

杂环化合物及其制备方法和用途

技术领域

本申请涉及化合物领域，具体涉及一种杂环化合物，所述化合物可以用于制备偶联物，例如抗体药物偶联物。

背景技术

在抗肿瘤药物研发领域，ADC 药物以其靶向性引起全球关注。ADC 是将毒素药物连接在抗体上的新型抗肿瘤药物，通常由抗体、毒素药物和连接子构成，借助抗体靶向识别性和毒素的高活性发挥抗肿瘤作用，比传统小分子药物更具特异性和有效性。

ADC 进入体内后，通过具有抗原靶向作用的抗体将毒素运输到肿瘤组织，ADC 与肿瘤细胞表面抗原结合，细胞吞噬 ADC，随后在溶酶体中分解释放细胞毒素，破坏 DNA 或阻止细胞分裂，达到杀伤细胞的效果。

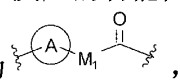
其中连接子保证 ADC 在血液中的稳定性，而毒素在达到靶点后发挥杀伤作用。ADC 的毒素主要包括微管类抑制剂、DNA 损伤剂和 RNA 聚合酶抑制剂等类型。连接子方面也包括裂解型、不可裂解型等多种类型的结构。毒素药物及连接体的结构对 ADC 的药效和安全性至关重要，因此，研发出兼具优良活性及安全性的药物连接子化合物的仍是本领域需要解决的问题。

发明内容

本申请涉及一种药物-连接子化合物及其制备方法和用途，药物-连接子化合物可用于同其他分子例如抗体形成偶联物。

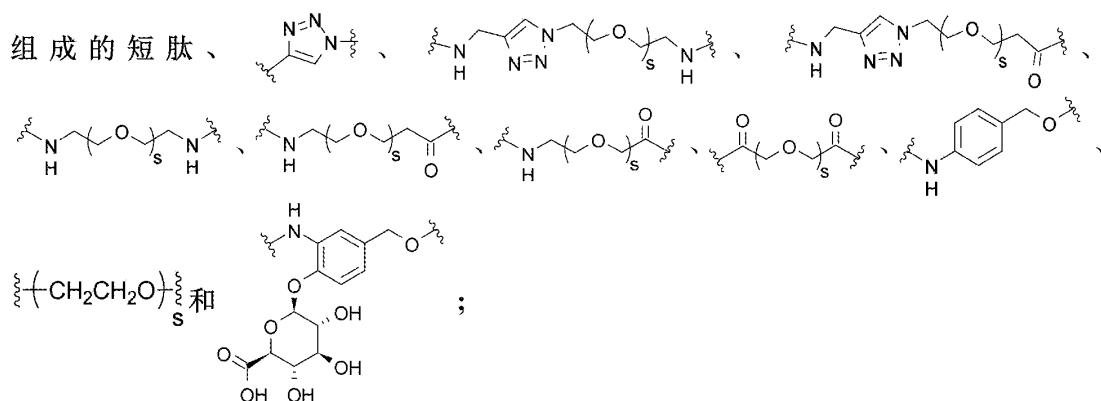
在一个方面，本发明提供一种药物-连接子化合物，其具有式 $G-M-[L-E-D]_x$ 所示结构，其中：

G 是能够与特异性氨基酸或糖基发生反应的官能团或离去基团；

M 是与 G 相连的接头，所述的 M 为 ，

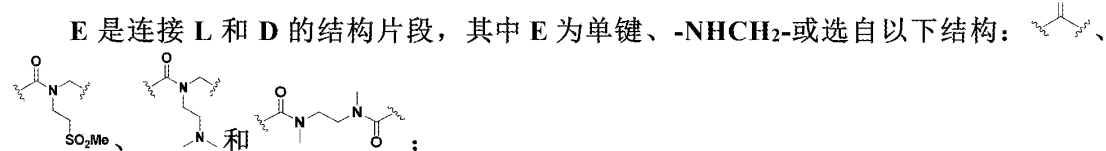
其中，环 A 为 5-6 元脂杂环、或 5-20 元芳香族环系，所述脂杂环和芳香族环系任选地被一个或多个选自氧基 (=O)、卤素、氰基、氨基、羧基、巯基和 C₁₋₆ 烷基的基团取代；M₁ 选自单键和 C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基，所述的 C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基任选地被一个或多个适合的取代基所取代；

L 是连接接头 M 和 E 之间的连接子，L 选自由下述的一个或多个组成的结构：C₁₋₆ 亚烷基、-N(R')-、羰基、-O-、天然氨基酸或非天然氨基酸及其类似物、以及氨基酸



其中 R' 代表氢、C₁₋₆ 烷基或含 1-10 个 EO 单元的聚乙二醇片段；s 选自 1-20 的

5 整数；

E 是连接 L 和 D 的结构片段，其中 E 为单键、-NHCH₂-或选自以下结构：

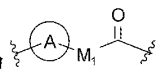
D 是细胞毒性药物片段；和/或

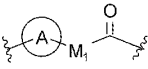
x 选自 1 至 10。

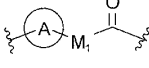
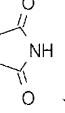
10 在一些实施方式中，所述的 G 是能够与抗体中的特异性氨基酸或糖基发生反应的官能团或离去基团。

在一些实施方式中，所述的 G 选自卤素、卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 磺酰基、卤代 C₁₋₆ 磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段，所述的卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 磺酰基、卤代 C₁₋₆ 磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺基、烯基、炔基及含炔基的结构片段任选地被一个或多个适合的取代基所取代。

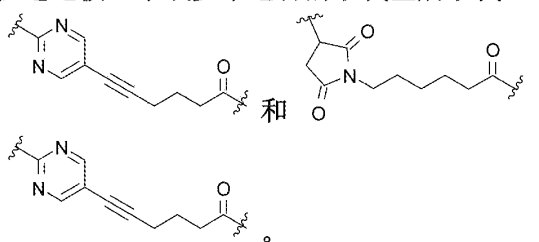
20 在一些实施方式中，所述的 G 选自卤素、卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 磺酰基、卤代 C₁₋₆ 磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段。

25 在一些实施方式中，所述的 M 为 ，其中环 A 为 5 元脂杂环、6 元杂芳环、或由一个以上（例如 2 个）的 6 元杂芳环与苯环或 6 元杂芳环通过单键连接形成的多环，所述脂杂环任选地被一个或多个选自氧基 (=O)、卤素和 C₁₋₄ 烷基的基团取代；M₁ 选自单键、C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基，所述的 C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基任选地被一个或多个适合的取代基所取代。

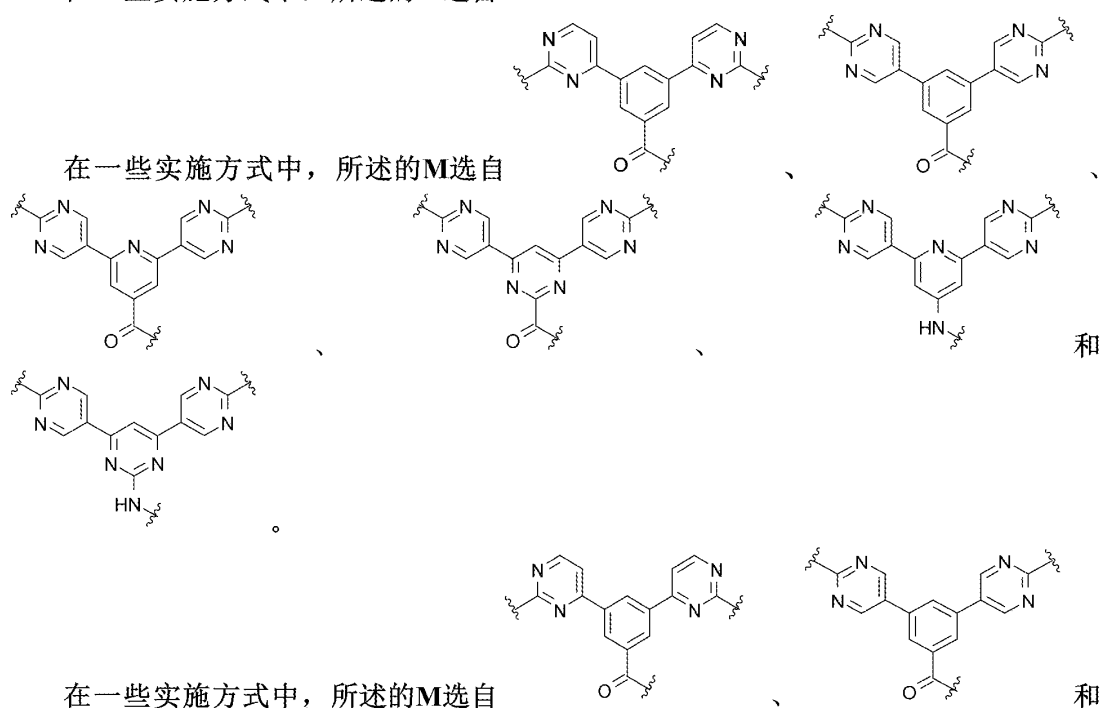
在一些实施方式中，所述的M为 ，其中环A为5元脂杂环、6元杂芳环、或由一个以上（例如2个）的6元杂芳环与苯环或6元杂芳环通过单键连接形成的多环，所述脂杂环任选地被一个或多个选自氧基(=O)、卤素和C₁₋₄烷基的基团取代；M₁选自单键、C₁₋₂₀亚烷基、C₂₋₂₀亚烯基、C₂₋₂₀亚炔基或胺基。

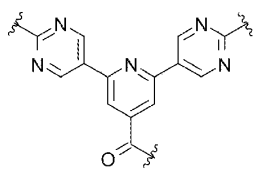
- 5 在一些实施方式中，所述的M为 ，其中环A选自 、、、和 ；M₁选自单键和C₁₋₆亚烷基、C₂₋₆亚烯基、C₂₋₆亚炔基或胺基，所述的C₁₋₆亚烷基、C₂₋₆亚烯基、C₂₋₆亚炔基或胺基任选地被一个或多个适合的取代基所取代。

在一些实施方式中，所述的M选自



- 10 在一些实施方式中，所述的M选自





在一些实施方式中，所述的 L 选自由下述的一个或多个组成的结构：C₁₋₆ 亚烷基、

-N(R')-、羰基、-O-、Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、

Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、Lys(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)_rOCH₃))、

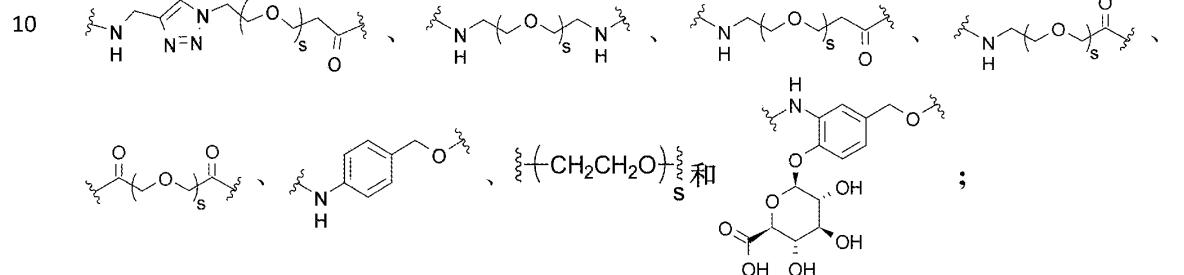
Ala-Ala、Ala-Lys、Ala-Lys(Ac)、Ala-Pro、Gly-Glu、Gly-Gly、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、

Val-Ala、Val-Lys、Val-Lys(Ac)、Val-Cit、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Leu-Ala-Glu、Gly-

Gly-Arg、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly-Gly、Gly-Ser-Lys、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ser-Ala-

Pro、Val-Leu-Lys、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Val-Ala、Gly-

Phe-Leu-Gly、Glu-Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly、



其中R'代表氢、C₁₋₆烷基或含1-10个EO单元的聚乙二醇片段；s选自1-20的整数，

例如1-15、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。

在一些实施方式中，所述的L选自由下述的一个或多个组成的结构：C₁₋₆亚烷基、

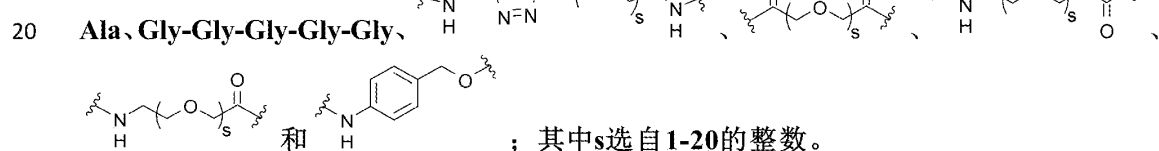
羰基、-NH-、Ala-Ala、Ala-Lys、Ala-Pro、Gly-Glu、Gly-Gly、Phe-Lys、Val-Ala、Val-

Lys、Val-Cit、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Leu-Ala-Glu、Gly-Gly-Arg、Gly-Glu-Gly、Gly-

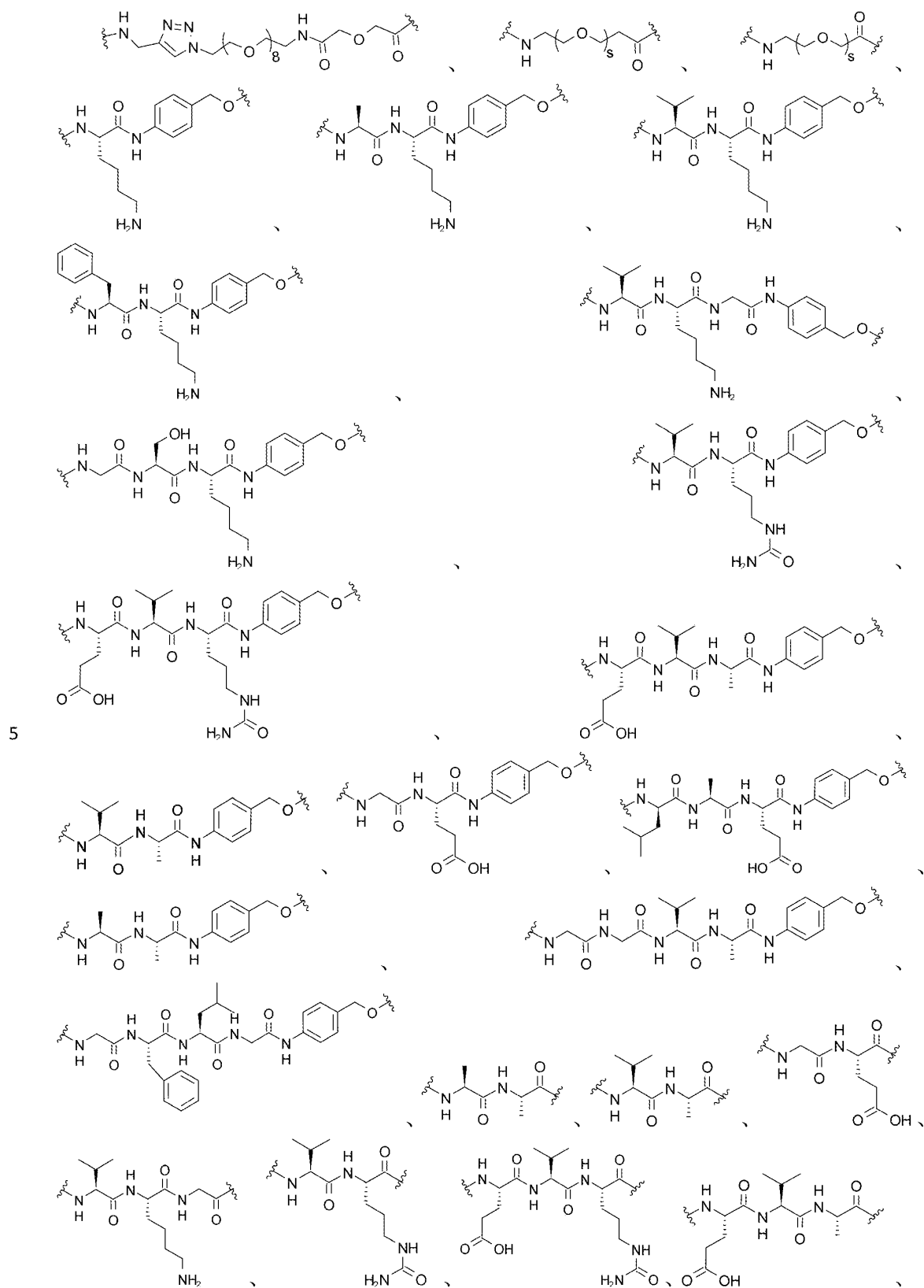
Gly-Gly、Gly-Ser-Lys、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ser-Ala-Pro、Val-Leu-Lys、Val-Lys-

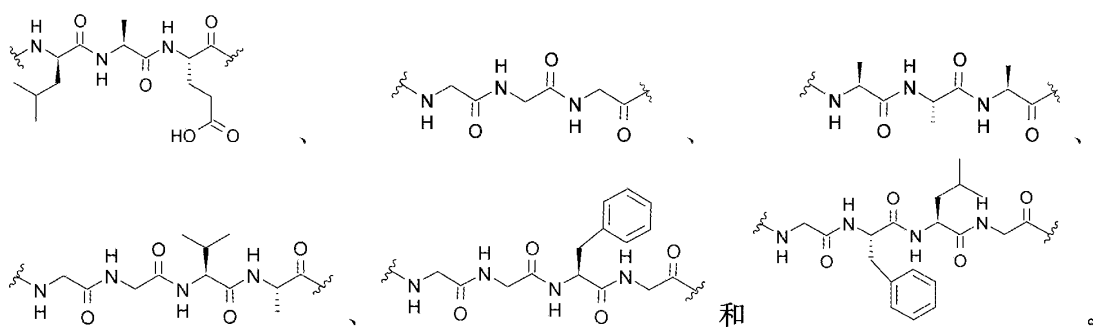
Ala、Val-Lys-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Val-Ala、Gly-Phe-Leu-Gly、Glu-Ala-Ala-

Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly、

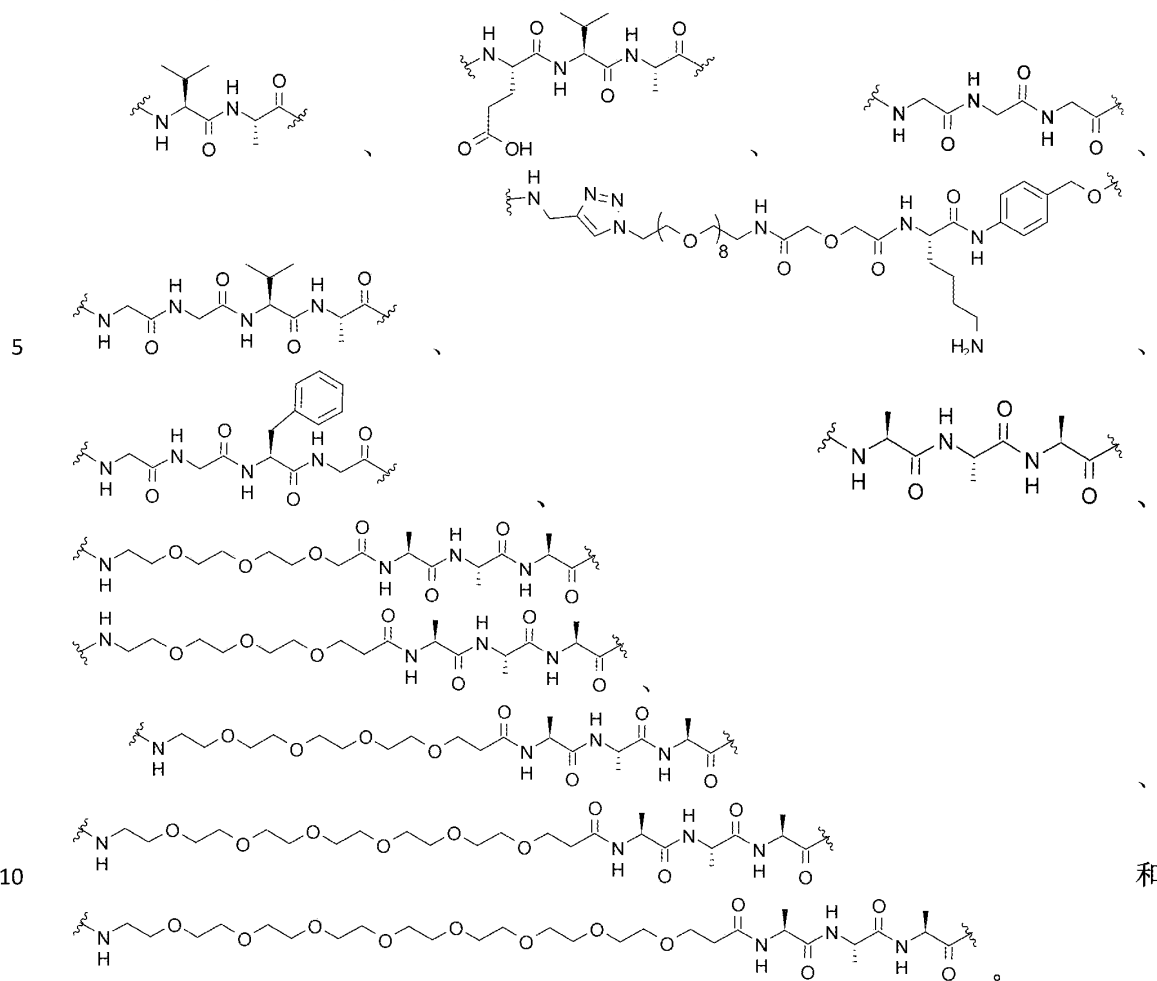


在一些实施方式中，所述的 L 选自由下述的一个或多个组成的结构：

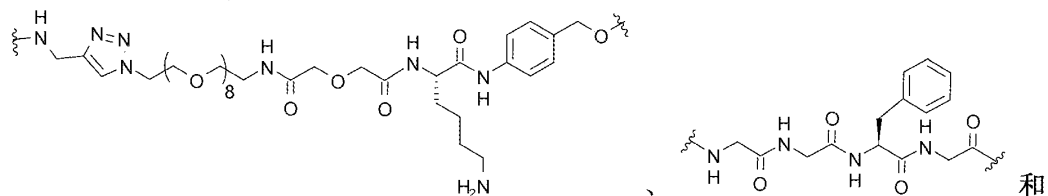


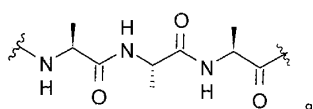


在一些实施方式中，所述的 **L** 选自以下结构：

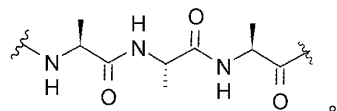


在一些实施方式中，所述的 **L** 选自以下结构：

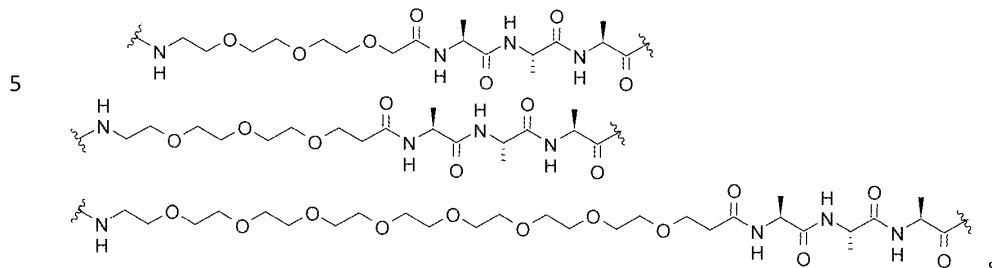




在一些实施方式中, 所述的 L 选自以下结构:



在一些实施方式中, 所述的 L 选自以下结构:

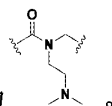


在一些实施方式中, 所述的 E 为单键、 $-\text{NHCH}_2-$ 、 或 .

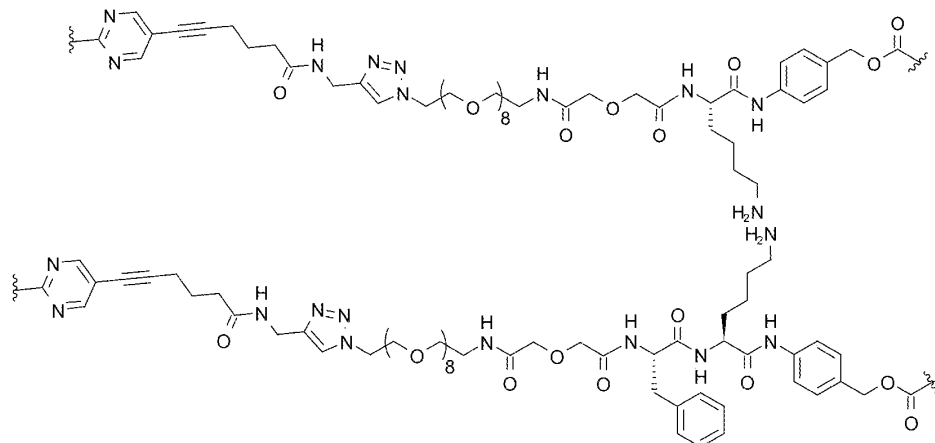
在一些实施方式中, 所述的 E 为单键。

10 在一些实施方式中, 所述的 E 为 $-\text{NHCH}_2-$ 。

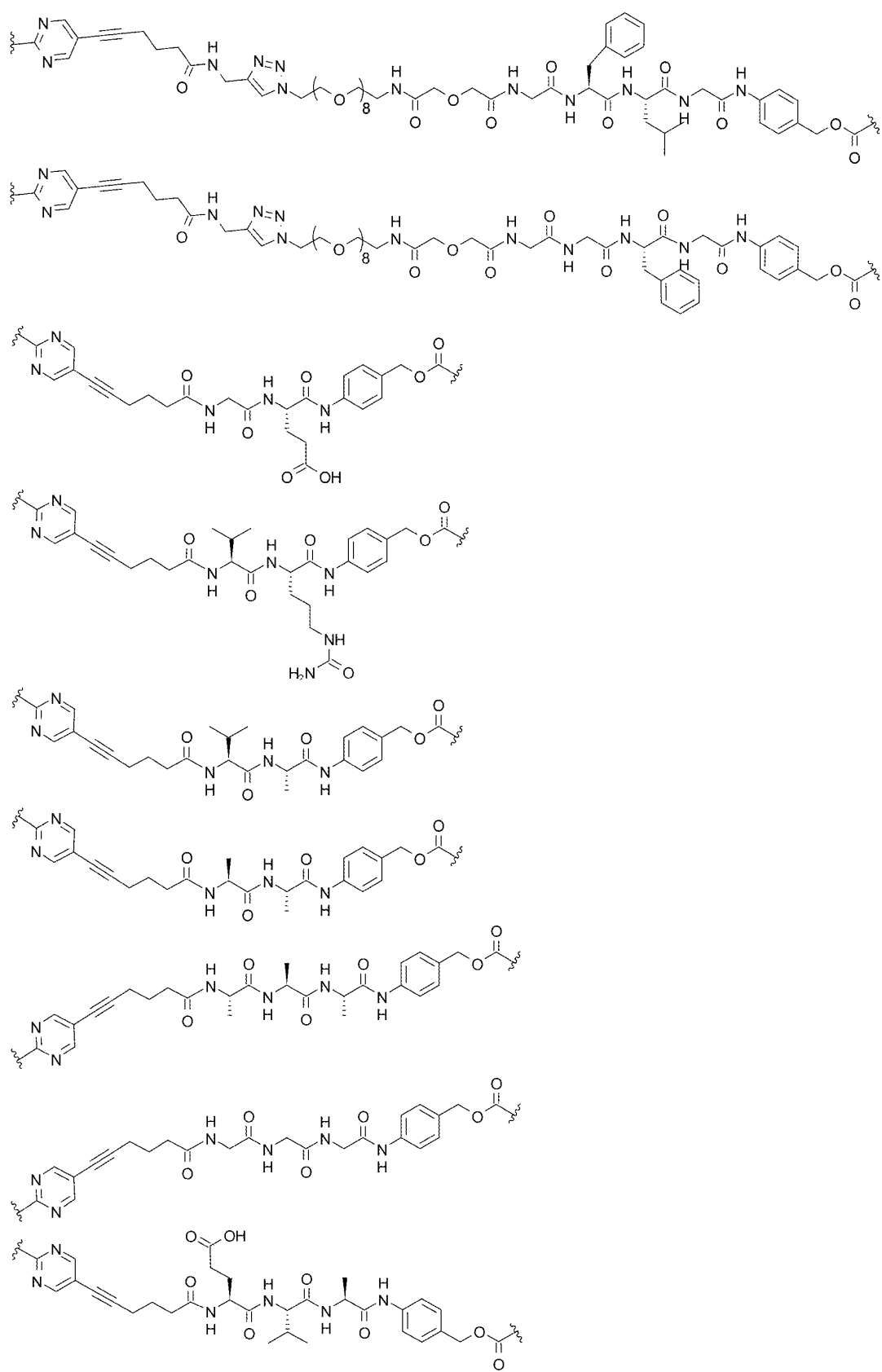
在一些实施方式中, 所述的 E 为 .

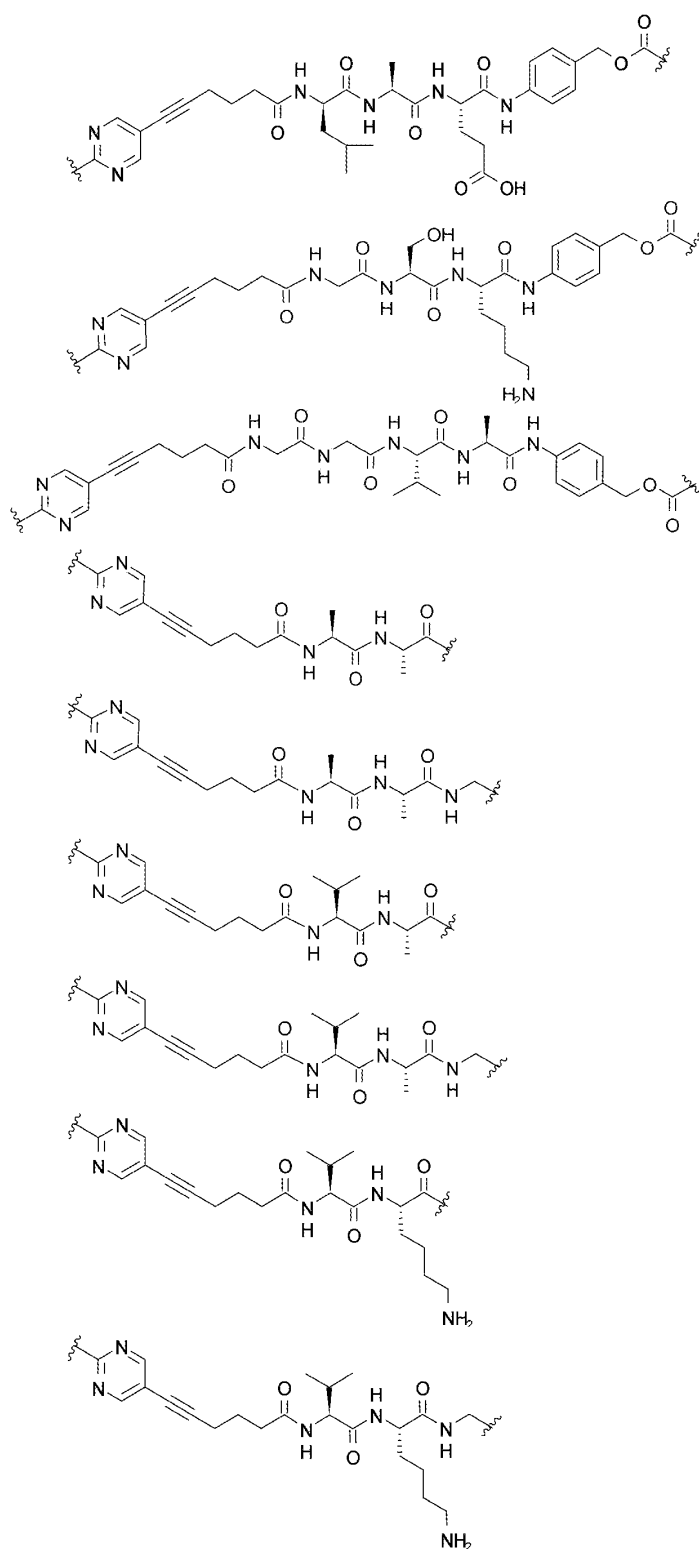
在一些实施方式中, 所述的 E 为 .

在一些实施方式中, $-\text{M}-\text{L}-\text{E}-$ 选自以下结构:



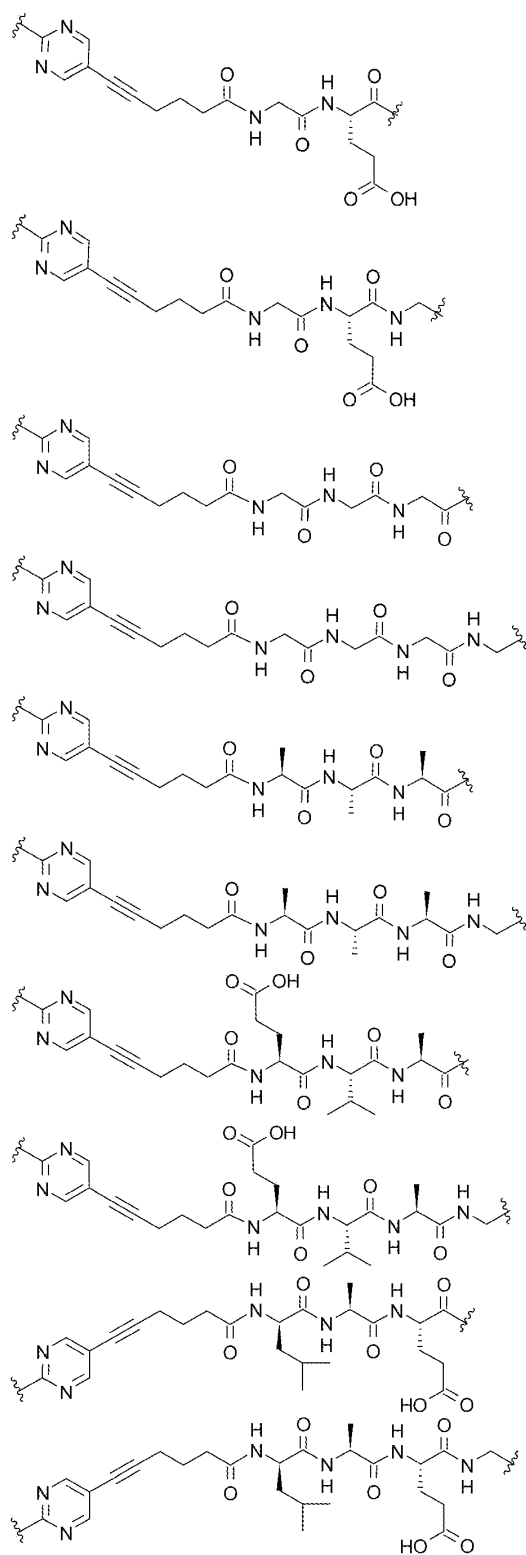


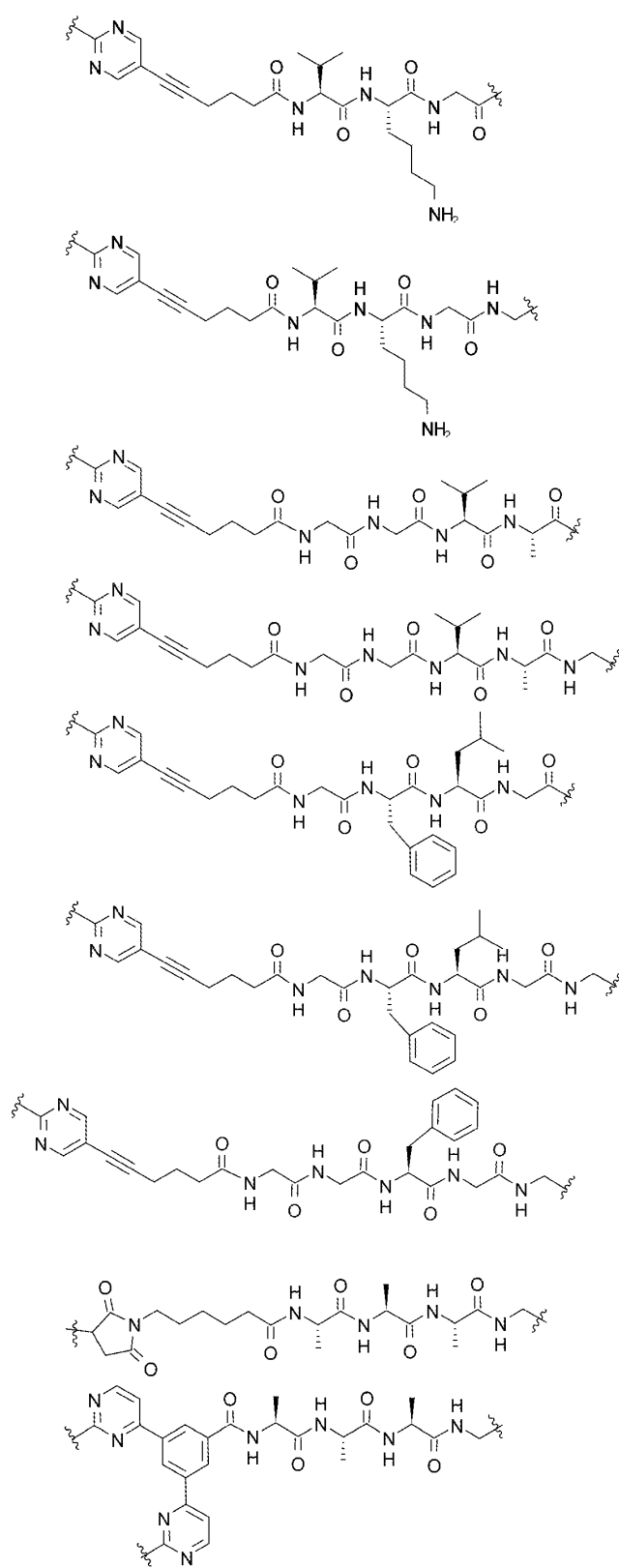


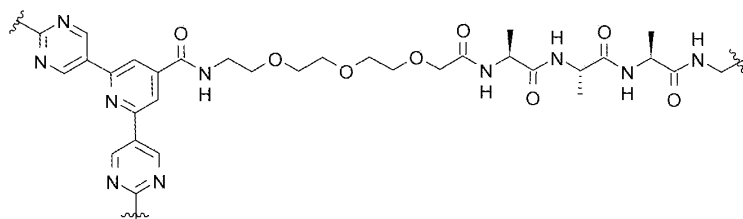
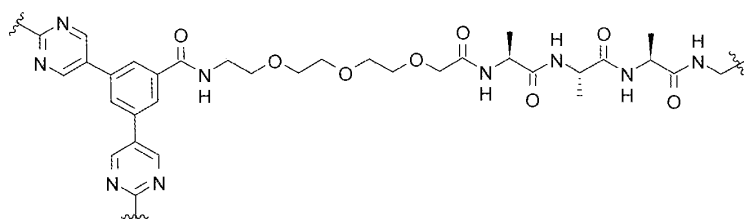
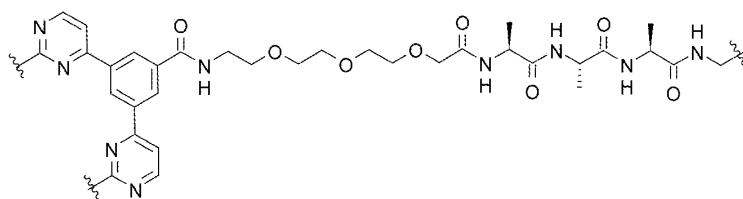
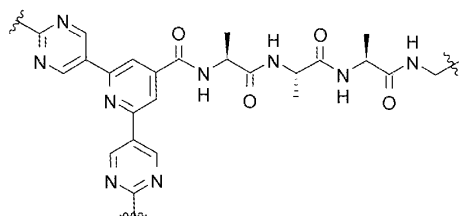
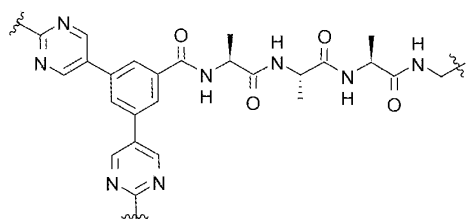


5

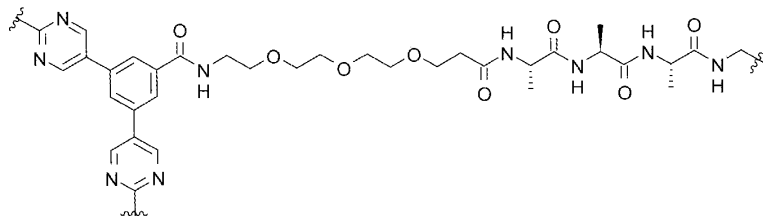
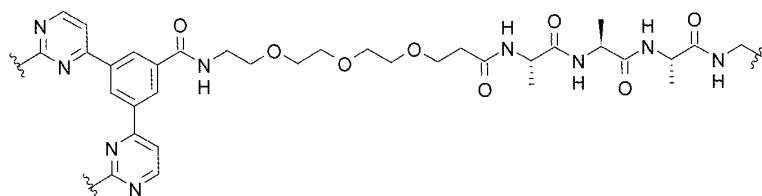
10

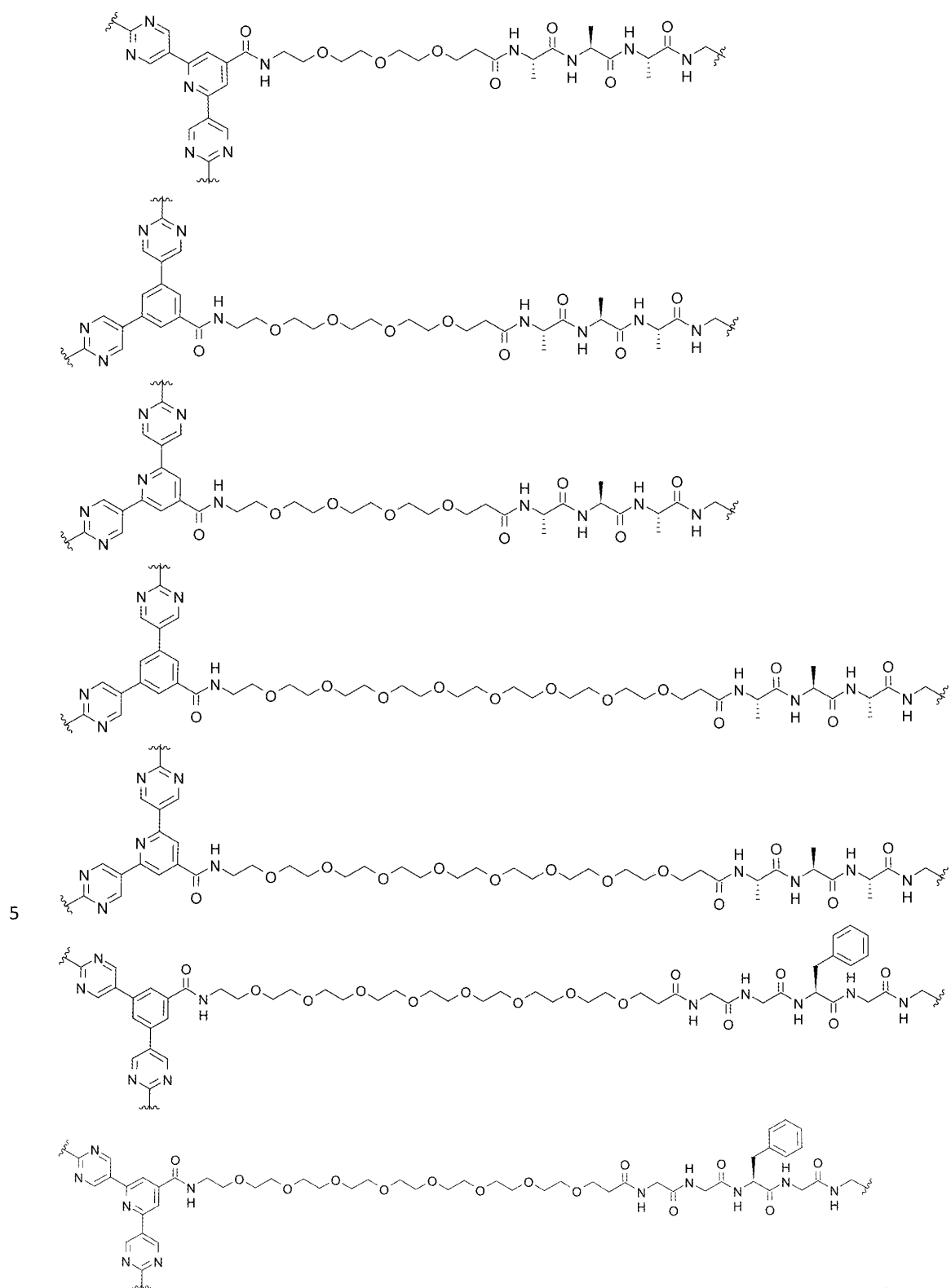




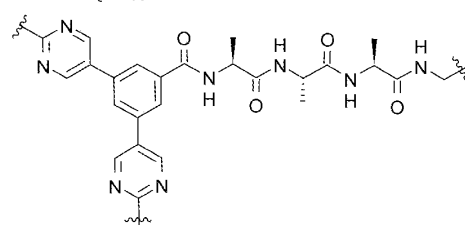


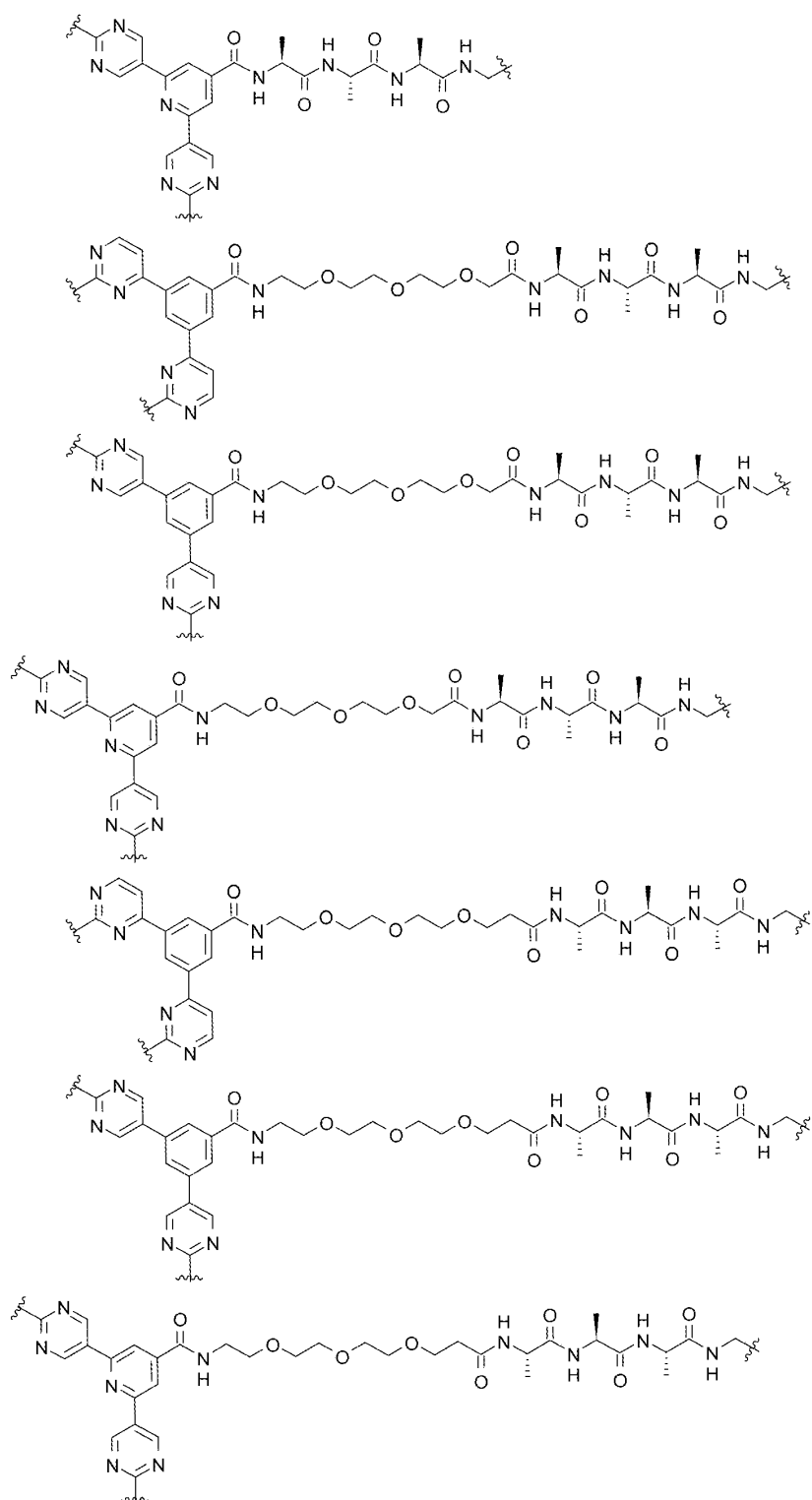
5

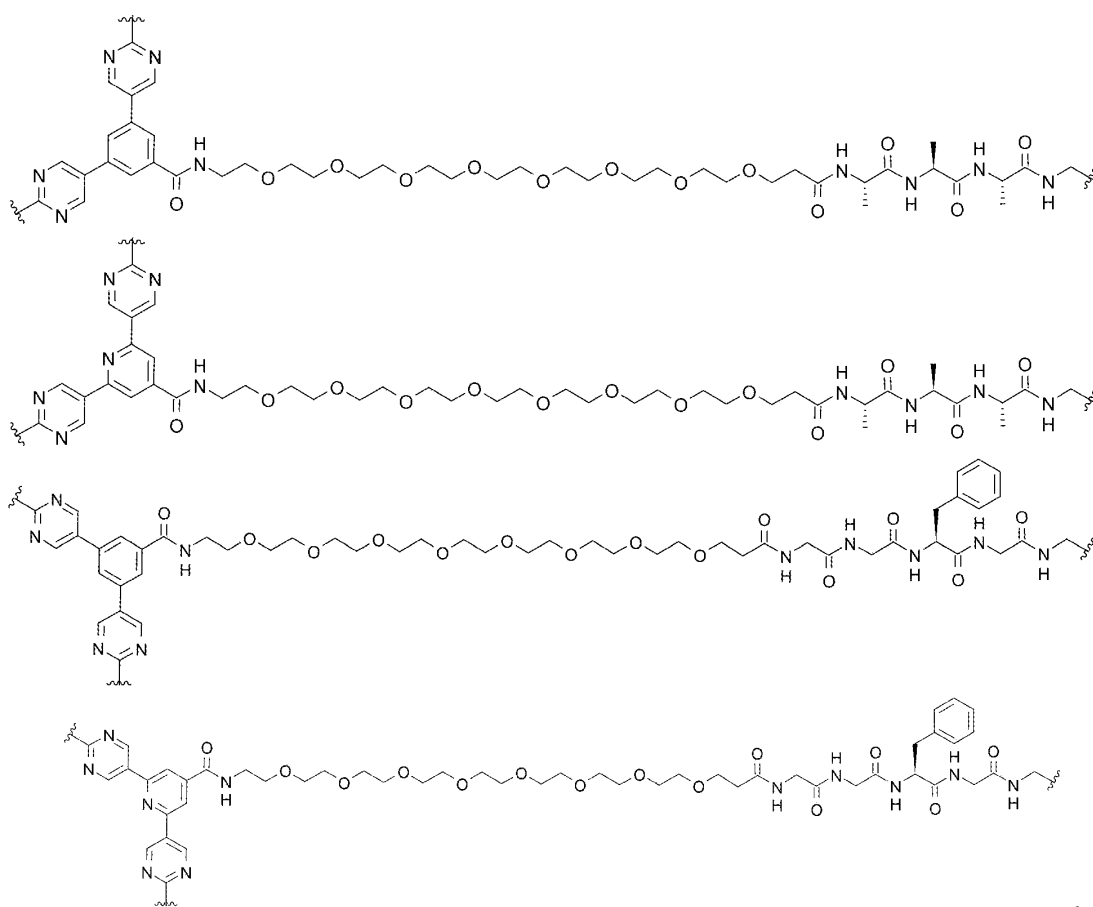




在一些实施方式中， $\text{---}\text{M}\text{---}\text{L}\text{---}\text{E}\text{---}$ 选自以下结构：







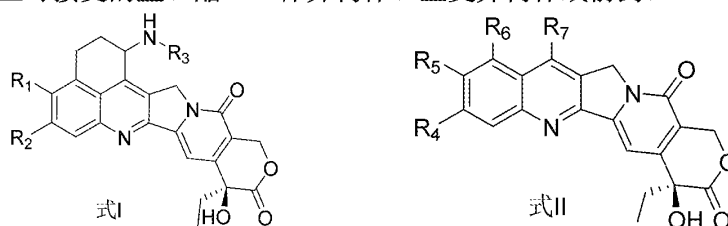
5 在一些实施方式中，所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA嵌入剂、DNA拓扑异构酶抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。

10 在一些实施方式中，所述微管蛋白抑制剂为奥瑞他汀类化合物或美登素类化合物；所述DNA嵌入剂为吡咯并苯二氮卓PBD；所述DNA拓扑异构酶抑制剂为拓扑异构酶I抑制剂（例如，喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、或卢比替康）或拓扑异构酶II抑制剂（例如，阿霉素、PNU-159682、多卡米星、柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素、或依托泊苷）；所述RNA聚合酶抑制剂为 α -鹅膏蕈碱（ α -amanitin）或其药学上可接受的盐、酯或类似物。

15 本申请中所公开的细胞毒性药物通常含有多种官能团，例如羟基（-OH）、羧基（-COOH）、巯基（-SH）、一级氨基（-NH₂）、二级胺基（-NR_AH）或三级胺基（-NR_BR_C），其中 R_A、R_B、R_C在此仅代表 N 上的非氢取代基，所述细胞毒性药物可通过这些官能团与偶联物中的连接体连接。

在一些实施方案中，所述细胞毒性药物通过其上的-OH、-SH、一级氨基、二级胺基或三级胺基与所述抗体药物偶联物中的E连接。

在一些实施方式中, 所述细胞毒性药物选自式 I、式 II 所示化合物、或式 I、式 II 所示化合物的药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药:



其中, R_1, R_2 各自独立地选自 C_{1-6} 烷基和卤素;

5 R_3 选自 H 和 $-CO-CH_2OH$;

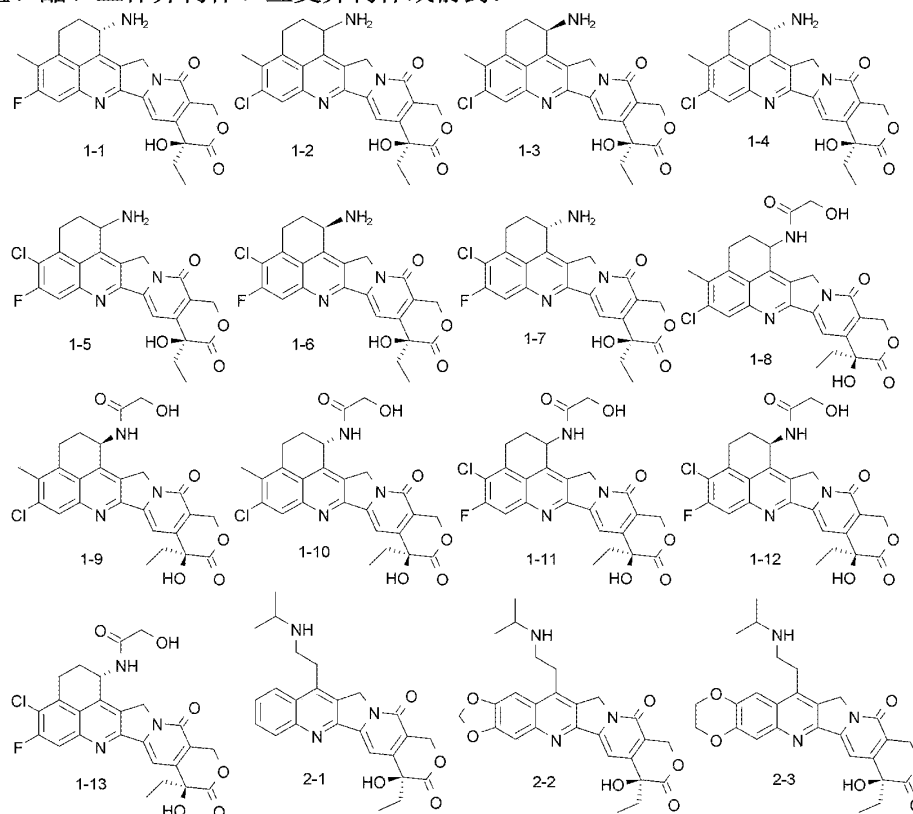
R_4 和 R_5 各自独立地选自 H、卤素和羟基; 或者 R_4 和 R_5 与相连碳原子连接成 5-6 元含氧杂环;

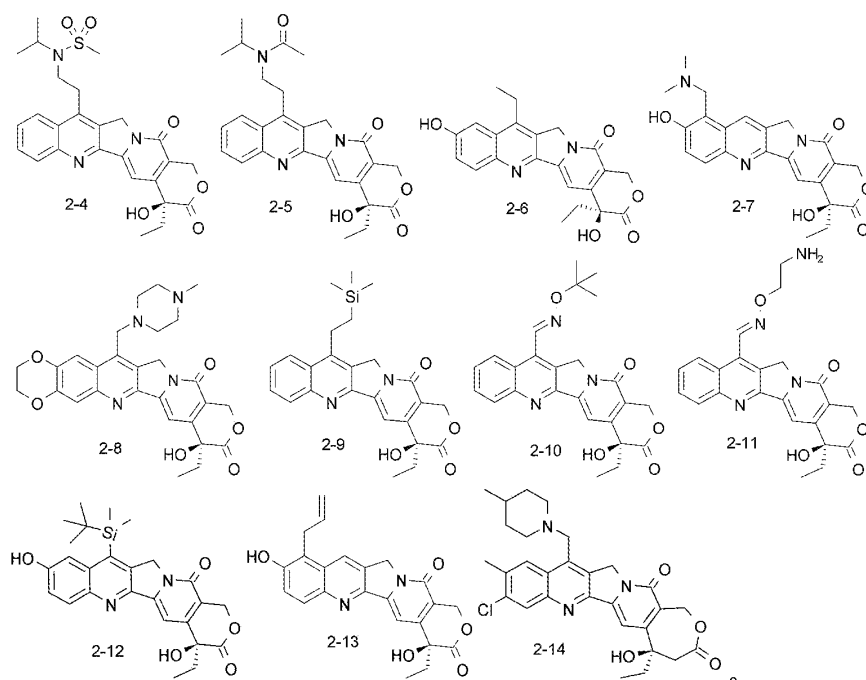
R_6 选自氢或 $-C_{1-4}$ 亚烷基- NR_aR_b ;

R_7 选自 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-4}$ 亚烷基- NR_aR_b ;

10 其中 R_a, R_b 在每次出现时各自独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基和 $-CO-C_{1-6}$ 烷基。

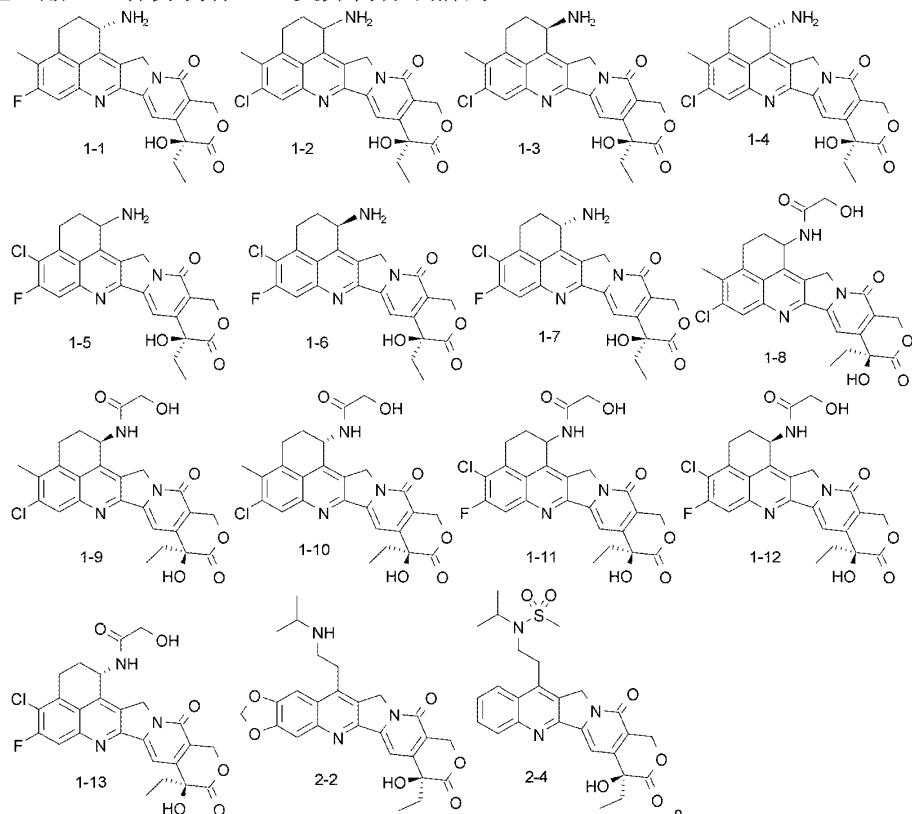
在一些实施方式中, 所述细胞毒性药物选自以下化合物或所述化合物的药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药:





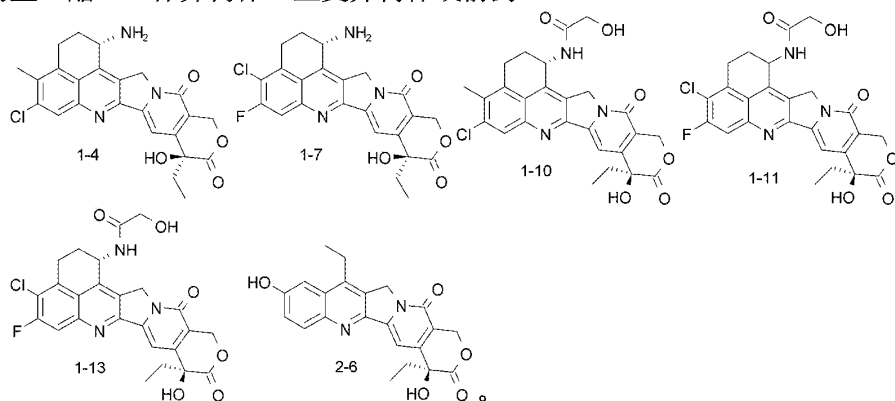
在一些实施方式中, 所述细胞毒性药物选自以下化合物或所述化合物的药学上可接受

5 的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药:



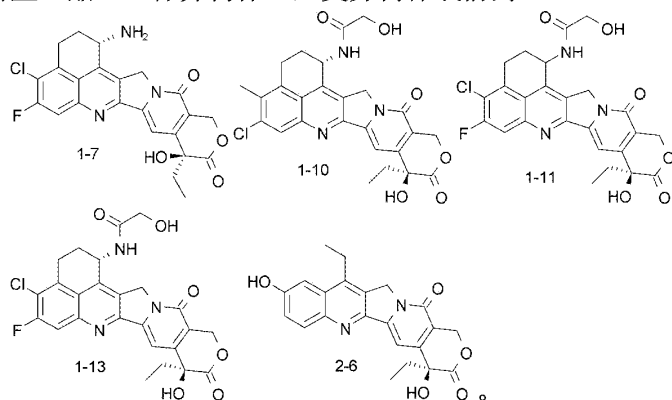
10 在一些实施方式中, 所述细胞毒性药物选自以下化合物或所述化合物的药学上可接

受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药：



在一些实施方案中，所述细胞毒性药物选自以下化合物或所述化合物的药学上可接

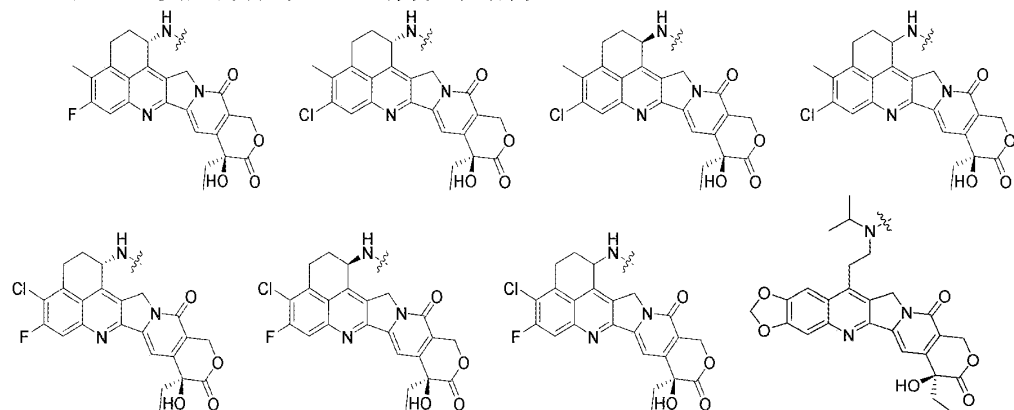
5 受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药：

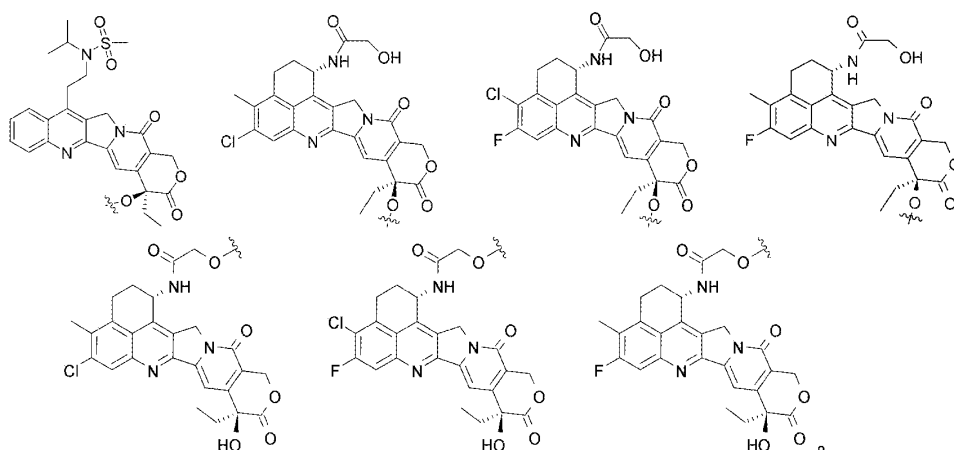


在一些实施方式中，所述细胞毒性药物与连接体连接后得到的该细胞毒性药物相应的片段即为通式中的D；优选地，D为所述细胞毒性药物上的-OH、-NH₂或二级胺基

10 失掉一个H得到的一价结构。

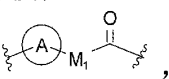
在一些实施方案中，D选自以下结构：



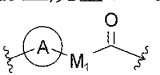


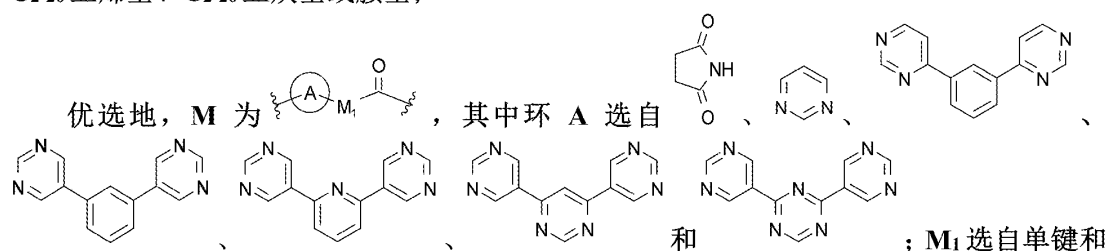
另一方面, 本发明提供的药物连接子化合物, 其具有式 **G-M-[L-E-D]_x** 所示结构, 其中:

- 5 **G** 是能够与抗体或抗原结合片段中特异性氨基酸或糖基发生反应的官能团或离去基团; **G** 优选自卤素、卤代 **C**₁₋₆ 烷基、**C**₁₋₆ 磺酰基、卤代 **C**₁₋₆ 磺酰基、卤代磺酰基、**C**₁₋₆ 磺酸酯基、卤代 **C**₁₋₆ 磺酸酯基、**C**₁₋₆ 亚磺酸酯基、**C**₁₋₆ 亚砷基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段;

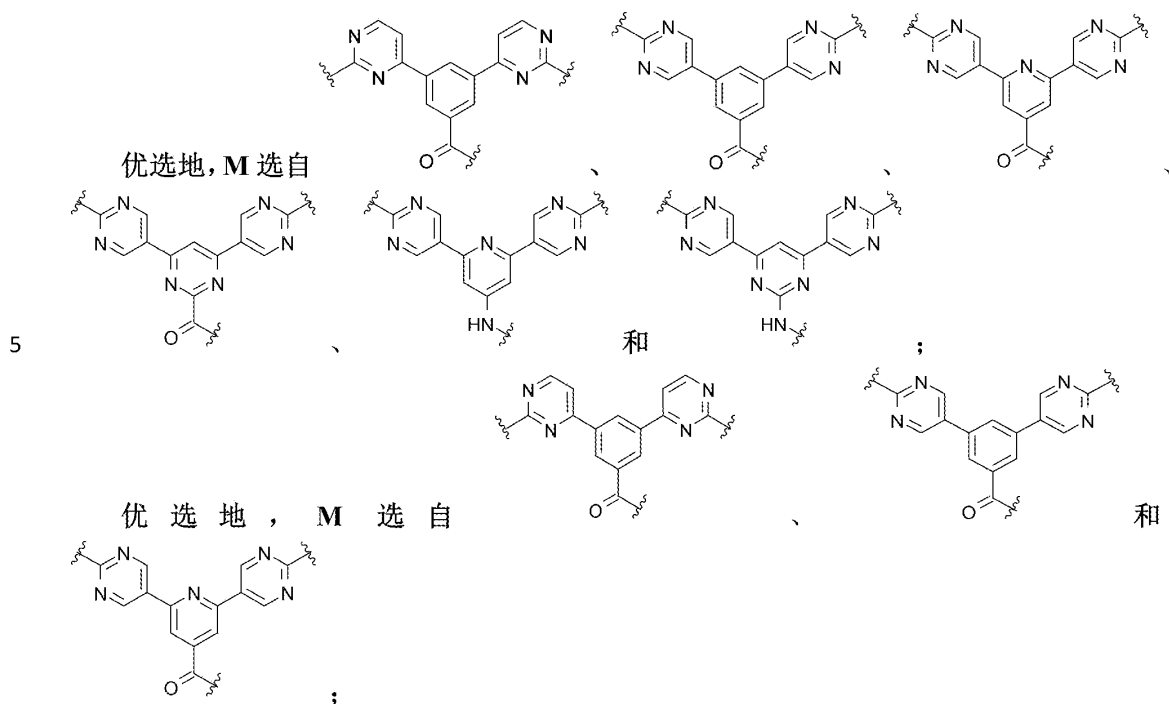
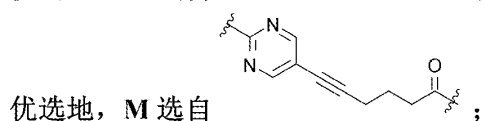
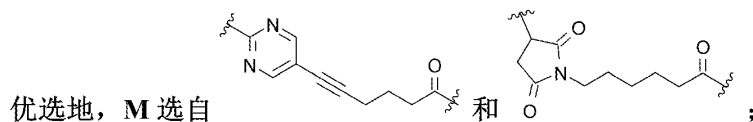
M 是与 **G** 相连的接头, **M** 为 ,

- 10 其中, 环 **A** 为 5-6 元脂杂环、或 5-20 元芳香族环系, 所述脂杂环和芳香族环系任选地被一个或多个选自氧基 (=O)、卤素、氰基、氨基、羧基、巯基和 **C**₁₋₆ 烷基的基团取代; **M**₁ 选自单键和 **C**₁₋₂₀ 亚烷基、**C**₂₋₂₀ 亚烯基、**C**₂₋₂₀ 亚炔基或胺基;

- 优选地, **M** 为 , 其中环 **A** 为 5 元脂杂环、6 元杂芳环、或由一个以上 (例如 2 个) 的 6 元芳杂环与苯环或 6 元杂芳环通过单键连接形成的多环, 所述脂杂环任选地被一个或多个选自氧基 (=O)、卤素和 **C**₁₋₄ 烷基的基团取代; **M**₁ 选自单键、**C**₁₋₂₀ 亚烷基、**C**₂₋₂₀ 亚烯基、**C**₂₋₂₀ 亚炔基或胺基;

