

一类抗体药物偶联物、其药物组合物及应用

本申请是以 CN 申请号为 202210465896.5，申请日为 2022 年 4 月 29 日的申请为基础，并主张其优先权，该 CN 申请的公开内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

- 5 本申请属于医药领域，具体涉及一类抗体药物偶联物、其药物组合物及应用。

背景技术

抗体药物偶联物（antibody-drug conjugate, ADC）通过特定的连接子将抗体和小分子细胞毒药物偶联起来，抗体作为载体将小分子药物靶向运输到目标细胞中，从而降低全身暴露，提高安全性，是肿瘤靶向治疗的研究和发展热点。

- 10 随着 ADC 技术的发展，在 ADC 的基础上开发出了免疫刺激抗体偶联物（Immune-stimulating antibody conjugate, ISAC），ISAC 通过可/不可切割的连接子将免疫激动剂或免疫调节剂如 TLR7 和/或 TLR8 激动剂与抗体偶联形成。免疫刺激抗体偶联物结合了抗体的精确靶向与免疫刺激剂的免疫激活和持久免疫记忆功效，实现系统给药的安全性并引发抗肿瘤免疫反应。

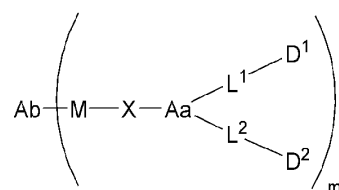
- 15 在抗肿瘤治疗的研究中，有一个较为明显的发展趋势是从单一治疗转向联合治疗。从临床需求而言，理想的联合用药可以提高临床疗效，降低药品毒性，延缓或避免抗药性的产生。联合用药一方面是将两种现有药物联合使用，譬如将细胞毒性药物与免疫刺激剂联合使用，另一方面将两种有效成分组合形成新的单一药物。

- 20 借助抗体的靶向性，将细胞毒性药物和免疫刺激剂与抗体偶联得到的双功能载荷免疫刺激抗体药物偶联物（immunomodulatory antibody drug conjugate, iADC），可同时进入肿瘤细胞及肿瘤微环境免疫细胞，发挥细胞毒药物的肿瘤杀伤和免疫刺激剂的局部免疫活化双重功效，从而提高抗体药物偶联物治疗癌症的疗效。

发明内容

- 25 本发明将细胞毒性药物和TLR激动剂与抗体偶联得到的一种双功能载荷免疫刺激抗体药物偶联物，其可同时进入肿瘤细胞及肿瘤微环境免疫细胞，发挥细胞毒药物的肿瘤杀伤和TLR激动剂的局部免疫活化双重功效，相较于单独偶联细胞毒性药物的抗体药物偶联物，具有提高的癌症治疗效果。

具体地，本发明提供一种如式(I)所示的抗体药物偶联物：



I

其中，

Ab 为靶向基团；

5 **M** 为和靶向基团连接的接头部位；

X 为连接 **M** 和 **Aa** 的连接子；

Aa 为氨基酸片段或由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段；

L¹ 为共价键或连接 **Aa** 和 **D**¹ 的连接子；

L² 为连接 **Aa** 和 **D**² 的连接子；

10 **D**¹ 选自细胞毒性药物片段；

D² 选自 **TLR** 激动剂片段；

m 选自 1 到 10，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一些实施方案中，**Ab** 为可靶向目标抗原的靶向基团，所述靶向基团针对细胞表面受体或肿瘤表面抗原。

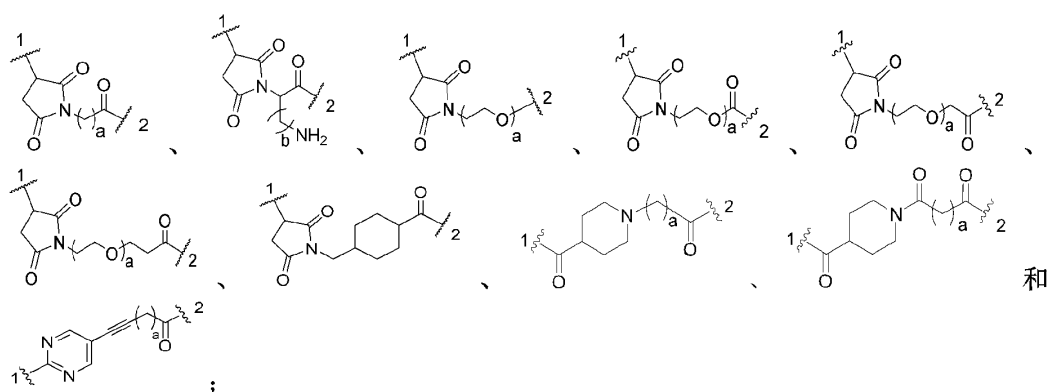
15 在一些实施方案中，**Ab** 为抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或抗原结合片段包括单克隆抗体、多克隆抗体、线性抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、嵌合抗体、鼠源抗体、人源化抗体、全人抗体和包含抗体的抗原结合部分的融合蛋白。

在一些实施方案中，**Ab** 为抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段选自 **Fab**、**Fab'**、**F(ab')**₂、**Fv**、二硫键连接的 **Fv** 和 **scFv**。

20 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段选自抗-**Her-2** 抗体、抗-**EGFR** 抗体、抗-**VEGFR** 抗体、抗-**PD-L1** 抗体、抗-**PD-1** 抗体、抗-**CTLA-4** 抗体和抗-**Trop-2** 抗体。

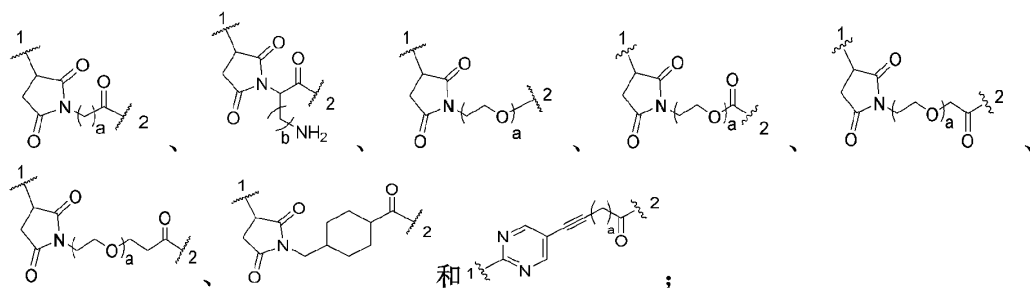
在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段为曲妥珠单抗 (**Trastuzumab**)。

在一些实施方案中，**M** 为共价键或选自以下结构：



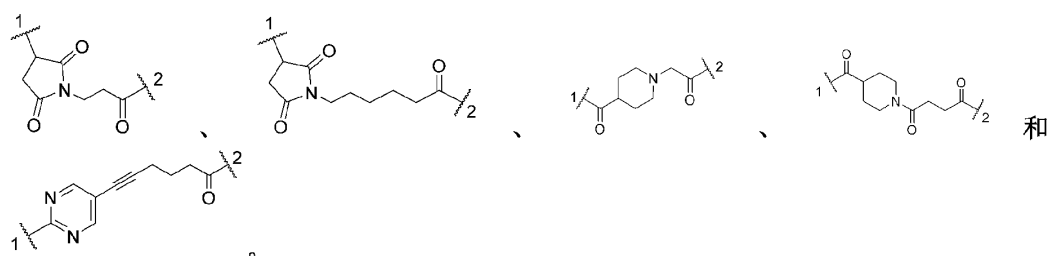
其中, 各 **a** 独立地选自 1-5 的整数, **b** 选自 1-3 的整数, 并且 **M** 的 1 位置与 **Ab** 相连, 2 位置与 **X** 相连。

在一些实施方案中，**M**为共价键或选自以下结构：

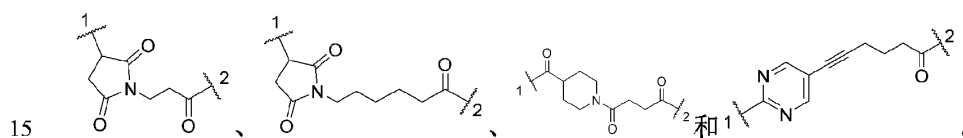


其中, 各 **a** 独立地选自 1-5 的整数, **b** 选自 1-3 的整数, 并且 **M** 的 1 位置与 **Ab** 相连, 2 位置与 **X** 相连。

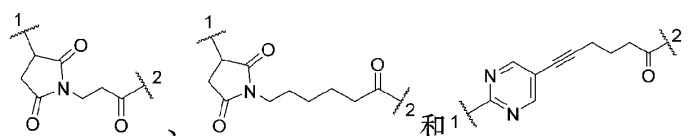
在一些实施方案中，**M** 为共价键或选自以下结构：



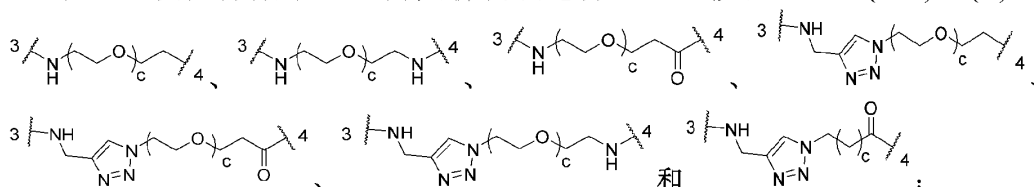
在一些实施方案中，**M**为共价键或选自以下结构：



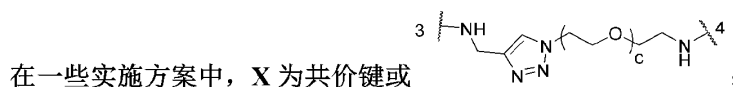
在一些实施方案中，M为共价键或选自以下结构：



在一些实施方案中, X 为共价键或选自 C_{1-6} 亚烷基、 $-NH-(CH_2)_c-C(O)-$ 、



5 其中, 各 c 独立地选自 1-10 的整数; X 的 3 位置与 M 相连, 4 位置与 Aa 相连。



其中, 各 c 独立地选自 1-10 的整数 (例如 5-10 的整数, 再例如 8-10 的整数); X 的 3 位置与 M 相连, 4 位置与 Aa 相连。

10 在一些实施方案中, Aa 选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段, 其中所述氨基酸选自 Gly、Phe、Ala、Val、Ser、Thr、His、Trp、Cys、Asp、Glu、Lys、Tyr 和 Arg, 任选地, 各氨基酸独立地被 C_{1-6} 烷基或聚乙二醇亲水结构单元修饰。在一些

实施方案中, 所述聚乙二醇亲水结构单元选自 和 , 其中各 c 独立地选自 1-10 的整数 (例如 5-10 的整数, 再例如 8-10 的整数)。

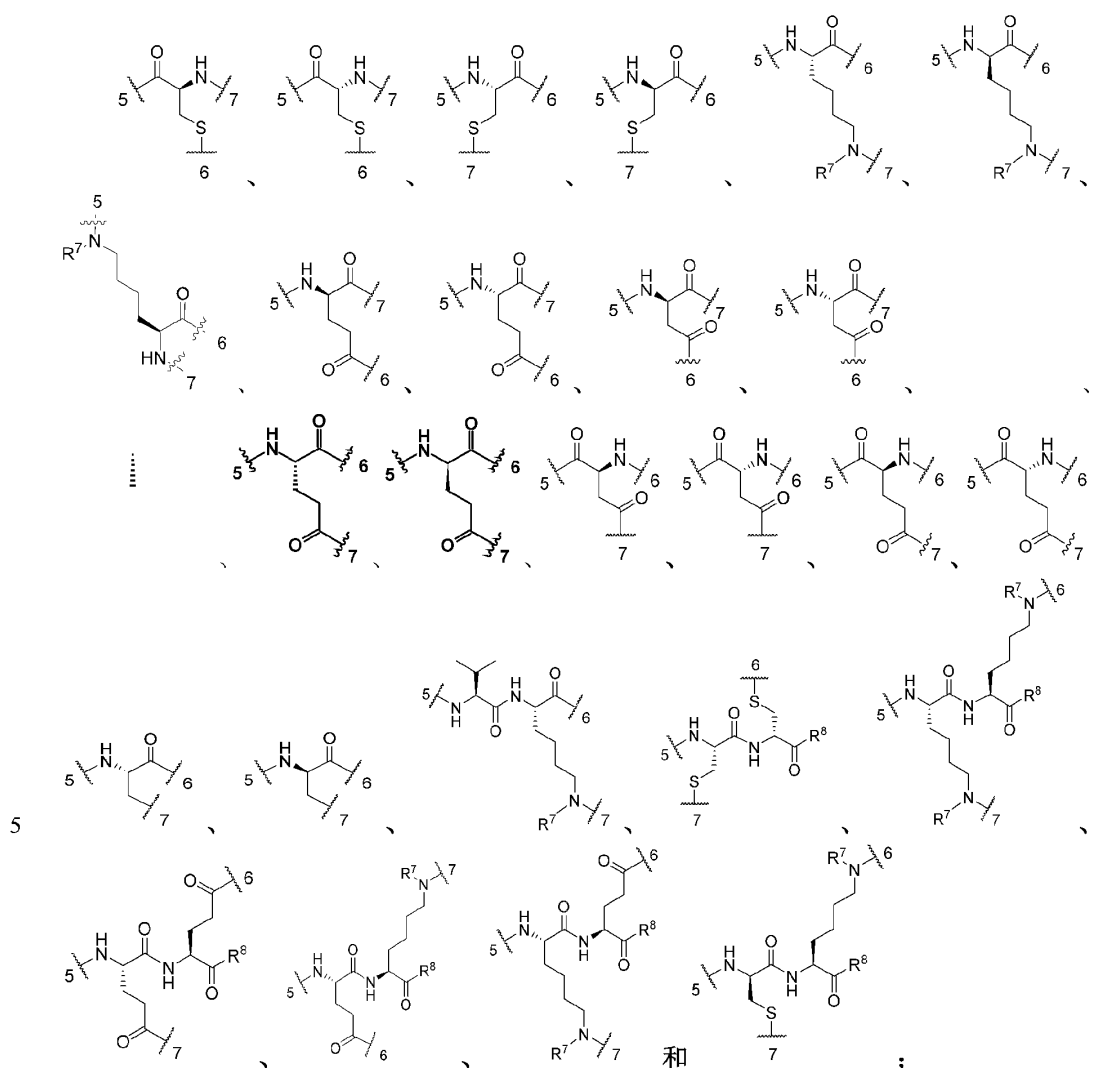
15 在一些实施方案中, Aa 选自下述氨基酸的片段和由它们中的两个或多个任意组合形成的肽片段: Gly、Phe、Ala、Val、Cys、Asp、Glu、Lys 和 Arg, 并且各氨基酸各自独立地任选地被 C_{1-6} 烷基或聚乙二醇亲水结构单元修饰。在一些实施方案中, 所述聚乙二醇

亲水结构单元选自 和 , 其中各 c 独立地选自 1-10 的整数 (例如 5-10 的整数, 再例如 8-10 的整数)。

在一些实施方案中, Aa 选自下述氨基酸的片段和由它们中的两个或多个任意组合形

20 成的肽片段: Val、Cys、Asp、Glu 和 Lys, 其中, Glu 和 Lys 羧基端任选地被 修饰, 其中各 c 独立地选自 1-10 的整数 (例如 5-10 的整数, 再例如 8-10 的整数)。

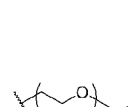
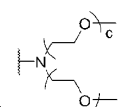
在一些实施方案中，Aa 选自以下结构：



其中，各 R⁷ 独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基和聚乙二醇亲水结构单元；各 R⁸ 独立地选自羟基和聚乙二醇亲水结构单元；5 位置与 X 相连，6 位置与 L¹ 和 L² 中的一个相连，7 位置与 L¹ 和 L² 中的另一个相连。

