

一种带有高稳定性亲水连接单元的喜树碱类药物及其偶联物

技术领域

本发明涉及一种带有高稳定性亲水连接结构单元的喜树碱类抗体药物偶联物。

背景技术

抗体药物偶联物(ADC)作为新型的靶向药物,一般由三部分组成:抗体或抗体类配体,小分子药物以及将配体和药物偶联起来的连接子。抗体药物偶联物利用抗体对抗原的特异性识别,将药物分子运输至靶细胞附近并有效释放药物分子,达到治疗目的。2011年8月,美国食品药品监督管理局(FDA)批准西雅图基因公司研制的用于治疗霍奇金淋巴瘤以及复发性变性大细胞淋巴瘤(ALCL)的ADC新药 Adcetris™上市,临床应用已经证明了此类药物的安全性和有效性。

喜树碱类药物作为抗肿瘤性的小分子化合物,已知作为抑制DNA拓扑异构酶I而呈现抗肿瘤作用,包括伊立替康,依喜替康,SN38等。许多喜树碱类药物已在临床中广泛应用,主要适应症为骨癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌等。与目前临床使用的伊立替康不同,依喜替康不需要通过利用酶进行活化。另外,与作为伊立替康的药效本体的SN-38、同在临床中使用的拓扑替康相比,拓扑异构酶I抑制活性更强,在体外针对多种癌细胞具有更强的伤细胞活性。尤其是,对于通过P-糖蛋白的表达面对SN-38等显示耐性的癌细胞也显示效果。依喜替康作为单独化疗药物尚未成功上市,推测与其较高的细胞活性相关,导致治疗窗口窄。

抗体药物偶联物(ADC)类药物的优势在于增加水溶性,提高靶向性,特异性抗体与抗原的结合,将药物携带至靶细胞周围,通过在靶细胞附近释放药物,有效杀灭肿瘤细胞,降低毒副作用。喜树碱类药物在ADC药物中具有可观的应用前景,目前以依喜替康为毒素的抗体偶联药物 trastuzumab deruxtecan(商品名为 Enhertu)已于2019年12月20日被美国FDA获批上市,作为第一个上市的喜树碱类ADC药物,很好证明了此类药物在ADC领域的成药能力和应用前景。

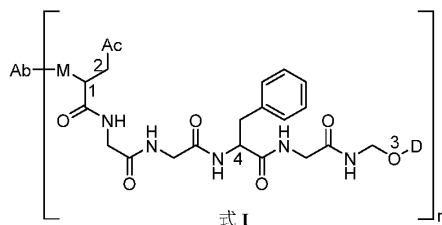
ADC药物结构中包括了抗体,连接子,及毒素三个关键部分。任何一部分的缺陷都可能影响ADC的整体药效。在本领域,Enhertu的结构设计缺陷是显而易见的:喜树碱为一类高脂溶性,难溶性药物,Enhertu采用的连接子-毒素设计为通过Mc接头与抗体连接,连接可酶切的四肽片段,搭配氨甲氧基自我消除的间隔单元,采用链间半胱氨酸残基以非定点偶联技术实现药物-抗体比例(DAR)为8(参考专利CN104755494)。该连接子的设计,在高DAR值下,将导致喜树碱类ADC药物稳定性降低,单体率降低,进一步降低ADC的体内药效和安全性。

本专利所需要解决的技术问题，就是探索发现更优的抗肿瘤喜树碱类 ADC 药物，使其具有更高的安全性、有效性，更好满足临床需求。

发明内容

发明人在对 ADC 类药物综合理解的基础上，意外的发现了一系列带有高稳定性的亲水多肽类连接结构单元的喜树碱类衍生物的抗体药物偶联物，通过实验发现，搭载该多肽类连接子的喜树碱各类衍生物 ADC 分子在体内外表现出很高的稳定性，单体率高，相比于对照 ADC 具有明显更高的药效活性。同时，发明人通过合成路线的设计创新，创造的采用了全新的脱保护试剂和溶剂策略，可以高效的获得该复杂连接子-毒素分子。

本发明的一个方面提供一种如式 I 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，



其中：

Ab 为配体单元，选自抗体、抗体片段或蛋白；

M 为连接单元与 Ab 连接；

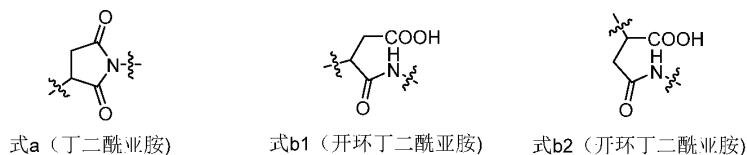
Ac 为亲水结构单元；

D 为任选的喜树碱类药物；

1 位及 4 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；

n 选自 1-20 的整数。

优选的，所述连接单元 M 具有如下式 a 所示的丁二酰亚胺或式 b1、式 b2 所示的开环丁二酰亚胺结构，



在式 a、式 b1 或式 b2 中，左侧波浪线表示与 Ab 连接位点相连，右侧波浪线表示与式 I 中已标示的 1 位叔碳原子连接位点相连。

进一步优选的，所述 Ac 具有如下式 c 所示结构，

3



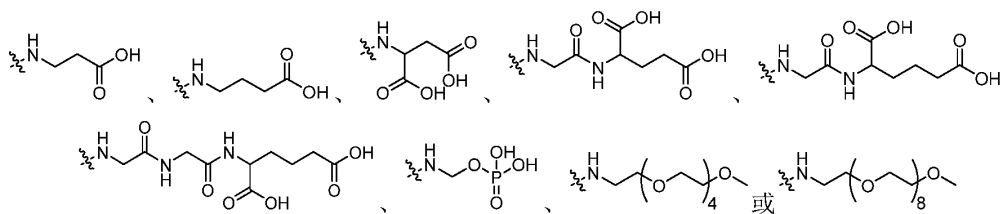
式 c

其中 X 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 为任意的连接氨基和 X 的支架；

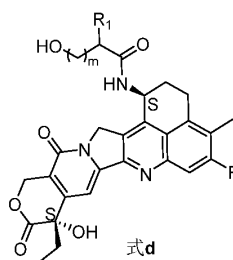
Ac 通过氨基官能团与结构式 I 中已标示的 2 位亚甲基碳相连。

更进一步优选，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，



其中左侧波浪线与 2 号碳原子相连。

本发明的另一个方面，提供具有如下式 d 所示结构的喜树碱类药物，



式 d

其中 R_1 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

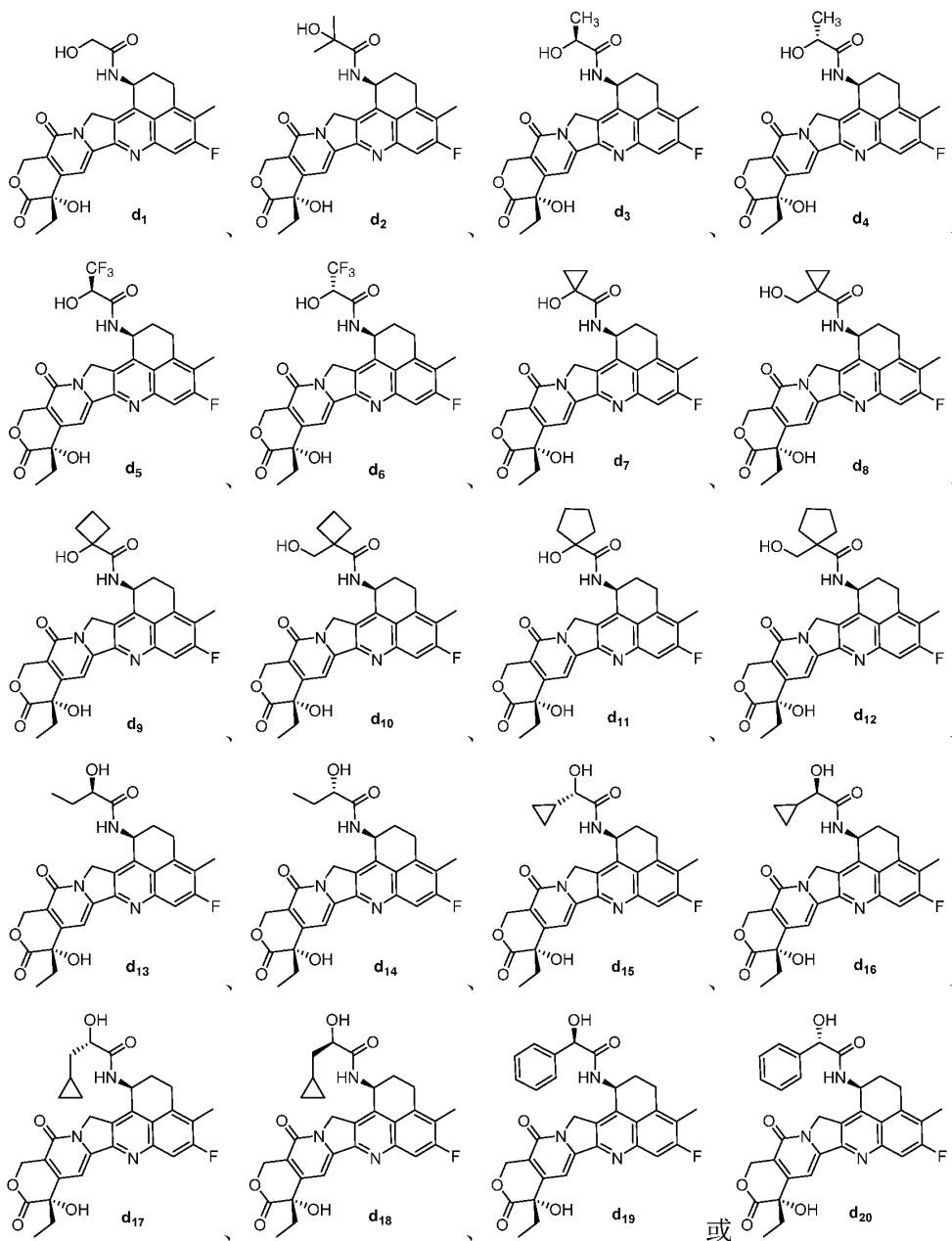
或者， R_1 及其所连接碳原子构成 C_{3-6} 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

R_1 相连手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性；

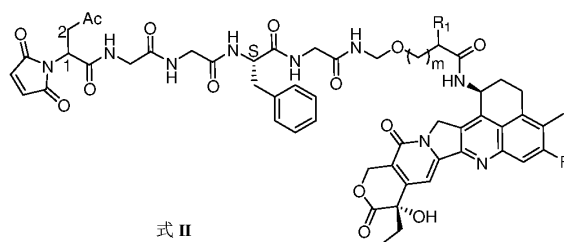
m 选自 0 或 1；

药物 d 分子中与 R_1 相连碳原子的羟基参与连接形成式 I 中的 3 位氧原子。

优选的，本发明提供的喜树碱类药物非限制性地选自以下化合物，



本发明的另一个方面提供一种具有如下式 II 所示的结构或其药学上可接受的盐，用于与配体 Ab 偶联形成式 I 所示的配体-药物偶联物的连接子-药物化合物，



其中 R_1 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

或者， R_1 及其所连接碳原子构成 C_{3-6} 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

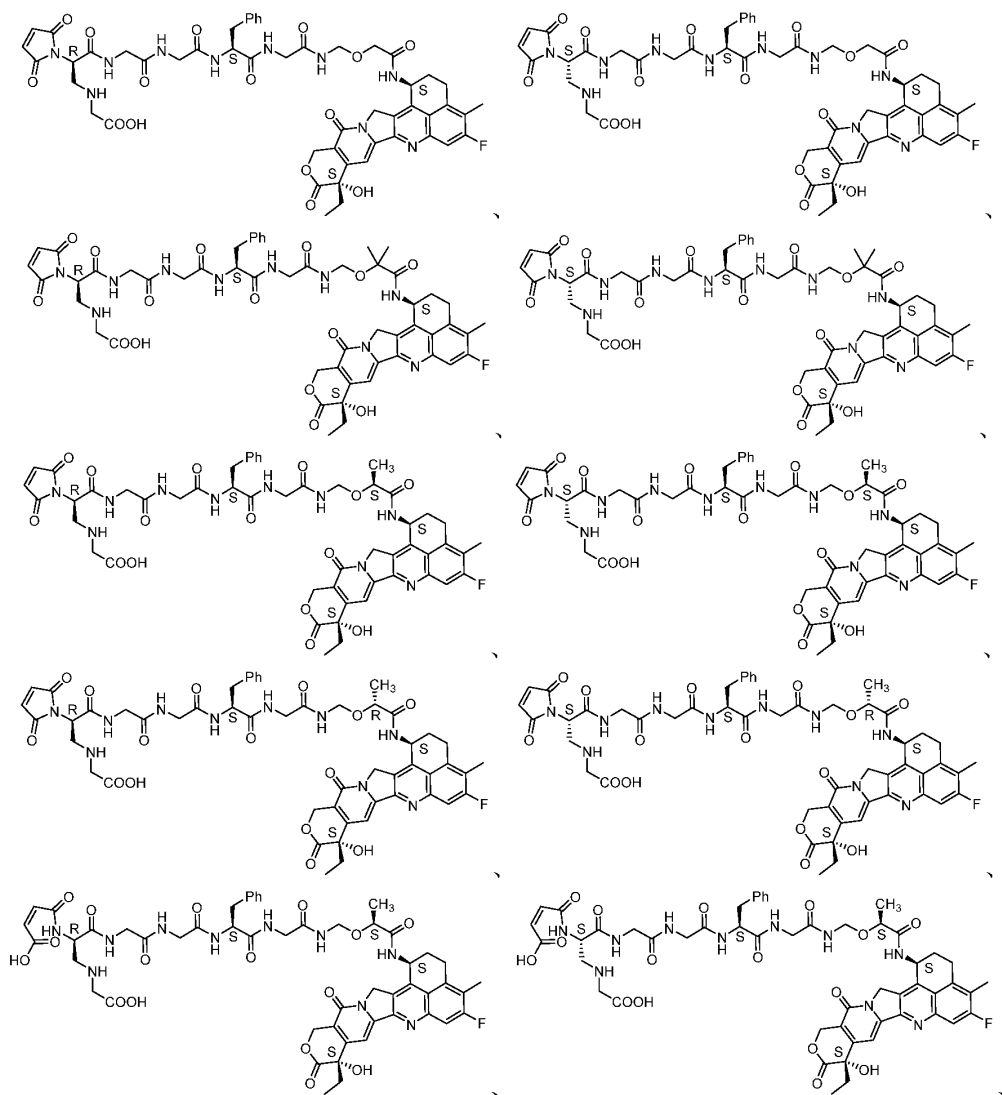
1 位手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性；

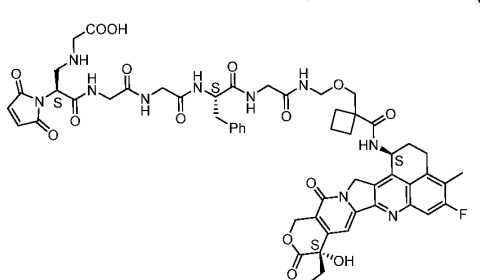
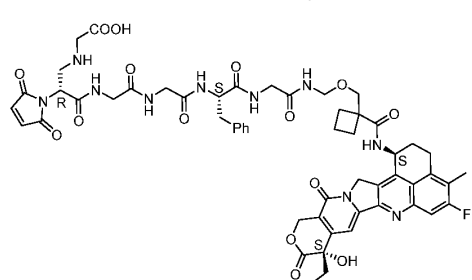
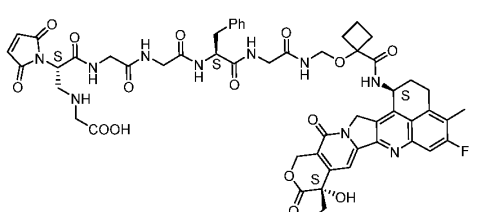
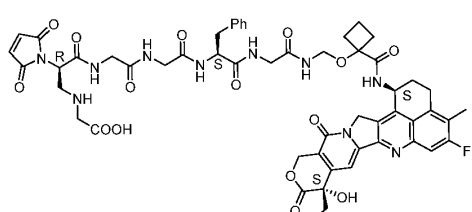
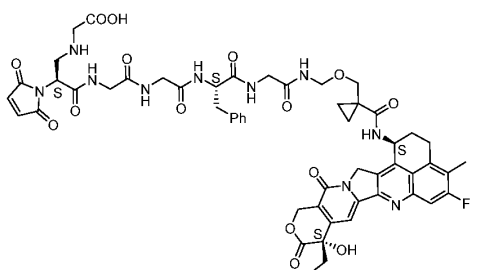
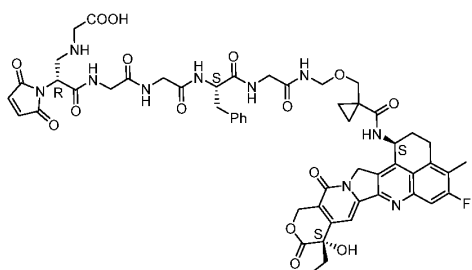
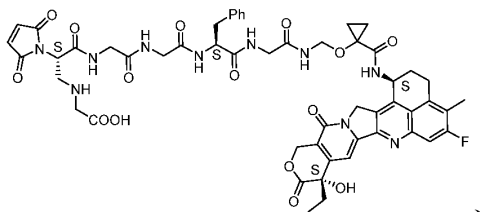
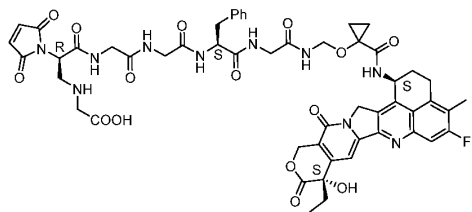
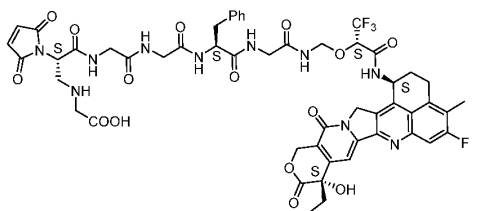
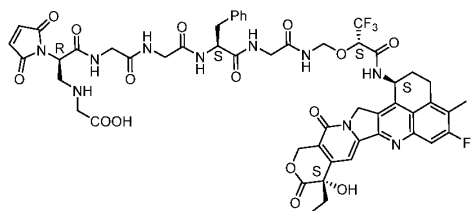
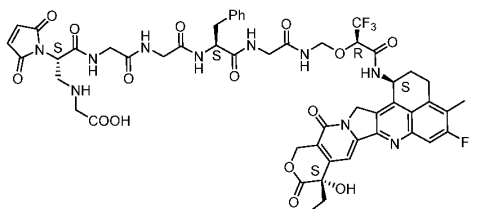
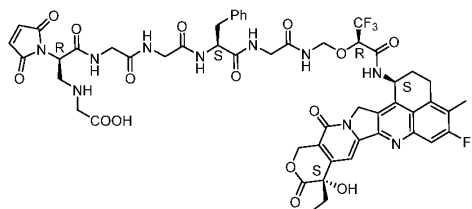
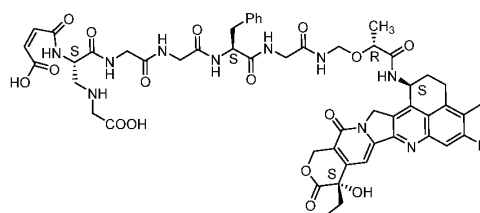
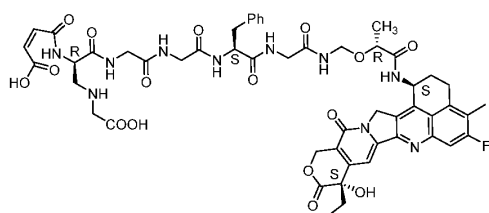
Ac 为亲水结构单元；

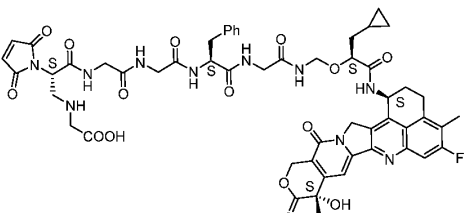
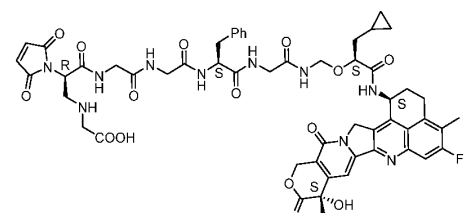
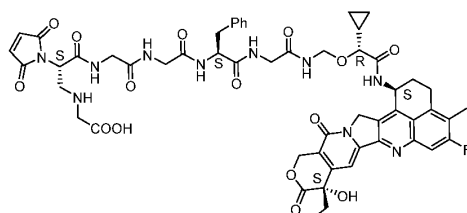
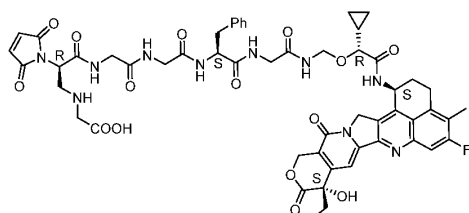
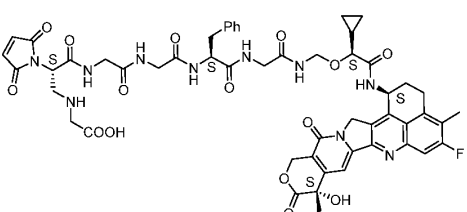
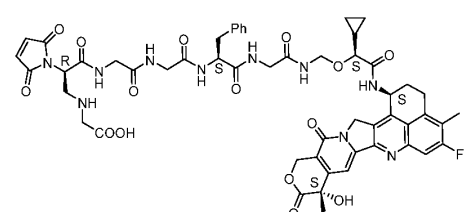
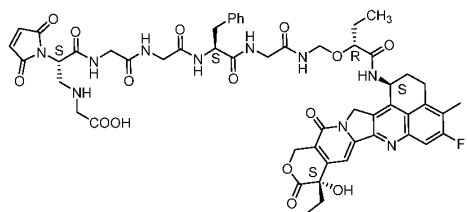
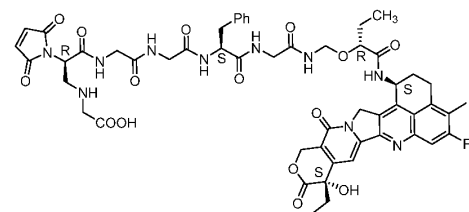
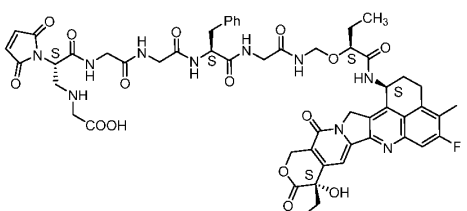
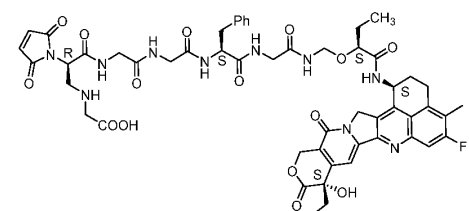
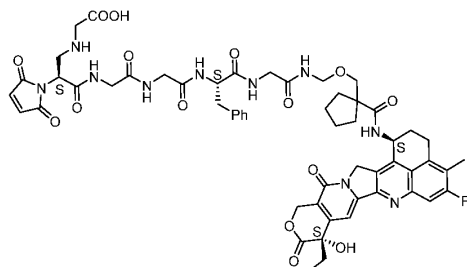
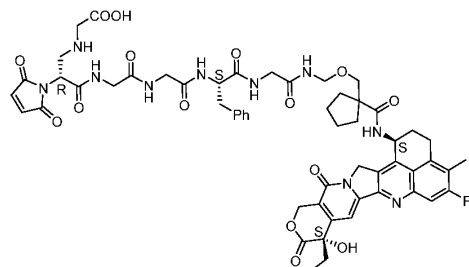
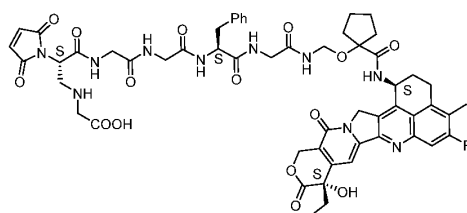
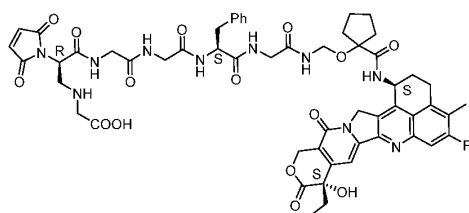
m 选自 0 或 1。