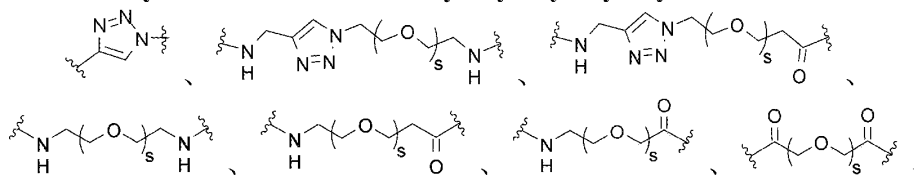


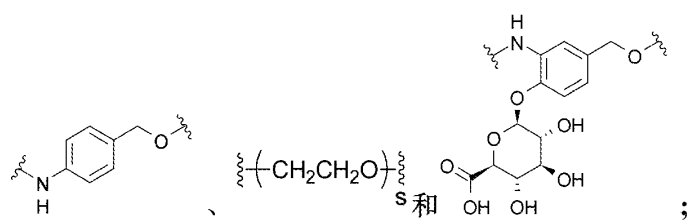
C₁₋₆ 亚烷基、**C**₂₋₆ 亚烯基、**C**₂₋₆ 亚炔基或胺基;



L 是连接接头 M 和 E 之间的连接子, L 选自由下述的一个或多个组成的结构:

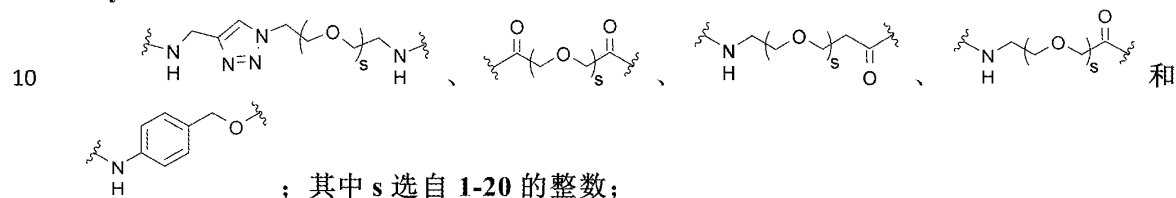
C₁₋₆ 亚烷基、-N(R')-、羰基、-O-、天然氨基酸或非天然氨基酸及其类似物 (比如 Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、Lys(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)_rOCH₃))、以及氨基酸组成的短肽 (比如 Ala-Ala、Ala-Lys、Ala-Lys(Ac)、Ala-Pro、Gly-Glu、Gly-Gly、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Val-Ala、Val-Lys、Val-Lys(Ac)、Val-Cit、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Leu-Ala-Glu、Gly-Gly-Arg、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly-Gly、Gly-Ser-Lys、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ser-Ala-Pro、Val-Leu-Lys、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Val-Ala、Gly-Phe-Leu-Gly、Glu-Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly)、



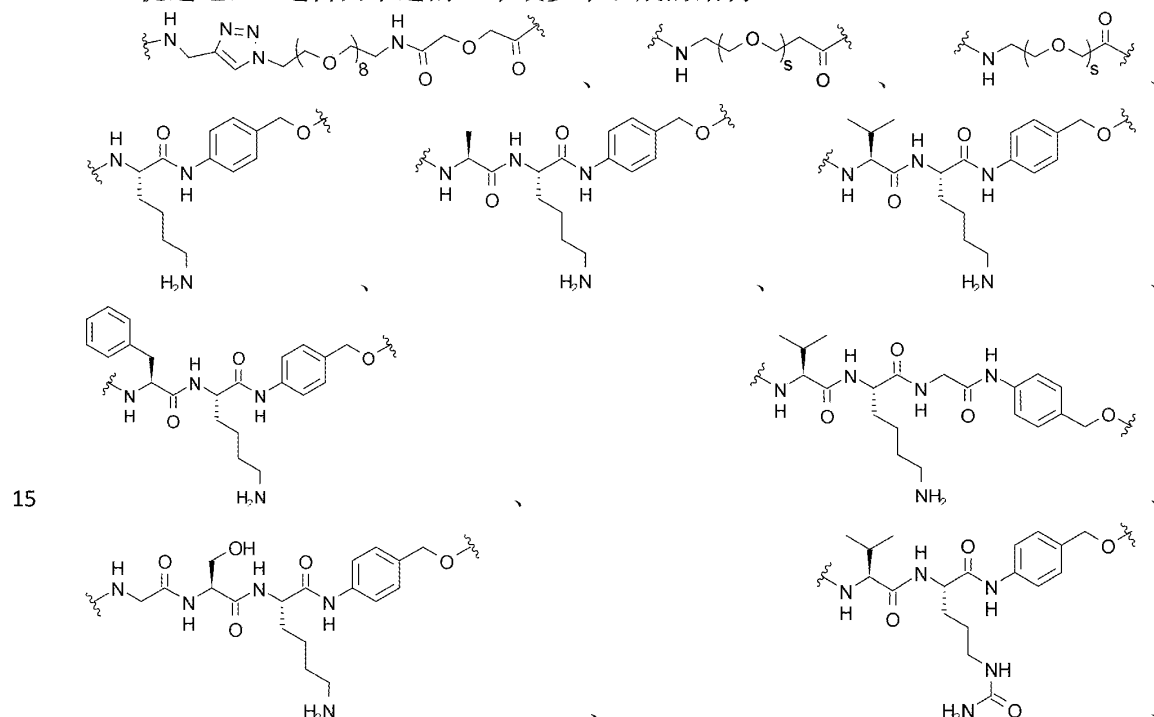


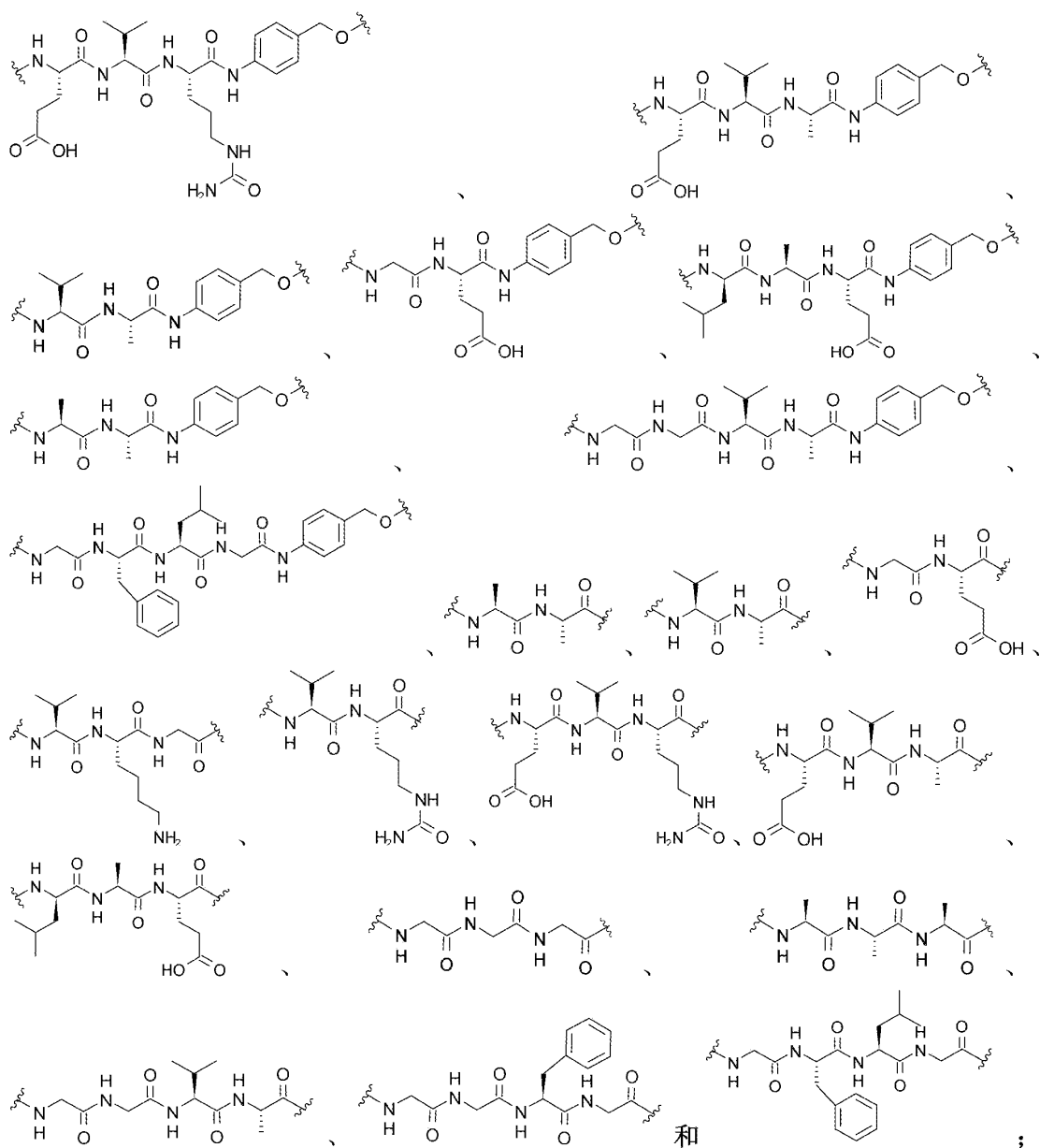
其中 R' 代表氢、C₁₋₆ 烷基或含 1-10 个 EO 单元的聚乙二醇片段；s 选自 1-20 的整数；

优选地，L 选自由下述的一个或多个组成的结构：C₁₋₆ 亚烷基、羰基、-NH-、Ala-
 5 Ala-Lys、Ala-Pro、Gly-Glu、Gly-Gly、Phe-Lys、Val-Ala、Val-Lys、Val-Cit、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Leu-Ala-Glu、Gly-Gly-Arg、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly-Gly、Gly-Ser-Lys、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ser-Ala-Pro、Val-Leu-Lys、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Val-Ala、Gly-Phe-Leu-Gly、Glu-Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly、

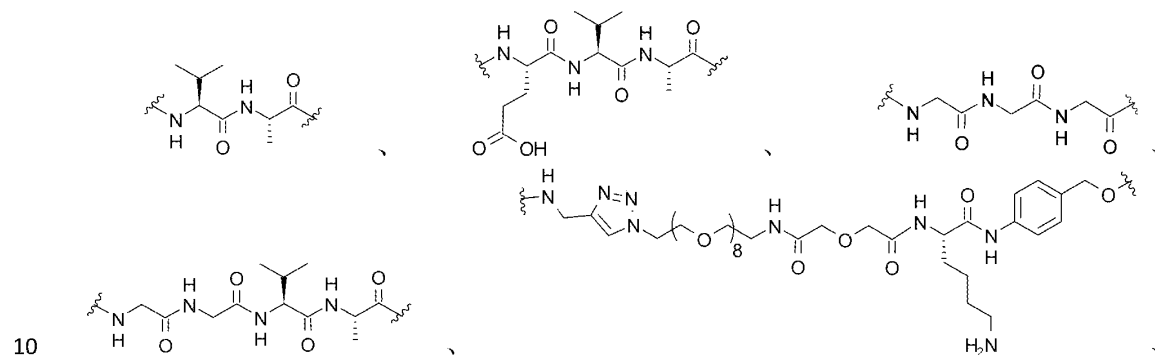


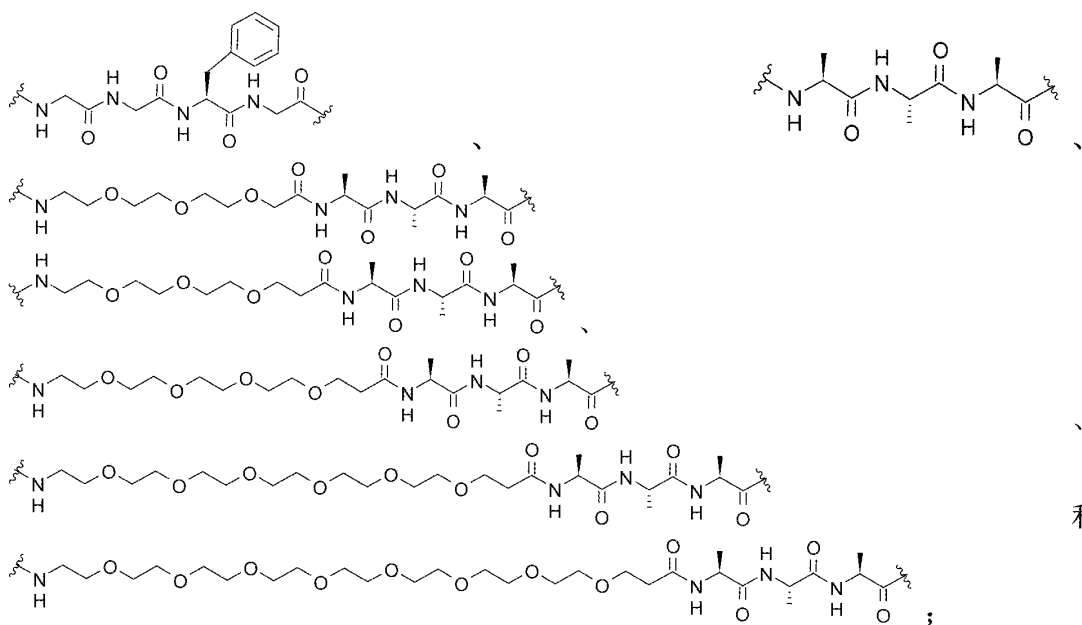
优选地，L 选自由下述的一个或多个组成的结构：



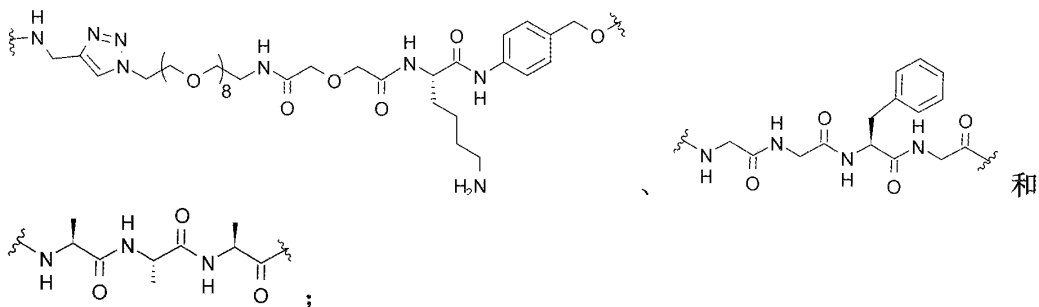


优选地，L 选自以下结构：

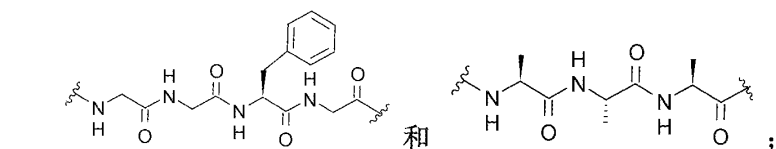




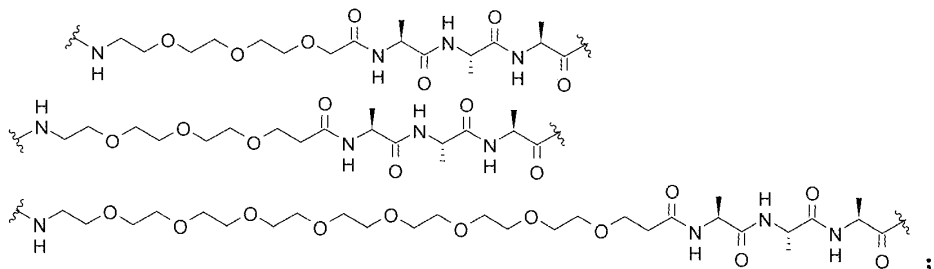
优选地，L选自以下结构：



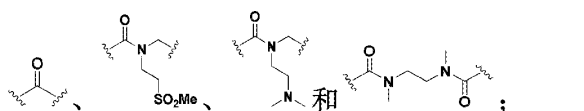
优选地，L选自以下结构：



优选地，L选自以下结构：



E 是连接 L 和 D 的结构片段，其中 E 为单键、-NHCH₂-或选自以下结构：



优选地, E 为单键、-NHCH₂-、或;

优选地, E 为-NHCH₂-或;

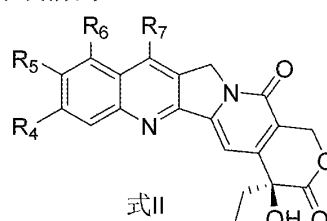
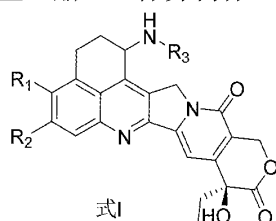
优选地, E 为-NHCH₂-;

5 优选地, E 为单键;

优选地, E 为;

D 是细胞毒性药物片段, 所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA 嵌入剂、DNA 拓扑异构酶抑制剂和 RNA 聚合酶抑制剂; 优选地, 所述微管蛋白抑制剂为奥瑞他汀类化合物或美登素类化合物; 优选地, 所述 DNA 嵌入剂为吡咯并苯二氮卓(PBD); 优选地, 10 所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为拓扑异构酶 I 抑制剂(例如, 喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、或卢比替康)或拓扑异构酶 II 抑制剂(例如, 阿霉素、PNU-159682、多卡米星、柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素、或依托泊苷); 优选地, 所述 RNA 聚合酶抑制剂为 α -鹅膏蕈碱(α -amanitin)或其药学上可接受的盐、酯或类似物;

15 优选地, 所述细胞毒性药物选自式 I、式 II 所示化合物、或式 I、式 II 所示化合物的药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药:



其中, R₁, R₂ 各自独立地选自 C₁₋₆ 烷基和卤素;

R₃ 选自 H 和-CO-CH₂OH;

20 R₄ 和 R₅ 各自独立地选自 H、卤素和羟基; 或者 R₄ 和 R₅ 与相连碳原子连接成 5-6 元含氧杂环;

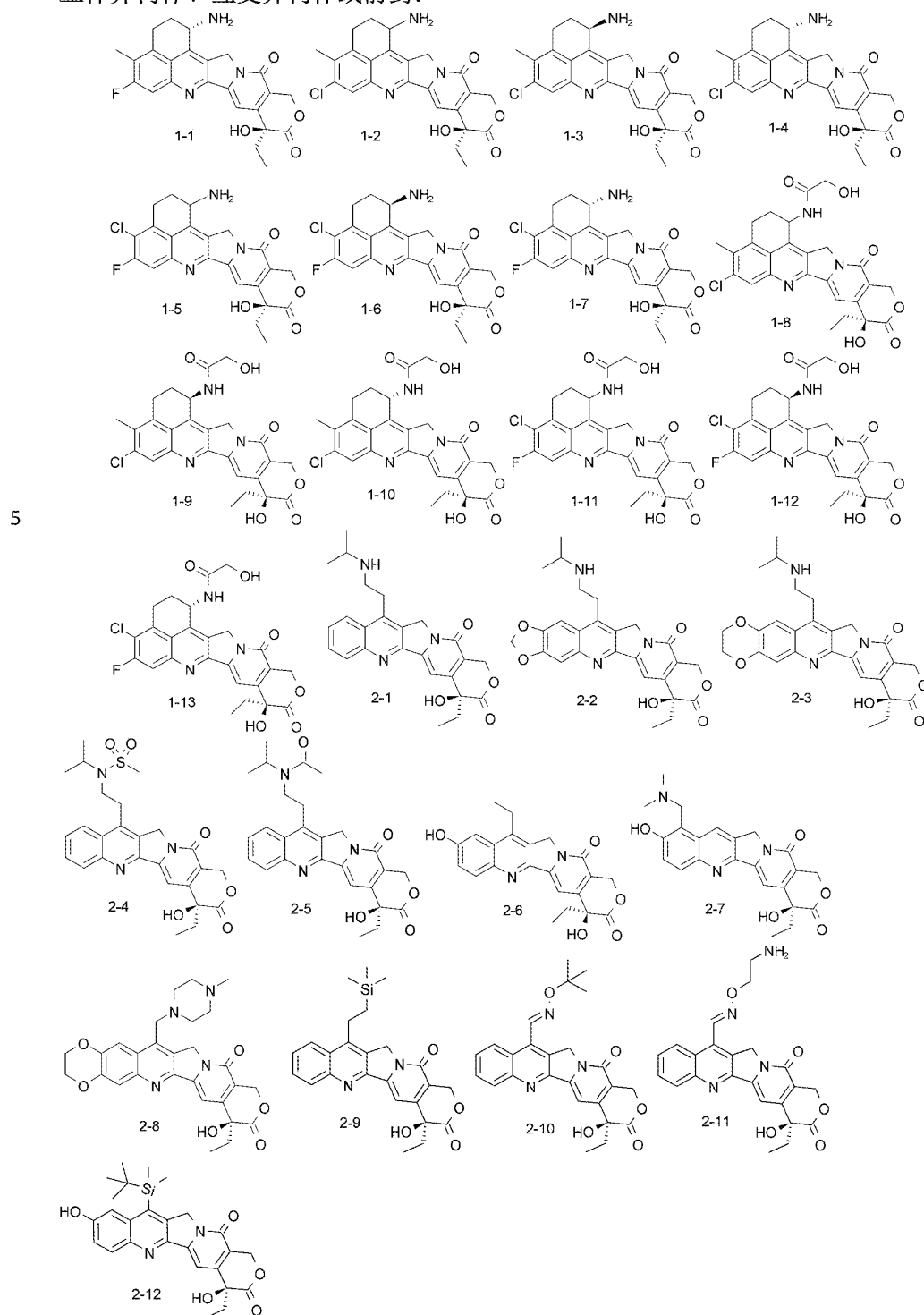
R₆ 选自氢或-C₁₋₄ 亚烷基-NR_aR_b;

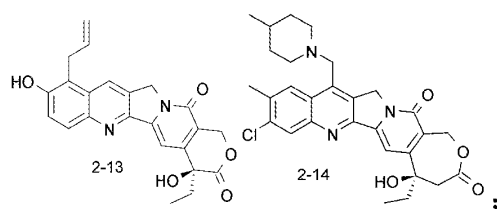
R₇ 选自 C₁₋₆ 烷基和-C₁₋₄ 亚烷基-NR_aR_b;

其中 R_a、R_b 在每次出现时各自独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基、-SO₂-C₁₋₆ 烷基和-CO-C₁₋₆ 烷基;

25 基;

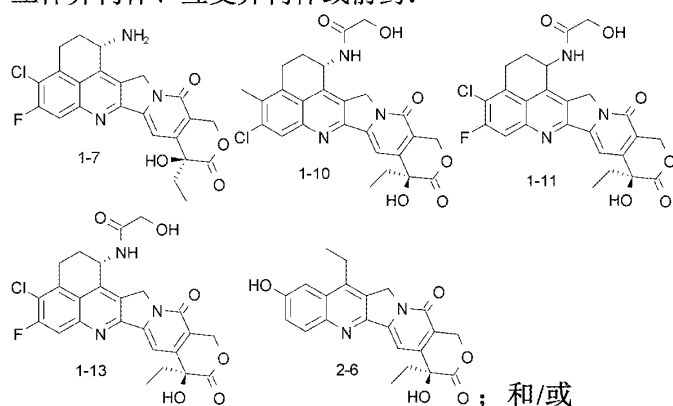
优选地，所述细胞毒性药物选自以下化合物或所述化合物的药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药：





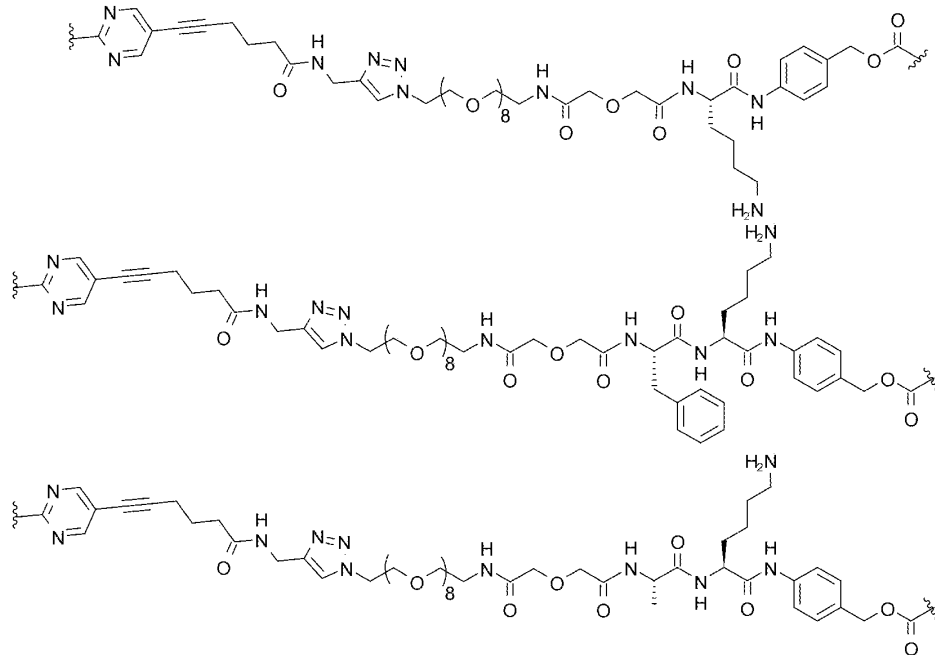
所述细胞毒性药物与连接体连接后得到的该细胞毒性药物相应的片段即为通式中的 **D**；优选地，**D** 为所述细胞毒性药物上的 **-OH**、**-NH₂** 或二级胺基失掉一个 **H** 得到的一价结构；

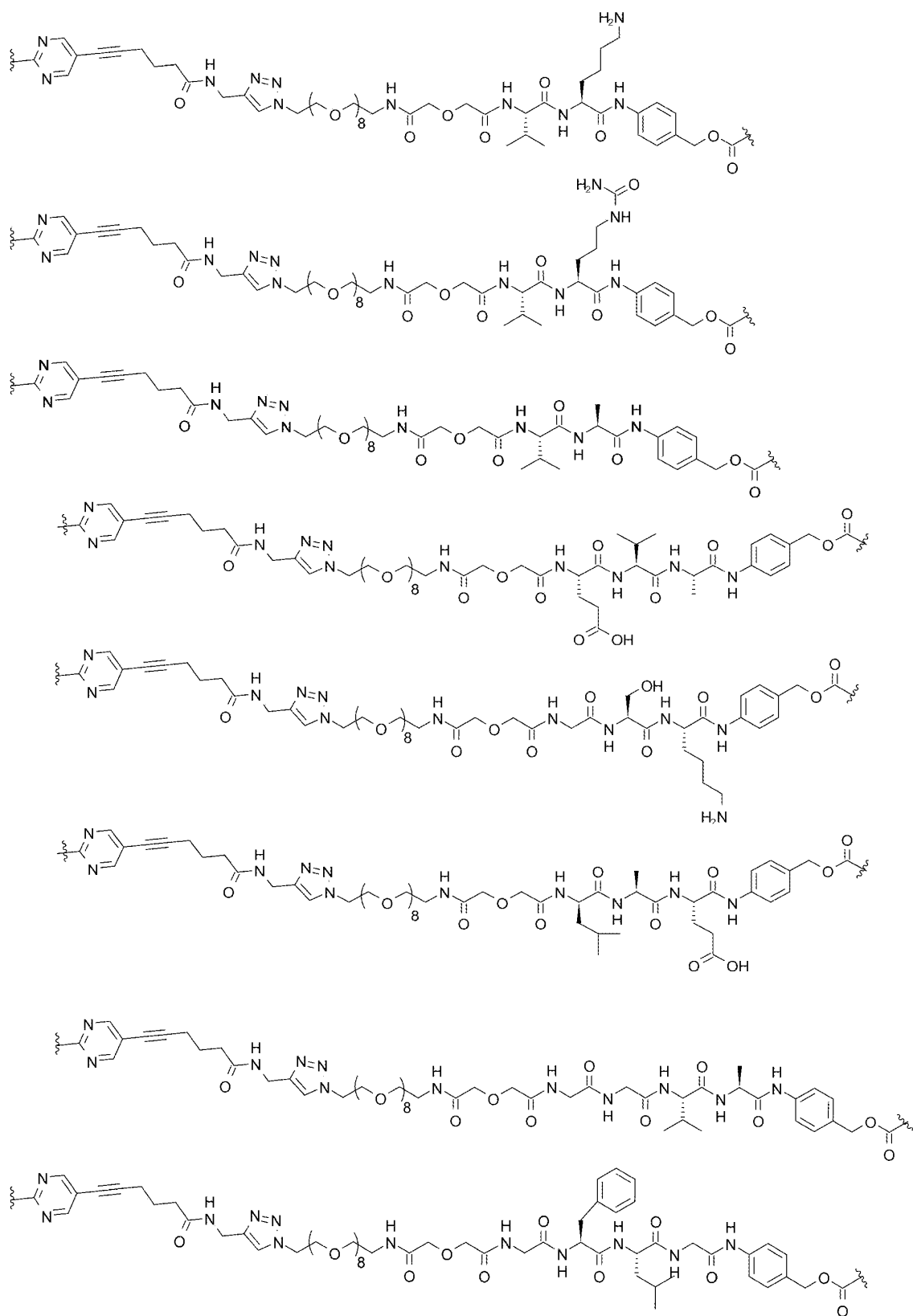
- 5 优选地，所述细胞毒性药物选自以下化合物或所述化合物的药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药：

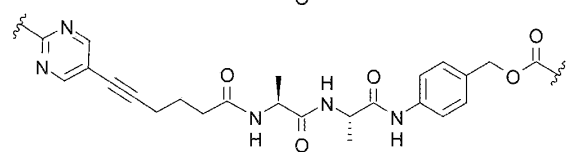
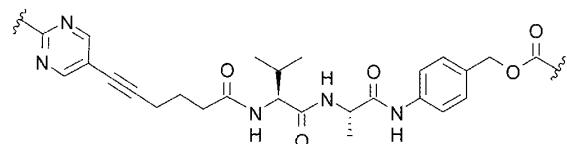
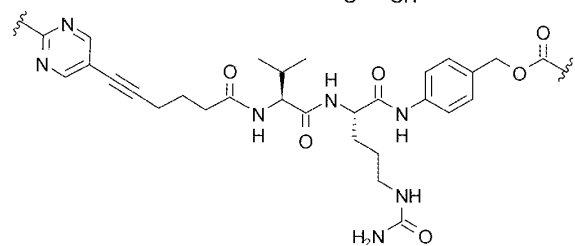
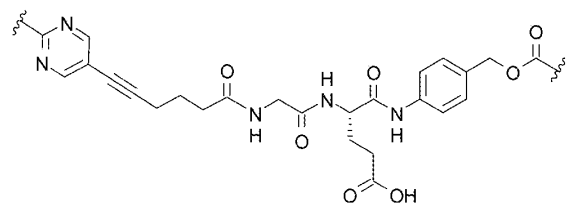
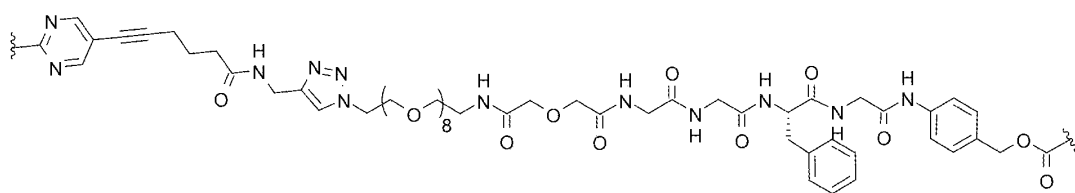


x 选自 **1** 至 **10**；

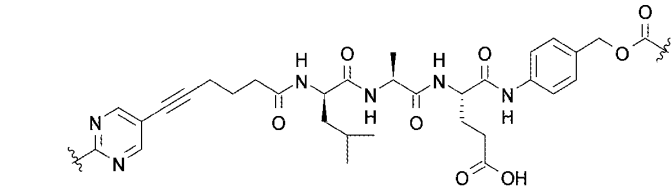
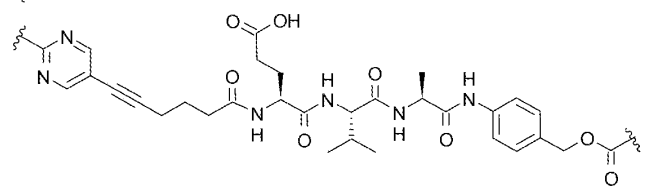
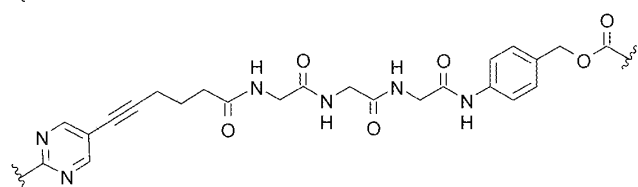
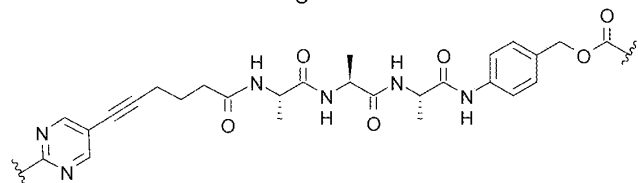
- 10 优选地， $\sim\text{M}-\text{L}-\text{E}\sim$ 选自以下结构：



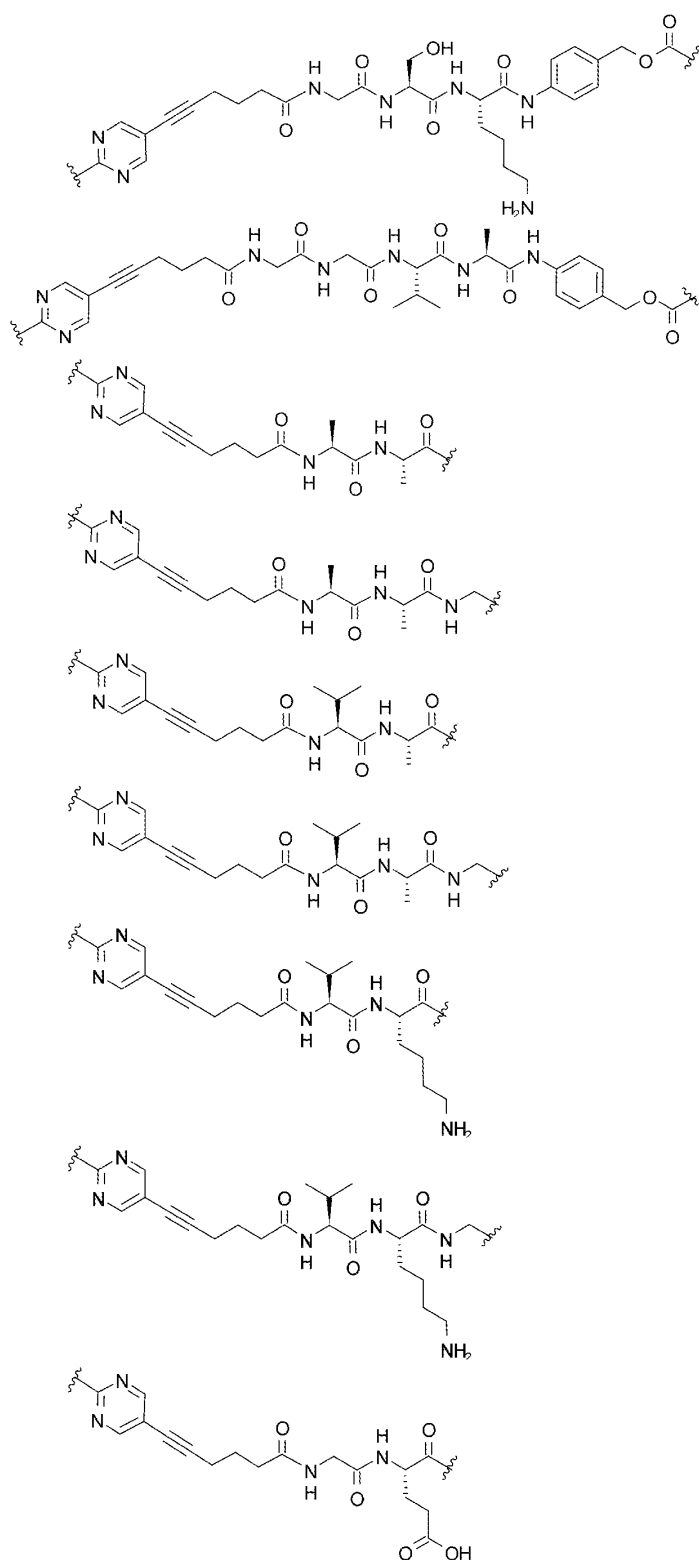




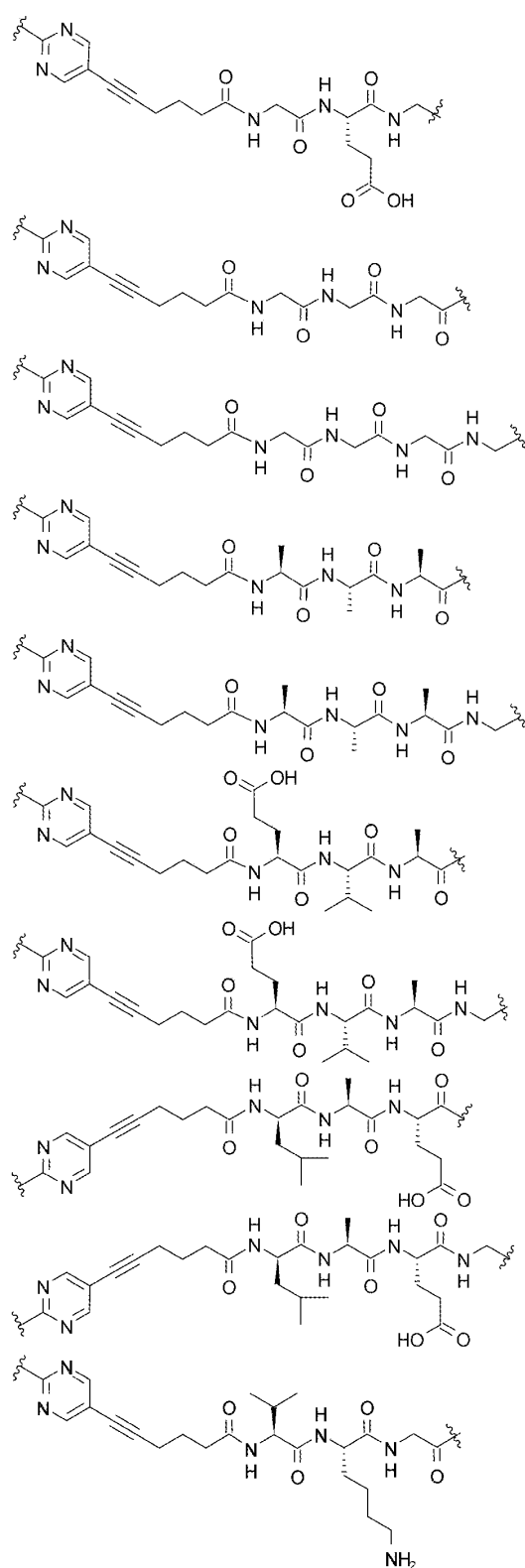
5



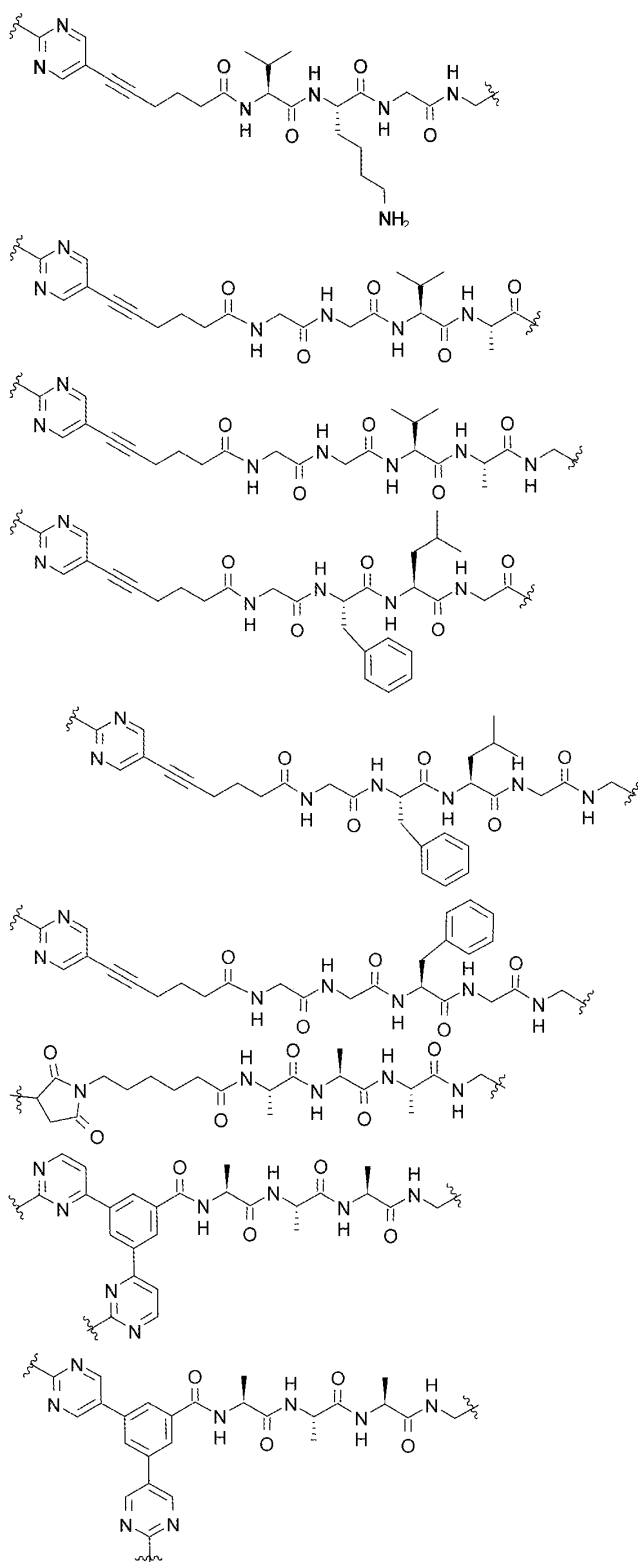
5

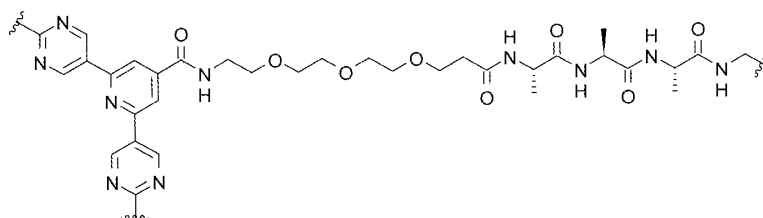


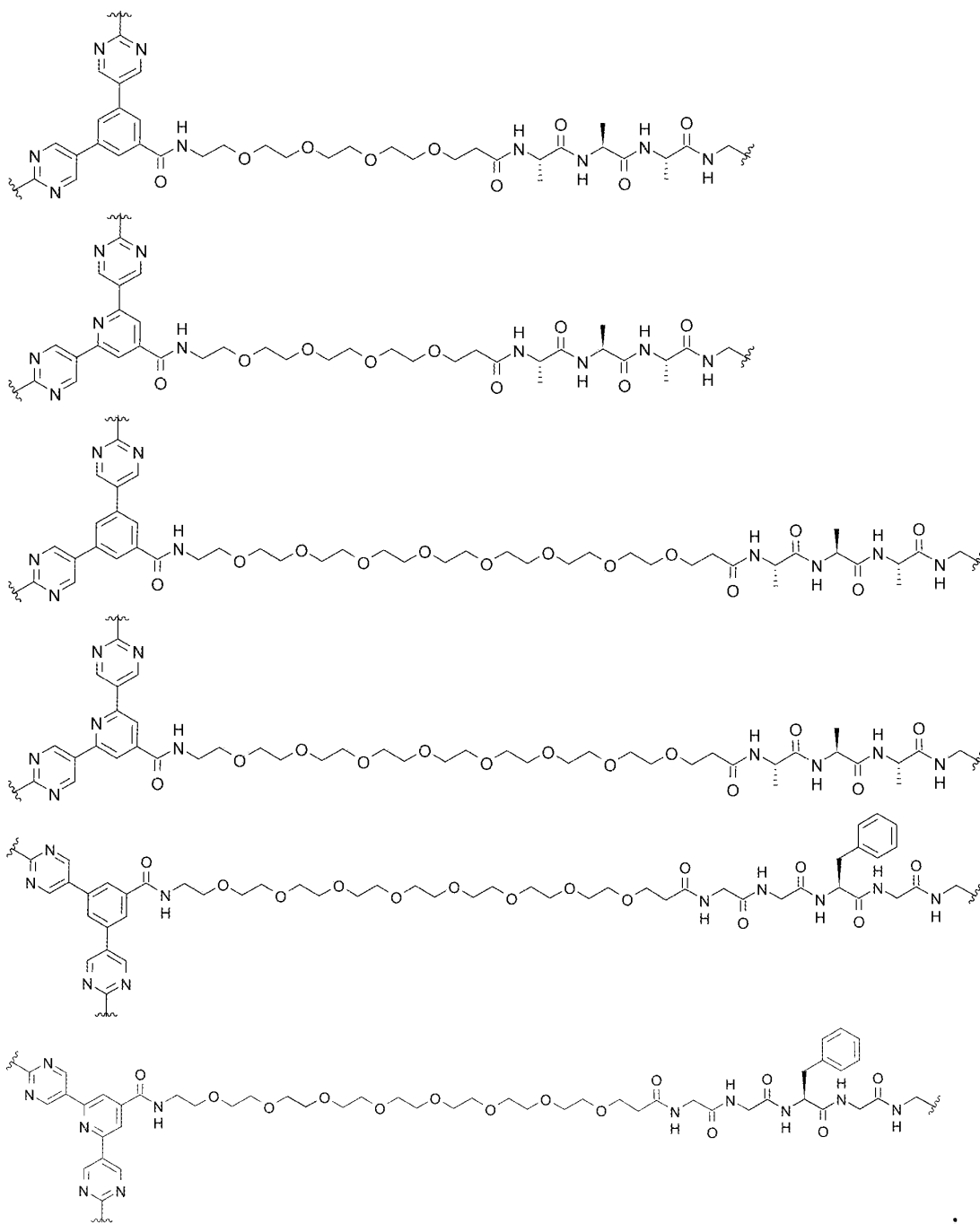
5



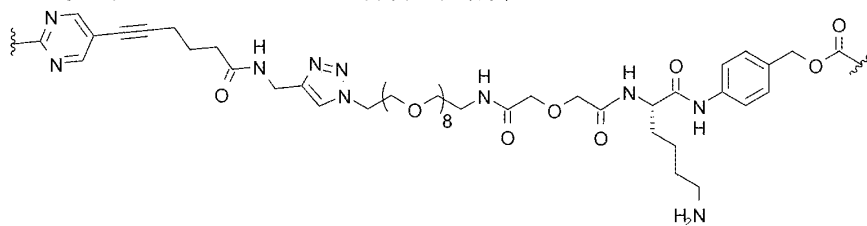
10

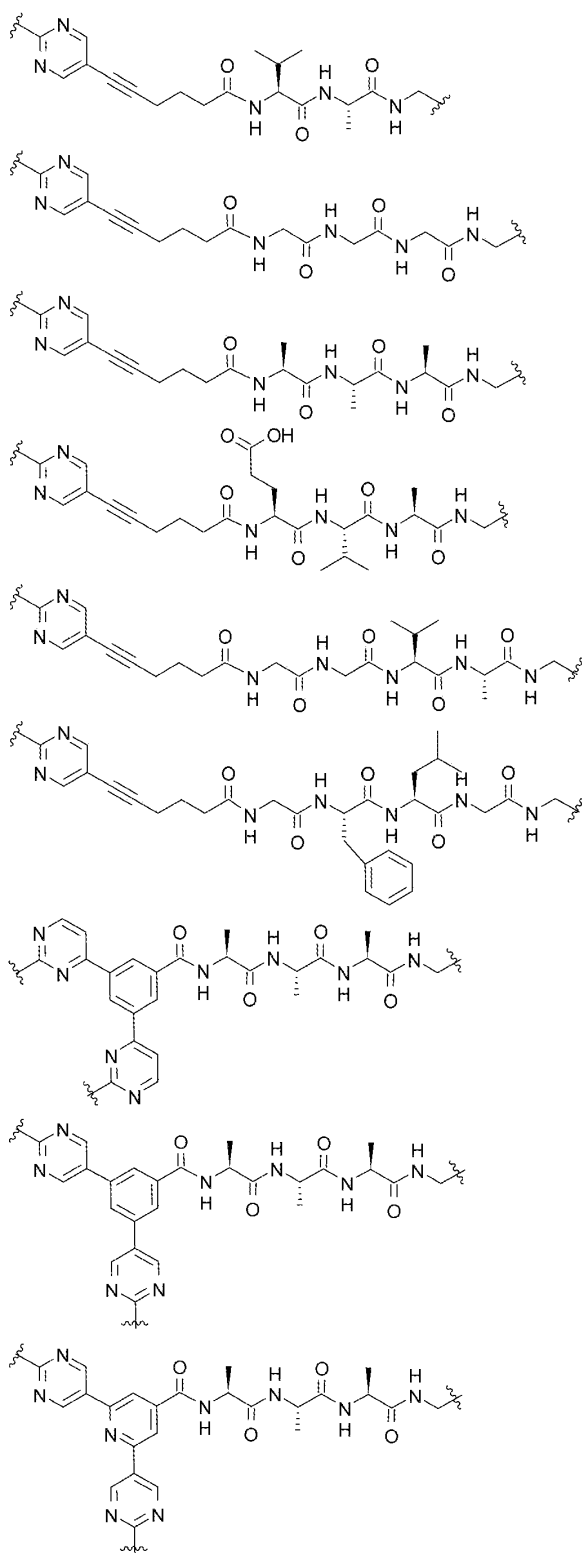


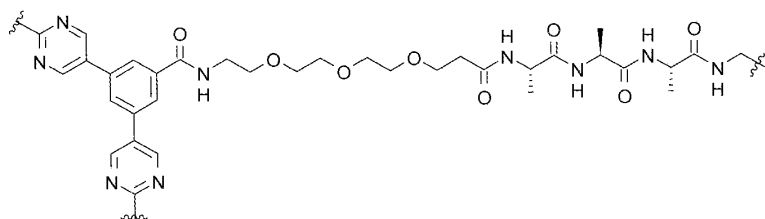
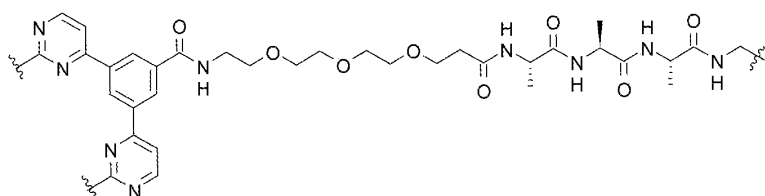
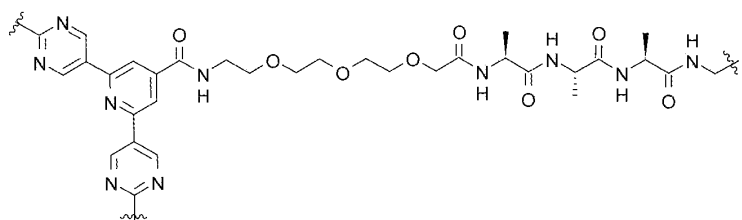
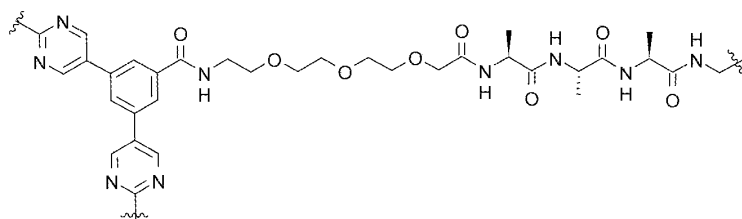
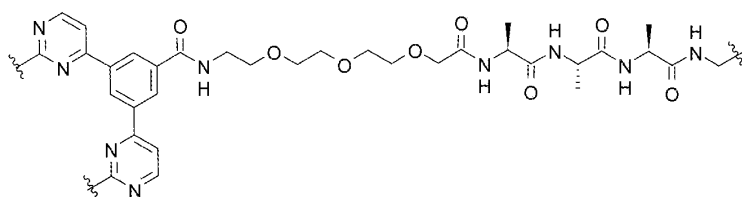




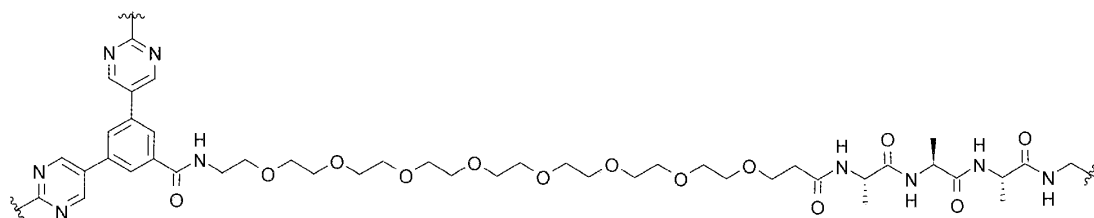
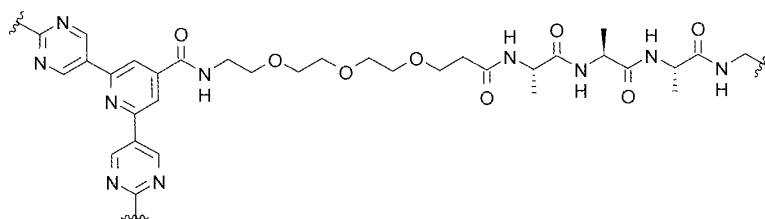
优选地， ---M---L---E--- 选自以下结构：

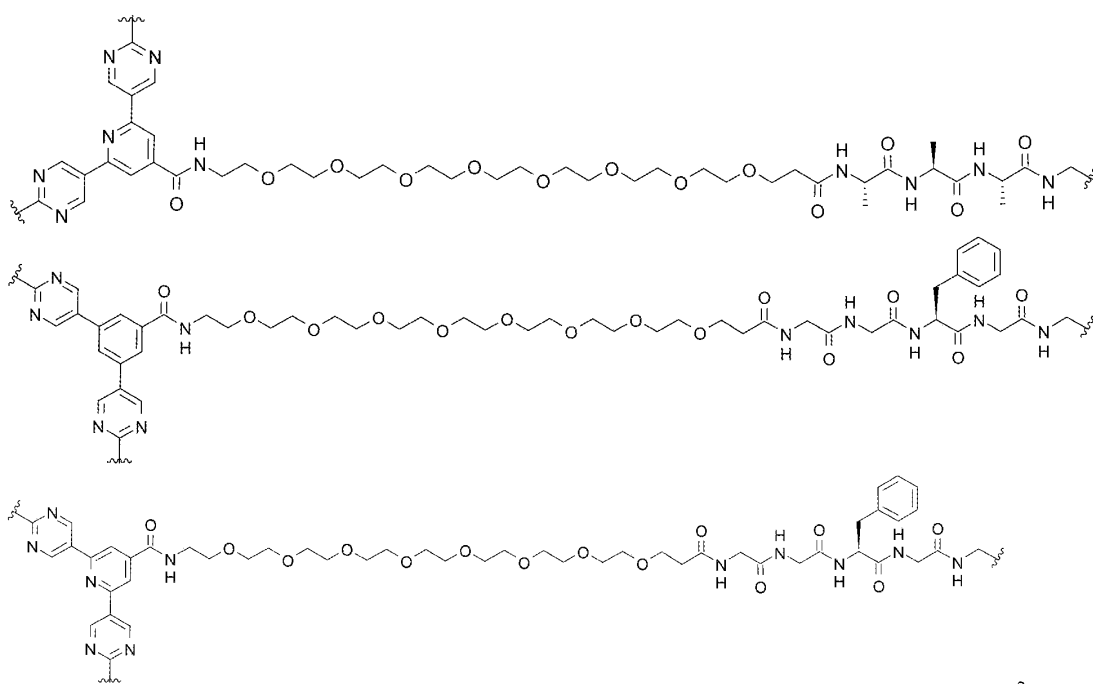






5

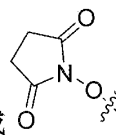




在另一个方面，本发明提供一种药物-连接体，其具有式G-M-[L-E-D]_x所示结构，

5 x选自1至10，其中：

G-M 为 $G-\text{A}-M_1$ ，G 为亲核取代反应的离去基团（例如，



卤素、甲磺酰基、氟代苯酚基或

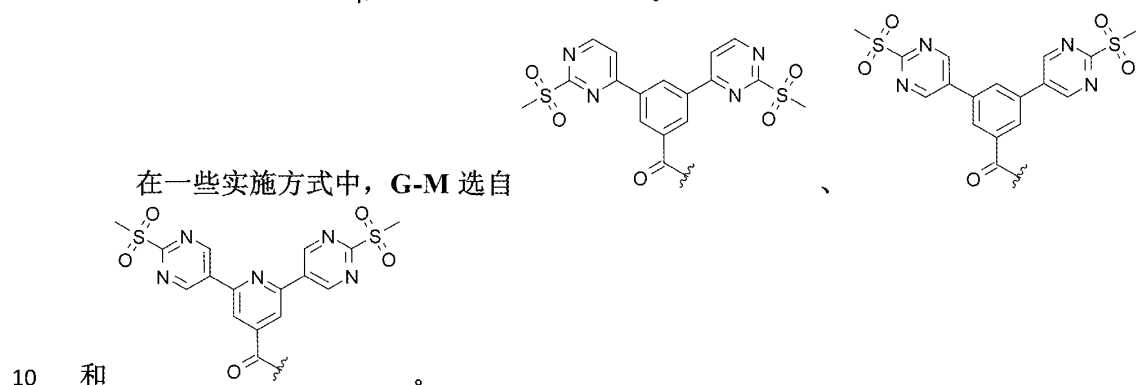
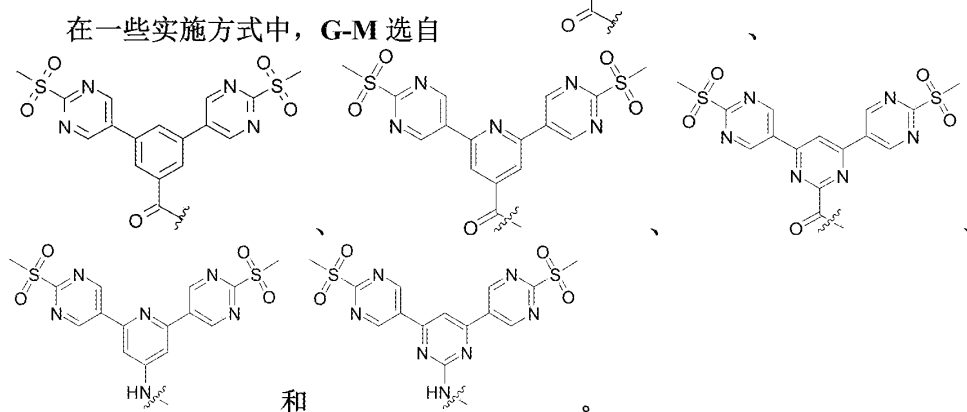
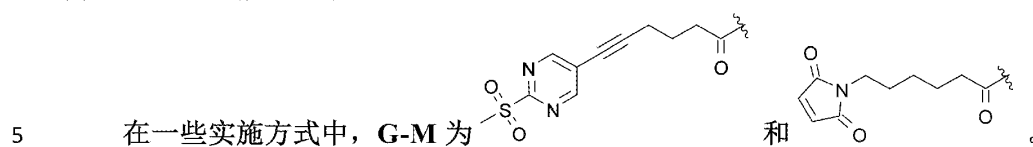
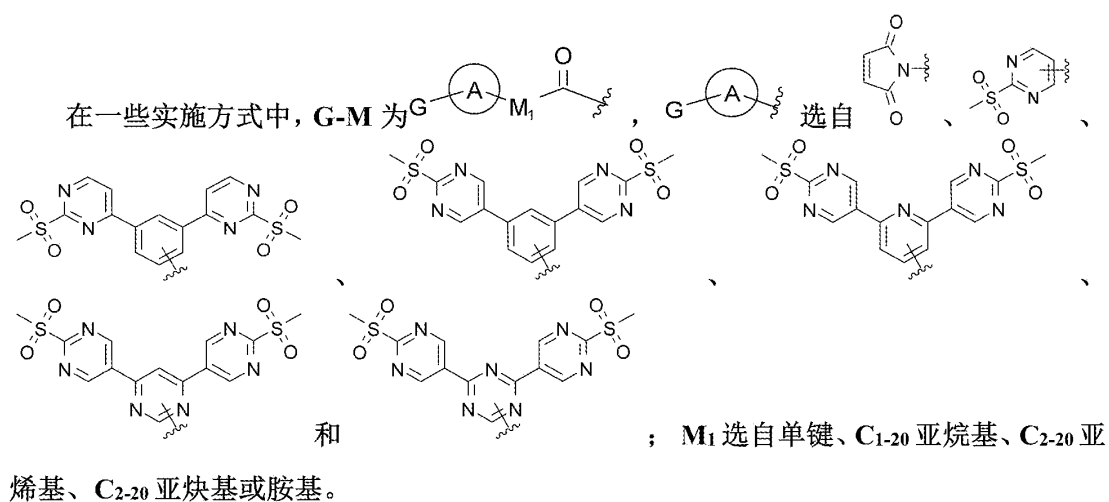
（-NH₂）；或者，G 与环 A 上相邻原子形成不饱和双键；环 A 为 5-6 元脂杂环、或 5-20 元芳香族环系，所述脂杂环和芳香族环系任选地被一个或多个选自氧基（=O）、卤素、氰基、

10 氨基、羧基、巯基和 C₁₋₆ 烷基的基团取代；M₁ 选自单键、C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基；

L、E 和 D 结构如前述所定义。

在一些实施方式中，G-M 为 $G-\text{A}-M_1$ ，G 为甲磺酰基，或者，G 与环 A 上

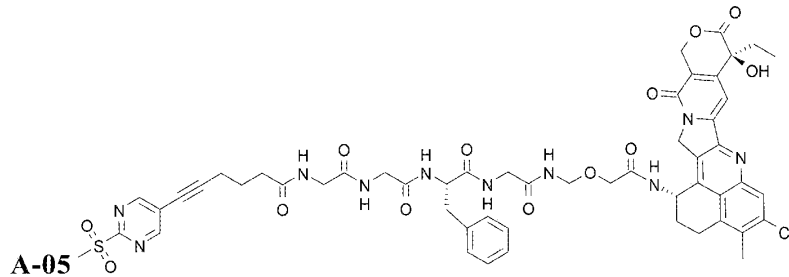
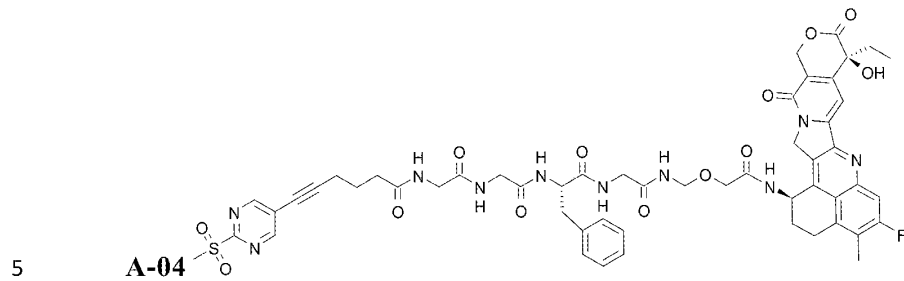
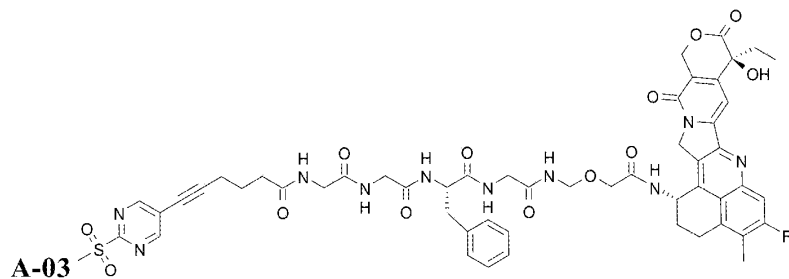
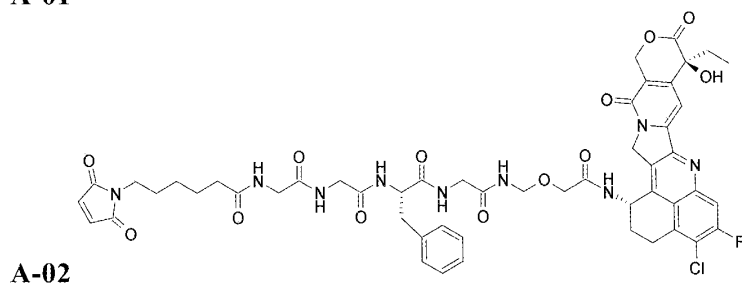
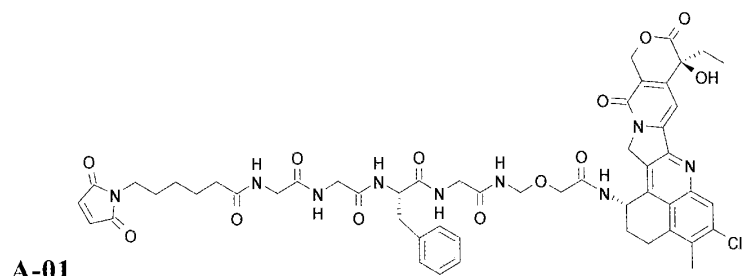
15 相邻原子形成碳碳双键；环 A 为 5 元脂杂环、6 元杂芳环、或由一个以上的 6 元芳杂环与苯环或 6 元杂芳环通过单键连接形成的多环，所述脂杂环任选地被一个或多个选自氧基（=O）、卤素和 C₁₋₄ 烷基的基团取代；M₁ 选自单键、C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₁₀ 亚炔基或胺基。

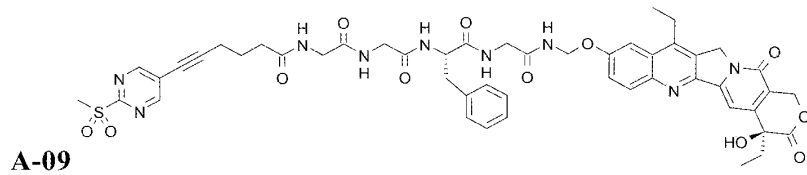
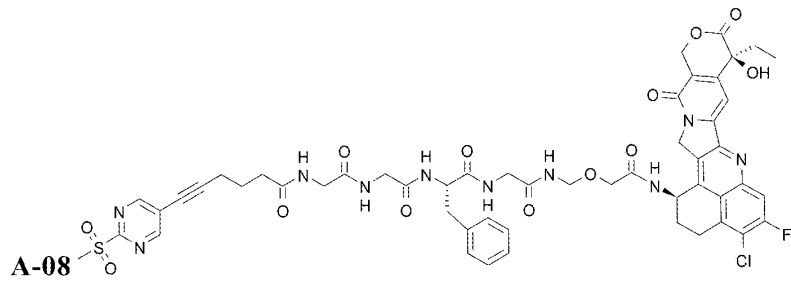
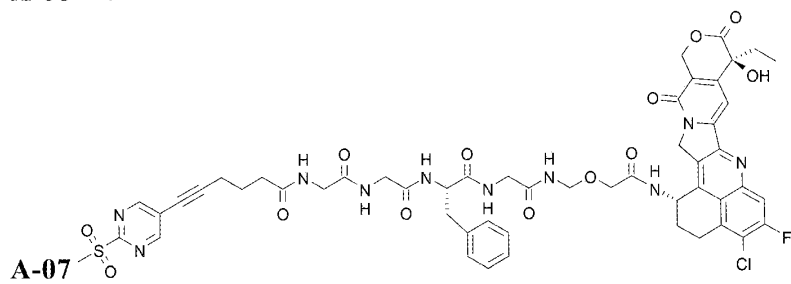
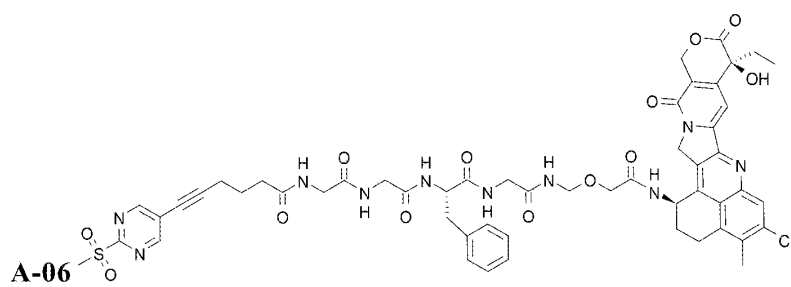


在一些实施方式中，**x** 选自 1 至 10。

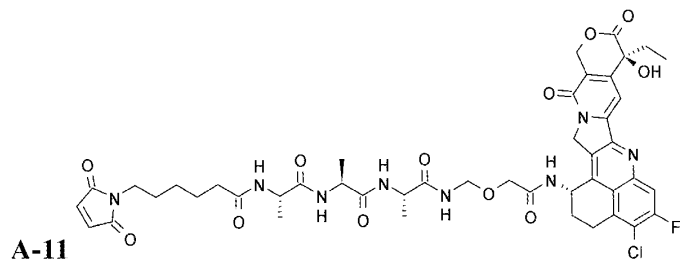
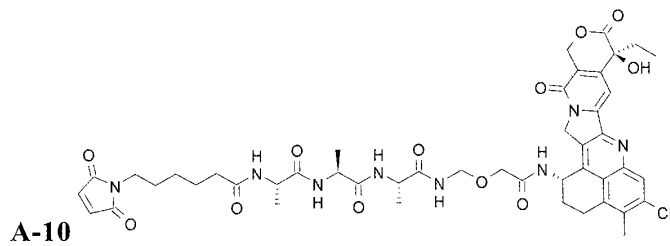
在一些实施方式中，所述的药物连接子化合物选自下示的 **A-01~A-34**, **B-01~B-07**,

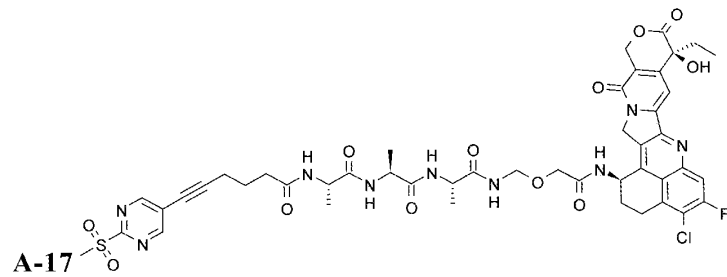
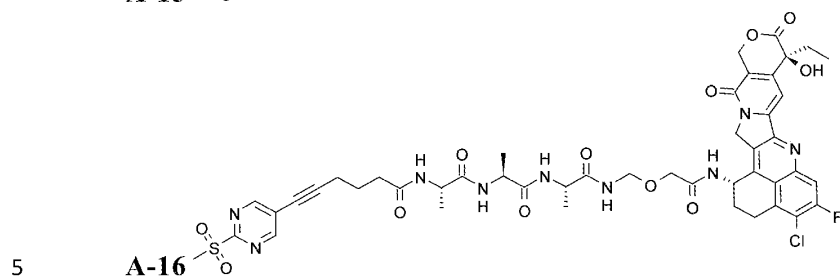
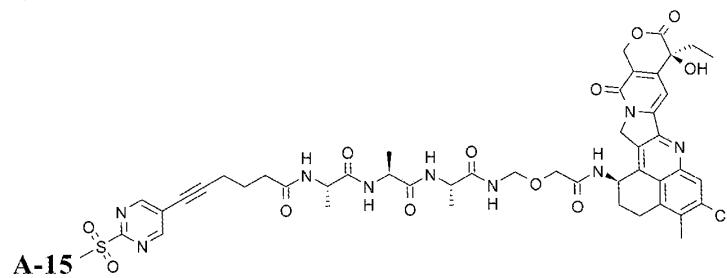
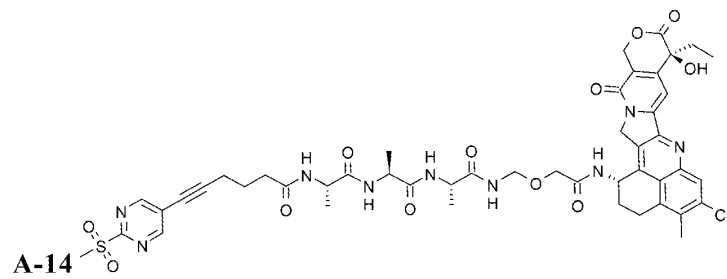
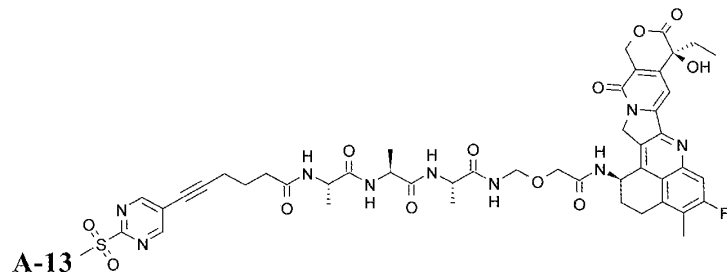
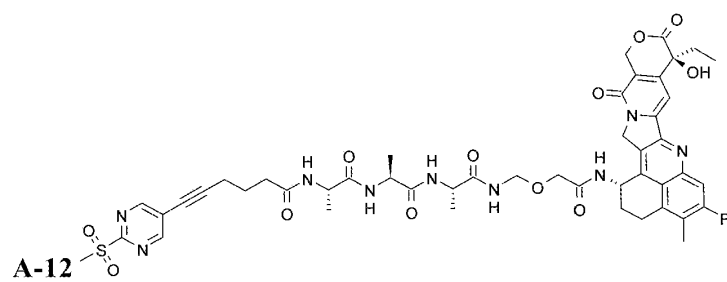
C-01~C-28:

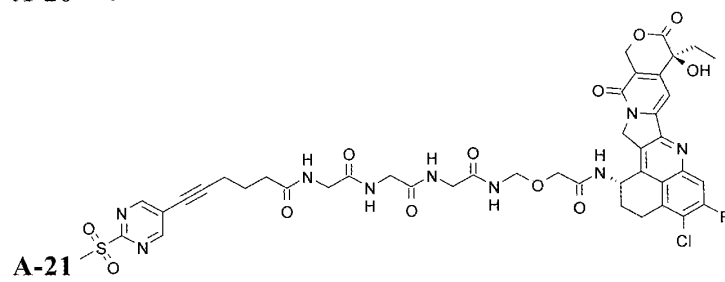
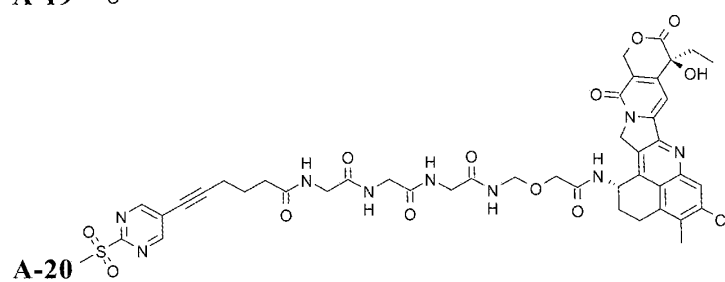
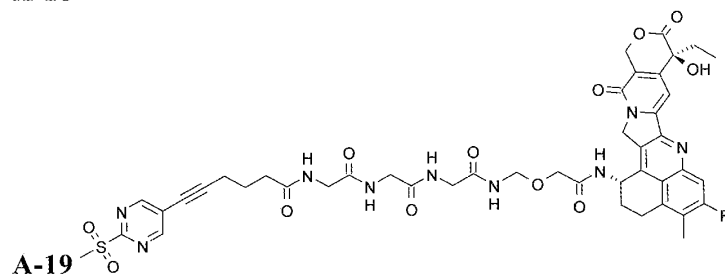
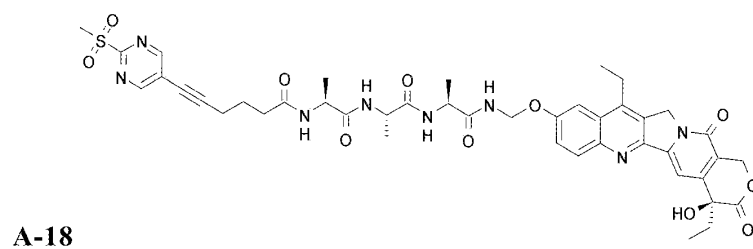




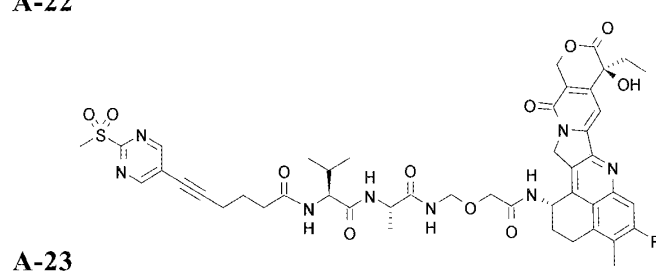
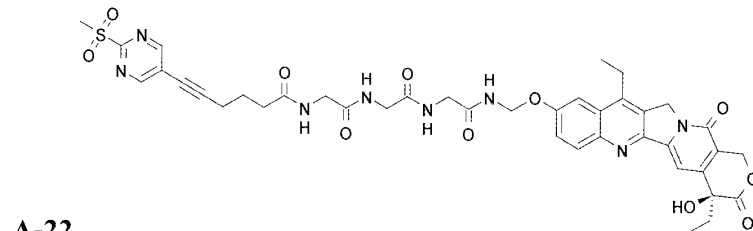
5

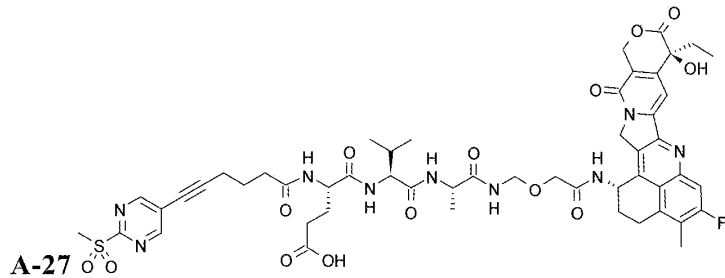
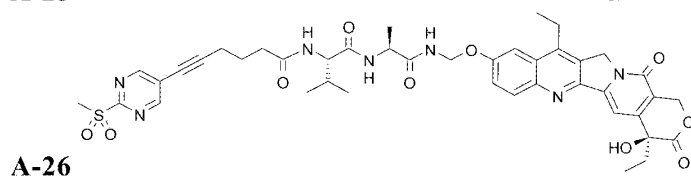
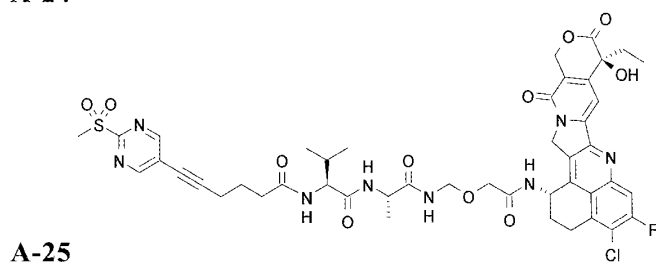
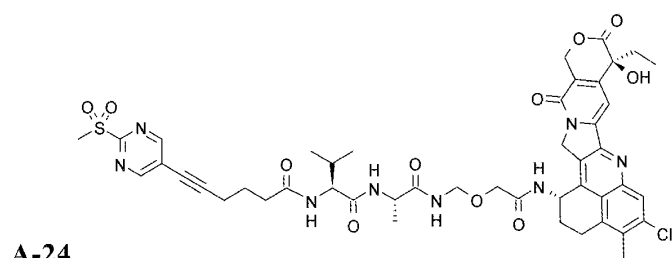




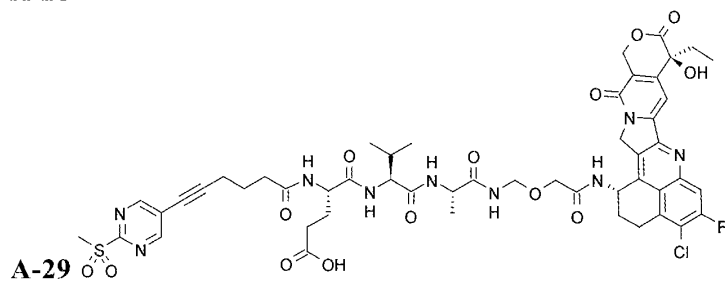
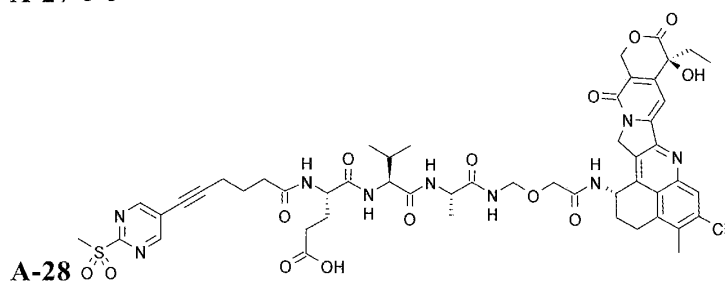


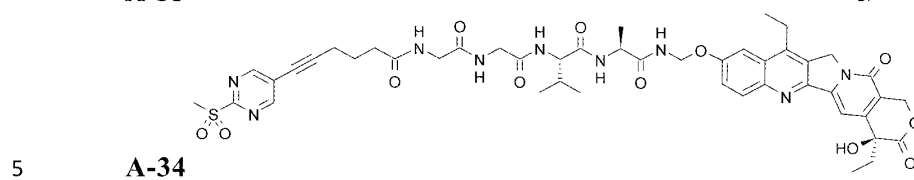
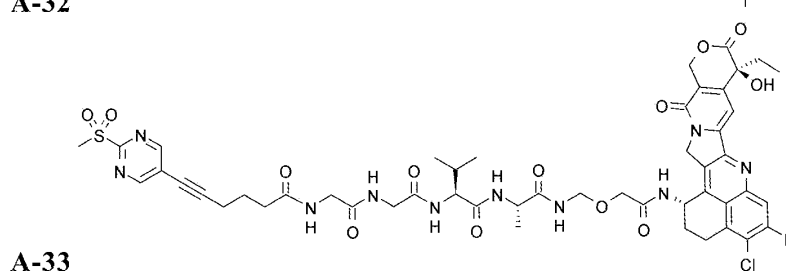
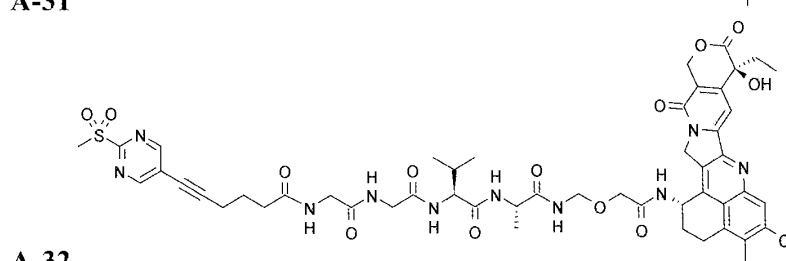
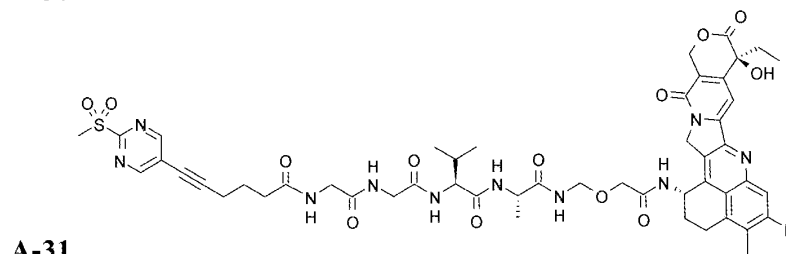
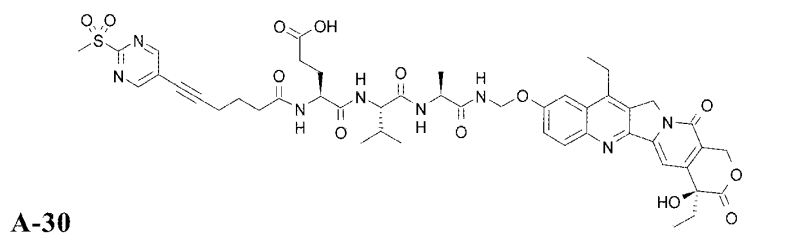
5



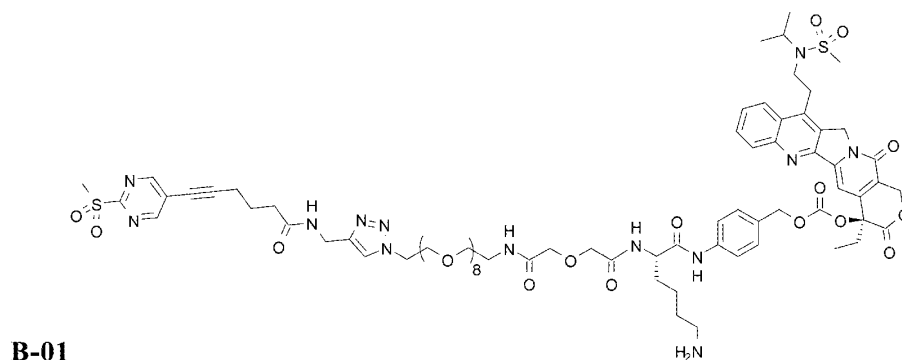


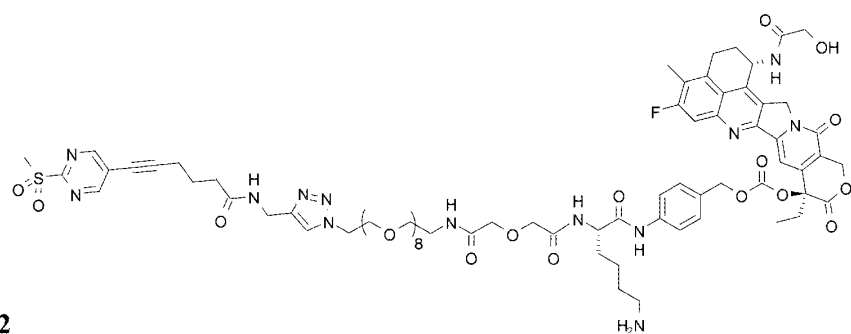
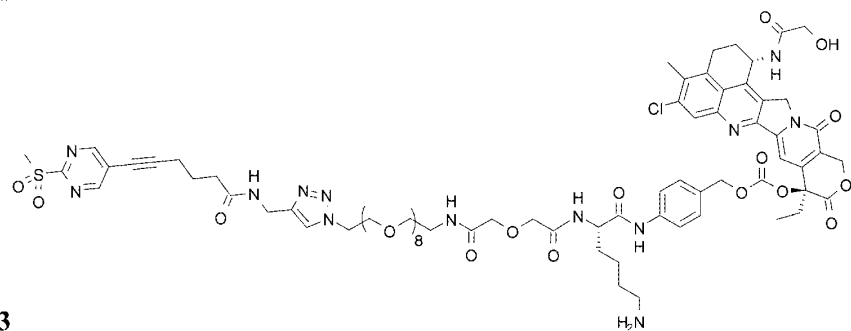
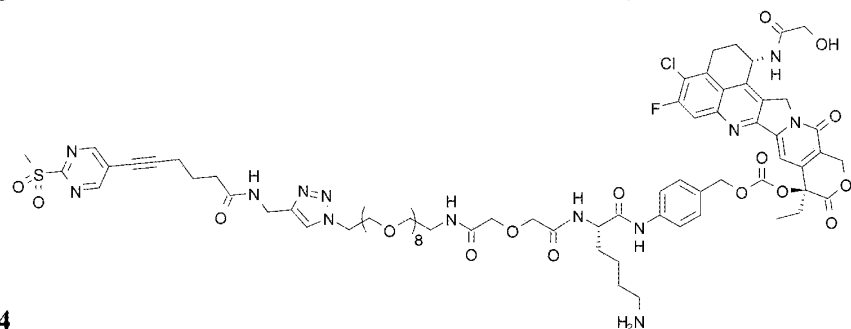
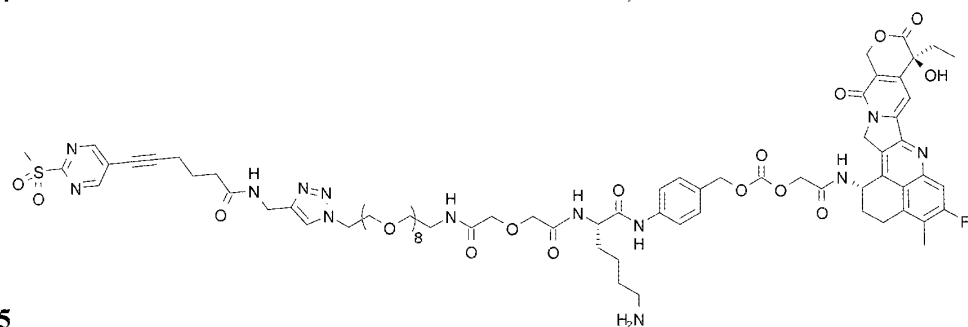
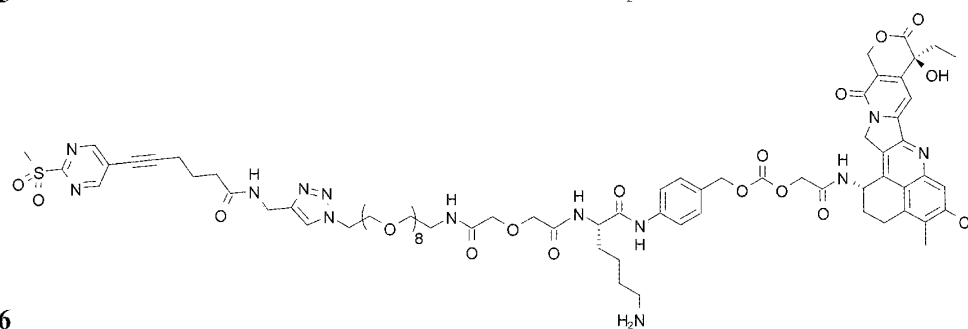
5

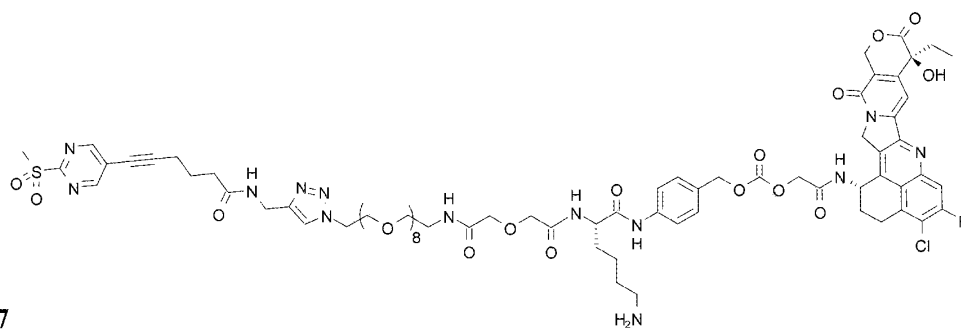
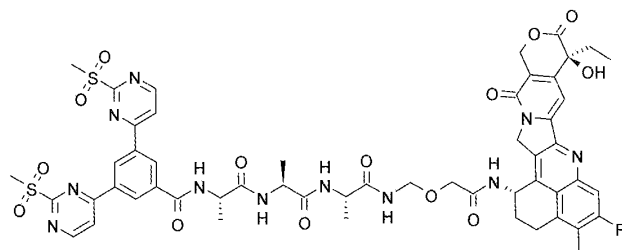
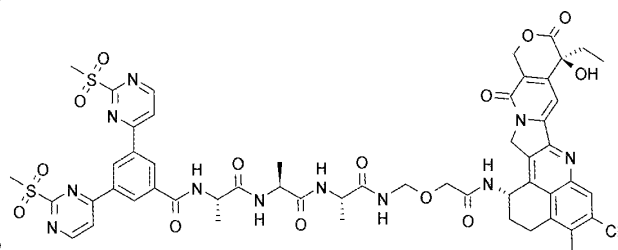
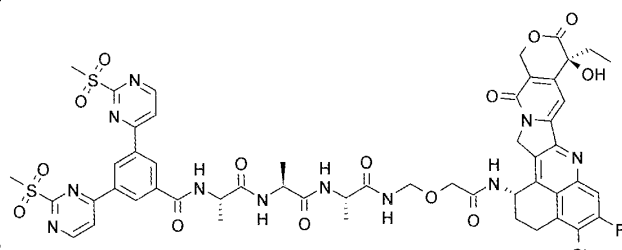
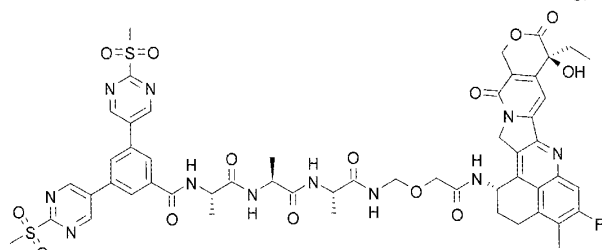
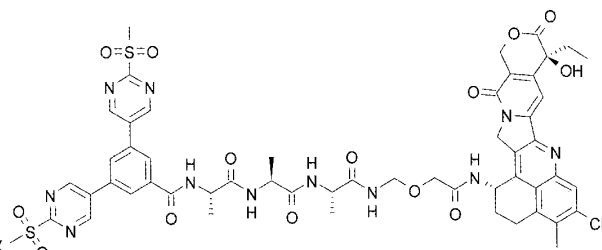


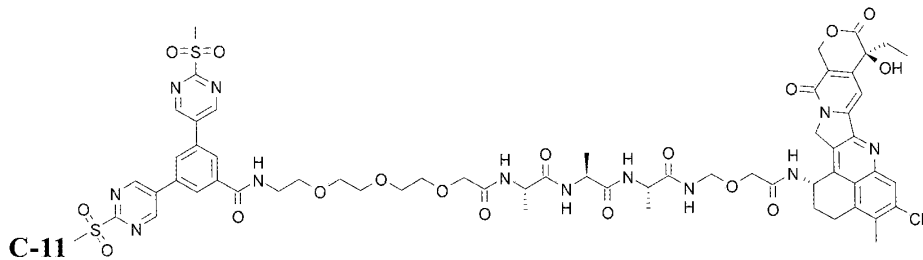
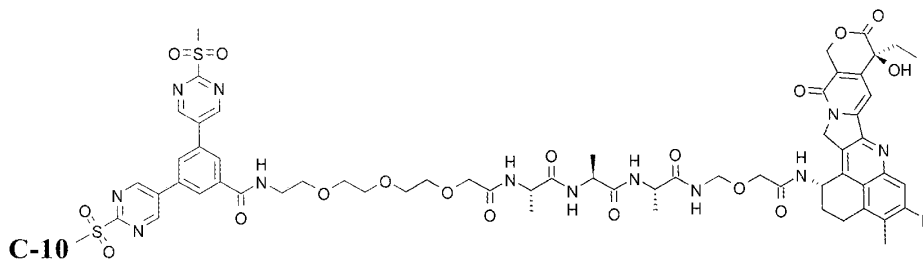
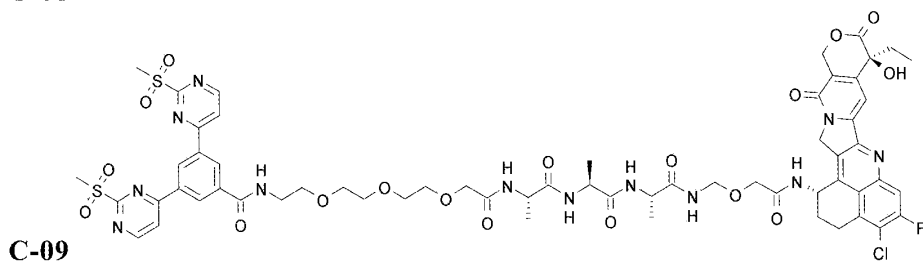
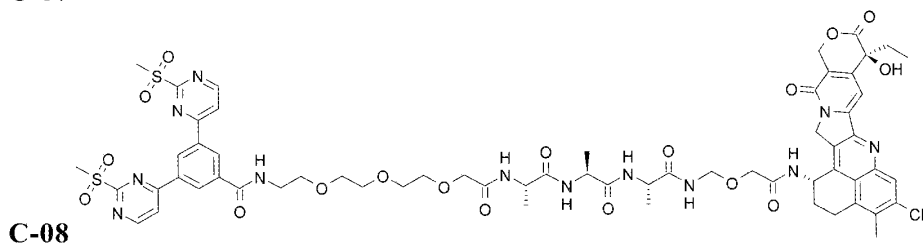
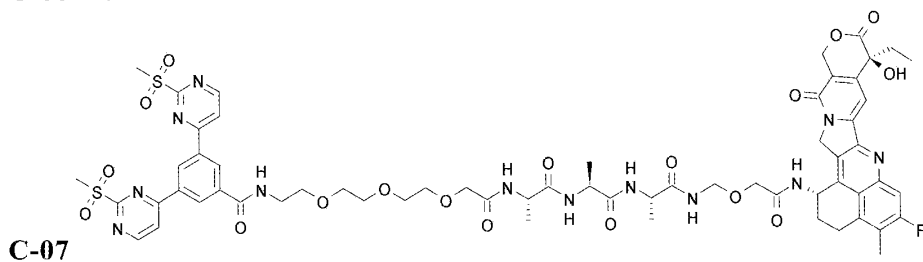
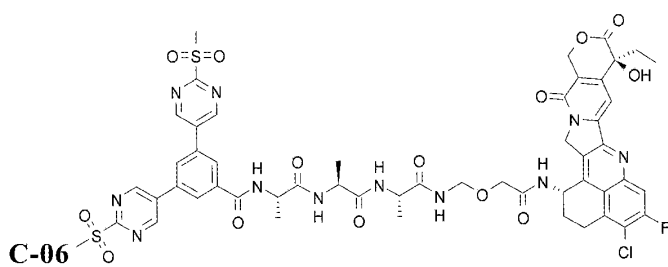


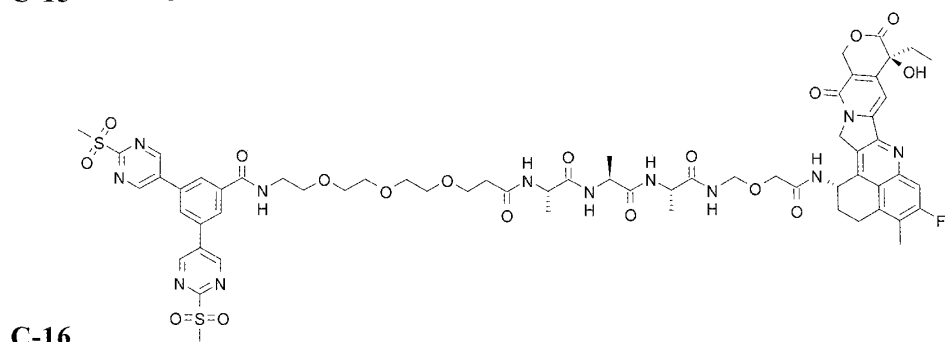
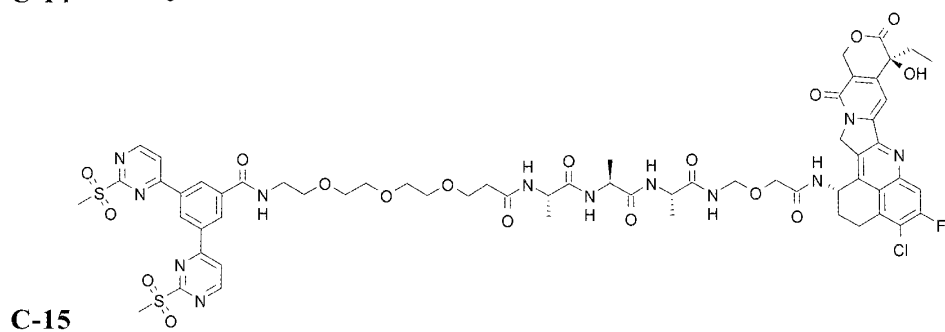
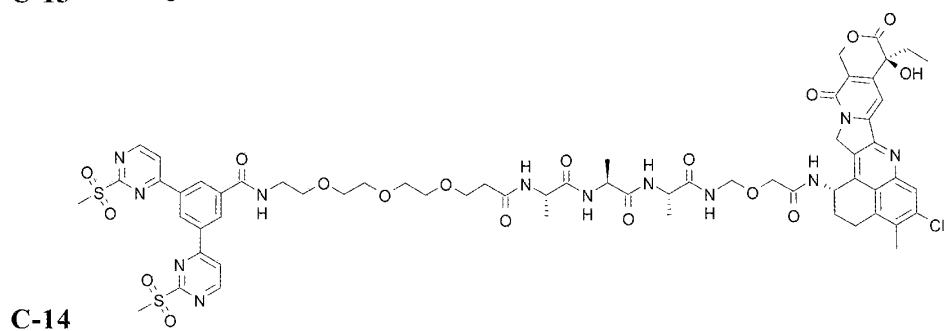
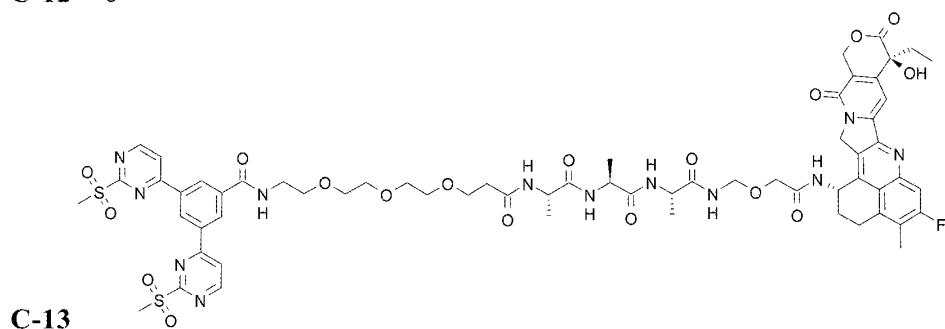
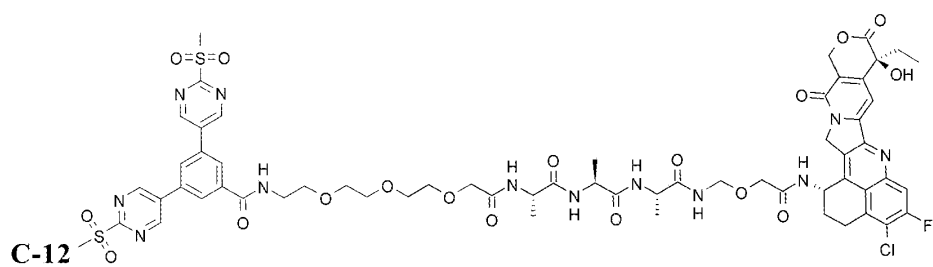
5

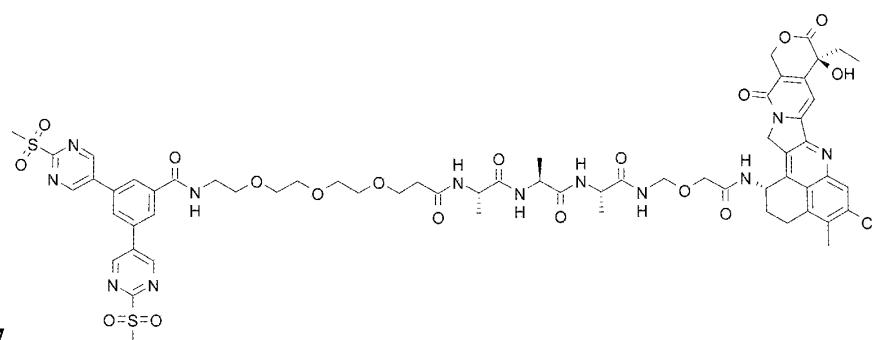


**B-02****B-03****B-04****B-05****B-06**

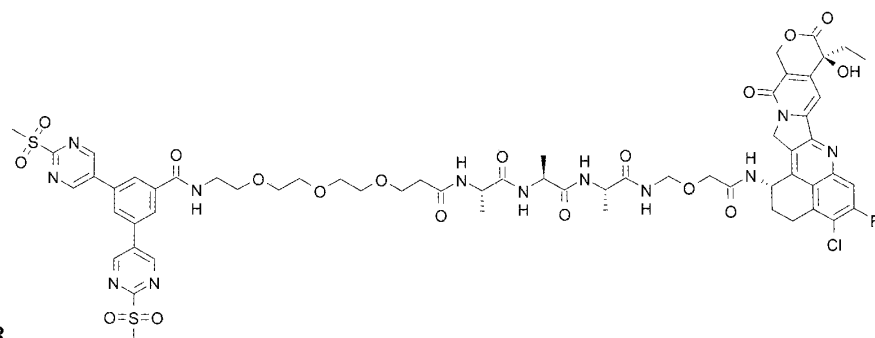
**B-07****C-01****C-02****C-03****C-04****C-05**



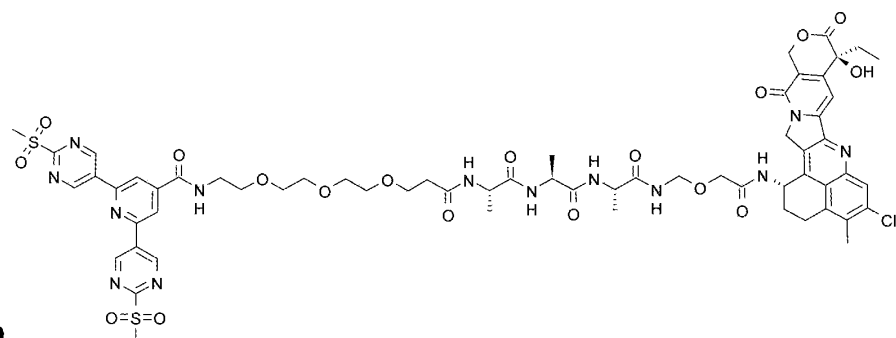




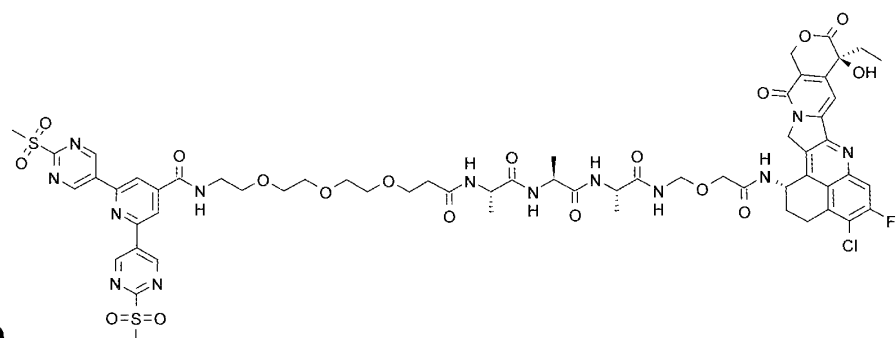
C-17



C-18

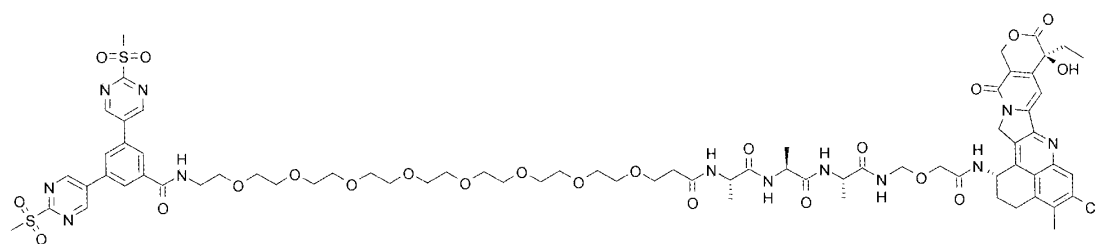
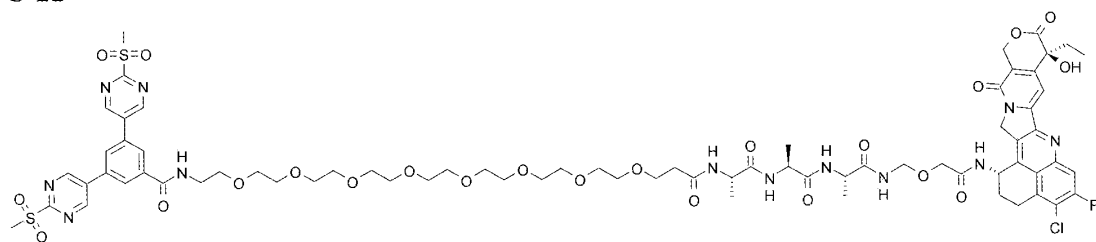
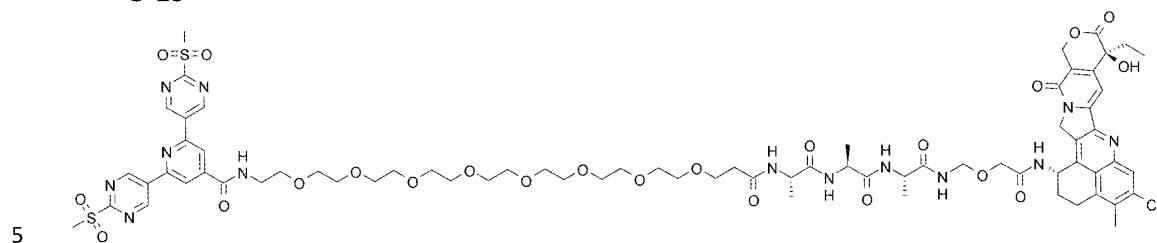


C-19

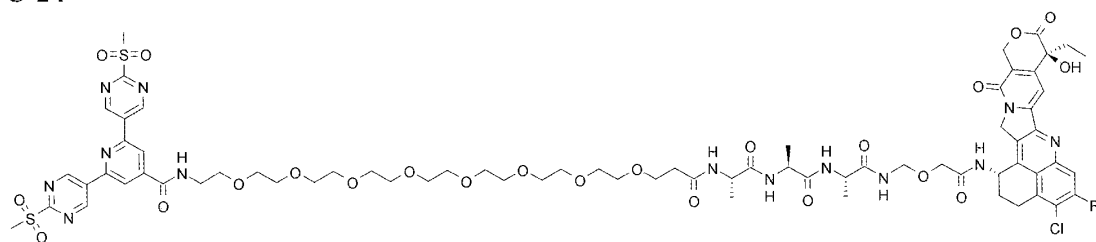
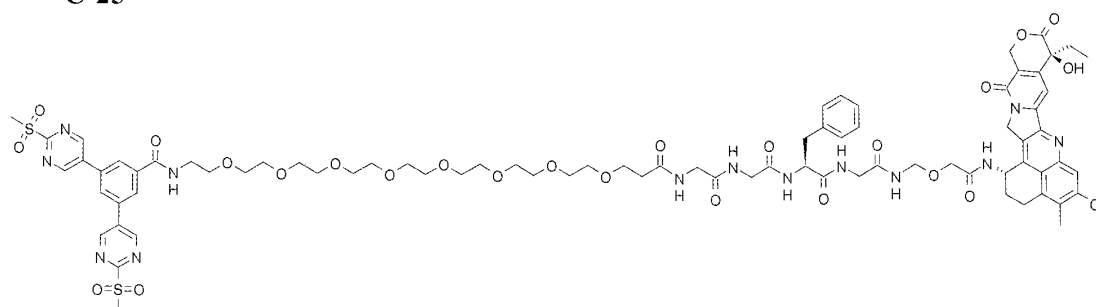


C-20

C-21

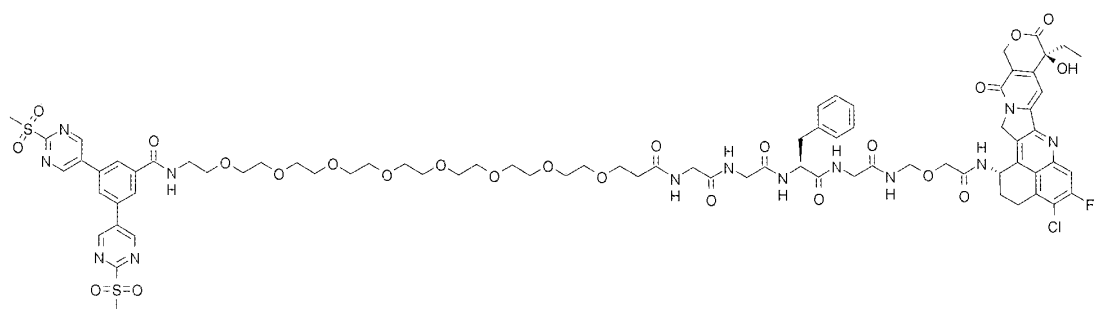
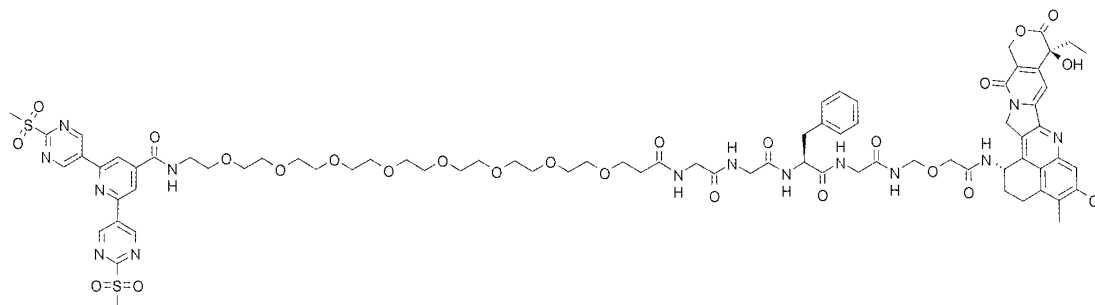
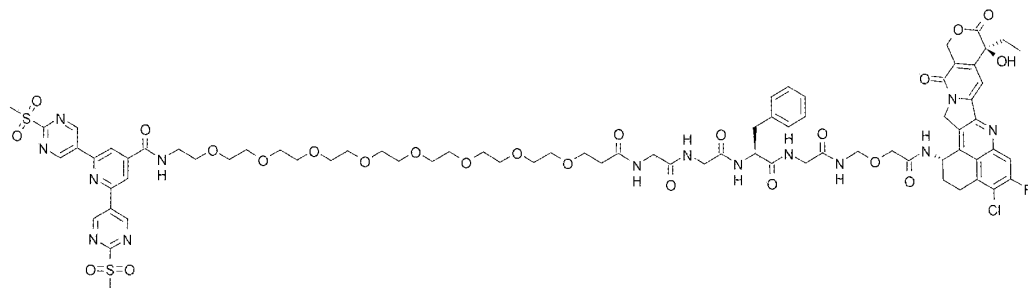
**C-22****C-23**

5

C-24**C-25**

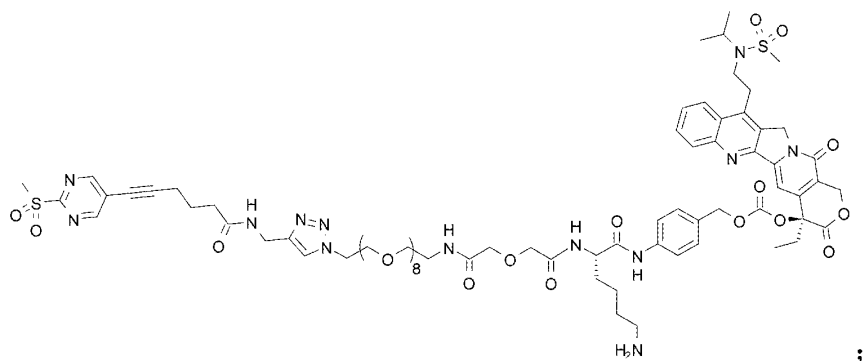
10

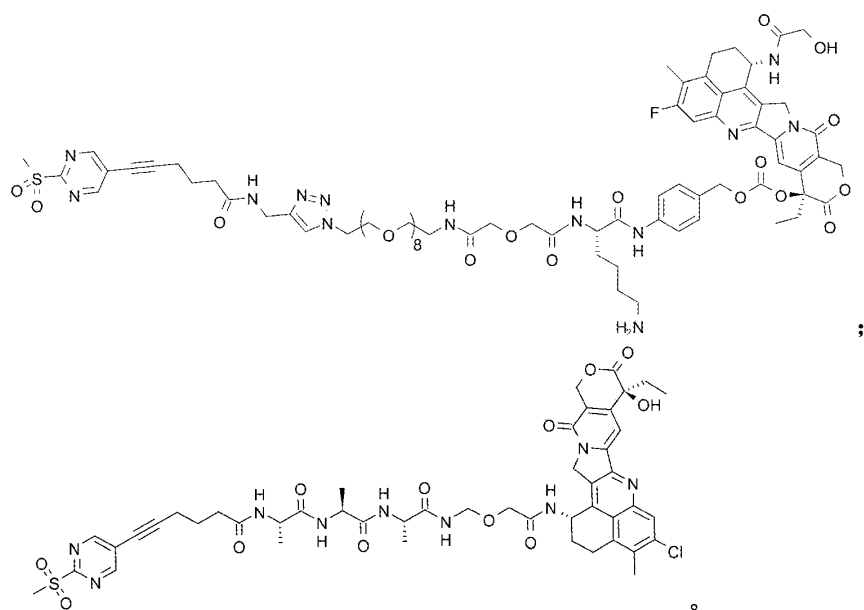
C-26

**C-27****C-28**

5

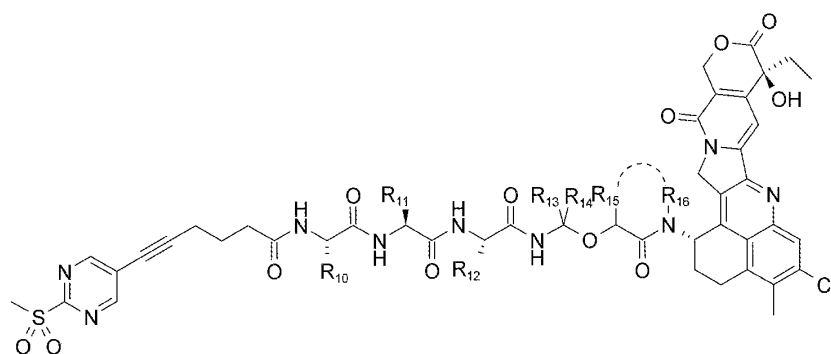
在一些实施方式中，本发明的药物连接子化合物选自：





在一些实施方式中, 前文所述的药物连接子化合物可任选地被一个或多个适合的取代基所取代。

5 在一些实施方式中, 前文所述的药物连接子化合物具有如下结构:



R₁₀、R₁₁、R₁₂独立地选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、5-12元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-12元杂芳基、-C₁₋₆烷基-C₆₋₁₀芳基和-C₁₋₆烷基-5-12元杂芳基; 所述烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选被一个或多个选自羟基、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₆₋₁₀芳基、5-12元杂芳基的取代基所取代;

R₁₃和R₁₄各自独立选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基和4-6元杂环基; 所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个选自羟基、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₆₋₁₀芳基、5-12元杂芳基的取代基所取代;

15 **R₁₅**选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、卤代C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷基-O-C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基和3-6元杂环烷基; **R₁₆**为H; 或者, **R₁₅、R₁₆**及其所连接的原子共同形成4-7元环; 所

述4-7元环任选被一个或多个选自羟基、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₆₋₁₀芳基、5-12元杂芳基的取代基所取代。

在一些实施方式中，R₁₀、R₁₁、R₁₂独立地选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、C₆₋₁₀芳基、苄基、羟基取代的苄基和吡啶基-C₁₋₆烷基；

5 R₁₃和R₁₄各自独立选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基和4-6元杂环基；且

R₁₅选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、卤代C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷基-O-C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基和3-6元杂环烷基；R₁₆为H；或者，R₁₅、R₁₆及其所连接的原子共同形成4-7元环。

在一些实施方式中，R₁₀、R₁₁、R₁₂独立地选自氢、C₁₋₄烷基、C₃₋₆环烷基、苯基、苄基、对羟基苄基和吡啶基甲基。

10 在一些实施方式中，R₁₃和R₁₄各自独立选自氢、C₁₋₄烷基、C₃₋₆环烷基和4-6元杂环基。

在一些实施方式中，R₁₃和R₁₄各自独立选自氢、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基和4-6元杂环基。

在一些实施方式中，R₁₅选自氢、C₁₋₄烷基、C₃₋₆环烷基、卤代C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基-O-C₁₋₄烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基和3-6元杂环烷基；或者，R₁₅、R₁₆及其所连接的原子共同形成4-7元杂环烷基或4-7元杂芳基。

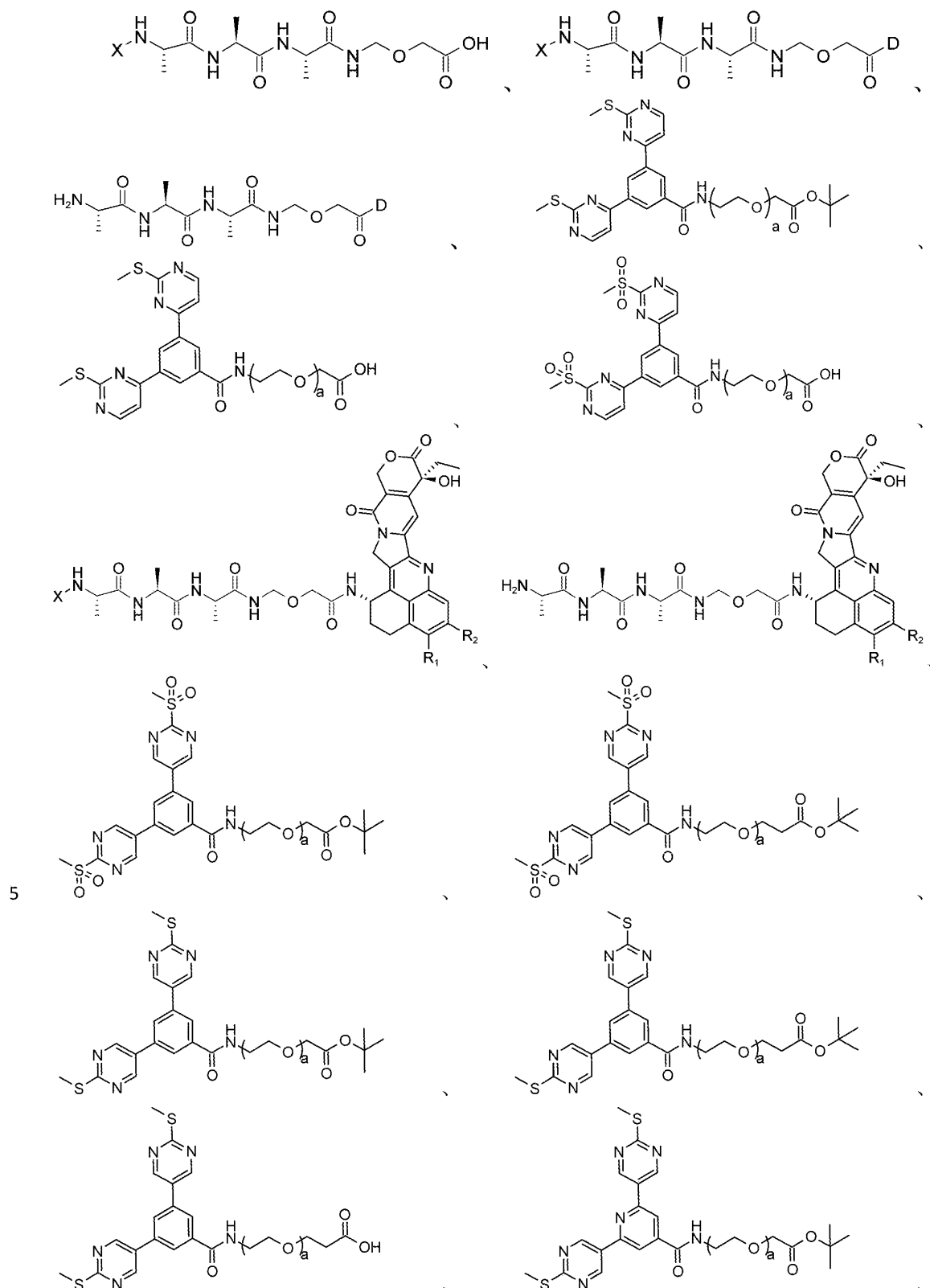
15 在一些实施方式中，R₁₅选自氢、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、卤代C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基-O-C₁₋₄烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基和3-6元杂环烷基；或者，R₁₅、R₁₆及其所连接的原子共同形成4-7元杂环烷基或4-7元杂芳基。

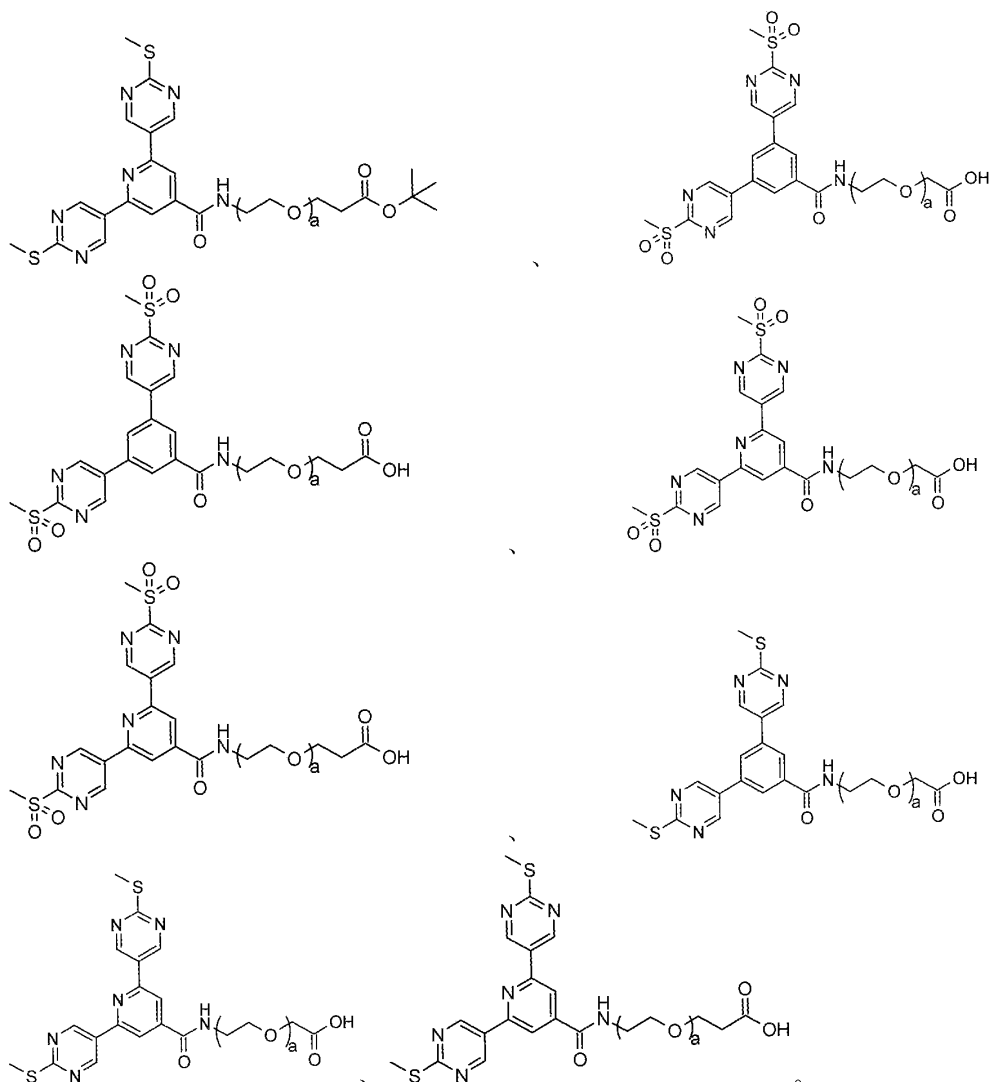
20 在一些实施方式中，R₁₀、R₁₁、R₁₂独立地选自氢、C₁₋₄烷基、C₃₋₆环烷基、苯基、苄基、对羟基苄基和吡啶基甲基；

R₁₃和R₁₄各自独立选自氢、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基和4-6元杂环基；

25 R₁₅选自氢、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、卤代C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基-O-C₁₋₄烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基和3-6元杂环烷基；或者，R₁₅、R₁₆及其所连接的原子共同形成4-7元杂环烷基或4-7元杂芳基。

另一个方面，本发明提供了具有如下结构的中间体化合物：



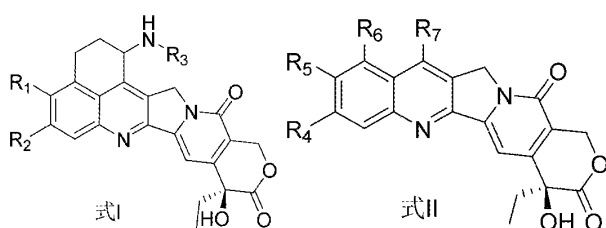


- 5 其中，**X** 选自苄氧羰基、叔丁氧羰基、苄甲氧羰基、烯丙氧羰基、三甲基硅乙氧羰基、甲氧羰基、乙氧羰基、邻苯二甲酰基、对甲苯磺酰基、三氟乙酰基、硝基苯磺酰基、苯甲酰基、特戊酰基、三苯甲基、4-甲氧基苄基二苯基甲基、二甲氧基三苯甲基、2,4-二甲氧基苄基、对甲氧基苄基和苄基；**a** 为 1 至 10 的整数，优选为 3 至 8 的整数；**R₁**、**R₂** 和 **D** 如前文所定义。

10

在一些实施方式中，**X**选自苄甲氧羰基（Fmoc）。

在一些实施方式中，**D** 选自：



其中, R_1, R_2 各自独立地选自 C_{1-6} 烷基和卤素;

R_3 选自 H 和 $-CO-CH_2OH$;

R_4 和 R_5 各自独立地选自 H、卤素和羟基; 或者 R_4 和 R_5 与相连碳原子连接成 5-6 元

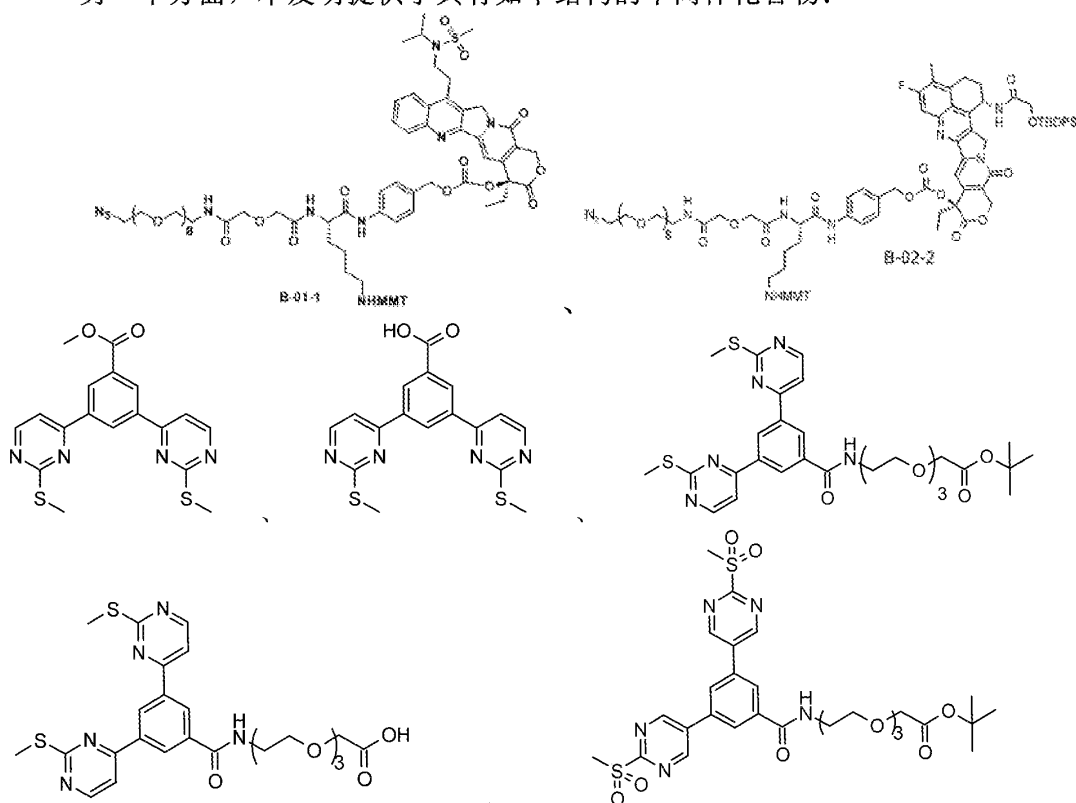
5 含氧杂环;

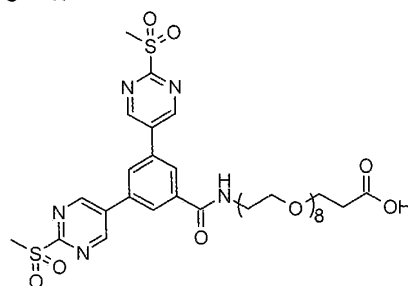
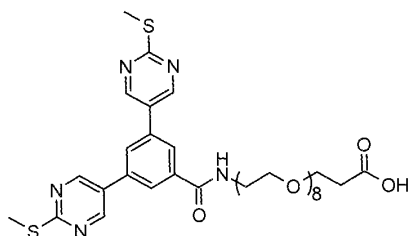
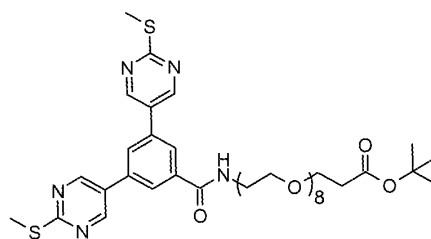
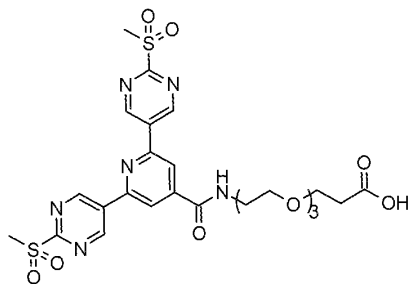
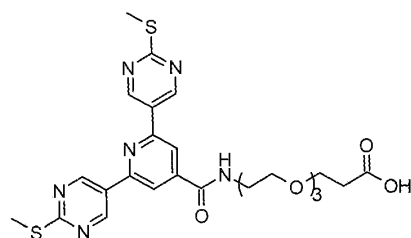
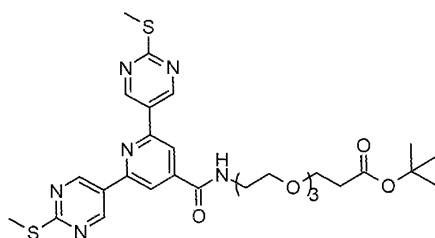
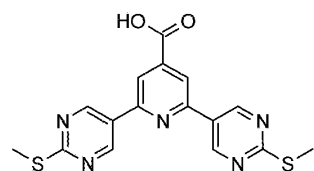
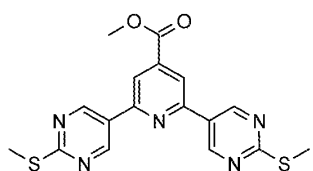
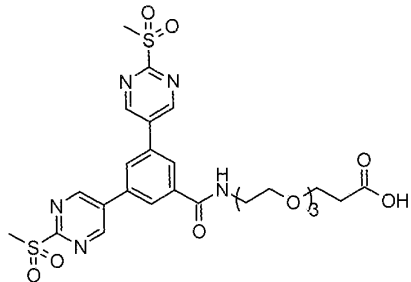
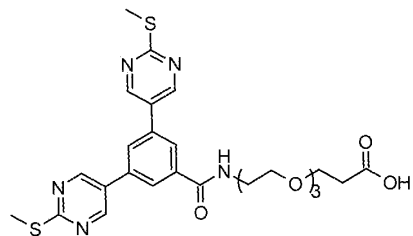
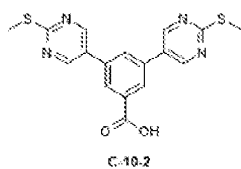
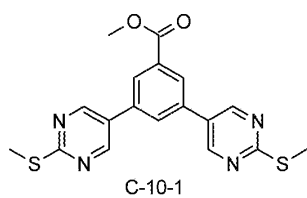
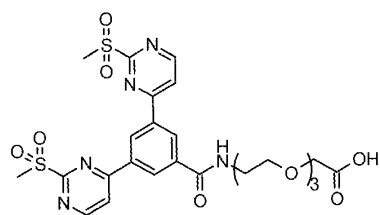
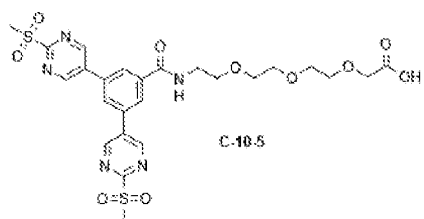
R_6 选自氢或 $-C_{1-4}$ 亚烷基- NR_aR_b ;

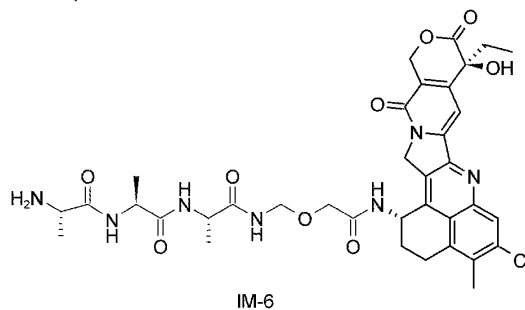
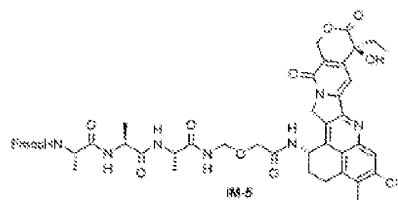
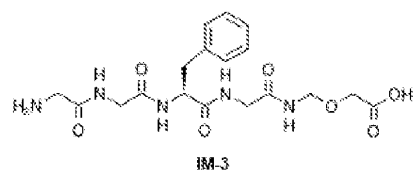
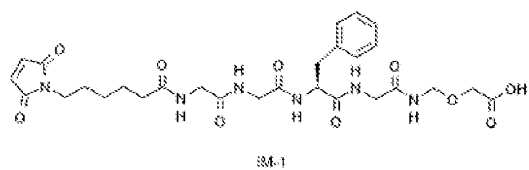
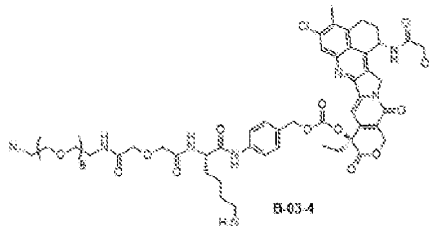
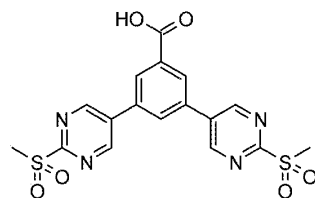
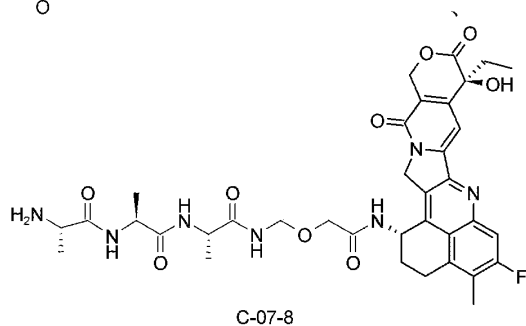
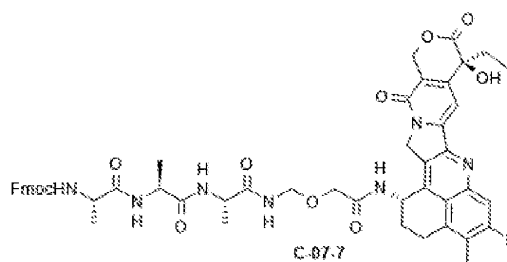
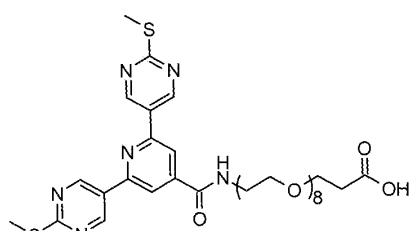
R_7 选自 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-4}$ 亚烷基- NR_aR_b ;

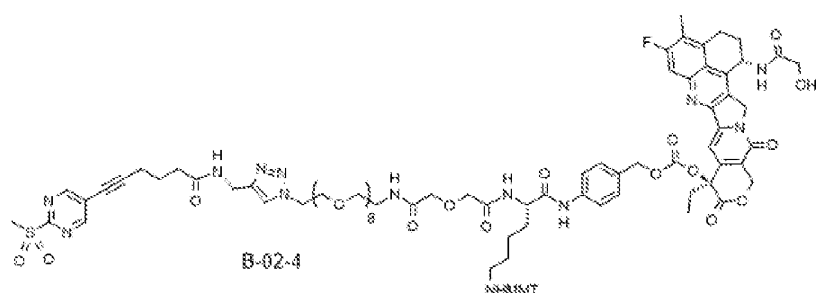
其中 R_a, R_b 在每次出现时各自独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基和 $-CO-C_{1-6}$ 烷基。

10 另一个方面, 本发明提供了具有如下结构的中间体化合物:



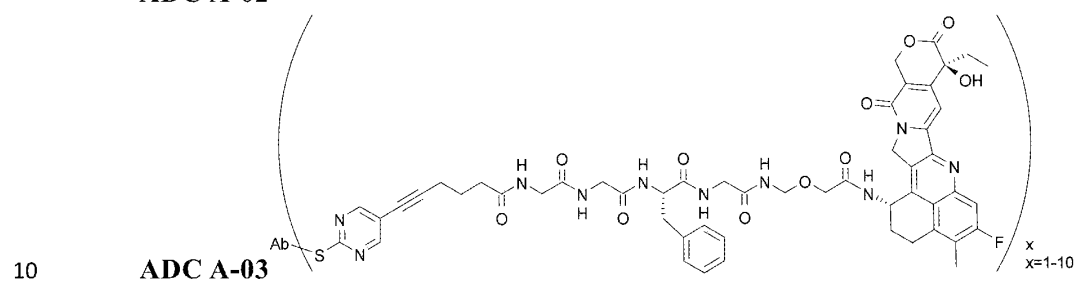
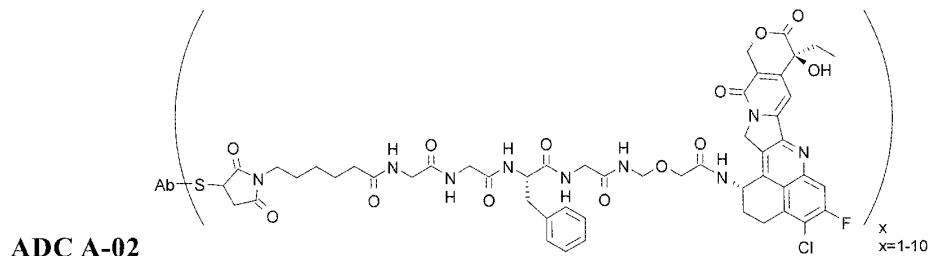
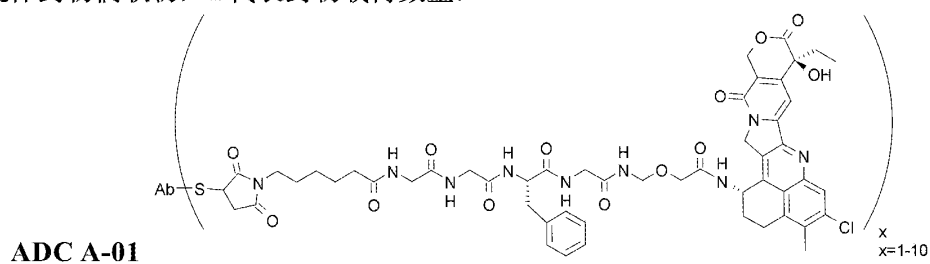


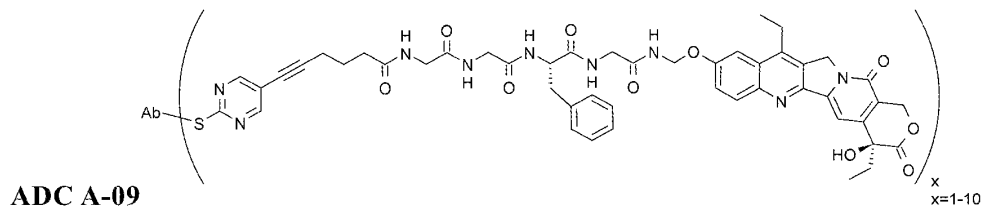
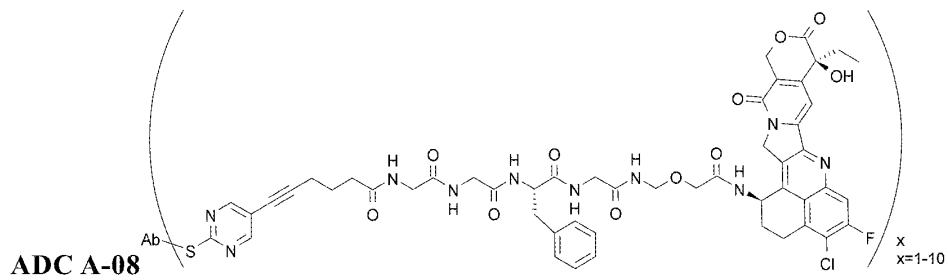
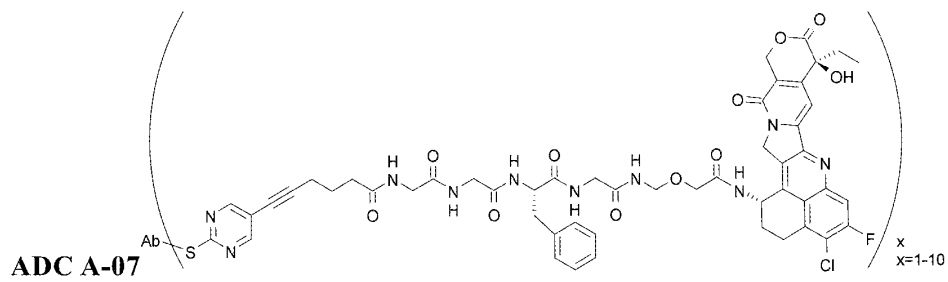
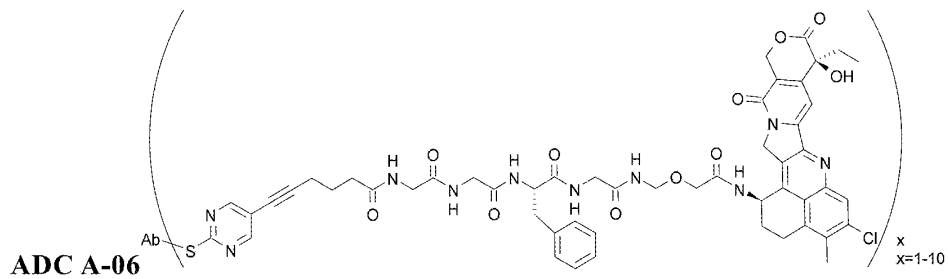
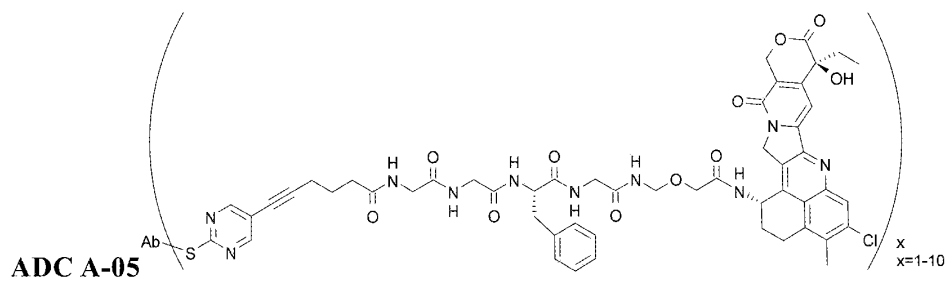
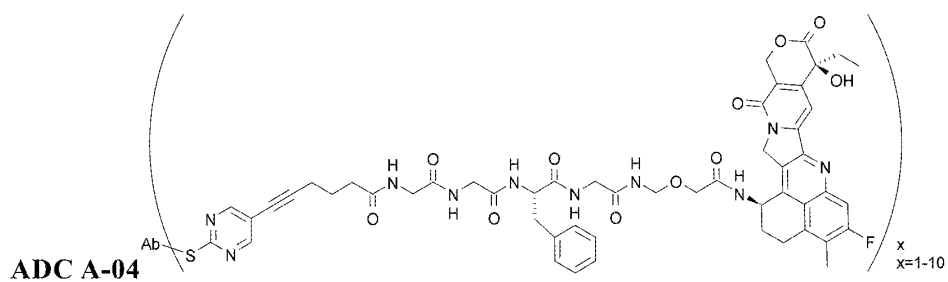