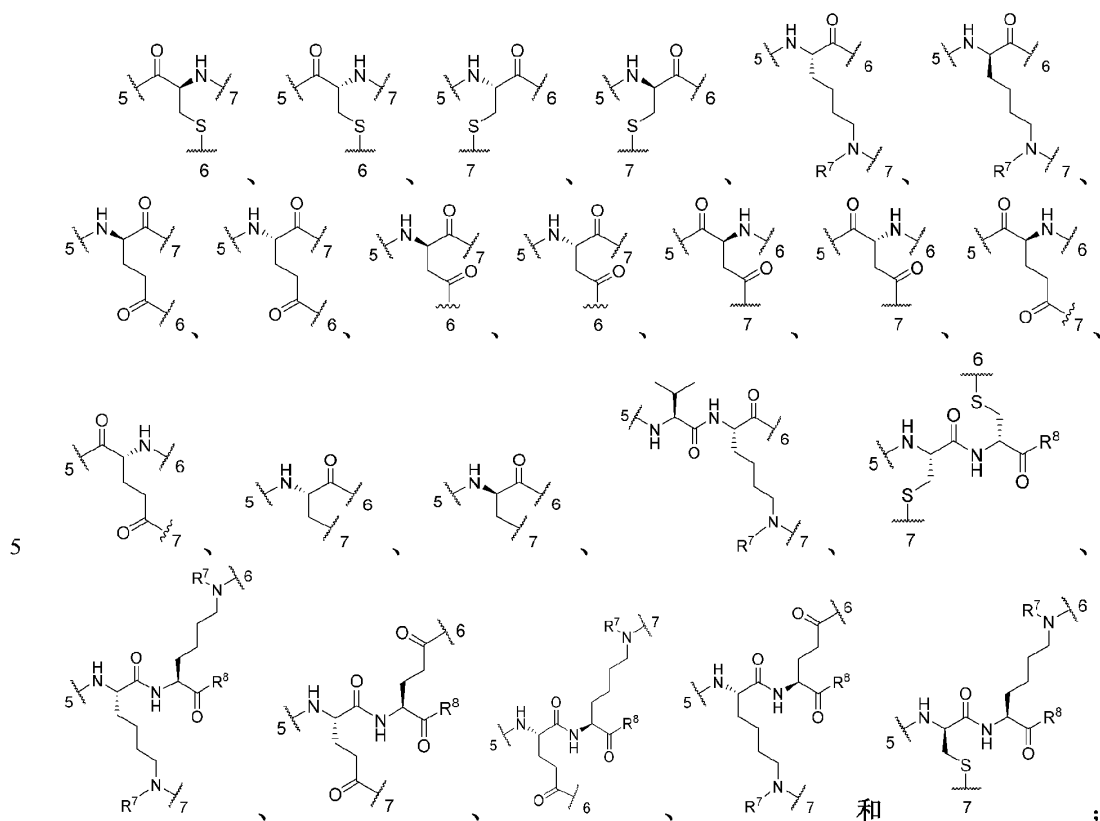
10 在一些实施方案中，5 位置与 X 相连，6 位置与 L¹ 相连，7 位置与 L² 相连。

在一些实施方案中，5 位置与 X 相连，6 位置与 L² 相连，7 位置与 L¹ 相连。

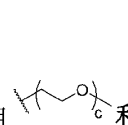
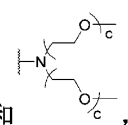
在一些实施方案中，所述聚乙二醇亲水结构单元选自  和 ，其中各 c 独立地选自 1-10 的整数（例如 5-10 的整数，再例如 8-10 的整数）。

在一些实施方案中， R^7 为 H。

在一些实施方案中，Aa 选自以下结构：

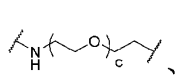
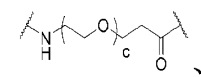


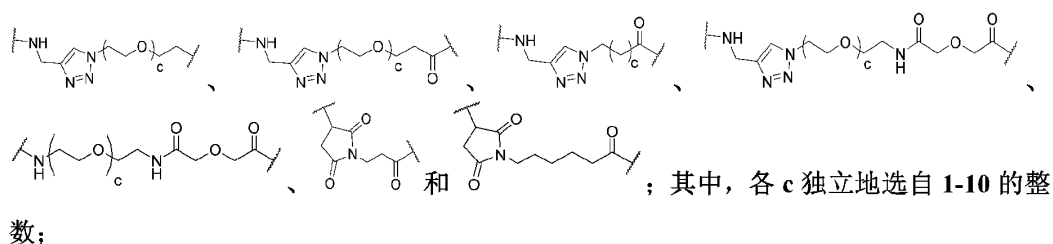
其中，各 R^7 独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基和聚乙二醇亲水结构单元；各 R^8 独立地选自羟基和聚乙二醇亲水结构单元；5 位置与 X 相连，6 位置与 L^1 和 L^2 中的一个相连，7 位置与 L^1 和 L^2 中的另一个相连；优选地，5 位置与 X 相连，6 位置与 L^1 相连，7 位置与 L^2 相连。

10 在一些实施方案中，所述聚乙二醇亲水结构单元选自  和 ，其中各 c 独立地选自 1-10 的整数（例如 5-10 的整数，再例如 8-10 的整数）。

在一些实施方案中， L^1 为共价键或选自不可断裂连接子和可断裂连接子，其中，可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割，所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶。

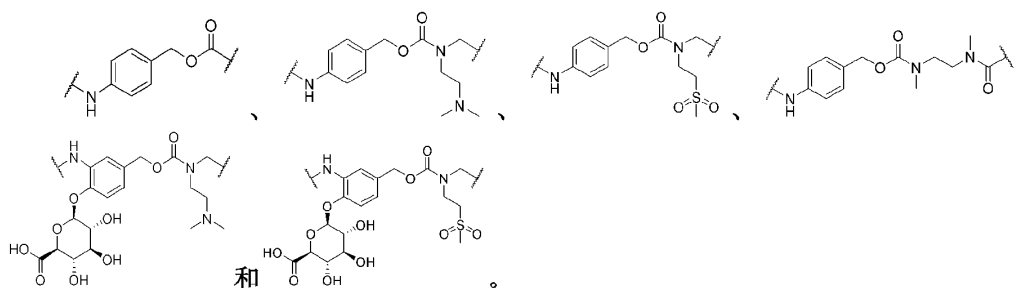
15 在一些实施方案中， L^1 为共价键或 $-L^a-L^b-L^c-$ ，其中：

L^a 为共价键或选自 C_{1-6} 亚烷基、 $-NH-(CH_2)_c-C(O)-$ 、、、

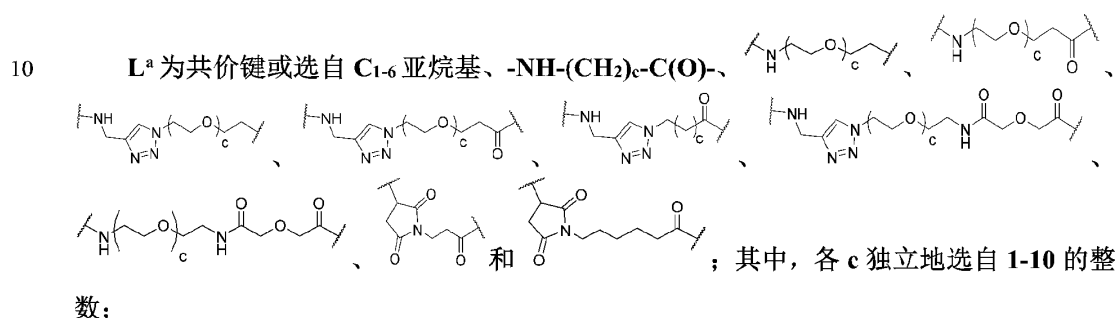


L^b 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段, 其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn;

L^c 为共价键、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 或选自以下结构:

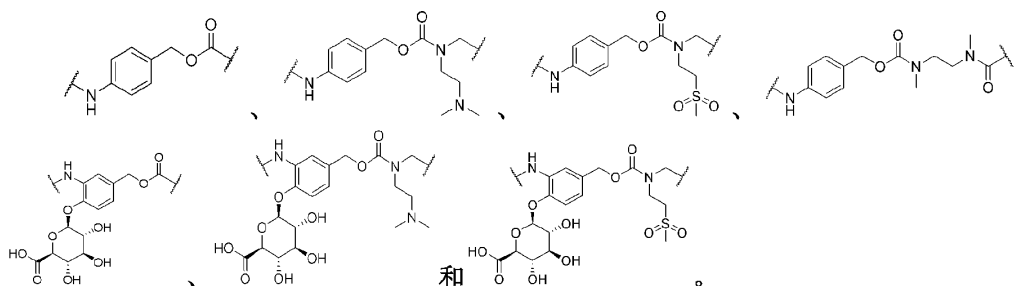


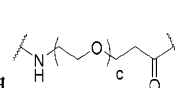
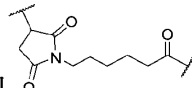
在一些实施方案中, L^1 为共价键或 $-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$, 其中:



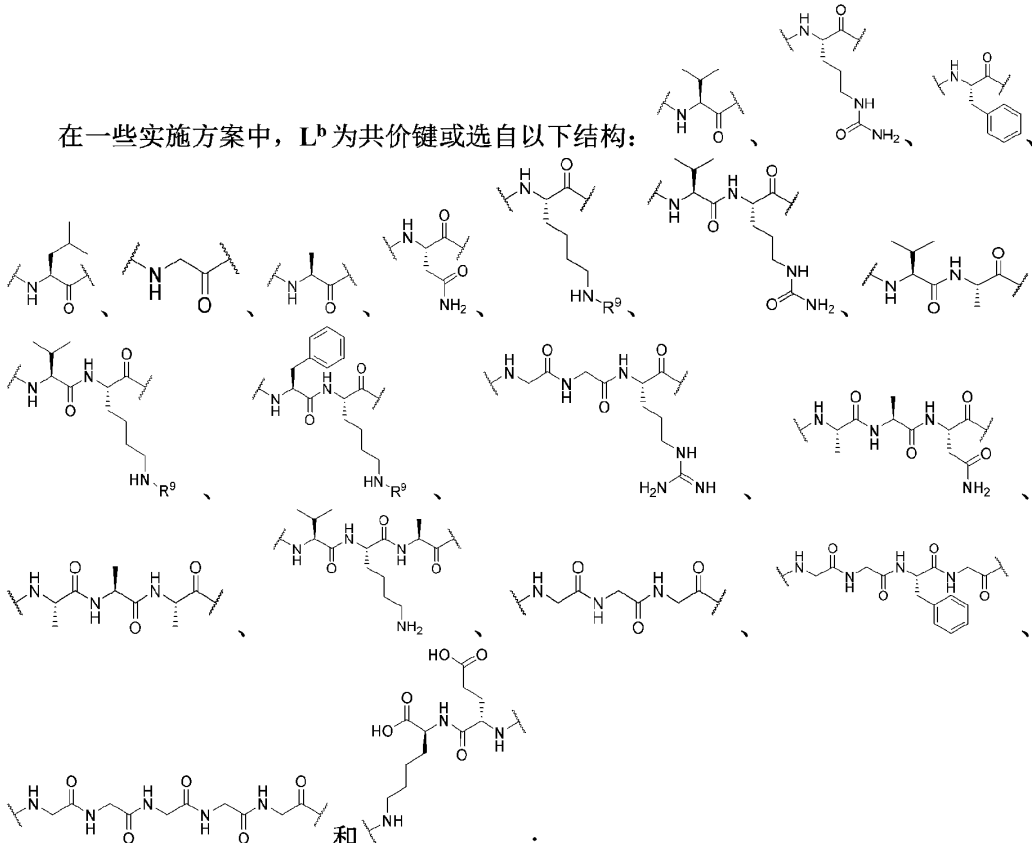
L^b 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段, 其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn;

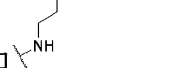
L^c 为共价键、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 或选自以下结构:

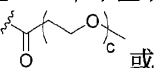
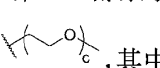


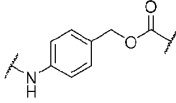
在一些实施方案中， L^a 为共价键或选自  和 ；其中，各 c 独立地选自 1-10 的整数。

在一些实施方案中， L^b 为共价键或选自以下结构：

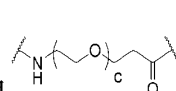
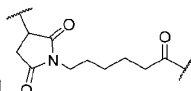
5 

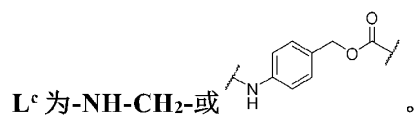
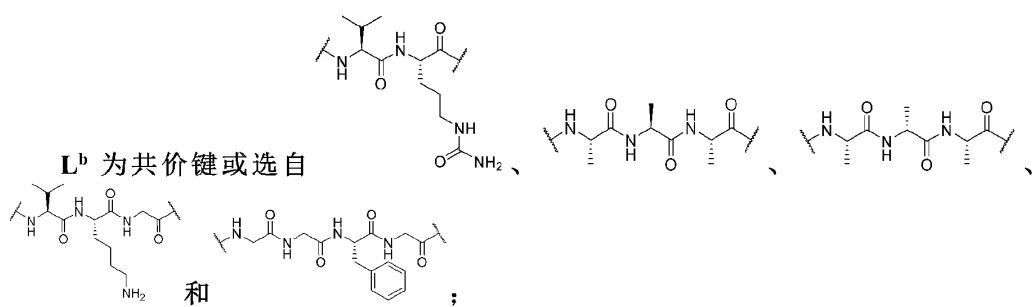
和 ；

其中， R^9 选自 H、乙酰基、苄氧羰基、三苯甲基和聚乙二醇亲水结构单元。在一些实施方案中，所述聚乙二醇亲水结构单元为  或 ，其中各 c 独立地选自 1-10 的整数。

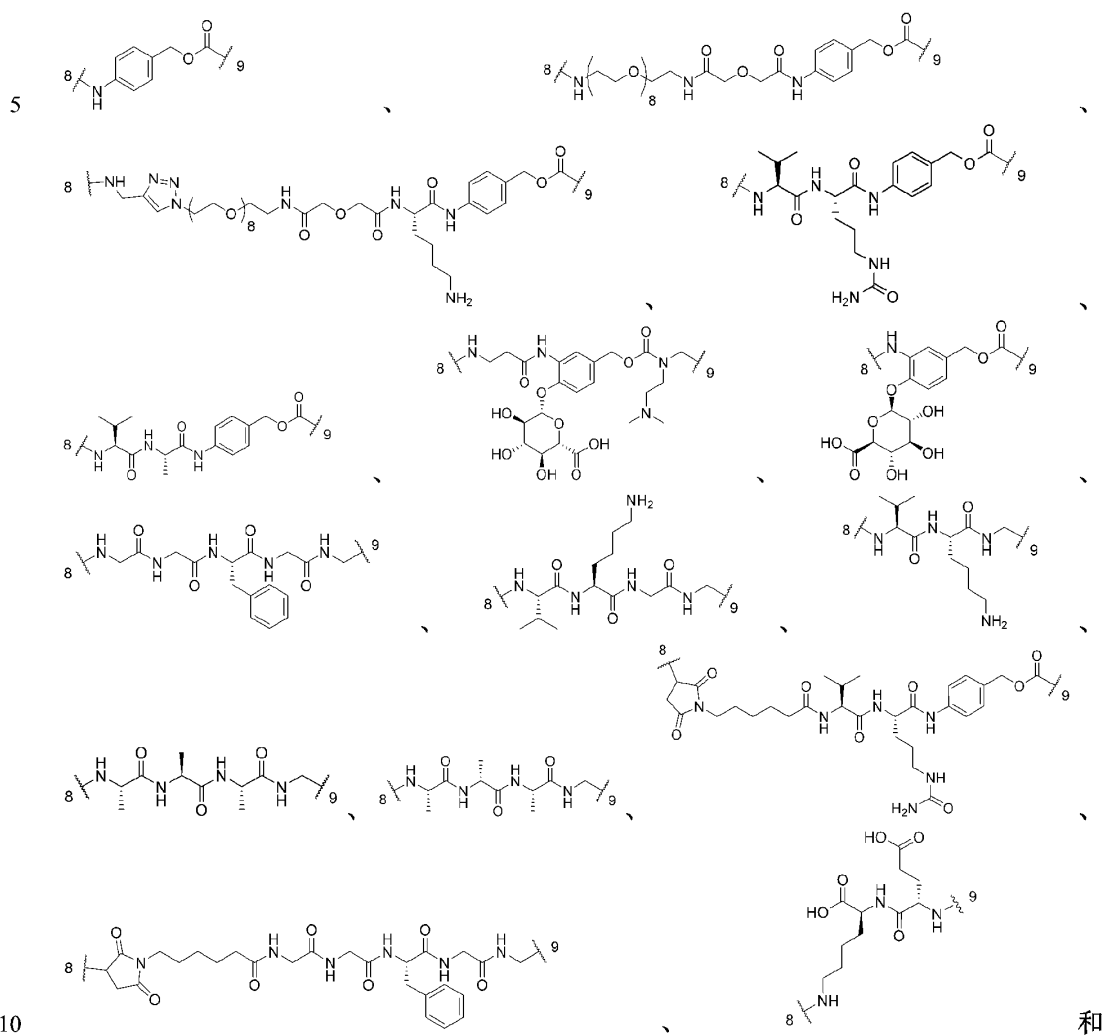
在一些实施方案中， L^c 为 $-NH-CH_2-$ 或 。

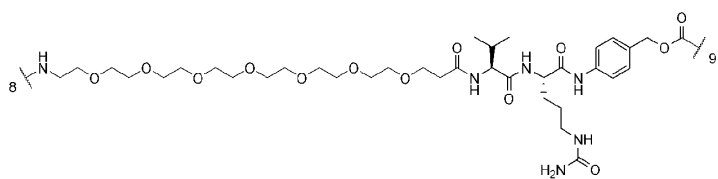
在一些实施方案中， L^1 为共价键或 $-L^a-L^b-L^c-$ ，其中：