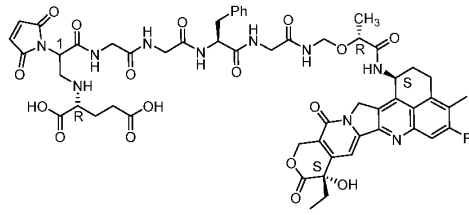
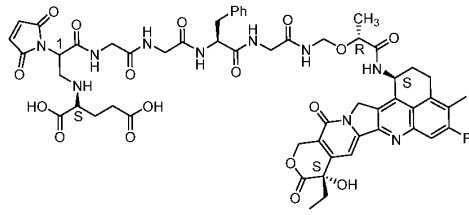
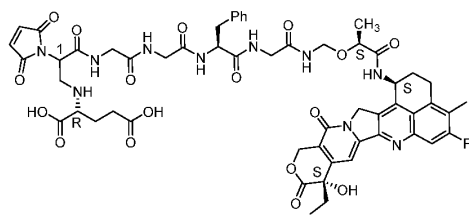
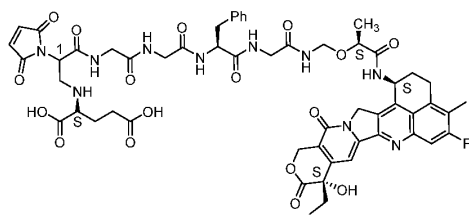
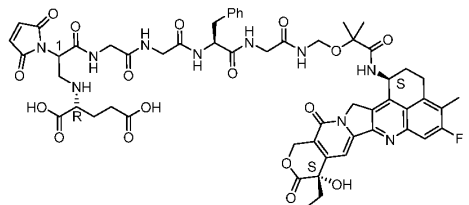
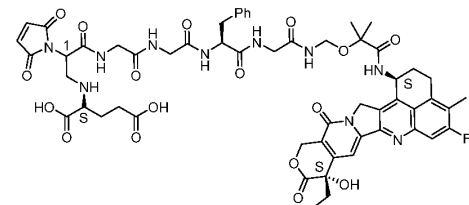
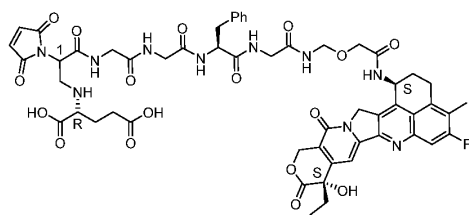
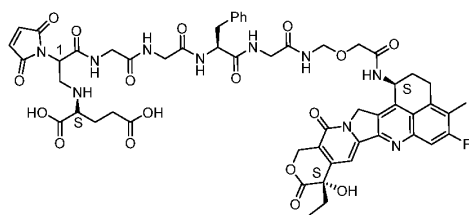
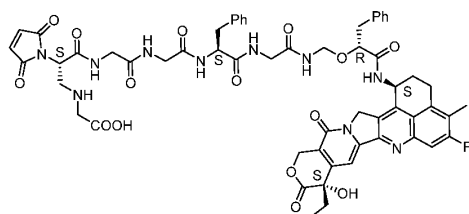
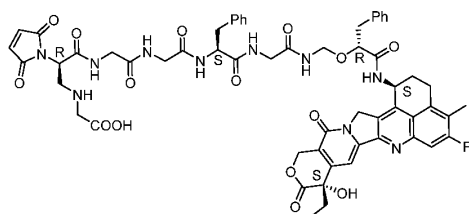
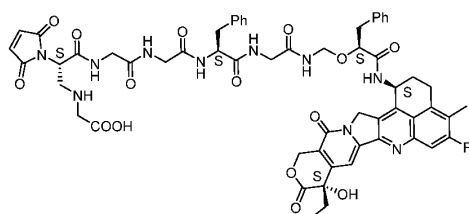
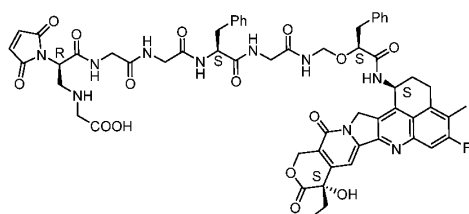
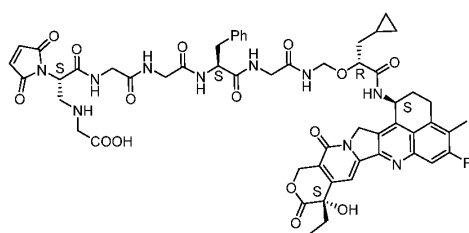
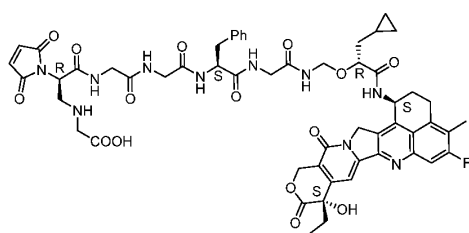
本发明的一个方面，所述 Ac 优选为甘氨酸、磷酸、聚乙二醇或(D/L)谷氨酸。

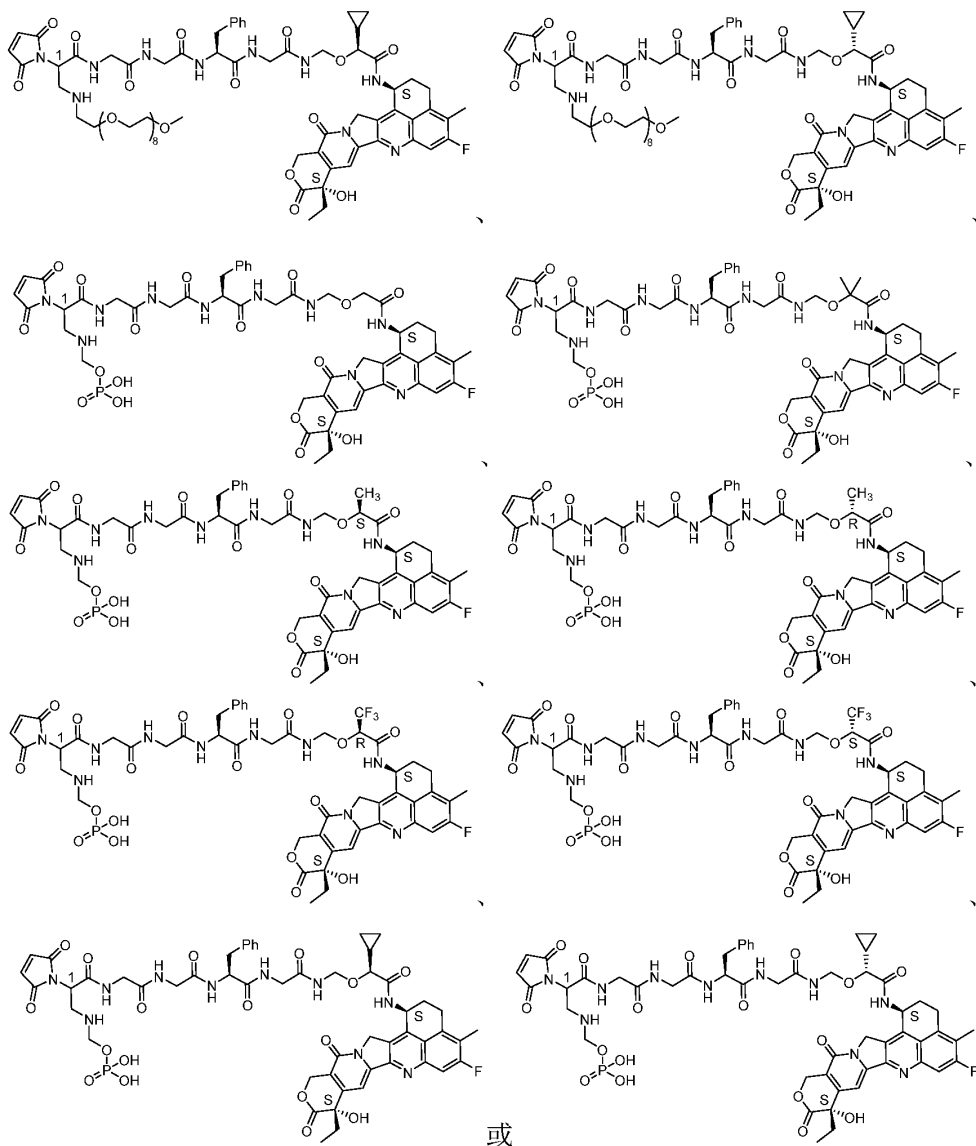
更进一步优选的，本发明提供的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐非限制性地选自以下结构，





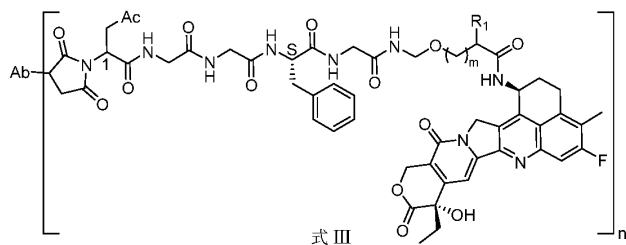


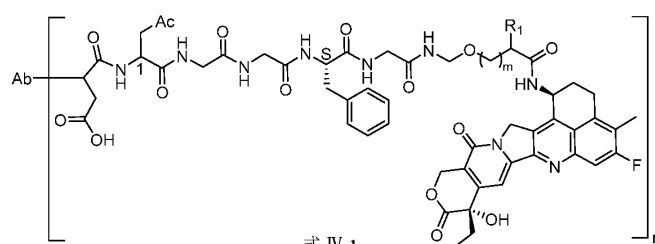




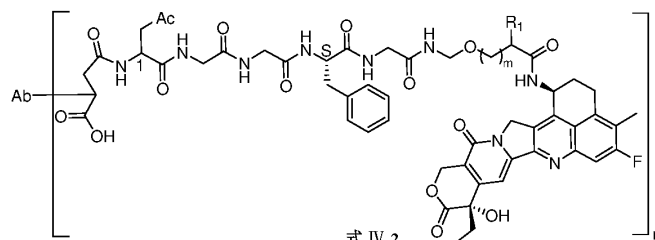
其中 1 位手性碳具有 **R** 绝对手性或 **S** 绝对手性两种构型。

本发明的另一个方面提供一种有如下式 **III**、式 **IV-1** 或式 **IV-2** 所示结构，





式 IV-1



式 IV-2

其中 Ab 为配体单元；

Ac 为亲水结构单元；

1 位手性碳具有 R 绝对手性或 S 绝对手性两种构型；

R₁、m 及 n 如式 II 所述。

优选的，本发明提供的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其特征在于：所述配体单元 Ab 选自抗体、抗体片段或蛋白，其中所述抗体选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人源抗体、抗体片段、双特异性抗体及多特异性抗体。

进一步优选地，所述抗体为单克隆抗体，非限制性地选自：抗 EGFRvIII 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 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、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、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、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 CD47 抗体、抗 CD138 抗体、抗 CD352 抗

体、抗 CD25 抗体或抗 CD123 抗体。

更进一步优选的，所述抗体或其抗原结合片段为曲妥珠单抗(Trastuzumab)，包含以下序列：

Light chain

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP
SRFSGSRSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC*;

SEQ ID NO:1

Heavy chain:

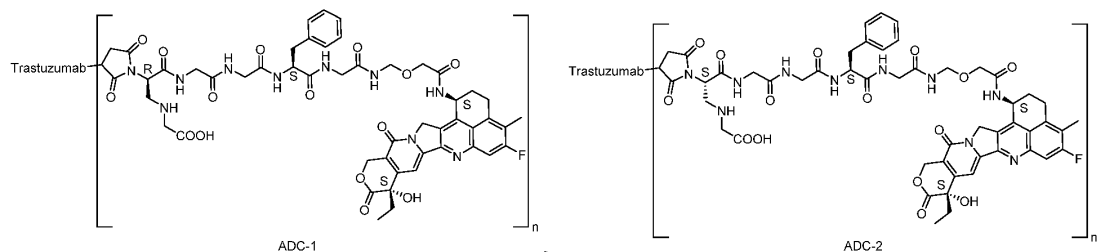
MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC

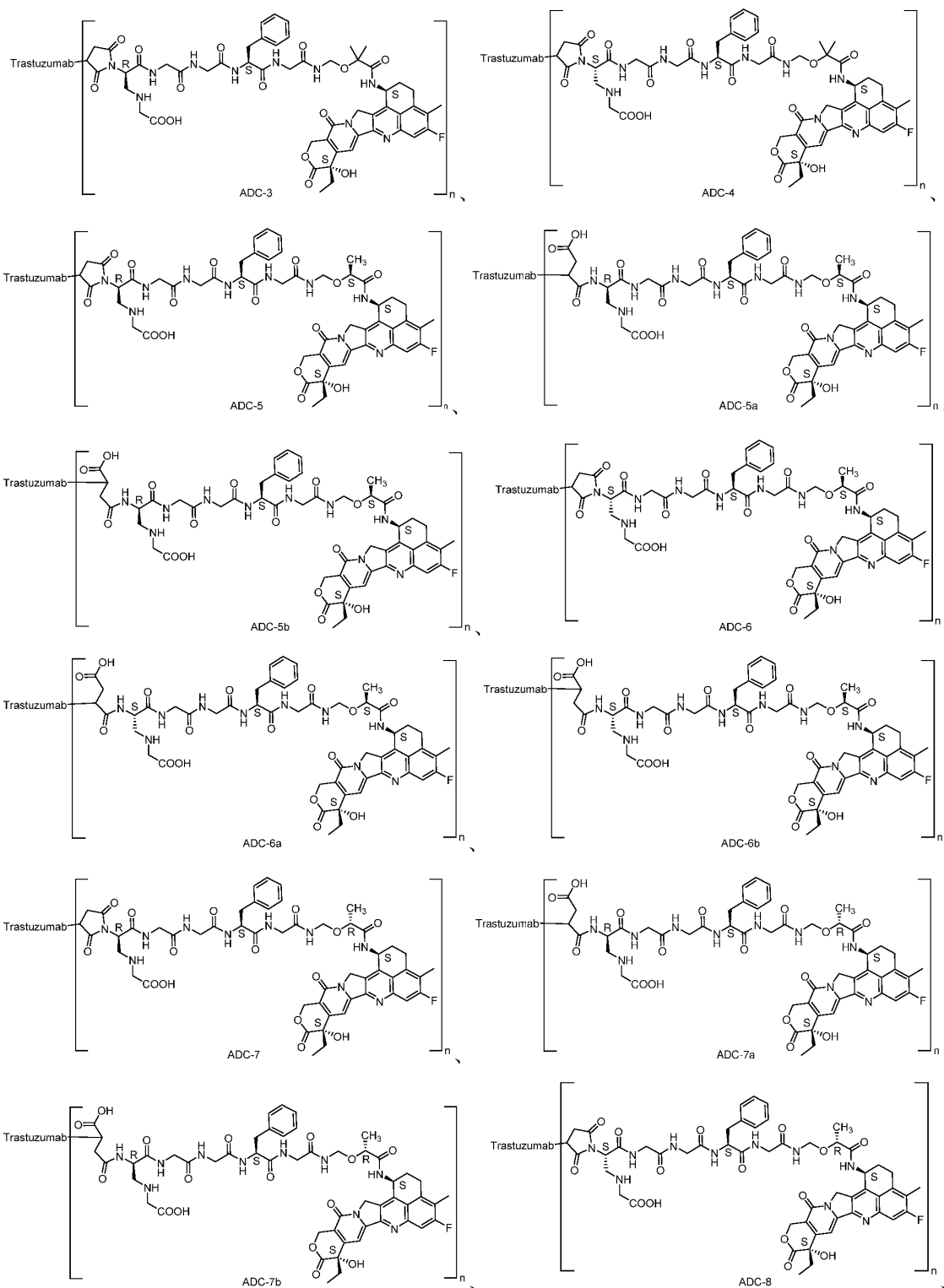
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS

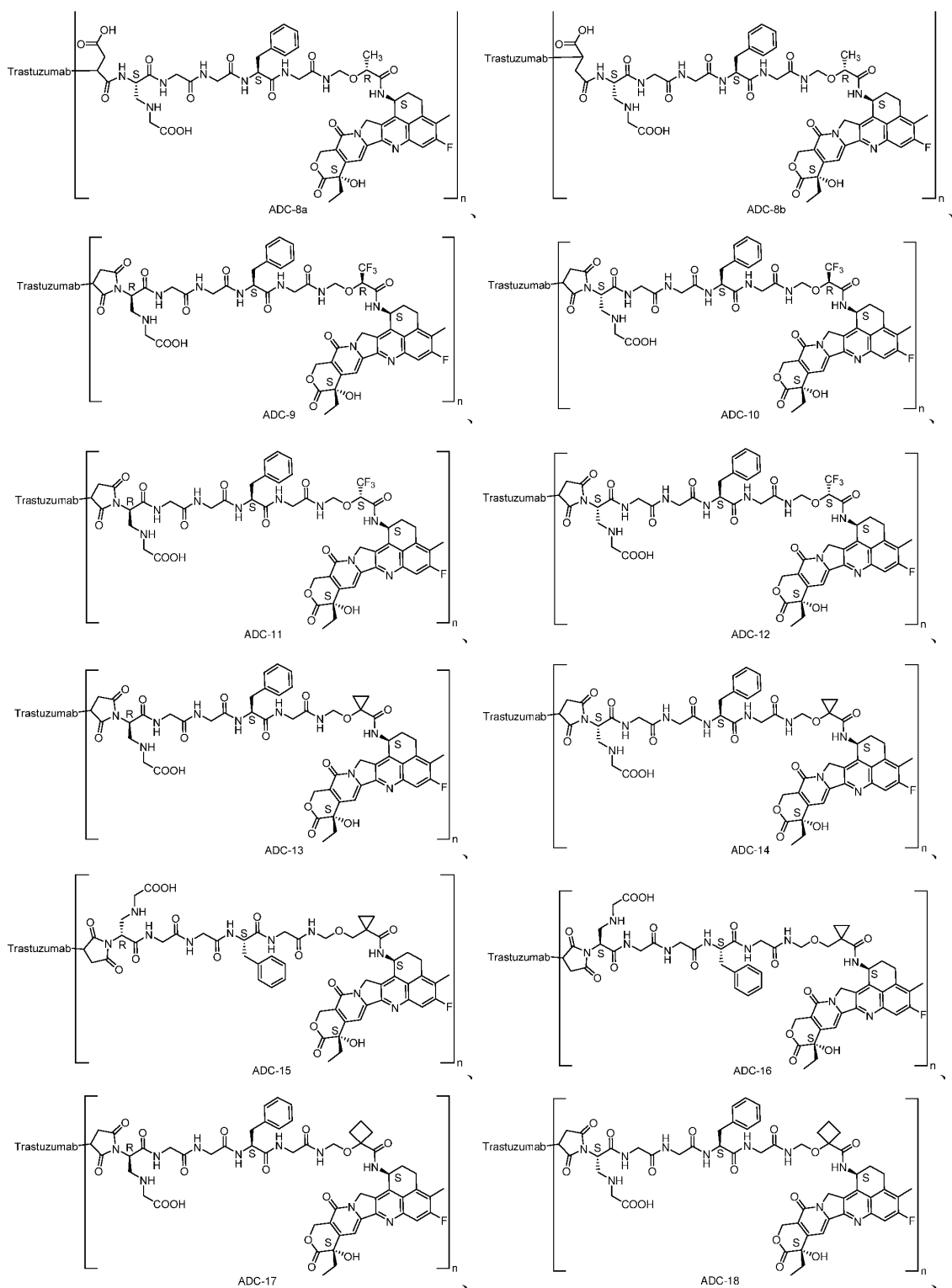
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG.