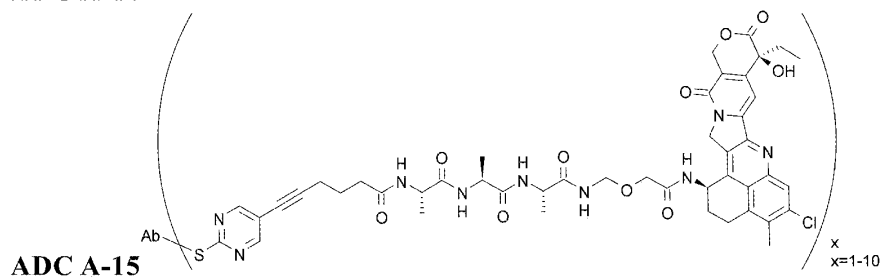
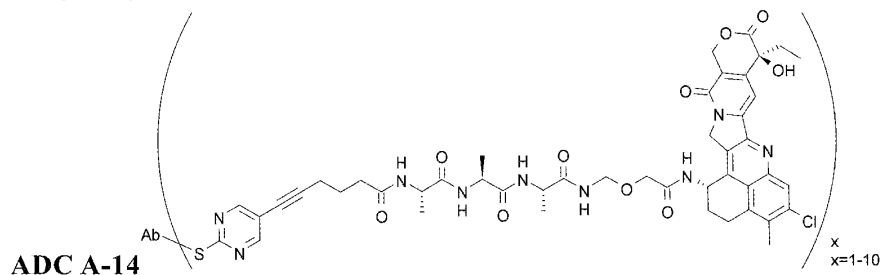
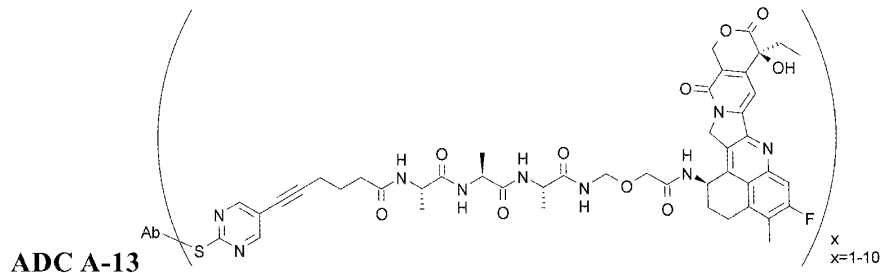
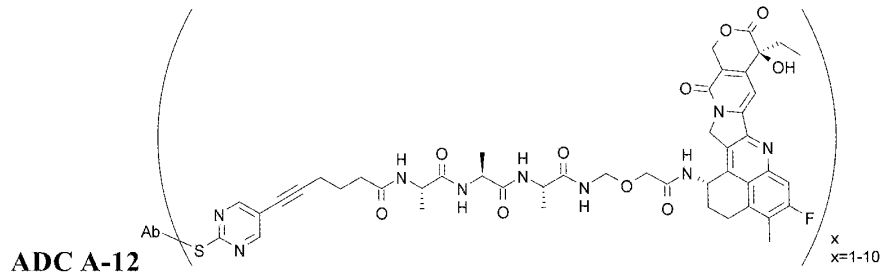
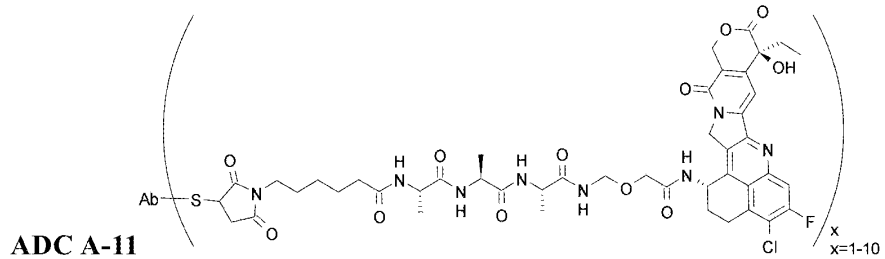
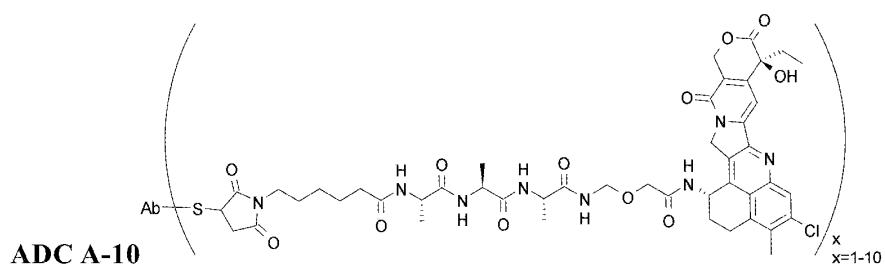


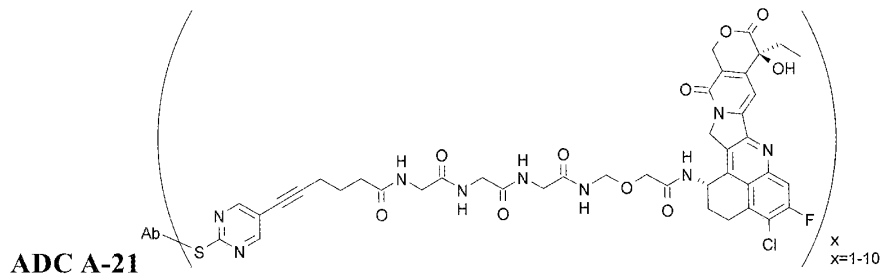
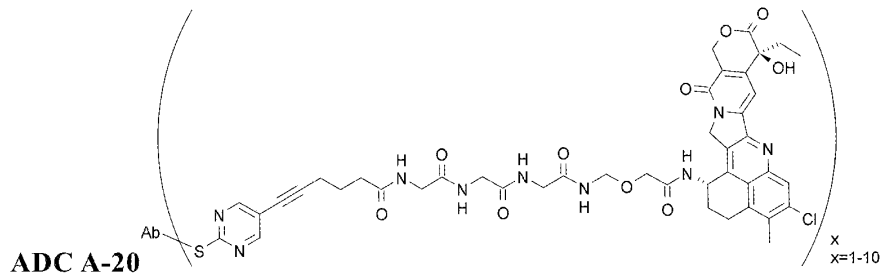
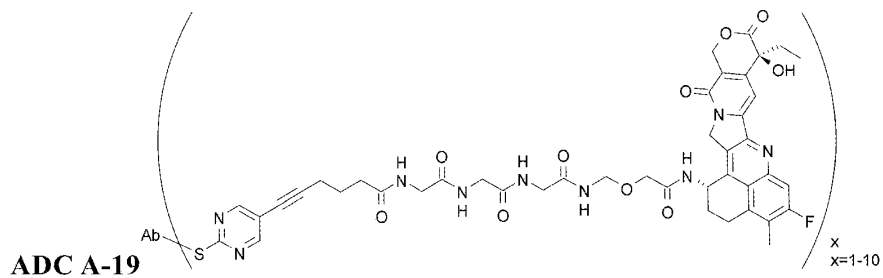
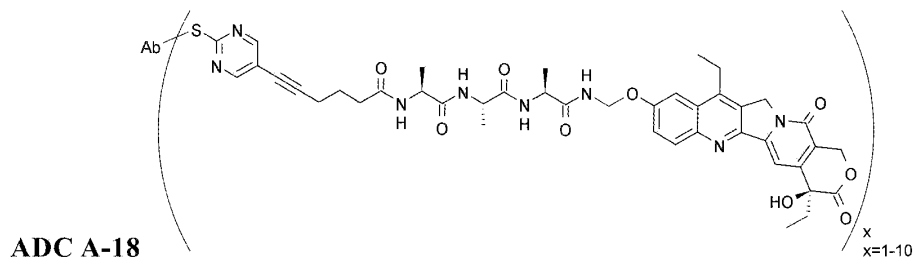
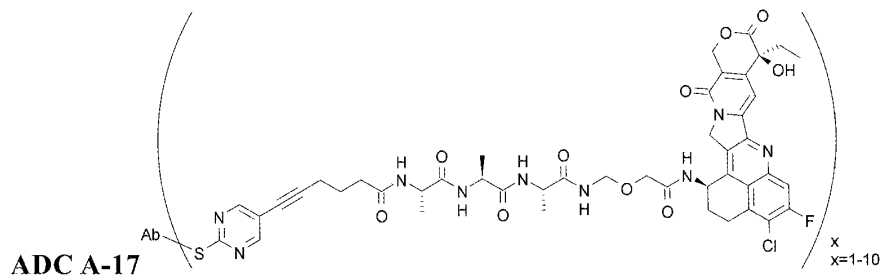
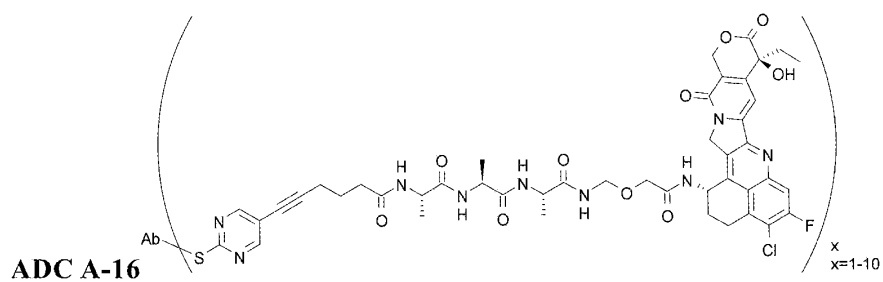
另一个方面,本发明提供抗体药物偶联物,其具有式 Ab-[M-L-E-D]_x 所示结构, M 、 L 、 E 、 D 、 x 如前文所定义, Ab 是与抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

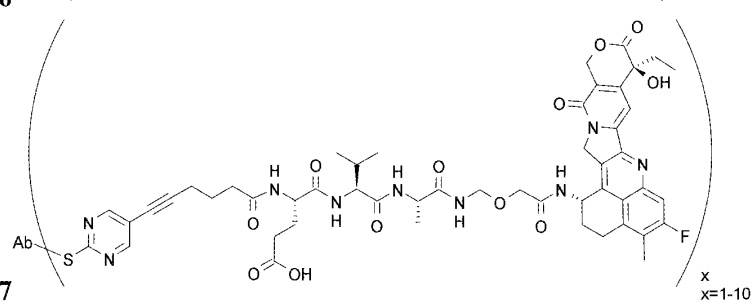
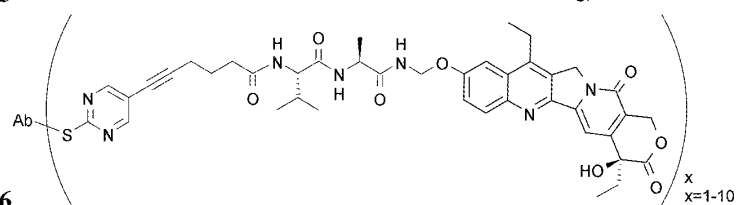
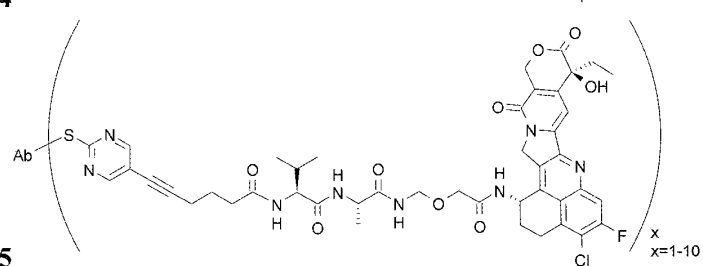
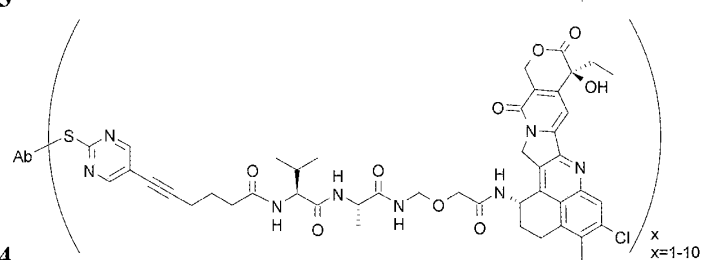
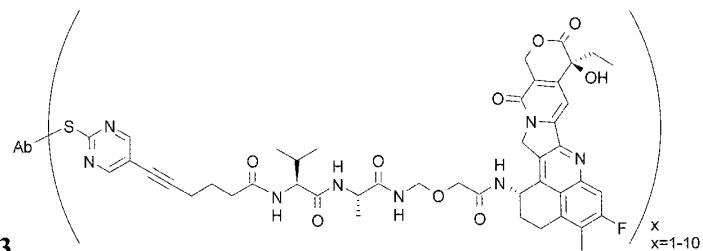
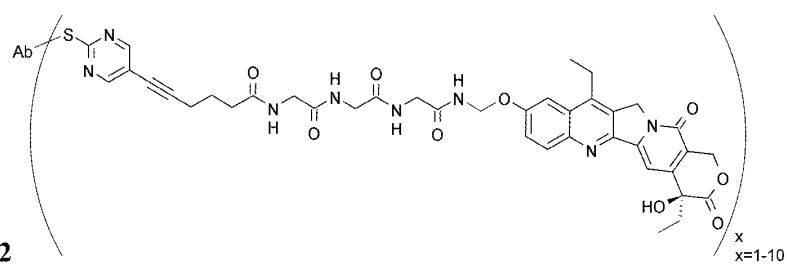
在一些实施方案中,所述抗体药物偶联物选自下表的 ADC A-01~ADC A-34, ADC B-01~ADC B-07, ADC C-01~ADC C-28: 下述图示中的 Ab 定义如前所述,其中抗体上的巯基与药物连接子化合物通过加成反应或者取代反应形成硫醚键进而得到完整的抗体药物偶联物, x 代表药物载荷数量:

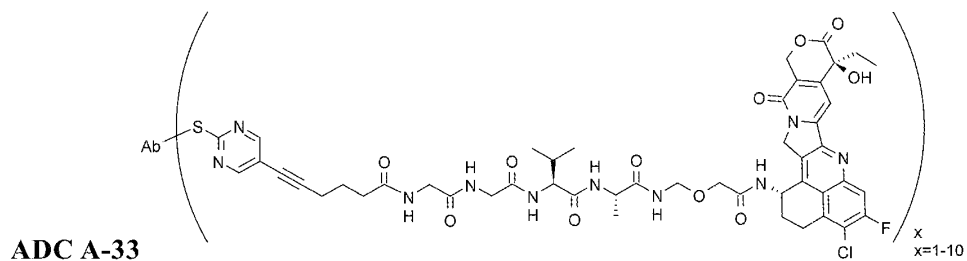
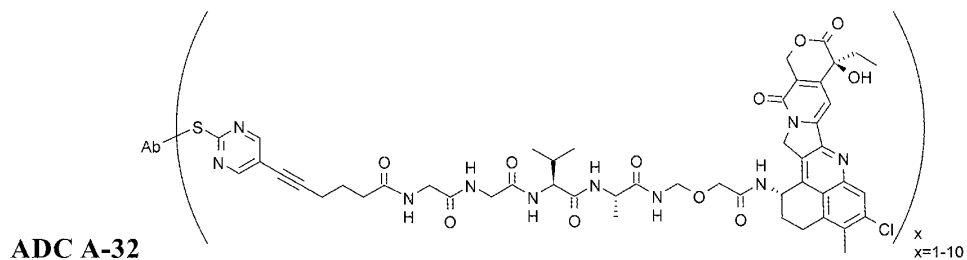
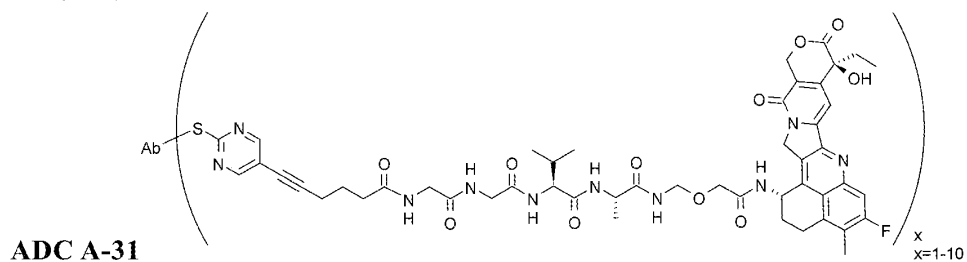
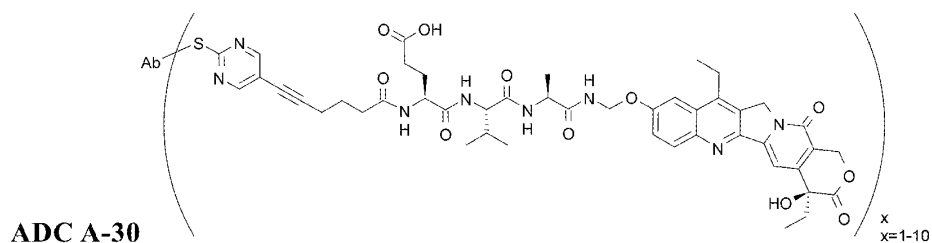
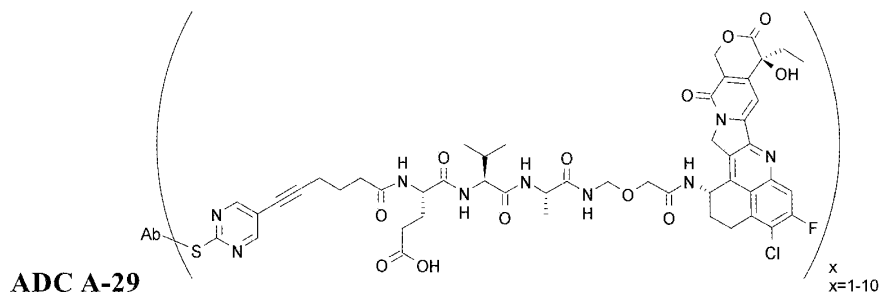
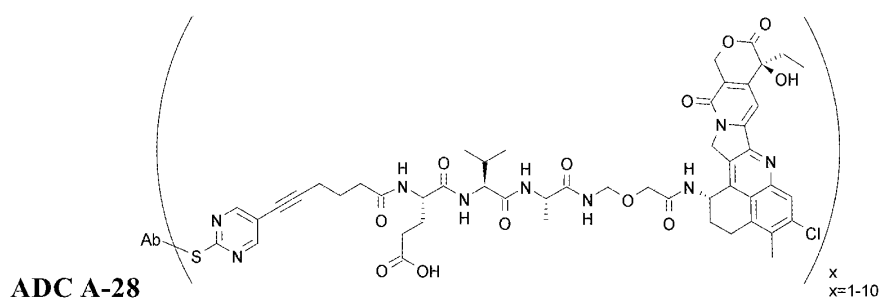




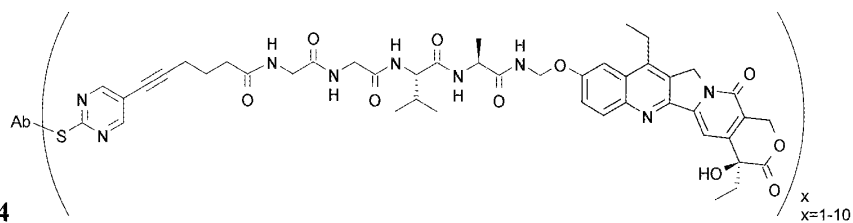




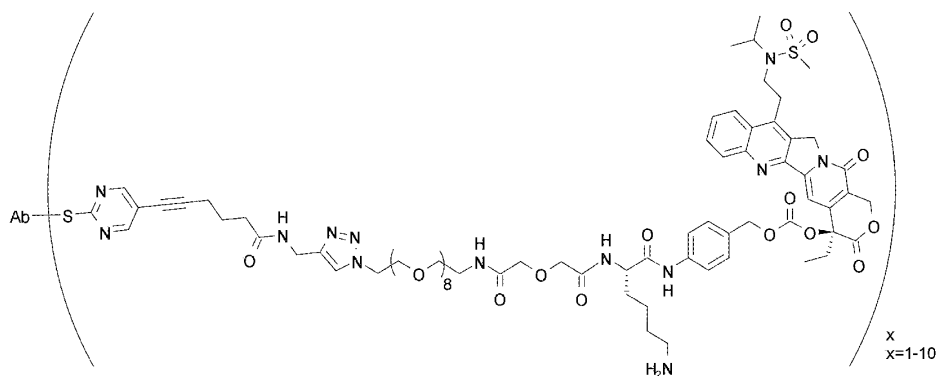




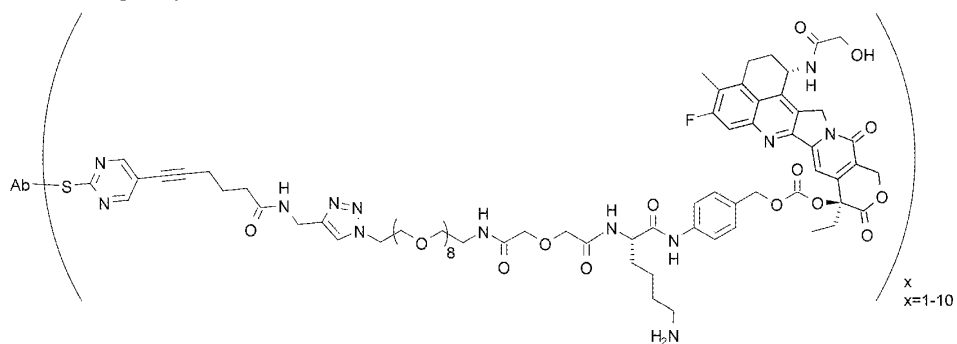
ADC A-34



ADC B-01

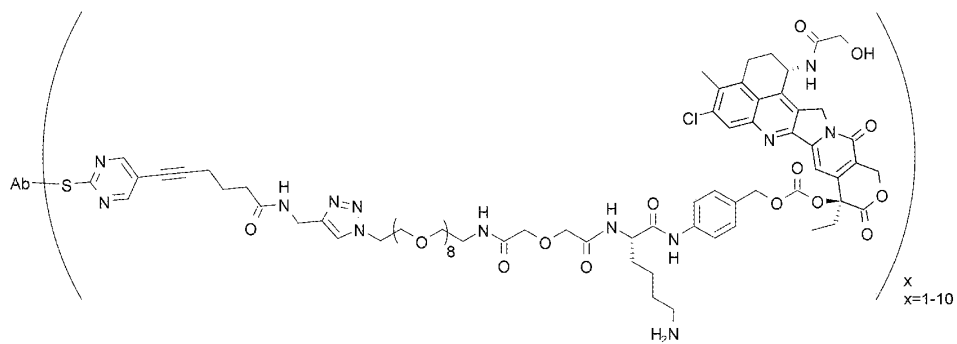


ADC B-02

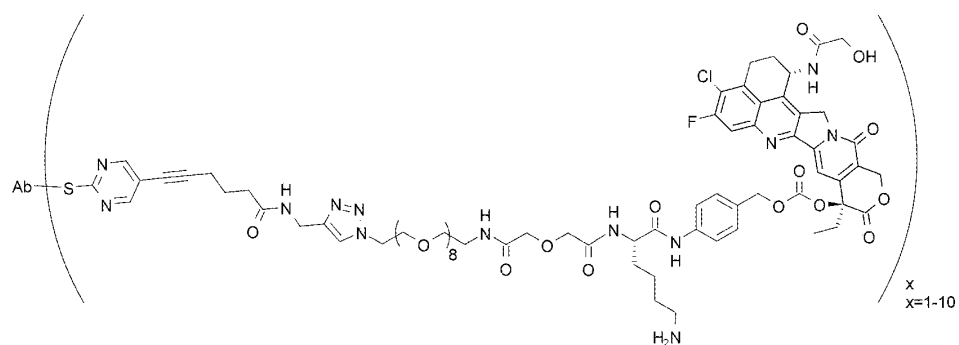


5

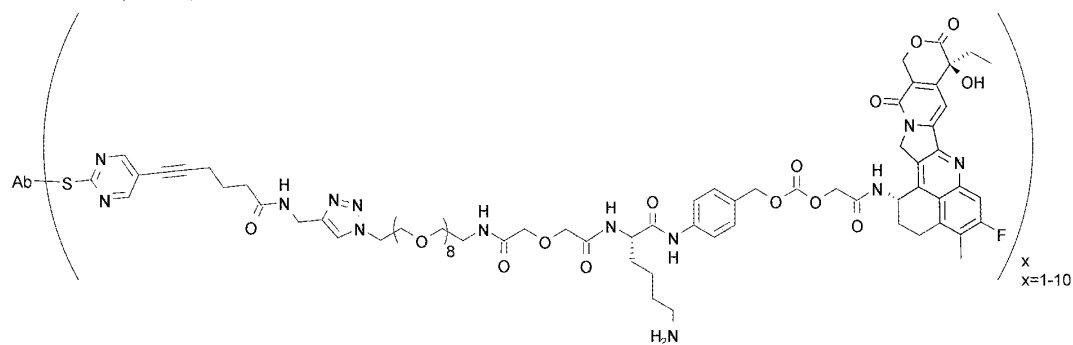
ADC B-03



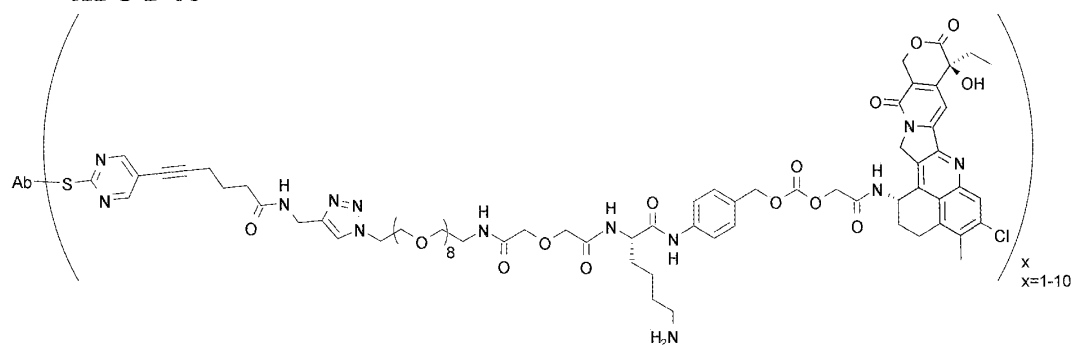
ADC B-04



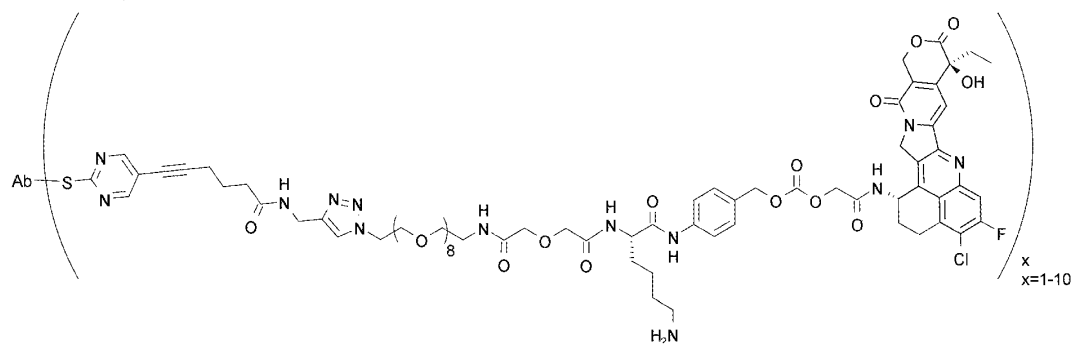
ADC B-05

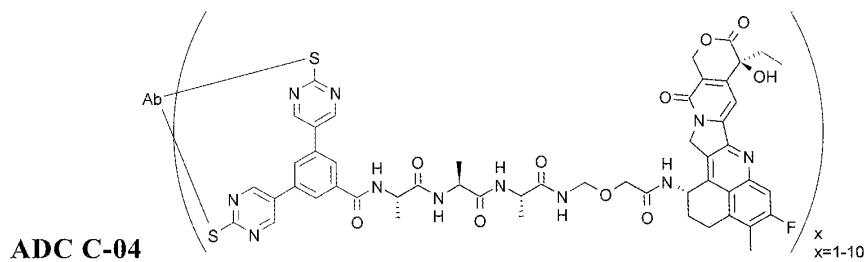
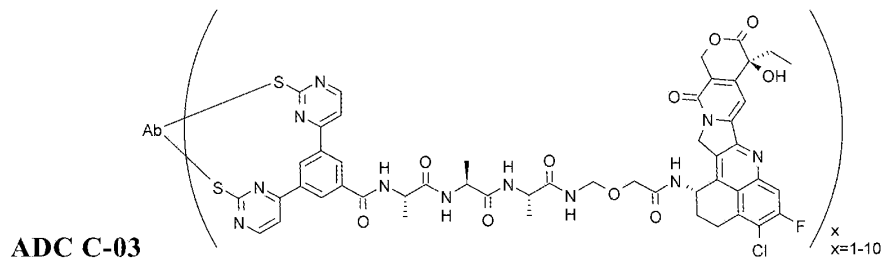
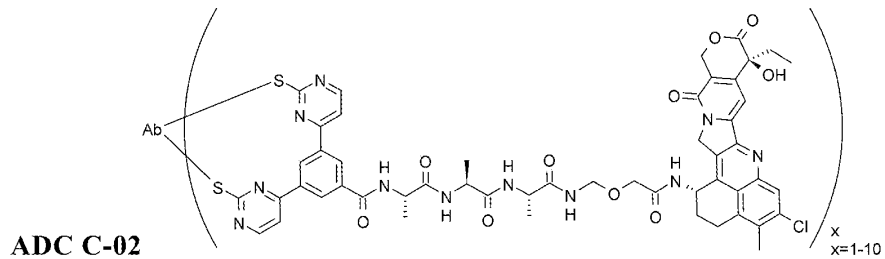
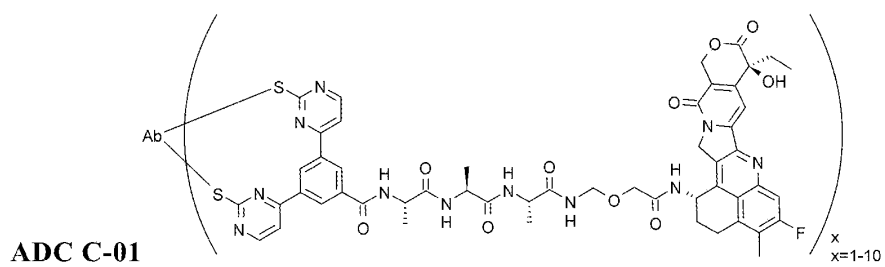


ADC B-06

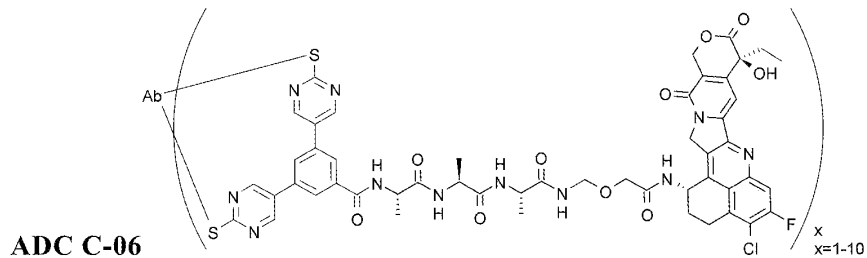
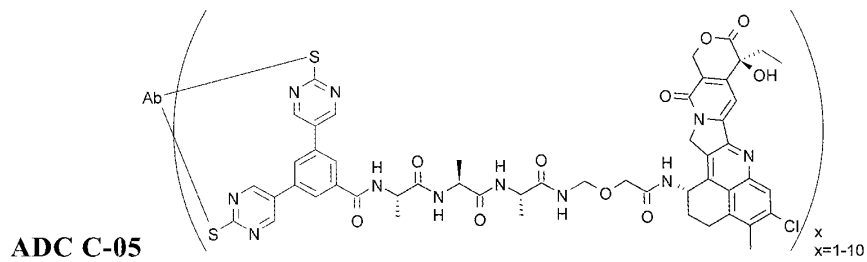


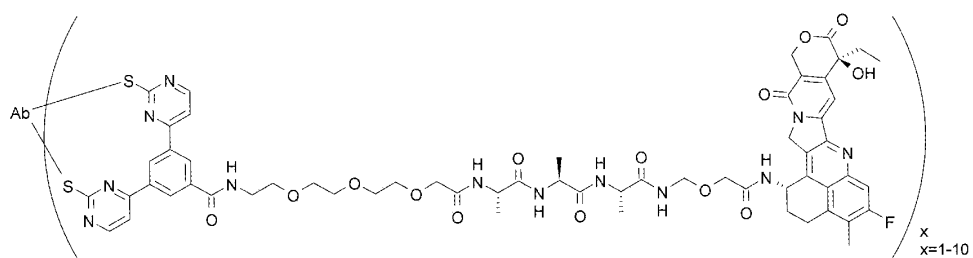
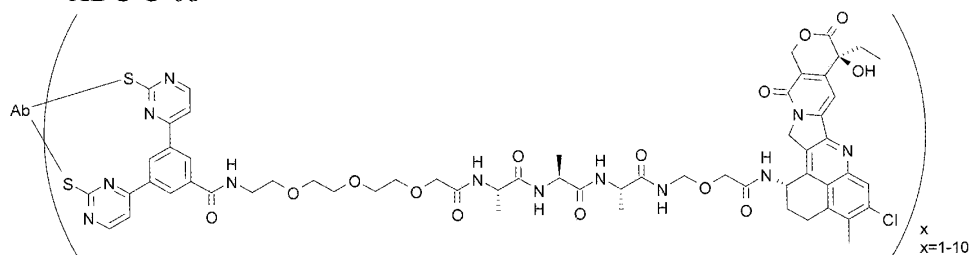
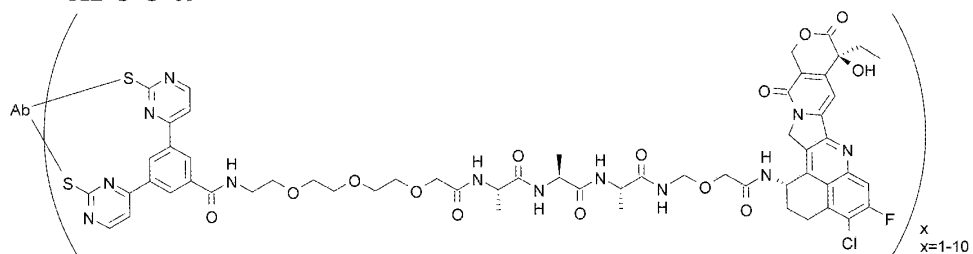
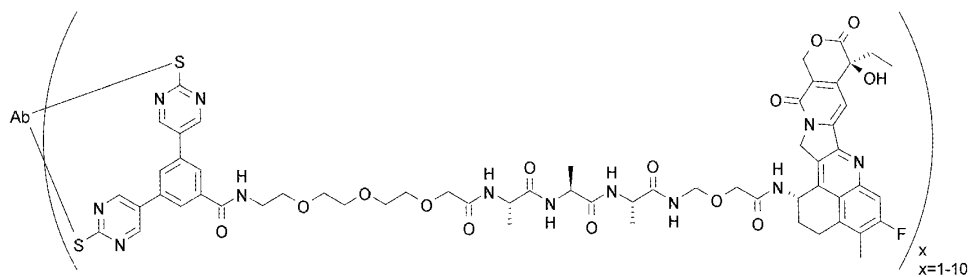
ADC B-07



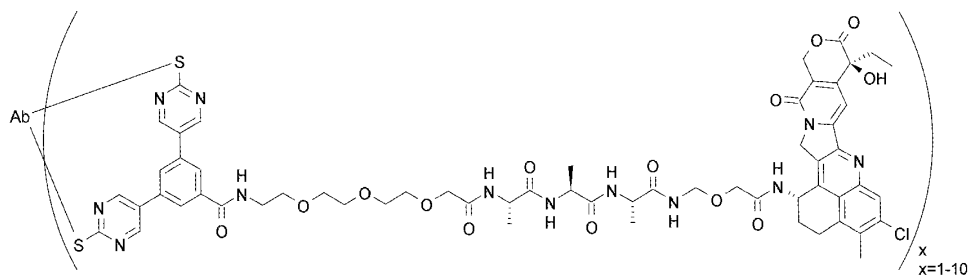


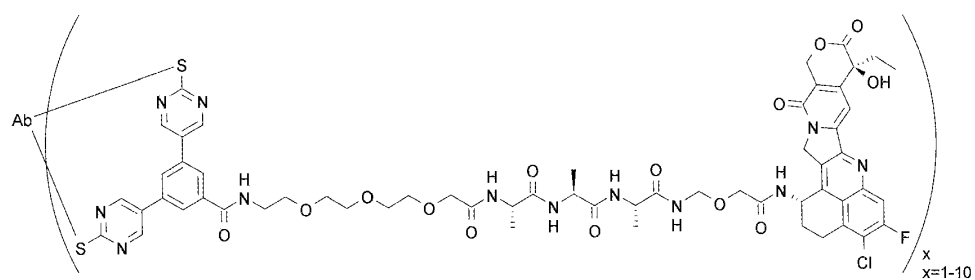
5

**ADC C-07**

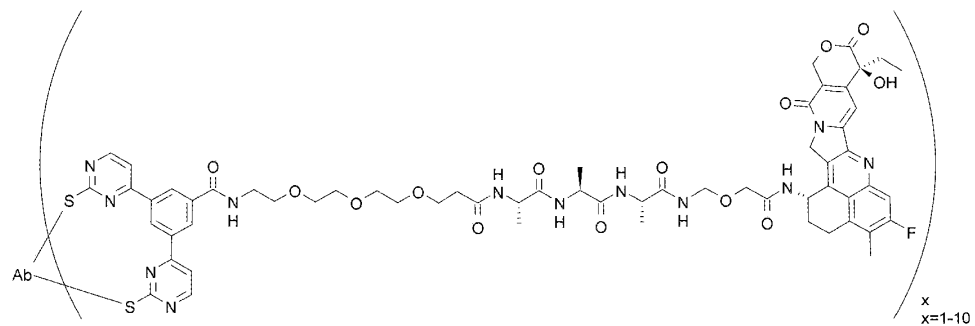
**ADC C-08****ADC C-09****ADC C-10**

ADC C-11

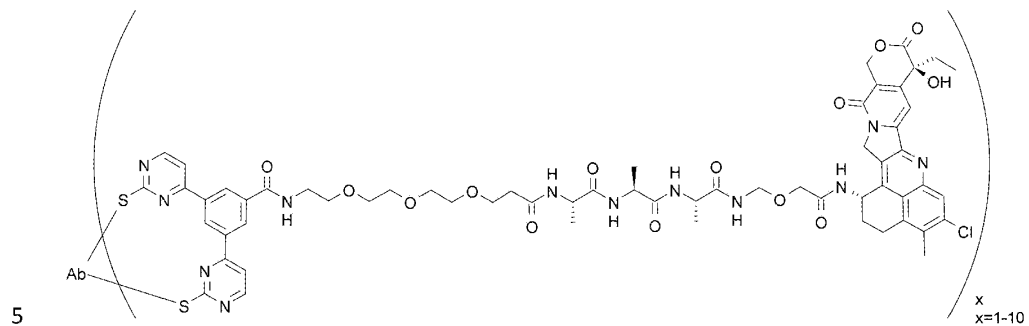
**ADC C-12**



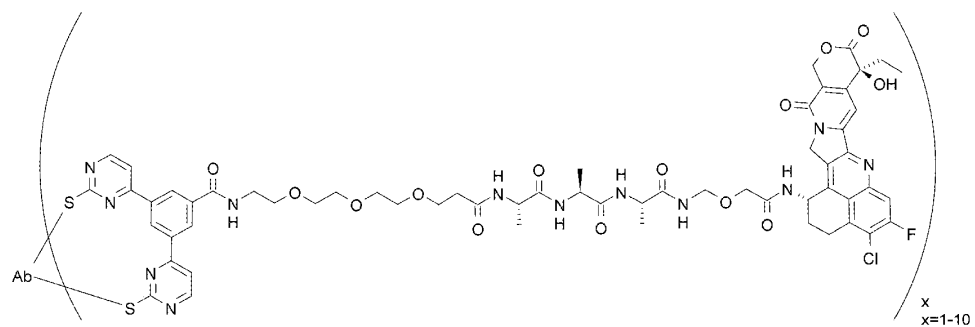
ADC C-13



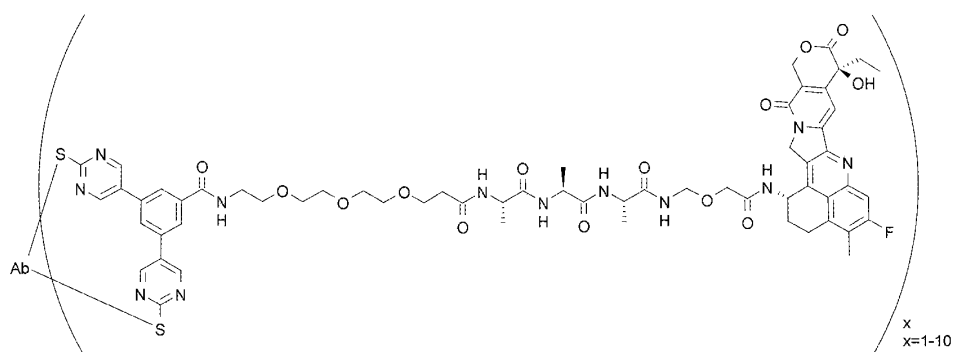
ADC C-14



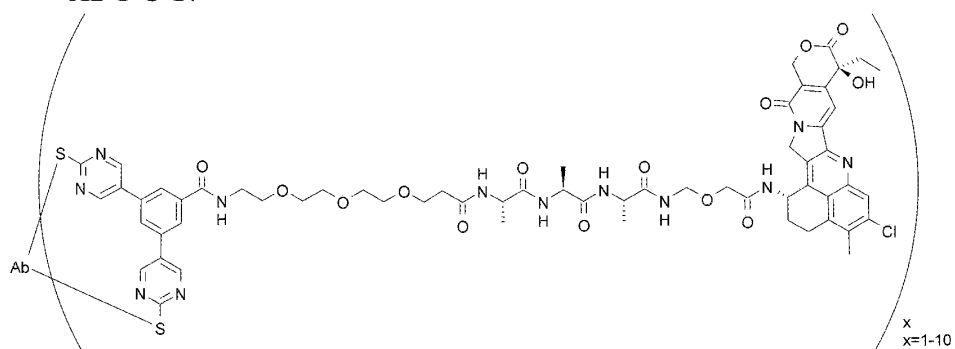
ADC C-15



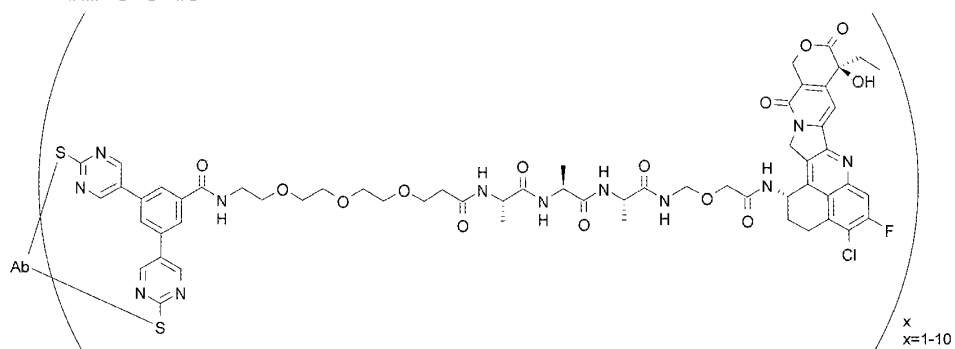
ADC C-16



ADC C-17

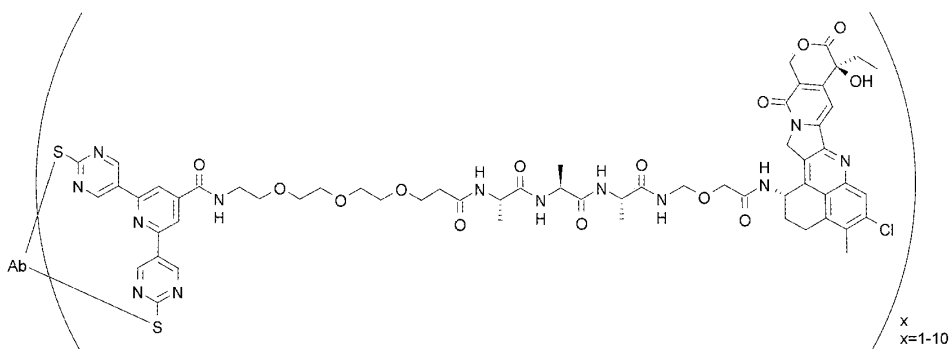


ADC C-18

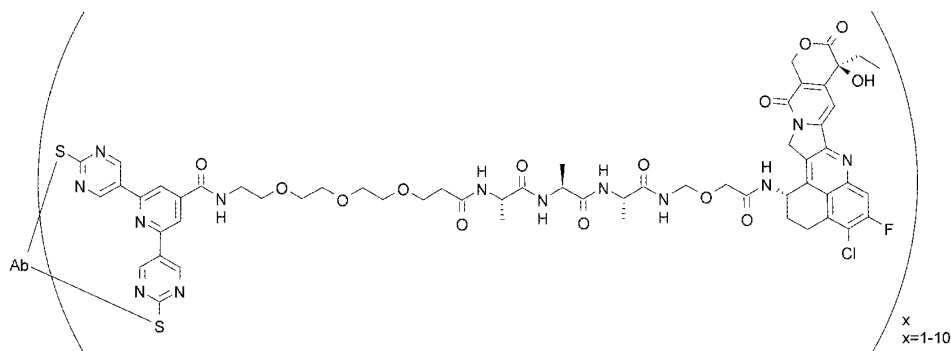
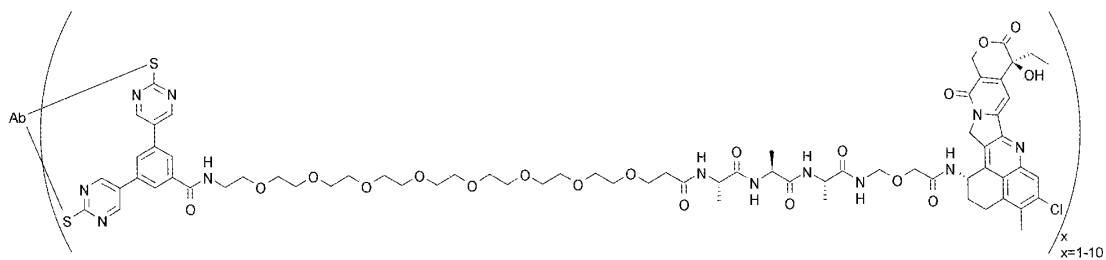
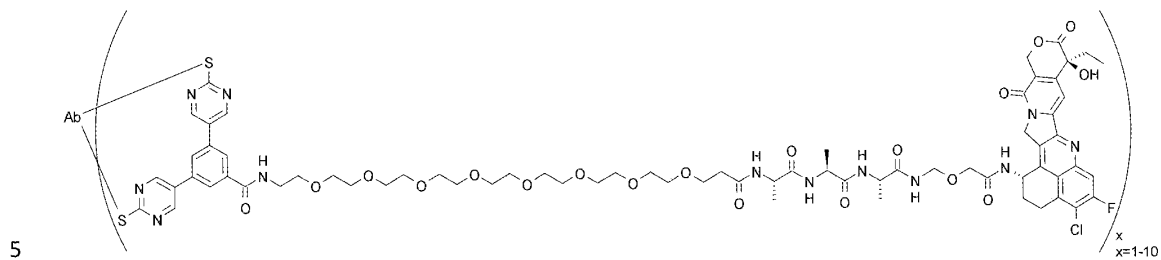
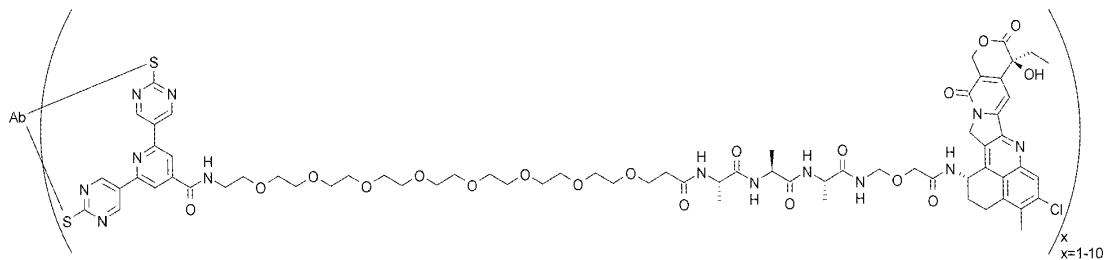
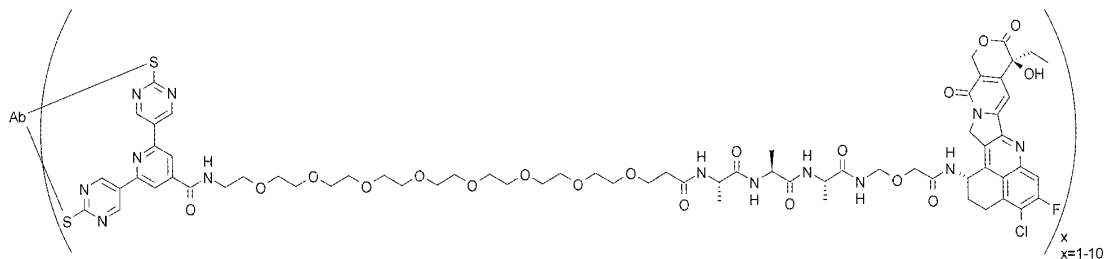


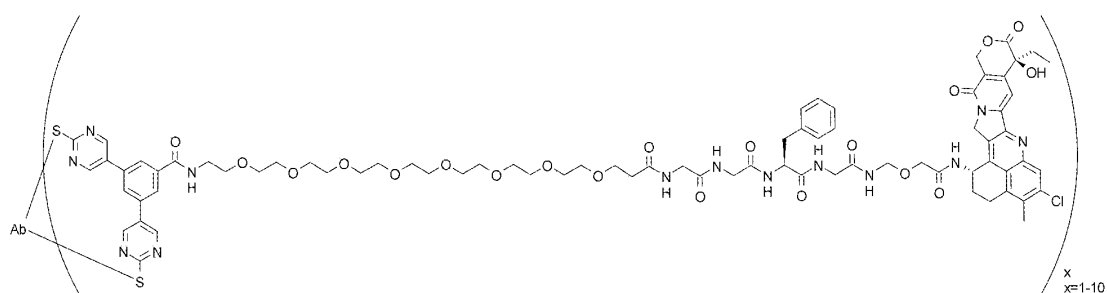
5

ADC C-19

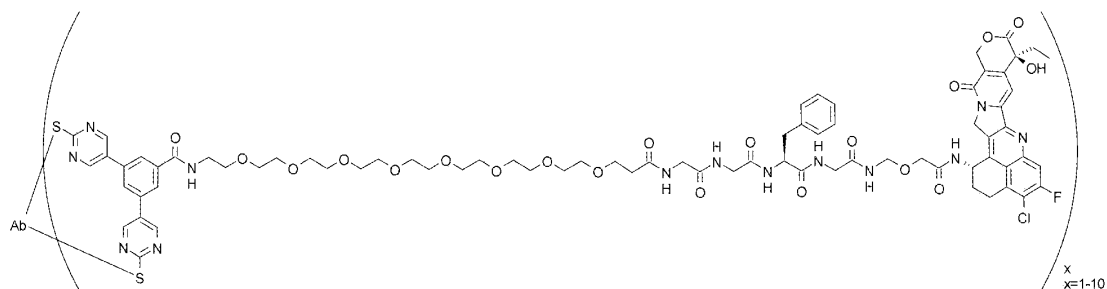


ADC C-20

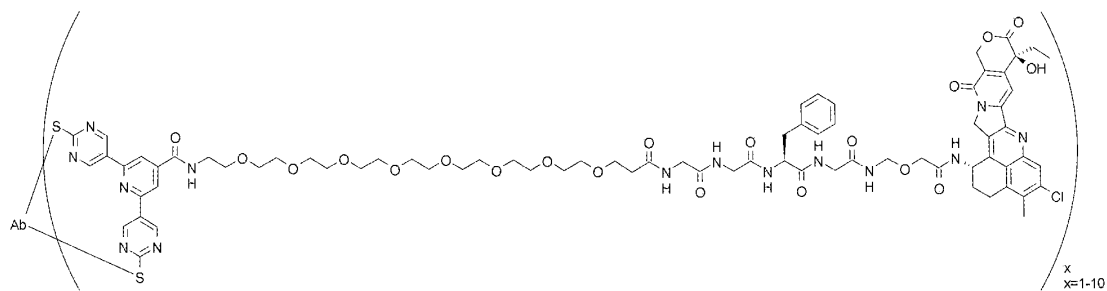
**ADC C-21****ADC C-22****ADC C-23****ADC C-24****ADC C-25**



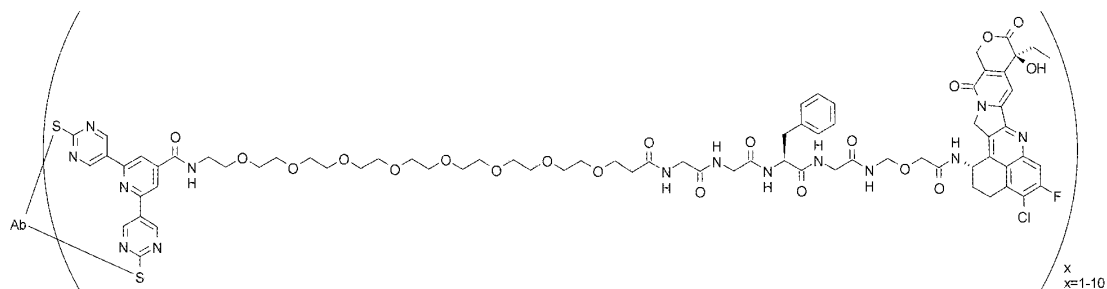
ADC C-26



ADC C-27



ADC C-28



其中， $\left(\begin{array}{c} \text{---S---} \\ \text{---} \end{array} \right)_x$ 表示抗体或其抗原结合片段中的巯基与连接体的具体连接方式。

组合物

- 10 在另一方面，本申请提供了组合物，所述可包含多个本文所述的 ADC。所述组合物中的每个抗体分子可以与 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个本发明所述的化合物偶联。因此，所述组合物的特征在于“药物-抗体比”(DAR)在约 1 至约 10 的范围内。

测定 **DAR** 的方法是技术人员熟知的，包括使用反相色谱或 **HPLC-MS** 的方法。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的 **DAR** 值（药物抗体偶联比）为 **1-10**，例如：1~2，1~3，1~4，1~5，1~6，1~7，1~8，1~9，1~10，2~3，2~4，2~5，2~6，2~7，2~8，2~9，2~10，3~4，3~5，3~6，3~7，3~8，3~9，3~10，4~5，4~6，4~7，4~8，4~9，
5 4~10，5~6，5~7，5~8，5~9，5~10，6~7，6~8，6~9，6~10，7~8，7~9，7~10，8~9，8~10，或 9~10，优选为 3~9，例如，3.0~3.5，3.0~4.0，3.0~4.5，3.0~5.0，3.0~5.5，3.0~6.0，3.5~4.0，3.5~4.5，3.5~5.0，3.5~5.5，3.5~6.0，3.5~6.5，3.5~7.0，3.5~7.5，3.5~8.0，4.0~4.5，4.0~5.0，4.0~5.5，4.0~6.0，4.0~6.5，4.0~7.0，4.0~7.5，4.0~8.0，4.5~5.0，4.5~5.5，4.5~6.0，4.5~6.5，4.5~7.0，4.5~7.5，4.5~8.0，5.0~5.5，5.0~6.0，5.0~6.5，5.0~7.0，5.0~7.5，5.0~8.0，
10 5.5~6.0，5.5~6.5，5.5~7.0，5.5~7.5，5.5~8.0，6.0~6.5，6.0~7.0，6.0~7.5，6.0~8.5，6.5~7.0，6.5~7.5，6.5~8.5，7.0~7.5，7.0~9.0 或 7.5~9.0。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的 **DAR** 值为 **4~8**。药物-连接体（药物连接子化合物）本领域技术人员应当理解，可模块化制备本申请所述抗体-药物偶联物。例如，先获得游离形式的“药物-连接体”（可理解为 **G-M-[L-E-D]_x**，其中 **G-M** 为与抗体或其抗原结合片段共价连接前的结构形式），而后将其与抗体或其抗原结合片段共价连接得到本申请所述抗体药物偶联物。相应地，所述游离形式的“药物-连接体”中 **G-M** 通过取代反应（例如脱除其上的 **-SO₂Me** 或 **-Br** 等结构）或者通过加成反应等方式与抗体或其抗原结合片段上的一个或多个巯基（**-SH**）、氨基（**-NH₂**）或羧基（**-COOH**）连接，**x** 选自 **1** 至 **10**。

20 药物组合物

抗体药物偶联物和/或药物-连接体的药物组合物

在另一个方面，本申请提供一种药物组合物，其含有前文任一项所述的抗体药物偶联物或任选的前文任一项所述的药物-连接体，以及一种或多种药用辅料。

本文所述抗体药物偶联物通常与药学上可接受的胃肠外媒介一起以单位可注射形式配制，供胃肠外使用，例如推注、静脉注射、肿瘤内注射等。任选地，以冻干剂或溶液剂的形式将具有期望纯度的抗体药物偶联物与药学上可接受的稀释剂、载体、赋型剂或稳定剂混合（**Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.**）。可以通过对于要治疗的个体适宜的任何路径施用本文所述抗体药物偶联物或含有所述抗体药物偶联物的药物组合物。

30 在某些实施方案中，所述药物组合物还可以包含另外的药学活性剂。

在某些实施方案中，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物。在某些实施方

案中，所述另外的药学活性剂选自 **B7-H3** 抑制剂、**EGFR** 抑制剂、**HER2** 抑制剂、**HER3** 抑制剂、**HER4** 抑制剂、**IGFR-1** 抑制剂、**mTOR** 抑制剂、**PI3** 激酶抑制剂、**c-met** 或 **VEGF** 抑制剂、化疗药物或其任意组合。

应用

5 1、抗体药物偶联物和/或药物-连接体的治疗用途

本文所述抗体药物偶联物、药物-连接体或药物组合物可以用于治疗多种疾病或病症，例如 **B7-H3** 阳性肿瘤、**Her2** 阳性肿瘤。

因此，本申请提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、药物-连接体、或含有其的药物组合物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗阳性肿瘤的药物中的用途。

10 本申请提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、药物-连接体、或含有其的药物组合物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗 **B7-H3** 阳性肿瘤的药物中的用途。

本申请提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、药物-连接体、或含有其的药物组合物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗 **HER2** 阳性肿瘤的药物中的用途。

15 同时，本申请还提供一种预防和/或治疗和/或辅助治疗阳性肿瘤的方法，其包括向由此需要的受试者施用有效量的前文任一项所述的抗体药物偶联物、药物连接体、或含有其的药物组合物的步骤。

本申请还提供一种预防和/或治疗和/或辅助治疗 **B7-H3** 阳性肿瘤的方法，其包括向由此需要的受试者施用有效量的前文任一项所述的抗体药物偶联物、药物连接体、或含有其的药物组合物的步骤。

20 本申请还提供一种预防和/或治疗和/或辅助治疗 **HER2** 阳性肿瘤的方法，其包括向由此需要的受试者施用有效量的前文任一项所述的抗体药物偶联物、药物连接体、或含有其的药物组合物的步骤。

本申请还提供了前文任一项所述的抗体药物偶联物、药物连接体或药物组合物在抑制 **B7-H3** 阳性肿瘤细胞增殖中的用途。

25 本申请还提供了前文任一项所述的抗体药物偶联物、药物连接体或药物组合物在抑制 **Her2** 阳性肿瘤细胞增殖中的用途。

在某些实施方案中，所述抗体药物偶联物、药物连接体或药物组合物被施用于体外细胞或受试者体内细胞；例如应用于受试者体内，以抑制受试者体内肿瘤细胞的增殖；或者，应用于体外肿瘤细胞（例如细胞系或者来自受试者的细胞），以抑制体外肿瘤细胞的增殖。

30 本申请中，**B7-H3** 阳性肿瘤包括实体瘤或血液系统恶性肿瘤，例如结直肠癌，胃癌，乳腺癌，前列腺癌，头颈部鳞癌，黑色素瘤，神经母细胞瘤，肉瘤，肺癌（例如，小细胞

肺癌，非小细胞肺癌等)、肾癌、膀胱癌、甲状腺癌、间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌，子宫内膜癌、食管癌，肝癌、唾液腺癌、胆管癌、脑膜瘤。

本申请中，受试者优选为哺乳动物，例如牛科动物、马科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物、啮齿类动物、灵长类动物；例如，人。

- 5 在某些实施方案中，所述方法还包括向所述受试者施用第二疗法，所述第二疗法选自手术、化疗、放疗、免疫疗法、基因疗法、DNA 疗法、RNA 疗法、纳米疗法、病毒疗法、辅助疗法及其任意组合。在某些实施方案中，所述第二疗法可以与上述方法同时、分开或相继应用。

- 10 在某些实施方案中，本发明药物组合物所涉及的肿瘤选自乳腺癌，结直肠癌，头颈癌，肾透明细胞癌，肾乳头状细胞癌，肝癌，肺腺癌，肺鳞癌，前列腺癌，胃腺癌，甲状腺癌或其任意组合。

2、药物-连接体在制备偶联物中的用途

本发明前文所述的药物连接子用于制备偶联物。本发明的偶联物包含抗体药物偶联物等。

- 15 3、中间体化合物在制备药物连接子化合物中的用途

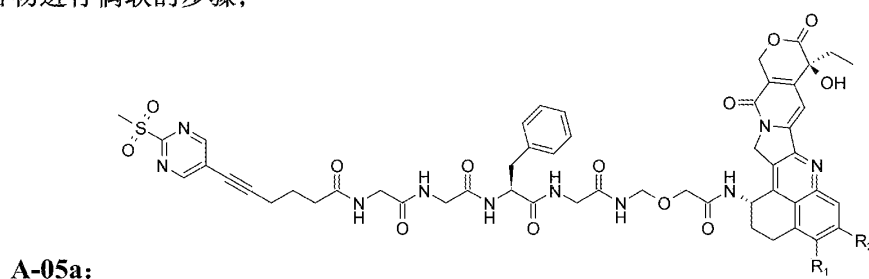
本发明前文所述的中间体化合物用于制备药物连接子化合物。

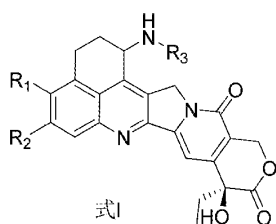
制备方法

本发明还提供了药物连接子化合物的制备方法，包含对中间体化合物进行脱保护的步骤。

- 20 方法一

在部分实施方案中，所述方法一包括制备化合物 A-05a 的方法，所述方法包括与式 I 化合物进行偶联的步骤；





其中, R_1, R_2 各自独立地选自 C_{1-6} 烷基和卤素;

R_3 选自 H 和 $-CO-CH_2OH$;

R_4 和 R_5 各自独立地选自 H、卤素和羟基; 或者 R_4 和 R_5 与相连碳原子连接成 5-6 元

5 含氧杂环;

R_6 选自氢或 $-C_{1-4}$ 亚烷基- NR_aR_b ;

R_7 选自 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-4}$ 亚烷基- NR_aR_b ;

其中 R_a, R_b 在每次出现时各自独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基和 $-CO-C_{1-6}$ 烷基。

10 在一些实施方式中, R_1, R_2 各自独立地选自 C_{1-4} 烷基、F、Cl、Br 和 I。

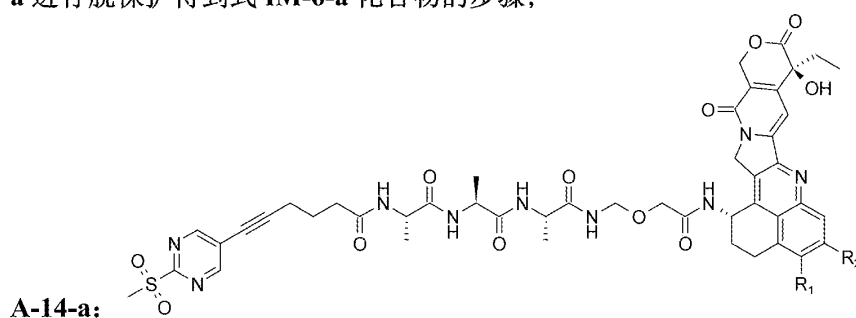
在一些实施方式中, R_1 选自卤素、甲基、乙基、丙基和丁基, 例如甲基和 Cl。

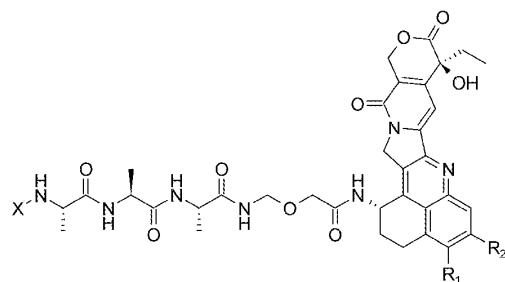
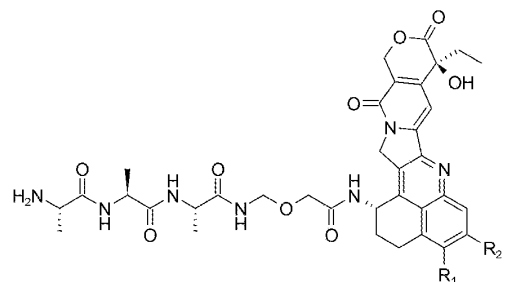
在一些实施方式中, R_2 选自 F、Cl、Br 和 I, 例如 F 和 Cl。

在一些实施方式中, R_1 选自甲基和 Cl, R_2 选自 F 和 Cl。

方法二

15 在部分实施方案中, 所述方法二包括制备化合物 A-14-a 的方法, 所述方法包括 IM-5-a 进行脱保护得到式 IM-6-a 化合物的步骤;



**IM-5-a:****IM-6-a:**

其中，X 如前文所述中间体化合物所定义，**R₁** 和 **R₂** 如方法一中所定义。

在一些实施方式中，所述脱保护的反应为：溶剂选自 **N,N**-二甲基甲酰胺，并加入烷胺
5 类化合物，例如二乙胺。

在一些实施方式中，所述脱保护在室温条件下进行，反应时间为 **1-5h**，例如 **1-3h**。

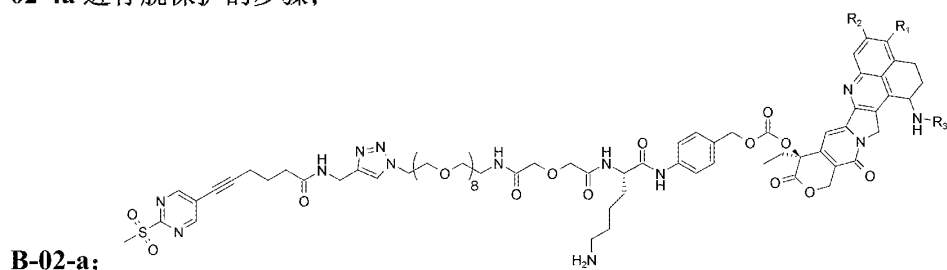
在部分实施方案中，所述方法二还进一步包括 **IM-6-a** 与 **IM-2** 进行反应得到化合物
A-14-a 的步骤。

在一些实施方式中，所述反应的溶剂选自 **N,N**-二甲基甲酰胺和 **N,N**-二甲基乙酰胺。

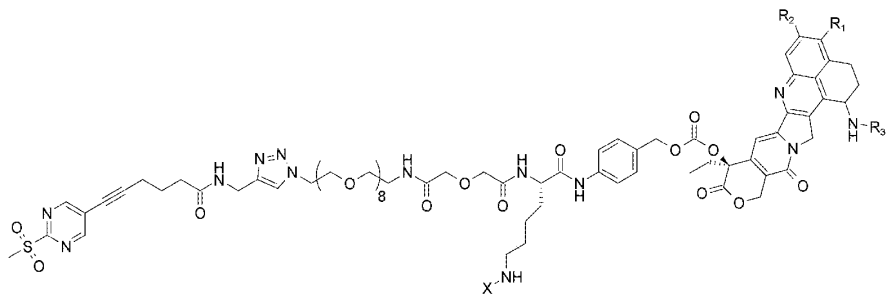
10 在一些实施方式中，所述反应还包括加入 **N,N**-二异丙基乙胺的步骤。

方法三

在部分实施方案中，所述方法三包括制备化合物 **B-02-a** 的方法，所述方法包括将 **B-**
02-4a 进行脱保护的步骤；

**B-02-a:**

15 **B-02-4a:**



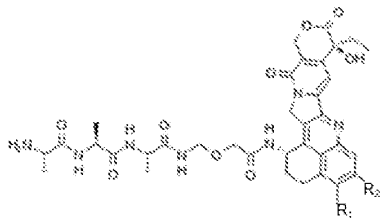
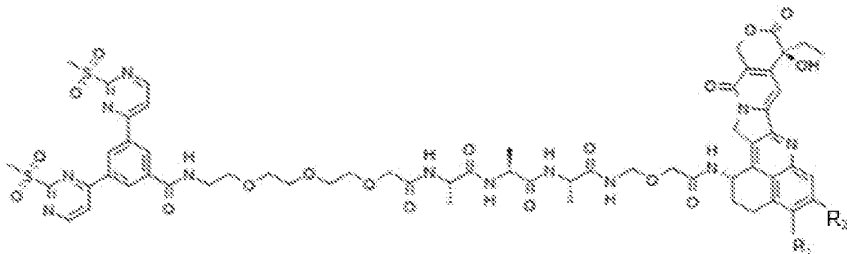
其中，X 如前文中间体化合物中所述，R₁、R₂ 和 R₃ 如前文式一化合物中所述。

方法四

在部分实施方案中，所述方法四包括制备化合物 C-07-a 的方法，所述方法包括 C-07-

5 6 与 C-07-8a 进行反应的步骤；

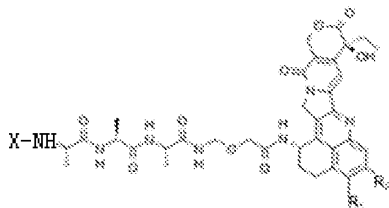
C-07-a:



C-07-8a:

其中，R₁ 和 R₂ 如方法一中所定义。

10 在一些实施方式中，所述方法四中的 C-07-8a 通过 C-07-7a 脱保护制备得到；



C-07-7a:

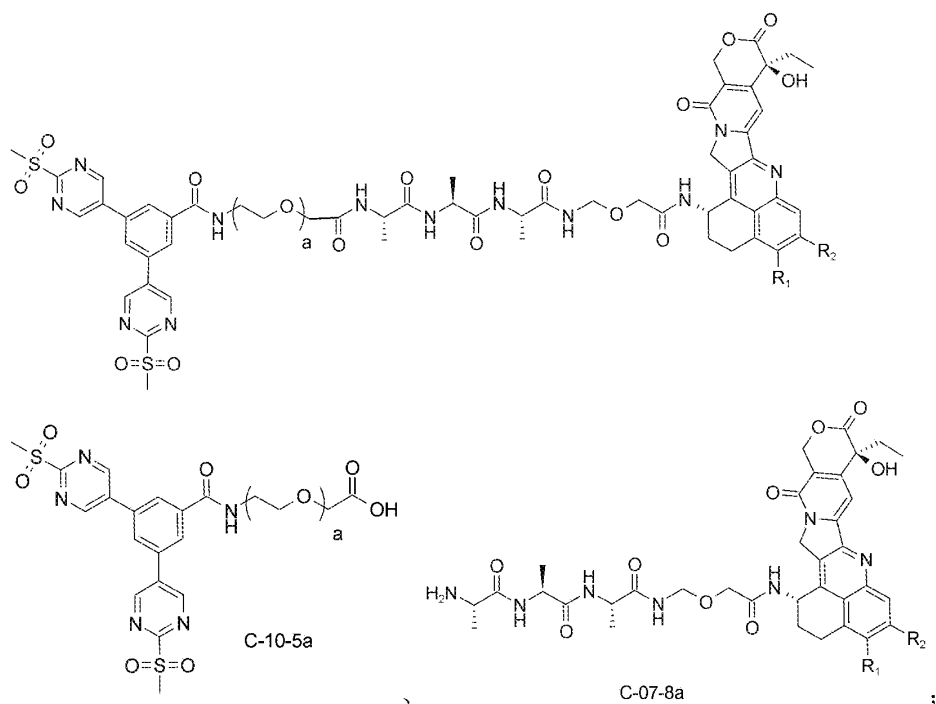
, 其中 X 如中间体化合物中所定义，

R₁ 和 R₂ 如方法一中所定义。

方法五

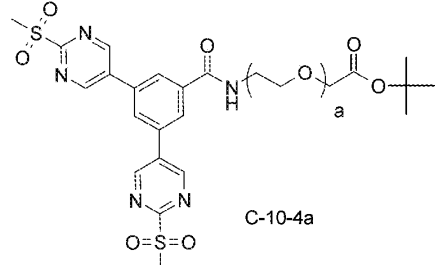
在部分实施方案中，所述方法五包括制备化合物 C-10a 的方法，所述方法包括 C-10-

15 5a 与 C-07-8a 进行反应的步骤；

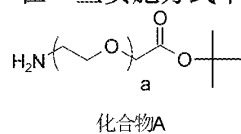
C-10-a:

5 其中， R_1 、 R_2 和 a 如上文任意一项所定义。

在一些实施方式中，所述方法五中的 C-10-5a 通过 C-10-4a 脱保护制备得到；

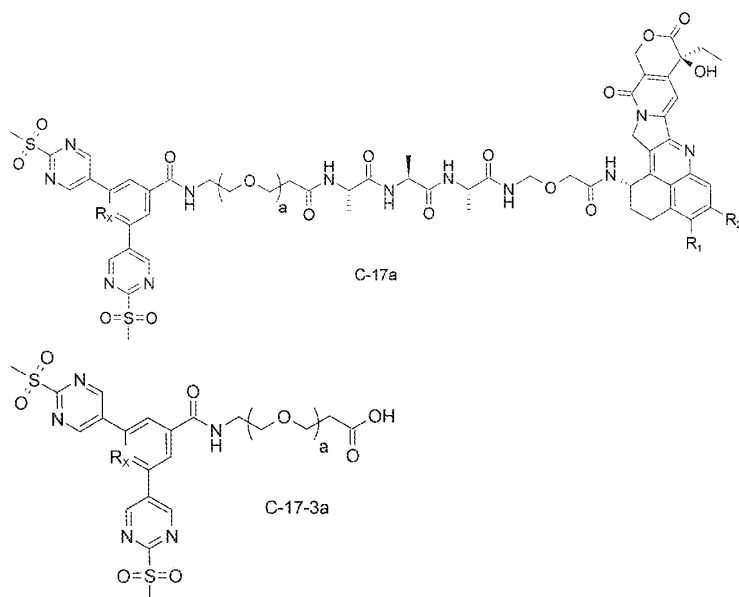


在一些实施方式中，所述方法五中的 C-10-4a 通过 C-10-3 与化合物 A 制备得到；



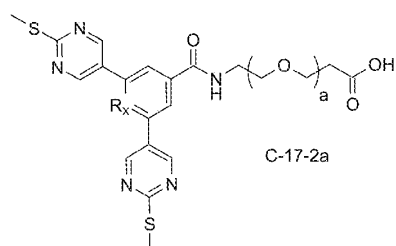
10 方法六

在部分实施方案中，所述方法六包括制备化合物 C-17a 的方法，所述方法包括 C-17-3a 与 C-07-8a 进行反应的步骤；

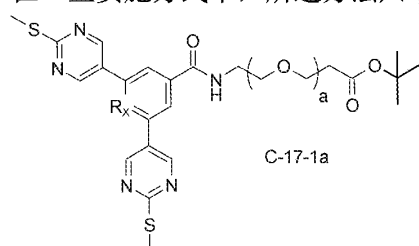


其中， R_1 、 R_2 和 a 如上文任意一项所定义；优选地， R_1 为甲基、 R_2 为 Cl 且 a 为 3 或 8； R_x 选自 CH 或 N。

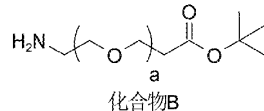
5 在一些实施方式中，所述方法六中的 C-17-3a 通过 C-17-2a 氧化反应制备得到；



在一些实施方式中，所述方法六中的 C-17-2a 通过 C-17-1a 脱保护制备得到；



10 在一些实施方式中，所述方法六中的 C-17-1a 通过 C-10-2 或 C-19-3 与化合物 A 进行偶联反应制备得到。



定义

除非在下文中另有定义，本文中所使用的所有技术术语和科学术语的含义意图与本领域技术人员通常所理解的相同。提及本文中使用的技术意图指在本领域中通常所理解的技术，包括那些对本领域技术人员显而易见的技术的变化或等效技术的替换。并且，本文中所用的基因组学、核酸化学、分子生物学等实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。虽然相信以下术语对于本领域技术人员很好理解，但仍然阐述以下定义以更好地解释本发明。

术语“抗体”是指，通常由两对多肽链（每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC)）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ (lambda) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循本领域已知的各种编号系统。

术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。在重链和轻链的可变区中各含有三个 CDRs，命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。这些 CDR 的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义，例如可按照 Kabat 编号系统 (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)、Chothia 编号系统 (Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia 等人 (1989) *Nature* 342:878-883)、IMGT 编号系统 (Lefranc et al., *Dev. Comparat. Immunol.* 27:55-77, 2003) 或 AbM 编号系统 (Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) *Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA* 86:9268-9272) 中的定义。对于给定的抗体，本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的 CDR。并且，不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的 (例如，可参见 Lefranc et al., *Dev. Comparat. Immunol.* 27:55-77, 2003)。

在本发明中，抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 可根据本领域已知的各种编号系统确定，例如通过 **Kabat**、**Chothia**、**IMGT** 或 **AbM** 编号系统确定。在某些实施方案中，抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 通过 **Chothia** 编号系统定义。

术语“构架区”或“**FR**”残基是指，抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

术语抗体的“抗原结合片段”是指抗体的片段的多肽，例如全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，**Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989))**，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。

可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括 **Fab** 片段、**Fab'** 片段、**F(ab)'₂** 片段、**F(ab)'₃** 片段、**Fd**、**Fv**、**scFv**、**di-scFv**、**(scFv)₂**、二硫键稳定的 **Fv** 蛋白(“**dsFv**”)、单结构域抗体(**sdAb**，纳米抗体)和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。工程改造的抗体变体综述于 **Holliger 等, 2005; Nat Biotechnol, 23: 1126-1136** 中。

术语“**Fd**”意指由 **VH** 和 **CH1** 结构域组成的抗体片段；术语“**dAb** 片段”意指由 **VH** 结构域组成的抗体片段 (**Ward 等人, Nature 341:544 546 (1989)**)；术语“**Fab** 片段”意指由 **VL**、**VH**、**CL** 和 **CH1** 结构域组成的抗体片段；术语“**F(ab)'₂** 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 **Fab** 片段的抗体片段；术语“**Fab'** 片段”意指还原连接 **F(ab)'₂** 片段中两个重链片段的二硫键后所获片段，由一条完整的轻链和重链的 **Fd** 片段 (由 **VH** 和 **CH1** 结构域组成) 组成。

术语“**Fv**”意指由抗体的单臂的 **VL** 和 **VH** 结构域组成的抗体片段。**Fv** 片段通常被认为是，能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为，六个 **CDRs** 赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是一个可变区 (例如 **Fd** 片段，其仅仅含有三个对抗原特异的 **CDRs**) 也能够识别并结合抗原，尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

术语“**Fc**”意指，由抗体的第一重链的第二、第三恒定区与第二重链的第二、第三恒定区经二硫键结合而形成的抗体片段。抗体的 **Fc** 片段具有多种不同的功能，但不参与抗原的结合。

术语“**scFv**”是指，包含 **VL** 和 **VH** 结构域的单个多肽链，其中所述 **VL** 和 **VH** 通过接头 (**linker**) 相连 (参见，例如，**Bird 等人, Science 242:423-426 (1988)**；**Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)**；和 **Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies**，第 113 卷，**Roseburg 和 Moore 编, Springer-Verlag**，纽约，第 269-315 页

(1994))。此类 **scFv** 分子可具有一般结构: **NH₂-VL-接头-VH-COOH** 或 **NH₂-VH-接头-VL-COOH**。合适的现有技术接头由重复的 **GGGGS** 氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(**GGGGS**)₄ 的接头,但也可使用其变体 (**Holliger** 等人(1993), **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 **Alfthan** 等人(1995), **Protein Eng.** **8**:725-731, **Choi** 等人(2001), **Eur. J. Immunol.** **31**: 94-106, **Hu** 等人(1996), **Cancer Res.** **56**:3055-3061, **Kipriyanov** 等人(1999), **J. Mol. Biol.** **293**:41-56 和 **Roovers** 等人 (2001), **Cancer Immunol.**描述。在一些情况下, **scFv** 的 **VH** 与 **VL** 之间还可以存在二硫键。在某些实施方案中, **VH** 和 **VL** 结构域可以以任何合适的排列彼此相对定位。例如,包含 **NH₂-VH-VH-COOH**、**NH₂-VL-VL-COOH** 的 **scFv**。

10 术语“单域抗体 (**single-domain antibody, sdAb**)”具有本领域技术人员通常理解的含义,其是指由单个单体可变抗体结构域(例如单个重链可变区)所组成的抗体片段,其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力(**Holt, L.**等人, **生物技术趋势(Trends in Biotechnology)**, **21(11)**:484-490, 2003)。单域抗体也称为纳米抗体 (**nanobody**)。

上述各个抗体片段均保持了特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合。

在本文中,除非上下文明确指出,否则当提及术语“抗体”时,其不仅包括完整抗体,而且包括抗体的抗原结合片段。

可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如,重组 **DNA** 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的抗体)获得抗体的抗原结合片段(例如,上述抗体片段),并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

术语“鼠源抗体”是指通过下述方法获得的抗体:融合免疫接种过的小鼠的 **B** 细胞与骨髓瘤细胞,筛选出既能无限增殖又能分泌抗体的鼠杂交融合细胞,继而进行筛选、抗体制备和抗体纯化;或者是指,由抗原侵入小鼠体内后 **B** 细胞分化增殖而形成浆细胞所分泌产生的抗体。

25 术语“人源化抗体”是指,经基因工程改造的非人源抗体,其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言,人源化抗体的全部或部分 **CDR** 区来自于非人源抗体(供体抗体),全部或部分的非 **CDR** 区(例如,可变区 **FR** 和/或恒定区)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。人源化抗体通常保留了供体抗体的预期性质,包括但不限于,抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力、增强免疫应答的能力等。供体抗体可以是有预期性质(例如,抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力和/或增强免疫应答的能力)的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物(例如,食蟹猴)抗体。

术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如,两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据,或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据),那么各分子在该位置上是一一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如,如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配,那么这两个序列具有 60% 的同一性。例如, DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50% 的同一性(总共 6 个位置中有 3 个位置匹配)。通常,在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用,例如,可通过计算机程序例如 Align 程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的 Needleman 等人(1970)*J. Mol. Biol.* 48: 443-453 的方法来实现。还可使用已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)的 E. Meyers 和 W. Miller (*Comput. Appl Biosci.*, 4:11-17 (1988))的算法,使用 PAM120 权重残基表(weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外,可使用已整合入 GCG 软件包(可在 www.gcg.com 上获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (*J Mol Biol.* 48:444-453 (1970))算法,使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重(gap weight)和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

如本文中所使用的,术语“变体”,在多肽的情境中(包括多肽)也指包含已通过引入氨基酸残基置换、缺失或添加改变的氨基酸序列的多肽或肽。在某些情况下,术语“变体”还指已被修饰(即,通过将任何类型的分子共价连接至多肽或肽)的多肽或肽。例如,但非限制性地,多肽可以被修饰,例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团进行的衍生化、蛋白水解切割、连接至细胞配体或其它蛋白质等。衍生多肽或肽可使用本领域技术人员已知的技术通过化学修饰来产生,所述技术包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,变体具有与其所源自的多肽或肽相似、相同或改善的功能。

如本文中所使用的,术语“特异性结合”是指,两分子间的非随机的结合反应,如抗体和其所针对的抗原之间的反应。特异性结合相互作用的强度或亲和力可以该相互作用的平衡解离常数(KD)或半最大效应浓度(EC₅₀)表示。

两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定。一种方法涉及测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速度。“结合速率常数”(ka 或 kon)和“解离速率常数”(kdis 或 koff)两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得出(参见 Malmqvist M, *Nature*, 1993, 361:186-187)。kdis/kon 的比率等于解离常数 KD(参见 Davies 等人, *Annual*

Rev Biochem, 1990; 59:439-473)。可用任何有效的方法测量 **KD**、**kon** 和 **kdis** 值。在某些实施方案中，可以使用生物发光干涉测量法（例如 **ForteBio Octet** 法）来测量解离常数。除此以外还可用表面等离子共振技术（例如 **Biacore**）或 **Kinexa** 来测量解离常数。

术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 **PCR** 介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此，优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见，例如，**Brummell** 等人，**Biochem. 32:1180-1187 (1993)**; **Kobayashi** 等人 **Protein Eng. 12(10):879-884 (1999)**; 和 **Burks** 等人 **Proc. Natl Acad. Sci USA 94:412-417 (1997)**，其通过引用并入本文)。

本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如，**Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))**，其以引用的方式并入本文中。在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 **A** 或 **Ala** 表示。

术语“包括”、“包含”、“具有”、“含有”或“涉及”及其在本文中的其它类似形式为包含性的(**inclusive**)或开放式的，且不排除其它未列举的元素或方法步骤。

术语“烷基”表示直链或支链烃基去掉 1 个氢原子得到的基团，例如“**C₁₋₂₀ 烷基**”、“**C₁₋₁₀ 烷基**”、“**C₁₋₆ 烷基**”、“**C₁₋₄ 烷基**”、“**C₁₋₃ 烷基**”等，具体实例包括但不限于：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、2-甲基丁基、新戊基、1-乙基丙基、正己基、异己基、3-甲基戊基、2-甲基戊基、1-甲基戊基、3,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、1,2-二甲基丙基等。

术语“亚烷基”表示直链或支链烃基去掉 2 个氢原子得到的基团，例如“**C₁₋₂₀ 亚烷基**”、“**C₁₋₁₀ 亚烷基**”、“**C₃₋₁₀ 亚烷基**”、“**C₅₋₈ 亚烷基**”、“**C₁₋₆ 亚烷基**”、“**C₁₋₄ 亚烷基**”、“**C₁₋₃**

亚烷基”等，具体实例包括但不限于：亚甲基、亚乙基、1,3-亚丙基、1,4-亚丁基、1,5-亚戊基或 1,6-亚己基等。

术语“亚烯基”是指含有至少一个碳碳双键的直链或支链的烃基失去两个氢原子得到的二价基团，包括例如“C₂₋₂₀ 亚烯基”、“C₃₋₁₀ 亚烯基”、“C₅₋₈ 亚烯基”等。其实例包括但不限于：亚乙烯基、1-亚丙烯基、2-亚丙烯基、1-亚丁烯基、2-亚丁烯基、1,3-亚丁二烯基、1-亚戊烯基、2-亚戊烯基、3-亚戊烯基、1,3-亚戊二烯基、1,4-亚戊二烯基、1-亚己烯基、2-亚己烯基、3-亚己烯基、1,4-亚己二烯基等。

术语“亚炔基”是指含有至少一个碳碳三键的直链或支链烃基失去两个氢原子得到的二价基团。包括例如“C₂₋₂₀ 亚炔基”、“C₃₋₁₀ 亚炔基”、“C₅₋₈ 亚炔基”等。其实例包括但不限于：亚乙炔基、1-亚丙炔基、2-亚丙炔基、1-亚丁炔基、2-亚丁炔基、1,3-亚丁二炔基、1-亚戊炔基、2-亚戊炔基、3-亚戊炔基、1,3-亚戊二炔基、1,4-亚戊二炔基、1-亚己炔基、2-亚己炔基、3-亚己炔基、1,4-亚己二炔基等。

术语“脂杂环”是指含至少一个（例如 1、2 或 3 个）选自 N、O 和 S 的环成员的饱和或部分饱和的环状结构。具体实例包括但不限于 5-6 元脂杂环、5-6 元含氮脂杂环、5-6 元含氧脂杂环等，例如四氢呋喃、吡咯烷、哌啶、四氢吡喃等。

术语“杂芳环”是指含至少一个选自 N、O 和 S 的环成员的芳香环状结构。具体实例包括但不限于 5-6 元芳杂环、5-6 元含氮芳杂环、5-6 元含氧芳杂环等，例如呋喃、噻吩、吡咯、噻唑、异噻唑、噻二唑、噁唑、异噁唑、噁二唑、咪唑、吡唑、1,2,3-三唑、1,2,4-三唑、1,2,3-噁二唑、1,2,4-噁二唑、1,2,5-噁二唑、1,3,4-噁二唑、吡啶、嘧啶、哒嗪、吡嗪、1,2,3-三嗪、1,3,5-三嗪、1,2,4,5-四嗪等。

术语“芳香族环系”是指包含至少一个芳环（例如苯环等）或杂芳环（例如 5-6 元芳杂环，例如 5-6 元含氮芳杂环，例如嘧啶环等）的单环或多环体系，两个或更多个芳环和/或杂芳环可以形成稠合环或通过单键连接（例如二嘧啶基苯基等），所述芳香族环系可以是二价或更高价态（例如三价或四价），例如 5-20 元芳香族环系。

如本文中所使用的，术语“适合的取代基”是指本领域技术人员可根据化合物取代基的需要对化合物进行的变型。“适合的取代基”包括氧基(=O)、卤素、氰基、NR⁸R⁹、羧基、巯基、羟基、酯基（例如-C₁₋₆烷基-C(=O)-OC₁₋₆烷基）、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₆烷基-O-C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₃₋₆环烷基、3-10 元杂环基、5-10 元杂芳基、C₆₋₁₀芳基、苄基、羟基取代的苄基、吡啶基亚甲基和 C₁₋₆ 卤代烷氧基，R⁸、R⁹各自独立地选自 H、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、3-10 元杂环基、5-10 元杂芳基、C₆₋₁₀芳基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆卤代烷氧基、卤素、羟基、羧基和酯基（例如-C₁₋₆烷基-C(=O)-

OC₁₋₆ 烷基)。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的(参见例如 **Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995**)，并且包括但不限于：**pH** 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，稀释剂，维持渗透压的试剂，延迟吸收的试剂，防腐剂。例如，**pH** 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 **Tween-80**。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂，例如对羟苯甲酸酯，三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、**NaCl** 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水，水性缓冲液(如缓冲盐水)，醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂，例如硫柳汞，**2-苯氧乙醇**，对羟苯甲酸酯，三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义，其能够稳定药物中的活性成分的期望活性，包括但不限于谷氨酸钠，明胶，**SPGA**，糖类(如山梨醇，甘露醇，淀粉，蔗糖，乳糖，葡聚糖，或葡萄糖)，氨基酸(如谷氨酸，甘氨酸)，蛋白质(如干燥乳清，白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。

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

如本文中所使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如灵长类哺乳动物，例如人。在某些实施方式中，所述受试者(例如人)患有肿瘤，或者，具有患有上述疾病的风险。

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

术语“癌症”“肿瘤”可互换使用，其是指以体内异常细胞的不受控生长为特征的一大类

疾病。不受管制的细胞分裂可能导致恶性肿瘤或侵入邻近组织的细胞的形成，并可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部位。癌症包括良性和恶性肿瘤以及休眠肿瘤或微转移。癌症也包括血液学恶性肿瘤。

术语“血液学恶性肿瘤”包括淋巴瘤，白血病，骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤，以及脾瘤和淋巴结肿瘤。示例性淋巴瘤包括 **B** 细胞淋巴瘤和 **T** 细胞淋巴瘤。**B** 细胞淋巴瘤，包括例如霍奇金淋巴瘤。**T** 细胞淋巴瘤，包括例如皮肤 **T** 细胞淋巴瘤。血液学恶性肿瘤还包括白血病，例如继发性白血病或急性淋巴细胞性白血病。血液恶性肿瘤还包括骨髓瘤（例如多发性骨髓瘤）及其他血液学和/或 **B** 细胞或 **T** 细胞相关的癌症。

10

具体实施方式

以下通过具体实施方式的描述对本发明作进一步说明，但这并非是对本发明的限制。本领域技术人员根据本发明的教导，可以做出各种修改或改进，而不脱离本发明的基本思想和范围。

15 本发明涉及的序列的信息描述于下面的表中：

SEQ ID NO:	描述	
1	20G11G6/2# VH 氨基酸序列	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTLCAVSGGSNSSSNWW TWVRQSPGKGLEWIGEISPTGFTSYSPSLKSRVTIS VDKSKTQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRLYFDFW QGTLVTVSS
2	20G11G6/2# VL 氨基酸序列	EIVMTQSPATLSVSPGKRATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPITFGQGTRLEIK
3	2#8890 VH 氨基酸序列	QVQLQESGPGLVQPSGTLSTLCAVSGGSDSSTNWW TWVRQSPGQGLEWIGEISPIGFTSYSPSLRSRVTISV DKSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLYFAFWG QGTLVTVSS
4	2#8890 VL 氨基酸序列	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTEFT LTISLSEDFAVYYCQQYNNWPITFGQGTRLEIK
5	20G11G6/2# CDR-H1 (IMGT 定义)	GGSNSSSNW
6	20G11G6/2# CDR-H2 (IMGT 定义)	ISPTGFT
7	20G11G6/2# CDR-H3 (IMGT 定义)	ARDRLYFDF
8	20G11G6/2#/2#8890 CDR-L1	QSVSSN

	(IMGT 定义)	
9	20G11G6/2#/2#8890 CDR-L2 (IMGT 定义)	GAS
10	20G11G6/2#/2#8890 CDR-L3 (IMGT 定义/ Chothia 定义/Kabat 定义/AbM 定义)	QQYNNWPIT
11	20G11G6/2# CDR-H1 (Chothia 定义)	GGSNSSSN
12	20G11G6/2# CDR-H2 (Chothia 定义)	SPTGF
13	20G11G6/2# CDR-H3 (Chothia 定义/Kabat 定义/AbM 定义)	DRLYFDF
14	20G11G6/2#/2#8890 CDR-L1 (Chothia 定义/Kabat 定义/AbM 定义)	RASQSVSSNLA
15	20G11G6/2#/2#8890 CDR-L2 (Chothia 定义/Kabat 定义/AbM 定义)	GASTRAT
16	20G11G6/2# CDR-H1 (Kabat 定义)	SSNWWT
17	20G11G6/2# CDR-H2 (Kabat 定义)	EISPTGFTSYSPSLKS
18	2#8890 CDR-H1 (IMGT 定义)	GGSDSSTNW
19	2#8890 CDR-H2 (IMGT 定义)	ISPIGFT
20	2#8890 CDR-H3 (IMGT 定义)	ARDRLYFAF
21	2#8890 CDR-H1 (Chothia 定义)	GGSDSSTN
22	2#8890 CDR-H2 (Chothia 定义)	SPIGF
23	2#8890 CDR-H3 (Chothia 定义/ Kabat 定义/ AbM 定义)	DRLYFAF
24	2#8890 CDR-H1 (Kabat 定义)	STNWWT
25	2#8890 CDR-H2 (Kabat 定义)	EISPIGFTSYSPSLRS
26	20G11G6/2# CDR-H1 (AbM 定义)	GGSNSSSNWWT

27	20G11G6/2# CDR-H2 (AbM 定义)	EISPTGFTS
28	2#8890 CDR-H1 (AbM 定义)	GGSDSSTNWWT
29	2#8890 CDR-H2 (AbM 定义)	EISPIGFTS
30	IgG1 重链恒定区氨基酸序列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
31	突变的 IgG1 重链恒定区氨基酸序列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
32	人轻链 κ 恒定区氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
33	20G11G6/2# VH 核苷酸序列	CAGGTTCAATTGCAAGAAAGCGGCCCGGGCTG GTAAAACCAAGTGGCACCCTGAGCCTGACGTGT GCTGTGTCTGGGGGGAGCAATTCCTCAAGCAATT GGTGGACATGGGTGAGGCAGTCCCCCGGAAAGG GCTTGGAATGGATCGGCGAGATCAGCCCTACAG GTTTTACCAGCTACTCCCCTAGCCTGAAATCCAG GGTGACGATCAGTGTGACAAGTCTAAAACACA GTTCTCTCTGAACCTTTCAAGTGTCACTGCAGCC GATACTGCTGTGTATTACTGCGCCAGAGATCGGC TGTATTTTGACTTTTGGGGCCAGGGCACTCTGGT CACAGTGTCTAGC
34	20G11G6/2# VL 核苷酸序列	GAAATAGTGATGACCCAATCCCCGCAACTCTGT CTGTGTCCCCTGGGAAGAGAGCCACCCTTTCCT GTCGCGCCTCACAATCCGTGAGCTCAAATCTGGC ATGGTATCAACAGAAACCAGGCCAAGCGCCTCG GCTGCTGATTTACGGCGCCTCTACCCGCGCTACC GGAATCCCAGCACGCTTTAGCGGCTCAGGGTCC GGCACTGAGTTCACCTTGACAATTAGTAGTCTGC AGTCCGAAGATTTTGCCGTCTATTACTGCCAGCA GTATAATAACTGGCCAATCACCTTTGGCCAGGGC ACACGCCTGGAGATCAAG

35	2#8890 VH 核苷酸序列	CAAGTACAACCTCCAAGAAAGTGGGCCAGGACTC GTGCAACCATCTGGCACCCCTCTCTCTCACCTGCG CAGTGTCTGGCGGCTCCGATTCTTCCACCAACTG GTGGACCTGGGTGAGACAGTCCCCAGGCCAAGG ATTGGAATGGATTGGCGAGATTTCCCCTATTGGG TTCACCAGCTACAGCCCCAGCCTGAGGAGCAGG GTGACTATCAGCGTGGATAAGTCTAAAACCCAGT TCAGTCTCAAACCTGAGTAGTGTGACTGCCGCGG ACACGGCAGTGTATTATTGCGCCCCGGGACCGCCT TTATTTTCGCTTCTGGGGGGCAGGGCACTTTGGTG ACCGTCAGTAGC
36	2#8890 VL 核苷酸序列	GAGATTGTCATGACACAGAGTCCTGCTACCTTGT CAGTTAGTCCTGGGGAGAGAGCAAACTGTCTT GCCGCGCTAGCCAAAAGTGTTAGCTCCAACCTGG CCTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCACCCA GACTCCTGATTACGGAGCCTCTACACGCGCAAC TGGAATCCCTGACCGGTTCTCAGGATCCGGGAG TGGCACGGAATTCACCTTGACCATTAGCAGCCTG GAATCCGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGC AGTACAACAACCTGGCCTATCACGTTCCGGGCAGGG GACCAGATTGGAATCAAG
37	IgG1 重链恒定区核苷酸序列	GCATCTACTAAAGGCCCAAGTGTTTTTCTCTGG CCCCATCCTCAAAAAGCACCTCCGGAGGCACAG CTGCGCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTATTTCCC TGAACCTGTTACCGTGTCATGGAACAGCGGCGCT CTCACTTCTGGCGTGACACATTTCCCGCTGTGT TGCAGTCCAGCGGACTCTATAGCCTGAGCTCCGT GGTTACAGTGCCCTCTTCATCTTTGGGCACCCAG ACCTACATATGCAATGTGAATCATAAACCGAGCA ATACCAAGGTAGATAAAAAGGTAGAGCCAAAAAG TTGCGATAAGACTCATAACATGCCACCTTGTCTT GCCCCGGAGCTGCTCGGAGGACCAAGCGTGTTT CTCTTCCCCCCCCAAGCCAAAGGATACCTTGATGA TTAGTCGCACCCCAGAAGTGACATGCGTGGTGG TTGACGTCAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TTAATTGGTACGTGGACGGTGTGGAAGTCCACAA TGCAAAAACCAAGCCTCGCGAAGAACAGTATAAC AGTACCTACAGGGTCGTGAGTGTCTGACCGTGC TGCACCAGGACTGGCTCAATGGAAAGGAATACAA GTGTAAGGTCTCCAACAAGGCCTTGCCAGCTCCC ATTGAAAAGACCATTAGCAAGGCCAAAGGTCAGC CTCGCGAACCACAAGTGTACACACTGCCTCCGTC ACGCGATGAACTTACCAAAAATCAGGTATCACTG ACCTGCCTTGTAAGGGCTTTTACCCGAGTGACA TAGCAGTCGAGTGGGAATCCAACGGTCAGCCGG AGAACAACCTATAAAACCACTCCCCAGTGCTTGA TTCCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGTAACTG ACTGTGGATAAGTCTCGCTGGCAGCAGGGCAAT GTGTTTTCTTGCTCTGTCATGCACGAGGCACTTC ACAACCACTACACACAGAAAAGTCTCAGTCTGAG TCCAGGGAAA

38	人轻链 κ 恒定区核苷酸序列	AGAACAGTGGCCGCACCAAGCGTGTTTATCTTTC CTCCCTCTGACGAACAATTGAAGAGTGGGACCG CCTCAGTGGTGTGTCTGCTGAACAATTTCTACCC CCGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAGGTGGATAA TGCACTCCAGTCCGGGAATAGTCAGGAAAGCGT GACTGAGCAAGACAGCAAAGACTCTACATATTCT CTGTCCAGTACCCTGACCCTCAGCAAGGCTGATT ATGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTCA CTCACCAGGGACTGAGTTCACCGGTCACTAAAA GCTTTAACAGAGGAGAGTGC
39	突变的 IgG1 重链恒定区核苷酸序列	GCCTCTACAAAAGGACCATCAGTCTTTCCATTGG CTCCGAGTAGCAAAAGCACCAGCGGTGGAACAG CTGCTCTGGGGTGCCTGGTCAAGGACTATTTCCC CGAGCCTGTGACCGTCTCTTGGAACAGCGGGGC ACTGACCTCCGGTGTCCATACATTTCTGCAGTG CTGCAAAGTTCTGGATTGTATTCACTCTCCTCTG TCGTGACGGTTCCTAGTTCATCCCTGGGACCCA GACTTATATTTGCAATGTCAACCACAAACCCAGC AATACTAAAGTGGATAAGAAGGTGCAACCCAAGT CTTGCGATAAGACACACACATGCCCTCCTTGTC CGCACCAGAGGCTGCTGGAGCACCATCAGTGTT TCTTTTCCCACCTAAGCCCAAGGATACACTGATG ATTAGTCGCACACCCGAAGTGACATGCGTCGTCG TAGACGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAAT TTAAGTGGTACGTGGATGGAGTGGAGGTACATAA TGCAAAGACAAAACCCCGAGAAGAGCAGTACAA CAGCACTTACAGGGTGGTGTCCGTTCTGACAGTC CTGCATCAGGATTGGCTTAACGGTAAAGAATATA AGTGTAAGTTAGTAATAAGGCCCTGCCCGCCCC CATTGAGAAGACTATTAGTAAGGCCAAGGGACAG CCCAGGGAACCTCAGGTGTATACCCTGCCACCCT CCCGGGACGAACTGACAAAAAATCAGGTATCATT GACCTGCCTCGTGAAGGGCTTTTATCCCTCAGAT ATAGCCGTGGAATGGGAGTCAAATGGCCAGCCT GAGAACAATTACAAGACTACGCCTCCCGTGCTGG ATTCTGATGGATCATTTTTTCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGGAAC GTGTTCTCTTGCTCCGTGATGCACGAGGCACTTC ATAACCATTATACCCAAAAGTCTCTCTCACTGTCC CCCGGCAAA
40	2#的重链氨基酸序列	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSNSSSNWW TWVRQSPGKGLEWIGEISPTGFTSYSPSLKSRVTIS VDKSKTQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRLYFDW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

		KTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	2#的轻链氨基酸序列	EIVMTQSPATLSVSPGKRATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDEAVYYCQQYNNWPITFGQGTRLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
42	2#8890 的重链氨基酸序列	QVQLQESGPGLVQPSGTLSTCAVSGGSDSSTNWW TWVRQSPGQGLEWIGEISPIGFTSYSPSLRSRVTISV DKSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLYFAFWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	2#8890 的轻链氨基酸序列	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTEFT LTISSLESEDEAVYYCQQYNNWPITFGQGTRLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

本文中所使用的缩写具有以下含义：

缩写	含义
CDR	免疫球蛋白可变区中的互补决定区
FR	抗体构架区：抗体可变区中除CDR残基以外的氨基酸残基
VH	抗体重链可变区
VL	抗体轻链可变区
IgG	免疫球蛋白G
IMGT	基于由 Lefranc 等人发起的国际免疫遗传学信息系统 (The international ImMunoGeneTics information system® (IMGT))的编号系统，可参阅Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003。
Kabat	由Elvin A. Kabat提出的免疫球蛋白比对及编号系统 (参见，例如 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.,

	1991)。
Chothia	由Chothia等人提出的免疫球蛋白编号系统，其是基于结构环区的位置鉴定CDR区边界的经典规则(参见，例如Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人 (1989) Nature 342:878-883)。
AbM	CDR定义方式，来源于Martin的相关研究(Martin ACR,Cheetham JC,Rees AR(1989)Modelling antibody hypervariable loops:A combined algorithm.Proc Natl Acad Sci USA 86:9268–9272)。
mAb	单克隆抗体
EC ₅₀	产生50%功效或结合的浓度
IC ₅₀	产生50%抑制的浓度
ELISA	酶联免疫吸附测定
PCR	聚合酶链式反应
HRP	辣根过氧化物酶
K _D	平衡解离常数
K _a	结合速率常数
K _d	解离速率常数
ADCC	抗体依赖性细胞介导的细胞毒性
CDC	补体依赖的细胞毒性
FACS	流式细胞仪技术
CDR-H1	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区1
CDR-H2	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区2
CDR-H3	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区3
CDR-L1	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区1
CDR-L2	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区2
CDR-L3	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区3

缩写	含义	缩写	含义
HATU	N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)六氟磷酸脒	HOBt	1-羟基苯并三唑

DIPEA	二异丙基乙基胺	EDCI	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐
TFA	三氟乙酸	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
Pd/C	钯碳	DMTMM	4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐
NBS	N-溴代丁二酰亚胺	IPA	异丙醇
NaIO₄	高碘酸钠	RuCl₃.H₂O	三氯化钌水合物
XPhos Pd G3	甲烷磺酸(2-二环己基膦基-2',4',6'-三-异丙基-1,1'-联苯基)(2'-氨基-1,1'-联苯-2-基)钯(II)	LiOH.H₂O	氢氧化锂水合物
K₃PO₄	磷酸钾	m-CPBA	间氯过氧苯甲酸
THF	四氢呋喃	DMSO	二甲亚砜
DCM	二氯甲烷	MeOH	甲醇
HPLC	高效液相色谱	LC-MS	液质联用色谱
TCEP	(三(2-羧乙基)膦	Na₂HPO₄	磷酸氢二钠
EDTA	乙二胺四乙酸	PB	磷酸盐缓冲液
DAR	药物载荷比		

以下的实施例中记载的化合物的结构通过核磁共振(¹H NMR)或质谱(MS)来确定。

核磁共振(¹H NMR)的测定使用 **Bruker 400 MHz** 核磁共振仪；氘代试剂为六氘代二甲基亚砜(**DMSO-d₆**)；内标物质为四甲基硅烷(**TMS**)。

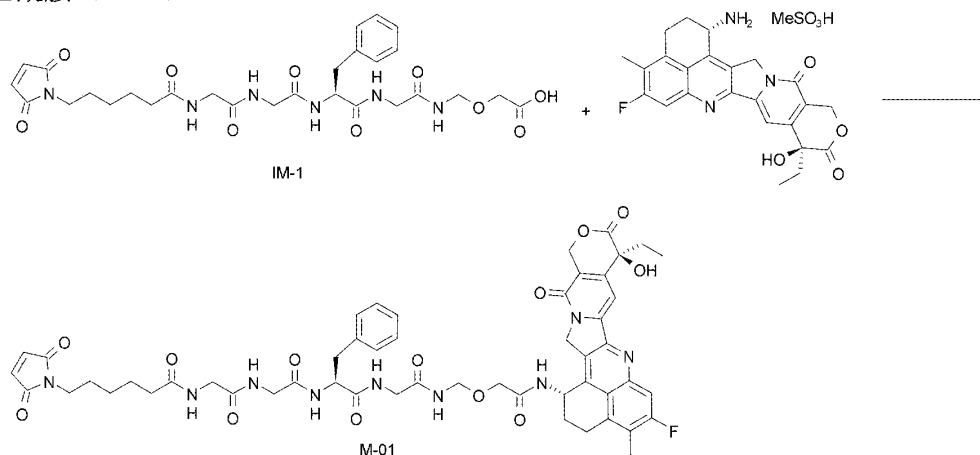
实施例中使用的核磁共振(NMR)图谱中的缩写示于以下。

- 5 **s**: 单峰(**singlet**)、**d**: 二重峰(**doublet**)、**t**: 三重峰(**triplet**)、**q**: 四重峰(**quartet**)、**m**: 多重峰(**multiplet**)、**br**: 宽峰(**broad**)、**J**: 偶合常数、**Hz**: 赫兹、**DMSO-d₆**: 氘化二甲基亚砜。**δ** 值用 **ppm** 值表示。

质谱(MS)的测定使用 **Agilent (ESI)** 质谱仪，型号为 **Agilent 6120B**。

- 10 实施例一 **N-((S)-10-苄基-1-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1-H-吡咯-**

1-基)己酰胺 (M-01)



将化合物 IM-1 (0.40 g, 640.59 μmol , 其合成参考专利 CN 111936169A)、依喜替康甲磺酸盐 (0.37 g, 704.65 μmol) 溶于 DMF (8 mL) 中, 加入 HATU (0.32 g, 832.77 μmol) 和 DIPEA (0.25 g, 1.92 mmol), 25°C 反应 4 小时。减压除去 DIPEA 并加水冷冻干燥以除去大部分 DMF 得到粗品, 粗品用制备高效液相色谱纯化 (条件如下) 得 M-01 化合物 273 mg。

色谱柱: Waters XBridge Prep C18 OBD 45 mm×450 mm×8.0 μm

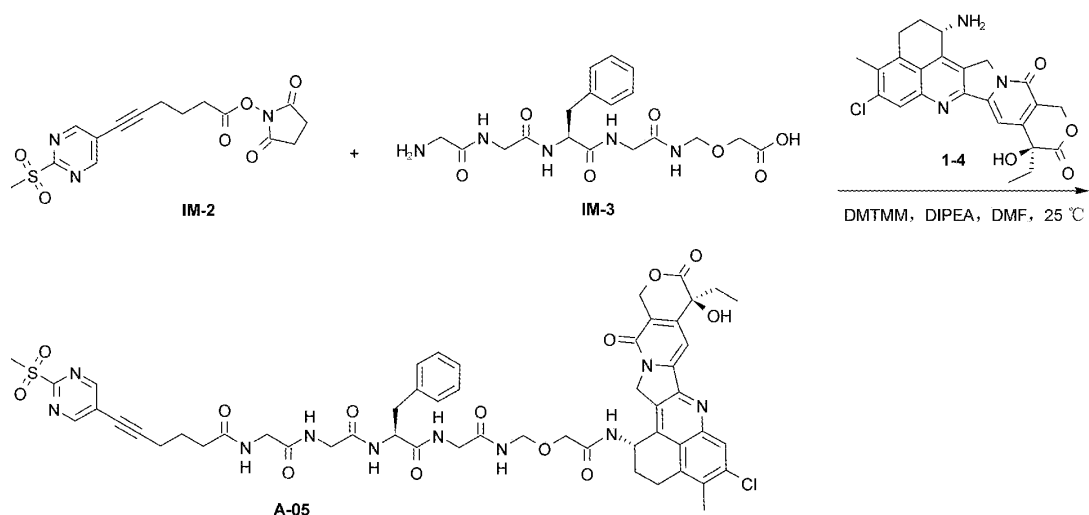
流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%三氟乙酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	70
5.00	30	70	70
60.00	70	30	70

M-01 结构表征数据如下:

ESI-MS (m/z): 1034.4[M+H]⁺.

实施例二 N-((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吲哚利啉[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧基-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)-6-(2-(甲基磺基)嘧啶-5-基)己-5-酰胺 (A-05)



氮气保护下，将 2,5-二氧吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己基-5-炔酸酯(IM-2, 0.66 g, 1.80 mmol)和(R)-16-氨基-10-苄基-6,9,12,15-四氧-3-氧-5,8,11,14-四氮杂十六酸(IM-3, 0.75 g, 1.77 mmol)加入 DMF (19 mL)中，升温至 35°C反应 16 小时后向该体系中加入

5 (1S, 9S)-1-氨基-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-10,13-二酮(1-4, 1.00 g, 1.77 mmol)，冰水降温至 5~15°C，加入 DMTMM (0.98 g, 3.53 mmol)，再滴入 DIPEA (1.14 g, 8.84 mmol)，25°C反应 16 小时。将反应液倒入 DCM(600 mL)、IPA(60 mL)、水(100 mL)混合液中搅拌 10 分钟，分出 DCM 相，盐水(100ml)洗，浓缩得到粗品，用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 A-05 化合物

10 0.98 g。

A-05 分离纯化方法如下：

色谱柱：Waters SunFire Prep C18 OBD (5 μm *19 mm*150 mm)

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	24
2.00	30	70	24
18.00	80	20	24

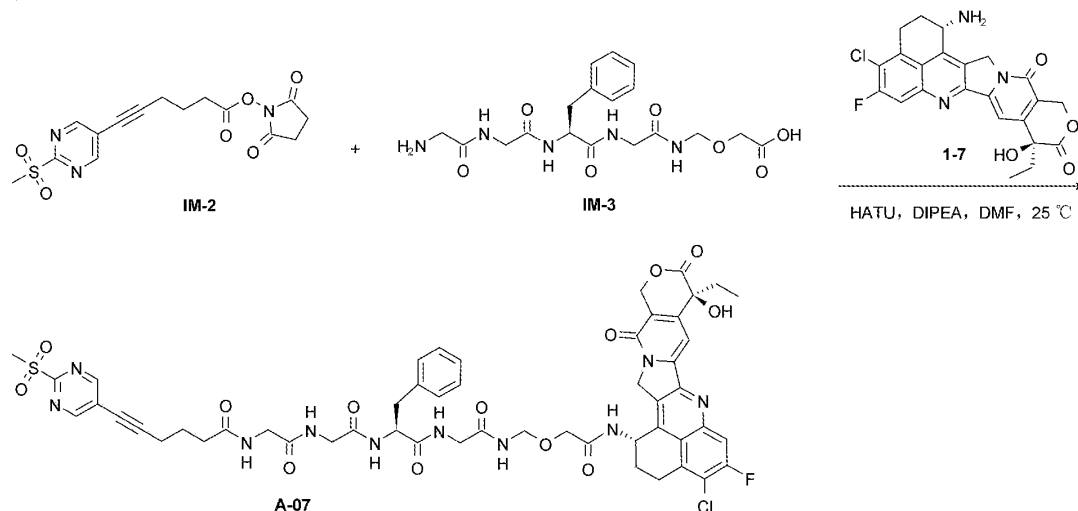
A-05 结构表征数据如下：

15 MS m/z (ESI): 1107.3 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.10 (s, 2H), 8.66 - 8.63 (m, 1H), 8.51 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.34 - 8.31 (m, 1H), 8.21 - 8.19 (m, 1H), 8.17 - 8.09 (m, 2H), 8.08 - 8.04 (m, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.26 - 7.15 (m, 5H), 6.55 (s, 1H), 5.56 - 5.55 (m, 1H), 5.48 - 5.35 (m, 2H), 5.25 - 5.10 (m, 2H), 4.64 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 4.45 - 4.44 (m, 1H), 4.06 - 3.98 (m, 2H), 3.77 - 3.52 (m, 6H), 3.41 (

s, 3H), 3.25 - 3.12 (m, 2H), 3.03 - 3.00 (m, 1H), 2.83 - 2.72 (m, 1H), 2.58 - 2.56 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.33 - 2.30 (m, 2H), 2.21 - 2.13 (m, 2H), 1.91 - 1.76 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

实施例三 N-((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-5-氟-9-乙基-9-羟基-4-氯-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吡啶利嗪[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧基-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)-6-(2-(甲基磺基)嘧啶-5-基)己-5-酰胺 (A-07)



氮气保护下, 将 2,5-二氧吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己基-5-炔酸酯(IM-2, 21.6 mg, 0.059 mmol)和(R)-16-氨基-10-苄基-6,9,12,15-四氧-3-氧-5,8,11,14-四氮杂十六酸 (IM-3, 24.5 mg, 0.058 mmol)加入 DMF (1 mL)中, 升温至 35°C反应 16 小时后, 向该体系中加入(1S, 9S)-1-氨基-5-氟-9-乙基-9-羟基-4-氯-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吡啶利嗪[1,2-b]喹啉-10,13-二酮三氟乙酸盐(30.0 mg, 0.053 mmol), HATU (30 mg, 0.079 mmol)和 DIPEA (27.2 mg, 0.21 mmol), 反应体系于 25°C反应 16 小时。反应液直接用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 A-07 化合物 26.4 mg。

A-07 分离纯化方法如下:

色谱柱: SunFire Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0 μm

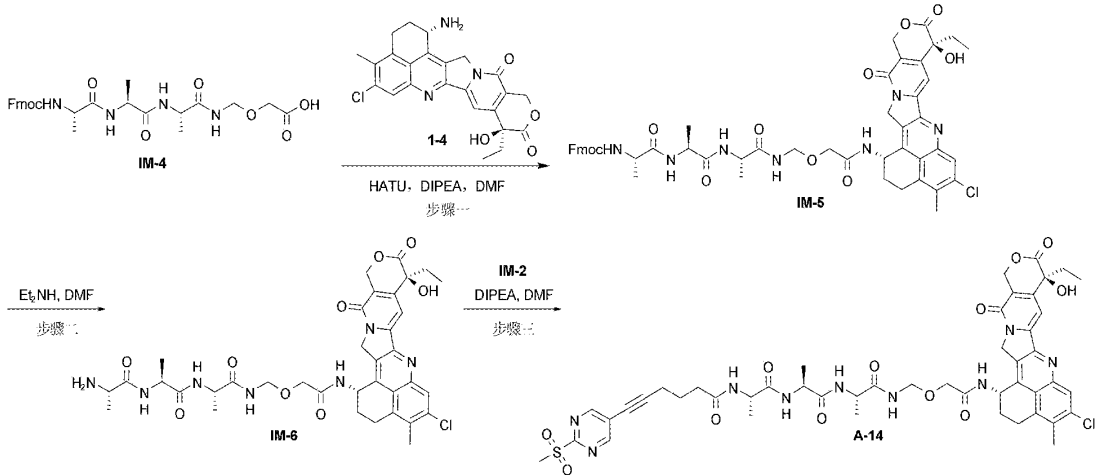
流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0	30	70	28
2	30	70	28
18	90	10	28

A-07 结构表征数据如下:

ESI-MS (m/z):1111.3[M+H]⁺.

实施例四 N-((7S,10S,13S)-1-(((1S, 9S)-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-7,10-二甲基-1,6,9,12-四氧-3-氧-5,8,11-三氮十四烷-13-基)-6-(2-(甲基磺基)嘧啶-5-基)己-5-酰胺 (A-14)



5

步骤一:

将化合物 IM-4 (657 mg, 1.22 mmol)和化合物 1-4 (500 mg, 1.11 mmol)溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (10 mL)中, 随后加入 HATU (630.67 mg, 1.66 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (428 mg, 3.32 mmol), 室温搅拌 1 小时。反应完毕后, 反应液直接用制备高效液相色谱纯化后
10 冷冻干燥得 IM-5 化合物 700 mg。

其制备方法如下:

色谱柱: Waters SunFire Prep C18 OBD (5 μ m*19 mm*150 mm)

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
2.00	30	70	28
18.00	90	10	28

15

步骤二:

将化合物 IM-5 (500 mg, 0.513 mmol)溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL)中, 加入二乙胺 (75.05 mg, 1.03 mmol), 室温反应 1 小时。反应结束后, 反应液直接用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 IM-6 化合物 307 mg。

其制备方法如下:

色谱柱: Waters SunFire Prep C18 OBD (5 μm*19 mm*150 mm)

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	20	80	24
2.00	20	80	24
18.00	80	20	24

步骤三:

- 5 将 IM-6 (170 mg, 0.226 mmol)和化合物 IM-2 (90.83 mg, 0.249 mmol)、溶解在 N,N-二甲基甲酰胺(10 mL), 加入 N,N-二异丙基乙胺 (29.21 mg, 0.226 mmol)。反应液在室温条件下搅拌 16 小时。反应液直接用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 A-14 化合物 50.56 mg。

其结构表征数据如下:

MS m/z (ESI): 1002.4 [M+H]⁺

- 10 其制备方法如下:

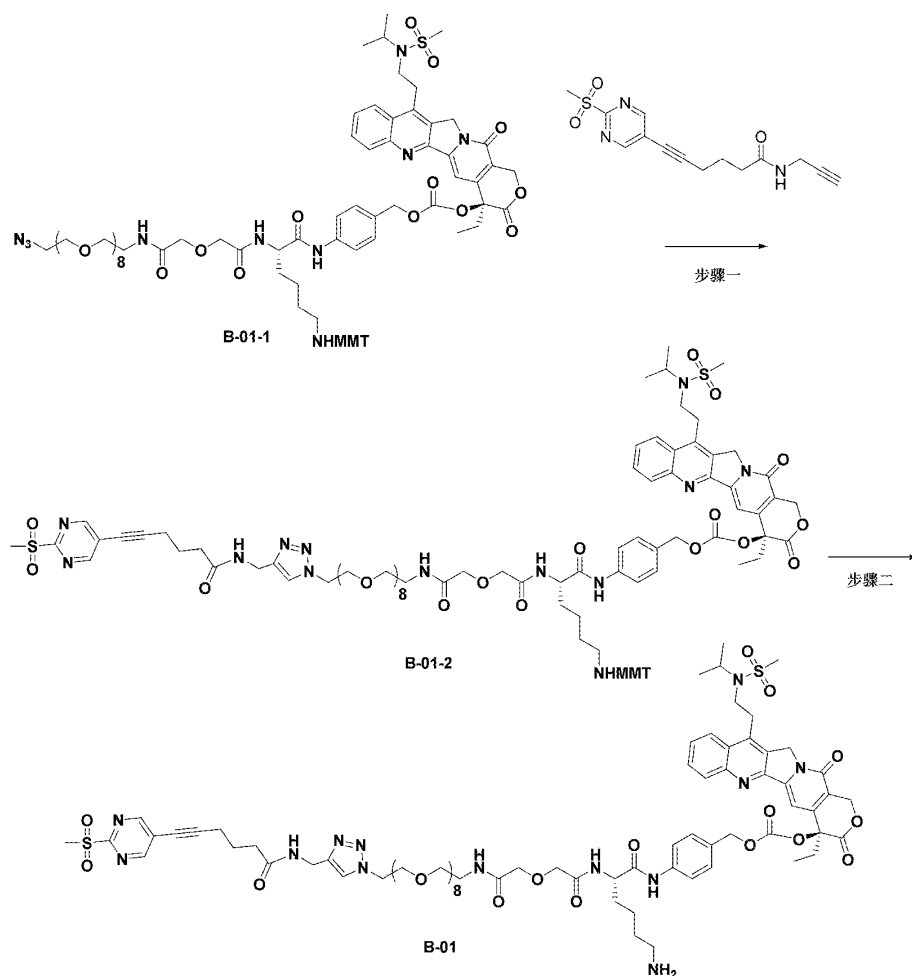
色谱柱: Waters SunFire Prep C18 OBD (5 μm*19 mm*150 mm)

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
2.00	30	70	28
18.00	90	10	28

- 15 ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.11 (s, 2H), 8.68 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.10 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.65-5.55 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.67-4.55 (m, 2H), 4.29-4.15 (m, 3H), 3.98 (s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.25-3.15 (m, 2H), 2.57-2.56 (m, 2H), 2.35-2.27 (m, 2H), 2.22-2.12 (m, 2H), 1.91-1.75 (m, 4H), 1.23-1.09 (m, 9H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

- 20 实施例五 4-((S)-2-(4-氨基丁基)-35-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)苄基((S)-4-乙基-11-(2-(N-异丙基甲基磺酰胺基)乙基)-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-4-基)碳酸酯的合成 (B-01)



步骤一:

室温下, 将化合物 B-01-1 (413.40 mg, 0.251 mmol, 其合成参考专利 CN111295389B) 溶于二甲基亚砜和水 (2.0 mL: 0.5 mL) 中, 加入溴化亚铜 (72.95 mg, 0.503 mmol) 和 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)-N-(丙-2-炔-1-基)-己-5-炔酰胺 (95.10 mg, 0.302 mmol), 搅拌反应 1 h 后过滤, 滤液经制备高效液相色谱纯化 (条件如下), 得 B-01-2 化合物 30.00 mg。

色谱柱: SunFire Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0 μm

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	40	60	28
8.00	40	60	28
50.00	90	10	28

步骤二:

10 将化合物 B-01-2 (30.00 mg, 0.02 mmol) 溶于二氯甲烷 (1.0 mL) 反应液中加入三氟

乙酸（0.2 mL），室温反应 30 min。反应液减压浓缩后经制备高效液相色谱纯化（条件如下），得 B-01 化合物的三氟乙酸盐 20.00 mg。

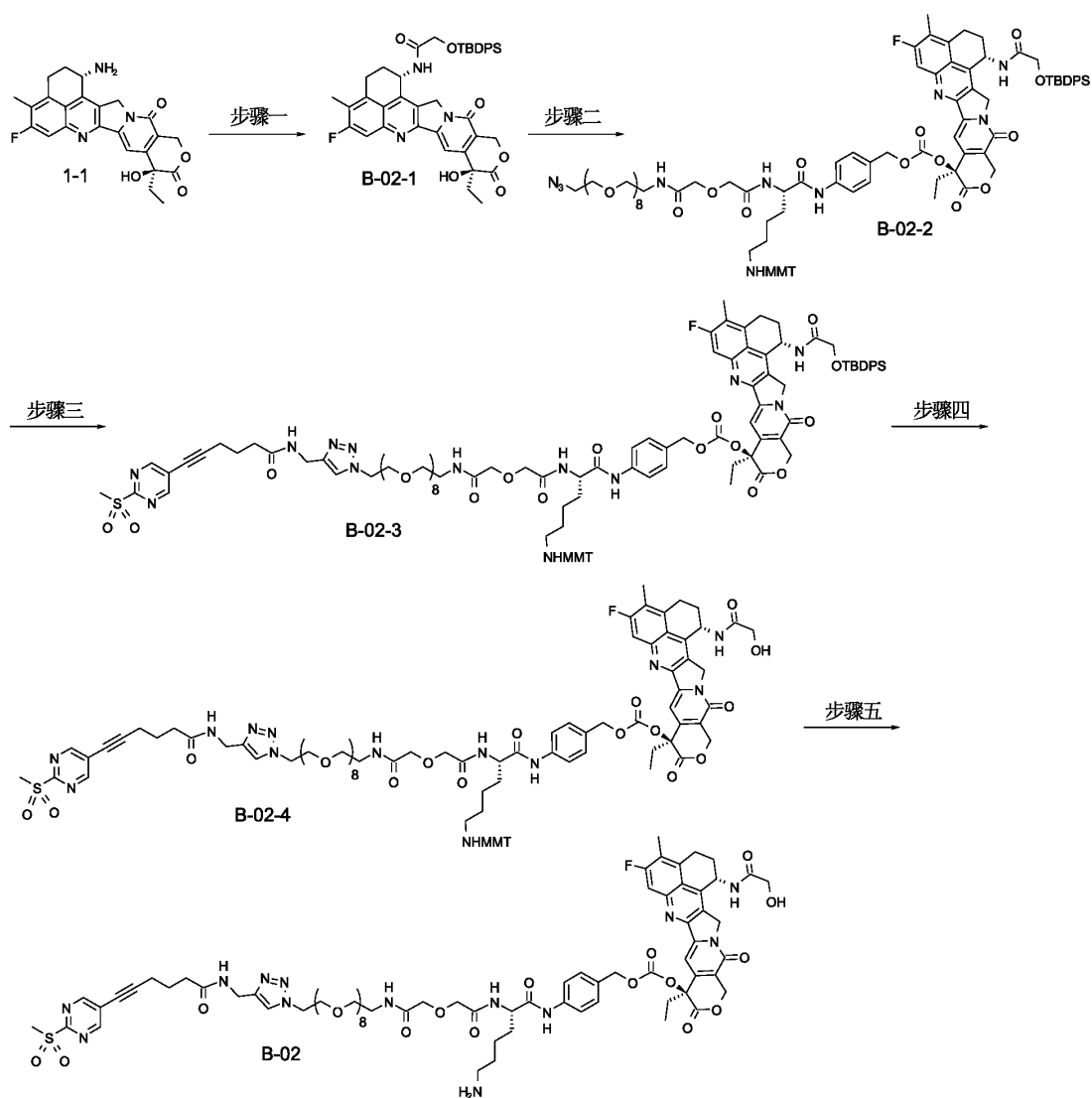
色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0 μm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%三氟乙酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	15	85	28
8.00	15	85	28
50.00	60	40	28

5 结构表征数据如下：ESI-MS (m/z):1631.7[M+H]⁺, 816.0[M/2+H]⁺。

实施例六 4-((S)-2-(4-氨基丁基)-35-(4-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧基-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)苄基((1S,9R)-9-乙基-5-氟-1-(2-羟基乙酰胺基)-4-甲基-10,13-二氧基-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-9-基)碳酸酯（B-02）



步骤一:

25°C下, 将 1-1 的甲磺酸盐 (30.00 mg, 56.44 μmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (1 mL) 中, 依次加入 1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐 (58.74 mg, 112.88 μmol)、N,N-二异丙基乙胺 (43.76 mg, 338.63 μmol) 和 2-((叔丁基二苯基硅基)氧基)乙酸 (26.62 mg, 84.66 μmol), 保持 25°C 反应 1 小时, 用液质联用色谱监测反应, 反应完成后向反应液中加入水, 乙酸乙酯萃取, 有机相合并, 经硫酸钠干燥后减压浓缩, 粗品经薄层层析分离 (二氯甲烷: 甲醇=15:1) 得到 B-02-1 化合物 27.00 mg。

步骤二:

0°C下, 将 B-02-1 (20 mg, 27.33 μmol) 溶于二氯甲烷 (2 mL) 中, 依次加入 4-二甲氨基吡啶 (26.71 mg, 218.61 μmol) 和三光气 (8.11 mg, 27.33 μmol) 的二氯甲烷溶液 (0.5

- mL), 保持 0°C 反应 0.5 小时; 用氮气置换掉残余三光气后滴加入 (S)-2-(32-叠氮基-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-6-(((4-甲氧基苯基)二苯甲基)氨基)己酰胺 (43.46 mg, 40.99 μmol) 的二氯甲烷溶液 (1 mL), 保持 0°C 反应 0.5 小时; 用液质联用色谱监测反应, 反应完成后将反应液浓缩, 粗品经薄层层析
- 5 分离 (二氯甲烷: 甲醇=15:1) 纯化得到 B-02-2 化合物 30.00 mg。

步骤三:

- 25°C 下, 将 B-02-2 (250.00 mg, 137.51 μmol) 溶于 DMSO (2 mL) 和水 (0.4 mL) 混合溶剂中, 加入 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-N-(丙-2-炔-1-基)己-5-炔酰胺 (62.98 mg, 206.26 μmol) 和溴化亚铜 (39.45 mg, 275.01 μmol), 保持 25°C 反应 1 小时; 用液质联用色谱监
- 10 测反应; 反应完成后将反应液用制备高效液相色谱纯化 (条件如下), 制备液冻干得到 B-02-3 化合物 150.00 mg。

色谱柱: SunFire Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0 μm

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水 (0.05% 甲酸)

时间 [min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速 [mL/min]
0	15	85	28
18	90	10	28

步骤四:

- 25°C 下, 将 B-02-3 (150 mg, 49.45 μmol) 溶于四氢呋喃 (1 mL) 中, 滴加入四丁基氟化铵 (1M 四氢呋喃溶液) / 冰醋酸混合液 (v/v=13/1) (50 μL), 保持 25°C 反应 0.5 小时, 用液质联用色谱监测反应; 反应完成后将反应液用制备高效液相色谱纯化 (条件如下), 制备液冻干得到 B-02-4 化合物 50.00 mg。
- 15

色谱柱: SunFire Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0 μm

- 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水 (0.05% 甲酸)
- 20

时间 [min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速 [mL/min]
0	15	85	28
20	90	10	28

步骤五:

- 25°C 下, 将 B-02-4 (50 mg, 26.52 μmol) 溶于二氯甲烷 (1 mL) 中, 加入三氟乙酸 (60.49 mg, 530.49 μmol), 保持 25°C 反应 0.5 小时; 用液质联用色谱监测反应; 反应完成后将反应液浓缩, 粗品用制备高效液相色谱纯化 (条件如下), 制备液冻干得到 B-02
- 25 化合物 23.69 mg。

色谱柱:SunFire Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0 μm

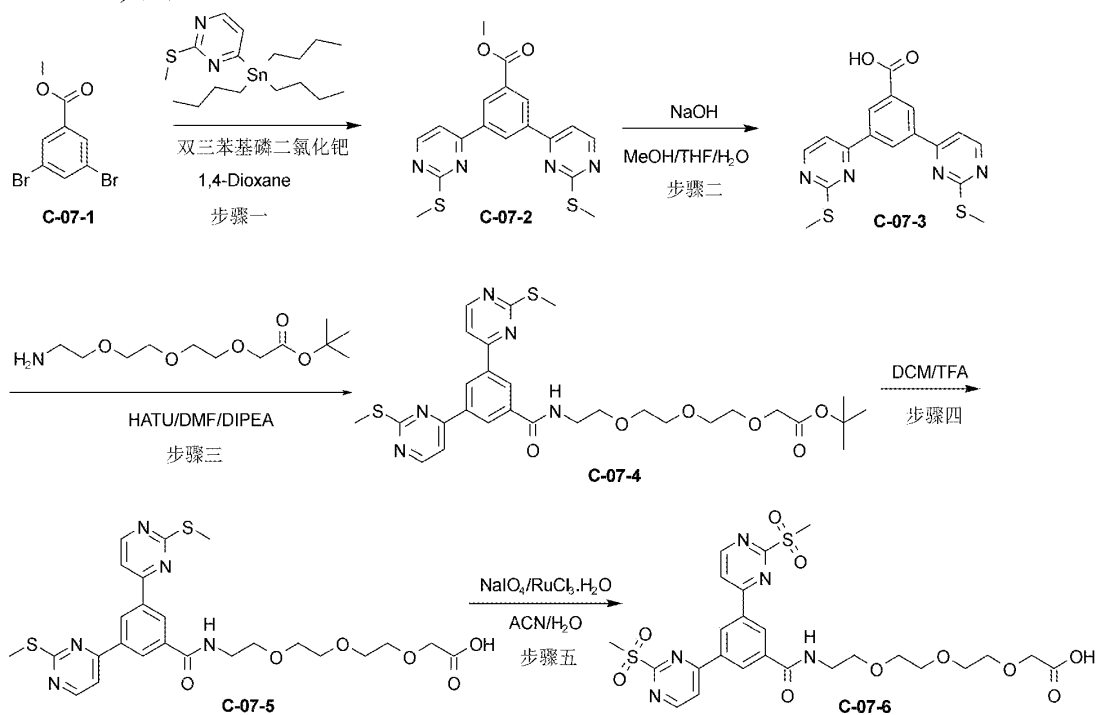
流动相 A:乙腈; 流动相 B:水 (0.05%甲酸)

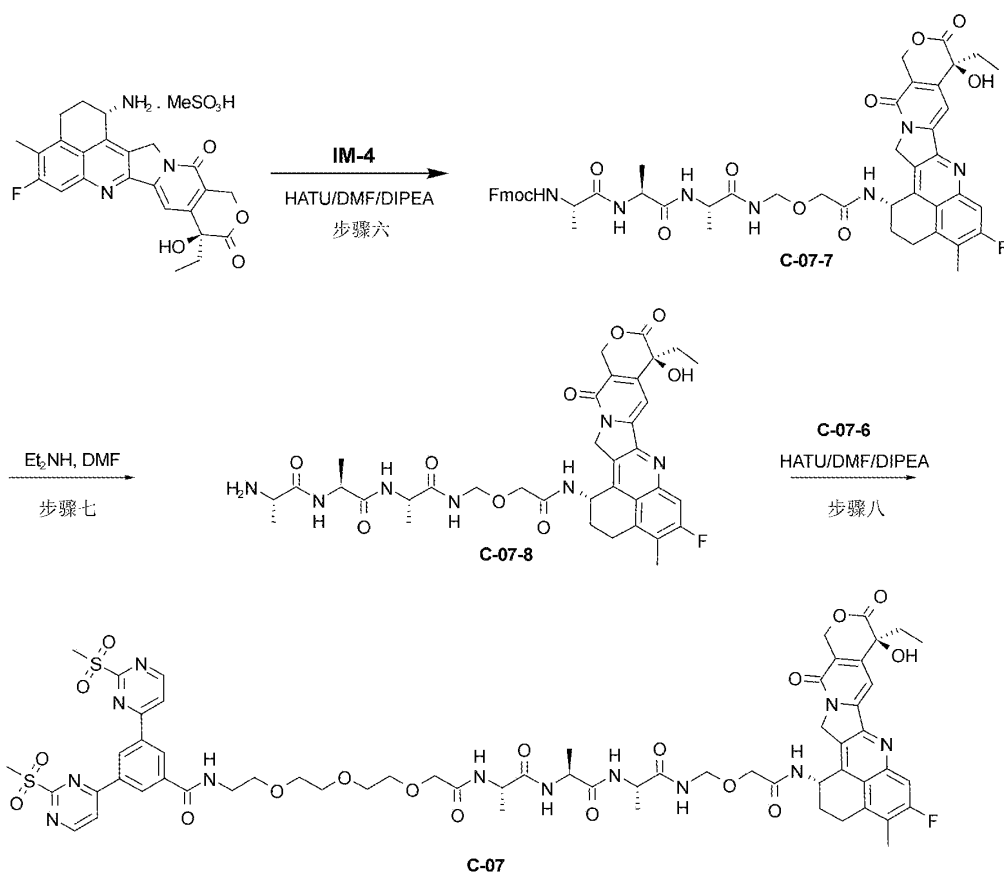
时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0	15	85	28
18	90	10	28

B-02 结构表征数据如下:

ESI-MS (m/z):1613.6[M+H]⁺.