L^a 为共价键或选自  和 ；其中，各 c 独立地选自 1-10 的整数；



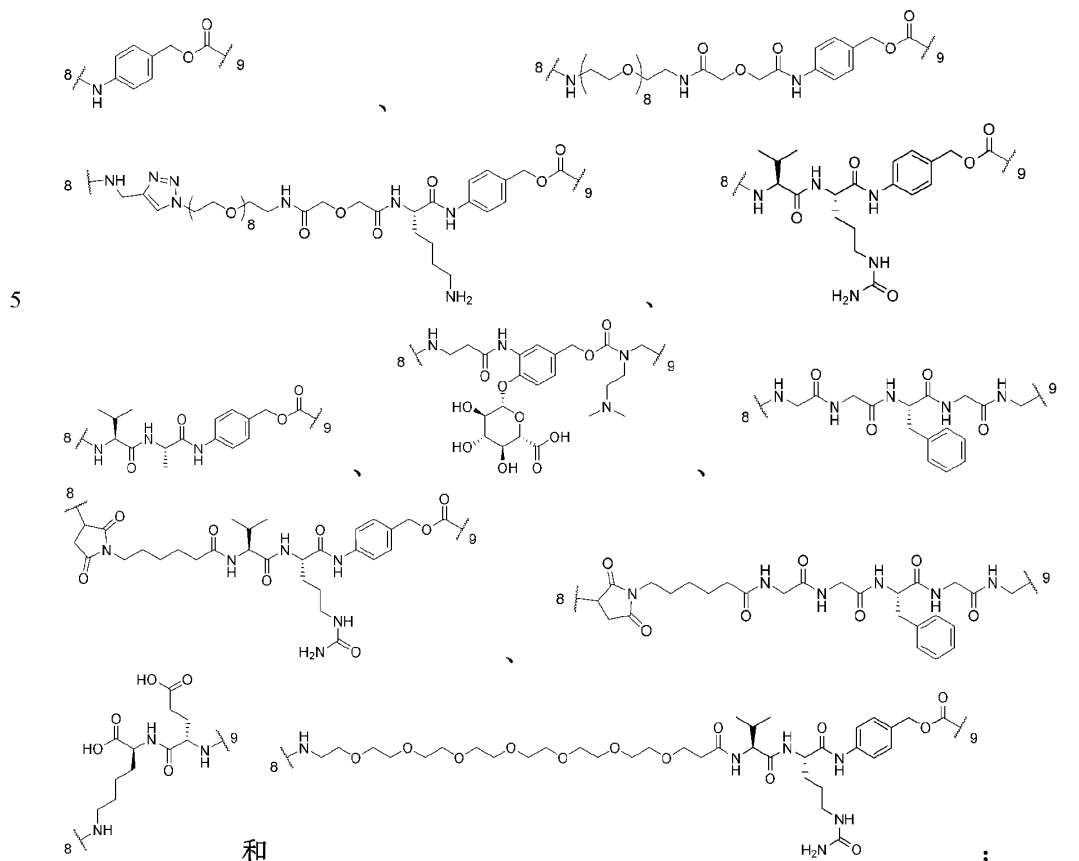
在一些实施方案中，L¹为共价键或选自以下结构：





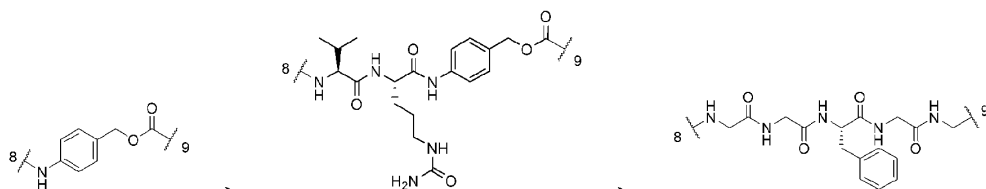
其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

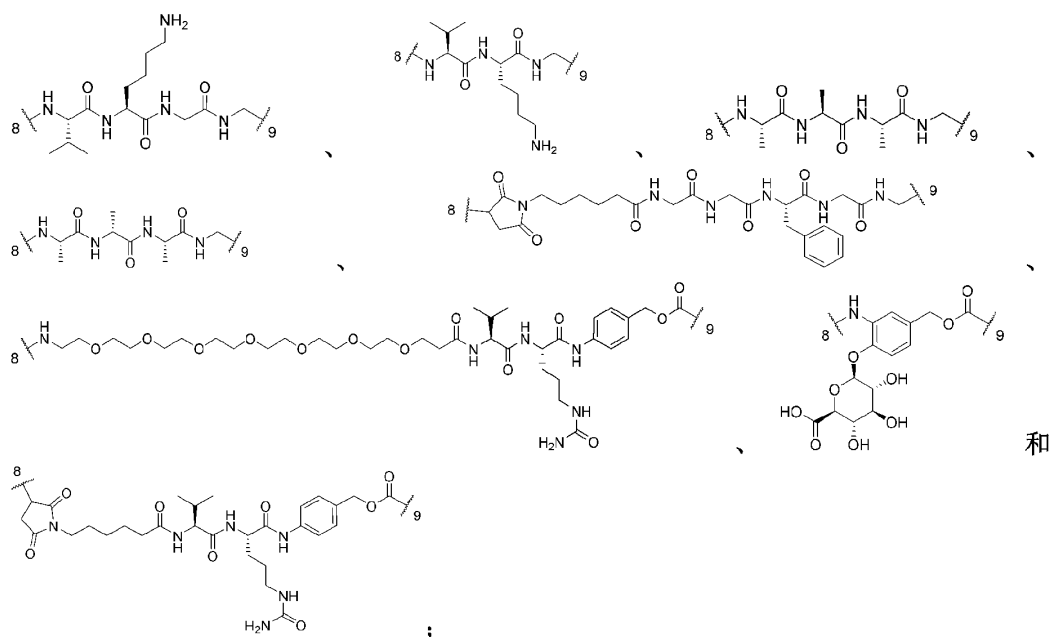
在一些实施方案中，L¹ 为共价键或选自以下结构：



其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

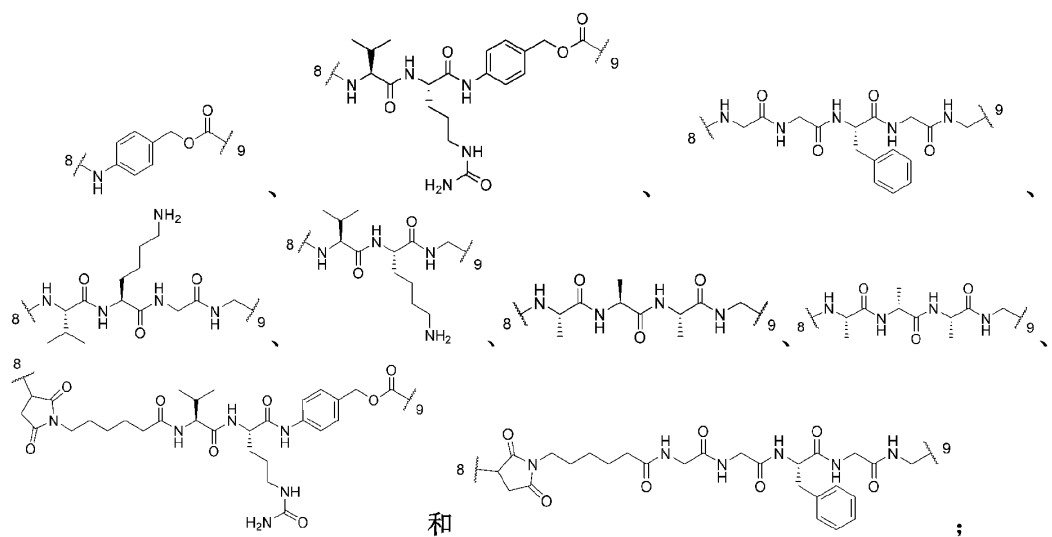
10 在一些实施方案中，L¹ 为：





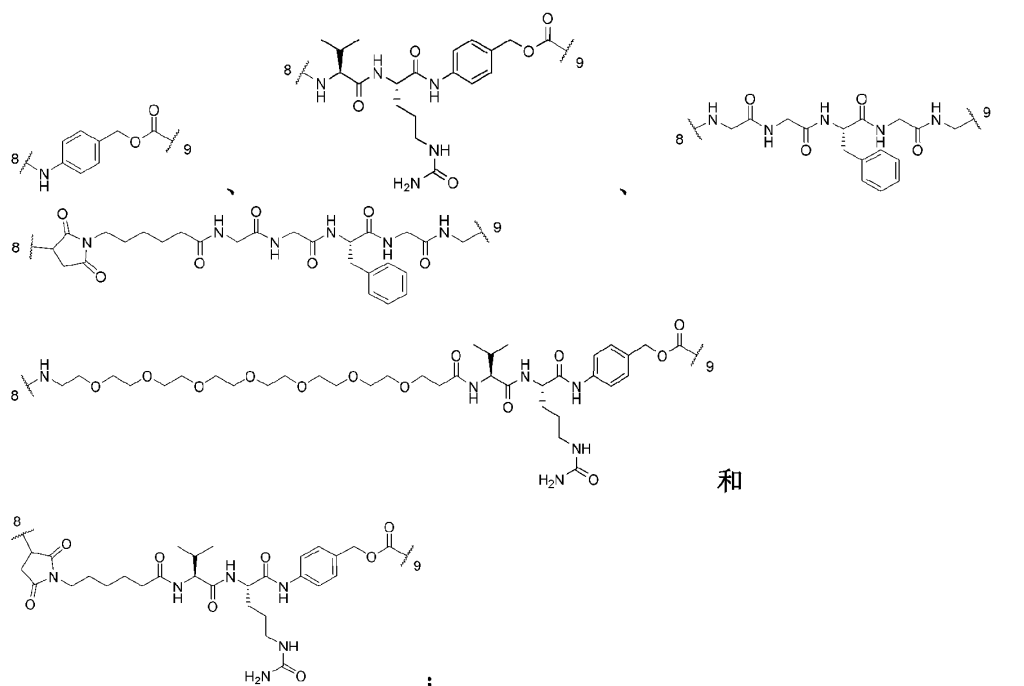
5 其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

在一些实施方案中，L¹ 为：



10 其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

在一些实施方案中，L¹ 为：

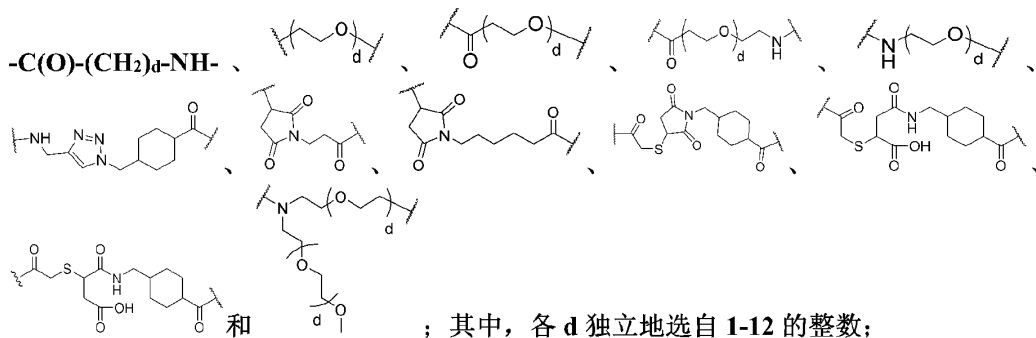


5 其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

在一些实施方案中，L² 选自不可断裂连接子和可断裂连接子，其中，可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割，所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶。

在一些实施方案中，L² 为 -L^d-L^e-L^f-，其中：

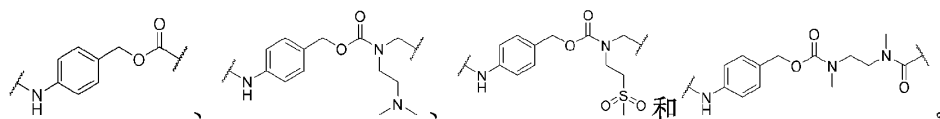
10 L^d 为共价键或选自由下述的一个或多个组成的二价结构：C₁₋₆ 亚烷基、



；其中，各 d 独立地选自 1-12 的整数；

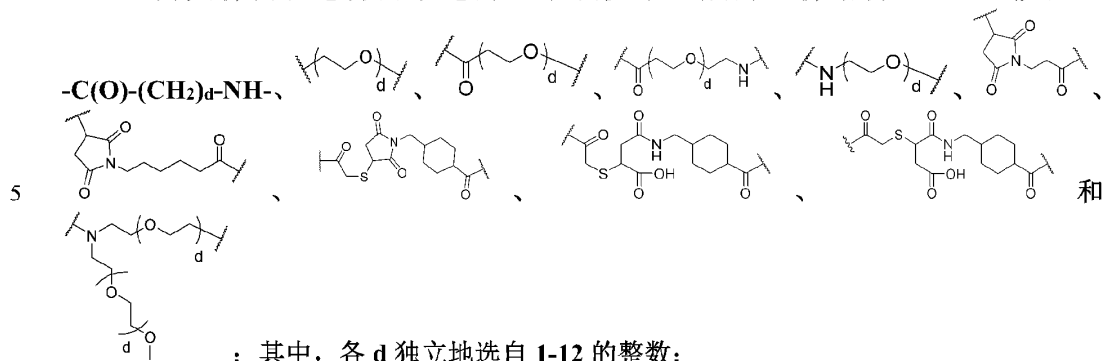
15 L^e 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn；

L^f 为共价键、-CH₂-NH-或选自以下结构：



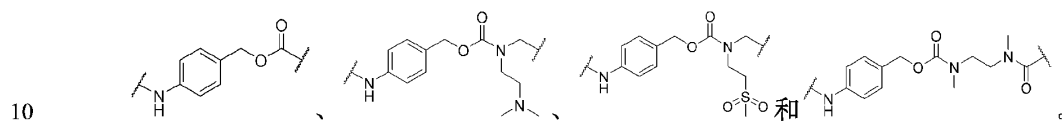
在一些实施方案中, L^2 为 $-L^d-L^e-L^f-$, 其中:

L^d 为共价键或选自由下述的一个或多个组成的二价结构: C_{1-6} 亚烷基、

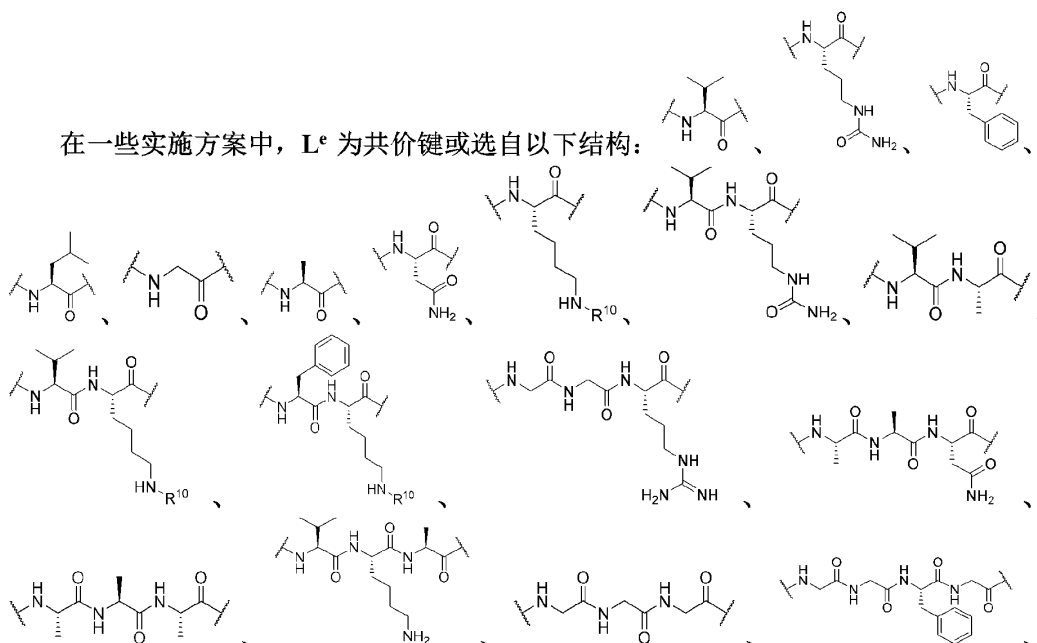


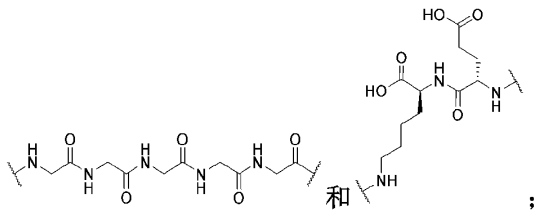
L^e 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段, 其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn;