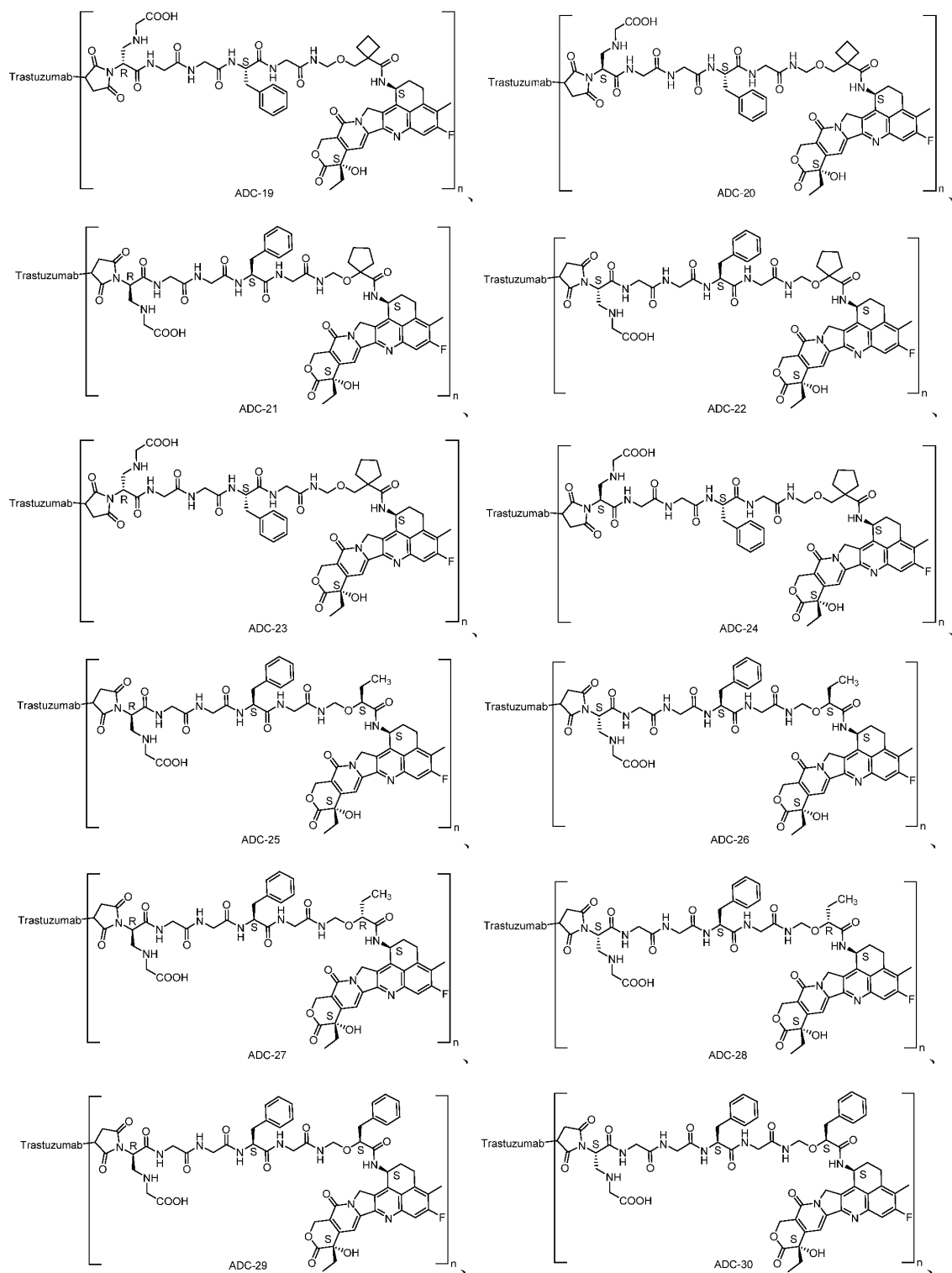
SEQ ID NO:2

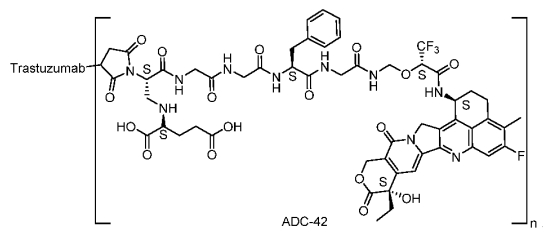
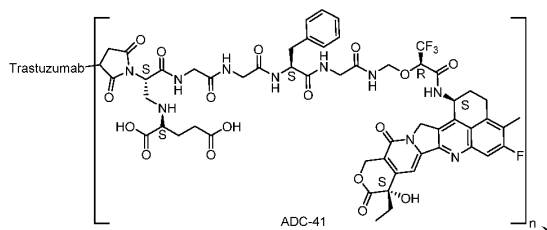
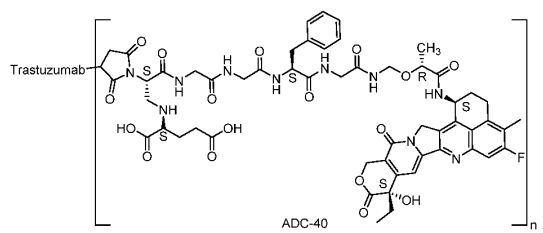
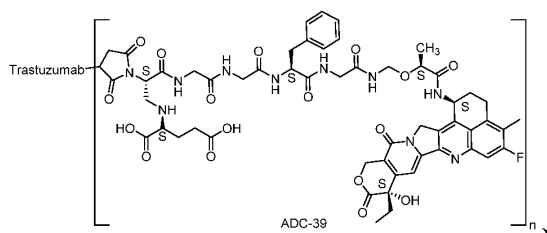
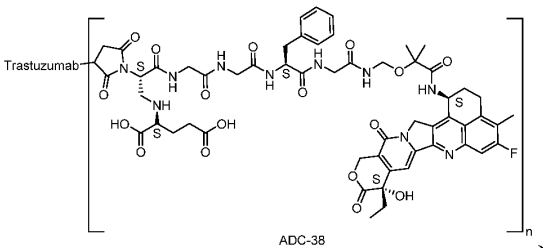
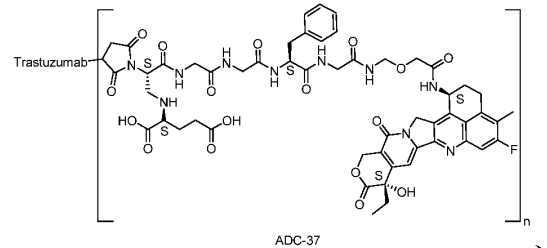
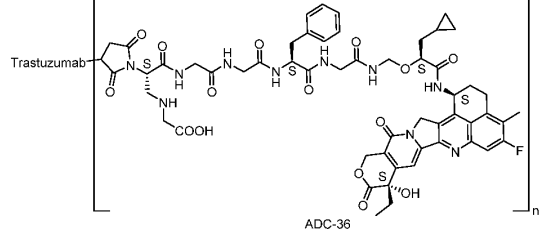
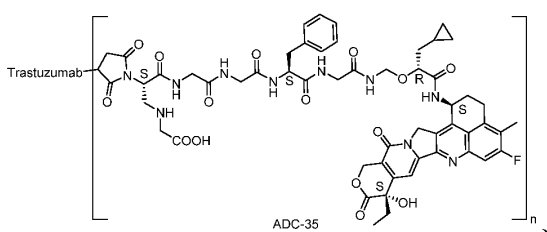
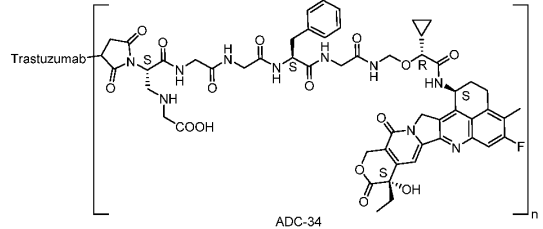
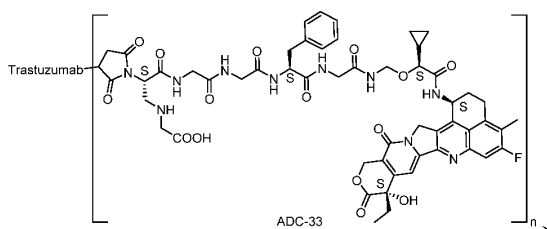
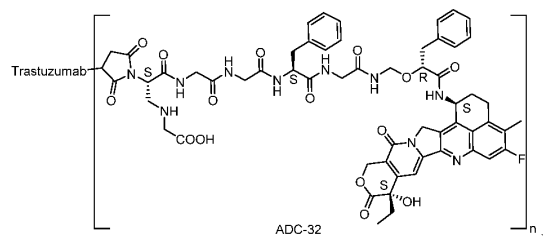
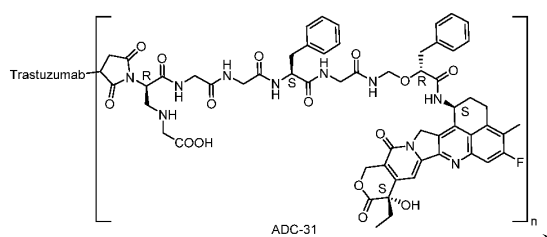
优选的，本发明提供的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其特征在于：所述配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐非限制性地选自以下结构或其丁二酰亚胺开环结构，

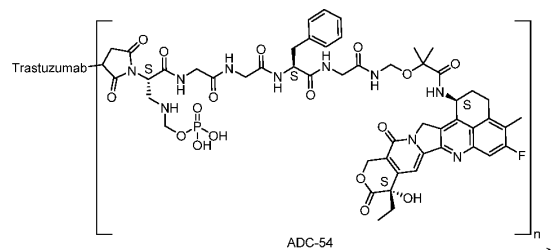
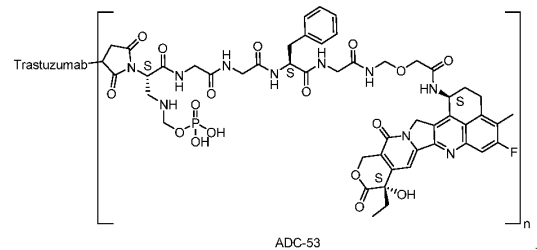
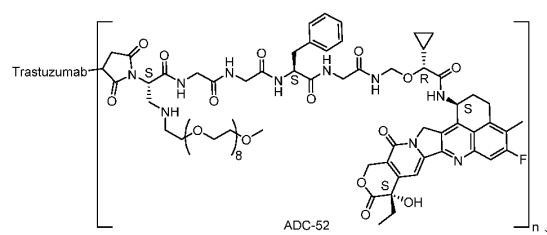
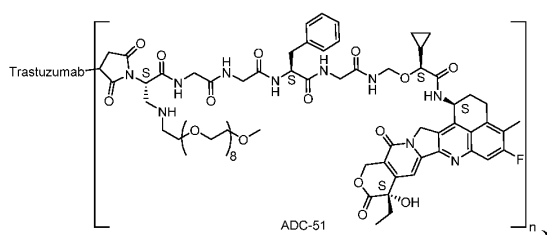
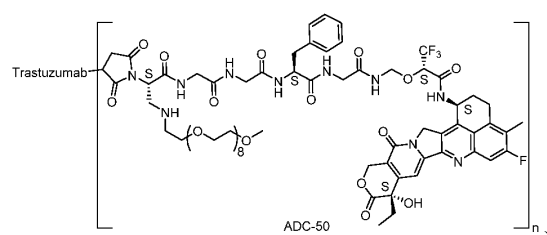
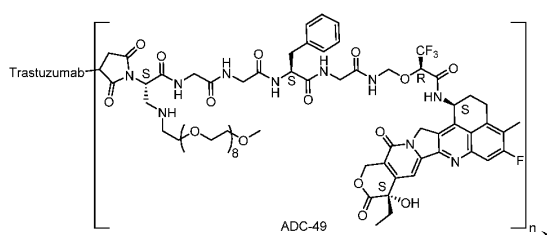
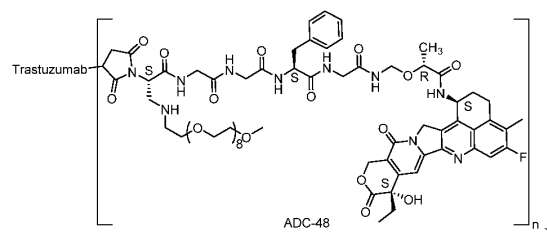
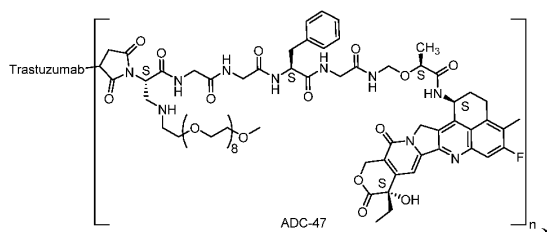
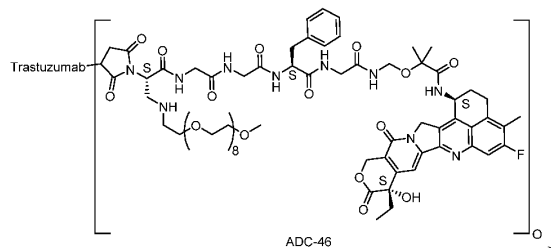
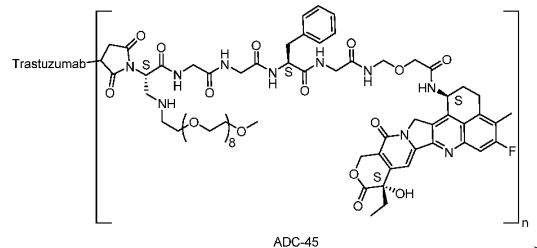
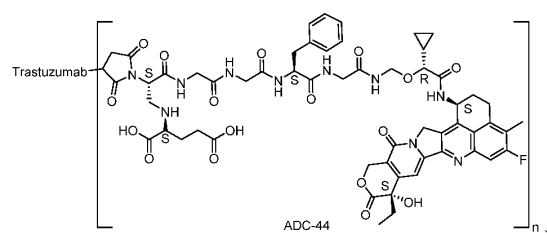
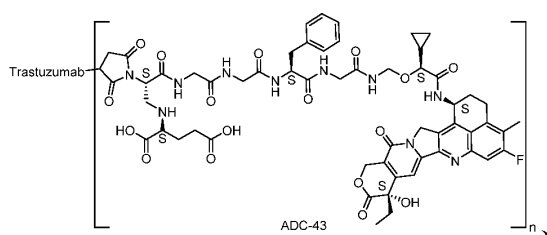


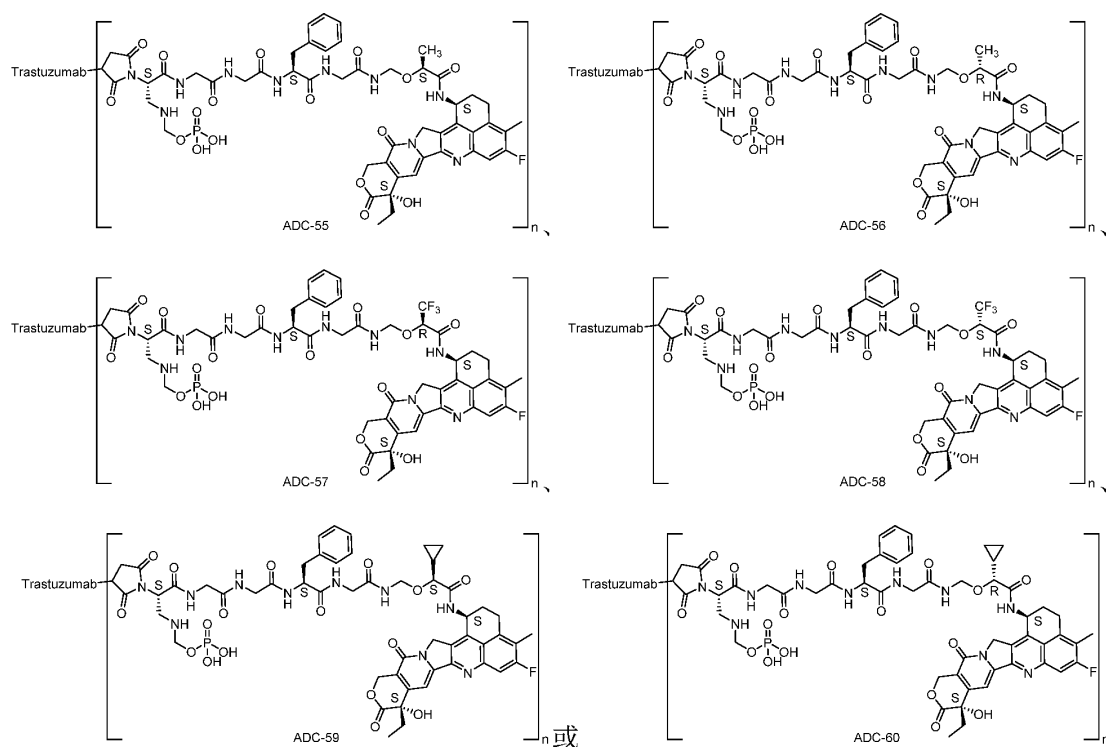






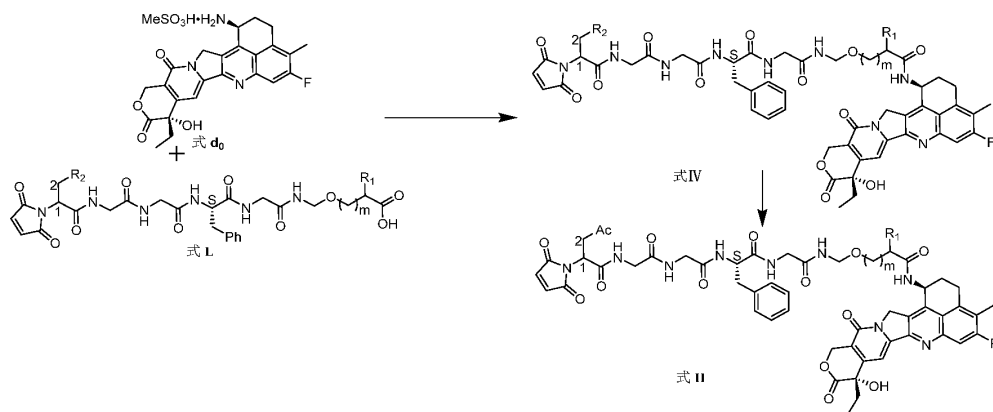






其中 n 选自 1-10 的整数。

本发明的另一个方面，提供一种制备连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐的方法，所述方法包含以下步骤，



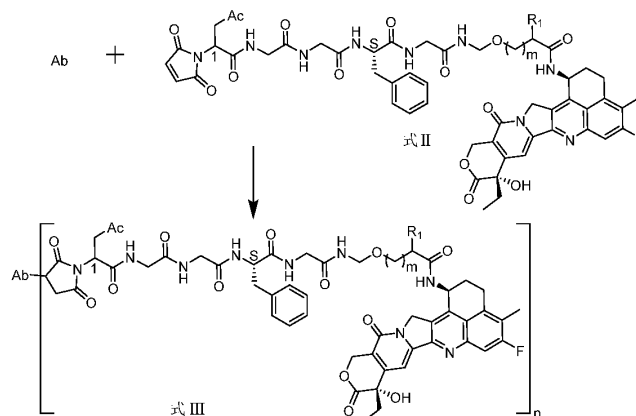
通式 L 化合物与式 d_0 依喜替康或其盐在缩合剂存在下，在任选的碱性条件下反应，得到式 IV 化合物，进一步转化为式 II 所示结构；

其中 1 位及 R_1 相连手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性；

R_2 为任意的可转化为 Ac 的结构；

Ac 、 R_1 、 m 如式 II 所定义。

本发明的另一方面提供一种制备配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法，所述方法包含以下步骤，



修饰配体单元 Ab 后，与式 II 通过偶联反应得到式 III 所示配体-药物偶联物；

其中 Ab 选自抗体、抗体片段或蛋白；

Ac 选自亲水结构单元；

1 位及 R_1 相连手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性；

R_1 、m 及 n 如式 II 所述。

本发明的另一个方面，提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本发明药学上可接受的盐，所述的成盐形式包括与结构式中羧基官能团形成的钠盐、钾盐、钙盐或镁盐以及与结构中含氮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。

本发明的另一个方面，提供一种配体-药物偶联物或其药学可接受的盐的药物组合物，在制备用于治疗肿瘤、自身免疫疾病或感染性疾病药物中的用途，并且所述的配体-药物偶联物的抗体特异性结合至所述肿瘤、自身免疫疾病或感染性疾病的靶细胞。

本发明的另一个方面，提供一种配体-药物偶联物或其药学可接受的盐在用于制备治疗乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、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的药物用途。

附图说明

- 图 1A. 本发明公开 Trastuzumab 单体率 SEC-HPLC 检测结果。
- 图 1B. 本发明公开 **ADC-2** 单体率 SEC-HPLC 检测结果。
- 图 1C. 本发明公开 **ADC-6** 单体率 SEC-HPLC 检测结果。
- 图 1D. 本发明公开 **ADC-10** 单体率 SEC-HPLC 检测结果。
- 图 1E. 本发明公开 **ADC-12** 单体率 SEC-HPLC 检测结果。
- 图 1F. 本发明公开对照组 **ADC-61** 单体率 SEC-HPLC 检测结果。
- 图 2A. 本发明公开 **ADC-02** 的 DAR(药物抗体偶联比)值 RP-HPLC 检测结果。
- 图 2B. 本发明公开 **ADC-06** 的 DAR(药物抗体偶联比)值 RP-HPLC 检测结果。
- 图 2C. 本发明公开 **ADC-10** 的 DAR(药物抗体偶联比)值 RP-HPLC 检测结果。
- 图 2D. 本发明公开 **ADC-12** 的 DAR(药物抗体偶联比)值 RP-HPLC 检测结果。
- 图 2E. 本发明公开对照组 **ADC-61** 的 DAR(药物抗体偶联比)值 RP-HPLC 检测结果。
- 图 3. 本发明公开 ADC、单药及裸抗对 N87(人胃癌细胞)增殖抑制体外药效。
- 图 3A. 本发明公开 ADC 及裸抗对 N87(人胃癌细胞)增殖抑制体外药效。
- 图 3B. 本发明公开单药对 N87(人胃癌细胞)增殖抑制体外药效。
- 图 4. 本发明公开 ADC、单药及裸抗对 SK-BR-3(人乳腺癌细胞)增殖抑制体外药效。
- 图 4A. 本发明公开 ADC 及裸抗对 SK-BR-3(人乳腺癌细胞)增殖抑制体外药效。
- 图 4B. 本发明公开单药对 SK-BR-3(人乳腺癌细胞)增殖抑制体外药效。

具体实施方式

缩写和定义

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

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

除非另有说明，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、通用药物和活性药物成分。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

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额半胱氨酸残基（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）。

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。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。

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 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分子毒素或酶活性毒素，放射性同位素（例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu^{176} 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“喜树碱类药物”指具有细胞毒性的喜树碱及其衍生物，非限制性地选自 10-羟基喜树碱、SN38(7-乙基-10-羟基喜树碱)、拓扑替康、依喜替康、伊立替康或 9-硝基-10-羟基喜树碱及其衍生物或药学上可接受的盐。

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。

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。

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配体-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）。

术语“配体-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，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、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、未取代的芳基、由 1-3 个卤素取代的芳基、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“杂烷基”指含有一个或多个选自 N、O 或 S 的杂原子的烷基，其中烷基如上所定义。

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。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，优选包含 3 至 12 个碳原子，更优选包含 3 至 10 个碳原子，最优选包含 3 至 8 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