- 5 实施例七 N-((7S,10S,13S)-1-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]呋啉[1,2-b]噻啉-1-基)胺基)-7,10,13-三甲基-1,6,9,12,15-五氧-3,17,20,23-四氧-5,8,11,14-四氮五碳烷-25-基)-3,5-双(2-(甲基磺基)嘧啶-4-基)苯酰胺 (C-07)





步骤一:

将原料 C-07-1 (4.80 g, 16.33 mmol)、三丁基 (2-甲基磺胺基嘧啶-4-基) 锡 (16.27 g, 39.19 mmol) 和双三苯基磷二氯化钯 (2.29 g, 3.27 mmol) 溶于 1, 4-二氧六环(100 mL) 中, 反应体系在氮气氛围下于 110°C 搅拌反应 5 小时, LC-MS 监控反应, 浓缩反应体系, 经柱层析纯化 (EA/PE=0-50%) 得 C-07-2 化合物 1.36 g。

步骤二:

将化合物 C-07-2 (510 mg, 1.33 mol)、NaOH (212.24 mg, 5.31 mmol) 溶于 THF (12.5 mL)、MeOH (12.5 mL) 和 H₂O (2.5 mL) 中。25°C 搅拌反应 2 小时, LC-MS 监控反应, 用 3N HCl 调节体系 pH 约为 2, 析出大量固体, 过滤, 收集滤饼, 干燥, 得到 C-07-3 化合物 380 mg。

步骤三:

将化合物 C-07-3 (315 mg, 850.32 μmol)、2-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基乙酸叔丁酯(246.31 mg, 935.35 μmol)、HATU (484.99 mg, 1.28 mmol), DIPEA (329.69 mg, 2.55 mmol) 加到 DMF (3 mL) 中, 25°C 反应 2h。LC-MS 监控反应。反应液用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-07-3 化合物 40 mg。

其制备方法如下:

色谱柱: **Waters XBridge Prep C18OBD (5 μ m*19mm*150 mm)**

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	55	45	24
2.00	55	45	24
18.00	100	0	24

步骤四:

- 5 将化合物 **C-07-4 (40 mg, 64.96 μ mol)**溶于 **DCM(3 mL)**和 **TFA(1.5 mL)**中, **25°C**反应 **1.5 小时**, **LC-MS** 监控反应, 浓缩反应体系至干得 **C-07-5 化合物 36 mg**。

步骤五:

- 10 将化合物 **C-07-5 (26 mg, 46.46 μ mol)**、高碘酸钠 (**99.37 mg, 464.57 μ mol**)、**RuCl₃•H₂O (9.64 mg, 46.46 μ mol)**, 溶于 **ACN(15 mL)**和水(**7.5 mL**)中, **25°C**反应 **40 分钟**, **LC-MS** 监控反应, 加入水和乙酸乙酯萃取, 乙酸乙酯层浓缩得 **C-07-6 化合物 28 mg**。

步骤六:

- 15 将化合物依喜替康甲磺酸盐 (**600 mg, 1.13 mmol**)、**(5S, 8S, 11S) -1- (9H-芴-9-基) -5,8,11-三甲基-3,6,9,12-四氧基-2,15-二氧基-4,7,10,13-四氮杂庚烷-17-酸 (IM-4, 610.17 mg, 1.13 mmol)**、**HATU (643.81mg, 1.69 mmol)**, **DIPEA (437.65 mg, 3.39 mmol)** 加到 **DMF (6 mL)** 中, **25°C**反应 **16h**。**LC-MS** 监控反应。向反应液中加入水, 析出大量固体, 过滤, 收集固体, **DCM** 溶解固体, 浓缩得粗品, 经柱层析纯化 (**DCM/MeOH=0-10%**), 得 **C-07-7 化合物 660mg**。

步骤七:

- 20 将化合物 **C-07-7 (660 mg, 688.94 μ mmol)**溶于 **N,N-二甲基甲酰胺 (6 mL)**中, 加入二乙胺 (**251.94 mg, 3.44 mmol**), 室温反应 **1 小时**。反应结束后, 反应液直接用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 **C-07-8 化合物 325 mg**。

其制备方法如下:

色谱柱: **Waters SunFire Prep C18 OBD (5 μ m*19 mm*150 mm)**

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	10	90	28
4.00	10	90	28
20.00	90	10	28

步骤八：

将化合物 C-07-6 (15.95 mg, 25.58 μmol)、C-07-8 (20 mg, 25.58 μmol)、HATU (14.59 mg, 38.37 μmol)，DIPEA (9.92 mg, 76.75 μmol) 加到 DMF (3 mL) 中，25°C反应 2h。LC-

5 MS 监控反应。反应液用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-07 化合物 7 mg。

其结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1342.4 [M+H]⁺。

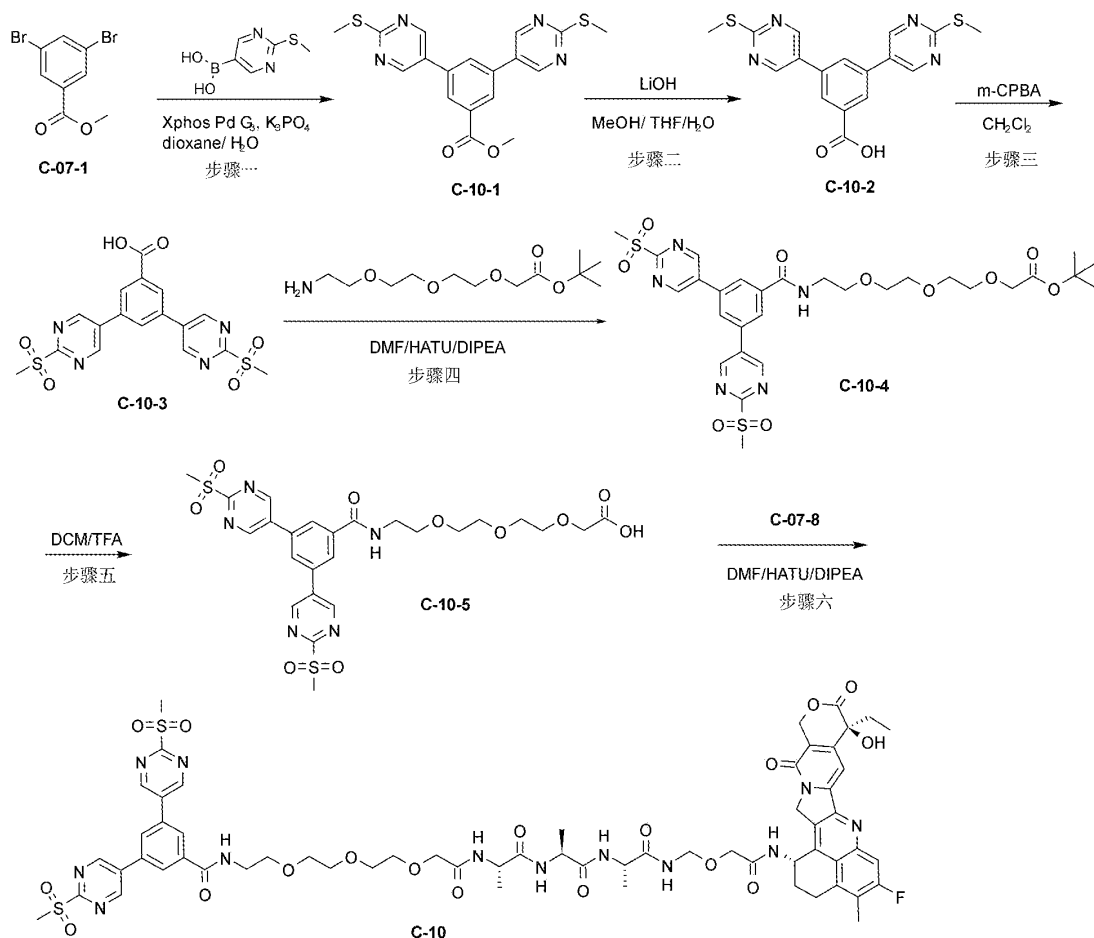
其制备方法如下：

色谱柱：Waters XBridge Prep C18OBD (5 μm*19mm*150 mm)

10 流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	20	80	24
2	20	80	24
18.00	90	10	24

实施例八 N-((7S,10S,13S)-1-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]呋喃[1,2-b]噻啉-1-基)胺基)-7,10,13-三甲基-1,6,9,12,15-五氧-3,17,20,23-四氧-5,8,11,14-四氮五碳烷-25-基)-3,5-双(2-(甲基磺基)嘧啶-5-基)苯酰胺 (C-10)



步骤一:

将原料 C-10-1 (720 mg, 2.45 mmol)、2-甲硫基嘧啶-5-硼酸 (874 mg, 5.14 mmol) XPhosPd G3 (207 mg, 245 μ mol)、K₃PO₄ (1.56 g, 7.35 mmol) 加到 dioxane (12 mL) and H₂O (4 mL) 中, 反应体系在氮气氛围下于 90°C 搅拌反应 3 小时, LC-MS 监控反应, 垫硅藻土过滤, 往滤液中加水和乙酸乙酯, 萃取, 浓缩, 得到粗品, 经柱层析纯化 (EA/PE=0-25%) 得到 C-10-1 化合物 710 mg。

步骤二:

将化合物 C-10-1 (650 mg, 1.69 mmol)、氢氧化锂 (121 mg, 5.07 mmol) 溶于 THF (2 mL)、MeOH (2 mL) 和 H₂O (2 mL) 中。25°C 搅拌反应 2 小时, LC-MS 监控反应, 用 1N HCl 调节体系 pH 约为 2, 析出大量固体, 过滤收集滤饼, 干燥得 C-10-2 化合物 560 mg。

步骤三:

将化合物 C-10-2 (450.80 mg, 1.22 mmol) 溶于 DCM (10 mL) 中, 将 m-CPBA (2.46 g, 12.1 mmol, 纯度为 85%) 加到反应体系中, 25°C 反应 12 小时, LC-MS 监控反应。氮气流吹

干溶剂得到粗品，粗品经制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-10-3 化合物 153mg。

其制备方法如下：

色谱柱：Phenomenex Luna C18 200*40mm*10um。

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%盐酸)

5 流动相：[water(HCl)-ACN]；B%：13%-43%，10min)。

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	13	87	25
10.00	43	57	25
18.00	90	10	25

步骤四：

将化合物 C-10-3 (140 mg, 322.25 μ mol)、2-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙氧基乙
酸叔丁酯(84.86 mg, 322.25 μ mol)、HATU (183.80 mg, 483.37 μ mol)，DIPEA (124.94 mg,
966.75 μ mol) 加到 DMF (4 mL) 中，25°C反应 2h。LC-MS 监控反应。反应液用制备高效
10 液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-10-4 化合物 51 mg。

其制备方法如下：

色谱柱：Waters XBridge Prep C18OBD (5 μ m*19mm*150 mm)

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	24
2.00	30	70	24
18.00	90	10	24

步骤五：

15 将化合物 C-10-4 (50 mg, 73.56 μ mol) 加到 DCM (2 mL) 和 TFA (1 mL) 中，25°C反应
1h，LC-MS 监控反应，浓缩反应体系至干得到 C-10-5 化合物 45 mg。

步骤六：

将化合物 C-10-5 (31.91 mg, 51.17 μ mol)、C-07-8(40 mg, 51.17 μ mol)、HATU (29.18 mg,
76.75 μ mol)，DIPEA (19.84 mg, 153.50 μ mol) 加到 DMF (3 mL) 中，25°C反应 2h。LC-MS
20 监控反应。反应液用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-10 化合物 13 mg。

其结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1342.5 [M+H]⁺。

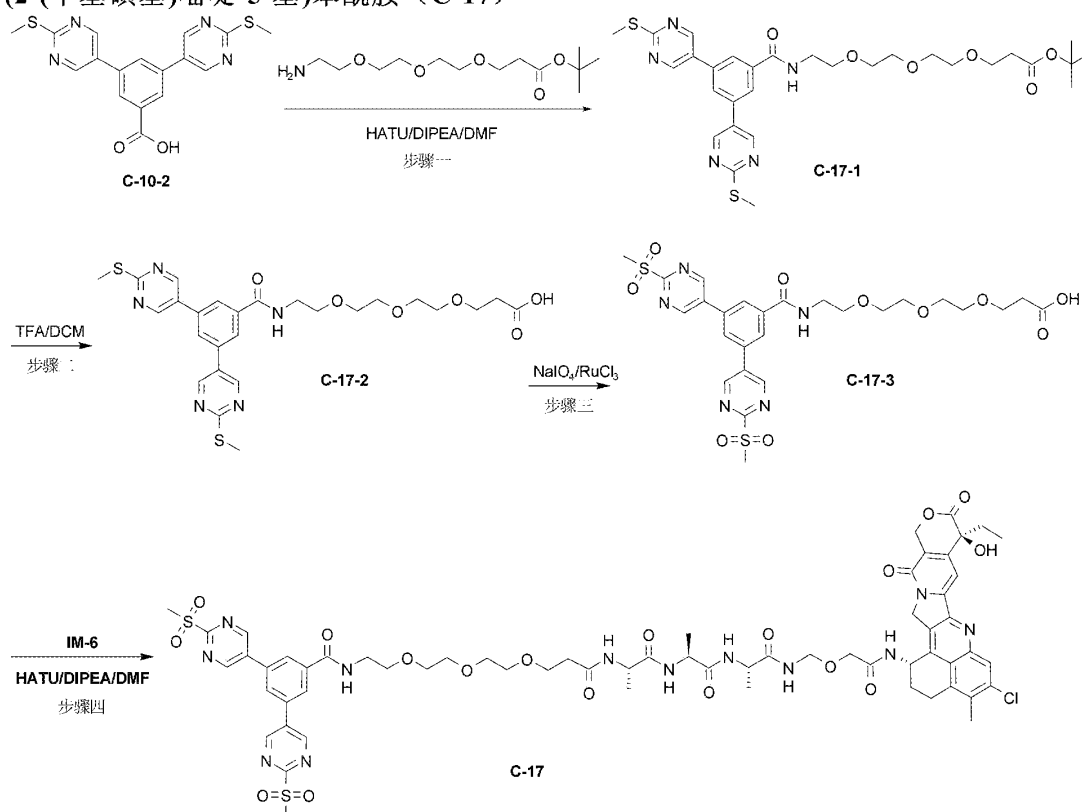
其制备方法如下：

色谱柱：Waters XBridge Prep C18OBD (5 μ m*19mm*150 mm)

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	20	80	24
2.00	20	80	24
18.00	90	10	24

实施例九 N-((7S,10S,13S)-1-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氯-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-1-基)胺基)-7,10,13-三甲基-1,6,9,12,15-五氧-3,17,20,23-四氧-5,8,11,14-四氮五碳烷-25-基)-3,5-双(2-(甲基磺基)嘧啶-5-基)苯酰胺 (C-17)



步骤一:

将 C-10-2 (3.00 g, 8.10 mmol) 和 3-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙氧基]-丙酸叔丁酯 (2.25 g, 8.10 mmol) 加入到 DMF (3 mL), 依次加入 HOBt (3.28 g, 24.3 mmol), EDCI (4.66 g, 24.3 mmol) 和 DIPEA (4.19 g, 32.4 mmol, 5.64 mL), 升至 60°C 反应 2 小时。向反应液中加入水 (50 mL), 用乙酸乙酯萃取 (30 mL x 3), 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得 C-17-1 粗品 (3.8 g, 4.75 mmol), 未经纯化直接用于下一步。

步骤二:

将 C-17-1 (3.40 g, 5.40 mmol) 溶于二氯甲烷 (30 mL)中, 加入三氟乙酸 (10.8 g, 94.2 mmol, 7 mL)。反应液 25°C 搅拌 2 小时。将反应液直接浓缩后, 经制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-17-2 (2.09 g, 3.64 mmol)。

其制备方法如下:

5 色谱柱: Phenomenex luna C18 (250 mm*70mm*10 μm)

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	30
22.00	60	40	30

步骤三:

将 C-17-2 (56 mg, 97.61 μmol)加到乙腈(6 mL)和水(3 mL)中, 再将高碘酸钠(208.79 mg, 976.15μmol) 和三氯化钨水合物 (8.10 mg, 39.05 μmol) 加到反应体系中, 25°C 搅拌反应 30 分钟, LC-MS 监控反应, 加入水和乙酸乙酯萃取, 浓缩得 C-17-3(60 mg)。

步骤四:

将 IM-6(20 mg, 25.06 μmol)、C-17-3(16mg, 25.06 μmol)、HATU (19.05 mg, 50.11 μmol)、DIPEA (16.19 mg, 125.28 μmol) 依次加入到 DMF (3 mL)中, 反应体系于 25°C 反应 1 小时。反应液直接用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-17(16 mg)。

15 其结构表征数据如下:

ESI-MS (m/z):1371.4 [M+H]⁺。

其制备方法如下:

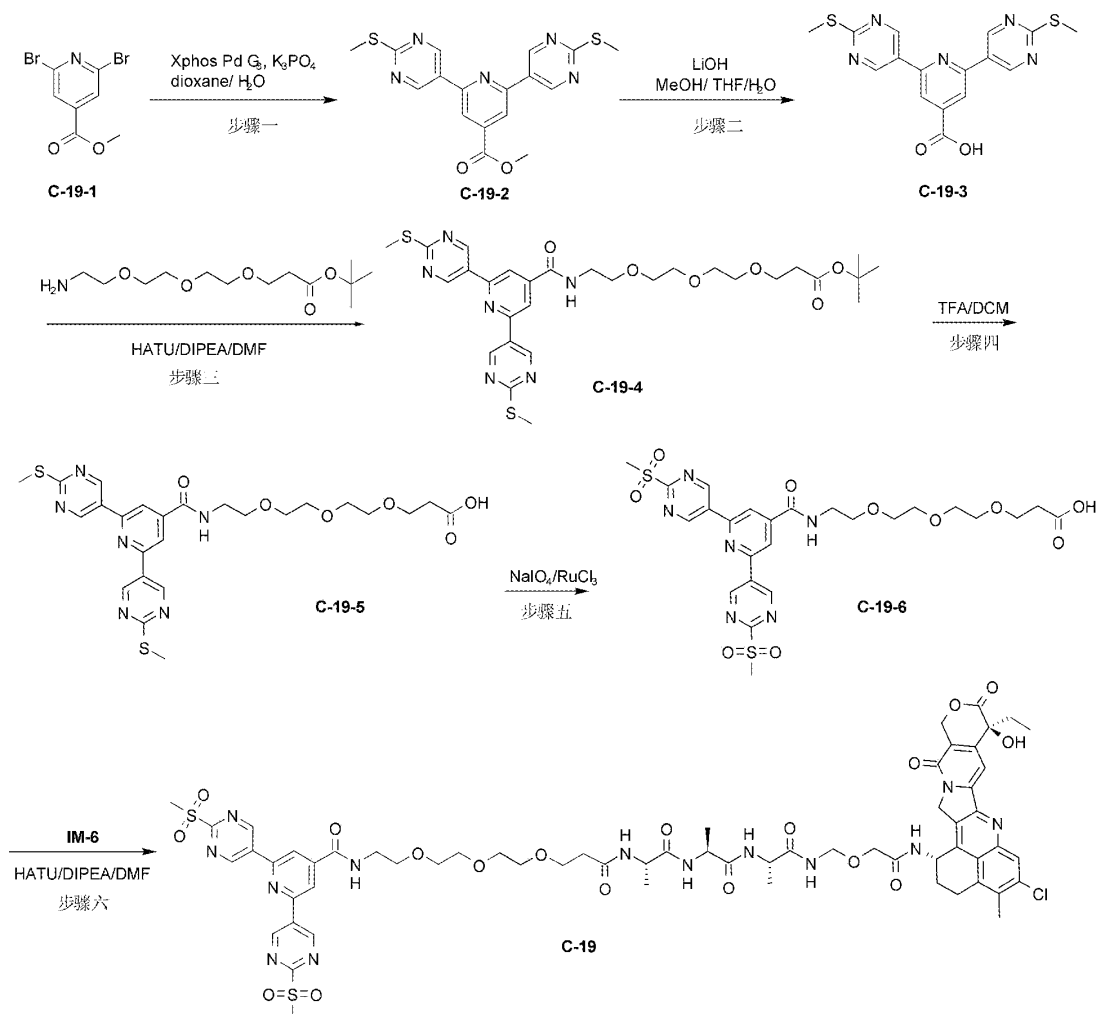
色谱柱: Waters XBridge Prep C18OBD (5 μm*19mm*150 mm)

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	20	80	30
2.00	20	80	30
18.00	80	20	30

20

实施例十 N-((7S,10S,13S)-1-(((1S,9S)-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-7,10,13-三甲基-1,6,9,12,15-五氧代-3,18,21,24-四氧代-5,8,11,14-四氮杂六烷-26-基)-2,6-双(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)异烟酰胺(C-19)



叔丁酯 (1.12 g, 4.04 mmol)溶于 DMF (20.0 mL)中,依次加入 HOBt (1.64 g, 12.1 mmol) 、EDCI (2.32 g, 12.1 mmol) 和 DIPEA (2.09 g, 16.2 mmol), 升温至 60°C 搅拌 2 小时。待反应体系冷却至室温, 向反应液中加入水(10.0 mL)和乙酸乙酯(20.0 mL), 水相用乙酸乙酯(25.0 mL * 2)萃取两次, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩得 C-19-4 粗品(2.50 g), 未经纯化直接用于下一步。

步骤四:

将 C-19-4 (2.50 g, 3.96 mmol) 溶于二氯甲烷(3.00 mL)中, 加入 TFA (4.61 g, 40.4 mmol)后, 反应体系于 25 °C 搅拌 12 小时。将反应液直接浓缩后, 经制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-19-5 (1.20 g)。

其制备方法如下:

色谱柱: Phenomenex luna C18 (150 mm*25mm*10 μm)

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	36	64	30
15.00	66	34	30

步骤五:

将 C-19-5 (1.10 g, 1.91 mmol)溶于乙腈(30 mL)和水(15 mL)的混合溶剂中,加入三氯化钨水合物(39.70 mg, 0.19 mmol)和高碘酸钠(4.09 g, 19.14 mmol), 反应体系于 25°C反应 1 小时后, 经水(50 mL)和乙酸乙酯(80 mL)萃取, 有机相浓缩得到粗品, 粗品经柱层析纯化(MeOH/DCM=10~20%), 浓缩得 C-19-6(130 mg)。

步骤六:

将 IM-6 (20.0 mg, 0.025 mmol)和 C-19-6 (16.0 mg, 0.025 mmol)加入 DMF (1 mL)中搅拌溶解,加入 HATU (19.0 mg, 0.050 mmol)和 DIPEA (12.9 mg, 0.100 mmol), 室温反应 2 小时, 反应液直接用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-19 (20.4 mg)。

其结构表征数据如下:

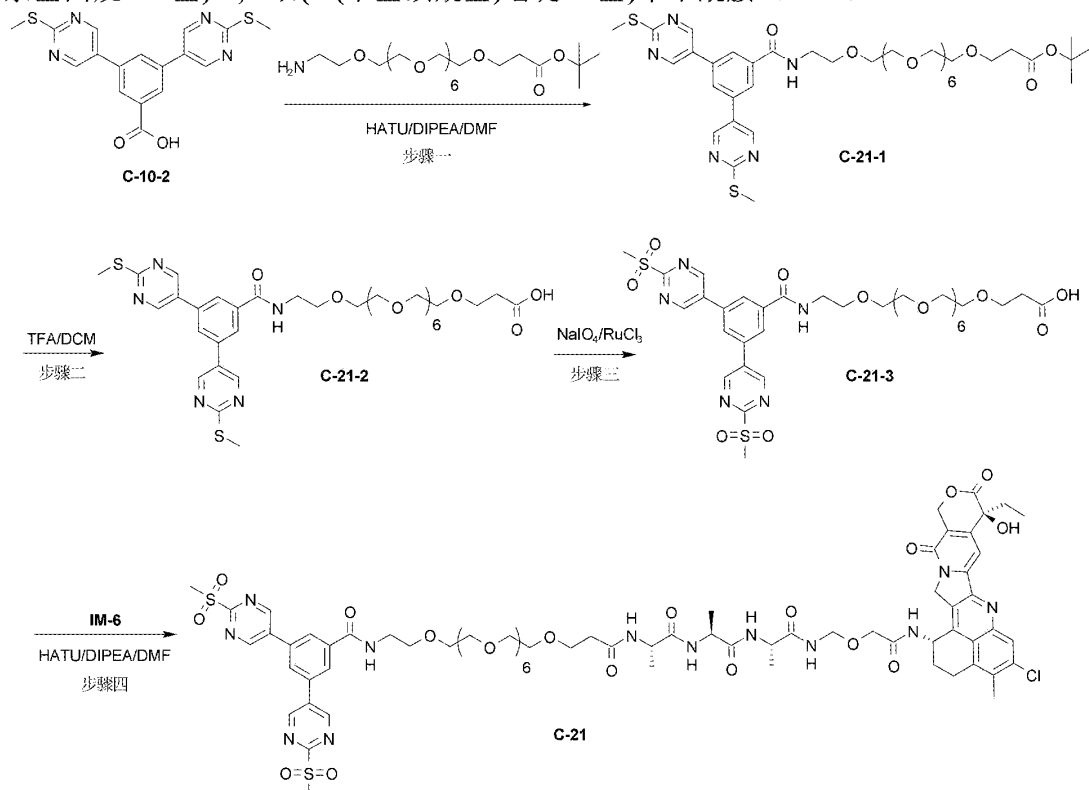
ESI-MS (m/z):1372.4 [M+H]⁺.

色谱柱: Waters XBridge Prep C18OBD (5 μm*19mm*150 mm)

流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	30
4.00	30	70	30
24.00	90	10	30

- 实施例十一 N-((7S,10S,13S)-1-(((1S,9S)-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]中氮茚并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-7,1,13-三甲基-1,6,9,12,15-五氧代-3,18,21,24,27,30,33,36,39-壬氧基-5,8,11,14-四氮杂基四烷-41-基)-3,5-双(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)苯甲酰胺 (C-21)



步骤一:

- 将 C-10-2(3.00 g, 8.10 mmol)和 1-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂庚烷-27-酸叔丁酯(4.03 g, 8.10 mmol)加入到 DMF (40 mL)中, 依次加入 HOBt (3.28 g, 24.3 mmol), EDCI (4.66 g, 24.3 mmol)和 DIPEA (4.19 g, 32.4 mmol, 5.64 mL), 反应体系于 60°C 搅拌 2 小时。向反应液中加入水 (100 mL)和乙酸乙酯萃取 (60 mL x 3), 有机相合并后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩 得 C-21-1(4.20 g, 4.14 mmol), 未经纯化直接用于下一步。

步骤二:

- 将 C-21-1(3.60 g, 4.24 mmol)溶于二氯甲烷(30 mL)中, 加入 TFA (15.3 g, 134 mmol, 10 mL), 反应体系于 25 °C 搅拌 6 小时。向反应液加入水(60 mL)和乙酸乙酯萃取(40 mL x 3)。有机相合并后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得粗品, 粗品经制备高

效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-21-2 (2.93 g, 3.63 mmol)。

其制备方法如下：

色谱柱：Phenomenex luna C18 (250 mm*70mm*10 μm)

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	30
15.00	60	40	30

5 步骤三：

将 C-21-2 (148 mg, 0.186 mmol) 加到乙腈 (15 mL) 和水(7.5 mL)中，再将高碘酸钠 (398.71 mg, 1.86 mmol) 和三氯化钨水合物 (15.47 mg, 74.56 μmol) 加到反应体系中，25°C搅拌反应 30 分钟，反应体系经水和乙酸乙酯萃取，浓缩得 C-21-3(155 mg)。

10 步骤四：

将 IM-6(27.91 mg, 34.97 μmol)、C-21-3(30 mg, 34.97 μmol)、HATU (26.59 mg, 69.93 μmol) , DIPEA (22.60 mg, 174.84 μmol) 加到 DMF (3 mL) 中，反应体系于 25°C 反应 1 小时。反应液经高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-21(15 mg)。

其结构表征数据如下：

15 ESI-MS (m/z):1591.7 [M+H]⁺.

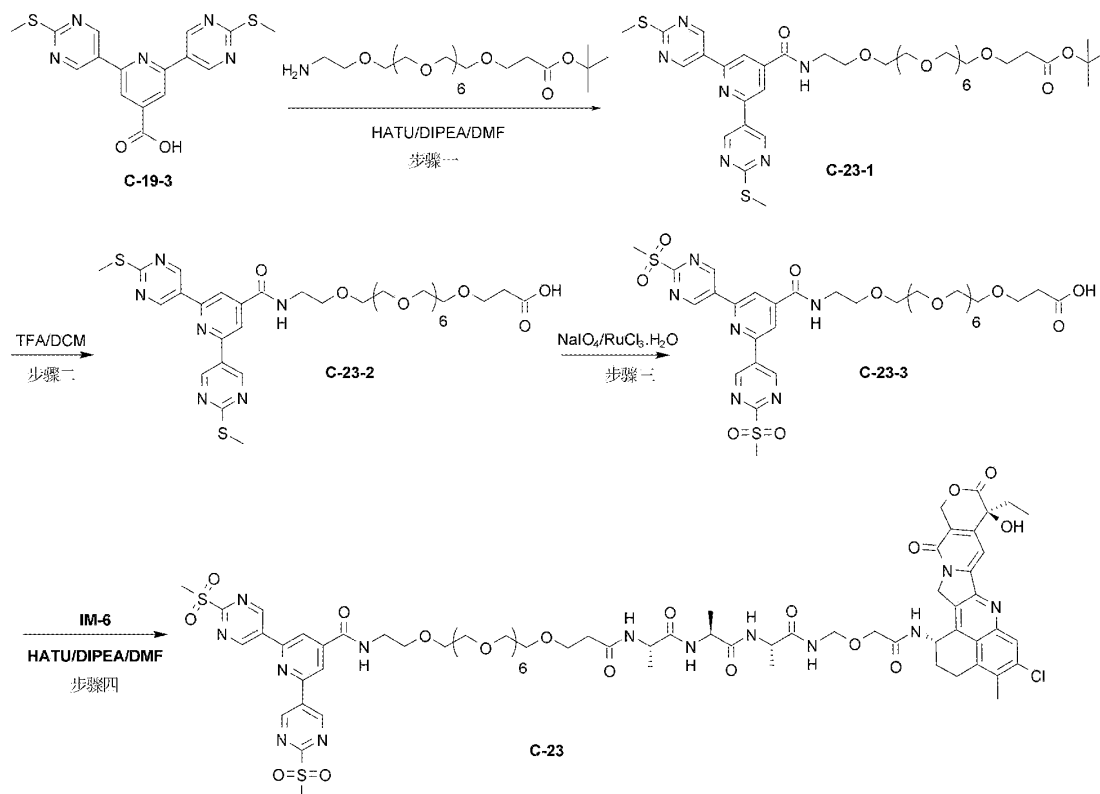
其制备方法如下：

色谱柱：Waters XBridge Prep C18OBD (5 μm*19mm*150 mm)

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	20	80	30
2.00	20	80	30
18.00	90	10	30

20 实施例十二 N-((7S,10S,13S)-1-(((1S,9S)-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-7,1,13-三甲基-1,6,9,12,15-五氧代-3,18,21,24,27,30,33,36,39-壬氧基-5,8,11,14-四氮杂四烷-4-基)-2,6-双(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)异烟酰胺 (C-23)



步骤一:

将 C-19-3(1.50 g, 4.04 mmol)和 1-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂庚烷-27-酸叔丁酯(2.01 g, 4.04 mmol)加入到 DMF (20.0 mL)中,依次加入 HOBt (1.64 g, 12.1 mmol)、

5 EDCI (2.32 g, 12.1 mmol)和 DIEA (2.09 g, 16.2 mmol),升温至 60 °C 搅拌 2 小时。冷却到室温,向反应液中加入水(10.0 mL)和乙酸乙酯(20.0 mL)分液,水相用乙酸乙酯(25.0 mL x 2)萃取两次,合并有机相用无水硫酸钠干燥,过滤浓缩得粗品 C-23-1 (3.00 g),直接用于下一步。

步骤二:

10 将 C-23-1 (3.00 g, 3.53 mmol)加入到二氯甲烷(10.0 mL)中,加入 TFA (15.4 g, 134 mmol)后于 25 °C 搅拌 12 小时。反应液直接浓缩得粗品,粗品经制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-23-2 (1.20 g)。

其制备方法如下:

色谱柱: Welch Ultimate C18 (150 mm*25mm*5 μm)

15 流动相 A: 乙腈;流动相 B: 水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	34	66	25
10.00	64	36	25

步骤三：

将 C-23-2 (500 mg, 0.63 mmol)加到乙腈 (10 mL)和水(5 mL)中，加入三氯化钨水合物(13.0 mg, 0.063 mmol)和高碘酸钠(1.35 g, 6.29 mmol)，体系于 25℃反应 1 小时后用水(10 ml)和乙酸乙酯(40 ml)萃取，有机相浓缩得到粗品，粗品经柱层析纯化

5 (MeOH/DCM=10~20%)并浓缩得 C-23-3 (350 mg)。

步骤四：

将 IM-6(20.0 mg, 0.025 mmol)和 C-23-3 (21.5 mg, 0.025 mmol)溶于 DMF (1 mL)，加入 HATU (19.0 mg, 0.050 mmol)和 DIPEA (12.9 mg, 0.100 mmol)后室温反应 2 小时，反应液直接用制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得 C-23(17.0 mg)。

10 其结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1592.6 [M+H]⁺.

其制备方法如下：

色谱柱：Waters XBridge Prep C18OBD (5μm*19mm*150 mm)

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%甲酸)

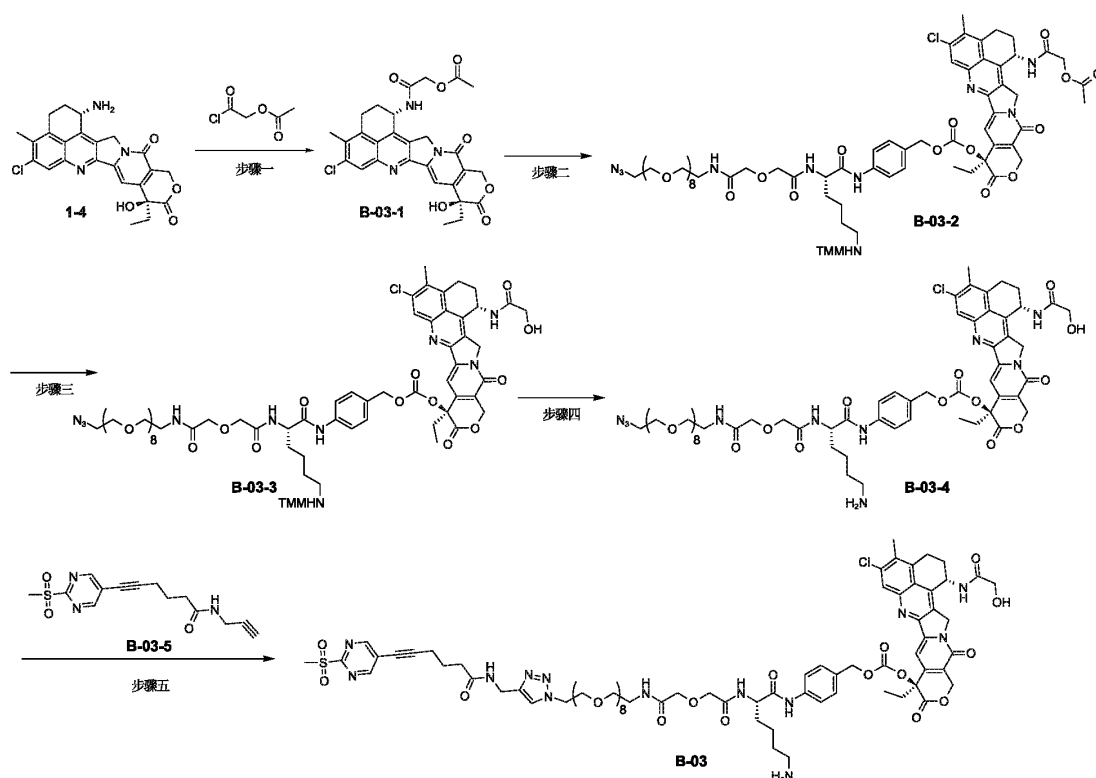
时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
4.00	30	70	28
24.00	90	10	28

15

实施例十三 4-((S)-2-(4-氨基丁基)-35-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己基-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂五氮杂三酰氨基)苄基((1S,9R)-5-氯-9-乙基-1-(2-羟基乙酰胺基)-4-甲基-10,13-二氧代-

2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d]吡喃并[3',4':6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-9-基)碳酸酯 (B-

20 03)



步骤一: 2-(((1S,9S)-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d]吡喃并[3',4':6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙酸乙酯(B-03-1)的制备

- 5 将(1S,9S)-1-氨基-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[d]吡喃并[3',4':6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮 (2 g, 3.65 mmol) 溶于 DMF (50 mL), 滴入 DIPEA (1.18 g, 9.12 mmol, 1.59 mL), 冰浴冷却搅拌下滴入乙酰氧基乙酰氯(548.12 mg, 4.01 mmol, 431.59 μ L), 继续搅拌反应 1 小时。将反应液加入 0.1M 稀盐酸水溶液中析出固体, 过滤。将滤饼溶于二氯甲烷和甲醇中, 无水硫酸钠干燥后过滤浓缩得粗品, 经硅胶
- 10 柱纯化(甲醇/二氯甲烷 = 0%~5%)再次浓缩得标题化合物 (1.7g, 3.077mmol)

其结构表征数据如下:

ESI-MS (m/z):552.2[M+1]⁺.

步骤二:2-(((1S,9S)-9-(((4-((S)-35-叠氮基-2-(4-(4-甲氧基苯基)二苯基甲基)氨基)丁基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂五苯并三酰氨基)苄基)氧基)羰基)

氧基-5-氯-9-乙基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]呋啉[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙酸乙酯(B-03-2)的制备

- 将 2-(((1S,9S)-5-氯-9-乙基-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d]吡喃并[3',4':6,7]中氮茚并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙酸乙酯(500 mg, 0.905mmol)和 DMAP (885.33 mg, 7.25 mmol)溶于干燥二氯甲烷(5mL)中, 氮气保护下冷却至 0°C, 滴入三光气(268.81 mg, 0.905mmol)的二氯甲烷溶液(5mL), 保温搅拌反应 0.5 小时。缓慢滴入(S)-2-(32-叠氮基-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-壬氧基-6-氮杂三硝基氨基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-6-(((4-甲氧基苯基)二苯基甲基)氨基)己酰胺(1.44 g, 1.36 mmol)的二氯甲烷溶液, 自然恢复室温反应 4 小时。加水淬灭反应, 用二氯甲烷萃取 3 次 (100ml x 3) 后合并有机相, 饱和食盐水洗涤后干燥浓缩。硅胶柱纯化(MeOH/DCM = 0% ~ 5%)得标题化合物 (498mg, 0.304mmol)

其结构表征数据如下:

ESI-MS (m/z):1352.8[M+1]⁺.

- 步骤三: 4-((S)-35-叠氮基-2-(4-((4-甲氧基苯基)二苯基甲基)氨基)丁基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂五氮杂三酰氨基)苄基((1S,9S)-5-氯-9-乙基-1-(2-羟基乙酰胺基)-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]氮茚并[1,2-b]喹啉-9-基)碳酸酯(B-03-3)的制备

- 将 2-(((1S,9S)-9-(((4-((S)-35-叠氮基-2-(4-(4-甲氧基苯基)二苯基甲基)氨基)丁基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂五苯并三酰氨基)苄基)氧基)羰基)氧基-5-氯-9-乙基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]呋啉[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙酸乙酯(200 mg, 0.122mmol) 溶于 THF (3 mL) 和 MeOH (3 mL)中, 搅拌下滴入碳酸钠(25.88 mg, 0.224mmol) 水溶液(1 mL), 滴加完毕后继续搅拌 1 小时。向反应液中滴入稀盐酸中和反应, 减压浓缩后直接进行下一步。

其结构表征数据如下:

- ESI-MS (m/z):1596.7[M+1]⁺.

步骤四: 4-((S)-2-(4-氨基丁基)-35-叠氮基-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂五苯并三酰氨基)苄基((1S,9S)-5-氯-9-乙基-1-(2-羟基乙酰胺基)-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-9-基)碳酸酯(B-03-4)的制备

- 5 将 4-((S)-35-叠氮基-2-(4-((4-甲氧基苯基)二苯甲基)氨基)丁基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂五氮杂三酰氨基)苄基((1S,9S)-5-氯-9-乙基-1-(2-羟基乙酰胺基)-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]氮茛并[1,2-b]喹啉-9-基)碳酸酯(190 mg, 119.04 μmol) 溶于二氯甲烷 (5 mL), 加入三氟乙酸 (0.5 mL)后继续反应 1 小时。向反应液中滴入饱和碳酸氢钠水溶液中和后分液, 将有机相浓缩得粗品。经反相柱色谱(乙腈/1%甲酸水溶液=0%~50%)纯化后冷冻干燥得标题化合物
- 10 (95 mg, 69.35 μmol)。

其结构表征数据如下:

ESI-MS (m/z):1323.6[M+1]⁺.

- 步骤五:4-((S)-2-(4-氨基丁基)-35-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己基-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂五氮杂三酰氨基)苄基((1S,9R)-5-氯-9-乙基-1-(2-羟基乙酰胺基)-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d]吡喃并[3',4':6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-9-基)碳酸酯(B-03)的制备
- 15

- 将 4-((S)-2-(4-氨基丁基)-35-叠氮基-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂五苯并三酰氨基)苄基((1S,9S)-5-氯-9-乙基-1-(2-羟基乙酰胺基)-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-9-基)碳酸酯(90 mg, 0.066mmol)和 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)-N-(丙-2-炔-1-基)己-5-炔酰胺(24.07 mg, 0.079mmol) 溶于 DMSO(2mL) 和水(0.2mL)中, 加入溴化亚铜 (9.42 mg, 0.066mmol)后继续搅拌 2 小时。将反应液直接过滤, 将反应液直接过滤浓缩的粗品, 经制备高效液相色谱纯化后冷冻干燥得标题化合物 (42.2 mg, 24.69 μmol)。
- 20

- 25 其结构表征数据如下:

ESI-MS (m/z):1628.7[M+1]⁺.

其制备高效液相色谱方法如下：

色谱柱:SunFire Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0μm

流动相 A:乙腈；流动相 B:水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	10	90	28
2.00	10	90	28
18.00	90	10	28

二、抗体的制备

5 采用人 **B7-H3-4Ig-His** 蛋白免疫全人源小鼠，通过 **ELISA**、细胞流式监测血清效价，根据效价结果选择最优小鼠取脾脏细胞融合、筛选并进行亚克隆，检测不同单克隆结合人\猴蛋白、细胞等活性，获得优选克隆 **20G11G6/2#**，对抗体的序列进行 **PTM** 位点去除改造，**PI** 降低改造，以及重链恒定区 **ADCC** 去除改造后，最终得到全人源抗体 **2#8890**（重链可变区, **SEQ ID NO:3**；轻链可变区, **SEQ ID NO:4**）、人 **IgG1** 重链恒定区去除 **ADCC** 活性改造的序列(**SEQ ID NO:31**)、人 **κ**轻链恒定区(**SEQ ID NO:32**)，
10 形成完整的人源化抗体（见表 1），抗体委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行密码子优化与基因合成，构建至 **pTT5** 质粒中，重链和轻链质粒同时转染到 **CHO-S** 细胞中，采用 **Protein A** 对上清中的表达抗体进行纯化，从而获得相应抗体蛋白 **2# 8890**。**2#8890** 的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列分别如 **SEQ ID NO: 42** 和 **SEQ ID NO: 43** 所示。

15 **hIgG1** 为抗鸡溶菌酶抗体，重链可变区融合至突变的人 **IgG1** 重链恒定区（**SEQ ID NO:31**），轻链可变区融合至野生型的人 **kappa** 轻链恒定区（**SEQ ID NO:32**），按上述方法表达纯化，获得抗体 **hIgG1**。

B7-H3 对照抗体 **DS7300** 来自专利 **CN 103687945 A** 中，进行密码子优化后，抗体重链可变区核苷酸序列分别合成克隆到含有突变的人 **IgG1** 重链恒定区（**SEQ ID NO:31**），轻链可变区核苷酸序列合成至含有野生型 **kappa** 轻链恒定区(**SEQ ID NO:32**)
20 的 **pTT5** 载体，按上述方法表达纯化，获得抗体 **DS7300**。

表 1: **2#8890** 可变区及 **CDR** 氨基酸序列

抗体	重链可	轻链	定义方	重链	重链	重链	轻链	轻链	轻链
----	-----	----	-----	----	----	----	----	----	----

	变区 (SEQ ID NO:)	可变 区 (S EQ ID NO :)	式	CDR1 (SE Q ID NO:)	CDR2 (SE Q ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
2# 8890	3	4	IMGT	18	19	20	8	9	10
			Chothia	21	22	23	14	15	10
			Kabat	24	25	23	14	15	10
			AbM	28	29	23	14	15	10

三、包含细胞生物活性分子和连接体的化合物与抗体的偶联

以下实施例所制备得到的抗体药物偶联物中所涉及的抗体 **2#8890**，**DS7300**，以及 **hIgG1** 为上述第二部分中所述的对应抗体。

5 **1、ADC 1 (DS7300-M-01, DAR 4)的制备**

取 **38.041ml** 自制 **DS7300** 抗体 (**26.287 mg/mL**)，用 **1M Na₂HPO₄** 溶液调 **pH** 至 **7.4**，用 **20mM PB** 将抗体稀释至 **3 mg/mL**，并于冰浴中向其中依次加入 **4mM ZnCl₂** (**3.413 mL**)，**10mM TCEP** (三(2-羧乙基)膦，**4.096 mL**，**pH 7.4**) 溶液混匀，**4°C** 放置过夜。再加入 **6** 倍物质的量的溶解在二甲基亚砷的 **M-01** (**4.18 mL**，**10 mM**) 溶液混匀，**4°C** 反应 **4h**，再向其中加入半胱氨酸溶液 (**10 mM**，**6.826 mL**)，反应 **1.5h** 后将反应液移至室温，并向其中加入 **EDTA** 溶液 (**10 mM**，**6.826 mL**)，**30** 分钟后再加入 **DHAA** 溶液(**10 mM**，**6.826 mL**)，继续反应 **30** 分钟。完毕后采用 **NAP-5** 凝胶柱(**Cytiva**)将缓冲液置换为 **pH 6.0** 的 **20 mM** 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，即 **ADC 1 (DS7300-M-01)**。质谱法测定 **DAR** 值为 **3.8**。

15 **2、ADC 2 (hIgG1-M-01, DAR 4)的制备**

取 **1.2245ml** **hIgG1** 抗体 (**24.5 mg/mL**)，用 **1M Na₂HPO₄** 溶液调 **pH** 至 **7.3**，用 **20mM PB** 将抗体稀释至 **3 mg/mL**，并于冰浴中向其中依次加入 **4mM ZnCl₂** (**52.04 uL**)，**10mM TCEP** (三(2-羧乙基)膦，**124.89 uL**，**pH 7.3**) 溶液混匀，**4°C** 放置过夜。再加入 **6** 倍物质的量的溶解在二甲基亚砷的 **171** (**127.44 uL**，**10 mM**) 溶液混匀，**4°C** 反应 **4h**，再向其中加入半胱氨酸溶液 (**10 mM**，**208.15 uL**)，反应 **1.5h** 后将反应液移至室温，并向其中加入 **EDTA** 溶液 (**10 mM**，**208.15 uL**)，**30** 分钟后再加入 **DHAA** 溶液 (**10 mM**，**208.15 uL**)，继续反应 **30** 分钟。完毕后采用 **NAP-5** 凝胶柱 (**Cytiva**) 将缓冲液置换为 **pH 6.0** 的 **20 mM** 组氨酸缓冲溶液，得到 **ADC 2** (即 **hIgG1-M-01**)。质

谱法测定 DAR 值为 4.46。

3、ADC 3 (2#8890-M-01, DAR 4)的制备

取 9.36ml 2#8890 抗体 (3.205 mg/mL)，用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.4，用 20mM PB 将抗体稀释至 3 mg/mL，并于冰浴中向其中依次加入 4mM ZnCl₂ (57.31
5 uL)，10mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，124.9 uL，pH 7.4) 溶液混匀，4°C 放置过夜。
再加入 6 倍物质的量的溶解在二甲基亚砷的 M-01 (124.9 uL，10 mM) 溶液混匀，4°C
反应 4h，再向其中加入半胱氨酸溶液 (10 mM，208.2 uL)，反应 1.5h 后将反应液移
至室温，并向其中加入 EDTA 溶液 (10 mM，208.2 uL)，30 分钟后再加入 DHAA 溶
液 (10 mM，208.2 uL)，继续反应 30 分钟。完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将
10 缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，即 ADC
3 (2#8890-M-01)。质谱法测定 DAR 值为 3.89。

4、ADC 4 (hIgG1-A-05, DAR 8)的制备

取 0.943ml hIgG1 抗体 (11 mg/mL)，用 47uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60)
稀释，然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 10mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，
15 57 uL，pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚
砷的 A-05 (103 uL，10 mM) 溶液混匀，室温静置 2h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱
(Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，
即 ADC 4 (hIgG1-A-05)。质谱法测定 DAR 值为 8.03。

5、ADC 5 (2#8890-A-05, DAR 8)的制备

20 取 3.052 ml 2#8890 抗体 (9.83 mg/mL)，用 153 uL 20mM PB + 0.1M EDTA
(pH 7.60) 稀释，然后用 1 M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 10 mM TCEP (三
(2-羧乙基)膦，114.5 uL，pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的
的溶解在二甲基亚砷的 A-05 (219.1 uL，10 mM) 溶液混匀，室温静置 2h，完毕后采
用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到
25 抗体药物偶联物，即 ADC 5 (2#8890-A-05)。质谱法测定 DAR 值为 7.90。

6、ADC 6 (hIgG1-A-07, DAR 8)的制备

取 0.518ml hIgG1 抗体 (19.3 mg/mL)，用 25.9uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60)
稀释，然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 10mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，
38.1 uL，pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基
30 亚砷的 A-07 (69.2 uL，10 mM) 溶液混匀，室温静置 2h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱
(Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，

即 ADC 6 (hIgG1-A-07)。质谱法测定 DAR 值为 8.04。

7、ADC 7 (2#8890-A-07, DAR 8)的制备

取 1.017ml 2#8890 抗体 (9.83 mg/mL)，用 50.85uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释，然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 10 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，38.2 uL，pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再加入 12 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 A-07 (87.6 uL，10 mM) 溶液混匀，室温静置 2h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，即 ADC 7 (2#8890-A-07)。质谱法测定 DAR 值为 7.76。

8、ADC 8 (hIgG1-A-14, DAR 8)的制备

取 1.9126ml hIgG1 抗体 (18.3 mg/mL)，用 95.6uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释，然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 10mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，66.86 uL，pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 A-14 (260.53 uL，10 mM) 溶液混匀，室温静置 2h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，即 ADC 8 (hIgG1-A-14)。质谱法测定 DAR 值为 8.0。

9、ADC 9 (2#8890-A-14, DAR 8)的制备

取 3.6788 ml 2#8890 抗体 (10.873 mg/mL)，用 183.94 uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释，然后用 1 M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 10 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，152 uL，pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 A-14 (292.26 uL，10 mM) 溶液混匀，室温静置 2h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，即 ADC 9 (2#8890-A-14)。质谱法测定 DAR 值为 7.22。

10、ADC 10 (hIgG1-B-01, DAR 8)的制备

取 1.533ml hIgG1 抗体 (19.57 mg/mL)，用 76.65uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释，然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 10mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，114.5 uL，pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 B-01 (212.4 uL，10 mM) 溶液混匀，室温静置 2h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，即 ADC 10 (hIgG1-B-01)。质谱法测定 DAR 值为 8.03。

11、ADC 11 (2#8890-B-01, DAR 8)的制备

取 3.052 ml 2#8890 抗体 (9.83 mg/mL)，用 152.6 uL 20mM PB + 0.1M EDTA

(pH 7.60) 稀释, 然后用 1 M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 10 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦, 114.5 uL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚砷的 B-01 (212.4 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置 2h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到

5 抗体药物偶联物, 即 ADC 11 (2#8890-B-01)。质谱法测定 DAR 值为 7.75。

对偶联后的 ADC 样品进行 LC-MS 分子量分析。

色谱测定条件:

液相色谱柱: Thermo MAbPac RP 3.0*100 mm;

流动相 A: 0.1% FA/H₂O; 流动相 B: 0.1% FA/ACN;

10 流速: 0.25 ml/min; 样品室温度: 8 °C; 柱温: 60 °C; 进样量: 2 µl;

时间(分钟)	2	20	22	25	26	30
流动相 A (体积%)	75	20	5	5	75	75
流动相 B (体积%)	25	80	95	95	25	25

质谱测定条件:

质谱型号: AB Sciex Triple TOF 5600+;

GS1 35 ; GS2 35 ; CUR 30 ; TEM 350 ; ISVF 5500 ; DP 200 ; CE 10 ;

Accumulation time 0.5 s;

15 m/z 600-4000; Time bins to sum 40。

12、ADC 12 (2#8890-C-07, DAR 4)的制备

取 0.2274 ml 2#8890 抗体 (10.994 mg/mL), 用 11.4 uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释, 然后用 1 M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 10 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦, 9.5 uL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再缓慢加入 8 倍物质的

20 量的溶解在二甲基亚砷的 C-07 (14.6 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置过夜, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物偶联物, 即 ADC 12 (2#8890-C-07)。质谱法测定 DAR 值为 4.12。

13、ADC 13 (2#8890-C-10, DAR 4)的制备

取 0.2274 ml 2#8890 抗体 (10.994 mg/mL), 用 11.4 uL 20mM PB + 0.1M EDTA

25 (pH 7.60) 稀释, 然后用 1 M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 10 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦, 9.5 uL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再缓慢加入 8 倍物质的量的溶解在二甲基亚砷的 C-10 (14 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置过夜, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得

到抗体药物偶联物，即 ADC 13 (2#8890-C-10)。质谱法测定 DAR 值为 4.17。

对偶联后的 ADC 样品进行 LC-MS 分子量分析。

色谱测定条件：

液相色谱柱：ACQUITY UPLC MAbPac BEH SEC；

5 流动相 A：20 mM NH₄Ac；

流速：0.1 ml/min；样品室温度：8 °C；柱温：60 °C；进样量：2 µl；

时间(分钟)	2	20	22	25	26	30
流动相 A (体积%)	75	20	5	5	75	75
流动相 B (体积%)	25	80	95	95	25	25

质谱测定条件：

质谱型号：AB Sciex Triple TOF 5600+；

GS1 55; GS2 55; CUR 30; TEM 450; ISVF 5500; DP 75; CE 5; Accumulation time 0.5 s;

10 m/z 900-7000; Time bins to sum 40。

14、ADC 14 (2#8890-C-17, DAR 4)的制备

取 0.292mL 2#8890 抗体 (8.565mg/mL)，用 14.6uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释，然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 20mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，4.77 uL, pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再缓慢加入 5 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 C-17 (8.76 uL, 10 mM) 溶液混匀，室温静置过夜，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，即 ADC 14 (2#8890-C-17)。质谱法测定 DAR 值为 3.86。

15、ADC 15 (2#8890-C-19, DAR 4)的制备

取 0.584mL 2#8890 抗体 (8.565mg/mL)，用 29.2uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释，然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 20mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，9.54 uL, pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再缓慢加入 5.5 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 C-19 (17.9 uL, 10 mM) 溶液混匀，室温静置过夜，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液，得到抗体药物偶联物，即 ADC 15 (2#8890-C-19)。质谱法测定 DAR 值为 4.05。

16、ADC 16 (2#8890-C-21, DAR 4)的制备

取 0.584mL 2#8890 抗体 (8.565mg/mL)，用 29.2uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释，然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60，加入 20mM TCEP (三(2-羧乙基)膦，9.54 uL, pH 7.60) 溶液混匀，室温放置 1.5 h。再缓慢加入 5.5 倍物质的

量的溶解在二甲基亚砷的 C-21 (17.9 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置过夜, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物偶联物, 即 ADC 16 (2#8890-C-21)。质谱法测定 DAR 值为 3.92。

17、ADC 17 (2#8890-B-03, DAR 8) 的制备

5 取 0.867ml 2#8890 抗体 (34.6 mg/mL), 用 93.4μL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释, 然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 10mM TCEP (三(2-羧乙基)膦, 112.65 μL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再加入 11 倍物质的量的溶解在二甲基亚砷的 B-03 (227.58 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置 2h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物
10 偶联物, 即 ADC 17 (2#8890-B-03, DAR 8)。质谱法测定 DAR 值为 7.82。

18、ADC 18 (2#8890-B-03, DAR 8) 的制备

取 0.867ml 2#8890 抗体 (34.6 mg/mL), 用 58.35μL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释, 然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 10mM TCEP (三(2-羧乙基)膦, 112.65 μL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚砷的 B-03 (211.1 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置 2h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物
15 偶联物, 即 ADC 18 (2#8890-B-03, DAR 8)。质谱法测定 DAR 值为 7.23。

19、ADC 19 (19F6-B-02) 的制备

以下实施例所涉及的抗体 19F6_Hu35v1 即为国际专利申请 WO2022253035A1 所
20 记载的 19F6_Hu35v1 抗体, 采用该专利实施例二所记载的方法制备。

样品的偶联制备如下:

取 0.46ml 19F6_Hu35v1 抗体 (11.0mg/mL), 用 0.1M 依地酸二钠的溶液 (pH 7.7) 稀释, 然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.7, 加入 10 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦) 溶液混匀, 室温放置 90 min。向上述溶液体系加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚砷的 B-02, 混匀, 室温静置 2h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 将缓冲液置换为 pH 6.0 的 10 mM 组氨酸缓冲溶液, 然后添加蔗糖和吐温 20, 混匀, 得到抗体药物偶联物, 即 ADC 19 (19F6-B-02)。质谱法测定 DAR 值为 7.92。
25

20、ADC 20 (Trastuzumab-A-05, DAR 8)

取 2.469mL Trastuzumab 抗体(16.2mg/mL),用 123uL 20mM PB + 0.1M EDTA
30 (pH 7.60)稀释,然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60,加入 10mM TCEP(三(2-羧乙基)膦,151.57 uL,pH 7.60)溶液混匀,室温放置 1.5 h。再缓慢加入 10 倍物质的量的溶解

在二甲基亚砜中的 A-05 (290.09 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置 2h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱(Cytiva)将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物偶联物(即 Trastuzumab-A-05)。质谱法测定 DAR 值为 8.04。

21、ADC 21 (Trastuzumab-A-14, DAR 8)

5 取 2.564mL Trastuzumab 抗体(15.6mg/mL), 用 128.2uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释, 然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 10mM TCEP(三(2-羧乙基)膦, 151.57 uL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再缓慢加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜中的 A-14 (290.1 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置 2h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱(Cytiva)将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物偶联物(即 Trastuzumab-A-14)。质谱法测定 DAR 值为 8.02。

22、ADC 22 (Trastuzumab-A-24, DAR 8)

取 0.617mL Trastuzumab 抗体(16.2mg/mL), 用 30.86uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释, 然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 10mM TCEP(三(2-羧乙基)膦, 37.89 uL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再缓慢加入 14 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 A-24 (98.42 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置 2h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱(Cytiva)将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物偶联物(即 Trastuzumab-A-24)。质谱法测定 DAR 值为 7.37。

23、ADC23 (Trastuzumab-A-32, DAR 8)

20 取 0.423mL Trastuzumab 抗体(4.73mg/mL), 用 21.17uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释, 然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 10mM TCEP(三(2-羧乙基)膦, 7.58 uL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再加入 10 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 A-32 (13.92 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置 2h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱(Cytiva)将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物偶联物(即 Trastuzumab-A-32)。质谱法测定 DAR 值为 6.77。

24、ADC24 (Trastuzumab-C-21, DAR 4)

25 取 0.617mL Trastuzumab 抗体(16.2 mg/mL), 用 30.86uL 20mM PB + 0.1M EDTA (pH 7.60) 稀释, 然后用 1M Na₂HPO₄ 溶液调 pH 至 7.60, 加入 19.83mM TCEP(三(2-羧乙基)膦, 19.1 uL, pH 7.60) 溶液混匀, 室温放置 1.5 h。再依次加入 5.5 倍物质的量的溶解在二甲基亚砜的 C-21 (38.28 uL, 10 mM) 溶液混匀, 室温静置 18h, 完毕后采用 NAP-5 凝胶柱(Cytiva)将缓冲液置换为 pH 6.0 的 20 mM 组氨酸缓冲溶液, 得到抗体药物偶联物(即 Trastuzumab-C-21)。质谱法测定 DAR 值为 4.41, 其中 DAR4 占比 60.06%。

四、检测抗体药物偶联物活性

1. 抗人 B7-H3 抗体偶联物动态亲和力检测

用 ForteBio (Pall life sciences) 检测抗人 B7-H3 抗体偶联物与人 B7-H3-4Ig-his、人 B7-H3-2Ig-his、大鼠 B7-H3-his 和猴 B7-H3-his 蛋白的动态亲和力。具体方法如下：

5 用 PBST(0.02% Tween-20)将待测偶联物稀释到 5 µg/ml，人 B7-H3-4Ig-his、人 B7-H3-2Ig-his、大鼠 B7-H3-his 和猴 B7-H3-his 蛋白梯度稀释到 200 nM、100 nM、50 nM、25 nM、12.50 nM、6.25 nM、3.125 nM、0 nM，随后在 PBST(0.02% Tween-20) 溶液

10 中用 Protein A Sensor (Pall life sciences) 分别捕获待测偶联物 60s，随后分别与 4 个蛋白结合 60 s，然后解离 180 s，测得结果在 Data Analysis 11.0 软件中打开，选用 1:1 模式，global fitting，对结果进行分析，获得亲和力常数。结果如表 2 所示，结果显示本发明药物连接子化合物所制备的偶联物与猴 B7-H3 结合，不与大鼠 B7-H3 结合。

表 2：抗人 B7-H3 抗体偶联物动态亲和力检测结果

ADC	人 B7-H3-4Ig-his KD (M)	人 B7-H3-2Ig-his KD (M)	大鼠 B7-H3-his KD (M)	猴 B7-H3-his KD (M)
ADC 5	5.88E-10	2.34E-08	不结合	9.89E-10
ADC 9	4.12E-10	2.30E-08	不结合	7.10E-10
ADC 17	1.04E-09	4.20E-08	不结合	2.57E-09

2. 抗人 B7-H3 抗体偶联物的细胞亲和力检测

用流式仪 (Beckman, 型号 Cytoflex) 检测抗人 B7-H3 全人源抗体偶联物与人结

15 肠癌细胞 HT29 (中国科学院细胞库)、人胃癌细胞 NCI-N87(ATCC)、人乳腺鳞状癌细胞 HCC1806 (ATCC)和人非小细胞肺癌细胞 HCC827 (ATCC)的亲和力；检测抗人 B7-H3 全人源抗体偶联物与 CHOS-人 B7-H3-4Ig、CHOS-人 B7-H3-2Ig 的亲和力；检测抗人 B7-H3 全人源抗体偶联物的种属交叉情况：与 CHOS-大鼠 B7-H3 和 CHOS-猴 B7-H3 的亲和力。用 Trypsin-EDTA (0.25%) (Thermo) 溶液消化贴壁生长的细胞，计

20 数并调整细胞密度至 4.0×10⁶/ml，用 1% BSA 洗涤两次，重悬于 1% BSA 溶液中，每孔加入 50 µl 细胞悬液到 96 孔尖底板中（细胞数目为 2×10⁵ 个/孔）；用 1% BSA 稀释抗体偶联物（终浓度 10 µg/ml 起始，3 倍梯度稀释，共稀释 11 个浓度点），hIgG1 抗体偶联物作为对照（终浓度 10ug/ml），取 50 µl 稀释好的抗体到含有细胞的尖底板中，

4 度孵育 60 min；1% BSA 洗涤细胞两次，每孔加入 50 µl 稀释好的二抗，混匀，4 度

25 孵育 30 min；1% BSA 洗涤细胞两次，将细胞重悬于 200 µl 1% BSA 中，流式上机检测。数据处理：导出 Median PE 数值，然后导入 GraphPad Prism 6 软件，计算 EC₅₀。

抗人 B7-H3 抗体偶联物的 HT29、NCI-N87、HCC1806、HCC827 肿瘤细胞亲和

力结果中，ADC17 对 HT29 肿瘤细胞亲和力的 EC₅₀ 为 3.213 ng/ml；对 HCC827 肿瘤细胞亲和力的 EC₅₀ 为 8.054ng/ml，其余抗体偶联物的亲和力结果分别如表 3 所示，抗人 B7-H3 全人源抗体偶联物对 CHOS-人 B7-H3-4Ig、CHOS-人 B7-H3-2Ig 细胞的亲和力结果如表 4 所示，抗人 B7-H3 抗体偶联物对 CHOS-大鼠 B7-H3 和 CHOS-猴 B7-H3 细胞的亲和力结果如表 5 所示，结果显示本发明药物连接子化合物所制备的偶联物与猴 B7-H3 过表达细胞结合，不与大鼠 B7-H3 过表达细胞结合。

表 3：ADC 肿瘤细胞亲和力测定结果

ADC	EC ₅₀ (ng/ml)			
	HT29	NCI-N87	HCC1806	HCC827
ADC 5	2.335	2.329	3.129	7.579
ADC 9	5.656	5.953	7.264	13.05

表 4：CHOS-人 B7-H3-4Ig、CHOS-人 B7-H3-2Ig 细胞亲和力测定结果

ADC	EC ₅₀ (ng/ml)	
	CHOS-B7-H3-4Ig	CHOS-B7-H3-2Ig
ADC 5	41.48	26.89
ADC 9	45.96	41.34

10 表 5：CHOS-大鼠 B7-H3 和 CHOS-猴 B7-H3 细胞亲和力测定结果

ADC	EC ₅₀ (ng/ml)	
	CHOS-大鼠 B7-H3	CHOS-猴 B7-H3
ADC 5	不结合	31.85
ADC 9	不结合	40.94

3. 抗人 B7-H3 抗体偶联物细胞内吞活性检测

用流式仪（Thermo，型号 Attune NxT）检测抗人 B7-H3 抗体偶联物对人胃癌细胞 NCI-N87(ATCC)、人乳腺鳞状癌细胞 HCC1806 (ATCC)和人非小细胞肺癌细胞 HCC827 (ATCC)的内吞活性。用 Trypsin-EDTA (0.25%)（Thermo）溶液消化贴壁生长的细胞并计数，用完全培养基调整细胞密度至 1×10⁵ 个/ml，每孔加入 100 μl 细胞悬液到 96 孔板中（细胞数目为 1×10⁴ 个/孔），将 96 孔板放置于 37℃，CO₂ 恒温培养箱孵育培养 24 h。取出 96 孔板，吸弃培养基，每孔加入 50 μl 新鲜完全培养基；采用完全培养基稀释待测抗体偶联物，共计 6 个浓度点；完全培养基稀释 300 μg/ml 的 pHrodo 试剂（Thermo，Cat#Z25612）至 12 μg/ml（pHrodo 的终浓度为 3 μg/ml）；将梯度稀

15 释的待测抗体与稀释后的 pHrodo 试剂 1:1 混合均匀（30μl:30μl），在室温避光孵育 30 min；取 50 μl 待测抗体和 pHrodo 试剂混合物加入 96 孔板中，37℃、5%CO₂ 培养 24 h；取出 96 孔板，吸弃培养基，无菌 PBS 洗涤 1 次，每孔加入 100 μl 的 Trypsin-EDTA (0.25%)消化细胞，再加入 100 μl 完全培养基中和；将孔里细胞吹打分散后，

20

FACS 上机检测。数据处理：导出 Median YL-1H 数值，然后导入 GraphPad Prism 6 软件，计算 EC₅₀，结果如表 6 所示，本发明药物连接子化合物所制备的抗体药物偶联物（例如 ADC 5 和 ADC 9）均具有较好的细胞内吞活性。

表 6: ADC 细胞内吞活性测定结果

ADC	EC ₅₀ (ng/ml)		
	NCI-N87	HCC1806	HCC827
ADC 5	7.984	10.91	9.835
ADC 9	8.649	18.94	10.65

5 4. 抗人 B7-H3 抗体偶联药物体外细胞杀伤检测

用 Trypsin-EDTA (0.25%) (Thermo) 溶液消化贴壁生长的 A375、Calu6-B7-H3 和 U87MG-B7-H3 细胞并计数,用完全培养基分别调整细胞密度至 1×10⁴、5×10⁴、1×10⁴ 个/ml, 每孔加入 100 μl 细胞悬液到 96 孔板中（细胞数目分别为 1000、5000、1000 个/孔），将 96 孔板放置于 37℃，CO₂ 恒温培养箱孵育培养 24 h。采用完全培养基稀释待测 ADC，终浓度 3333.3 nM 起始，4 倍梯度稀释，共计 12 个浓度点；取 100 μl 稀释好的 ADC 加入 96 孔板中，37℃、5%CO₂ 培养 4~7 天。取出 96 孔板，每孔加 20 μl CCK8 试剂，37℃孵育 2~3 h，使用酶标仪检测 OD_{450nm} 信号值，然后导入 GraphPad Prism 6 软件，计算 IC₅₀，结果如表 7 所示。

表 7 ADC 体外细胞杀伤结果

ADC	IC ₅₀ (nM)		
	A375	Calu6-B7-H3	U87MG-B7-H3
ADC 5	0.4753	0.2529	0.08650
ADC 9	2.638	0.3282	0.09748
ADC 2	28.52	148.7	30.15
ADC 8	11.25	52.51	14.48

15 结果显示，本发明药物连接子化合物所制备的抗体药物偶联物对于肿瘤细胞具有明确的杀伤作用。

5. 2#8890 不同偶联药物 HCC1806 模型体内药效检测

人乳腺鳞状癌细胞 HCC1806 (ATCC)，培养条件为 RPMI1640 培养基中加 10% 胎牛血清，于 37℃、含 5% CO₂ 空气的培养箱中培养。当细胞呈指数生长期时，取培养液进行支原体检测后，收集细胞并计数。每只小鼠右侧肩胛处皮下接种 2×10⁶ 个 HCC1806 细胞，悬浮于 0.1 ml PBS。待平均肿瘤体积生长至约 100~200 mm³ 时，剔除肿瘤体积过小或过大的小鼠，剩余小鼠根据肿瘤体积和动物体重随机分为 6 组，每组 6 只，尾静脉注射单次给药(DAR4 给药组：10 mg/kg，DAR8 给药组：5 mg/kg)。给药后每周 2 次测量肿瘤体积和体重，具体结果见表 8。

表 8 2#8890 不同偶联药物对 HCC1806 细胞荷瘤鼠模型的疗效分析

药物	剂量 (mg/kg)	VP0(mm ³ , mean±SEM)	VP52(mm ³ , mean±SEM)	TGI (%)	P 值
生理盐水	/	150.56±12.13	3538.70±1032.32	/	/
ADC 11	5	151.62±11.10	819.27±346.44	80.29*	0.032
ADC 5	5	151.51±13.21	6.10±3.98	195.97**	0.007

注：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001 表示与溶媒组相比有显著差异。

结果显示：给药组小鼠体重稳定，耐受性良好。单次给药后 95 天，ADC 5 组小鼠肿瘤完全消退。说明本发明药物连接子化合物所制备的抗体药物偶联物具有明显的肿瘤抑制作用。

6. 不同剂量抗体偶联药物 HCC1806 模型药效检测

人乳腺鳞状癌细胞 HCC1806 (ATCC)，培养条件为 RPMI1640 培养基中加 10% 胎牛血清，于 37℃、含 5% CO₂ 空气的培养箱中培养。当细胞呈指数生长期时，取培养液进行支原体检测后，收集细胞并计数。每只小鼠右侧肩胛处皮下接种 2×10⁶ 个 HCC1806 细胞，悬浮于 0.1ml PBS。待平均肿瘤体积生长至约 100~200 mm³ 时，剔除肿瘤体积过小或过大的小鼠，剩余小鼠根据肿瘤体积和动物体重随机分为 12 组，每组 6 只，尾静脉注射单次给药。给药后每周 2 次测量肿瘤体积和体重，具体结果见表 9。

表 9 抗体偶联药物不同剂量 HCC1806 细胞荷瘤鼠模型的疗效分析

药物	剂量 (mg/kg)	VP0(mm ³ , mean±SEM)	VP27(mm ³ , mean±SEM)	TGI (%)	P 值
生理盐水	/	172.26±16.70	2984.81±647.24	/	/
ADC 5	5	172.53±13.65	44.57±7.16	174.17**	0.001
ADC 9	5	172.94±16.05	75.12±27.55	156.56**	0.001

注：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001 表示与溶媒组相比有显著差异。

结果显示：ADC 5 与 ADC 9 组均具有较好的药效，且小鼠体重稳定，耐受性良好，说明本发明药物连接子化合物所制备的抗体药物偶联物具有明显的肿瘤抑制作用以及良好的安全性。

7. 不同抗体偶联药物 NCI-N87 模型药效检测

人胃癌细胞 NCI-N87 (ATCC)，培养条件为 RPMI1640 培养基中加 10% 胎牛血

清，于 37℃、含 5%CO₂ 空气的培养箱中培养。当细胞呈指数生长期时，取培养液进行支原体检测后，收集细胞并计数。每只小鼠右侧肩胛处皮下接种 5×10⁶ 个 NCI-N87 细胞，悬浮于 0.1 ml PBS 基质胶中。待平均肿瘤体积生长至约 100~200mm³ 时，剔除肿瘤体积过小或过大的小鼠，剩余小鼠根据肿瘤体积和动物体重随机分为 8 组，每组 6 只，尾静脉注射给药，QW 给药两次。给药后每周 2 次测量肿瘤体积和体重，具体结果见表 10。

表 10 不同抗体偶联药物 NCI-N87 细胞荷瘤鼠模型的疗效分析

药物	剂量 (mg/kg)	VP0(mm3, mean±SEM)	VP42(mm3, mean±SEM)	TGI (%)	P 值
生理盐水	/	119.85±11.01	1351.59±211.29	/	/
ADC 3	10	120.27±9.29	875.71±114.43	38.67	0.0758
ADC 11	5	119.98±9.38	688.71±105.48	53.83*	0.0186
ADC 5	5	118.93±10.37	532.12±102.51	66.45**	0.0058
ADC 9	5	118.90±7.18	474.09±121.07	71.16**	0.0048

注：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001 表示与溶媒组相比有显著差异。

结果显示：各给药组小鼠体重稳定，耐受性良好，说明本发明药物连接子化合物所制备的抗体药物偶联物具有明显的肿瘤抑制作用以及良好的安全性。

8. 抗人 B7-H3 抗体偶联药物与 Fc 受体结合活性检测

用 ForteBio(Pall life sciences)检测 2#8890 抗体偶联药物与人 Fc 受体蛋白 CD16a、CD32a、CD32b、C1q、FcRn 动态亲和力。具体方法如下：在 PBST 溶液中用 SA Sensor (Pall life sciences) 分别捕获待测生物素化蛋白，用 PBST 将待测抗体及偶联物稀释到起始浓度 5000 nM 并 2 倍稀释 7 个浓度点，结合、解离并将测得结果在 Data Analysis 11.0 软件中打开，选用 1:1 模式，global fitting，对结果进行分析，获得结合速率、解离速率及亲和力常数，结果如表 11 所示。

表 11 抗体及偶联物结合 Fc 受体活性检测

ADC	Fc 受体蛋白	KD(M)
ADC 11	FcRn	1.07E-08
ADC 5	CD32a	不结合
ADC 5	FcRn	1.45E-08
ADC 9	CD32a	不结合
ADC 9	FcRn	1.5E-08

结果表明，本发明药物连接子化合物所制备的抗体药物偶联物不结合 Fc 受体 CD16a、CD32a、CD32b、C1q 蛋白，可降低 Fc 受体介导的非特异性杀伤，提高药物

安全性，同时这些偶联物保留了 **FcRn** 蛋白结合活性，不影响药物的半衰期。

9. 食蟹猴多次静脉注射给予抗人 **B7-H3** 抗体偶联药物后血清中总抗体（**Tab**）、**ADC**、**Payload** 药代动力学研究

采用 **ELISA** 和 **LC-MS/MS** 方法来进行食蟹猴血清中 **ADC**（**ADC 5**、**ADC 9**）、总抗体（**TA**b）、**Payload** 的定量检测。**ADC**（**ADC 5**、**ADC 9**）和总抗体（**TA**b）方法的标准曲线定量范围均为 **11.72~3000.00 ng/mL**，**Payload** 的方法线性范围为 **0.1~40 ng/mL**。**ADC**（**ADC 5**、**ADC 9**）和总抗体（**TA**b）方法均采用 **B7-H3** 蛋白作为捕获蛋白，包被于 **96** 孔酶标板中，随后总抗体（**TA**b）使用 **Goat Anti-Human IgG-HRP** 作为检测抗体；**ADC**（**ADC 5**、**ADC 9**）则先后分别使用 **Anti-Toxin mouse antibody** 和 **Goat Anti-Mouse IgG** 作为第二抗体和检测抗体。通过酶和底物的作用进行显色，于 **SpectraMax i3x**（**Molecular Devices**）酶标仪上读取，采用 **4-P** 参数法拟合出标准曲线并计算出各样本浓度。**ADC**（**ADC 5**、**ADC 9**）和总抗体（**TA**b）浓度与颜色的深浅呈正相关。**LC-MS/MS** 通过岛津 **LC 30-AD** 液相系统联用 **SCIEX QTRAP 5500+**（**SCIEX** 公司）质谱仪，采用**(+)****ESI** 离子化方式，选取多反应监测模式（**MRM**）分析。其中色谱柱为 **Xbridge C18 50*4.6 mm, 5 μm**，待测物化合物 **1-10** 离子对为 **510.2/435.2**，样品前处理使用乙腈进行蛋白沉淀。结果：食蟹猴多次静脉注射给予 **ADC5** 和 **ADC 9** 后，测试结果显示，本申请的药物连接子化合物所制备的 **ADC** 分子（例如 **ADC 5** 及 **ADC 9**）体现出良好的药代动力学特性，于体循环中较为稳定，游离毒素释放量少。

20 表 12 ADC 末次静脉注射 50 mg/kg 后血清中 **TA**b 的药代参数

供试品	T _{1/2} h	T _{max} h	C _{max} μg/mL	AUC _{0-t} h*μg/mL	AUC _{0-∞} h*μg/mL	V _z mL/kg	CL mL/h/kg	MRT _{last} h
ADC5	126.16	0.08	727.25	46406.21	79399.78	117.81	0.68	64.31
ADC9	161.44	0.50	1179.45	97998.68	188256.01	61.87	0.27	68.33

表 13 ADC 末次静脉注射 50mg/kg 后血清中 **ADC** 的药代参数

供试品	T _{1/2} h	T _{max} h	C _{max} μg/mL	AUC _{0-t} h*μg/mL	AUC _{0-∞} h*μg/mL	V _z mL/kg	CL mL/h/kg	MRT _{last} h
ADC5	113.80	0.29	731.80	50982.95	81318.16	102.58	0.66	62.92
ADC9	145.63	0.29	1242.45	95874.14	174007.67	60.21	0.29	67.38