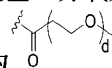
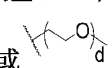
L^f 为共价键、 $-CH_2-NH-$ 或选自以下结构:



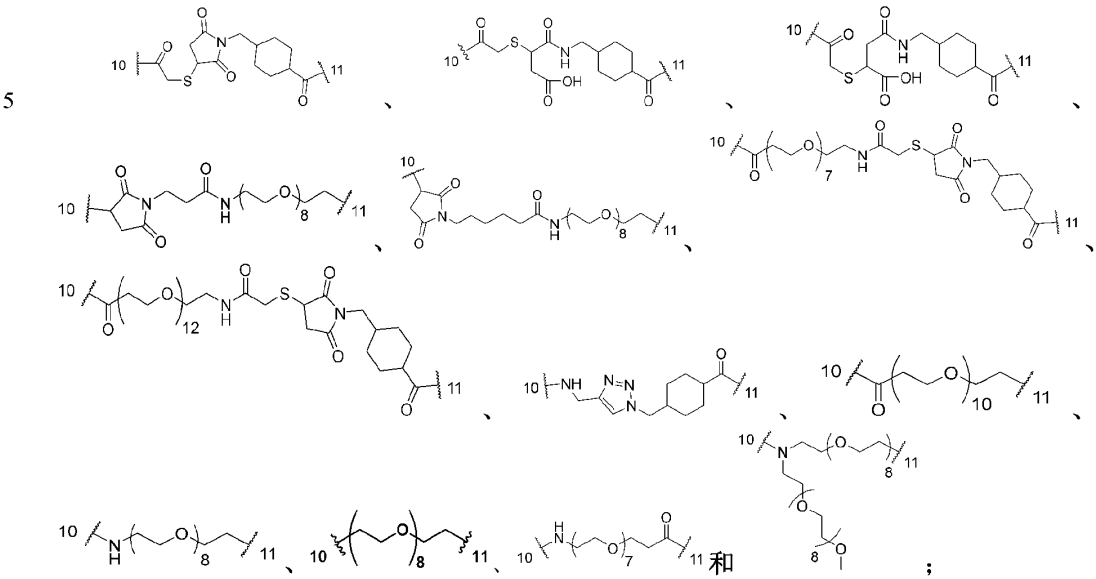
在一些实施方案中, L^e 为共价键或选自以下结构:





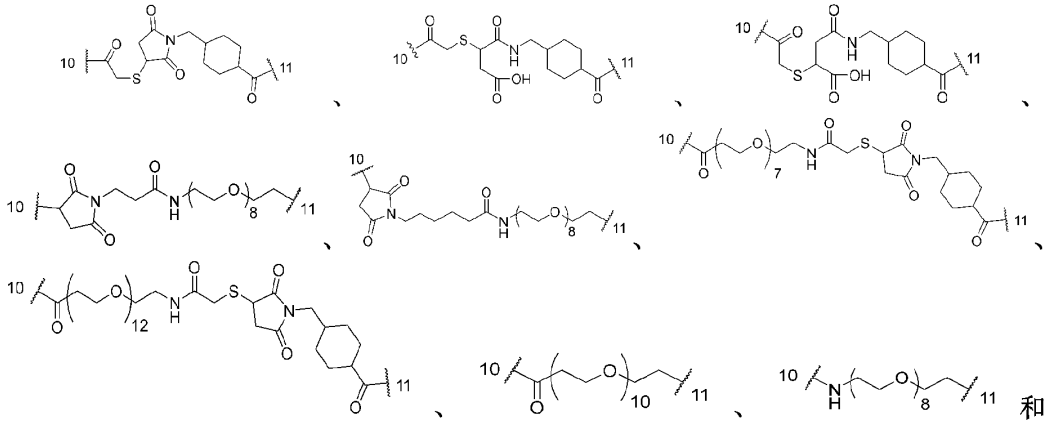
其中，各 R^{10} 独立地选自 H、乙酰基、苄氧羰基、三苯甲基和聚乙二醇亲水结构单元；
优选地，所述聚乙二醇亲水结构单元为  或 ；各 d 独立地选自 1-10 的整数。

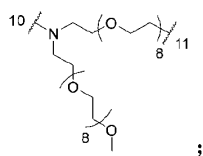
在一些实施方案中， L^2 选自以下结构：



其中，位置 10 同 Aa 相连，位置 11 同 D^2 相连。

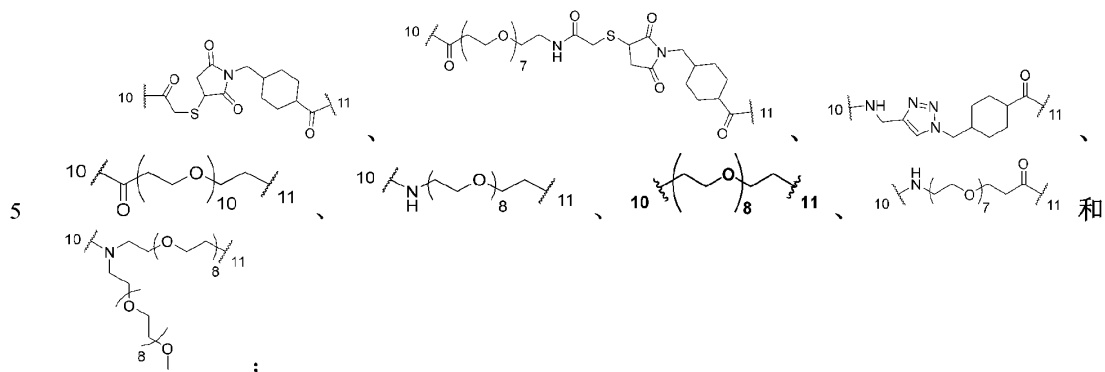
10 在一些实施方案中， L^2 选自以下结构：





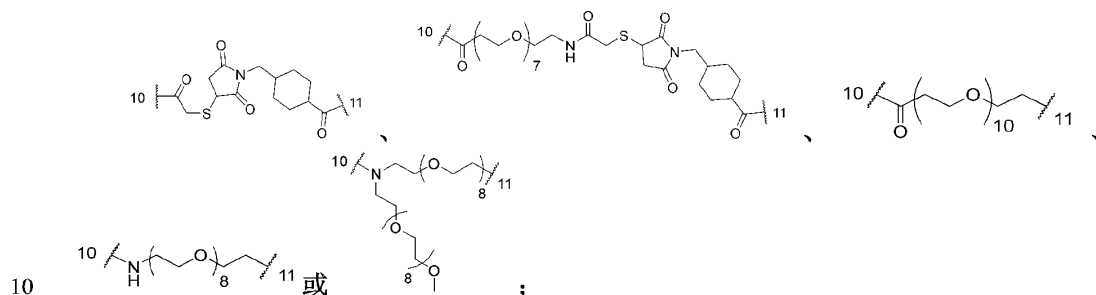
其中，位置 10 同 Aa 相连，位置 11 同 D² 相连；

在一些实施方案中，L² 选自以下结构：



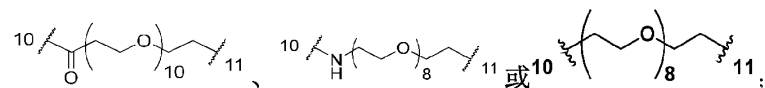
其中，位置 10 同 Aa 相连，位置 11 同 D² 相连。

在一些实施方案中，L² 为：



其中，位置 10 与 Aa 相连，位置 11 与 D² 相连。

在一些实施方案中，L² 为：



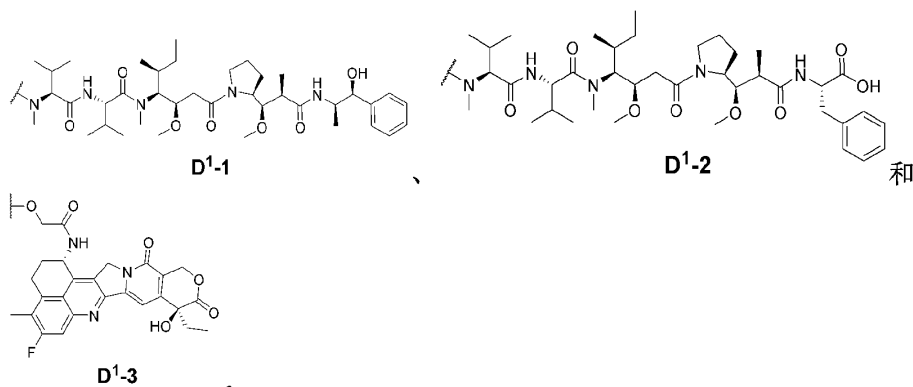
其中，位置 10 与 Aa 相连，位置 11 与 D² 相连。

- 15 在一些实施方案中，D¹ 选自细胞毒性药物片段，所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂和拓扑异构酶抑制剂，所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素（dolastatin）、澳瑞他汀（auristatin）类、美登素（maytansine）类、微管溶素（Tubulysins）类和隐粘菌素（cryptomycins）类，所述 DNA 损伤剂包括但不限于 PBD 类、杜卡霉素

(duocarmycin) 类和卡齐霉素 (calicheamicin) 类, 所述拓扑异构酶抑制剂包括但不限于喜树碱及其衍生物。

在一些实施方案中, 所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素 10、MMAE、MMAF、美登素、DM1、DM3 和 DM4, 所述拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱、SN-38、依喜替康、拓扑替康、贝洛替康、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、阿霉素、表柔比星和 PNU-159682。

在一些实施方案中, D¹ 选自以下结构:

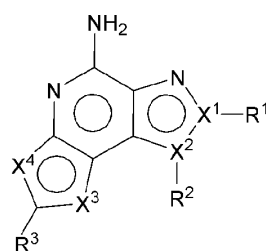


在一些实施方案中, D² 为 TLR 激动剂片段。

10 在一些实施方案中, 所述 TLR 激动剂选自 TLR2 激动剂、TLR4 激动剂、TLR6 激动剂、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂、TLR7/8 激动剂和 TLR9 激动剂。

在一些实施方案中, D² 为 TLR 激动剂片段, 所述 TLR 激动剂选自 TLR7 激动剂、TLR8 激动剂和 TLR7/8 激动剂。

在一些实施方案中, D² 为 TLR 激动剂片段, 所述 TLR 激动剂为式(II)所示化合物:



II

其中,

X¹ 选自 N 和 C;

X² 选自 N 和 C;

且 X^1 和 X^2 中至少一个选自 N;

X^3 选自 O、S 和 N;

X^4 选自 O、S、N 和 CR^4 ;

R^1 选自 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $O-C_{1-6}$ 烷基;

5 R^2 选自氢和式- $L^3-L^4-L^5-L^6$;

L^3 选自共价键和 C_{1-6} 亚烷基;

L^4 选自共价键、 C_{3-10} 环烷基、3-12 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代;

10 L^5 选自共价键、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-NR^5-$ 、 $-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-O-$ 、 $-NR^5-C(O)-NR^5-$ 、 $-S(O)_r-NR^5-$ 、 $-NR^5-S(O)_r-$ 和 $-NR^5-S(O)_r-NR^5-$;

L^6 选自氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(O-CH_2CH_2)_n-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $-(O-CH_2CH_2)_n-O-C_{1-6}$ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、

15 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代;

R^3 选自氢和式- $L^7-L^8-L^9-L^{10}$;

L^7 选自共价键和 C_{1-6} 亚烷基;

L^8 选自共价键、 C_{3-10} 环烷基、3-12 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代;

20 氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代;

L^9 选自共价键、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-C(O)-NR^6-$ 、 $-NR^6-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^6-$ 、 $-NR^6-C(O)-O-$ 、 $-NR^6-C(O)-NR^6-$ 、 $-S(O)_p-NR^6-$ 、 $-NR^6-S(O)_p-$ 和 $-NR^6-S(O)_p-NR^6-$;

L^{10} 选自氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(O-CH_2CH_2)_q-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $-(O-CH_2CH_2)_q-O-C_{1-6}$ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代;

25 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代;

R^4 选自氢、卤素、氰基、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-10} 环烷基;

各 R^5 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基;

各 R^6 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基;

各 r 独立地为 1 或 2;

各 n 独立地选自 1-25 的整数;

各 p 独立地为 1 或 2;

5 各 q 独立地选自 1-25 的整数;

D^2 通过式(II)中的 R^2 或 R^3 与 L^2 相连。

在一些实施方案中, 各 n 独立地选自 1-15, 优选地, n 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 和 15。

10 在一些实施方案中, 各 q 独立地选自 1-15, 优选地, q 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 和 15。

在一些实施方案中, X^3 选自 S 和 N。

在一些实施方案中, L^3 选自共价键和 C_{1-3} 亚烷基。

15 在一些实施方案中, L^4 选自共价键、3-12 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代。

在一些实施方案中, L^5 选自共价键、 $-NR^5-$ 、 $-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-O-$ 、 $-NR^5-C(O)-NR^5-$ 、 $-S(O)_r-NR^5-$ 、 $-NR^5-S(O)_r-$ 和 $-NR^5-S(O)_r-NR^5-$, 各 R^5 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基; 优选地, L^5 选自共价键和 $-NR^5-$, 各 R^5 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基。

20 在一些实施方案中, L^6 选自氢、 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $(O-CH_2CH_2)_n-O-C_{1-6}$ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代, n 为 1-10。

在一些实施方案中, L^8 选自共价键和 3-12 元杂环基, 所述杂环基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基和 C_{1-6} 烷基所取代。

在一些实施方案中, L^9 为共价键。

25 在一些实施方案中, L^{10} 选自氢、 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $(O-CH_2CH_2)_q-O-C_{1-6}$ 烷基, q 为 1-10。

在一些实施方案中, R^3 选自氢和式- $L^7-L^8-L^9-L^{10}$;

L^8 选自共价键和 3-12 元杂环基, 所述杂环基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰

基和 C₁₋₆ 烷基所取代;

L⁹ 为共价键;

L¹⁰ 选自氢、C₁₋₆ 烷基和 -C₁₋₆ 亚烷基-(O-CH₂CH₂)_q-O-C₁₋₆ 烷基;

q 选自 1-10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

5 在一些实施方案中, X¹ 为 C;

X² 为 N;

X³ 为 S;

X⁴ 选自 CR⁴;

R¹ 选自 C₁₋₆ 烷基;

10 R² 选自式-L³-L⁴-L⁵-L⁶;

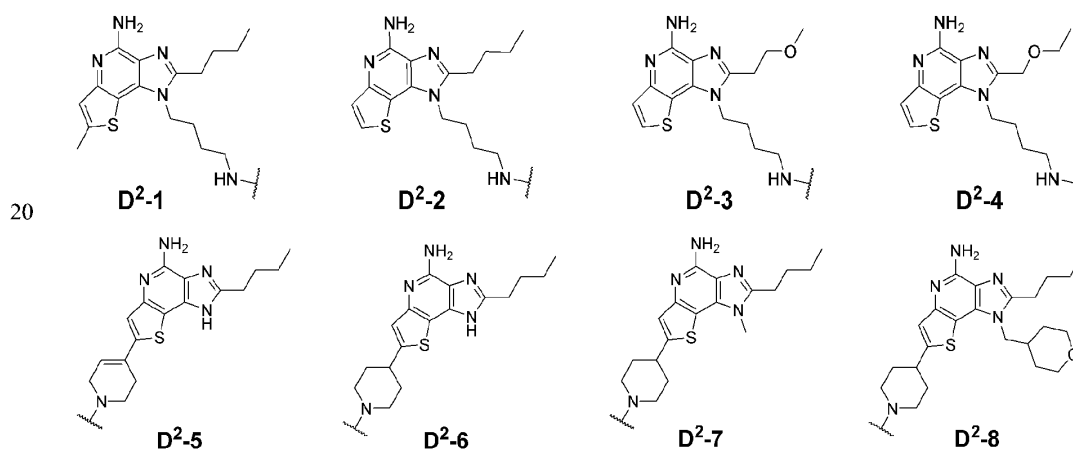
L³ 选自共价键和 C₁₋₆ 亚烷基;