术语“杂环基”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，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 S(O)_m (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子，其中 1~4 个是杂原子；

更优选环烷基环包含 3 至 10 个环原子。单环杂环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。

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

术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代，其中烷基如上所定义。

术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代，其中烷基如上所定义。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

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。

术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的 6 至 14 元全碳单环或稠合多环(即共享毗邻碳原子对的环)基团，优选为 6-10 元，例如苯基。芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为以下一个或多个基团，非限制性地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、氘原子、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、环烷硫基或杂环烷硫基。

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。

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、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、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、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；优选为曲妥珠单抗(Trastuzumab,商品名 Herceptin)、帕妥珠单抗(Pertuzumab,也被称作 2C4, 商品名 Perjeta)、尼妥珠单抗(Nimotuzumab, 商品名泰欣生)、Enoblituzumab、Emibetuzumab、Inotuzumab、Pinatuzumab、Brentuximab、Gemtuzumab、Bivatuzumab、Lorvotuzumab、cBR96 和 Glematumamab。

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打开的链间半胱氨酸巯基-SH 上和/或定点突变的半胱氨酸巯基-SH 上，一般的，偶联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。

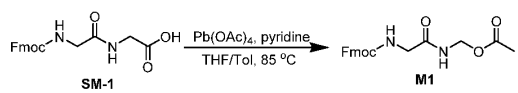
下面结合具体实施例，进一步阐述本发明，应理解，这些实施例只用于说明本发明，而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的试验方法，通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则所有的百分数、比例、比率、或份数按重量计。

除非另行定义，文中所使用的所有专业和科学术语用于与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。

此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

实施例 1

化合物 **M1** 的合成：

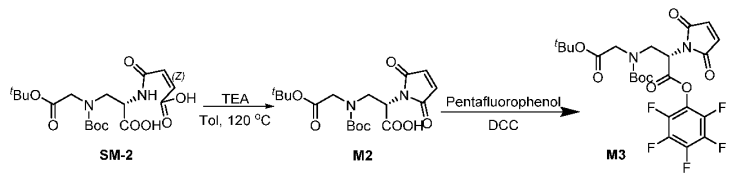


于 5000 mL 单口瓶中加入 *N*-苄氧羰基-甘氨酸-甘氨酸(100 g, 282 mmol, 1.0eq)，四乙酸铅(175 g, 553 mmol, 1.4 eq)，2000 mL 干燥四氢呋喃和 670 mL 甲苯，搅拌均匀，氮气保护，加热至 85 °C 反应 2.5 h。TLC 监控，原料反应完后，冷却至室温，过滤，滤液减压浓缩，残

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:

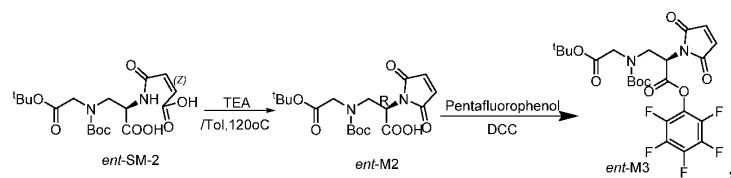


于 1000 mL 单口瓶中加入化合物 **SM-2**(按照专利 CN108452321A 公布的方法合成)(40 g, 96 mmol, 1.0 eq), 三乙胺(26.7 mL, 2.0 eq), 甲苯(400 mL), 升温至 120 °C 下回流反应 2h。TLC 监测基本完全反应, 降温至 50 °C 下减压旋除溶剂。用乙酸乙酯(150 mL), 水(40 mL)溶解, 冰浴搅拌下用 1M HCl 调 pH 至 2-3, 分液。水层用乙酸乙酯再萃取一次, 合并有机层, 加入无水硫酸钠干燥。过滤后, 浓缩得到淡黄色油状粗品, 粗品经柱层析纯化(DCM:MeOH=40:1), 得到化合物 **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-MS: $[M+H]^+=565.1$ 。

实施例 3

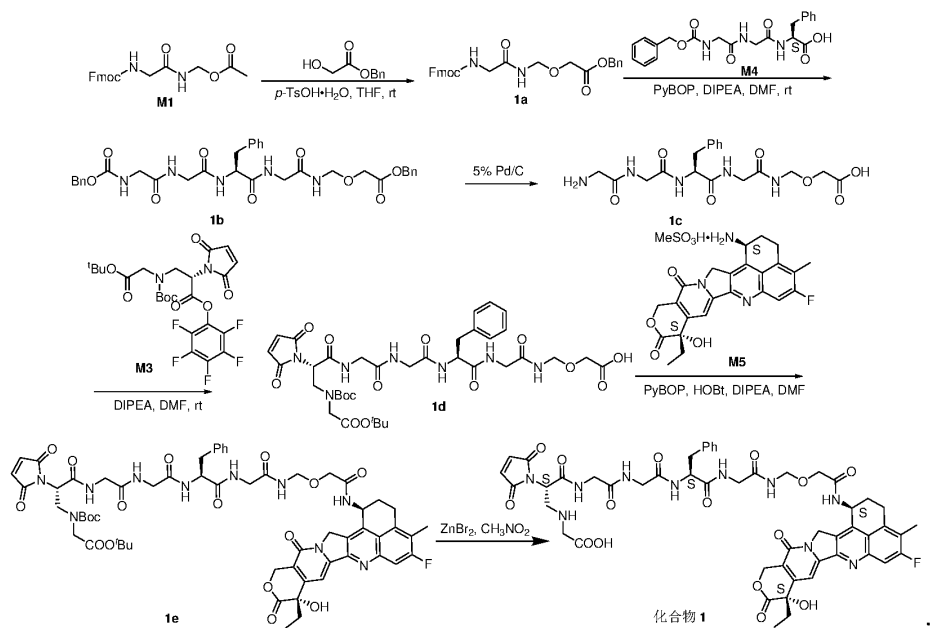
化合物 **ent-M3** 的合成:



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

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 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=10:1-5:1-1:1) 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；

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 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 **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: $[M+H]^+=804.4$ 。

第五步: 化合物 **1e**

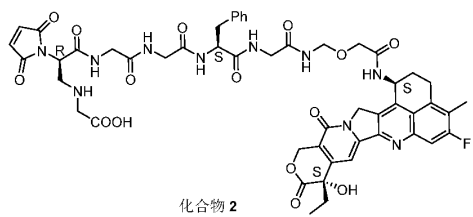
于 50 mL 单口瓶中加入 **1d** (500 mg, 0.62 mmol), **M5**(310 mg, 0.62 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBT(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **1e** 的制备液, 制备液冻干得到 **1e**(210 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1221.6$ 。

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 $^{\circ}$ 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 **1**(60 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1065.3$ 。

实施例 5

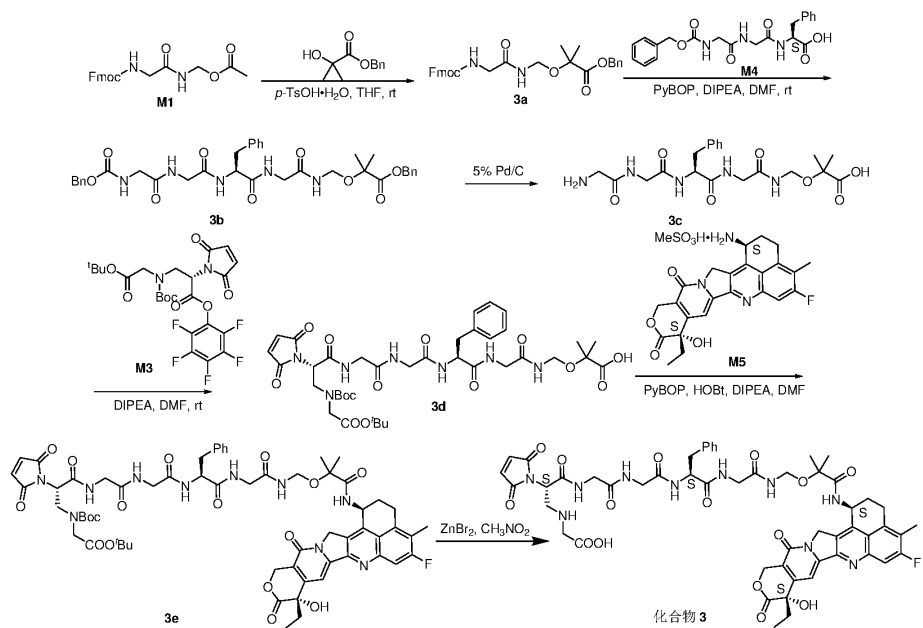
化合物 **2** 的合成:



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**

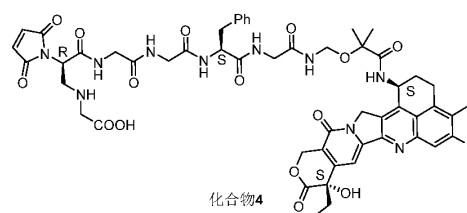
于 50 mL 单口瓶中加入 **3d** (300 mg, 0.36 mmol), **M5**(180 mg, 0.36 mmol), PyBOP(260 mg, 0.5 mmol), HOBt(67 mg, 0.5 mmol)及 10 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(219.5 μ L, 1.33 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **3e** 的制备液, 制备液冻干得到 **3e**(157 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1249.6$ 。

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 $^{\circ}$ 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 **3**(64 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1093.1$ 。

实施例 7

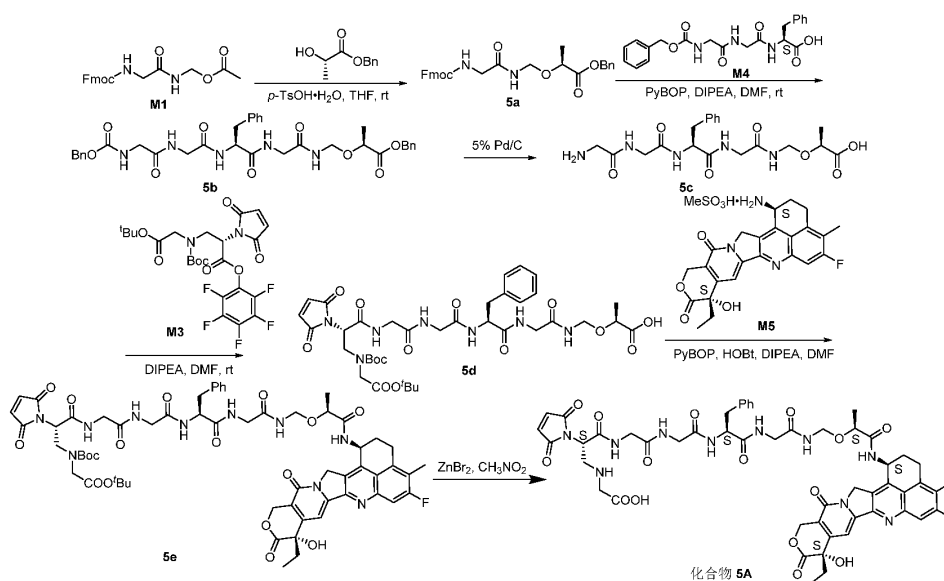
化合物 **4** 的合成:



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

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 NaHCO₃ 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, CDCl₃/CD₃OD): 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**

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 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, 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 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**

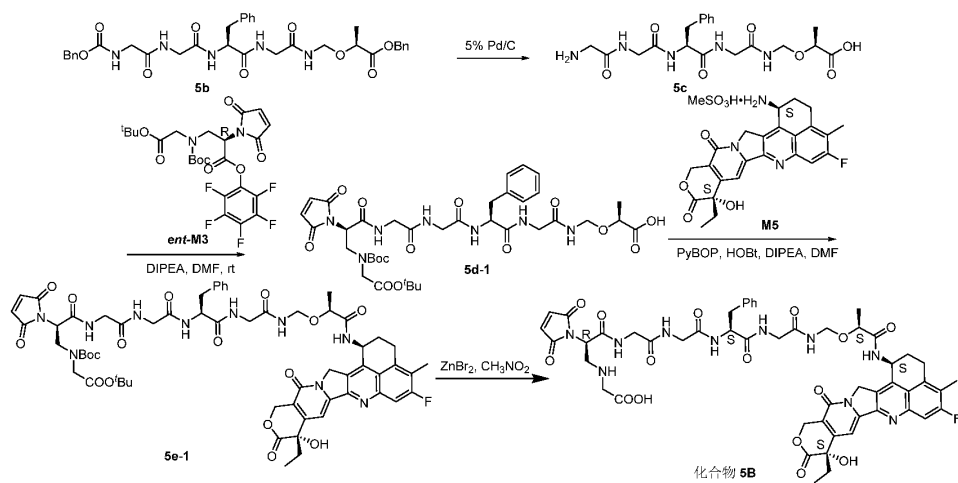
于 100mL 单口瓶中加入化合物 **5e**(1.0 g, 0.8 mmol, 1.0 eq), 35 mL 硝基甲烷, 溶解后再加入溴化锌(3.64 g, 16 mmol, 20.0 eq), 油浴 40 °C(提前预热稳定)反应 30 min, 水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去硝基甲烷, 得黄色残余物固体(采用 HPLC 监测)。经酸法制备, 得到化合物 **5A** 的制备液, 制备液经水泵减压水浴 35 °C 浓缩旋除乙腈, 冻干得到化合物 **5A**(786 mg)收率 90%。

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

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 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), 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**

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 °C, 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: $[M-H]^- = 816.3$ 。

第二步: 化合物 **5e-1**

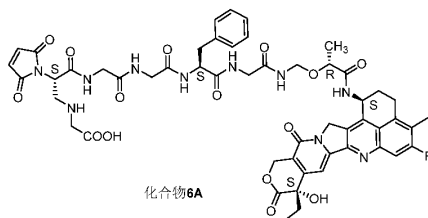
于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **5d-1**(200 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq)、**M5**(127 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq)、PyBOP(187 mg, 0.36 mmol, 1.2eq)、HOBT(48 mg, 0.36 mmol, 1.2 eq)及 DMF(6 mL), 冰水浴降至 0-5℃, 加入 DIPEA(62 mg, 0.48 mmol, 2.0 eq), 加毕, 升至 20±5℃ 反应 2 h, HPLC 监测反应结束。反应液直接 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **5e-1**(162.8 mg); LC-MS: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

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℃ 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 **5B**(73.4 mg), 收率 76.5%; LC-MS: $[M+H]^+ = 1079.4$ 。

实施例 10

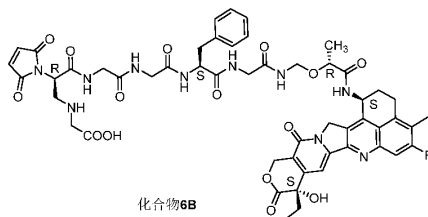
化合物 **6A** 的制备:



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

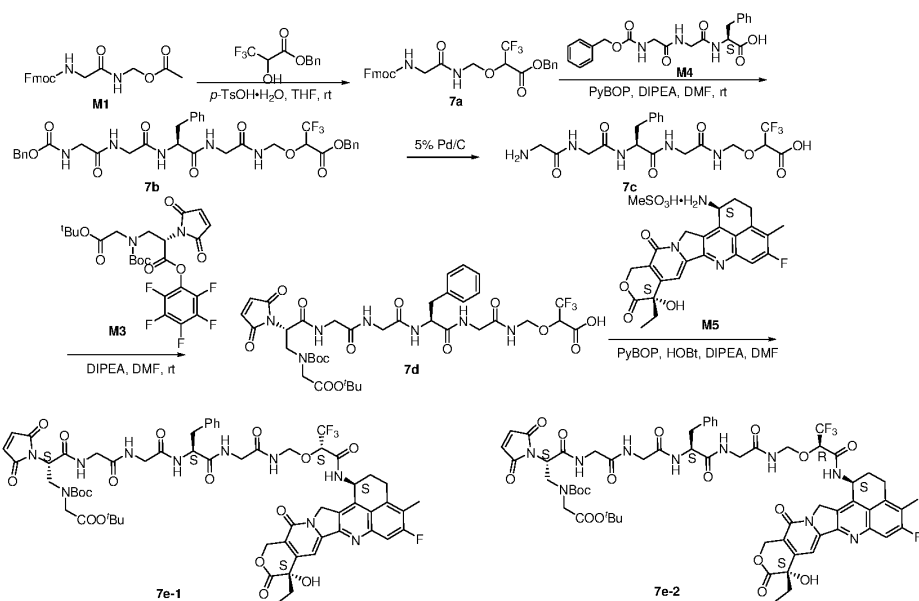
化合物 **6B** 的制备:



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

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: $[M+H]^+=716.25$ 。

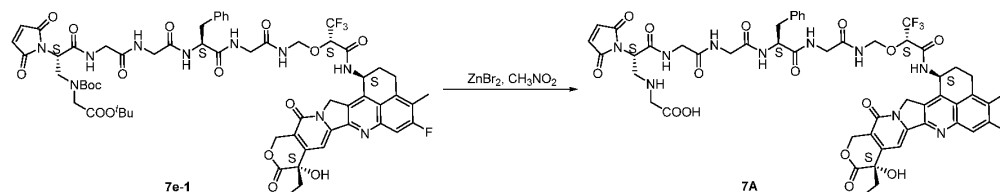
第三步：化合物 **7d**

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 μ L, 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**

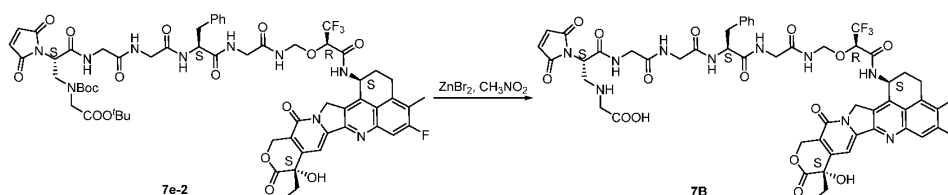
于 50 mL 单口瓶中加入 **7d**(500 mg, 0.57 mmol), **M5**(305 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86mmol), HOBt(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **7e-1** 和化合物 **7e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 150 mg 化合物 **7e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1289.46$; 220mg 化合物 **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 $^{\circ}$ 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 52 mg; TOF 结果: 1133.3613。

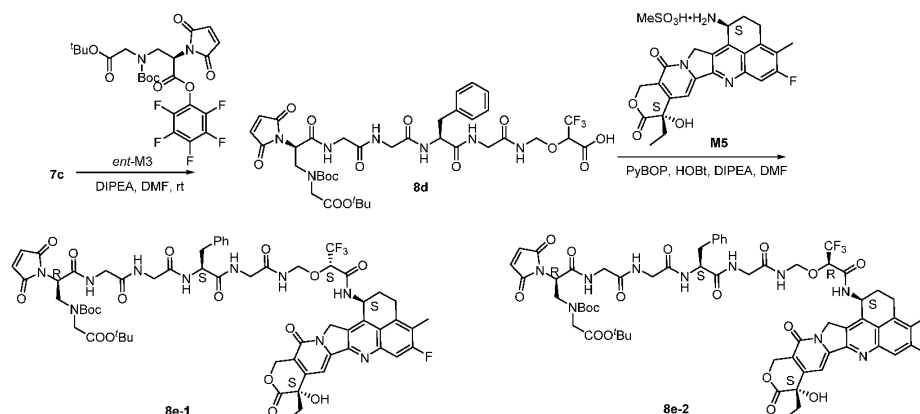
第六步: 化合物 **7B**



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 $^{\circ}$ 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 63 mg; TOF 结果: 1133.3668。

实施例 13

化合物 **8A** 和 **8B** 的合成:



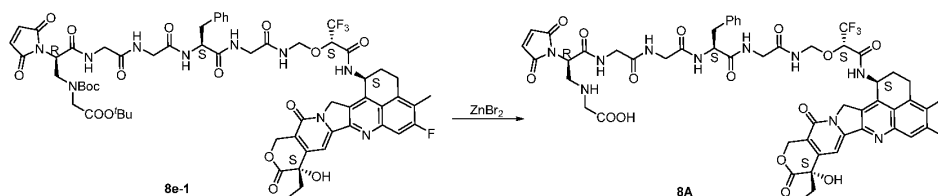
第一步：化合物 **8d**

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**

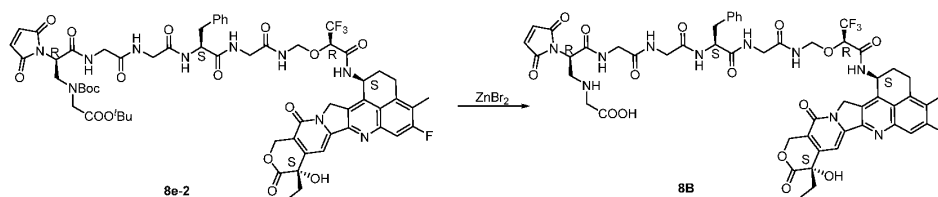
于 50 mL 单口瓶中加入 **8d**(500 mg, 0.57 mmol), **M5**(305 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBt(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **8e-1** 和化合物 **8e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 140 mg 化合物 **8e-1**, 210 mg 化合物 **8e-2**。化合物 **8e-1** 的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

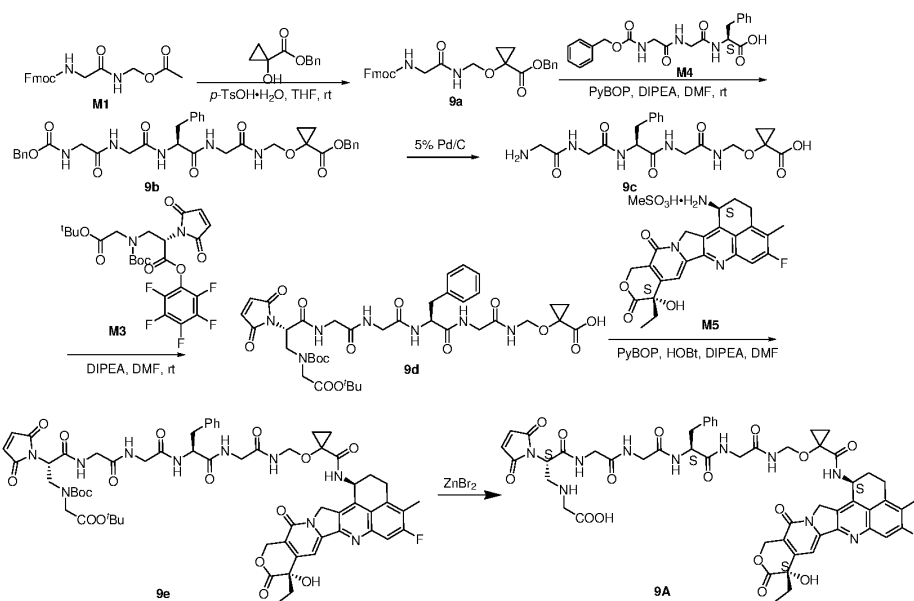
第四步：化合物 **8B**



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:



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。

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**

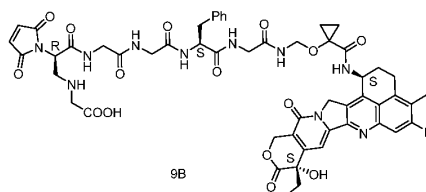
于 50 mL 单口瓶中加入 **9d** (500 mg, 0.6 mmol), **M5**(300 mg, 0.6 mmol), PyBOP(416 mg, 0.8 mmol), HOBt(108 mg, 0.5 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(351 μ L, 2.13 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **9e** 的制备液, 制备液冻干得到 **9e**(257 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1247.5$ 。

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 $^{\circ}$ 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 **9A**(55 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1091.3$ 。

实施例 15

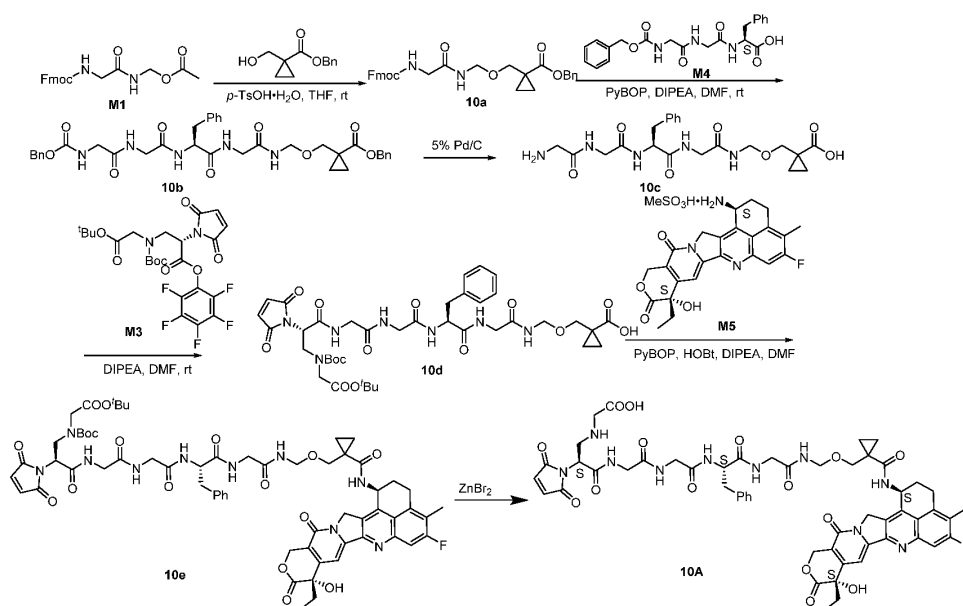
化合物 **9B** 的合成:



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 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 **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；

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。

第四步：化合物 **10d**

将粗产品 **10c** 置于冰水浴中，加入 DIPEA(258 uL, 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**

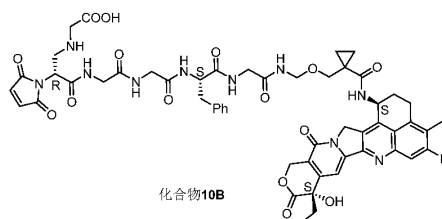
于 50 mL 单口瓶中加入 **10d** (400 mg, 0.48 mmol)，**M5**(240 mg, 0.48 mmol)，PyBOP(250 mg, 0.48 mmol)，HOBt(104 mg, 0.48 mmol)及 15 mL DMF，冰水浴下加入 DIPEA(330 uL, 2.0 mmol)，升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后，反应液经高效液相纯化，得化合物 **10e** 的制备液，制备液冻干得到 **10e**(188 mg)；LC-MS: [M+H]⁺=1261.5。

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。

实施例 17

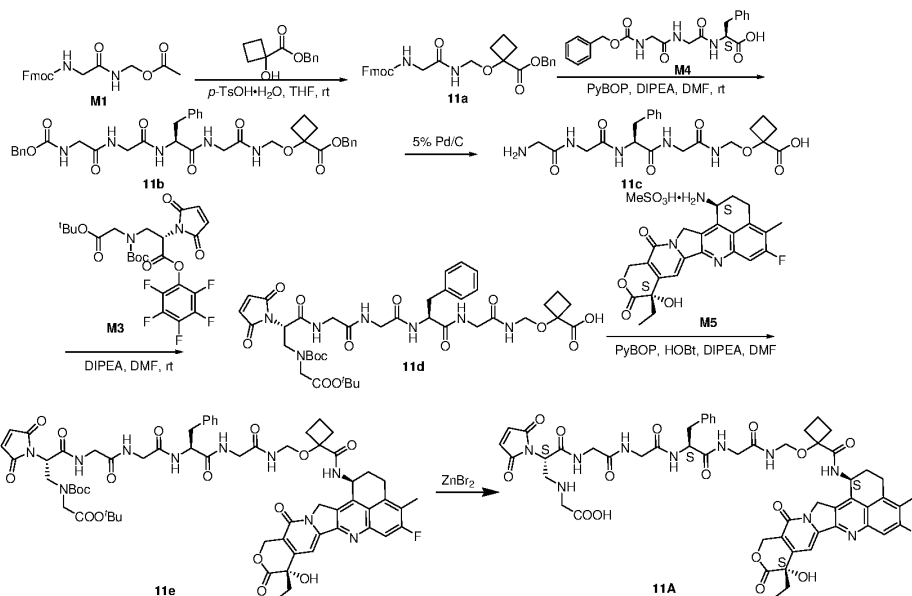
化合物 **10B** 的合成:



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

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(参照文献 *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, 56(13), 5541-5552. 公布的方法合成)(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 **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 μ L, 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

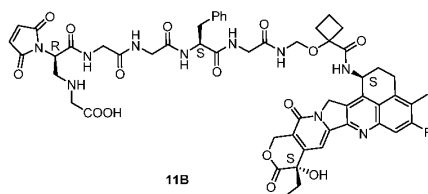
于 50 mL 单口瓶中加入 11d (800 mg, 0.96 mmol), M5(480 mg, 0.96 mmol), PyBOP(500 mg, 0.96 mmol), HOBt(208 mg, 0.96 mmol)及 30 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(660 μ L, 4.0 mmol), 升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 11e 的制备液, 制备液冻干得到 11e(401 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1261.4$ 。

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 $^{\circ}$ 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 11A(86 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

实施例 19

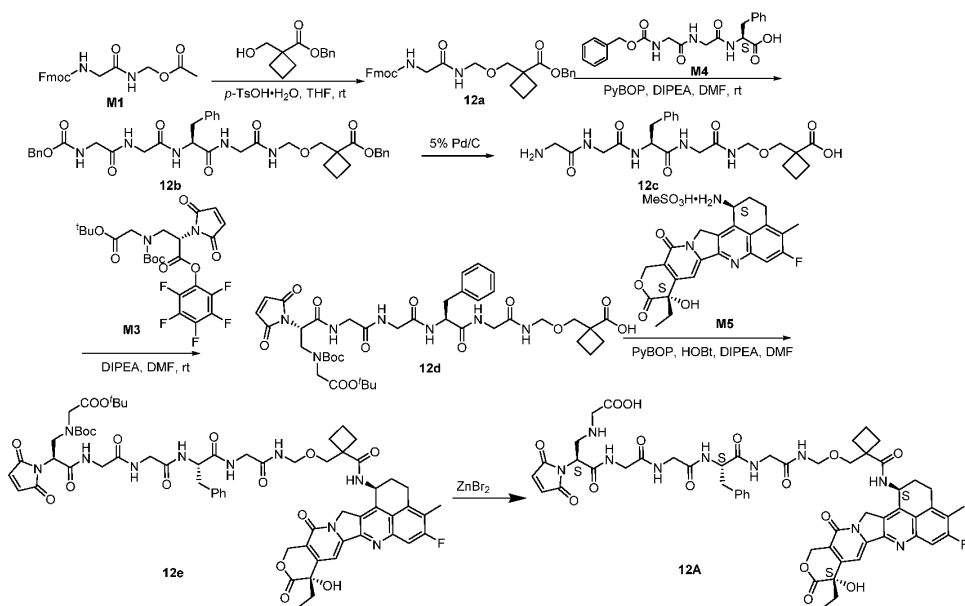
化合物 11B 的合成



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

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(参照专利 WO2009011285A1 公布的方法制备)(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 **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 μ L, 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**

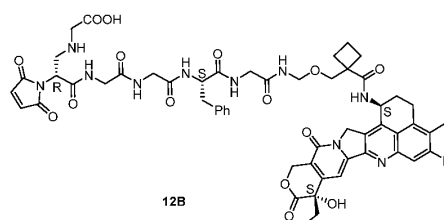
于 50 mL 单口瓶中加入 **12d** (400 mg, 0.47 mmol), **M5**(240 mg, 0.47 mmol), PyBOP(250 mg, 0.47 mmol), HOBT(101 mg, 0.47 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **12e** 的制备液, 制备液冻干得到 **12e**(198 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1275.4$ 。

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 $^{\circ}$ 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 **12A**(55 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1119.4$ 。

实施例 21

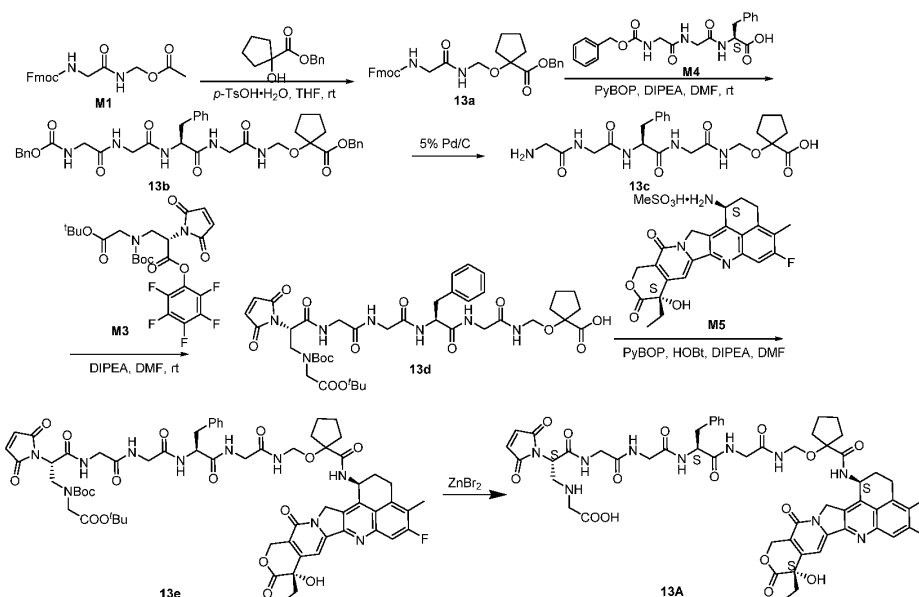
化合物 **12B** 的合成:



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(参照文献 *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, 56(13), 5541-5552. 公布的方法合成)(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**

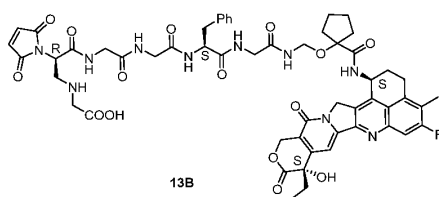
于 50 mL 单口瓶中加入 **13d** (400 mg, 0.47 mmol)，**M5**(240 mg, 0.48 mmol)，PyBOP(250 mg, 0.48 mmol)，HOBt(103 mg, 48 mmol)及 15 mL DMF，冰水浴下加入 DIPEA(330 uL, 2.0 mmol)，升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后，反应液经高效液相纯化，得化合物 **13e** 的制备液，制备液冻干得到 **13e**(187 mg)；LC-MS: [M+H]⁺=1275.5。

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

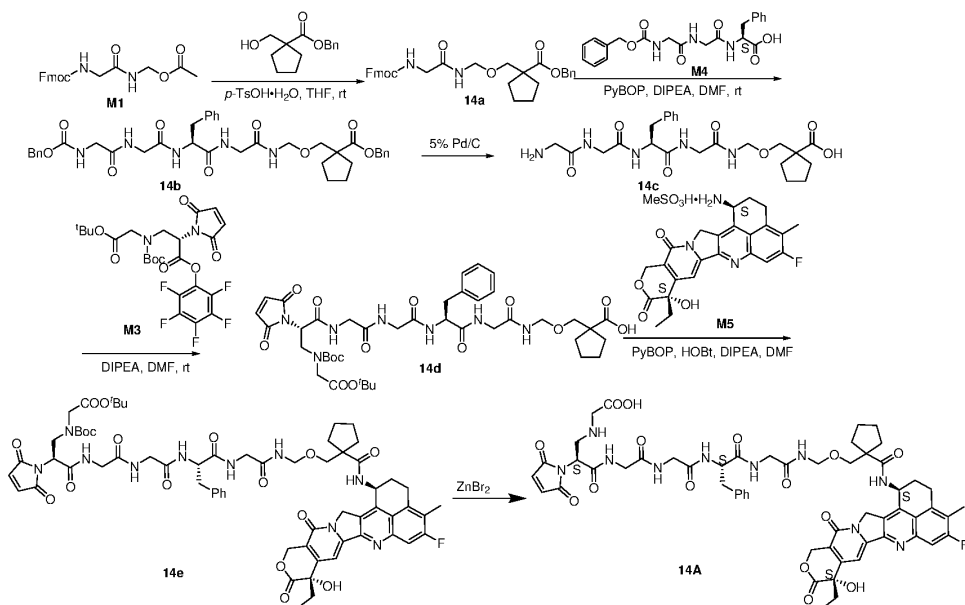
化合物 **13B** 的合成:



参照实施例 22 合成路线, 得到化合物 **13B**(51mg); 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;

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。

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**

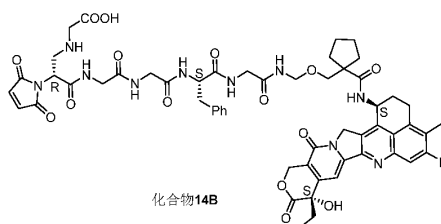
于 50 mL 单口瓶中加入 **14d** (400 mg, 0.46 mmol)，**M5**(235 mg, 0.46 mmol)，PyBOP(245 mg, 0.46 mmol)，HOBt(99 mg, 0.46 mmol)及 15 mL DMF，冰水浴下加入 DIPEA(331 μ L, 2.0 mmol)，升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后，反应液经高效液相纯化，得化合物 **14e** 的制备液，制备液冻干得到 **14e**(146 mg)；LC-MS: $[M+H]^+=1289.5$ 。

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 $^{\circ}$ 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 **14A**(52 mg)；LC-MS: $[M+H]^+=1133.4$ 。

实施例 25

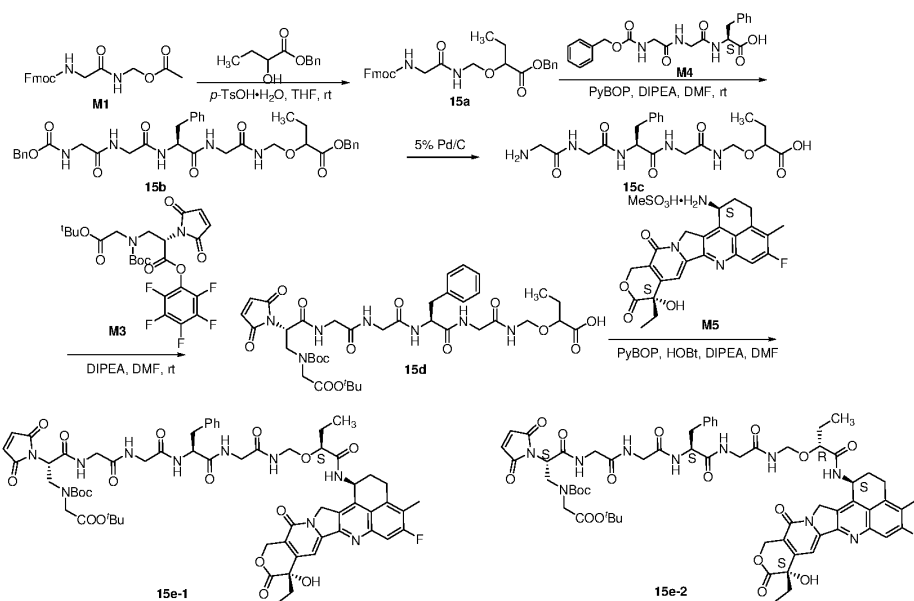
化合物 **14B** 的合成：



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

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: $[M+H]^+=676.7$ 。

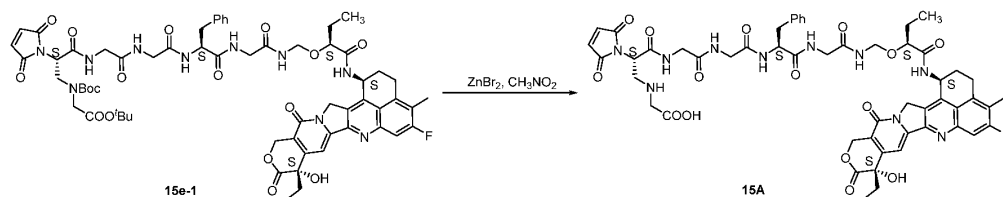
第三步：化合物 **15d**

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 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**

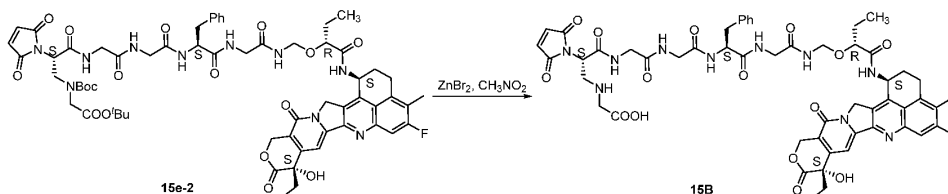
于 50 mL 单口瓶中加入 **15d**(500 mg, 0.60 mmol), **M5**(321 mg, 0.60 mmol), PyBOP(469 mg, 0.90 mmol), HOBT(121 mg, 0.90mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(446 uL, 2.7 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **15e-1** 和化合物 **15e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 138 mg 化合物 **15e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1249.5$; 140 mg 化合物 **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: $[M+H]^+=1093.4$ 。

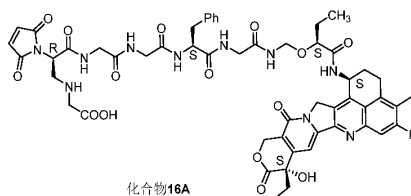
第六步: 化合物 **15B**



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: $[M+H]^+=1093.4$ 。

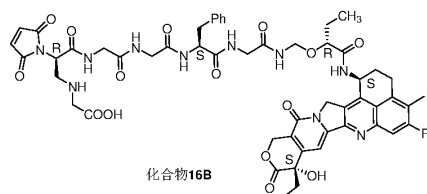
实施例 27

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: $[M+H]^+=1093.4$ 。

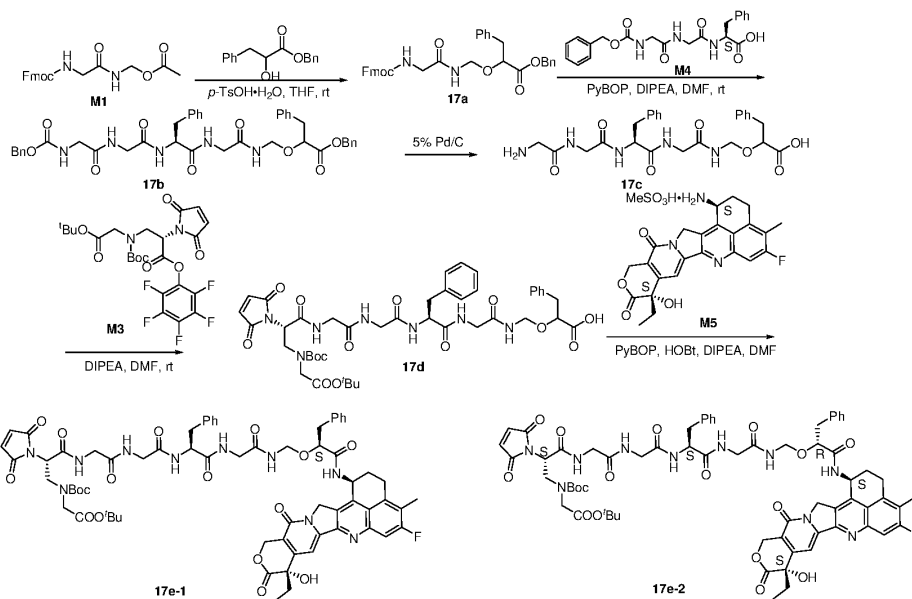
51



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: $[M+H]^+=738.3$ 。

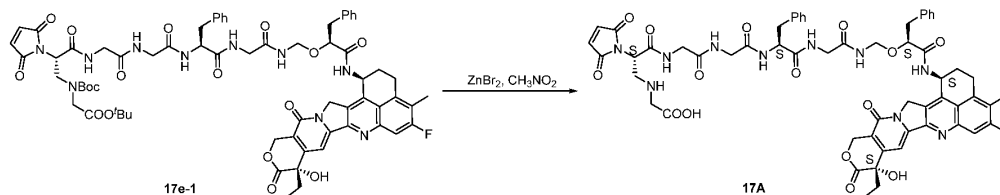
第三步: 化合物 17d

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

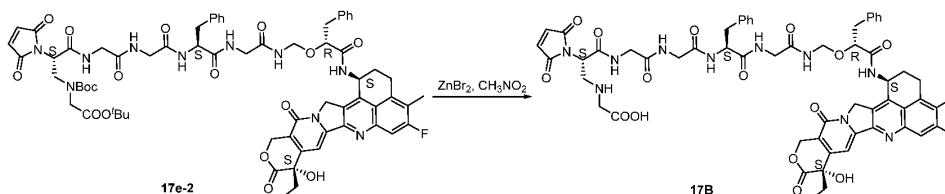
于 50 mL 单口瓶中加入 **17d**(500 mg, 0.56 mmol), **M5**(300 mg, 0.56 mmol), PyBOP(438 mg, 0.84 mmol), HOBT(113 mg, 0.84 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **17e-1** 和化合物 **17e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 156 mg 化合物 **17e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1311.4$; 150 mg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

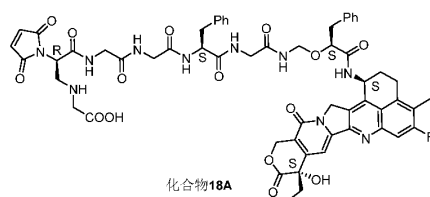


于 25 mL 单口瓶中加入 **17e-2**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 40 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1155.4$ 。