表 14 ADC 末次静脉注射 50mg/kg 后血清中 **Payload** 的药代参数

供试品	T _{1/2} h	T _{max} h	C _{max} ng/mL	AUC _{0-t} h*ng/mL	AUC _{0-∞} h*ng/mL	CL F obs mL/h/kg	MRT _{last} h
ADC5	110	0.083	3.03	99	157	347008	57
ADC9	90	0.083	8.20	96	119	422692	36

10.重复给药毒性试验

重复给药毒性试验包括食蟹猴静脉注射 ADC5 和 ADC 9 的给药 4 次的重复毒性试验。

本试验共设 3 个组，1 只/组/性别，分别静脉注射给予 30 mg/kg 的 ADC5、ADC 9 以及生理盐水（体积：10mL/kg），每周给药 1 次，共给药 2 次；之后提高剂量至 50 mg/kg 的 ADC 5、ADC 9 以及生理盐水，每周给药 1 次，共给药 2 次。试验中，未见供试品相关的死亡或濒死。ADC 5 给药组给药期间可见动物食欲减退、脱毛、皮肤色素沉着和体重降低。雌猴可见 WBC、NEUT、LYM、MONO 降低。雄猴可见 RBC、HGB、HCT 降低，FGB 升高，恢复期有恢复趋势。ADC 9 给药组给药期间可见动物食欲减退。雌猴可见 WBC、NEUT、LYM、MONO 降低和 FBG 升高。雄猴可见 FBG 升高、RBC、HGB、HCT 降低。恢复期间，另见给药局部色素沉着和轻微脱毛，其他改变均有恢复趋势。在本实验条件下，食蟹猴每周 1 次，连续 2 周，静脉注射 30 mg/kg 的 ADC 5 和 ADC 9；随后提高剂量，每周 1 次，连续 2 周，静脉注射 50 mg/kg 的 ADC 5 和 ADC 9。所有动物均可耐受。最高无严重毒性剂量（HNSTD）为 50 mg/kg。

11. 抗体-药物偶联物对小鼠皮下移植瘤模型上的肿瘤生长抑制作用

分别通过尾静脉注射给予皮下移植人乳腺鳞状癌细胞 HCC1806 小鼠 CDX 模型含有本发明 ADC 的制剂，每周 2 次测定肿瘤体积和动物体重变化，计算本发明 ADC 对荷瘤小鼠的抑瘤疗效。

实验动物：Balb/c Nude 小鼠(成都药康生物科技有限公司)

细胞系：人乳腺鳞状癌细胞 HCC1806(ATCC)

实验方法：

用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液，在 37℃，5% CO₂ 的条件下培养 HCC1806 细胞。收集指数生长期的 HCC1806 细胞，PBS 重悬至适合浓度，接种于雌性 Balb/c-nude 小鼠皮下建立乳腺鳞状癌模型。待肿瘤平均体积约 200mm³ 左右时，根据肿瘤大小随机分组并分别给药，各组别及其给药剂量依次为：溶媒对照组(即阴性对照,Vehicle 组)：给予 0.9% Nacl 注射液；ADC 5：给药剂量为 3 mg/kg；ADC 9：给药剂量为 3 mg/kg；ADC 11：给药剂量为 3.16 mg/kg 组；ADC 17：给药剂量为 3.32 mg/kg。各组均采用尾静脉注射(i.v.)，在 Day 0 给药,共给药 1 次。给药后每周 2 次测量小鼠体重以及用游标卡尺测量肿瘤长径和短径，并按如下计算公式计算肿瘤体积： $V = 0.5 a \times b^2$ ，其中 a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径，每天观察记录动物死亡情况。

- 采用以下公式计算肿瘤生长抑制率 **TGI (%)**:
- $V_{T末} > V_{T0}$, **TGI (%)** = $[1 - (V_{T末} - V_{T0}) / (V_{C末} - V_{C0})] * 100\%$ 或 $V_{T末} \leq V_{T0}$, **TGI (%)** = $[1 - (V_{T末} - V_{T0}) / V_{T0}] * 100\%$ 。
- 其中 $V_{T末}$:治疗组实验结束时肿瘤体积均值
- 5 V_{T0} :治疗组给药开始时肿瘤体积均值
- $V_{C末}$:阴性对照组实验结束时肿瘤体积均值
- V_{C0} :阴性对照组给药开始时肿瘤体积均值
- 采用以下公式计算肿瘤相对增殖率 **T/C (%)**:
- $T/C = (V_{T末} / V_{T0}) / (V_{C末} / V_{C0})$ 。
- 10 本发明 ADC 对 HCC1806 乳腺鳞状癌移植瘤模型的肿瘤生长抑制作用显著。在第 14 天, 与 Vehicle 组相比, 本发明 ADC 5, ADC 9, ADC 11 和 ADC 17 的肿瘤生长抑制率(TGI)分别为 96.68%、98.50%、82.61%、86.69%, 与对照组相比具有显著性差异。治疗期间各治疗组无动物死亡及显著地动物体重降低, 未见明显的药物毒性反应, 小鼠对本发明 ADC 耐受性良好。具体结果见表 15。
- 15

表 15 不同抗体药物偶联物对 HCC1806 细胞荷瘤鼠模型的疗效分析

组别	剂量 (mg/kg)	Day 14			
		肿瘤体积(mm ³) ($\bar{x} \pm SEM$)	TGI (%)	T/C (%)	P 值 (vs.Vehicle)
Vehicle	-	1274.42±80.85	-	-	-
ADC 5	3	218.24±57.69	96.68	16.99	0.0000
ADC 9	3	201.74±45.01	98.50	15.42	0.0000
ADC 11	3.16	370.35±41.88	82.61	29.12	0.0000
ADC 17	3.32	329.35±72.16	86.69	25.40	0.0000

- 注:TGI 为肿瘤生长抑制率, T/C 为相对肿瘤增殖率。
- 20 12. 抗体药物偶联物对体外细胞活性的抑制作用
- (1) 细胞铺板: 首先采用相应的培养基培养肿瘤细胞 **NCI-H1975**、**HT-29**, 用胰酶消化细胞, 离心后重悬细胞计数, 调整细胞至合适的浓度进行铺板。肿瘤细胞来源见表 16。

表 16: 肿瘤细胞来源

细胞名称	肿瘤类型	来源
NCI-H1975	人肺腺癌细胞	南京科佰生物
HT-29	人结肠癌细胞	中国科学院细胞库

待细胞贴壁后，移除细胞中培养基，将稀释好的抗体药物偶联物 **ADC 19** 加入到上述板孔中，孵育 **96** 小时。

体外细胞活性检测：孵育结束后，每孔加入 **Cell Counting-Lite™ 2.0** 试剂(**Vazyme/**
5 诺唯赞) **50 μL**，避光振荡混匀，反应 **10 min** 后即可进行检测，酶标仪（厂家：**BMG**，
型号：**PERAStar-FS**）读数。通过加入 **Cell Counting-Lite™**，不含细胞的培养基孔
获得背景 **RLU**，有细胞但不含化合物的培养孔获得对照 **RLU**。细胞抑制率= $1 - (\text{样品 RLU} - \text{背景 RLU}) / (\text{细胞对照 RLU} - \text{背景 RLU}) \times 100\%$ ，按照四参数模型拟合曲线，
计算 **ADC 19** 的半数抑制浓度 (**IC₅₀**)。

10 **ADC 19** 对 **NCI-H1975** 细胞系的半数抑制浓度 (**IC₅₀**) **5.00 μg/mL**；**ADC 19** 对
HT-29 细胞系的半数抑制浓度 (**IC₅₀**) **4.56 μg/mL**。

结果说明本发明的药物连接体所形成的抗体药物偶联物（例如 **ADC19**）具有明显的肿瘤细胞杀伤活性。

13. 抗人 **Her2** 抗体偶联药物在 **NCI-N87** 模型的药效检测

15 用含 **10%**胎牛血清的 **RPMI1640** 培养液,在 **37℃,5% CO₂** 的条件下培养 **NCI-N87**
细胞。收集指数生长期的 **NCI-N87** 细胞,**PBS** 重悬至适合浓度,接种于雌性 **Balb/c-nu**
小鼠皮下建立胃癌模型。待肿瘤平均体积约 **160mm³** 左右时,根据肿瘤大小随机分组,
依次为:溶媒对照组(即阴性对照,**Vehicle** 组),本发明 **Trastuzumab-A-05 1 mg/kg** 组,
20 **Trastuzumab-A-14 1 mg/kg** 组, **Trastuzumab-A-24 1 mg/kg** 组。各组均采用尾静脉注
射(**i.v.**),在 **Day0、Day7、Day14** 给药,共给药 **3** 次。给药后每周 **2** 次测量小鼠体重以及用
游标卡尺测量肿瘤长径和短径,并按如下计算公式计算肿瘤体积: $V = 0.5 a \times b^2$,其中 **a**
和 **b** 分别表示肿瘤的长径和短径,每天观察记录动物死亡情况。

本发明 **ADC** 对 **NCI-N87** 胃癌移植瘤模型的肿瘤生长抑制作用显著。与溶媒对照
组相比,本发明 **Trastuzumab-A-05 1 mg/kg** 组, **Trastuzumab-A-14 1 mg/kg** 组和
25 **Trastuzumab-A-24 1 mg/kg** 组的肿瘤生长抑制率(**TGI**)分别为 **81.62%、107.38%**和
61.43%。Day30 各治疗组无动物死亡及显著地动物体重降低,未见明显的药物毒性反
应,治疗期间小鼠对本发明药物连接子化合物所制备的 **ADC** 耐受性良好。具体结果见
表 **17**。

表 17 人胃癌细胞 **NCI-N87 CDX** 模型

组别	剂量 (mg/kg)	Day26			
		肿瘤体积(mm3) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	TGI (%)	T/C (%)	P 值 (vs. Vehicle)
溶媒对照	-	506.05±102.02	-	-	-
Trastuzumab-A-05	1	194.42±53.15	81.62	37.27	<0.05
Trastuzumab-A-14	1	111.44±37.23	107.38	21.91	<0.01
Trastuzumab-A-24	1	270.12±29.44	61.43	52.76	<0.05

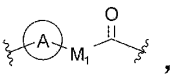
注:TGI 为肿瘤生长抑制率,T/C 为相对肿瘤增殖率。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解，根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

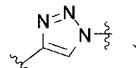
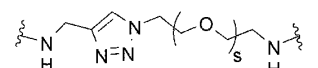
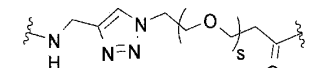
1. 一种药物连接子化合物，其具有式 $G-M-[L-E-D]_x$ 所示结构，其中：

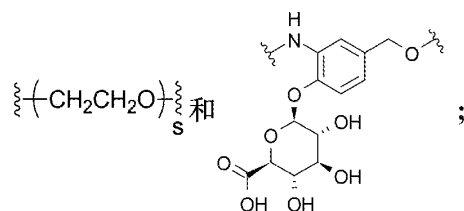
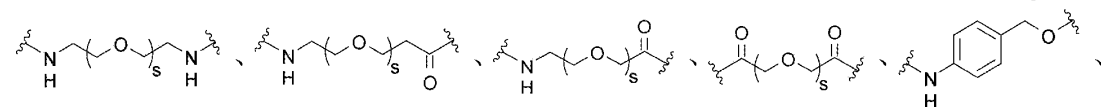
G 是能够与特异性氨基酸或糖基发生反应的官能团或离去基团；

M 是与 G 相连的接头，所述的 M 为 ，

其中，环 A 为 5-6 元脂杂环、或 5-20 元芳香族环系，所述脂杂环和芳香族环系任选地被一个或多个选自氧基 (=O)、卤素、氰基、氨基、羧基、巯基和 C₁₋₆ 烷基的基团取代；M₁ 选自单键和 C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基，所述的 C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基任选地被一个或多个适合的取代基所取代；

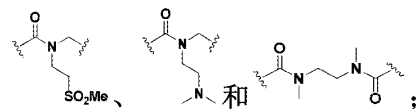
L 是连接接头 M 和 E 之间的连接子，L 选自由下述的一个或多个组成的结构：

C₁₋₆ 亚烷基、-N(R')-、羰基、-O-、天然氨基酸或非天然氨基酸及其类似物、以及氨基酸组成的短肽、、、、



其中 R' 代表氢、C₁₋₆ 烷基或含 1-10 个 EO 单元的聚乙二醇片段；s 选自 1-20 的整数；

E 是连接 L 和 D 的结构片段，其中 E 为单键、-NHCH₂-或选自以下结构：、

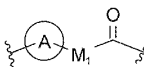


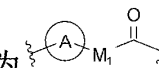
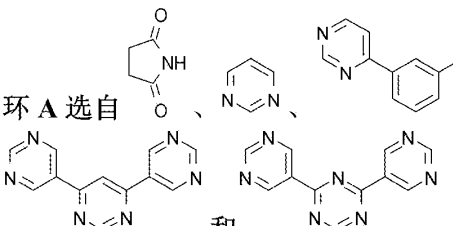
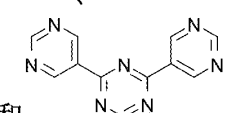
D 是细胞毒性药物片段；和/或

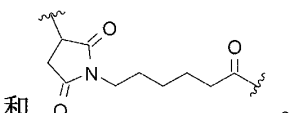
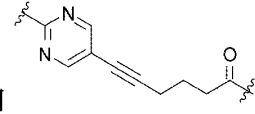
x 选自 1 至 10。

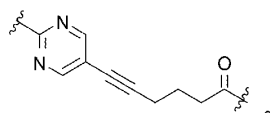
2. 权利要求 1 所述的药物连接子化合物，所述的 G 选自卤素、卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 磺酰基、卤代 C₁₋₆ 磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段，所述的卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 磺酰基、卤代 C₁₋₆ 磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺酸酯基、C₁₋₆ 亚磺基、烯基、炔基及含炔基的结构片段

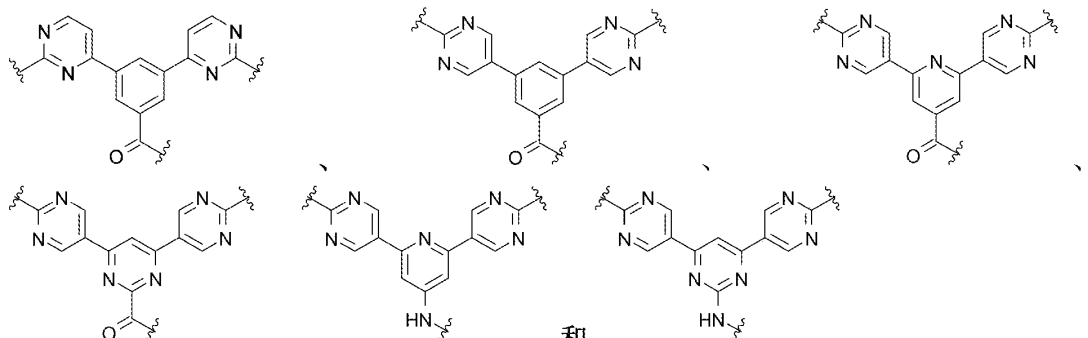
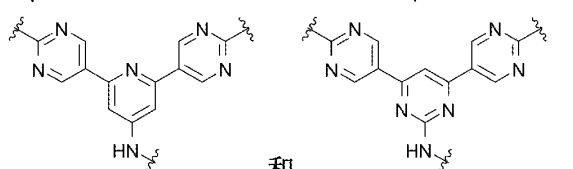
任选地被一个或多个适合的取代基所取代。

3. 权利要求 1 或 2 所述的药物连接子化合物, 所述的 M 为 , 其中环 A 为 5 元脂杂环、6 元杂芳环、或由一个以上 (例如 2 个) 的 6 元杂芳环与苯环或 6 元杂芳环通过单键连接形成的多环, 所述脂杂环任选地被一个或多个选自氧基 (=O)、卤素和 C₁₋₄ 烷基的基团取代; M₁ 选自单键、C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基, 所述的 C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基、C₂₋₂₀ 亚炔基或胺基任选地被一个或多个适合的取代基所取代。

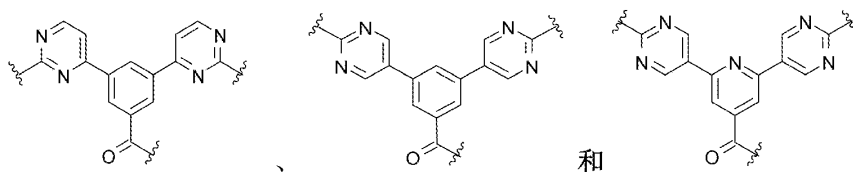
4. 权利要求 1-3 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 M 为 , 其中环 A 选自  和 ; M₁ 选自单键和 C₁₋₆ 亚烷基、C₂₋₆ 亚烯基、C₂₋₆ 亚炔基或胺基, 所述的 C₁₋₆ 亚烷基、C₂₋₆ 亚烯基、C₂₋₆ 亚炔基或胺基任选地被一个或多个适合的取代基所取代。

5. 权利要求 1-4 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 M 选自  和 .

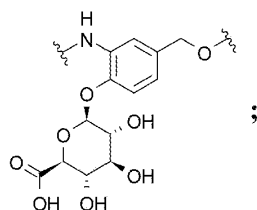
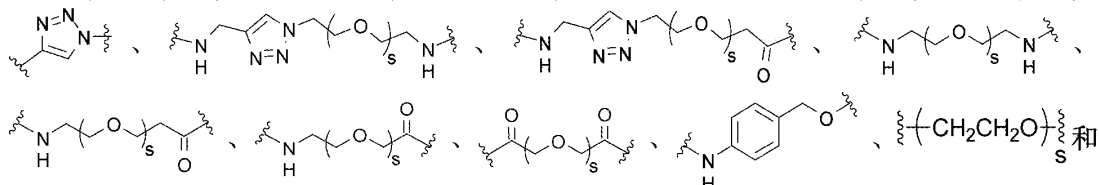
6. 权利要求 5 所述的药物连接子化合物, 所述的 M 选自 .

7. 权利要求 1-4 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 M 选自  和 .

8. 权利要求 1-4 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 M 选自

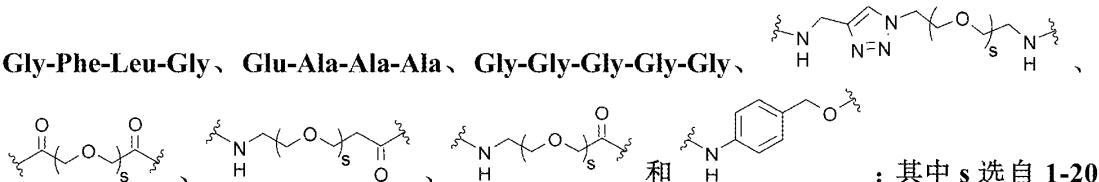


9. 权利要求 1-8 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 L 选自由下述的一个或多个组成的结构: C₁₋₆ 亚烷基、-N(R')-, 羰基、-O-, Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、Lys(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)_rOCH₃), Ala-Ala、Ala-Lys、Ala-Lys(Ac)、Ala-Pro、Gly-Glu、Gly-Gly、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Val-Ala、Val-Lys、Val-Lys(Ac)、Val-Cit、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Leu-Ala-Glu、Gly-Gly-Arg、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly-Gly、Gly-Ser-Lys、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ser-Ala-Pro、Val-Leu-Lys、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Val-Ala、Gly-Phe-Leu-Gly、Glu-Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly、



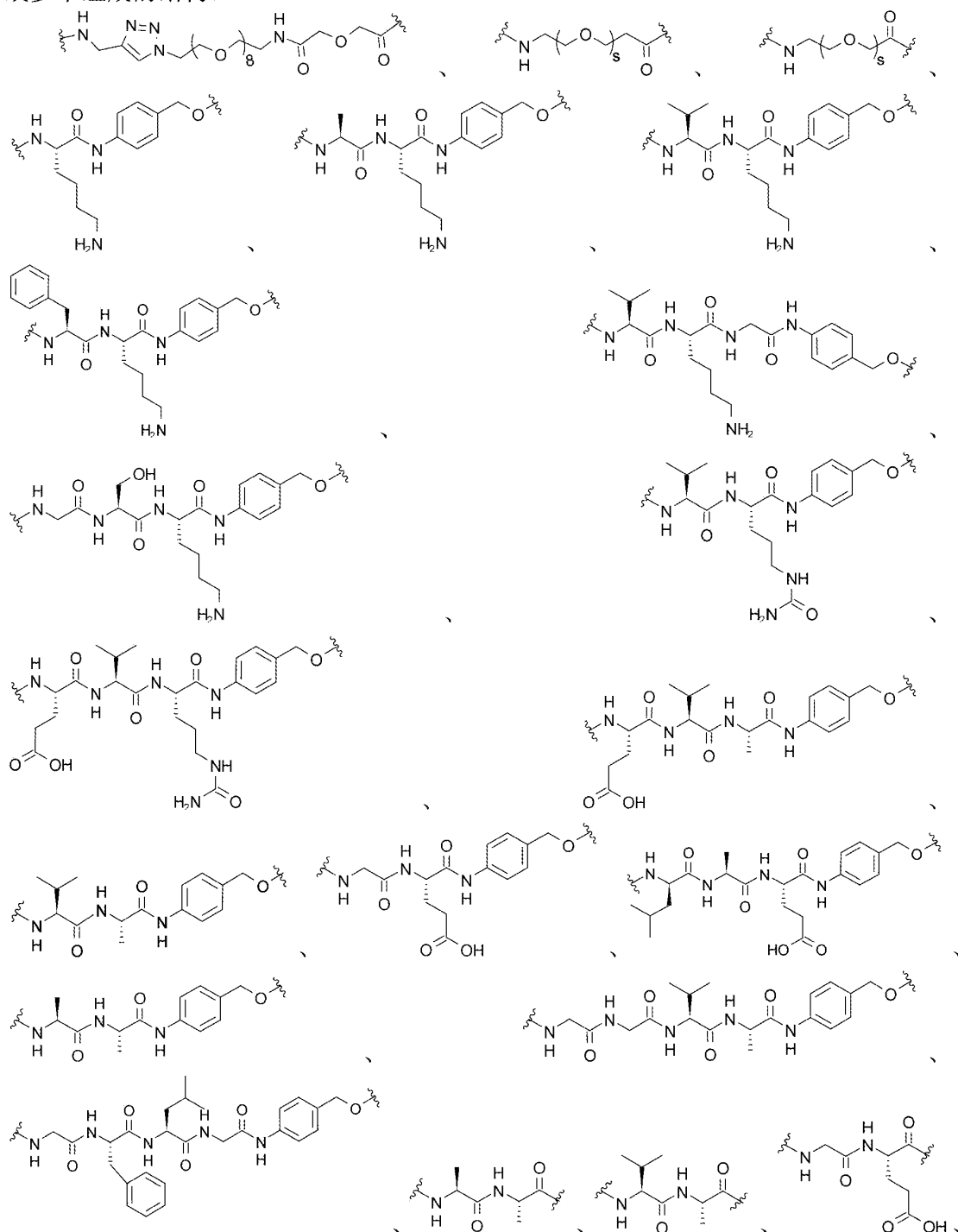
其中 R' 代表氢、C₁₋₆ 烷基或含 1-10 个 EO 单元的聚乙二醇片段; s 选自 1-20 的整数。

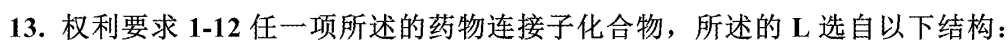
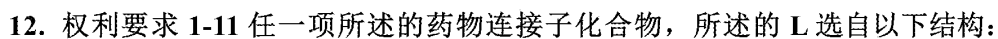
10. 权利要求 1-9 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 L 选自由下述的一个或多个组成的结构: C₁₋₆ 亚烷基、羰基、-NH-, Ala-Ala、Ala-Lys、Ala-Pro、Gly-Glu、Gly-Gly、Phe-Lys、Val-Ala、Val-Lys、Val-Cit、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Leu-Ala-Glu、Gly-Gly-Arg、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly-Gly、Gly-Ser-Lys、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ser-Ala-Pro、Val-Leu-Lys、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Val-Ala、Gly-Phe-Leu-Gly、Glu-Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly、

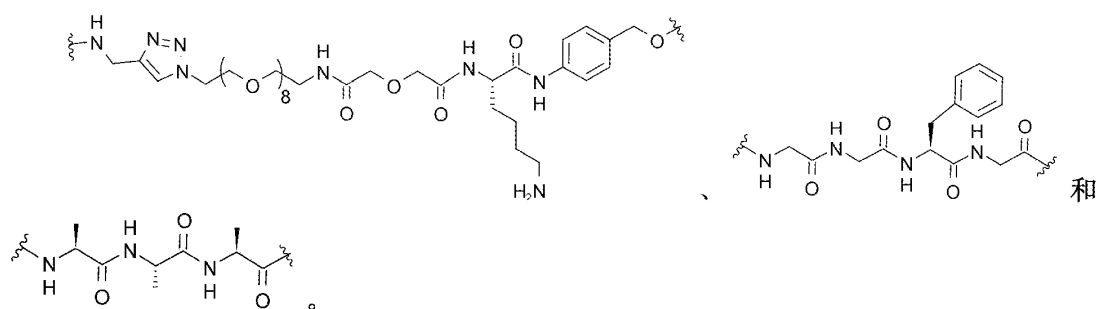


的整数。

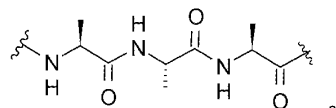
11. 权利要求 1-10 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 L 选自由下述的一个或多个组成的结构:



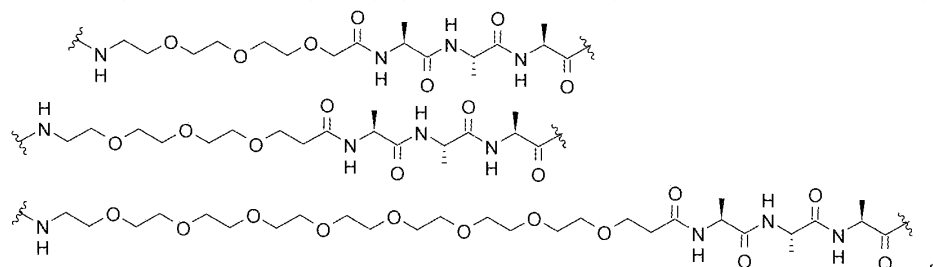




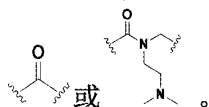
14. 权利要求 1-13 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 L 选自以下结构:



15. 权利要求 1-12 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 L 选自以下结构:

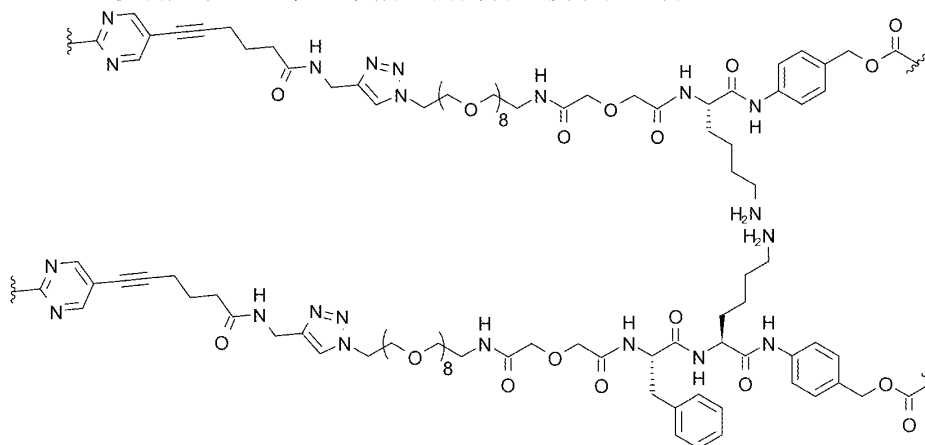


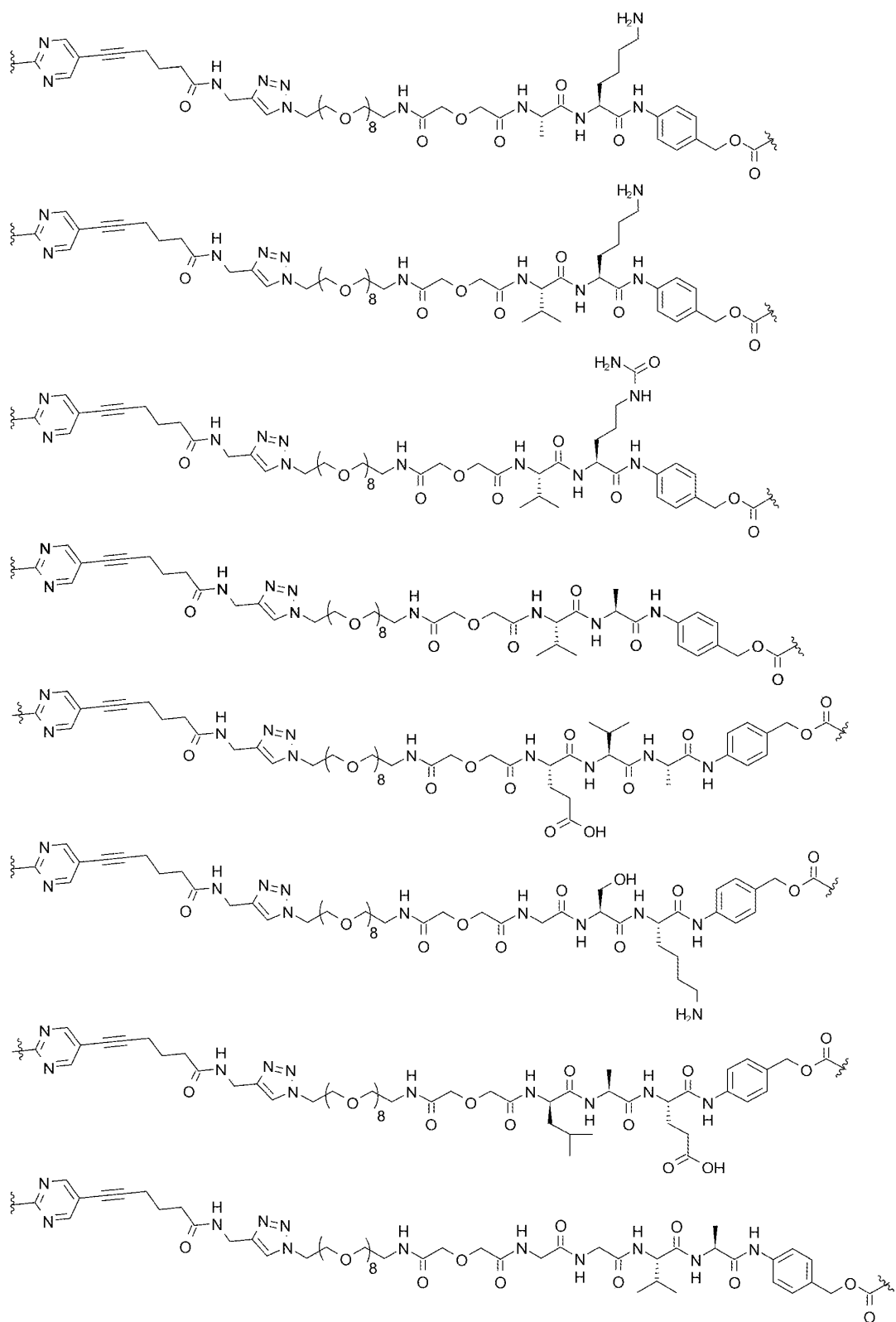
16. 权利要求 1-15 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的 E 为单键、-NHCH₂-、

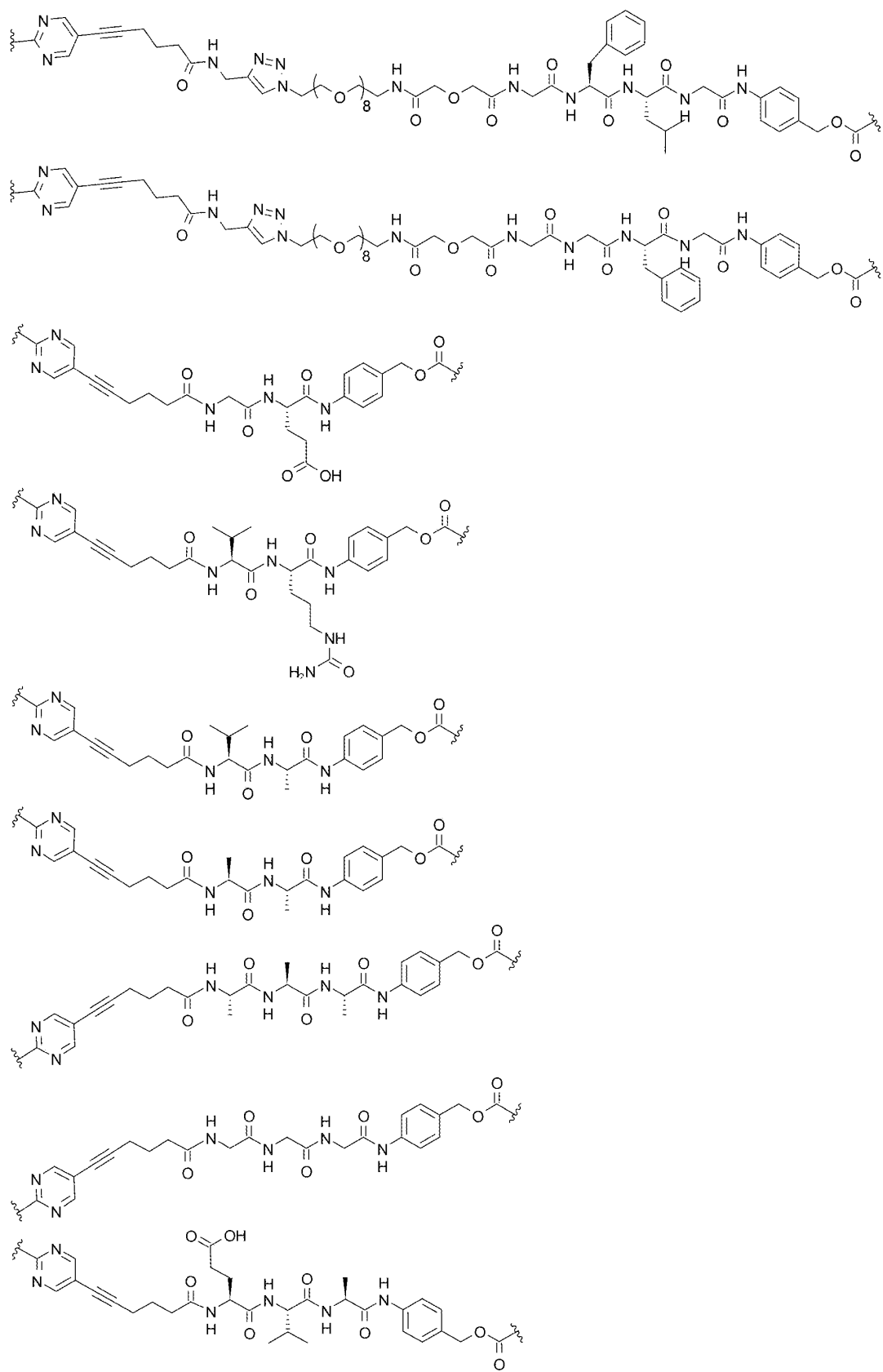


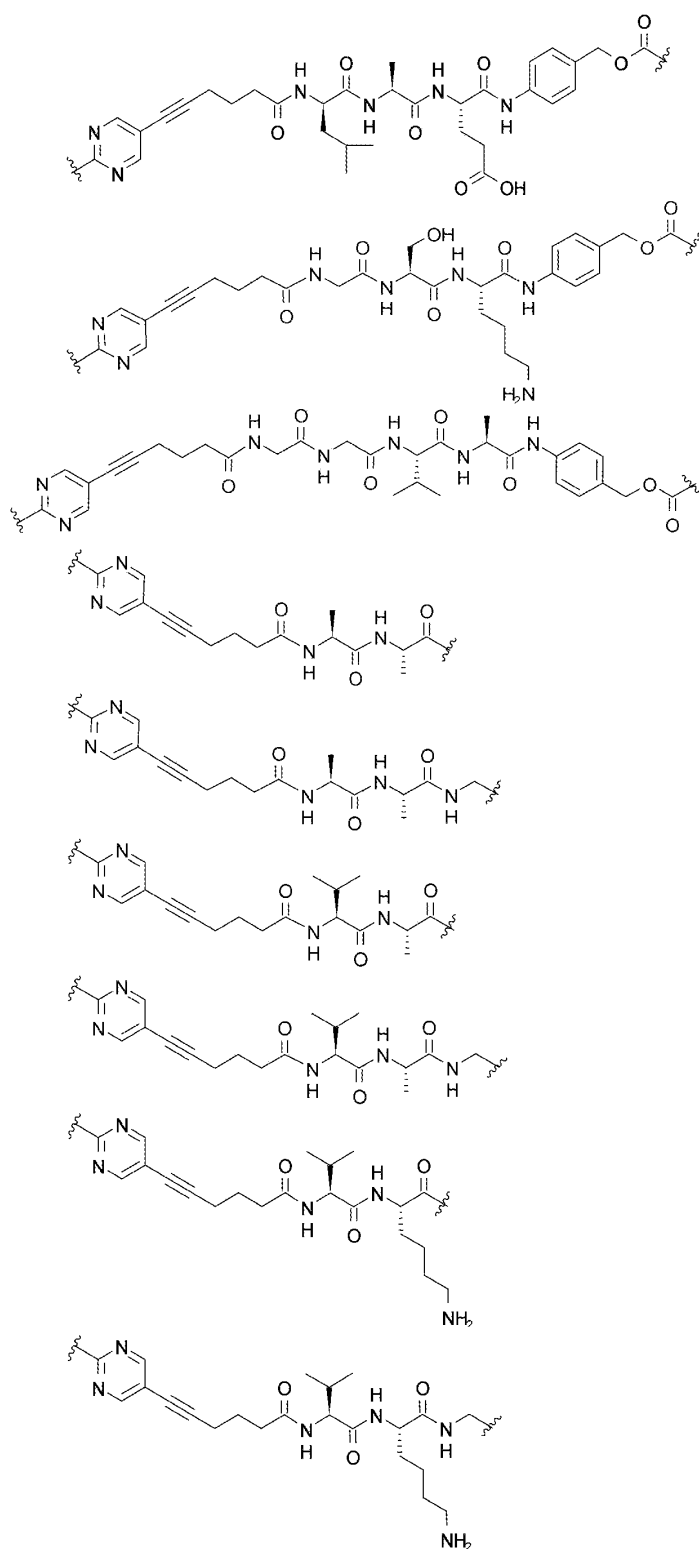
17. 权利要求 16 所述的药物连接子化合物, 所述的 E 为-NHCH₂-。

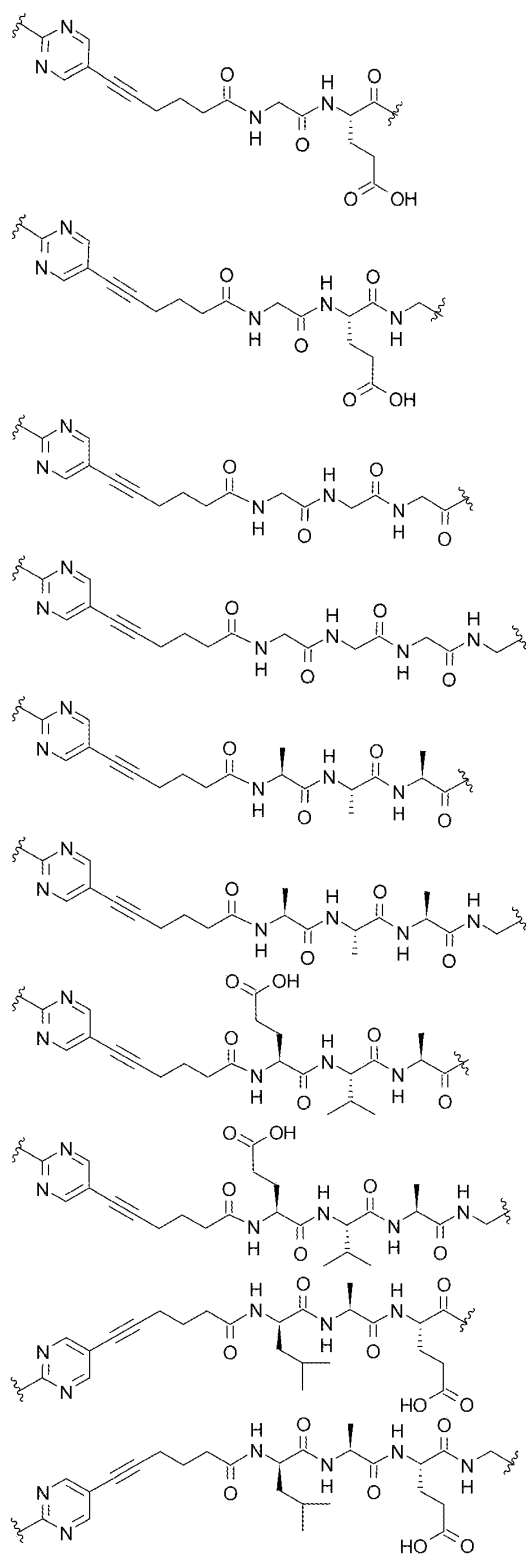
18. 权利要求 1-17 任一项所述的药物连接子化合物, ---M---L---E--- 选自以下结构:

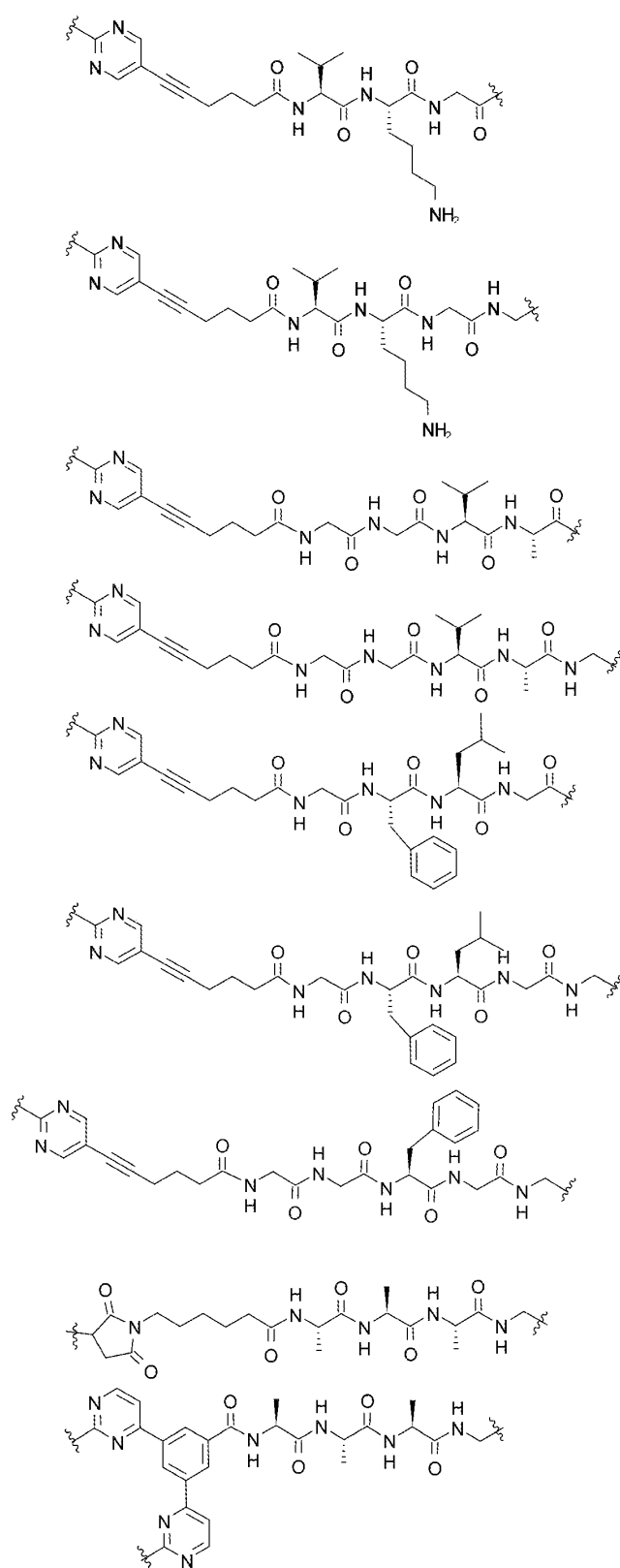


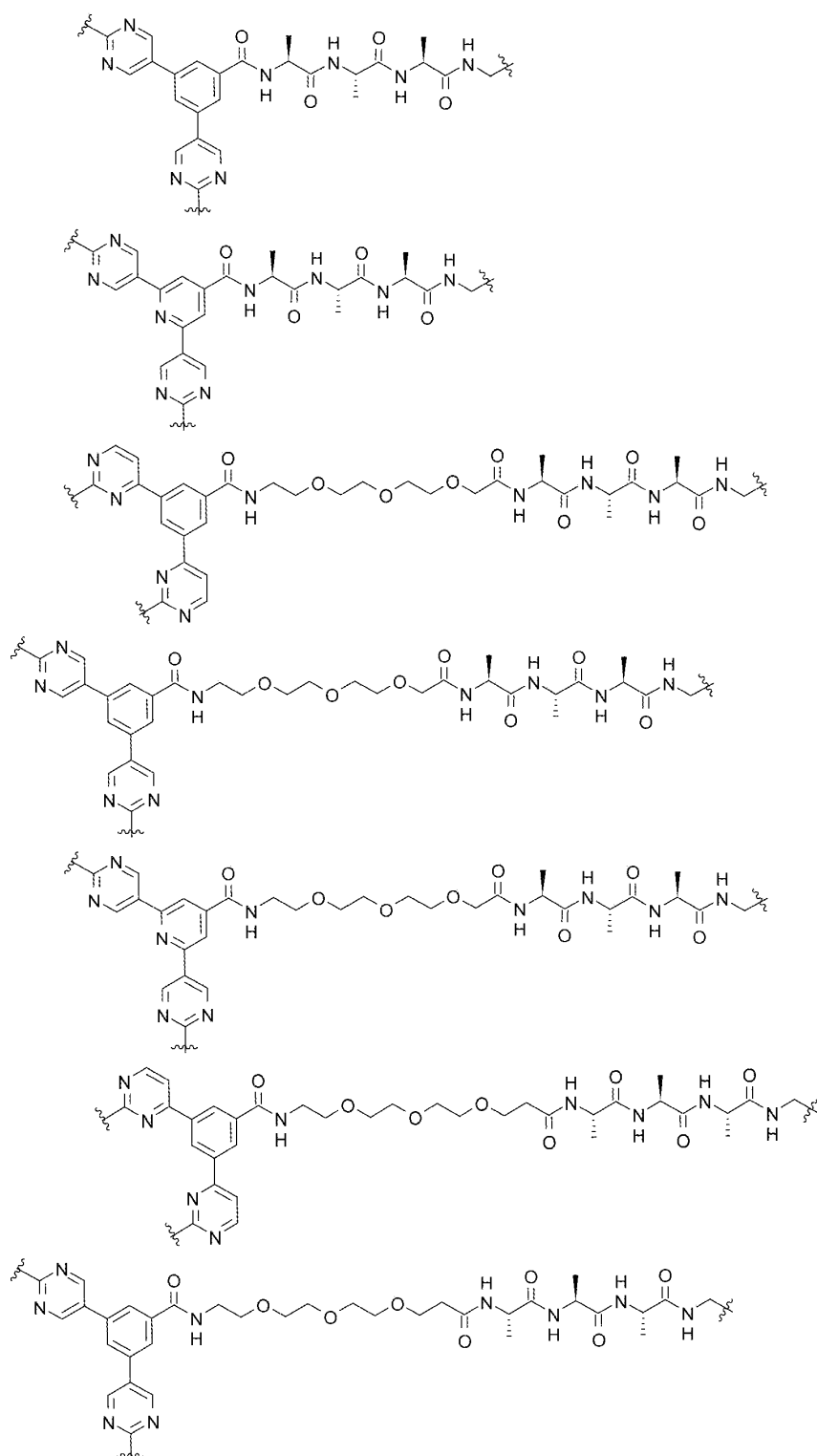


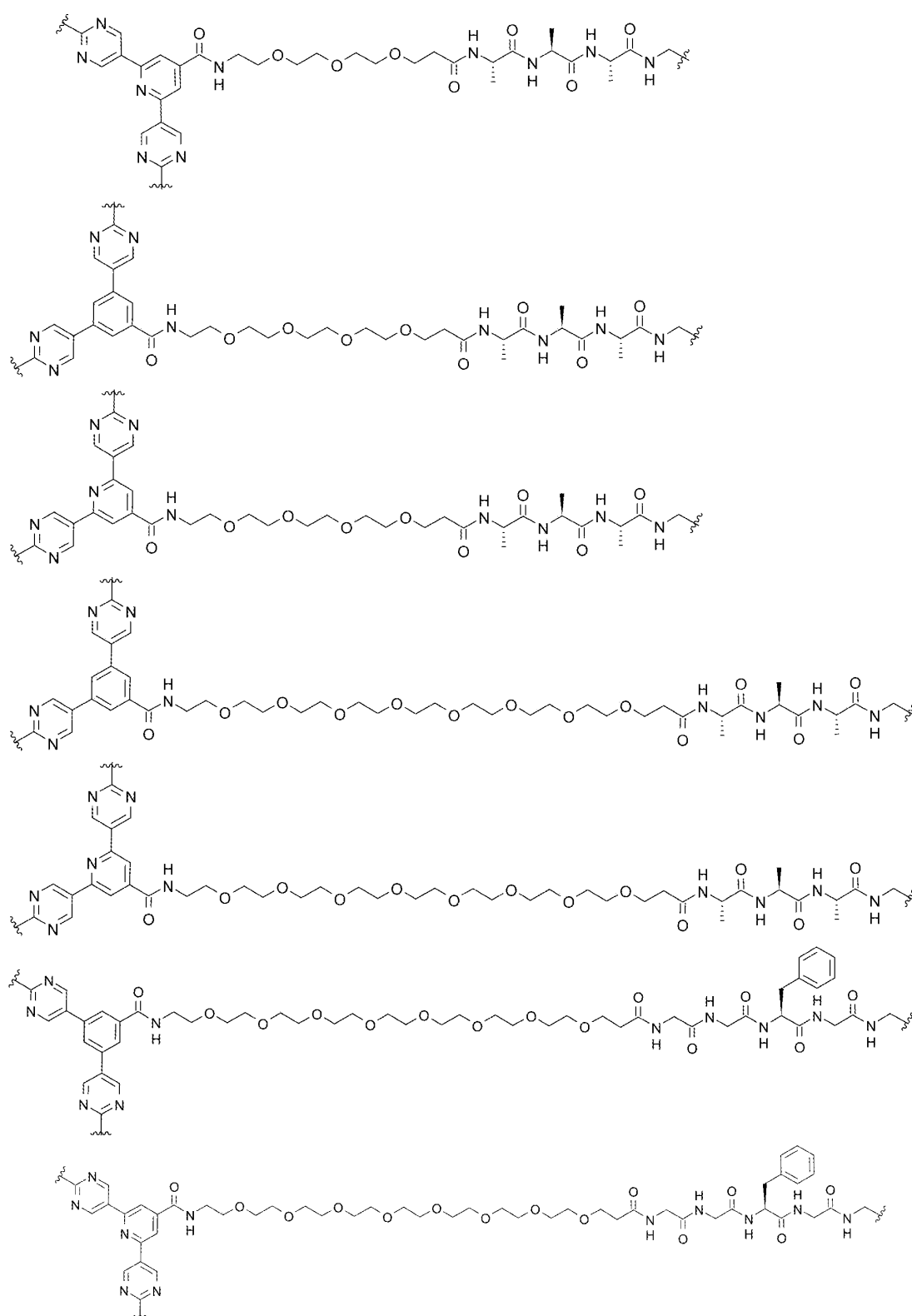




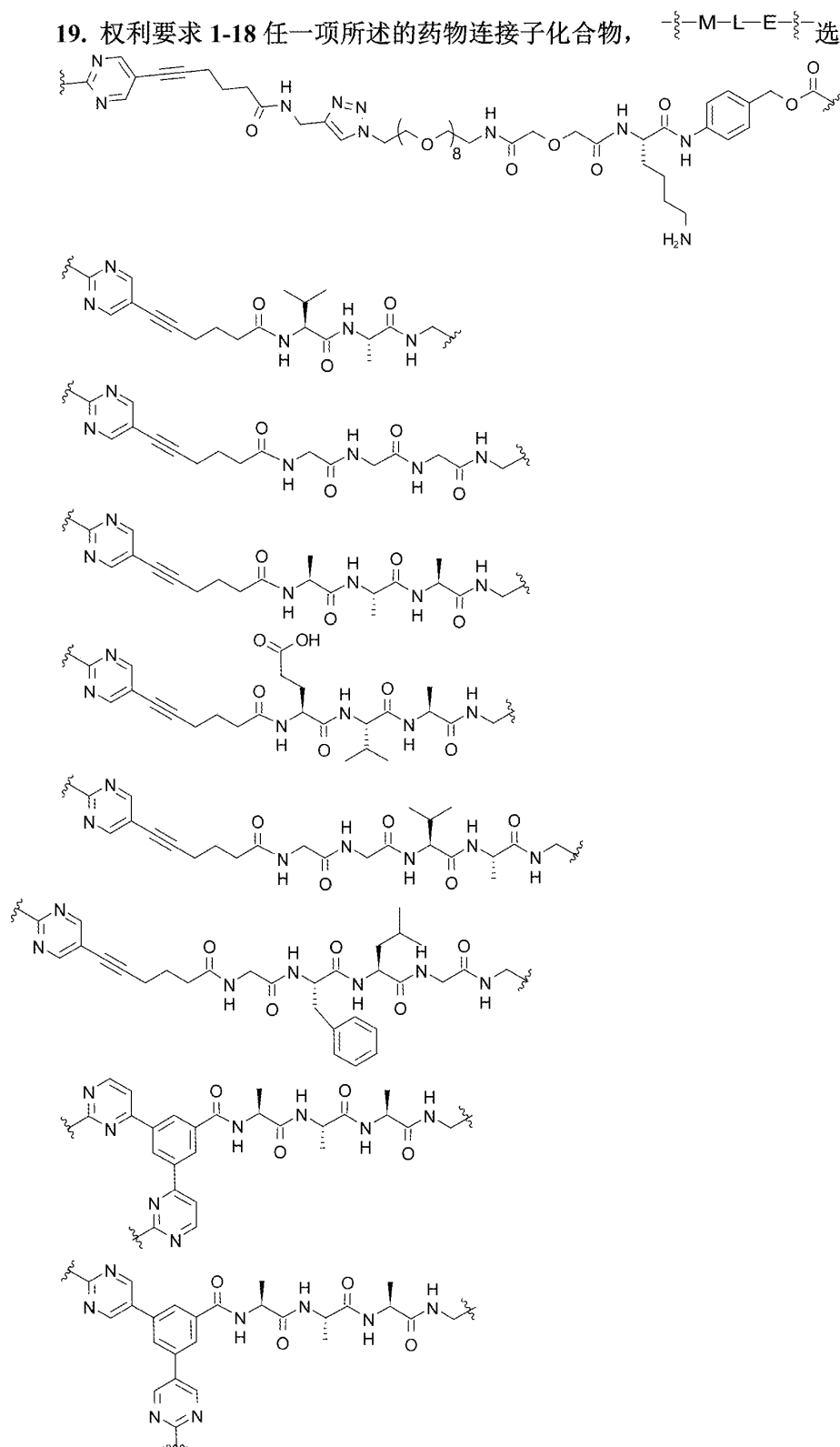


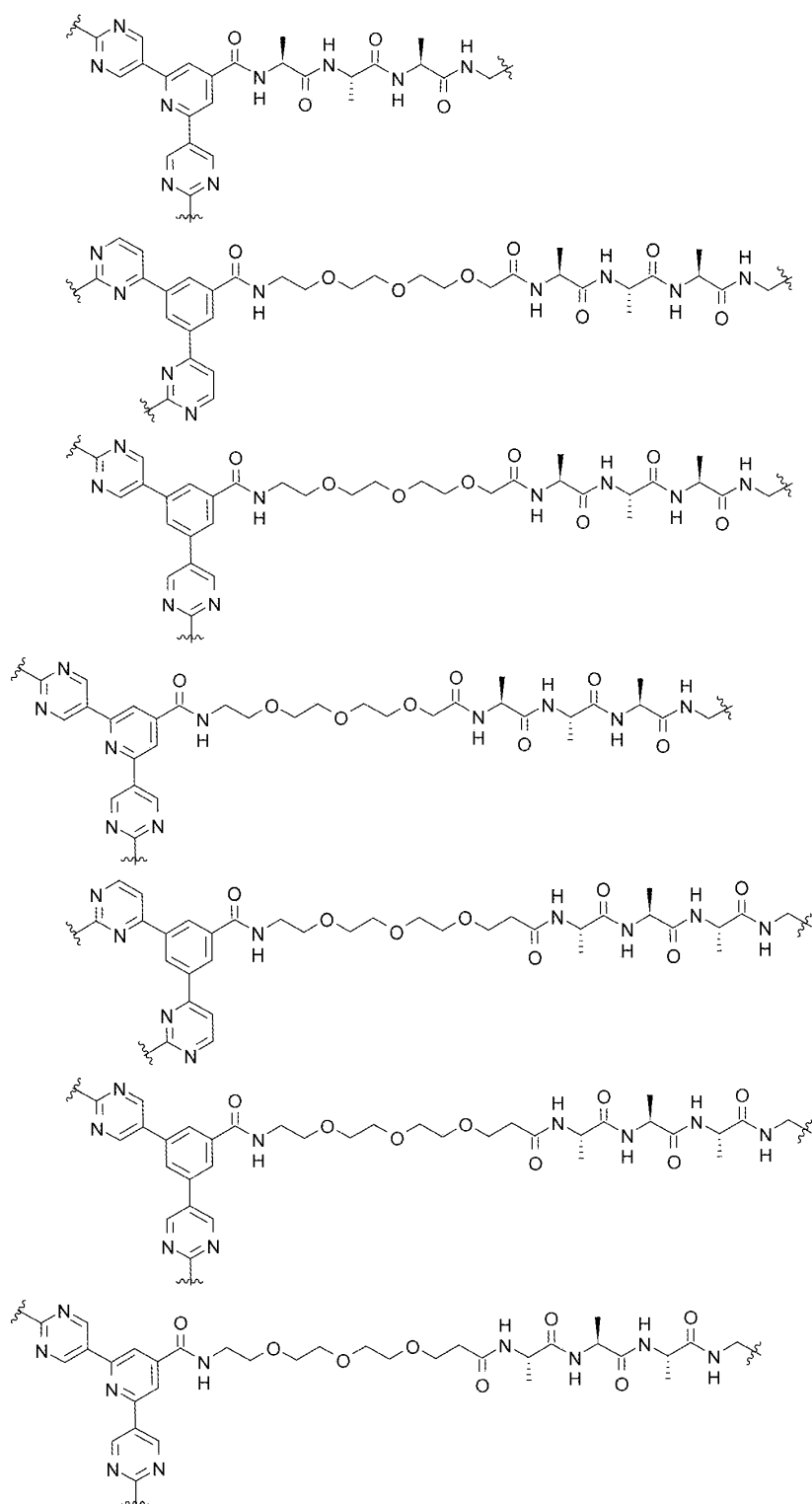


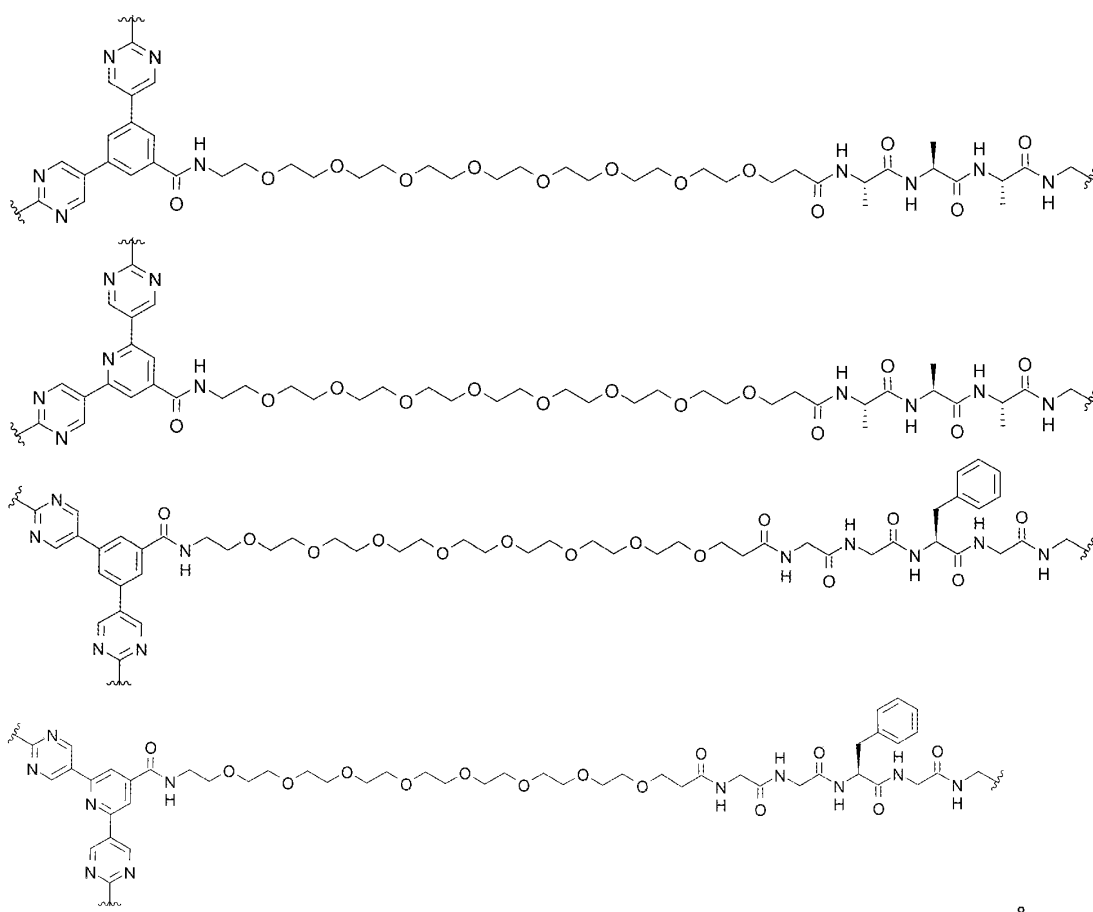




19. 权利要求 1-18 任一项所述的药物连接子化合物, $\sim\text{M-L-E}\sim$ 选自以下结构:



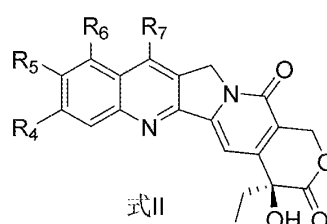
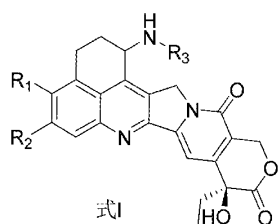




20. 权利要求 1-19 任一项所述的药物连接子化合物，所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA 嵌入剂、DNA 拓扑异构酶抑制剂和 RNA 聚合酶抑制剂。

21. 权利要求 1-20 任一项所述的药物连接子化合物，所述微管蛋白抑制剂为奥瑞他汀类化合物或美登素类化合物；所述 DNA 嵌入剂为吡咯并苯二氮卓 PBD；所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为拓扑异构酶 I 抑制剂（例如，喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、或卢比替康）或拓扑异构酶 II 抑制剂（例如，阿霉素、PNU-159682、多卡米星、柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素、或依托泊苷）；所述 RNA 聚合酶抑制剂为 α -鹅膏蕈碱（ α -amanitin）或其药学上可接受的盐、酯或类似物。

22. 权利要求 1-21 任一项所述的药物连接子化合物，所述细胞毒性药物选自式 I、式 II 所示化合物、或式 I、式 II 所示化合物的药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药：



其中, R_1, R_2 各自独立地选自 C_{1-6} 烷基和卤素;

R_3 选自 H 和 $-CO-CH_2OH$;

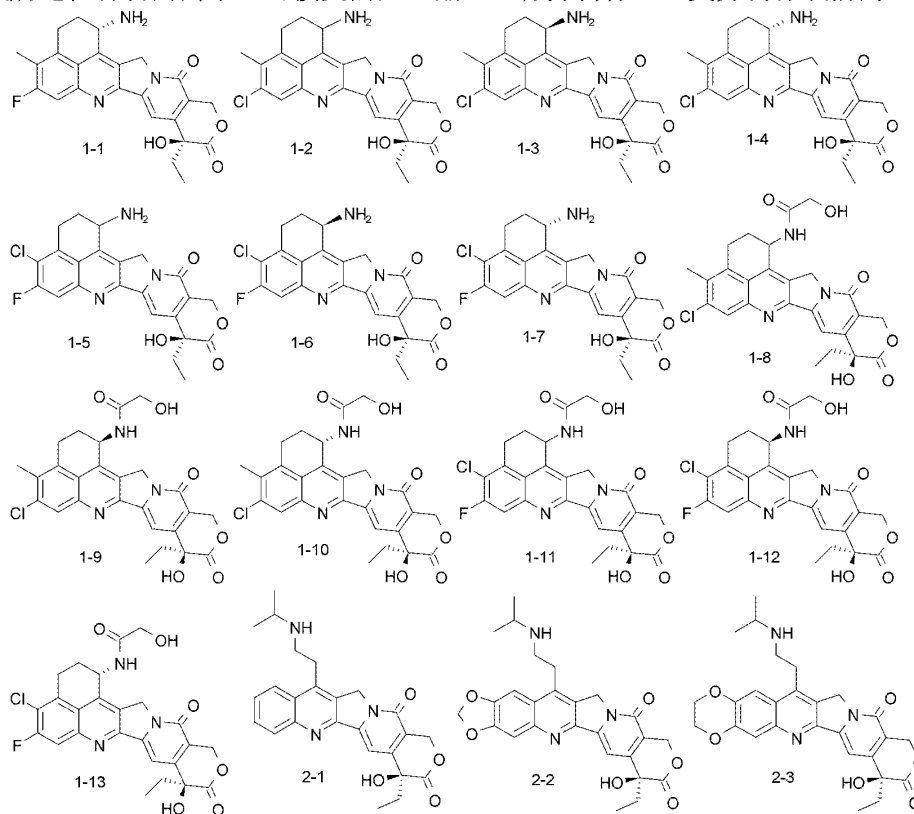
R_4 和 R_5 各自独立地选自 H、卤素和羟基; 或者 R_4 和 R_5 与相连碳原子连接成 5-6 元含氧杂环;

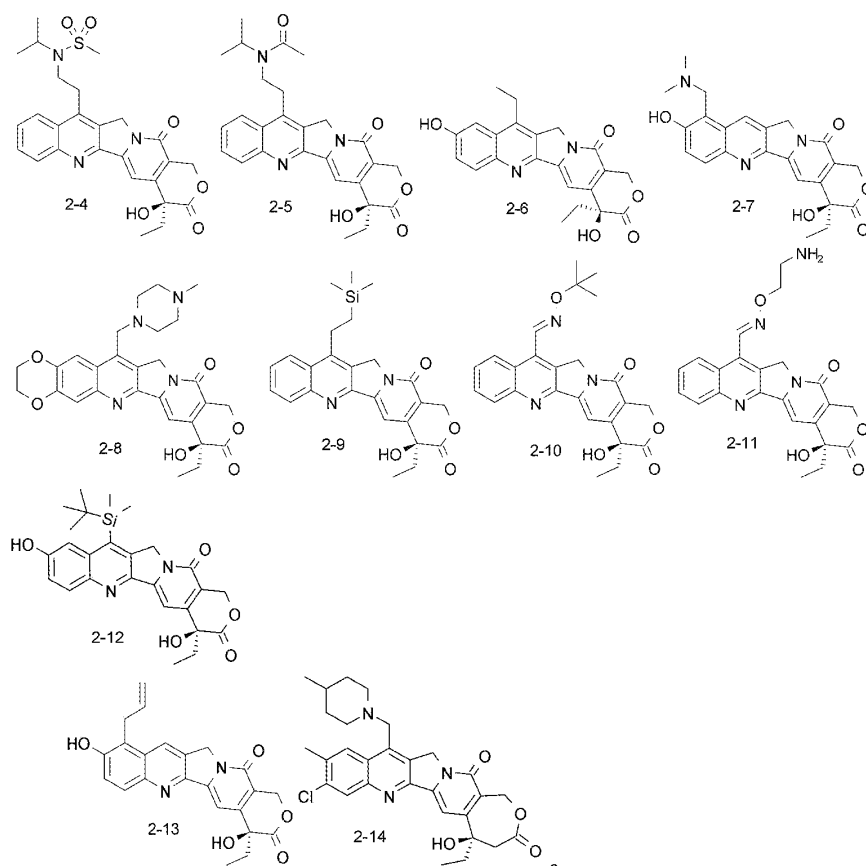
R_6 选自氢或 $-C_{1-4}$ 亚烷基- NR_aR_b ;

R_7 选自 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-4}$ 亚烷基- NR_aR_b ;

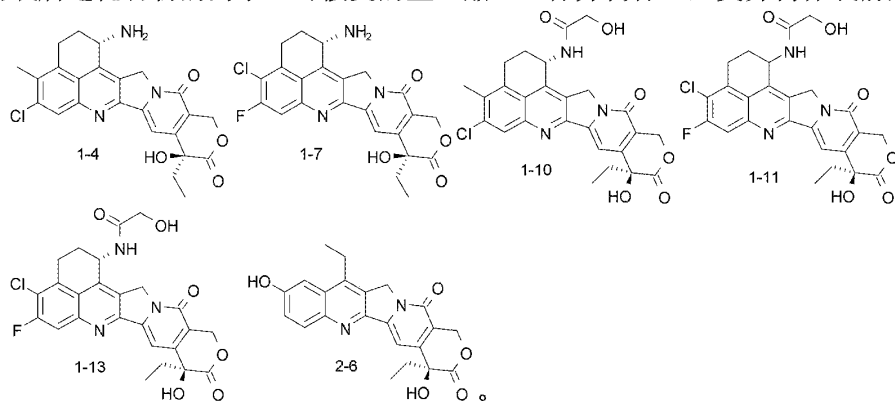
其中 R_a, R_b 在每次出现时各自独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基和 $-CO-C_{1-6}$ 烷基。

23. 权利要求 1-22 任一项所述的药物连接子化合物, 所述细胞毒性药物选自以下化合物或所述化合物的药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药:

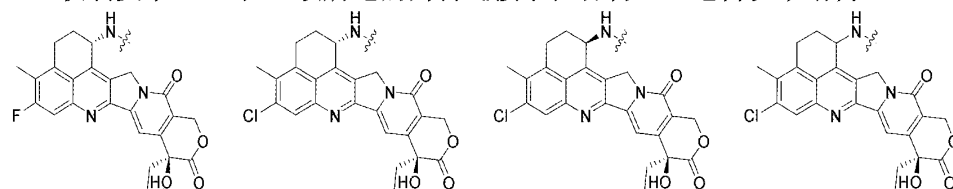


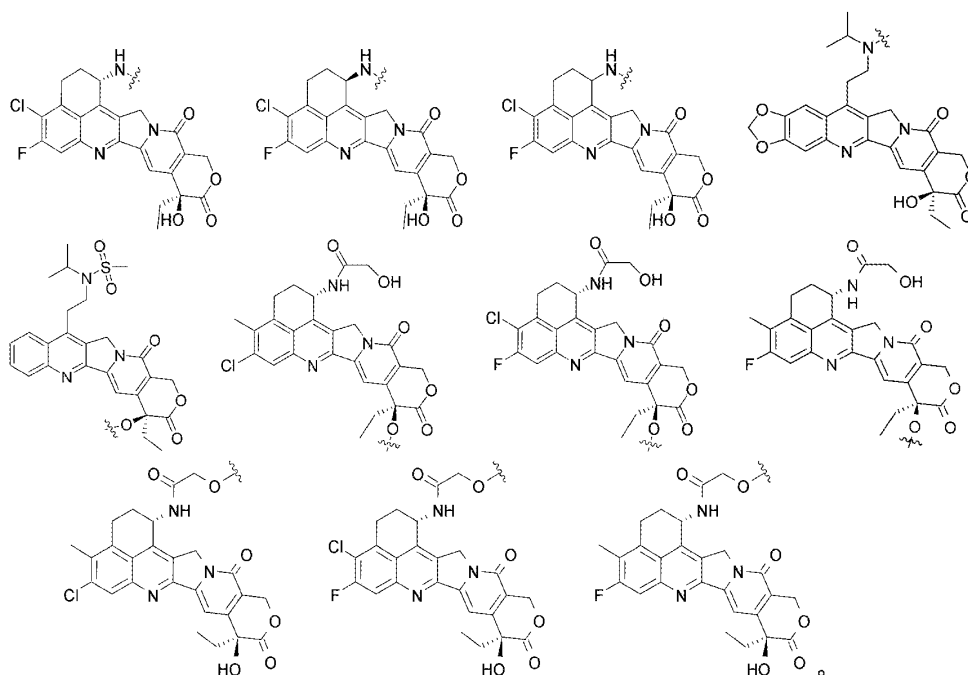


24. 权利要求 1-23 任一项所述的药物连接子化合物，所述细胞毒性药物选自以下化合物或所述化合物的药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体或前药：