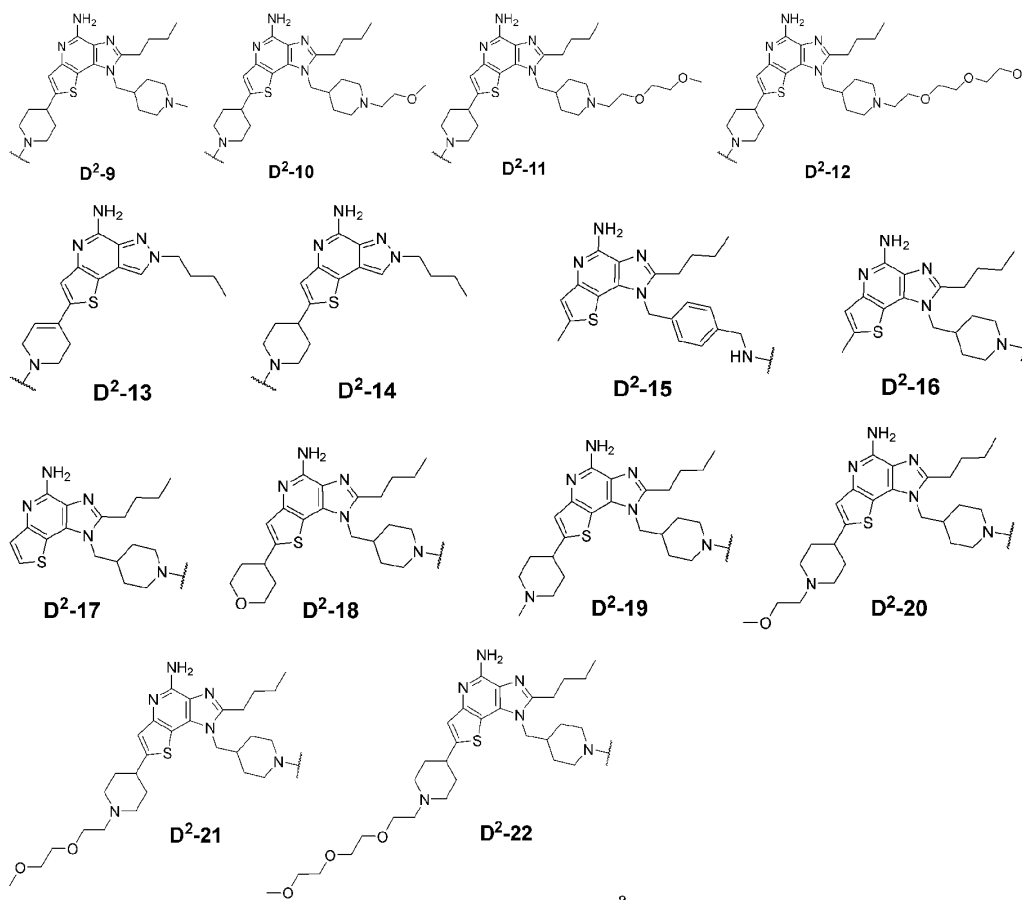
L⁴ 选自共价键、3-12 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 -C₁₋₆ 亚烷基-NH₂ 的基团所取代;

15 L⁵ 选自共价键和 -NR⁵-, 各 R⁵ 独立地选自氢和 C₁₋₆ 烷基;

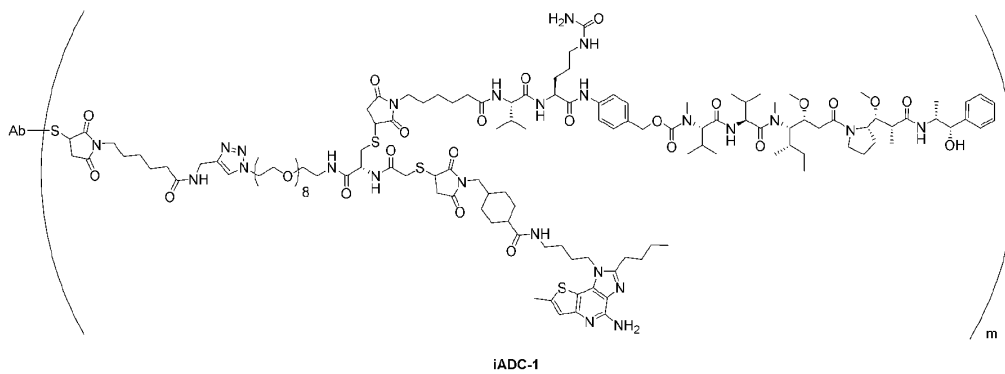
L⁶ 选自氢、C₁₋₆ 烷基和 -C₁₋₆ 亚烷基-(O-CH₂CH₂)_n-O-C₁₋₆ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、-NH₂、-NH-C(O)-O-C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、羧基和 -C(O)-O-C₁₋₆ 烷基的基团所取代。

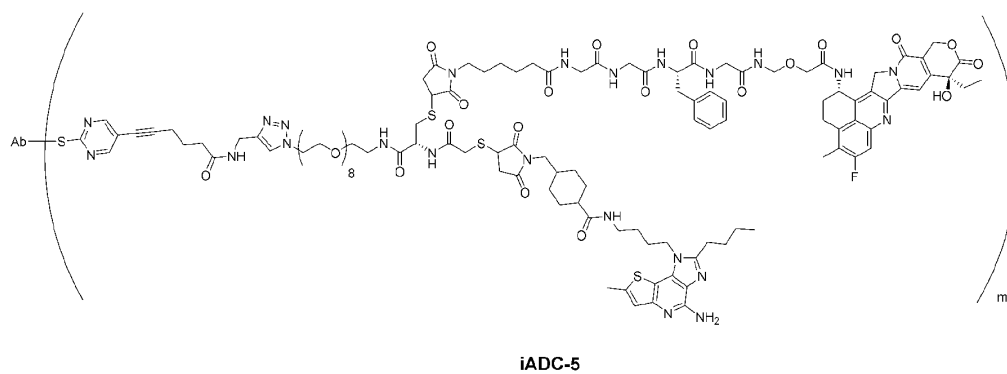
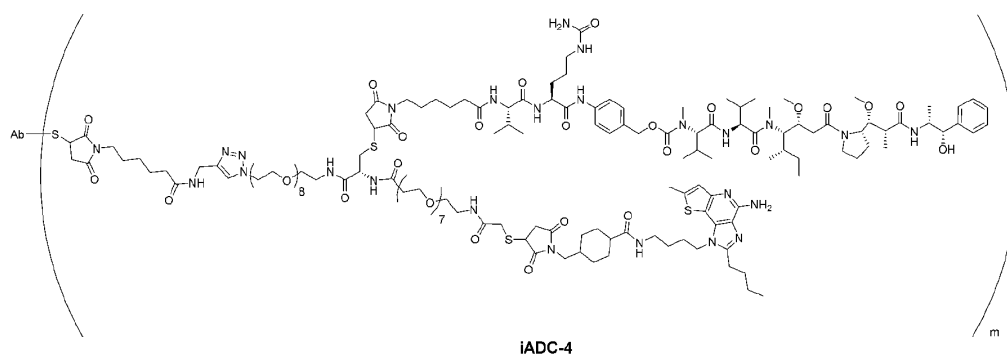
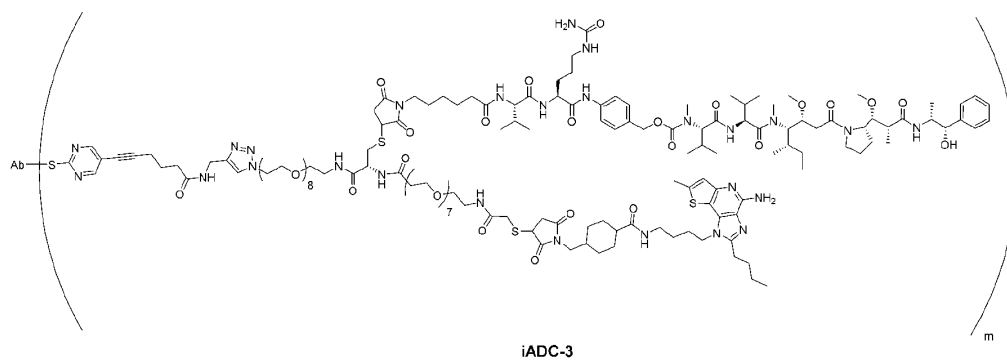
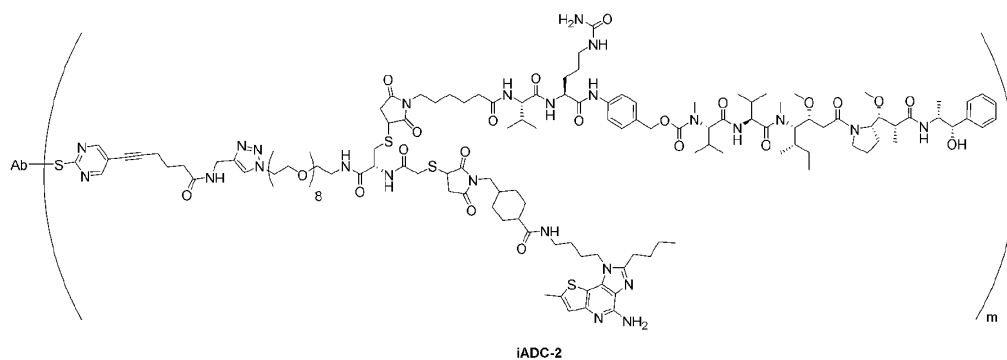
在一些实施方案中, D² 选自以下结构:

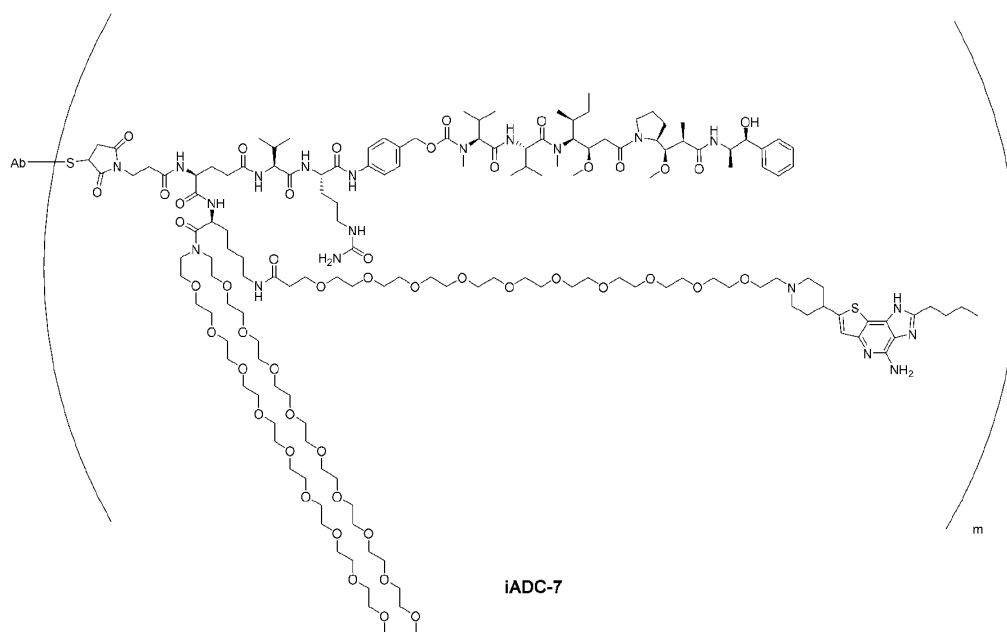
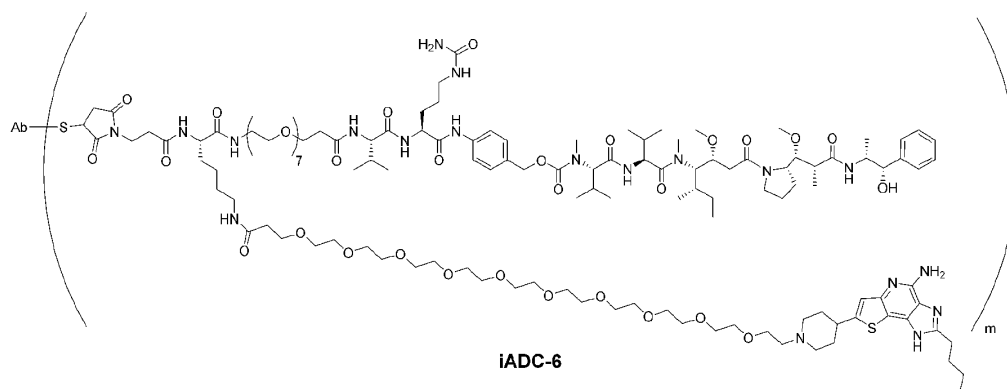


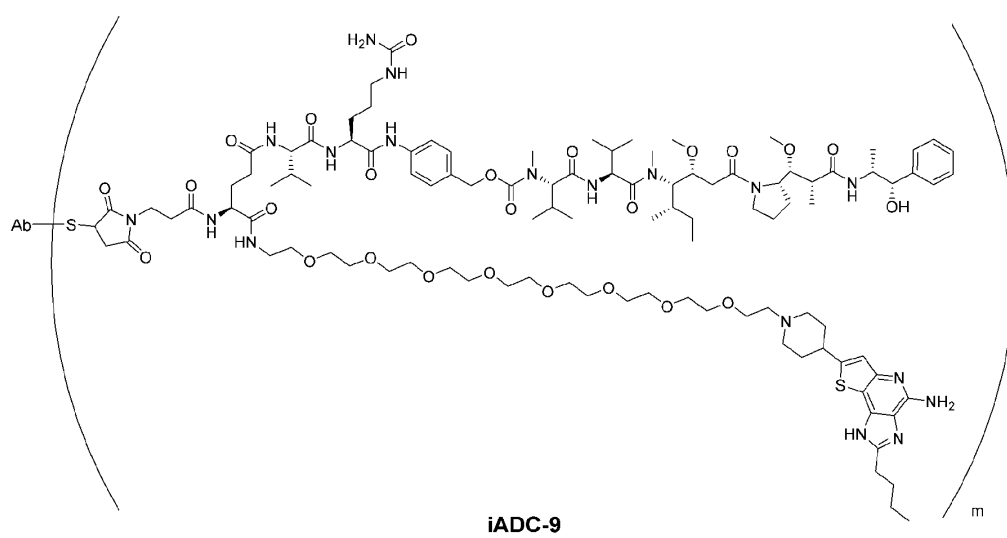
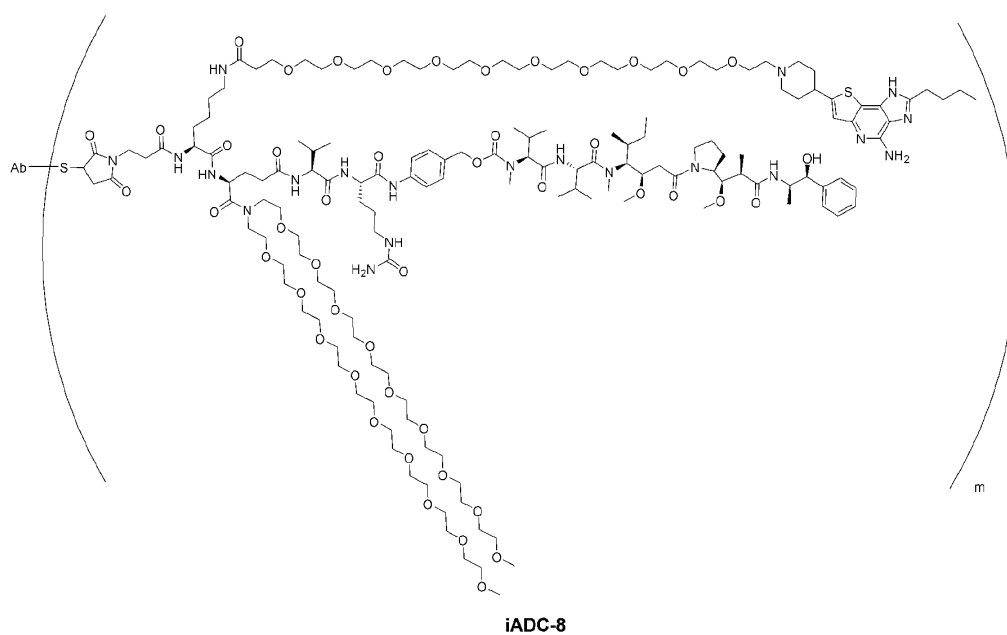