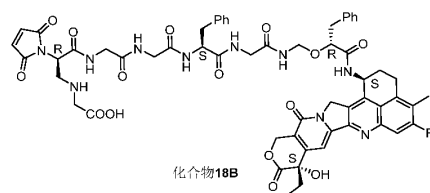
实施例 29

化合物 **18A** 和 **18B** 的合成:

53



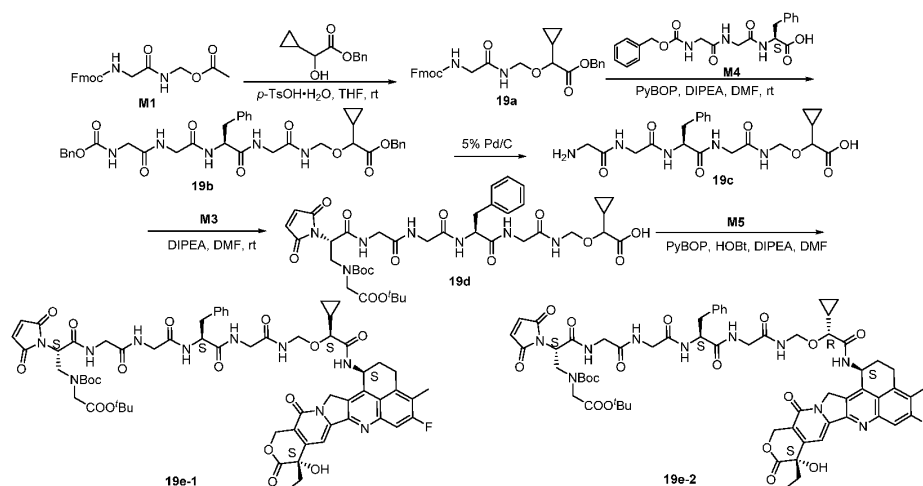
参照实施例 28 合成路线, 得到化合物 **18A**(54 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1155.4$ 。



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: $[M+H]^+=688.3$ 。

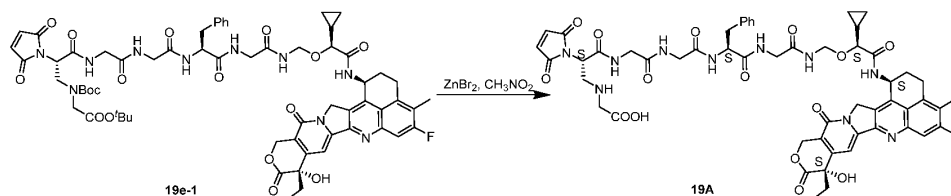
第三步: 化合物 **19d**

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 μ L, 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**

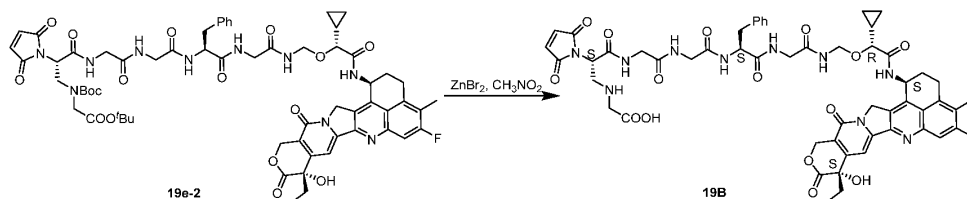
于 50 mL 单口瓶中加入 **19d**(500 mg, 0.59 mmol), **M5**(317 mg, 0.59 mmol), PyBOP(339 mg, 0.65 mmol), HOBt(88 mg, 0.86 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(292 μ L, 1.77 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **19e-1** 和化合物 **19e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 112mg 化合物 **19e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1261.5$; 131 mg 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: $[M+H]^+=1105.4$ 。

第六步: 化合物 **19B**

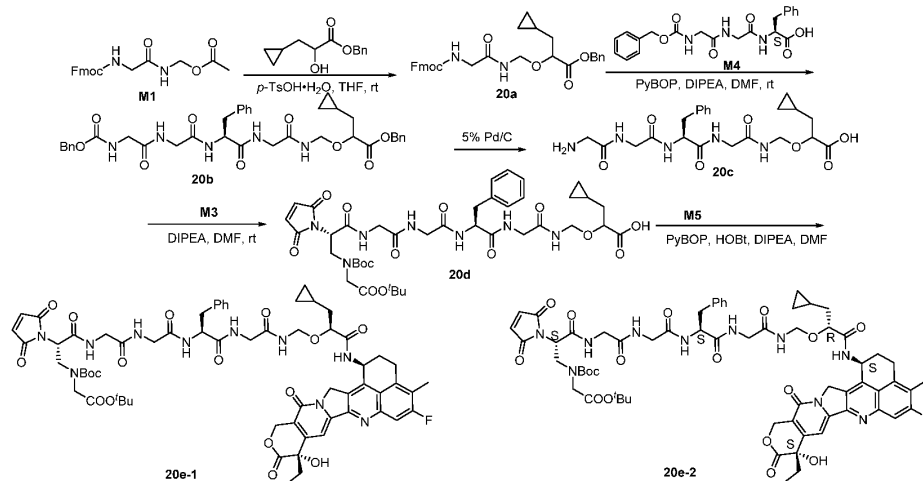


于 25 mL 单口瓶中加入 **19e-2**(100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol)及 5 mL

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: $[M+H]^+=1105.4$ 。

实施例 31

化合物 **20A** 和 **20B** 的合成:



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: $[M+H]^+=529.2$ 。

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: $[M+H]^+=702.3$ 。

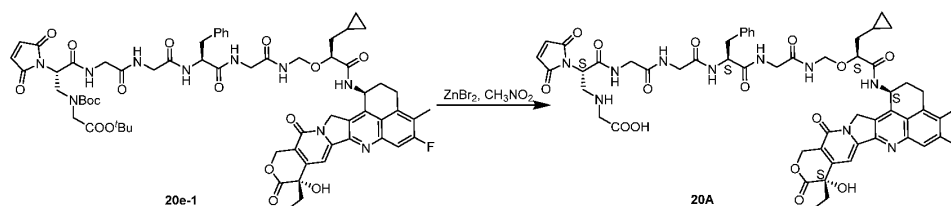
第三步: 化合物 **20d**

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**

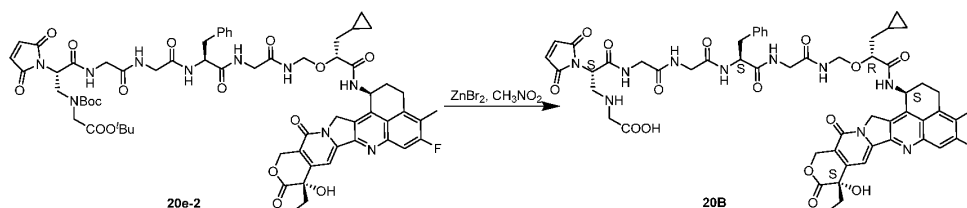
于 50 mL 单口瓶中加入 **20d**(400 mg, 0.47 mmol), 依喜替康甲磺酸盐 (250 mg, 0.47 mmol), PyBOP(223 mg, 0.56 mmol), HOBt(83 mg, 0.56 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(248 μ L, 1.5 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **20e-1** 和化合物 **20e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 103mg 化合物 **20e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$; 103 mg 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: $[M+H]^+=1119.4$ 。

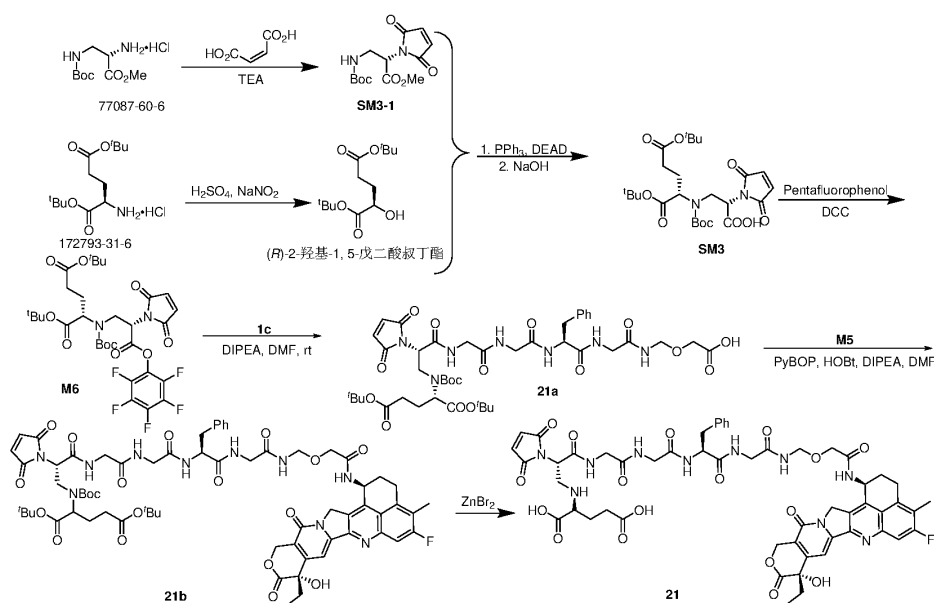
第六步：化合物 **20B**



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 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 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 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: $[M-H]^-=931.0$ 。

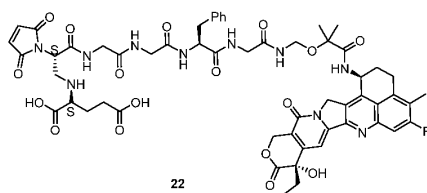
第六步：化合物 **21b**

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**

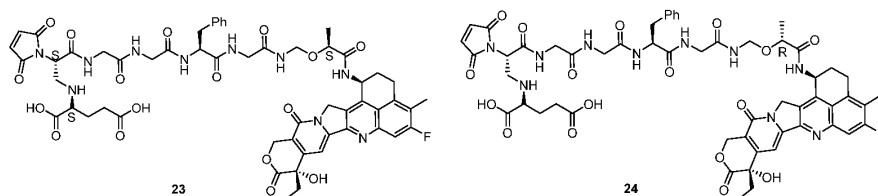
于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **21b**(200 mg, 0.1488 mmol), 溴化锌(665 mg, 2.96 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 103 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1137.5$ 。

实施例 33

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: $[M+H]^+=1165.5$ 。

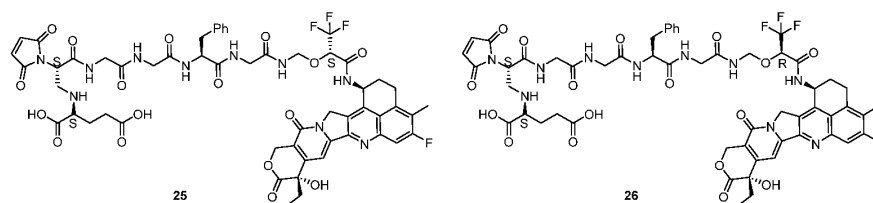
实施例 34



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: $[M+H]^+=1151.4$ 。

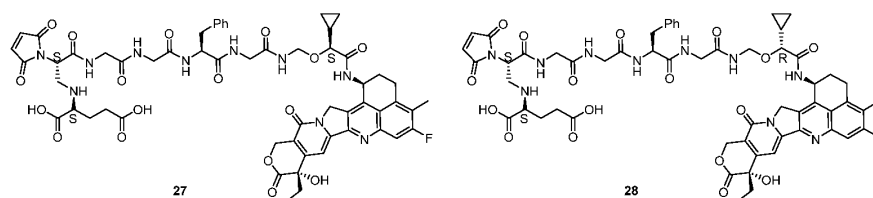
实施例 35



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: $[M+H]^+=1205.7$ 。

实施例 36

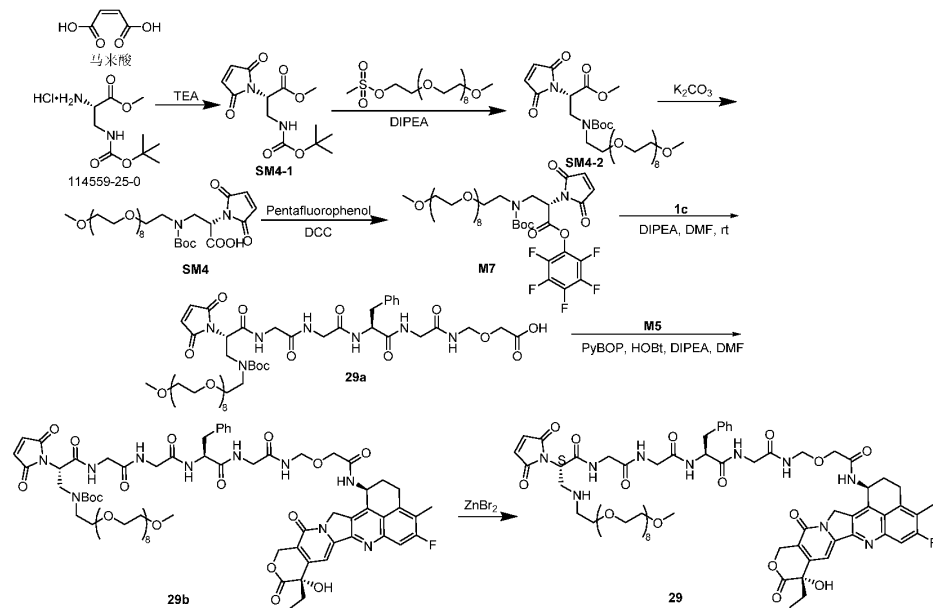


化合物 **27** 和 **28** 的合成:

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: $[M+H]^+=1177.5$ 。

实施例 37

化合物 **29** 的合成:



第一步：化合物 **SM4-1**

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 K₂CO₃(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: $[M-H]^- = 1098.5$ 。

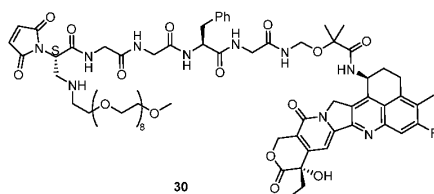
第六步：化合物 **29b**

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**

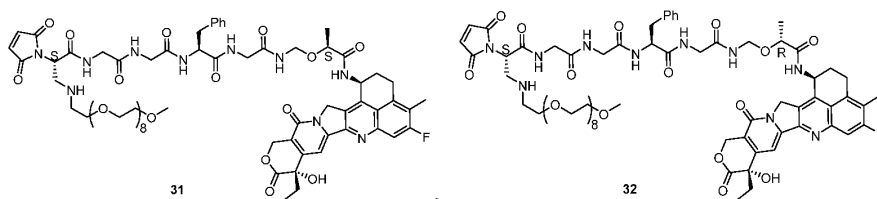
于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **29b**(150 mg, 0.988 mmol), 溴化锌(223 mg, 0.988 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 114 mg; LC-MS: $[M+H]^+ = 1517.9$ 。

实施例 38

化合物 **30** 的合成:

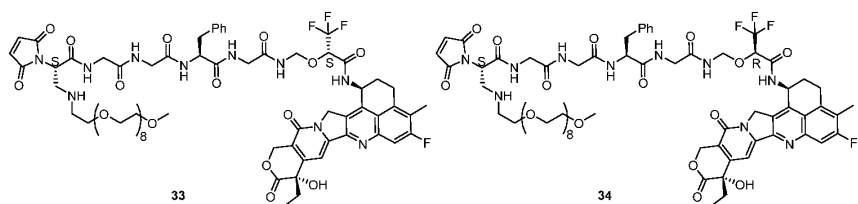
以化合物 **M7** 及 **3c** 为起始原料, 参照实施例 37 的合成路线, 得到化合物 **30**(125 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1445.6$ 。

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: $[M+H]^+ = 1431.7$ 。

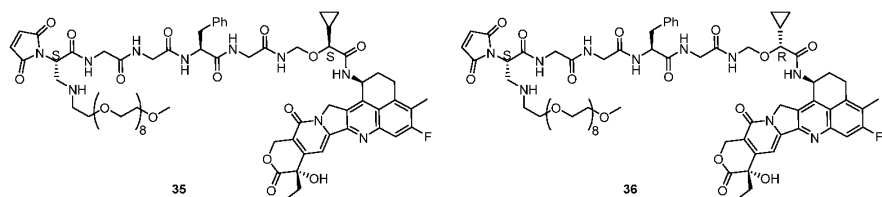
实施例 40



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: $[M+H]^+=1485.6$ 。

实施例 41

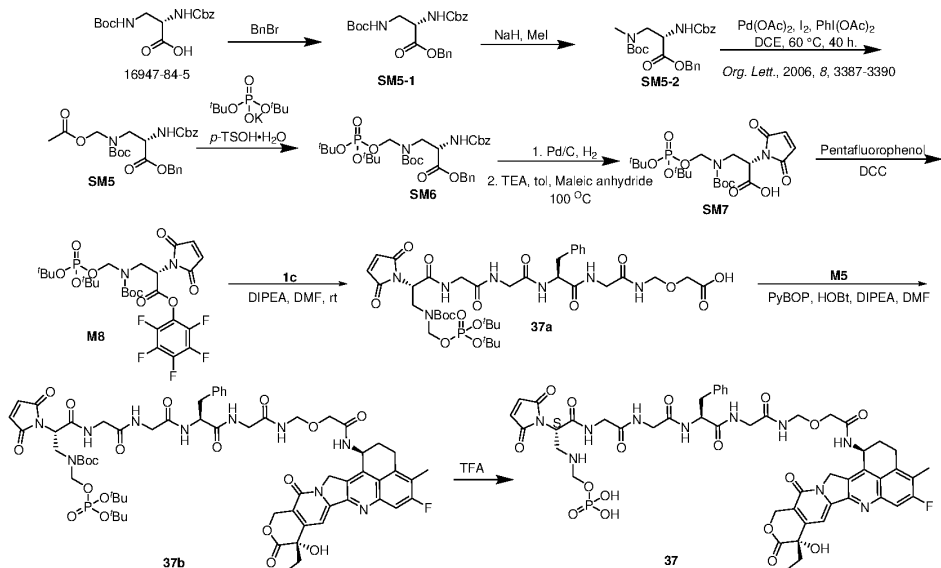


化合物 **35** 和 **36** 的合成:

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: $[M+H]^+=1457.8$ 。

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 NH₄Cl 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)，依次加入二乙酸钨(180 mg, 0.8 mmol)，I₂(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: $[M-H]^-=911.0$ 。

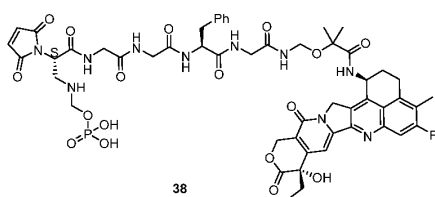
第八步: 化合物 **37b**

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 $^{\circ}$ 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 96 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1117.4$ 。

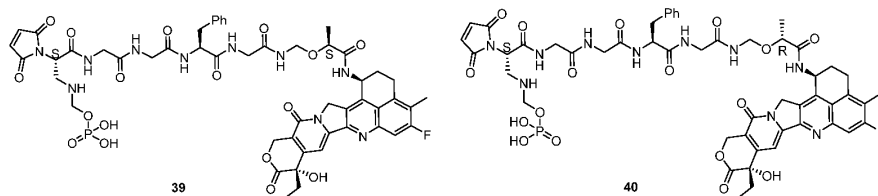
实施例 43



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: $[M+H]^+=1145.6$ 。

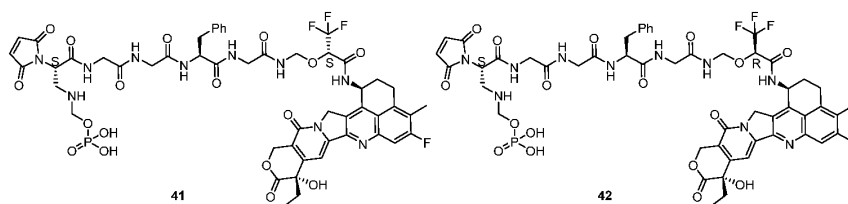
实施例 44



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: $[M+H]^+=1131.4$ 。

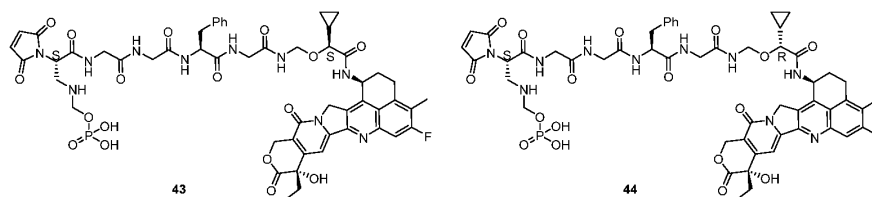
实施例 45



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: $[M+H]^+=1185.3$ 。

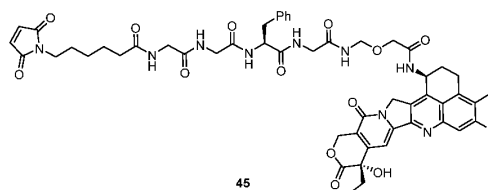
实施例 46



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: $[M+H]^+=1157.4$ 。

实施例 47 (对照例)



化合物 **45** 的合成

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

以下为 Trastuzumab 的序列:

轻链

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP
SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

重链

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLV
VSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG。

配体-药物偶联物的制备：

1) 通用偶联方法

将通过初步的纯化后单体率大于 95% 的抗体分子，使用超滤离心管换液至磷酸盐缓冲液中，浓度 10 mg/mL。加入 20 倍于抗体摩尔分子数的 TCEP，室温下反应 4 h 以打开抗体链间二硫键。加入 20 倍于抗体摩尔分子数的连接子-药物化合物(payload)，室温下反应 2 h。反应结束后，使用截留分子量为 30 KDa 的超滤离心管换液至 PBS 中，并去除未偶联的 payload。换液后的 ADC 样品使用 0.22 微米除菌过滤器过滤后备用。