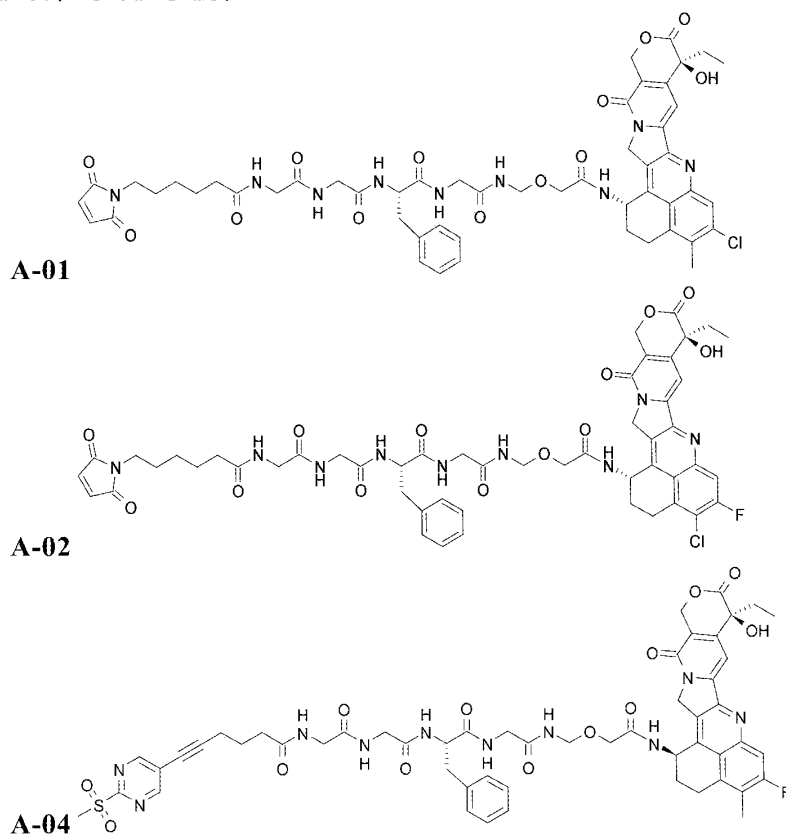


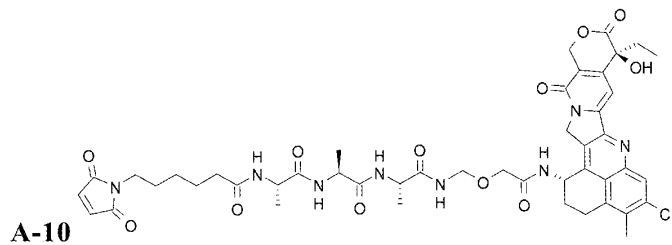
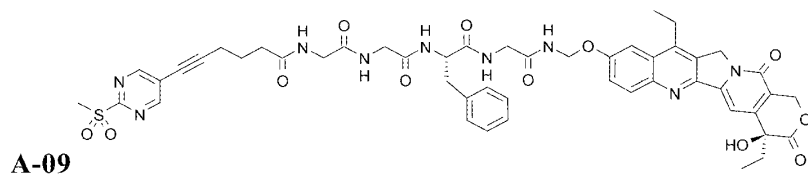
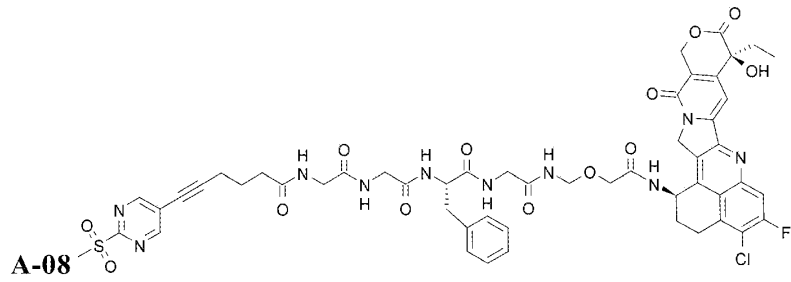
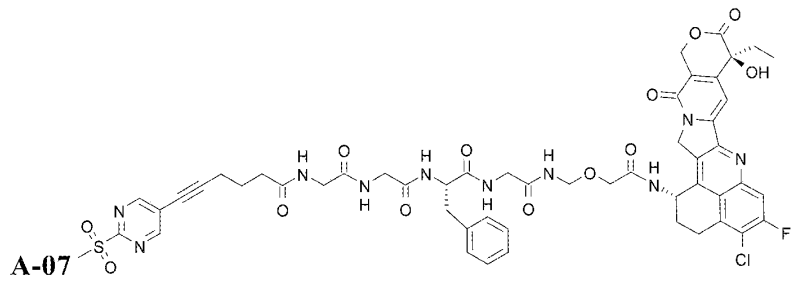
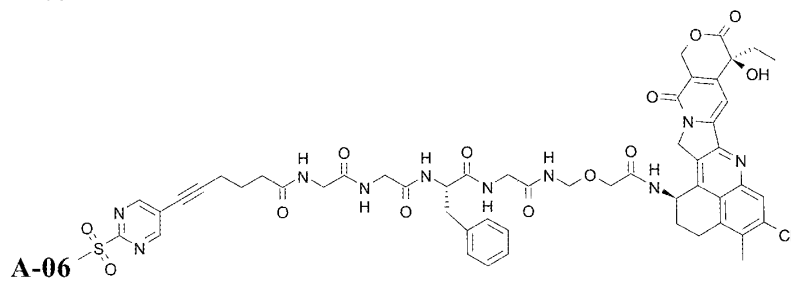
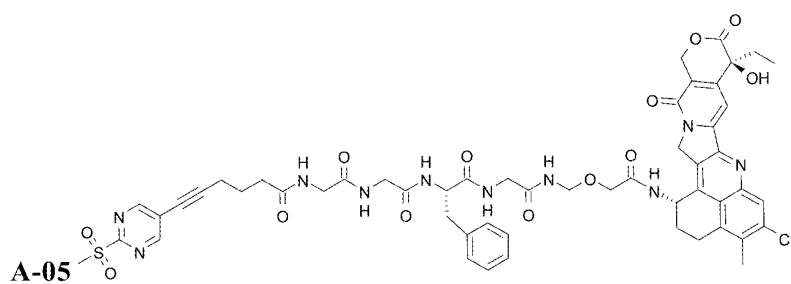
25. 权利要求 1-24 任一项所述的药物连接子化合物，D 选自以下结构：

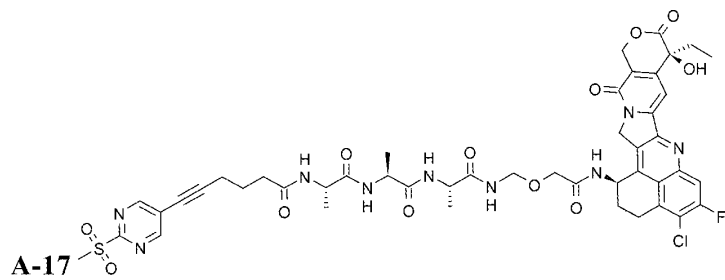
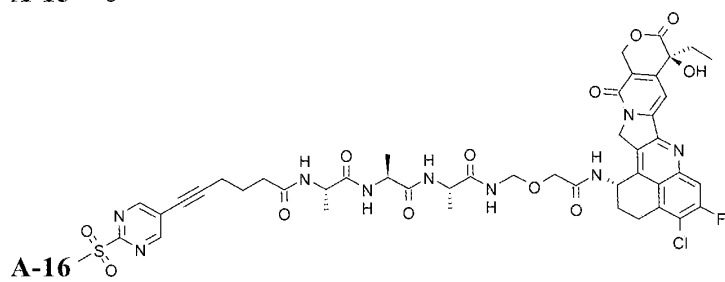
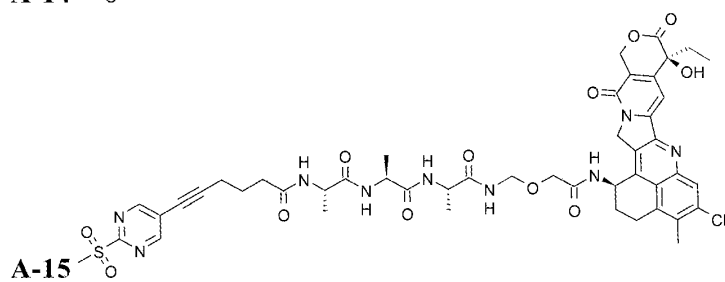
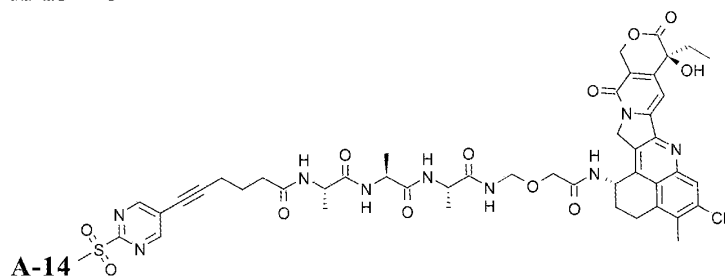
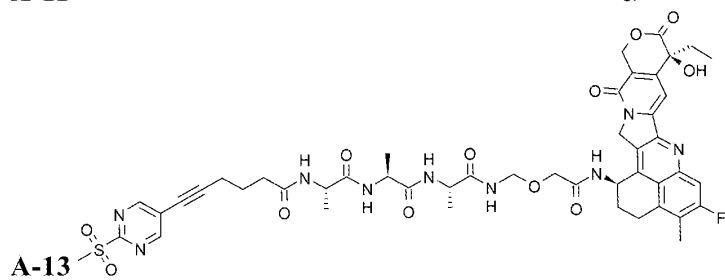
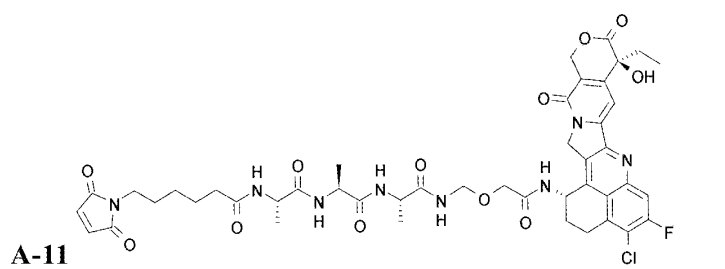


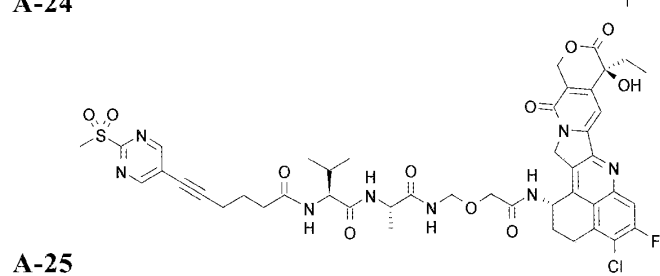
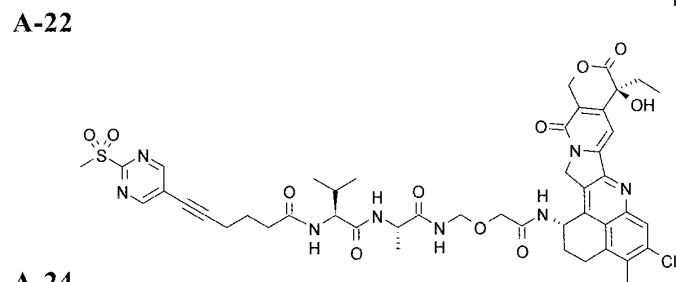
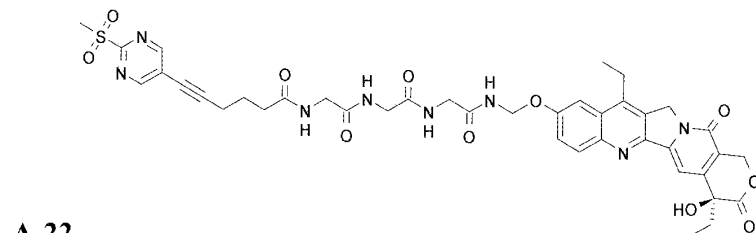
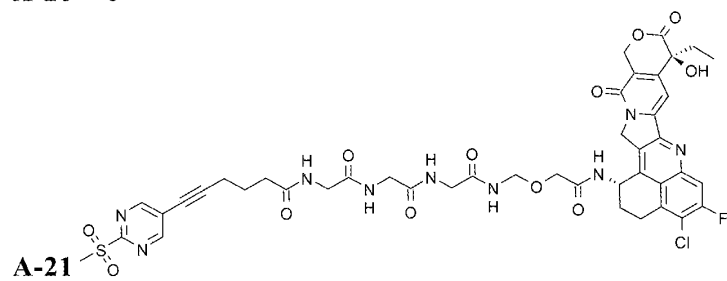
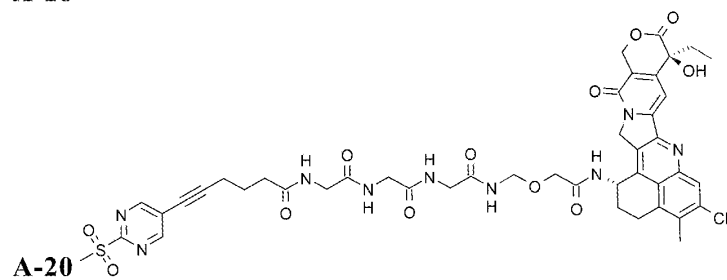
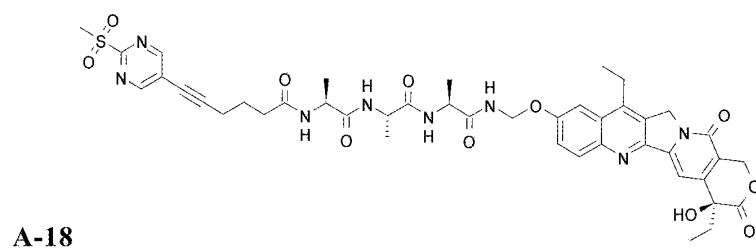


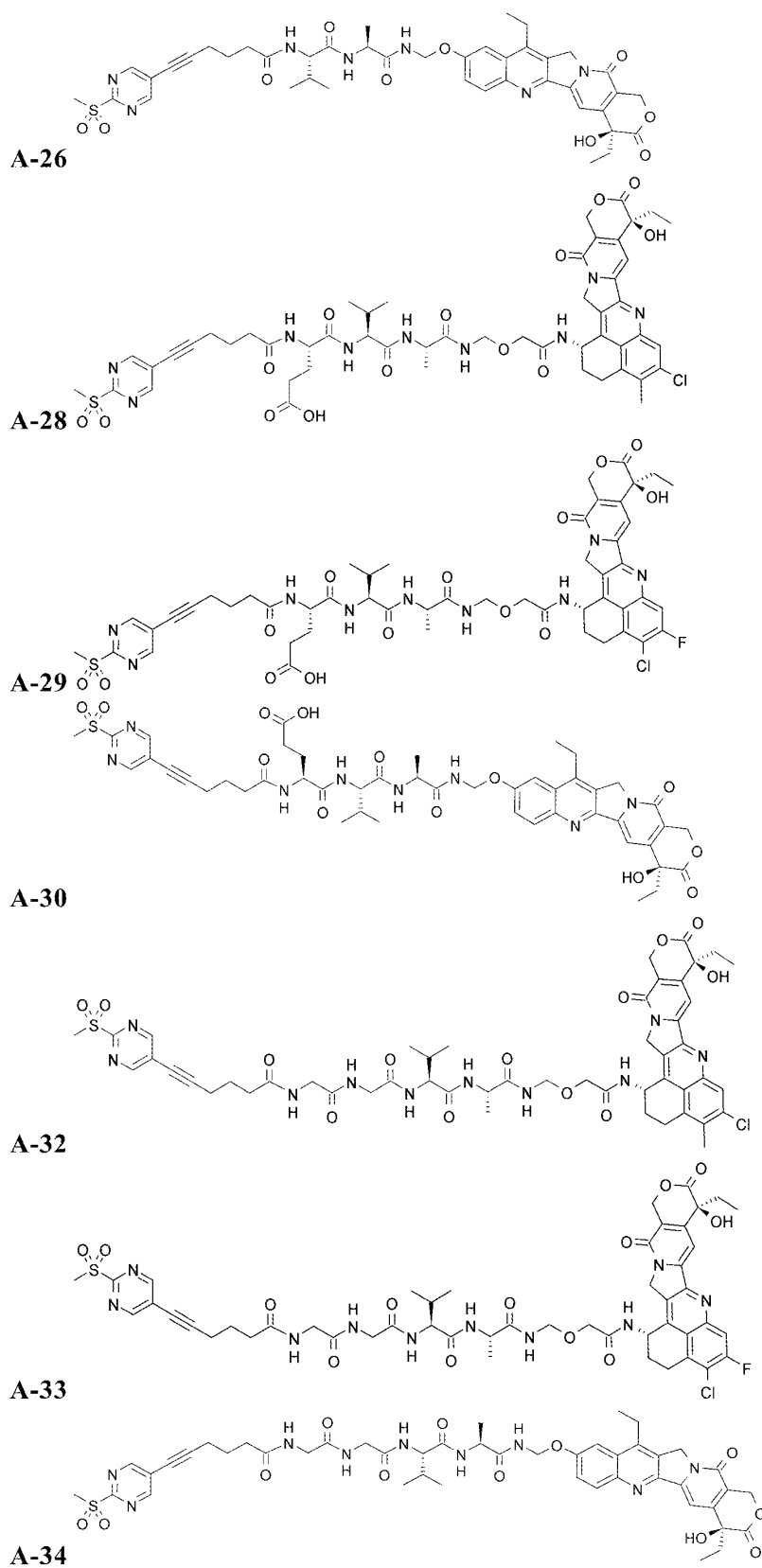
26. 权利要求 1-25 任一项所述的药物连接子化合物，选自下示的 A-01~A-34，B-01~B-07，C-01~C-28:

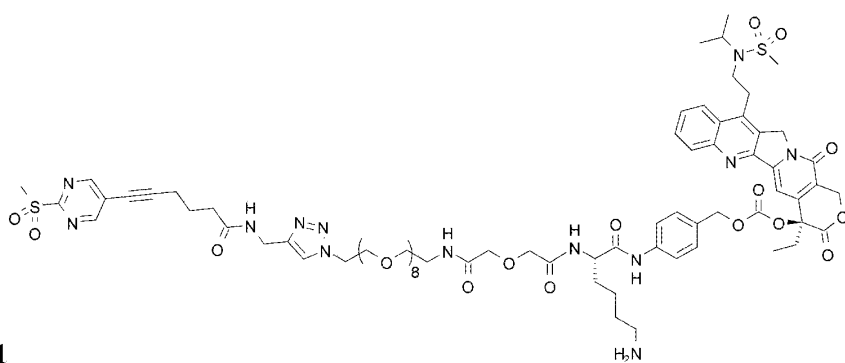




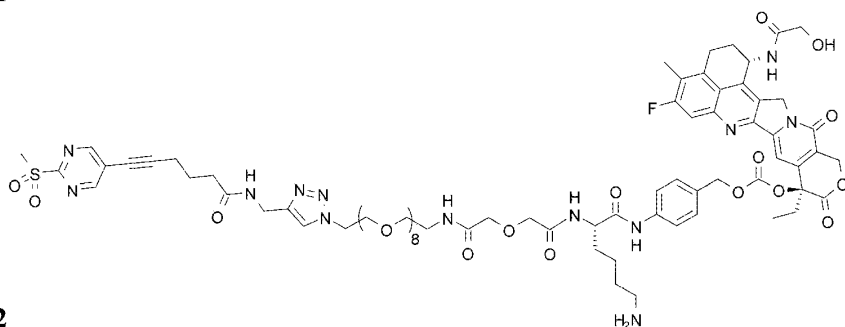




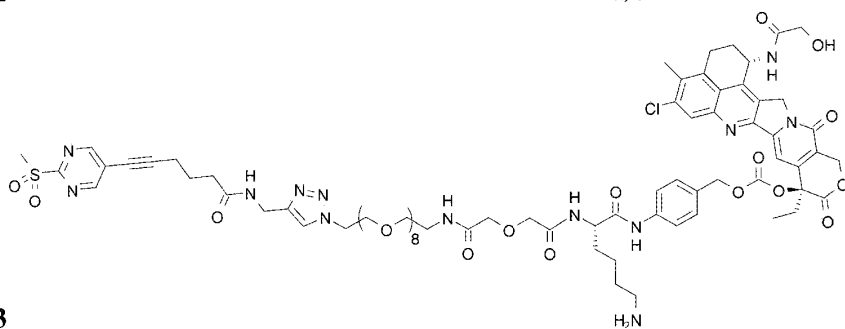




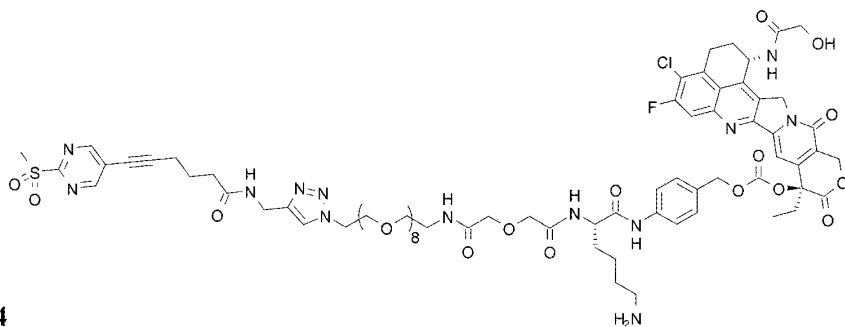
B-01



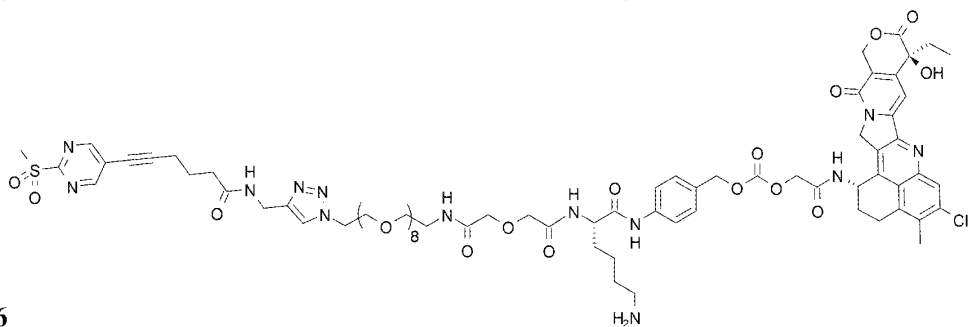
B-02



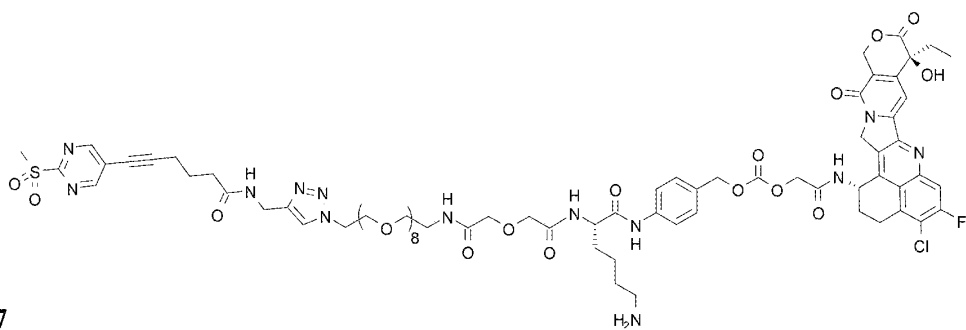
B-03



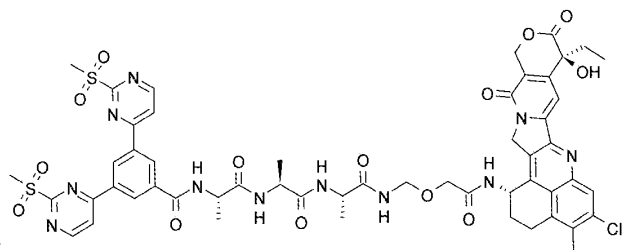
B-04



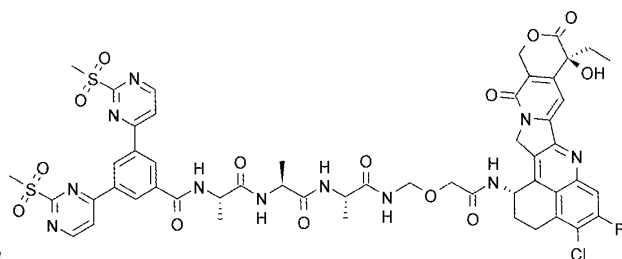
B-06



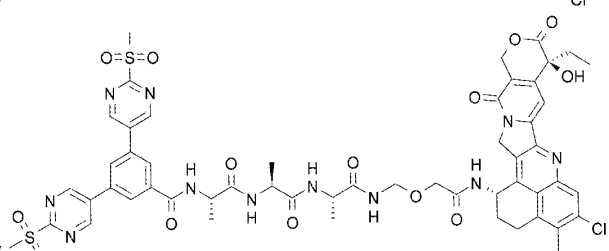
B-07



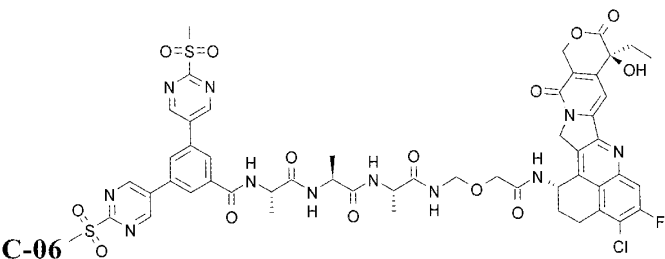
C-02



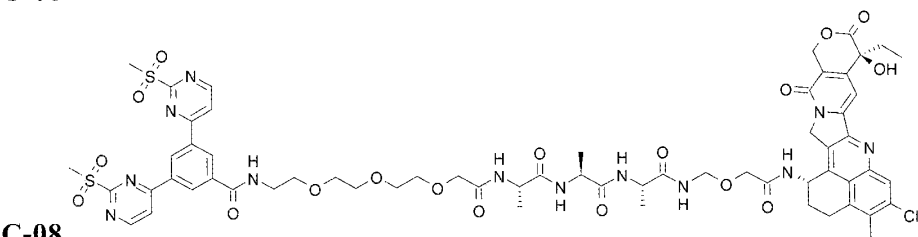
C-03



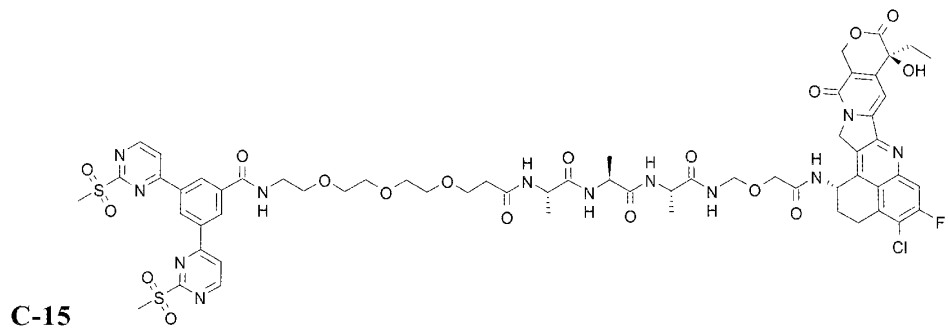
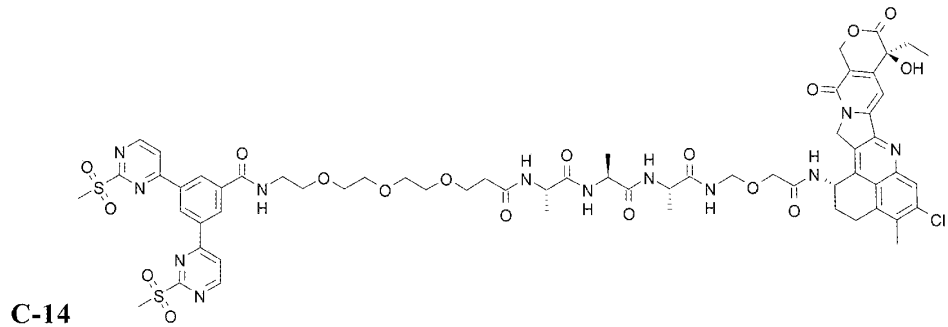
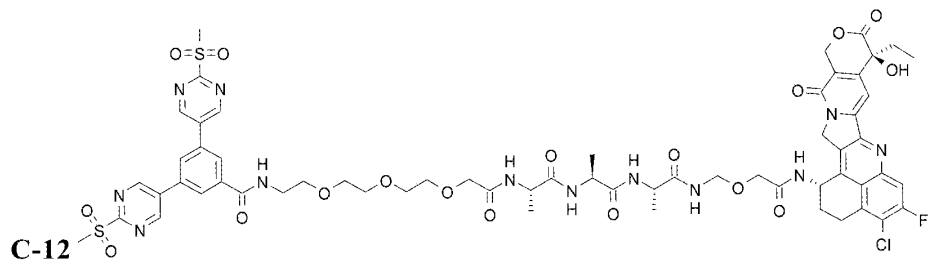
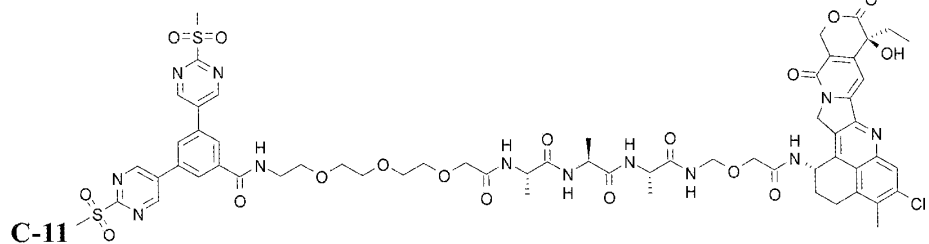
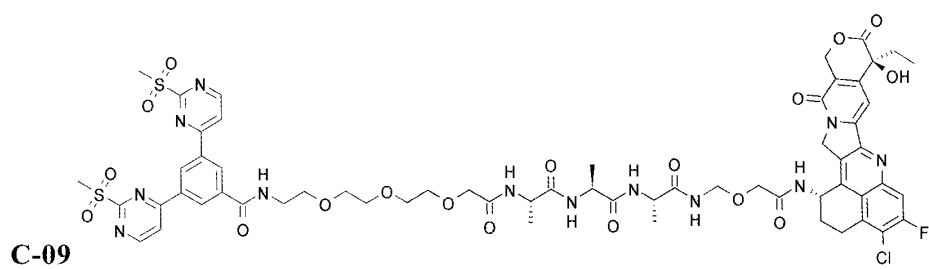
C-05

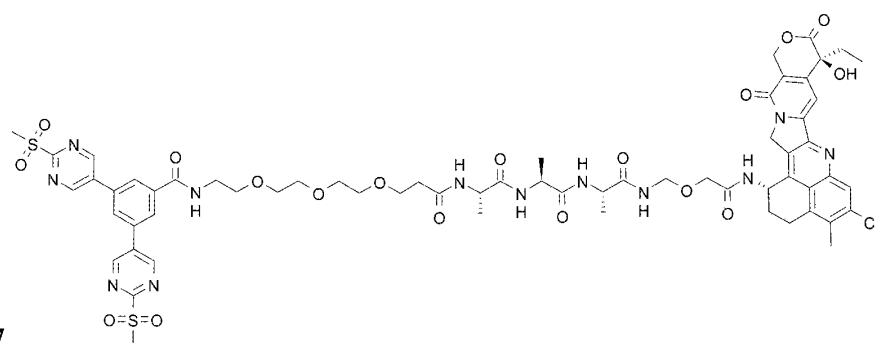


C-06

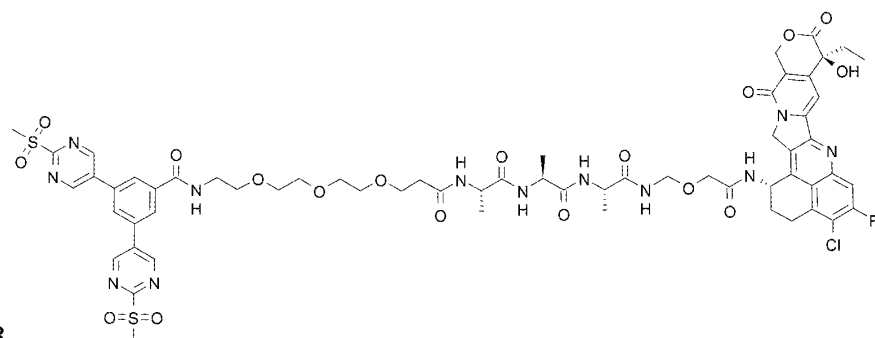


C-08

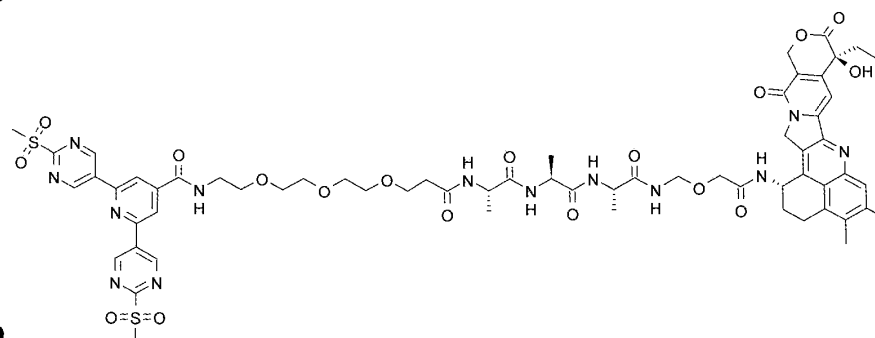




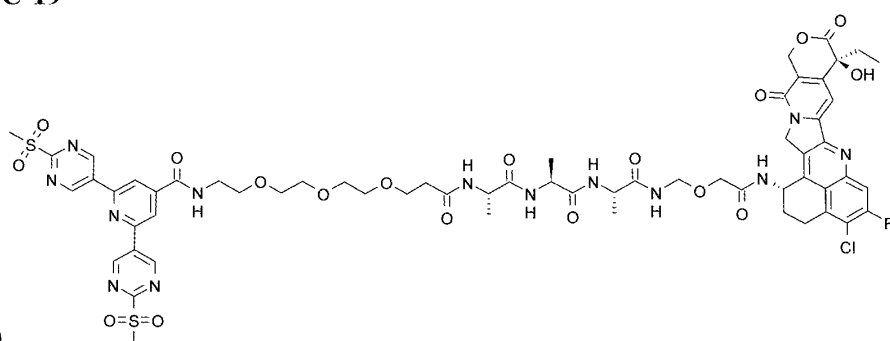
C-17



C-18

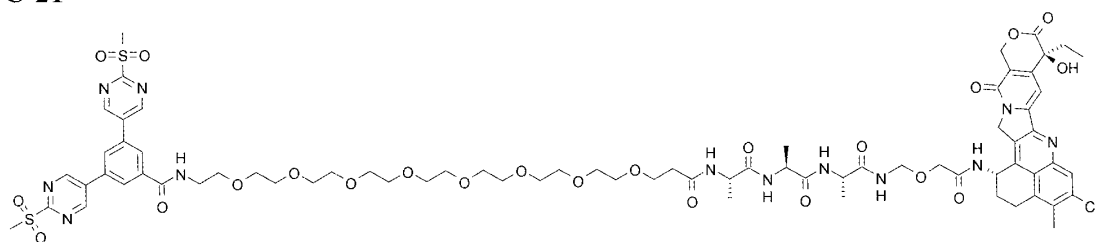


C-19

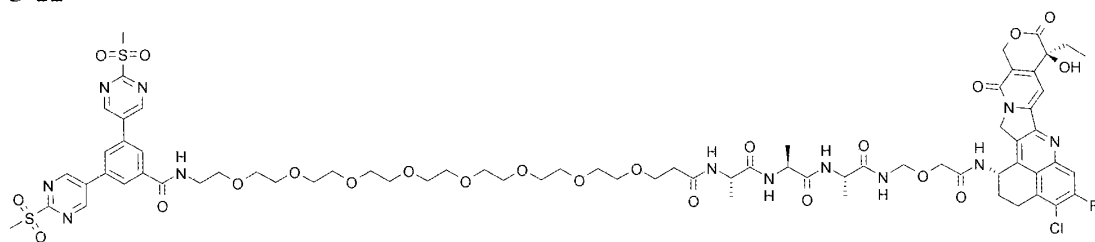


C-20

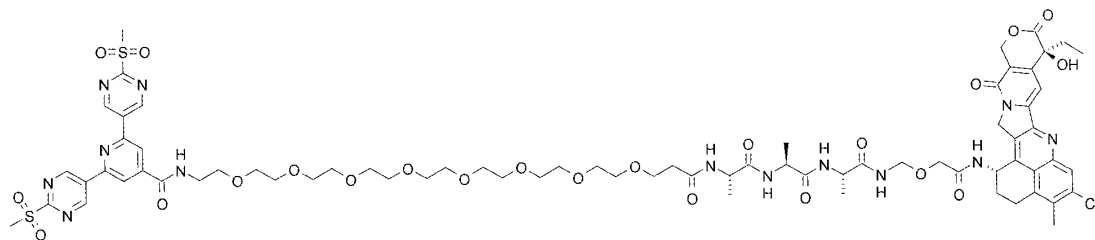
C-21



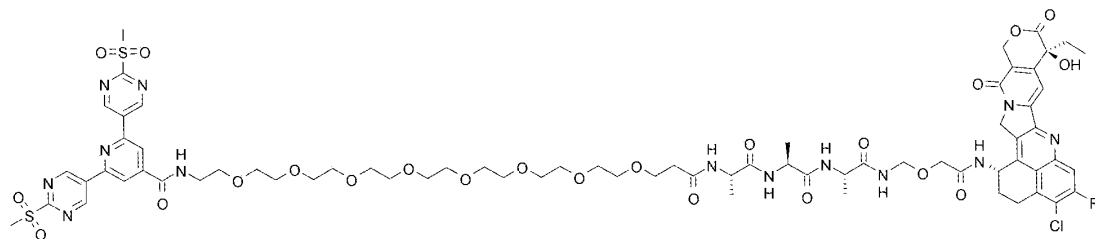
C-22



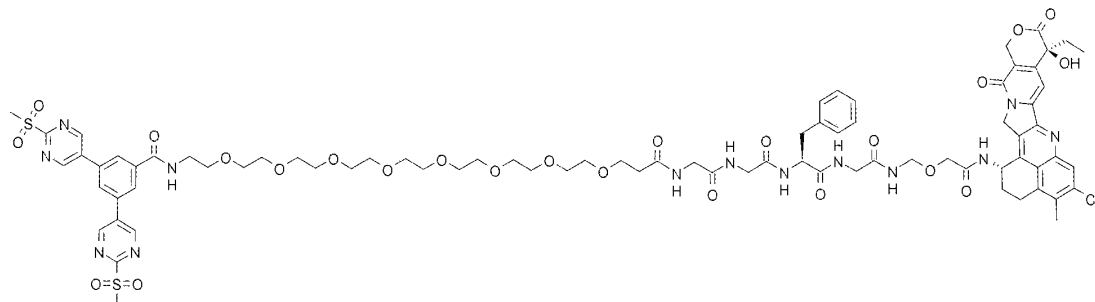
C-23



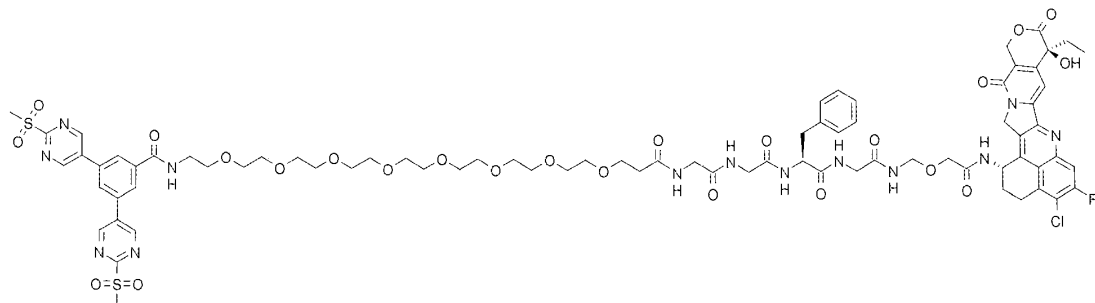
C-24



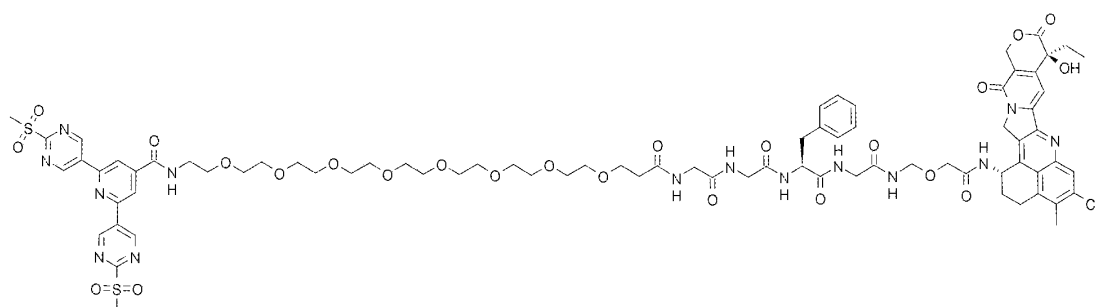
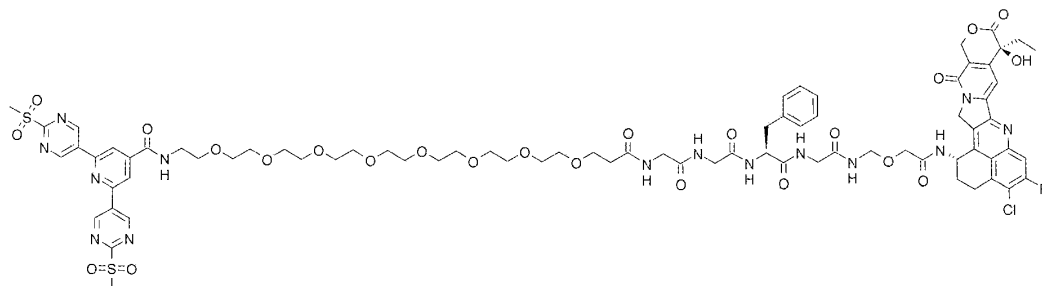
C-25



C-26

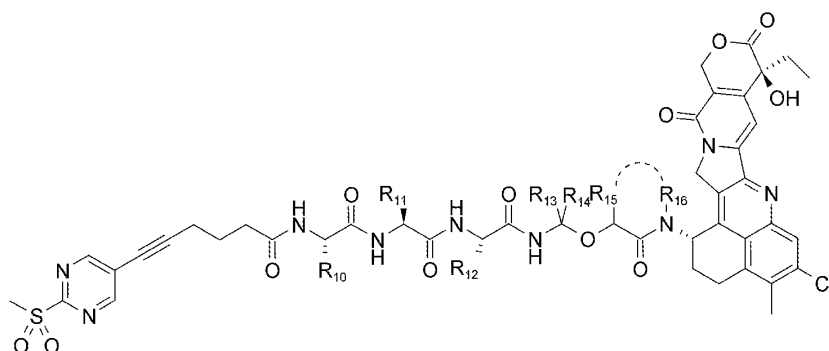


C-27

**C-28**

27. 权利要求 1-26 任一项所述的药物连接子化合物, 所述的药物连接子化合物可任选地被一个或多个适合的取代基所取代。

28. 权利要求27所述的药物连接子化合物, 具有如下结构:



其中, R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、5-12元杂环基、 C_{6-10} 芳基、5-12元杂芳基、- C_{1-6} 烷基- C_{6-10} 芳基和- C_{1-6} 烷基-5-12元杂芳基; 所述烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选被一个或多个选自羟基、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{6-10} 芳基、5-12元杂芳基的取代基所取代;

R_{13} 和 R_{14} 各自独立选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基和4-6元杂环基; 所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个选自羟基、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{6-10} 芳基、5-12元杂芳基的取代基所取代;

R_{15} 选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基-O- C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-}

6-炔基和3-6元杂环烷基；R₁₆为H；或者，R₁₅、R₁₆及其所连接的原子共同形成4-7元环；所述4-7元环任选被一个或多个选自羟基、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₆₋₁₀芳基、5-12元杂芳基的取代基所取代。

29. 权利要求28所述的药物连接子化合物, 具有如下结构:

R₁₀、R₁₁、R₁₂独立地选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、C₆₋₁₀芳基、苄基、羟基取代的苄基和吡啶基-C₁₋₆烷基-

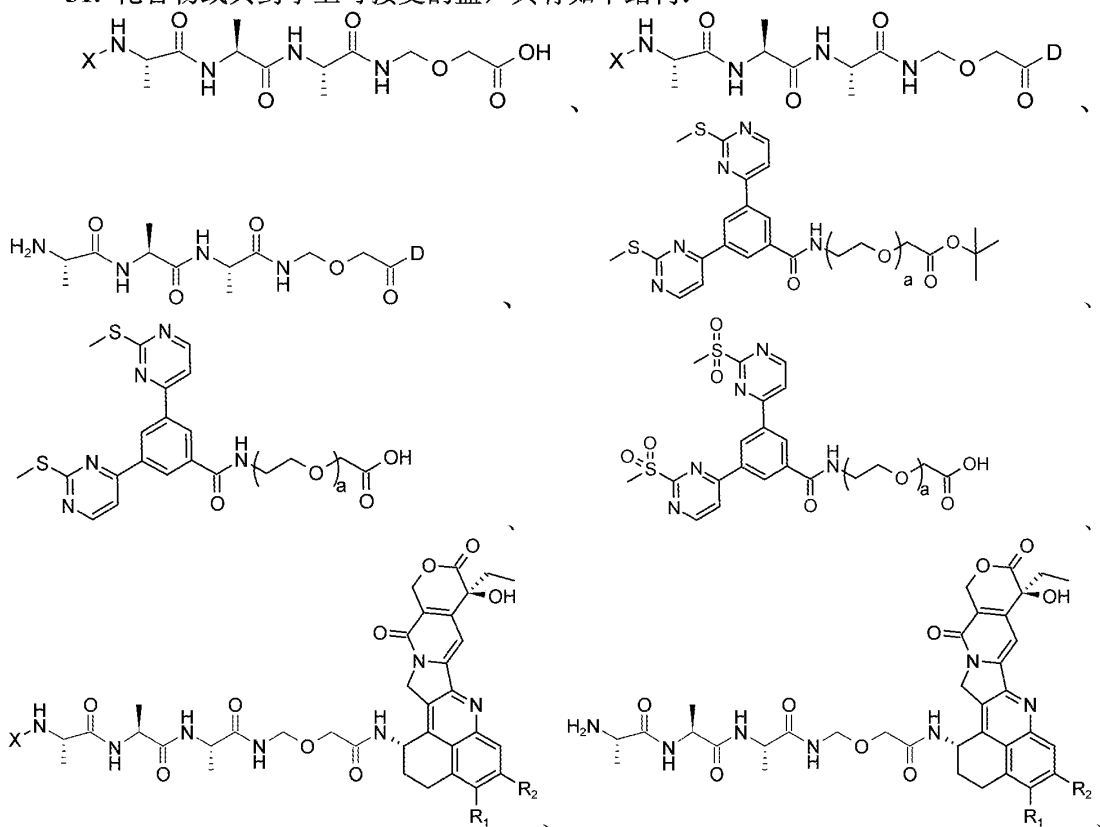
R₁₃和**R₁₄**各自独立选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基和4-6元杂环基;

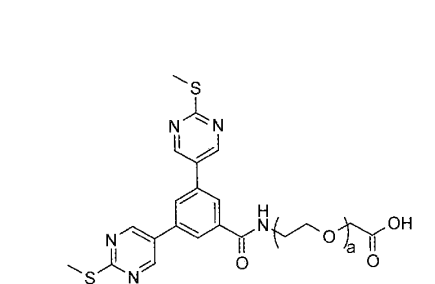
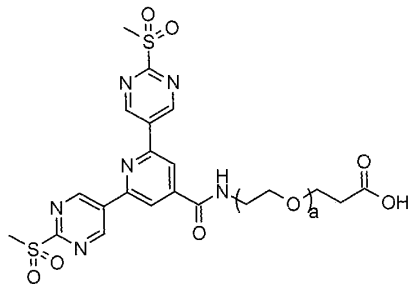
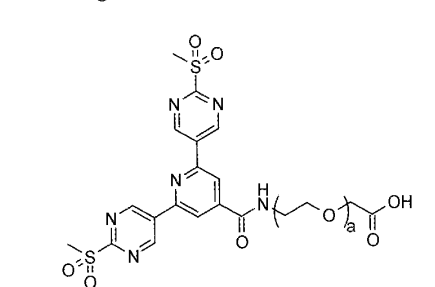
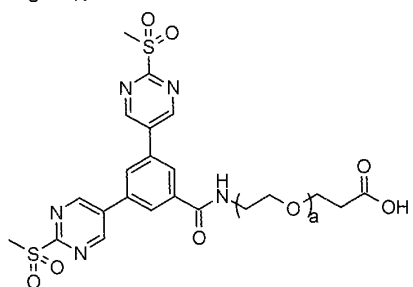
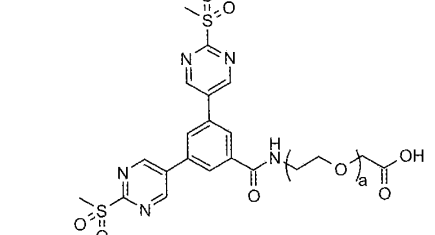
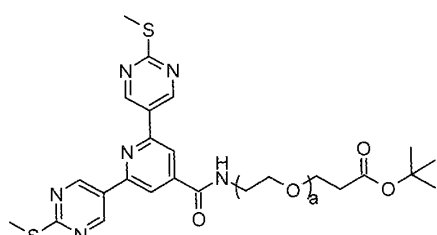
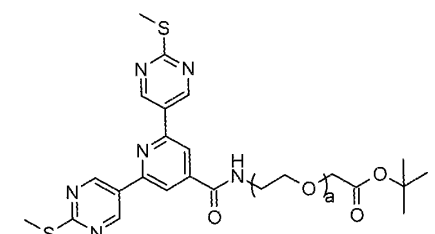
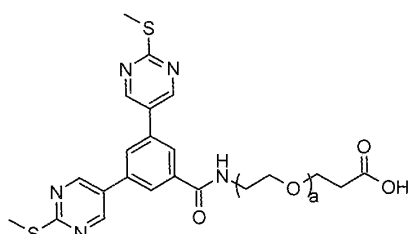
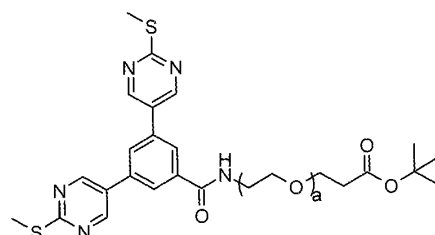
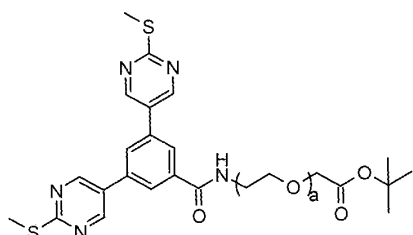
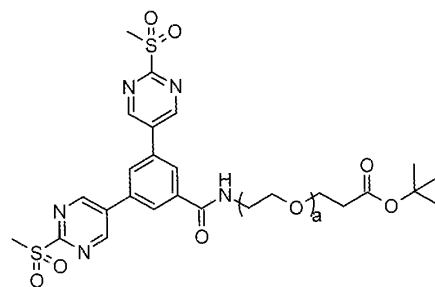
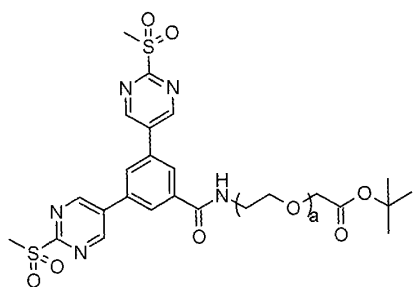
R₁₅选自氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、卤代C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷基-O-C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基和3-6元杂环烷基；R₁₆为H；或者，R₁₅、R₁₆及其所连接的原子共同形成4-7元环。

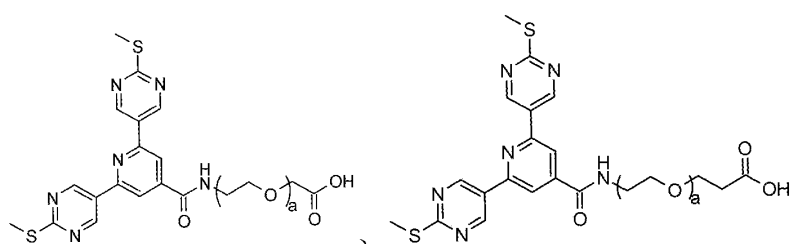
9

30. 权利要求1-29任一项所述的药物连接子化合物在制备偶联物（例如抗体药物偶联物）中的用途。

31. 化合物或其药学上可接受的盐，具有如下结构：

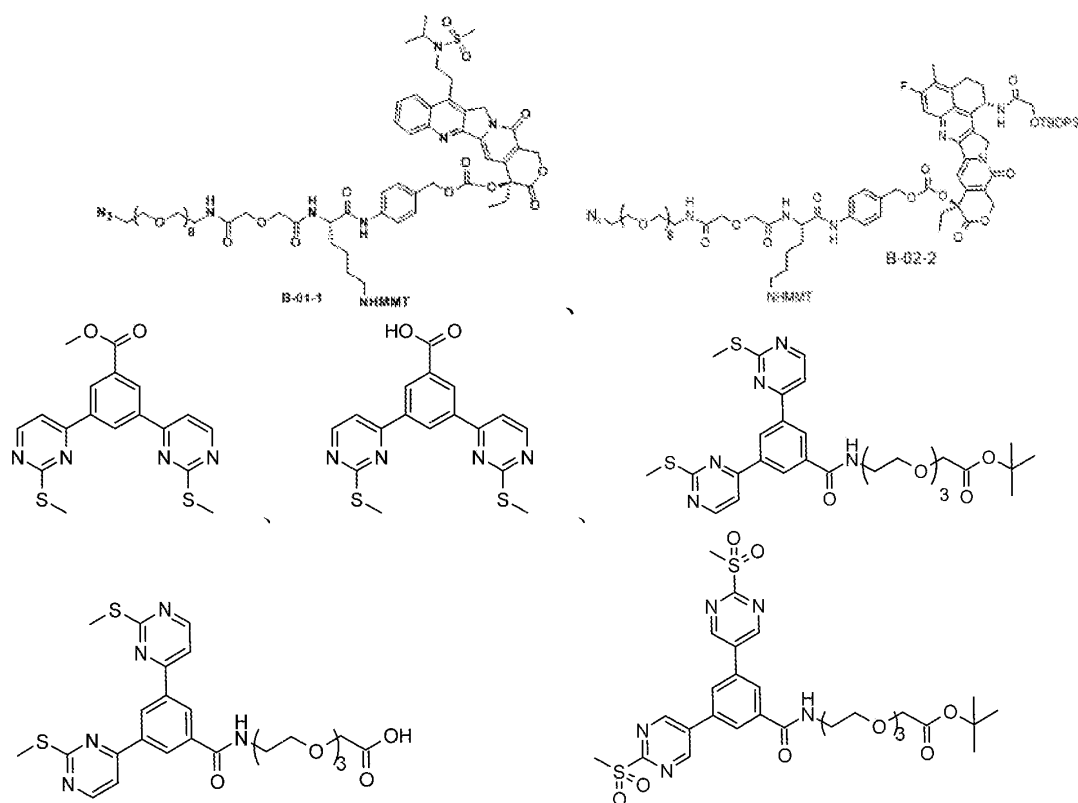


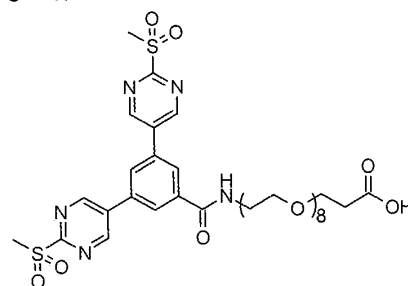
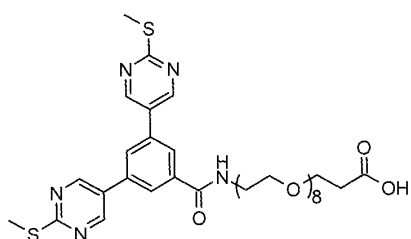
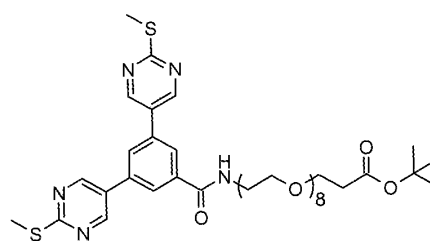
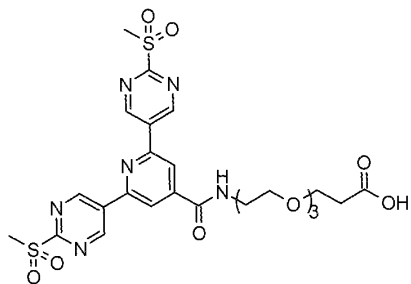
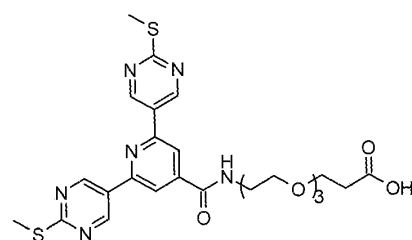
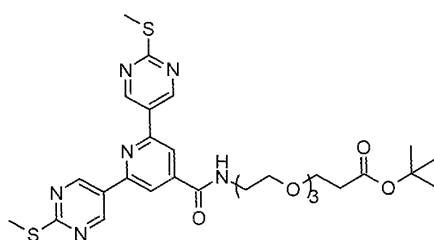
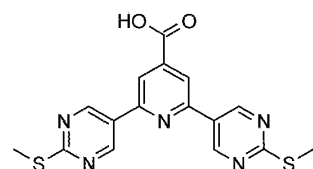
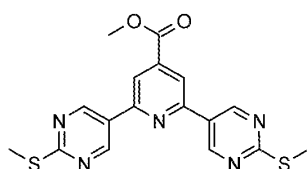
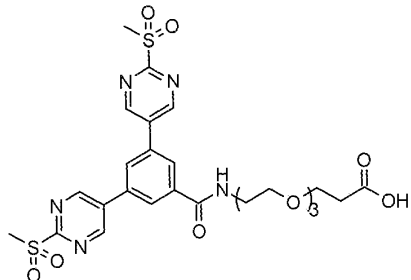
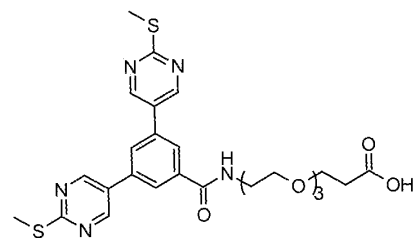
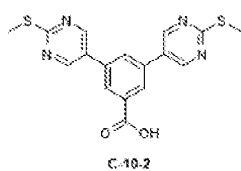
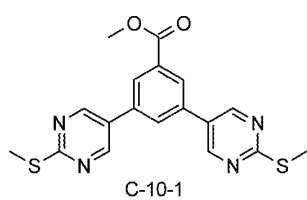
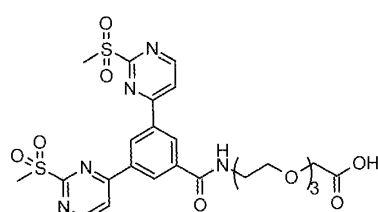
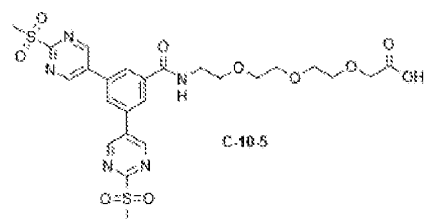


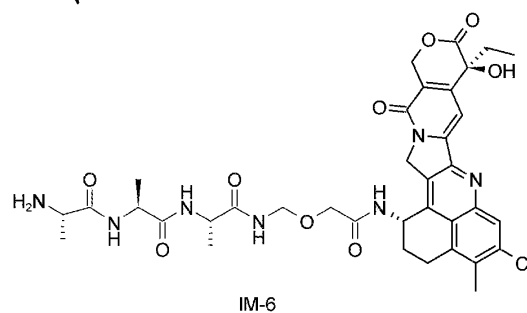
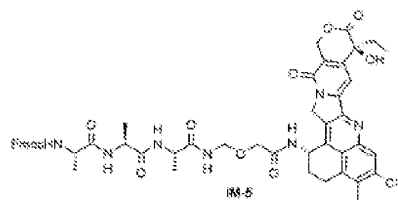
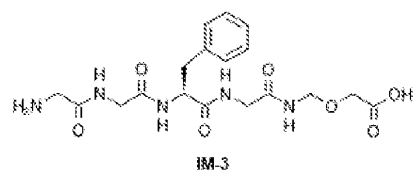
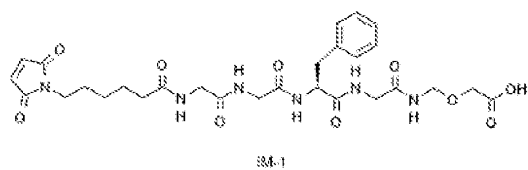
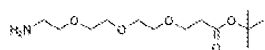
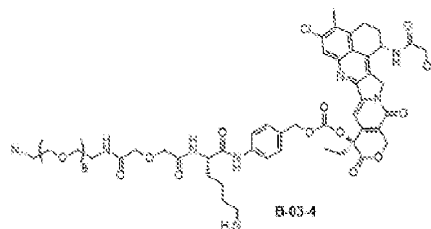
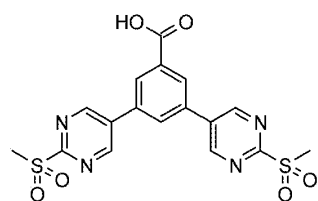
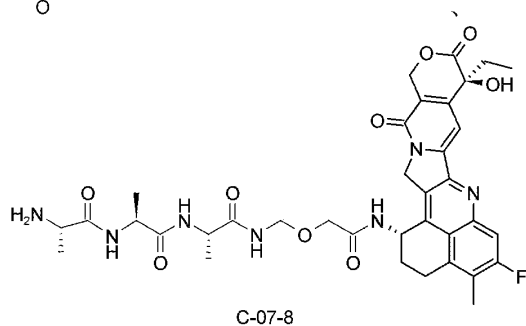
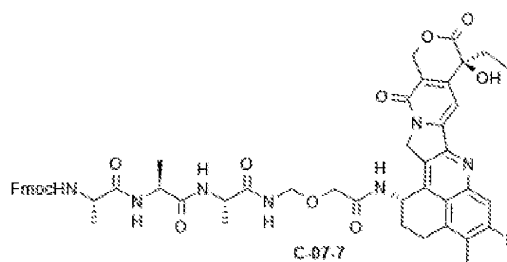
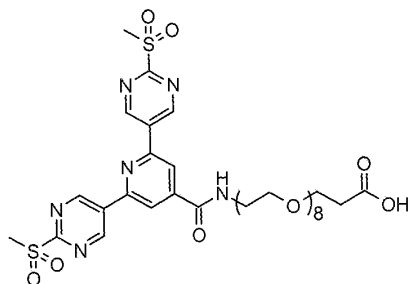
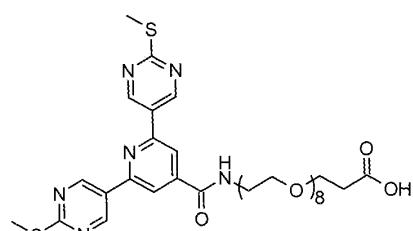
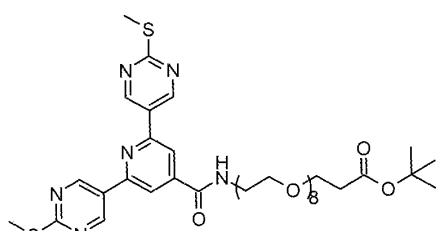


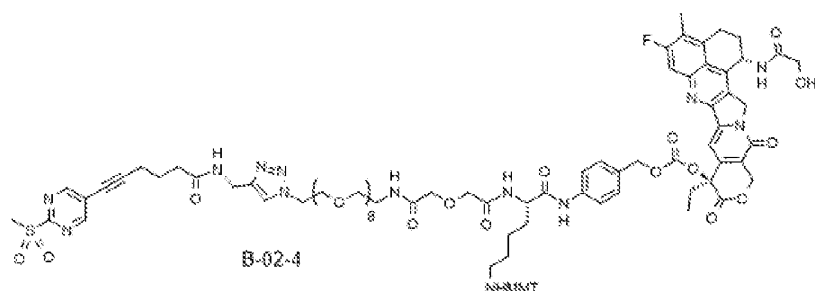
其中, **X** 选自苄氧羰基、叔丁氧羰基、苄甲氧羰基、烯丙氧羰基、三甲基硅乙氧羰基、甲氧羰基、乙氧羰基、邻苯二甲酰基、对甲苯磺酰基、三氟乙酰基、硝基苯磺酰基、苯甲酰基、特戊酰基、三苯甲基、4-甲氧基苄基二苯基甲基、二甲氧基三苯甲基、2,4-二甲氧基苄基、对甲氧基苄基和苄基; **a** 为 1 至 10 的整数, 优选为 3 至 8 的整数; **R₁**、**R₂** 和 **D** 如权利要求 1 或 20-25 任一项中所定义。

32. 化合物, 具有如下结构:



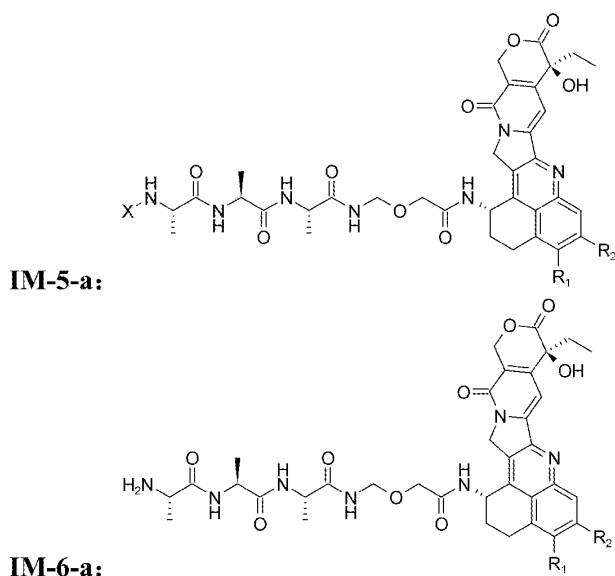






33. 权利要求 32 所述的化合物在制备权利要求 1-29 任一项所述的药物连接子化合物中的用途。

34. 一种化合物的制备方法, 所述方法包括 IM-5-a 进行脱保护得到式 IM-6-a 化合物的步骤:

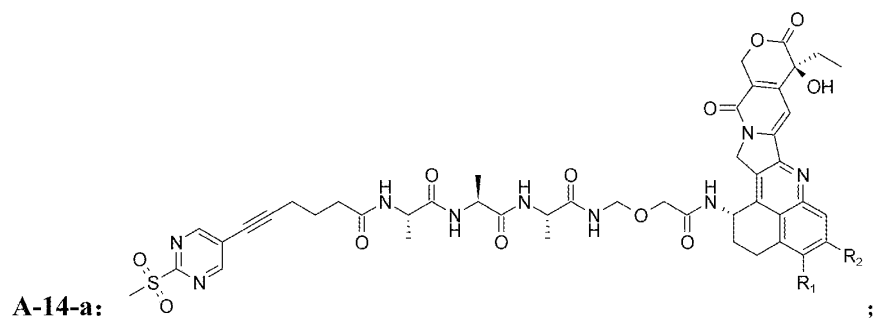


其中, X、R₁ 和 R₂ 如权利要求 31 或 32 所定义。

35. 权利要求 34 所述的制备方法, 所述脱保护的反应在以下一项或多项条件下进行:

- (1) 溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺;
- (2) 反应体系中加入烷胺类化合物;
- (3) 室温条件下进行;
- (4) 反应时间为 1-5h。

36. 权利要求 34 所述的制备方法, 所述方法进一步包括 IM-6-a 与 IM-2 进行反应得到化合物 A-14-a 的步骤:

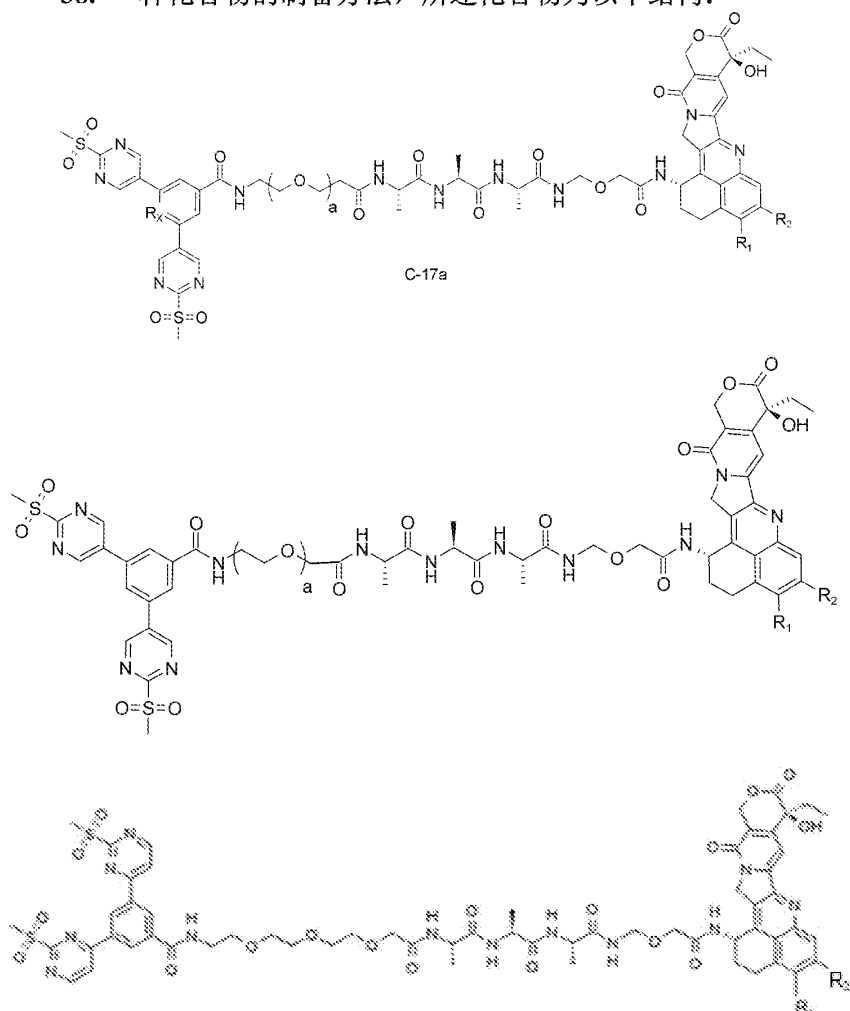


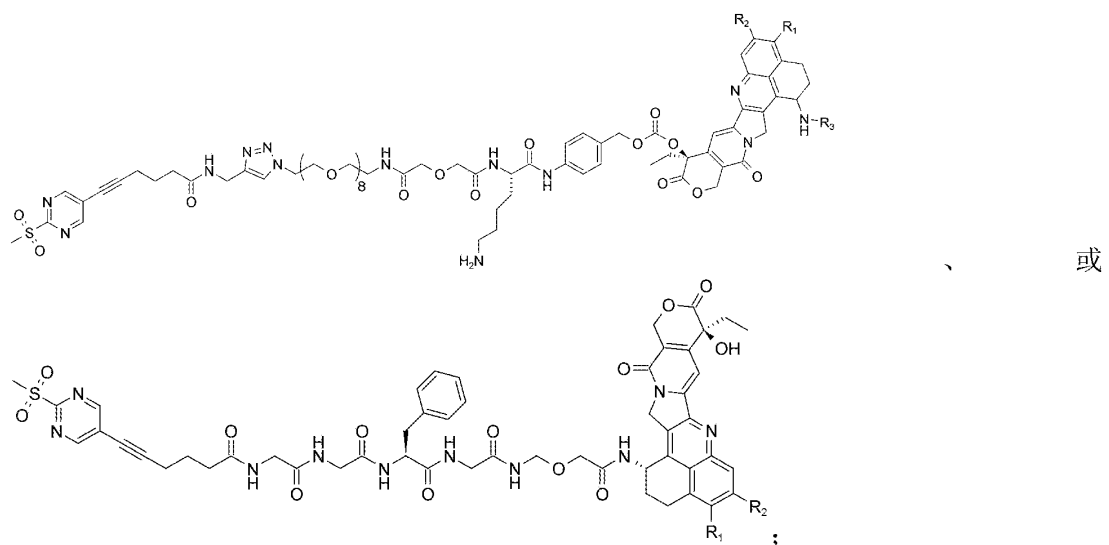
其中， R_1 和 R_2 如权利要求 31 或 32 所定义。

37. 权利要求 36 所述的制备方法，所述反应在以下一项或两项条件下进行：

- (1) 反应的溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺和 N,N-二甲基乙酰胺；
- (2) 所述反应还包括加入 N,N-二异丙基乙胺的步骤。

38. 一种化合物的制备方法，所述化合物为以下结构：





其中， R_1 和 R_2 如权利要求 31 或 32 所定义； a 为 1~10 的整数；优选地， a 为 3 或 8。