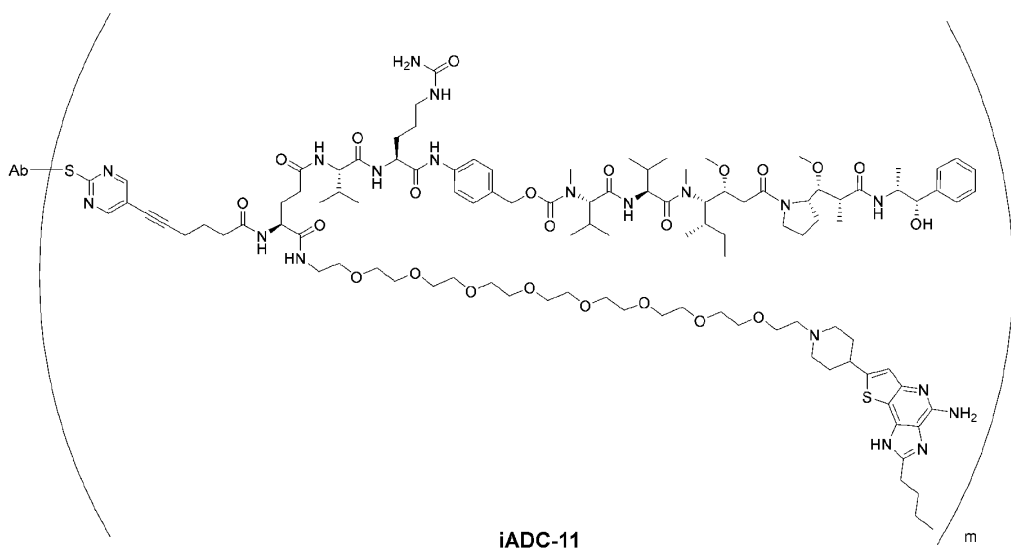
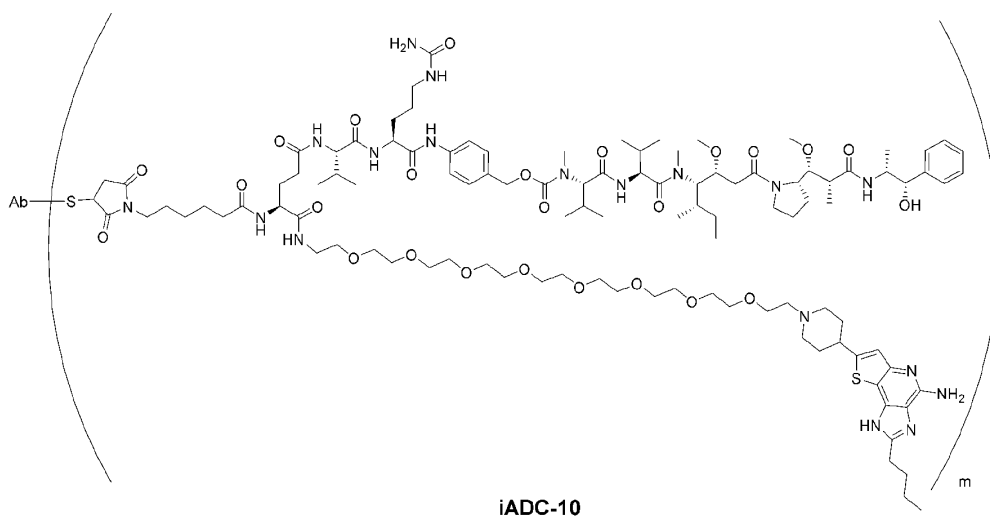
5 在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物选自以下结构：

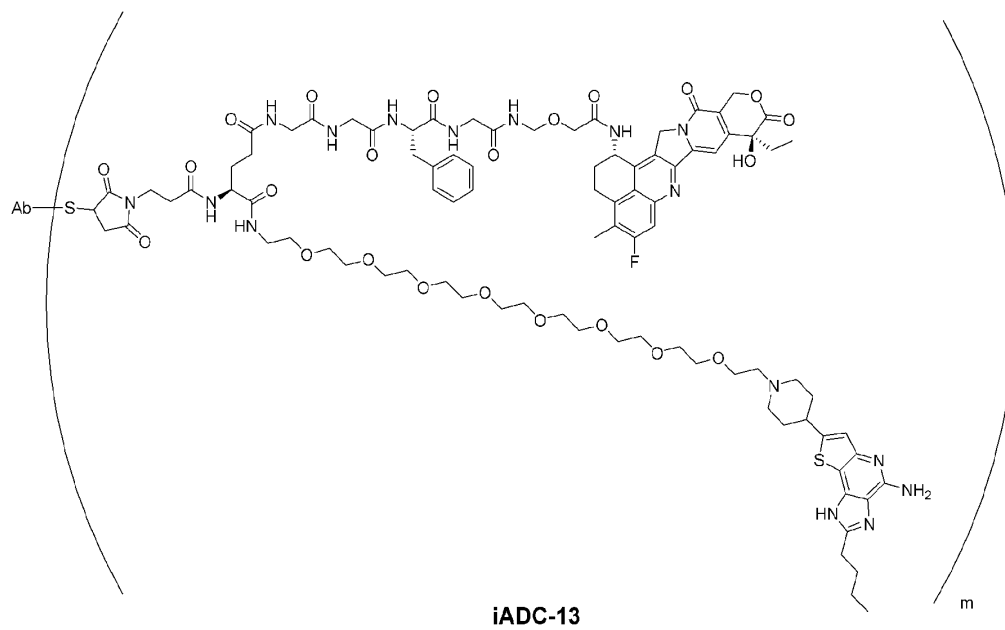
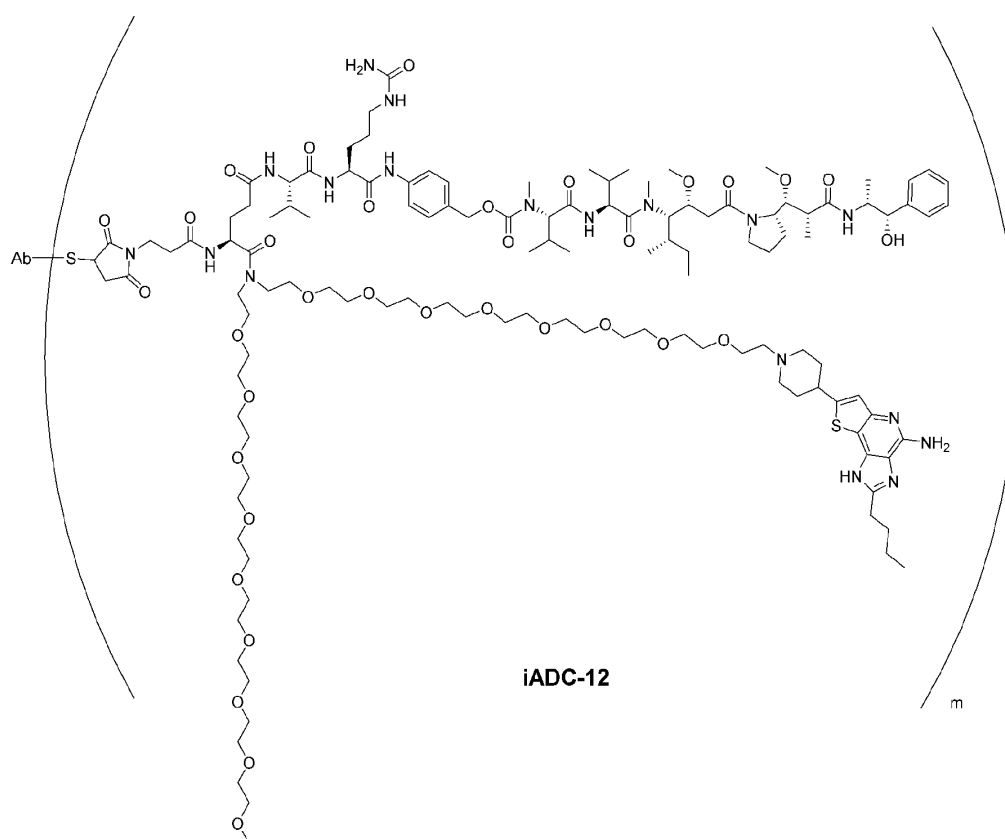


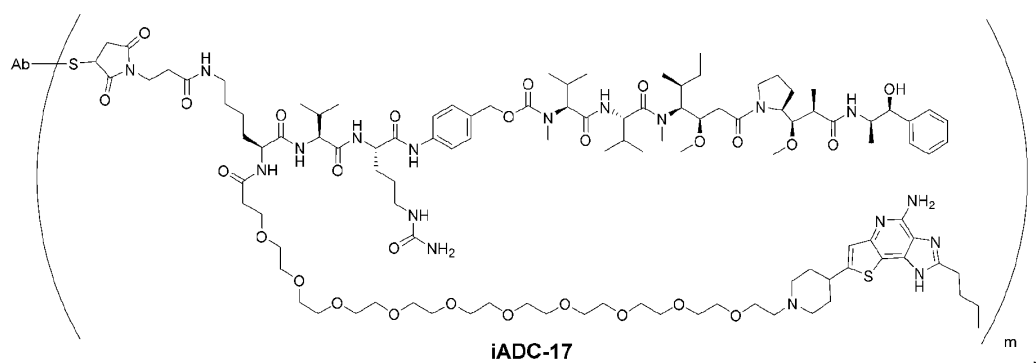
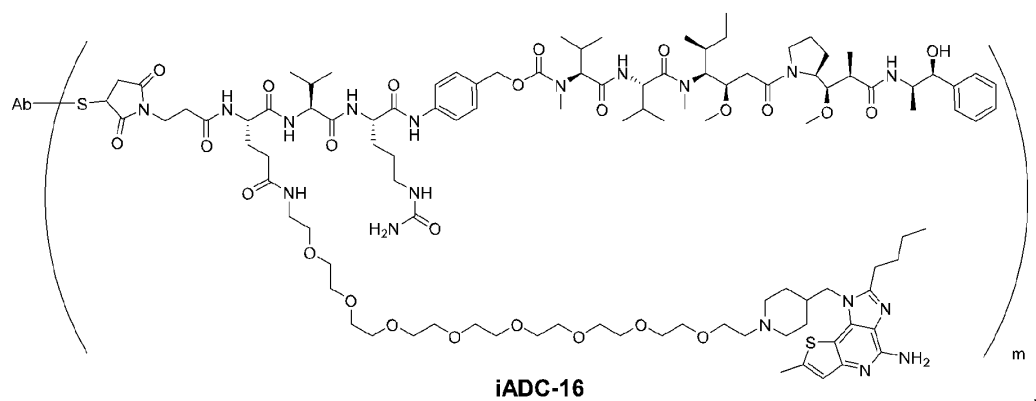
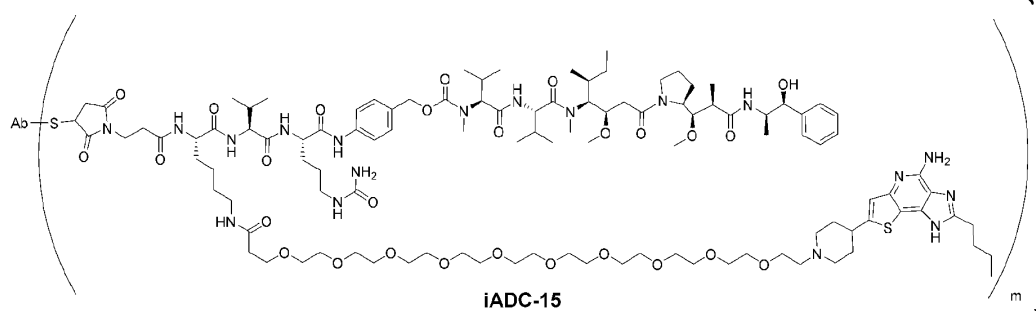
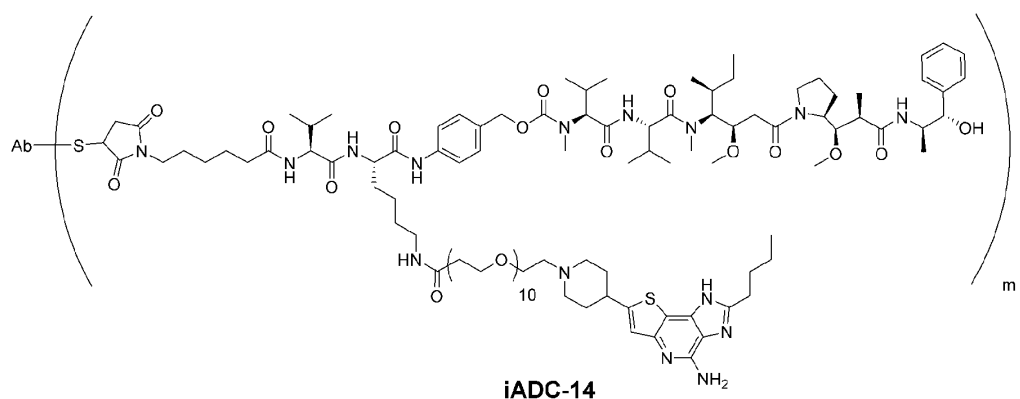


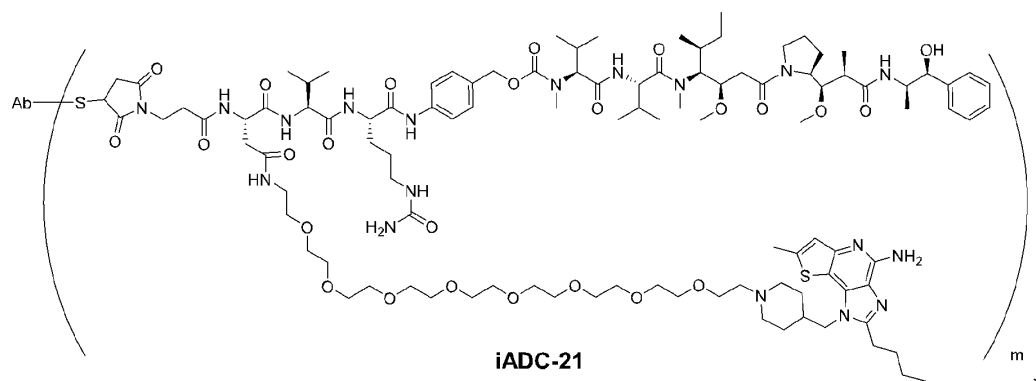
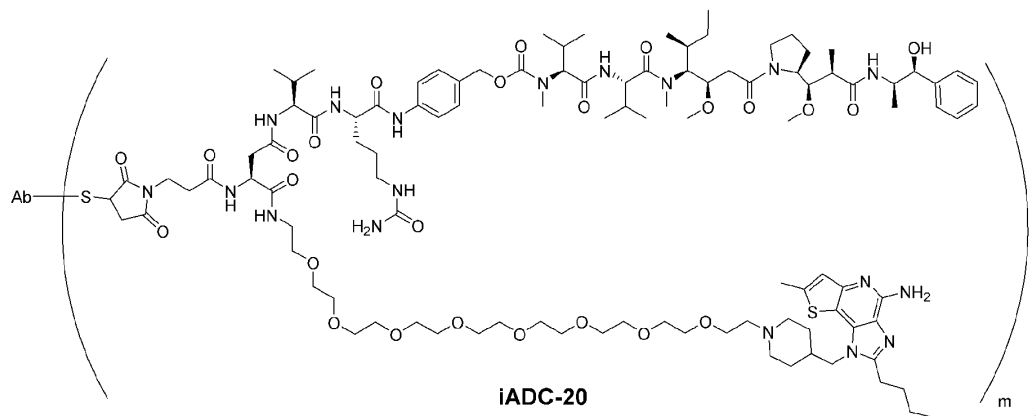
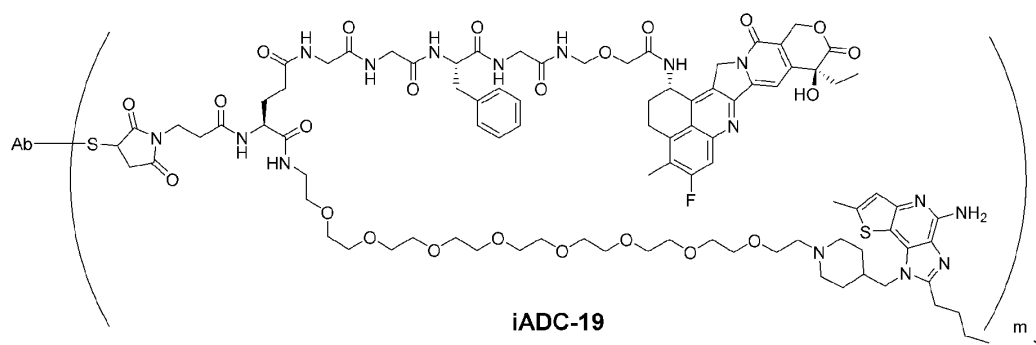
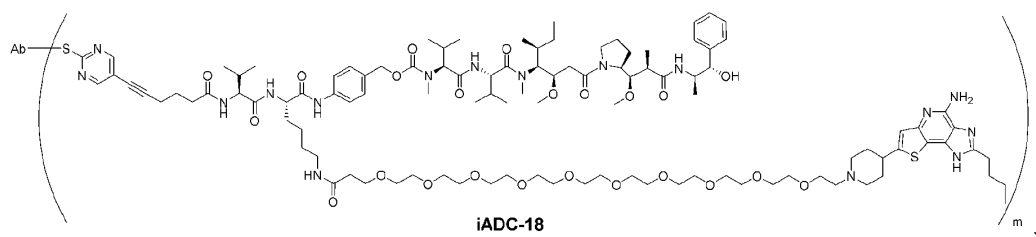