2) 配体-药物偶联物 DAR 值的测定

单体率检测条件：

样品 14000 rpm 离心 5 分钟，取上清液进样分析；

仪器：Waters e2695(2489UV/Vis) ；

色谱柱：TSKgel G3000SWXL(7.8×300 mm, 5 μm)；

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

流动相 A 等度洗脱 30 min，流速：0.714 mL/min，柱温 25 °C，检测波长：280 nm。

DAR 检测条件：

样品 14000 rpm 离心 5 分钟，取上清液进样分析；

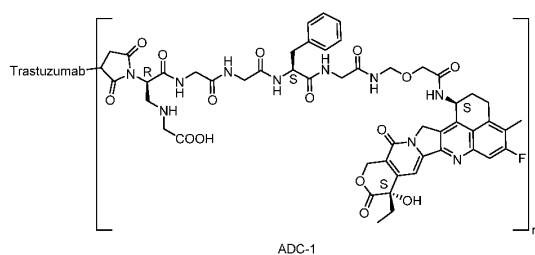
仪器：Waters H-class(TUV) ；

色谱柱：Proteomix HIC Butyl-NP5(4.6×35 mm, 5 μm)；

流动相：A：1.5 M 硫酸铵，0.025 M 无水磷酸钠，pH 为 7.0，B：0.025 M 无水磷酸钠，25% IPA，pH 为 7.0；

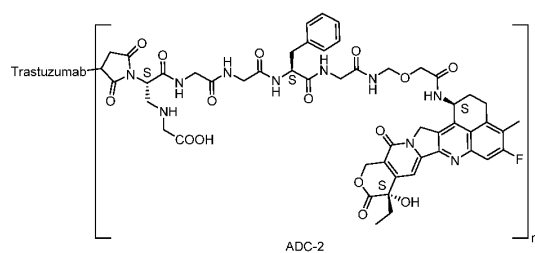
流动相 A 平衡色谱柱，流动相 A 和 B 梯度洗脱，流速 0.8 mL/min；柱温 25 °C，检测波长：214 nm。

实施例 48：ADC-1



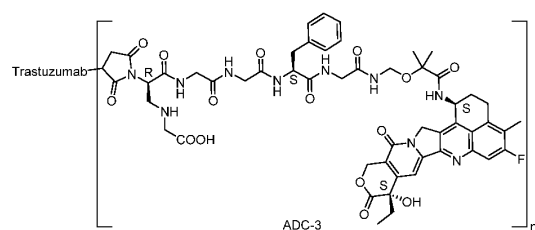
按照通用偶联方法制备得到 ADC-1。

实施例 49：ADC-2



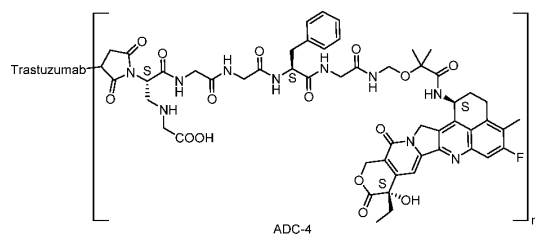
按照通用偶联方法制备得到 ADC-2。

实施例 50：ADC-3



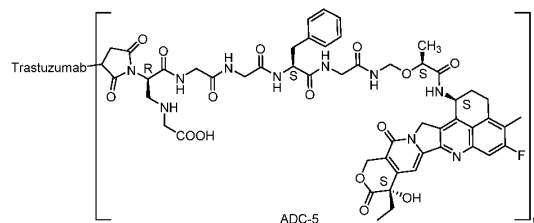
按照通用偶联方法制备得到 ADC-3。

实施例 51：ADC-4



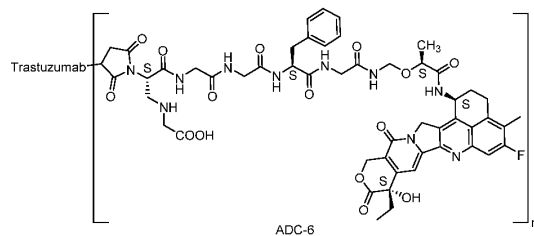
按照通用偶联方法制备得到 ADC-4。

实施例 52: ADC-5



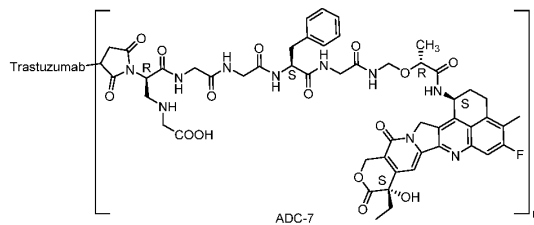
按照通用偶联方法制备得到 ADC-5。

实施例 53: ADC-6



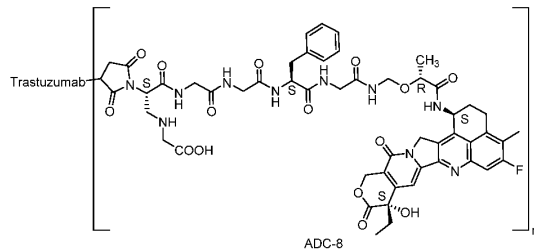
按照通用偶联方法制备得到 ADC-6。

实施例 54: ADC-7



按照通用偶联方法制备得到 ADC-7。

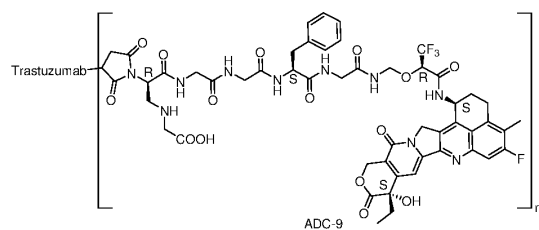
实施例 55: ADC-8



按照通用偶联方法制备得到 ADC-8。

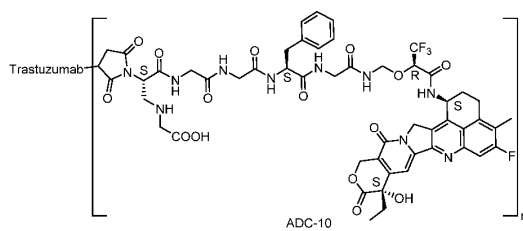
实施例 56: ADC-9

69



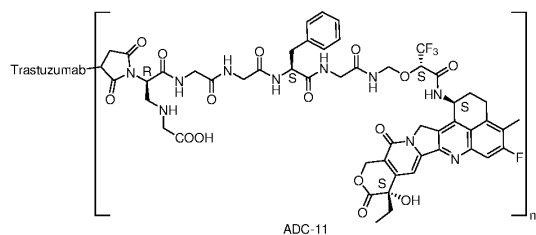
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-9**。

实施例 57: **ADC-10**



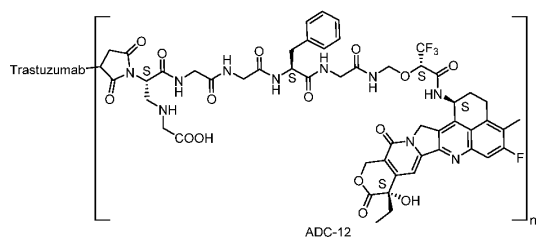
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-10**。

实施例 58: **ADC-11**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-11**。

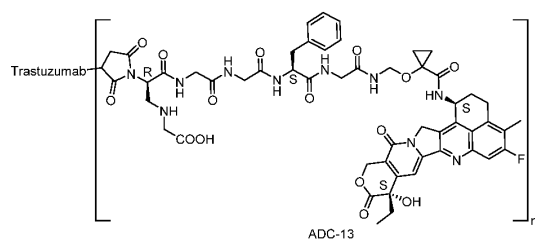
实施例 59: **ADC-12**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-12**。

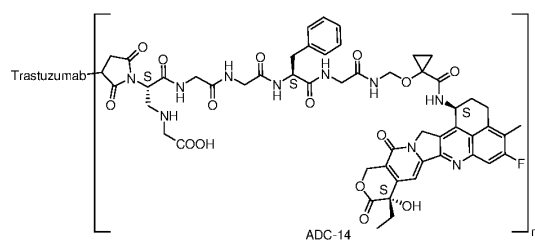
实施例 60: **ADC-13**

70



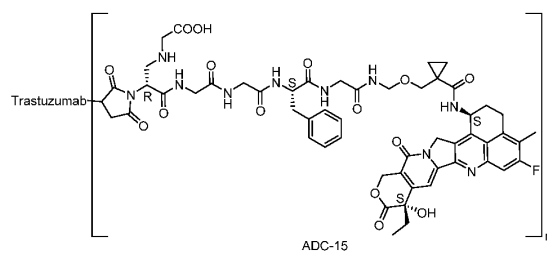
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-13**。

实施例 61: **ADC-14**



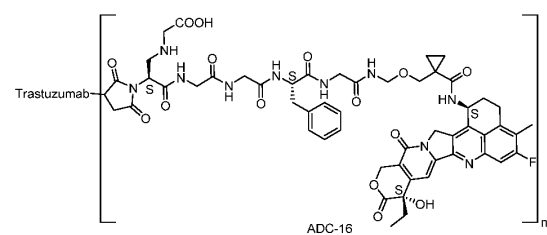
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-14**。

实施例 62: **ADC-15**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-15**。

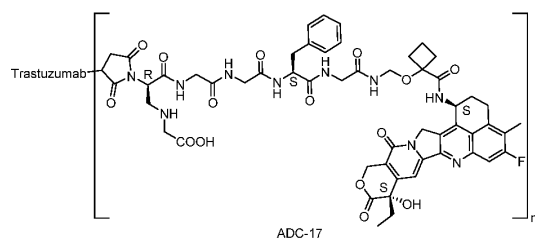
实施例 63: **ADC-16**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-16**。

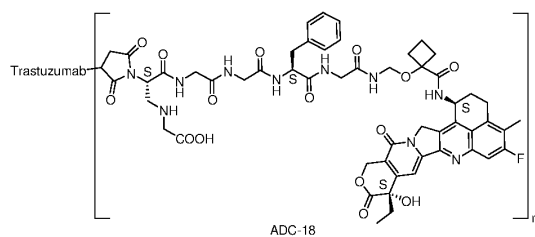
实施例 64: **ADC-17**

71



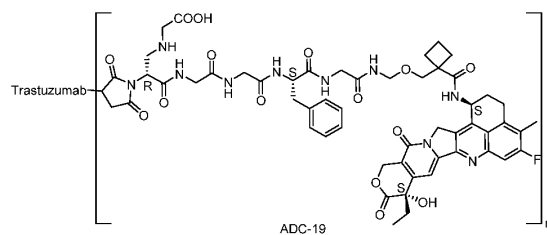
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-17**。

实施例 65: **ADC-18**



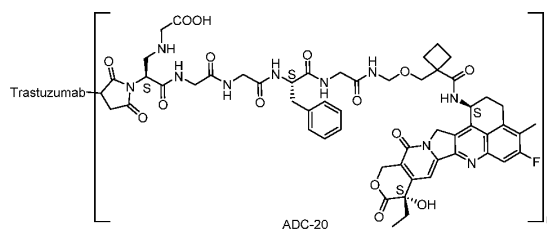
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-18**。

实施例 66: **ADC-19**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-19**。

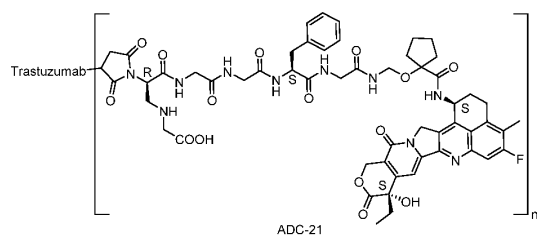
实施例 67: **ADC-20**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-20**。

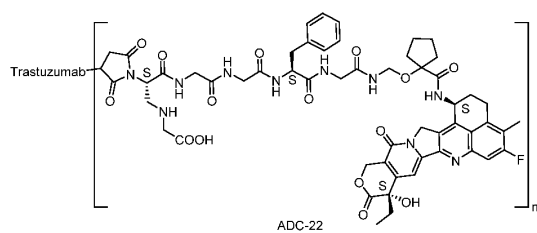
实施例 68: **ADC-21**

72



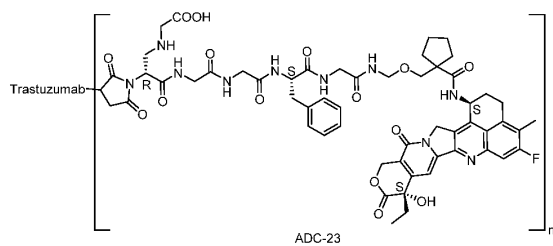
按照通用偶联方法制备得到 ADC-21。

实施例 69: ADC-22



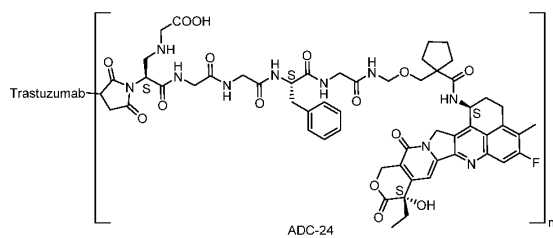
按照通用偶联方法制备得到 ADC-22。

实施例 70: ADC-23



按照通用偶联方法制备得到 ADC-23。

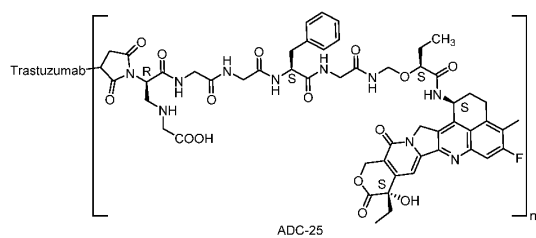
实施例 71: ADC-24



按照通用偶联方法制备得到 ADC-24。

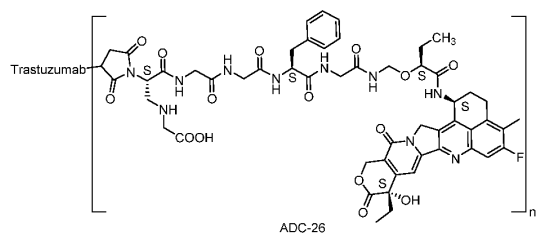
实施例 72: ADC-25

73



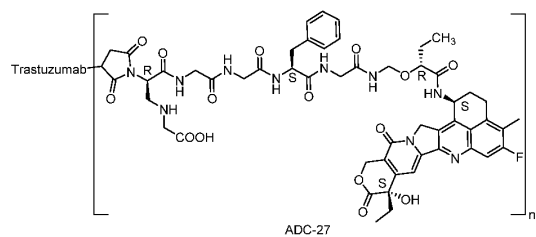
按照通用偶联方法制备得到 ADC-25。

实施例 73: ADC-26



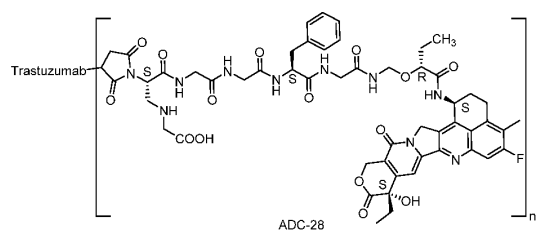
按照通用偶联方法制备得到 ADC-26。

实施例 74: ADC-27



按照通用偶联方法制备得到 ADC-27。

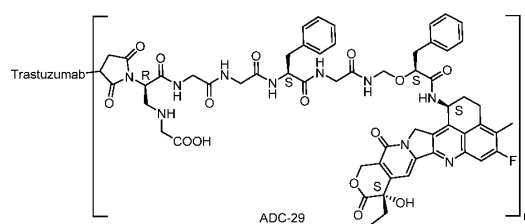
实施例 75: ADC-28



按照通用偶联方法制备得到 ADC-28。

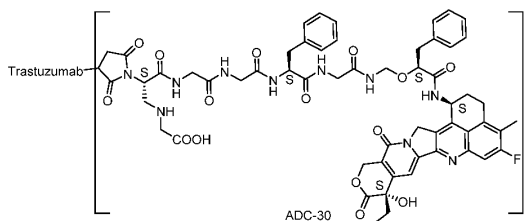
实施例 76: ADC-29

74



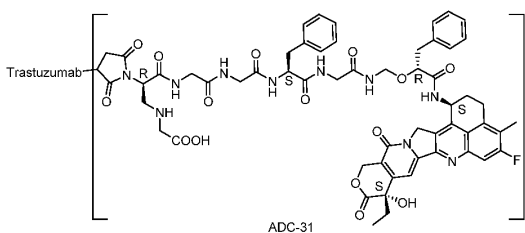
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-29**。

实施例 77: **ADC-30**



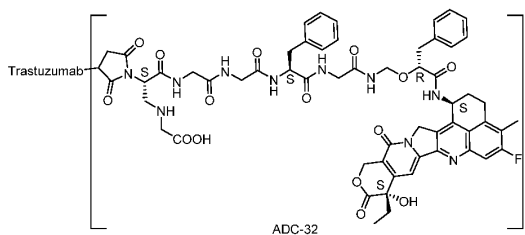
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-30**。

实施例 78: **ADC-31**



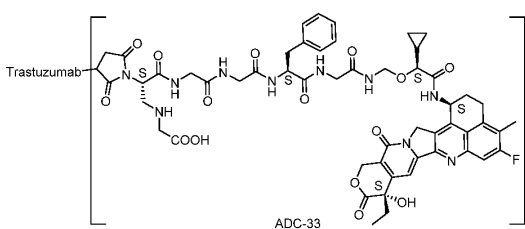
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-31**。

实施例 79: **ADC-32**



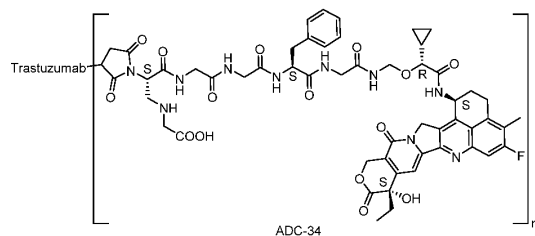
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-32**。

实施例 80: **ADC-33**



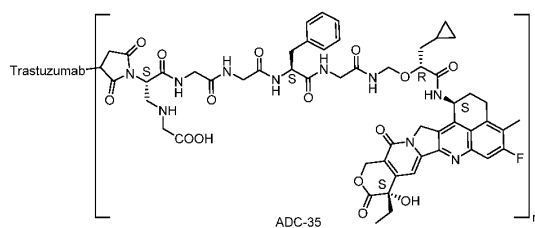
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-33**。

实施例 81: **ADC-34**



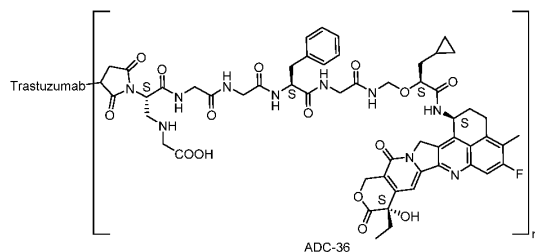
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-34**。

实施例 82: **ADC-35**



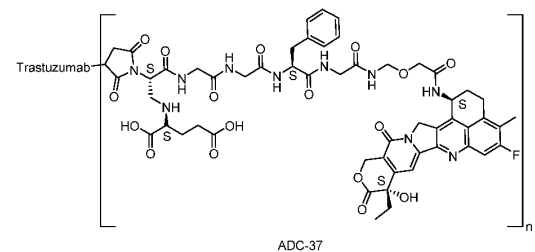
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-35**。

实施例 83: **ADC-36**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-36**。

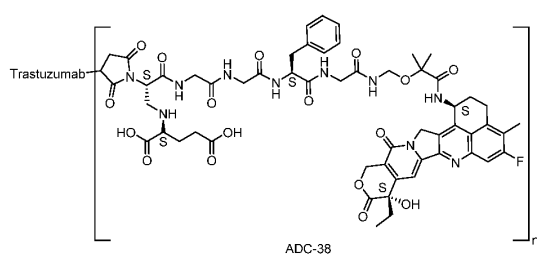
实施例 84: **ADC-37**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-37**。

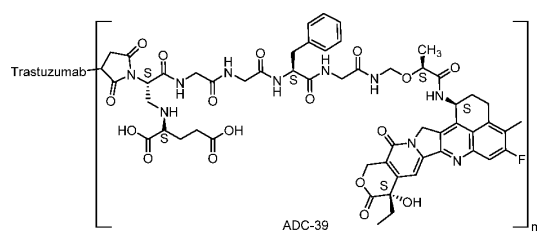
实施例 85: **ADC-38**

76



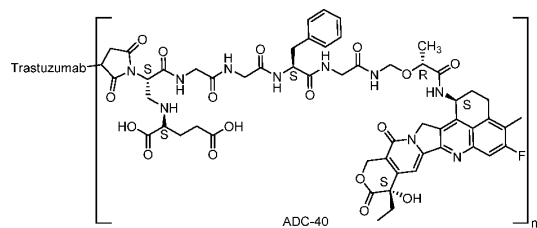
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-38**。

实施例 86: **ADC-39**



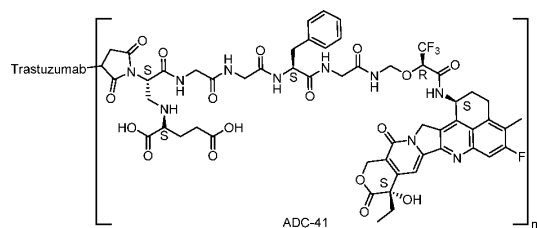
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-39**。

实施例 87: **ADC-40**



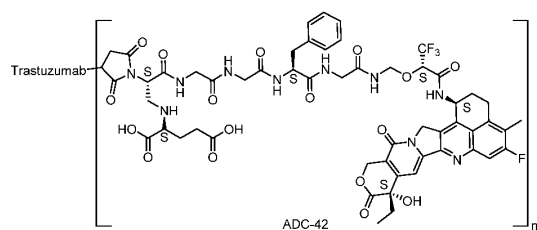
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-40**。

实施例 88: **ADC-41**



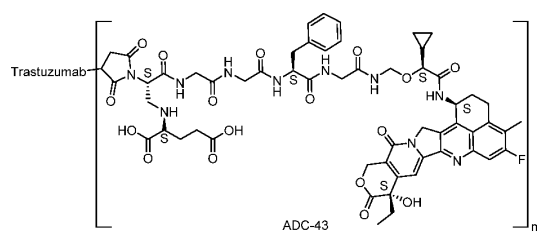
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-41**。

实施例 89: **ADC-42**



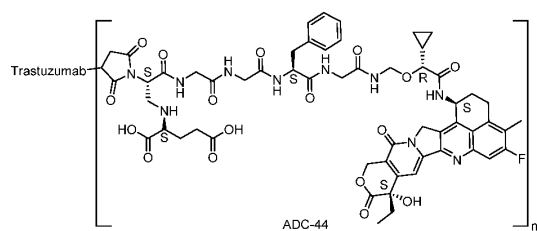
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-42**。

实施例 90: **ADC-43**



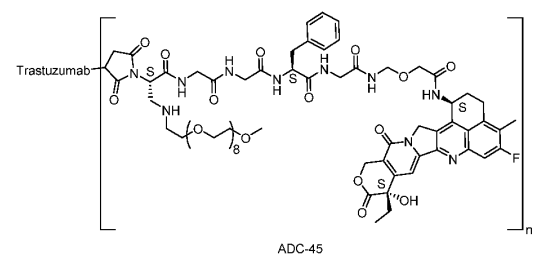
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-43**。