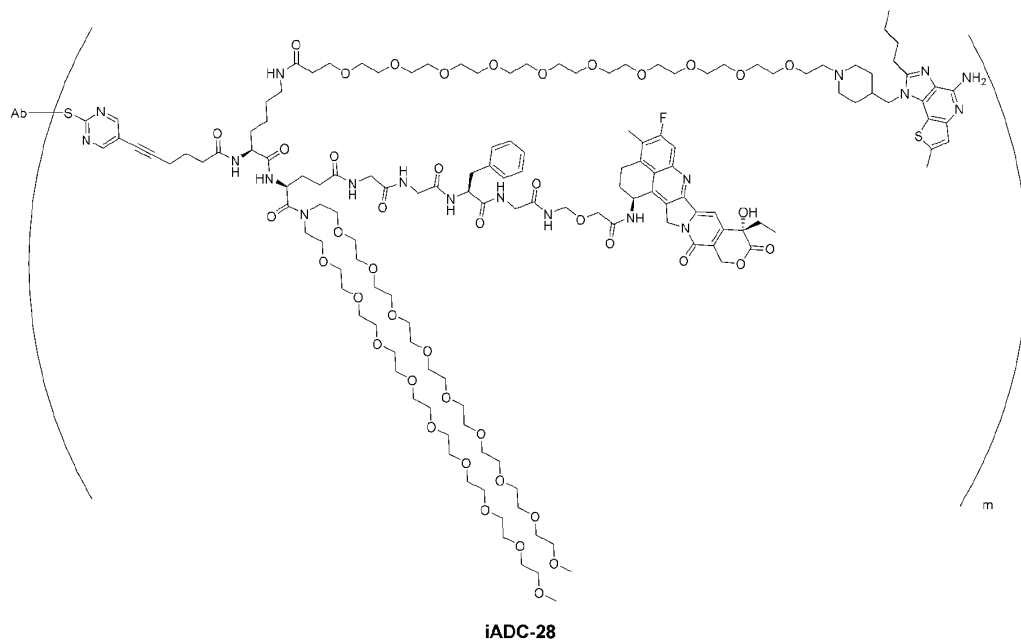
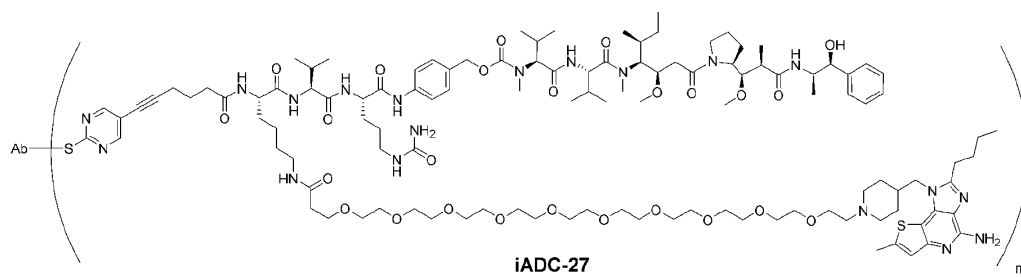
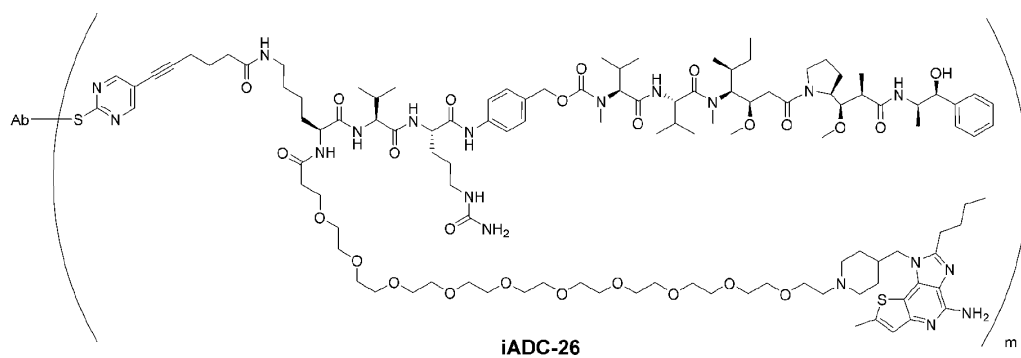


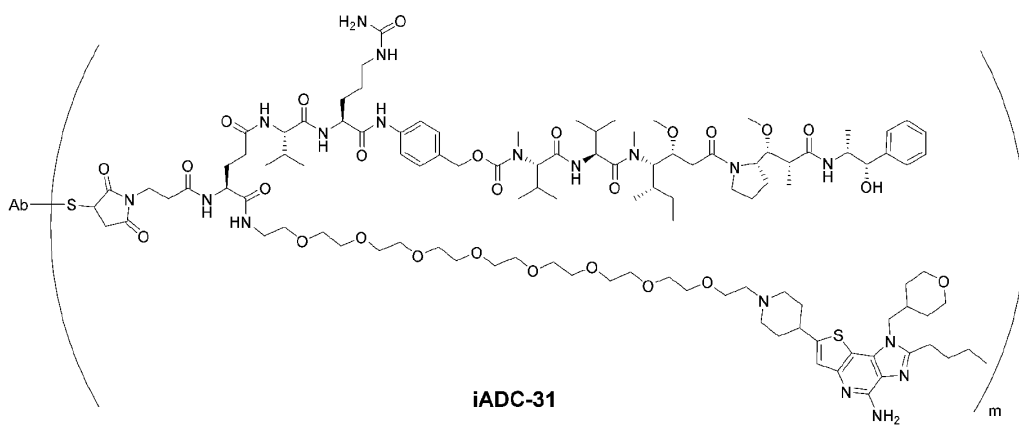
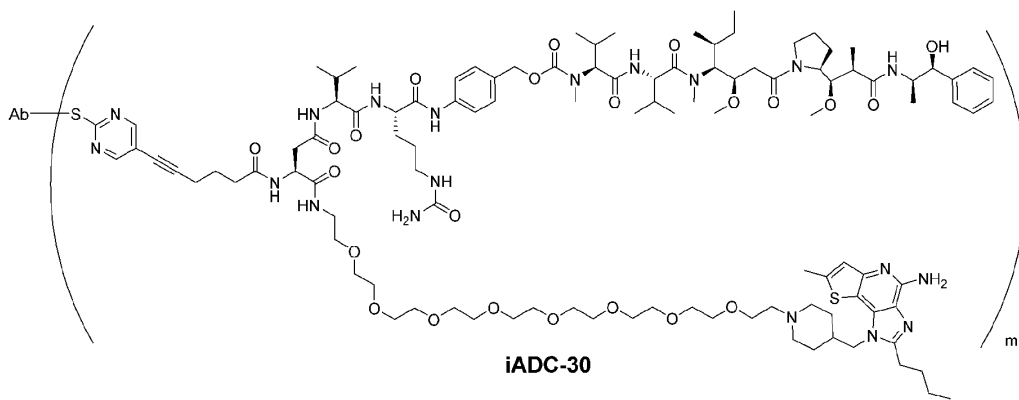
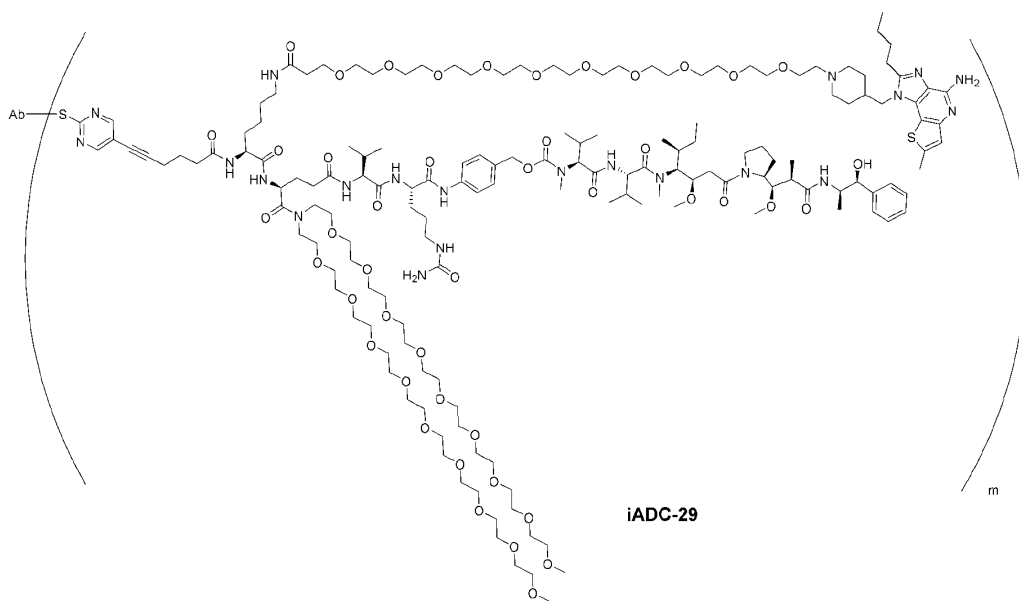


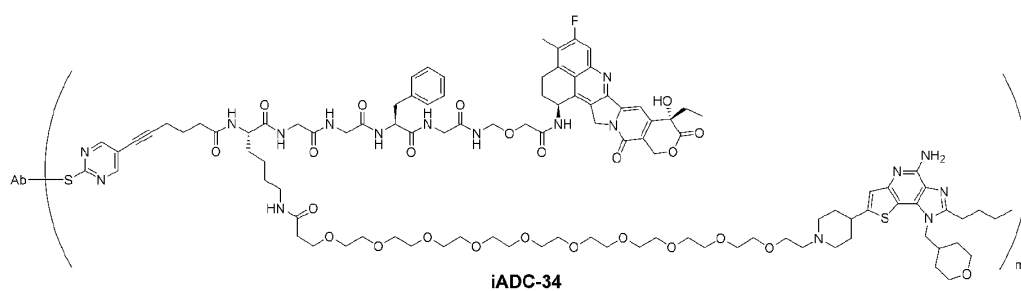
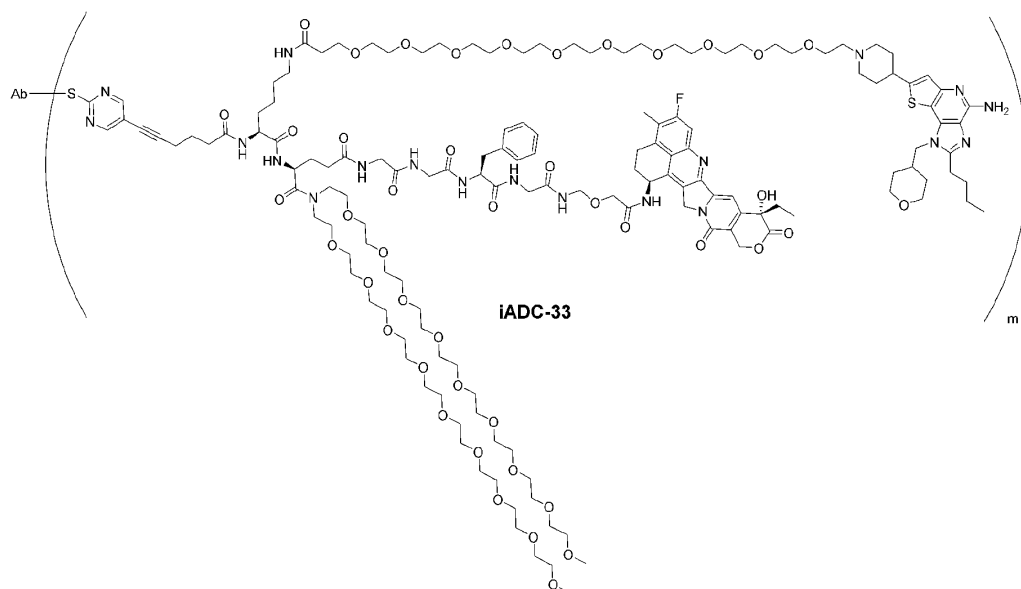
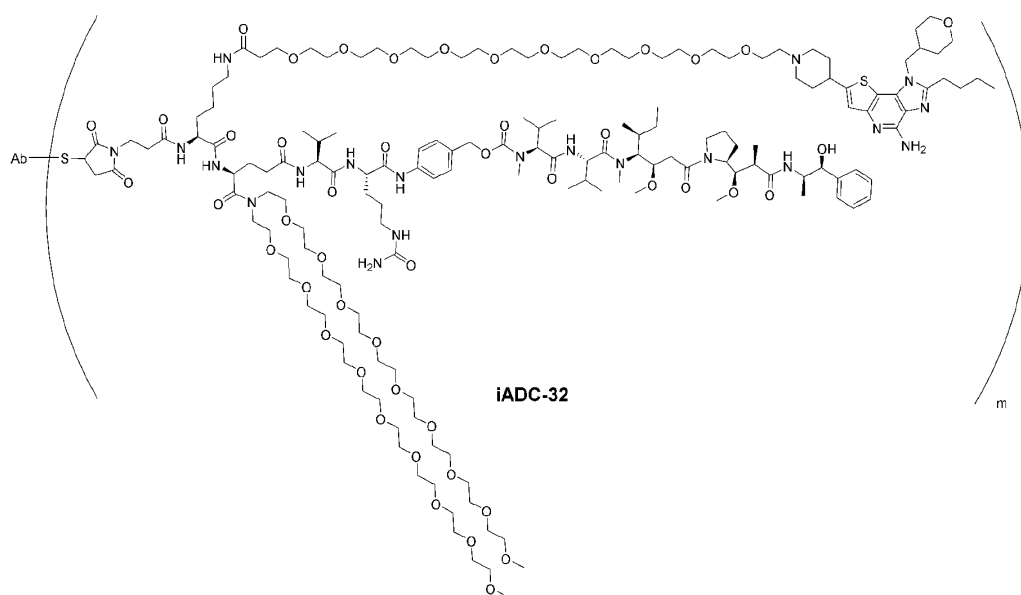