实施例 91: **ADC-44**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-44**。

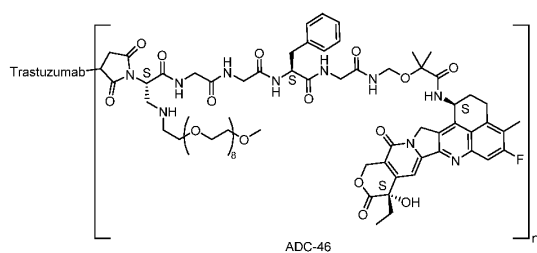
实施例 92: **ADC-45**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-45**。

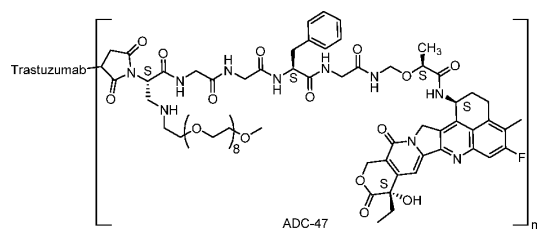
实施例 93: **ADC-46**

78



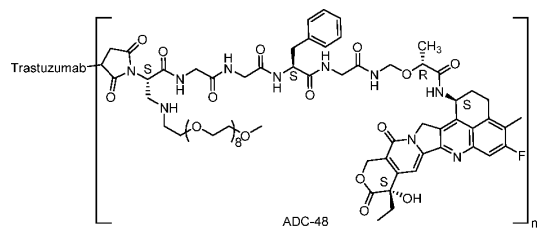
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-46**。

实施例 94: **ADC-47**



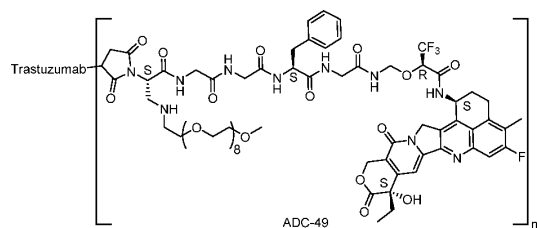
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-47**。

实施例 95: **ADC-48**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-48**。

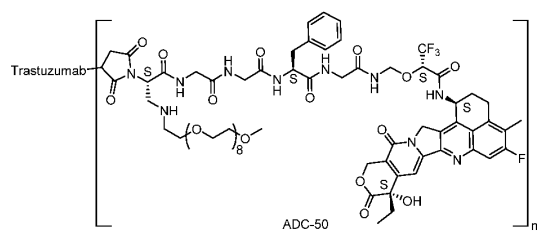
实施例 96: **ADC-49**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-49**。

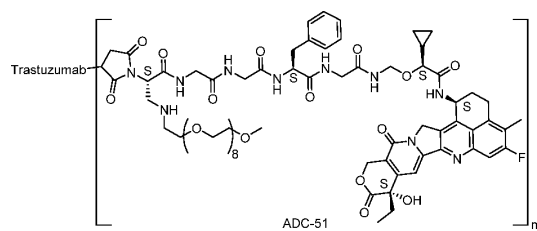
实施例 97: **ADC-50**

79



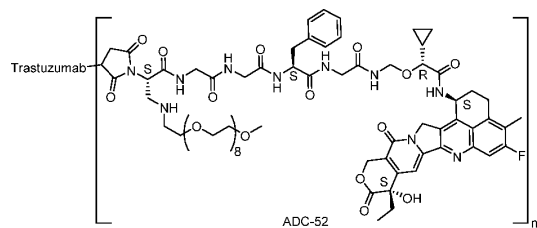
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-50**。

实施例 98: **ADC-51**



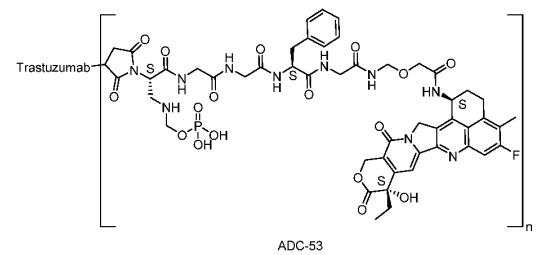
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-51**。

实施例 99: **ADC-52**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-52**。

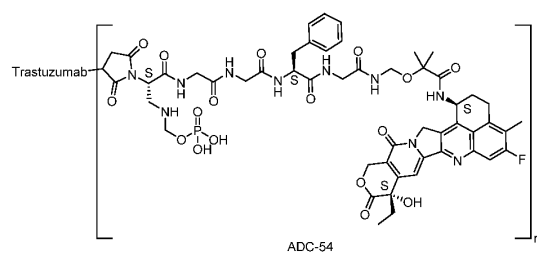
实施例 100: **ADC-53**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-53**。

实施例 101: **ADC-54**

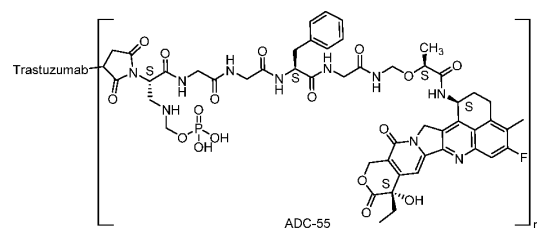
80



ADC-54

按照通用偶联方法制备得到 **ADC-54**。

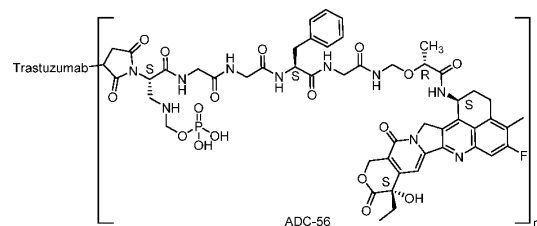
实施例 102: **ADC-55**



ADC-55

按照通用偶联方法制备得到 **ADC-55**。

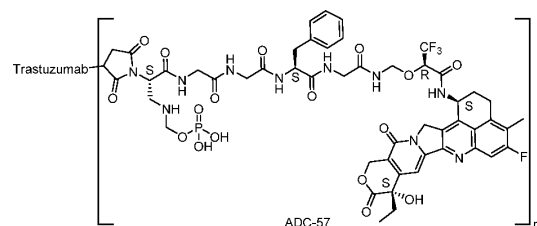
实施例 103: **ADC-56**



ADC-56

按照通用偶联方法制备得到 **ADC-56**。

实施例 104: **ADC-57**

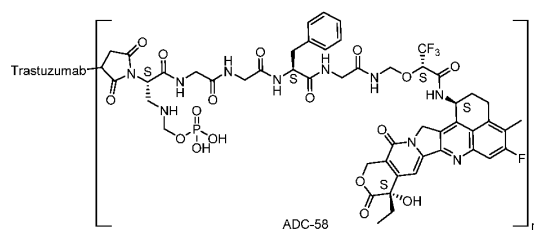


ADC-57

按照通用偶联方法制备得到 **ADC-57**。

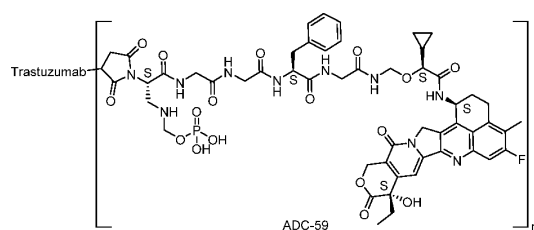
实施例 105: **ADC-58**

81



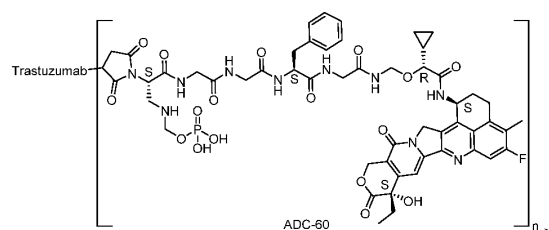
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-58**。

实施例 106: **ADC-59**



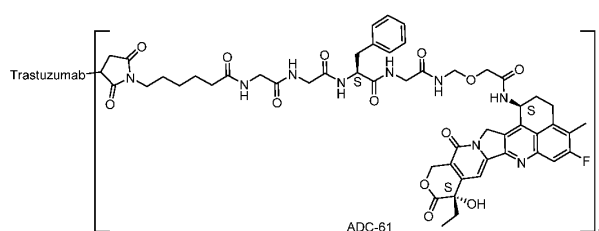
按照通用偶联方法制备得到 **ADC-59**。

实施例 107: **ADC-60**



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-60**。

实施例 108: **ADC-61** (对照组)



按照通用偶联方法制备得到 **ADC-61**。

实施例 109: 血浆稳定性

1)操作

取一定量的 ADC 样品,加入到已去除人 IgG 的人血浆中,每种 ADC 重复三管,放置 37 °C 水浴中孵,分别孵育 72 h、144 h 后,取出 ADC 样品,每管加入 ProteinA resin(MabSelect SuRe™

LX Lot:#10221479GE, 用取 PBS 洗涤过的)100 uL, 垂直混合仪晃动吸附 2 h, 经过洗涤洗脱步骤, 获得孵育后的 ADC。对孵育特定时间的 ADC 样品进行 RP-HPLC 检测。

2) 结果

表 1. 本发明公开配体-药物偶联物(ADC)DAR 值及单体率数据。

分子名称	DAR	聚集体%	单体%
Trastuzumab	NA	1.61	98.39
ADC-2	7.67	1.51	98.49
ADC-6	7.55	1.61	98.39
ADC-10	7.66	1.45	98.55
ADC-12	7.64	2.28	97.72
ADC-15	7.63	1.44	98.56
ADC-20	7.60	1.40	98.60
ADC-29	7.66	1.62	98.38
ADC-35	7.59	1.67	98.33
ADC-36	7.68	1.38	98.62
ADC-41	7.64	1.51	98.49
ADC-48	7.67	1.77	98.23
ADC-52	7.58	1.61	98.39
ADC-56	7.60	1.61	98.39
ADC-61 (对照)	7.59	8.21	91.79

表 2. 本发明公开配体-药物偶联物(ADC)血浆稳定性数据。

分子名称	DAR			
	未孵育	孵育 0 天	孵育 3 天	孵育 7 天
ADC-2	7.67	7.51	6.77	6.43
ADC-6	7.55	7.52	7.46	7.44
ADC-10	7.66	7.48	6.43	6.21
ADC-12	7.64	7.43	6.73	6.11
ADC-29	7.66	7.60	6.91	6.65
ADC-36	7.68	7.64	7.02	6.96
ADC-48	7.67	7.65	7.63	7.48
ADC-56	7.60	7.49	7.08	6.33
ADC-61 (对照)	7.59	7.48	5.31	5.02

3) 结论

如表 1 所示, 本发明公开的带有高稳定性亲水连接单元的喜树碱类 ADC 具有 DAR 值(>7.5)及单体率(>97%)高的优异性质, 相比于对照 ADC-61, 具有明显更高的单体率。

如表 2 所示, 本发明公开的 ADC 血浆中孵育 7 天后, 相比于对照 ADC-61, DAR 值仍可以保持较高水平, 证明本发明的 ADC 在血浆中具有优异的稳定性。

实施例 110: 体外活性测试

1)实验材料

细胞：来源于中国科学院细胞库；

肿瘤细胞培养基：Gibco；

FBS：BIOWEST；

2)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

提前 30 min 开启生物安全柜紫外灯照射，后通风 3 min。将生长培养基、检测培养基、D-PBS 和胰酶放入 37 °C 恒温水浴锅预热，之后用酒精对表面进行消毒，放入生物安全柜中。选择汇合度在~80%的细胞（对数生长期），放于生物安全柜中，吸掉旧培养基，用 D-PBS 润洗，吸弃，用胰酶消化 2~3 min，后加入生长培养基终止胰酶，500×g 离心 5 min。吸去离心上清液，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 μL 0.4% Trypan Blue Stain 并混匀，混匀后计数)。按照之前设置好的细胞数铺板，80 uL/孔铺于 96 孔板中，孔 E11、F11、G11 只加 80 uL 检测培养基，边缘孔加入 200 uL 的 DPBS 封边。待铺板细胞完全贴壁后(通常至少需要 4 小时)，进行受试样品配置与稀释：用检测培养基配置 1.0mL, 2.5μM(5×Top Dose)的受试样品，分装于 V 型 96 孔板第一列，每孔 200μL；后面第 2 至 8 列分别加入 180 μL 的检测培养基，从第一列中取 30 μL 加入到第二列，用排枪上下混匀 10 次，弃枪头，剩余检测浓度点依次操作，进行 7 倍梯度浓度稀释。将梯度浓度的受试样品按照每孔 20 uL 的量加入细胞中，同时第 11 列只加入 20 uL 的检测培养基，每个浓度设置 3 个复孔，随后将 96 孔板放入 5%CO₂, 37 °C 细胞培养箱，培养 5 天。

4)检测

受试样品作用 5 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 Cell Titer One Solution Reagen MTS 试剂，轻轻拍动板面，使 MTS 溶液混合均匀，放于细胞培养箱中 5%CO₂, 37°C 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、存储。

5)结果

表 3：抗体药物偶联物及毒素对 N87 肿瘤细胞的体外增值抑制的 IC₅₀ 值。

Sample	Trastuzumab	ADC-61 (对照)	ADC-12	ADC-6	ADC-10	ADC-2	d ₃	d ₆	d ₁
IC50 (nM)	>500	2.992	0.565	0.622	0.907	1.075	8.025	2.147	13.344

表 4：抗体药物偶联物及毒素对 SK-BR-3 肿瘤细胞的体外增值抑制的 IC50 值。

Sample	Trastuzumab	ADC-61 (对照)	ADC-12	ADC-6	ADC-10	ADC-2	d ₃	d ₆	d ₁
IC50 (nM)	>500	>500	135.295	435.861	115.987	116.329	182.766	239.311	103.798

6)讨论

如表 3 所示，本发明针对 HER2 靶标的配体-药物偶联物对 HER2 阳性细胞 N87 具有明显的体外增值抑制活性，明显优于裸抗(Trastuzumab)、对照组 ADC-61 及毒素单药。

如表 4 所示，与裸抗(Trastuzumab)及对照组 ADC 对比，本发明公开的 ADC 及单药对 HER2 阳性的细胞 SK-BR-3 也具有明显的体外增值抑制活性。

实施例 111：体内活性测试

1)实验材料

细胞：来源于中国科学院细胞库；

肿瘤细胞培养基：Gibco；

Balb/c-nu 裸鼠：雌性，5-7 周（肿瘤细胞接种时的小鼠周龄），体重 18.0-24.0g，170 只（110 只加 60 只富余小鼠）。购自北京维通利华实验动物技术有限公司；

供试品和对照品：

供试品：ADC-61、ADC-6 由成都多特抗体药物有限责任公司提供。

Histidine 缓冲液，由成都多特抗体药物有限责任公司提供。

0.9%氯化钠注射液：科伦药业有限责任公司。

2)细胞培养

NCI-H1975(人非小细胞肺癌腺癌细胞)培养在 RPMI1640 培养基中。收集指数生长期的 NCI-H1975 细胞，RPMI1640 培养基重悬至适合浓度后用于小鼠皮下肿瘤接种。

NCI-N87(人胃癌细胞) 培养在 RPMI1640 培养基中。收集指数生长期的 NCI-N87 细胞，RPMI1640 培养基重悬至适合浓度后用于小鼠皮下肿瘤接种。

3) 动物造模和随机分组

85 只雌性裸鼠右肩侧皮下接种 5×10^7 个 NCI-H1975 细胞。待肿瘤平均体积 170mm^3 左右时，根据肿瘤大小随机分组。选取 55 只肿瘤体积合适的荷瘤小鼠，随机分组并开始给药（尾静脉注射，给药体积按 $0.1\text{ml}/10\text{g}$ ）。分组当天定义为第 0 天。

85 只雌性裸鼠右肩侧皮下接种 5×10^7 个 NCI-N87 细胞。待肿瘤平均体积 170mm^3 左右时，根据肿瘤大小随机分组。选取 55 只肿瘤体积合适的荷瘤小鼠，随机分组并开始给药（尾静脉注射，给药体积按 $0.1\text{ml}/10\text{g}$ ）。分组当天定义为第 0 天。

4) 供试品和对照品的配制

表5. 在NCI-H1975(人非小细胞肺癌腺癌细胞)和NCI-N87(人胃癌细胞)裸鼠皮下移植瘤模型中抗肿瘤作用研究的供试品和对照品溶液的配制。

供试品 /对照品	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/ml)	配制	配制后 状态	配制 频率	配制后 储存
Vehicle	-	-	1200 微升 Histidine 缓冲液。	☒ 溶液 ☐ 悬浊液	每次现 用现配	4℃
ADC-6	3.75	0.375	102 微升的 ADC 原液中加入 2298 微升 Histidine 缓冲液，上下颠倒混匀。	☒ 溶液 ☐ 悬浊液	每次现 用现配	使用后 丢弃
ADC-6	11.25	1.125	306 微升的 ADC 原液中加入 2094 微升 Histidine 缓冲液，上下颠倒混匀。	☒ 溶液 ☐ 悬浊液	每次现 用现配	使用后 丢弃
ADC-61	3.75	0.375	92 微升的 ADC 原液中加入 2308 微升 Histidine 缓冲液，上下颠倒混匀。	☒ 溶液 ☐ 悬浊液	每次现 用现配	使用后 丢弃
ADC-61 (对照)	11.25	1.125	277 微升的 ADC 原液中加入 2123 微升 Histidine 缓冲液，上下颠倒混匀。	☒ 溶液 ☐ 悬浊液	每次现 用现配	使用后 丢弃
Trastuzumab	11.25	1.125	277 微升的 Trastuzumab 原液中加入 2123 微升 Histidine 缓冲液，上下颠倒混匀。	☒ 溶液 ☐ 悬浊液	每次现 用现配	使用后 丢弃

注：使用前混匀，确保制剂是均一的。

5) 实验观察和数据收集

本实验过程中，动物实验操作均根据抗肿瘤药物体内筛选试验标准操作规程的要求。肿瘤接种后，常规监测包括了肿瘤生长(肿瘤每周测量 2 次)及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低（体重每周测量 2 次）情况，

眼睛、被毛及其它异常情况。实验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积（mm³）=1/2×（a×b²）（其中 a 表示长径，b 表示短径）。实验中采用人工记录数据，包括肿瘤的长短径的测量和动物体重的称量。

6) 疗效评价标准

相对肿瘤增殖率，T/C %，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。计算公式如下：

$T/C \% = TRTV / CRTV \times 100\%$ （TRTV：治疗组平均 RTV；CRTV：溶媒对照组平均 RTV； $RTV = V_t / V_0$ ，V₀ 为分组时该动物的瘤体积，V_t 为治疗后该动物的瘤体积）；或 $T/C \% = TTW / CTW \times 100\%$ （TTW：治疗组实验终结时平均瘤重；CTW：溶媒对照组实验终结时平均瘤重）。

相对肿瘤抑制率，TGI（%），计算公式如下： $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。[T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积（RTV）或瘤重（TW）]。

7) 结果

表 6：给药抗体药物偶联物对 NCI-H1975 移植瘤的体内疗效。

NCI-H1975 分组信息\平均瘤体积(mm ³)	D0	D3	D7	D10	D14	D17	D21	D24	D28	D31
Vehicle	171.98	306.67	682.07	955.08	1484.48	1926.35	2086.61	2283.27	1908.57	2057.03
Trastuzumab	172.19	296.69	627.87	887.25	1094.88	1458.59	1659.49	1893.14	1795.55	1900.54
ADC-6 (3.75mg/kg)	177.23	287.29	456.33	461.82	429.12	427.21	434.03	466.98	342.13	318.87
ADC-6 (11.25 mg/kg)	176.38	302.16	281.28	127.32	49.21	35.49	20.87	21.05	8.57	6.35
ADC-61 (3.75 mg/kg)	175.70	310.96	524.82	590.38	691.41	801.68	741.46	805.82	744.25	590.86
ADC-61 (11.25 mg/kg)	176.93	258.15	322.19	226.12	208.91	232.64	198.01	232.77	150.44	163.34

表 7：给药抗体药物偶联物对 NCI-N87 移植瘤的体内疗效。

NCI-N87\分组信息\平均瘤体积 (mm ³)	D0	D3	D7	D10	D14	D17	D21	D24	D28	D31
Vehicle	176.61	257.61	541.37	646.95	857.49	915.65	1118.54	1093.71	1396.93	1625.59
Trastuzumab	180.57	226.45	322.76	445.83	542.50	631.28	725.55	848.82	942.65	1004.93
ADC-6 (3.75mg/kg)	174.88	165.59	170.49	113.27	75.82	44.08	30.78	11.16	24.76	17.02
ADC-61 (3.75 mg/kg)对照	174.86	217.78	236.78	233.98	201.96	139.46	137.63	83.22	106.70	130.81

表 8: 给药抗体药物偶联物(11.25mg/kg)对 NCI-H1975 移植瘤小鼠体重影响情况。

NCI-H1975\分组信息\平均体重(g)	D0	D3	D7	D10	D14	D17	D21	D24	D28	D31
Vehicle	19.83	20.52	20.13	19.79	20.42	19.83	19.57	20.45	18.21	19.79
ADC-6 (11.25mg/kg)	19.99	20.66	19.70	20.46	20.65	19.99	20.68	19.89	20.52	20.69
ADC-61 (11.25 mg/kg)对照	19.78	20.55	19.52	19.32	19.57*	19.78*	19.36*	19.59*	20.14*	18.99*

注: *标识组观察到两只小鼠死亡

8)讨论

如表 6 所示,本发明公开 **ADC-6** 在低剂量对照组(3.75 mg/Kg)对荷瘤小鼠 NCI-H1975 体内药效明显优于对照组 **ADC-61** 及裸抗;当剂量增加至 11.25 mg/Kg 时,本发明公开 **ADC-6** 的治疗效果进一步提升,且明显优于对照 **ADC-61**。

如表 7 所示,在相同剂量下(3.75 mg/Kg)本发明公开 **ADC-6** 对荷瘤小鼠 NCI-N87 体内药效明显优于对照组 **ADC-61**,对比高剂量裸抗(11.25 mg/Kg)体内药效更显著。

如表 8 所示,本发明公开 **ADC-6** 在高剂量对照组 11.25 mg/Kg 对 NCI-H1975 荷瘤小鼠的体重影响明显相比于 **ADC-61** 的影响小,即便在该高剂量组下,也未出现如对照组所示的小鼠死亡,证明本发明所述的 ADC 药物在安全性方面具有显著的优势。