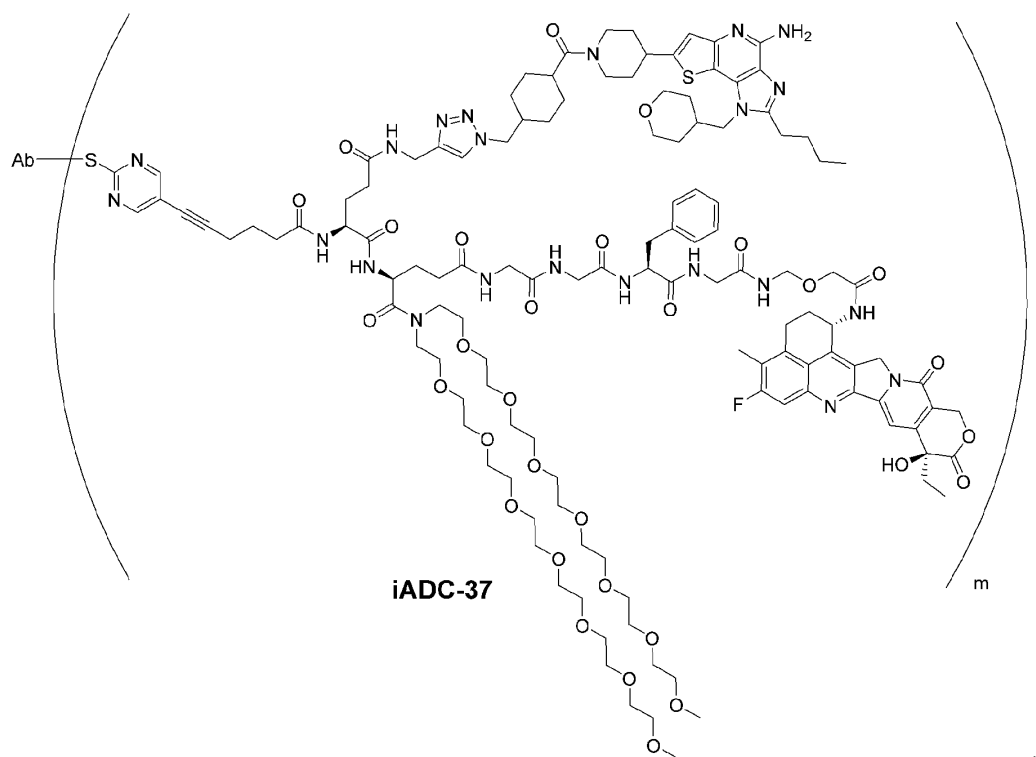
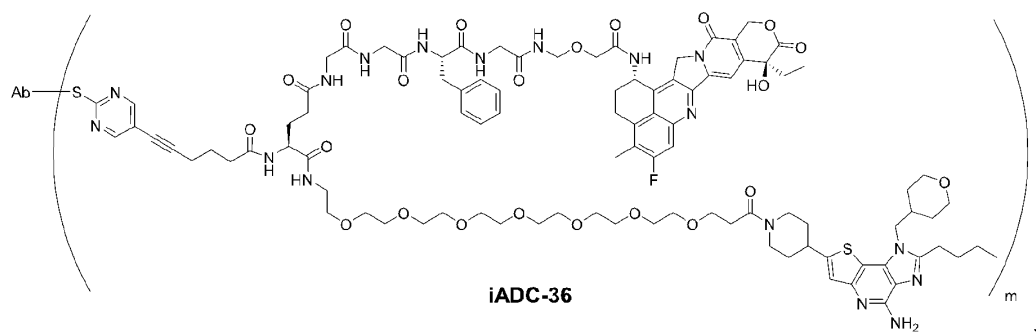
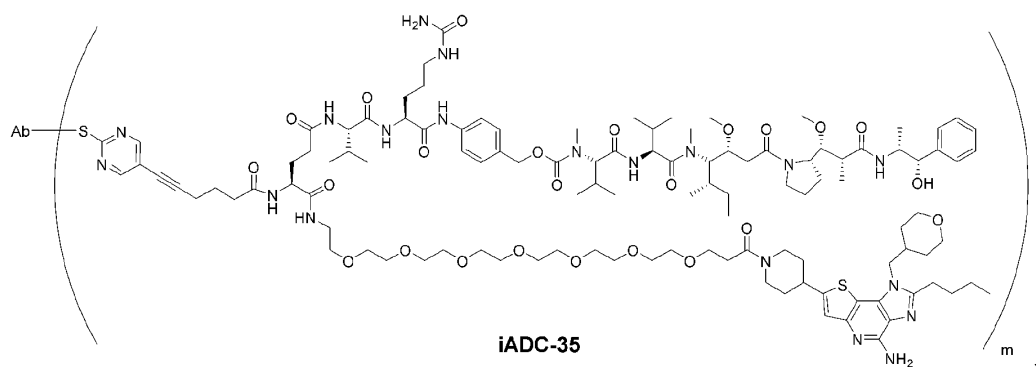


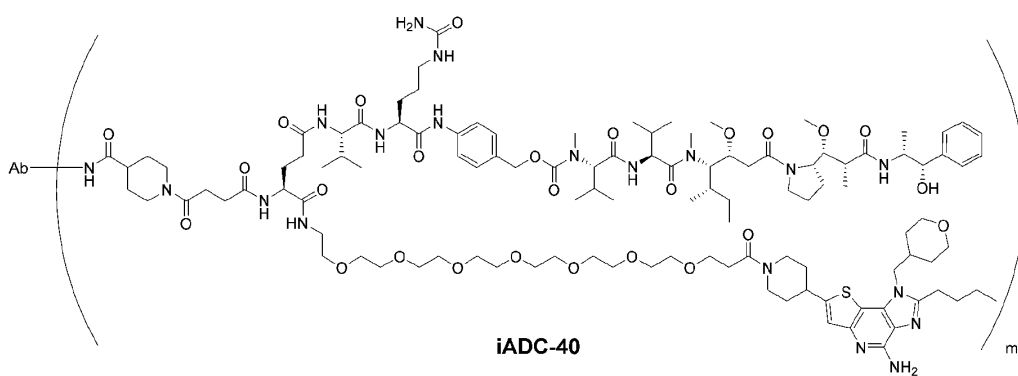
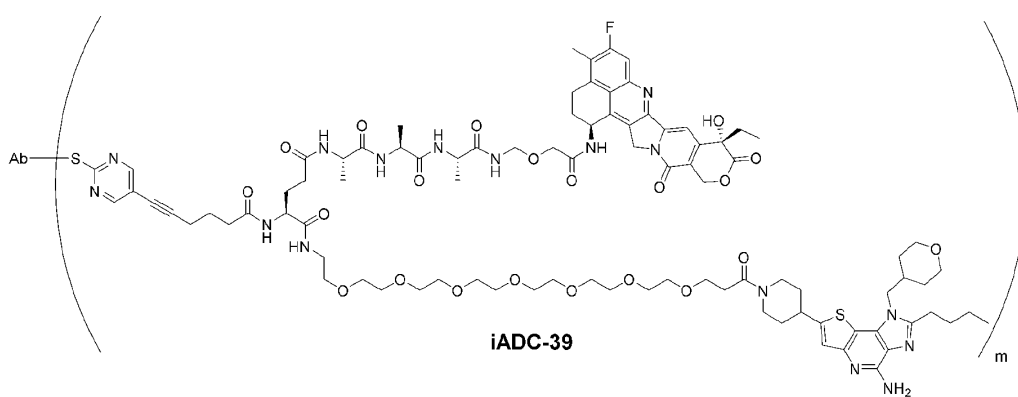
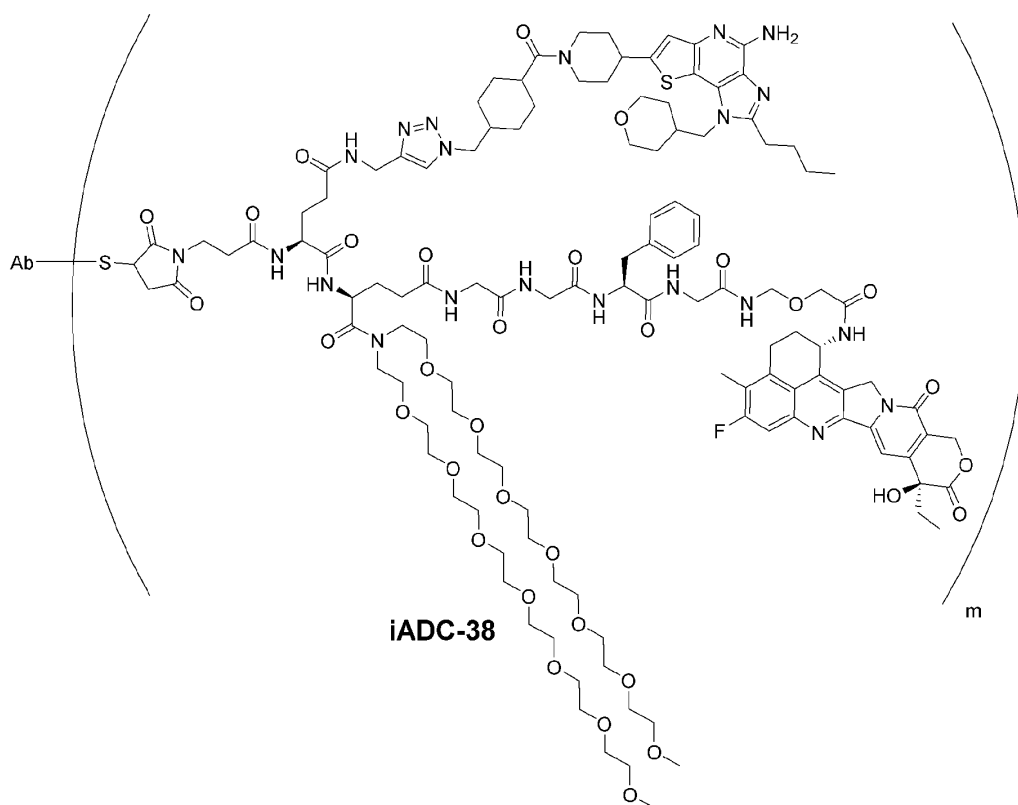


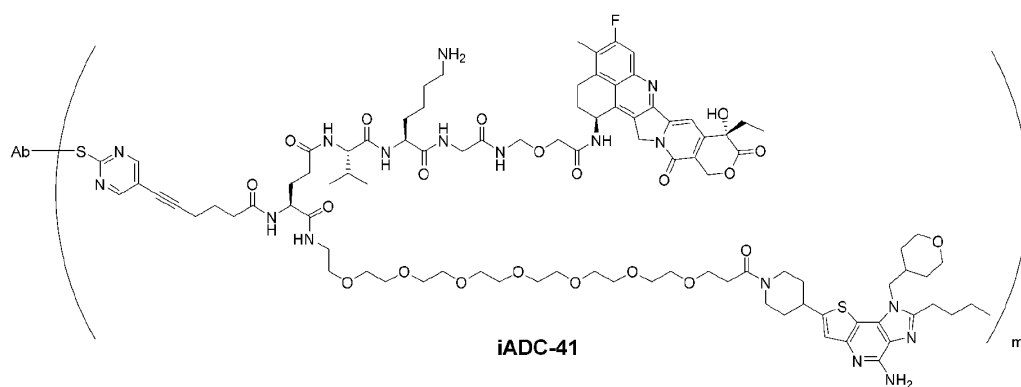




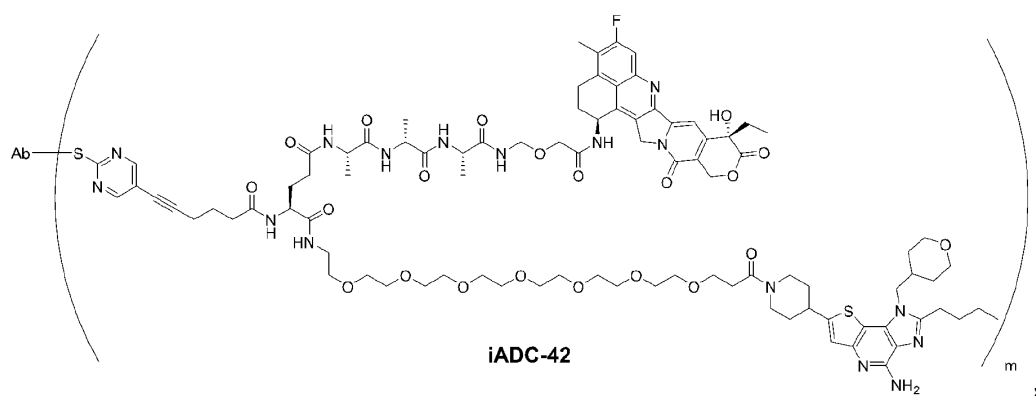








和



各 m 独立地选自 1-10，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

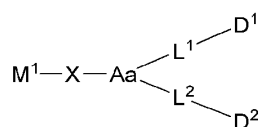
5 在一些实施方案中，所述 Ab 为曲妥珠单抗。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的 DAR 值为 2.0-5.0，例如 2.0-2.5，2.0-3.0，2.0-3.5，2.0-4.0，2.0-4.5，2.0-5.0，2.5-3.0，2.5-3.5，2.5-4.0，2.5-4.5，2.5-5.0，3.0-3.5，3.0-4.0，3.0-4.5，3.0-5.0，3.5-4.0，3.5-4.5，3.5-5.0，4.0-4.5，4.0-5.0，或 4.0-5.0。

药物-连接体

10 在另一个方面，本发明提供一种同时偶联有细胞毒性药物和 TLR 激动剂的药物-连接体，其可用于制备前述抗体药物偶联物。

具体地，本发明提供式(III)的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



III

34

其中,

M^1 为和靶向基团连接的接头部位的前体, 其中所述靶向基团如前文任一项所定义;

X 为连接 M 和 Aa 的连接子;

Aa 选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段;

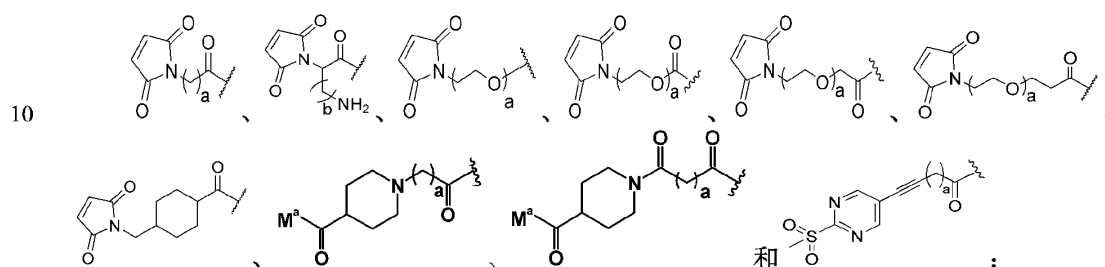
5 L^1 为共价键或连接 Aa 和 D^1 的连接子;

L^2 为连接 Aa 和 D^2 的连接子;

D^1 选自细胞毒性药物片段;

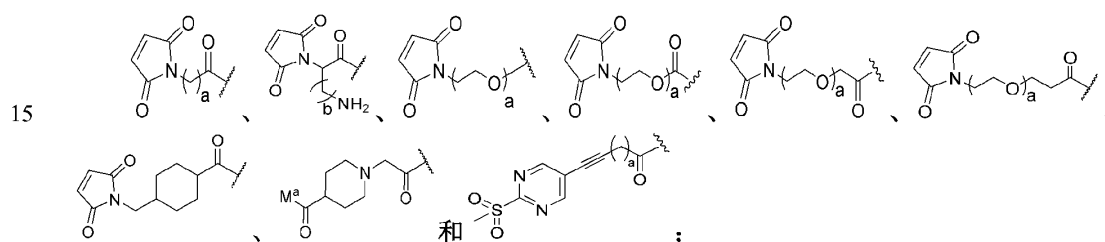
D^2 选自 TLR 激动剂片段。

在一些实施方案中, M^1 选自以下结构:



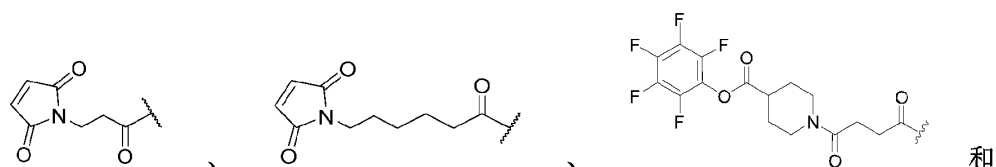
其中, 各 a 独立地选自 1-5 的整数, b 选自 1-3 的整数, M^a 为羧基的活化基团 (例如, 五氟苯氧基)。

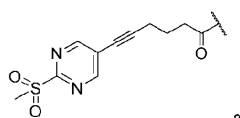
在一些实施方案中, M^1 选自以下结构:



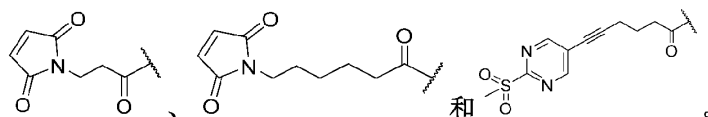
其中, 各 a 独立地选自 1-5 的整数, b 选自 1-3 的整数, M^a 为羧基的活化基团。

在一些实施方案中, M^1 为共价键或选自以下结构:

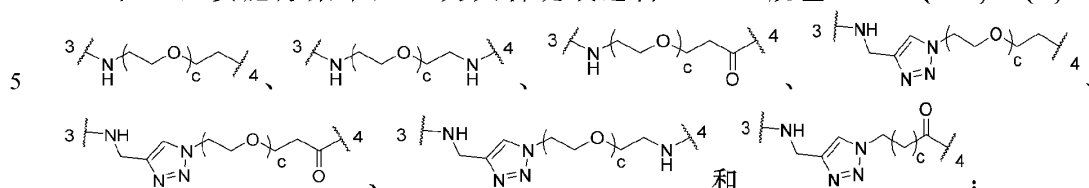




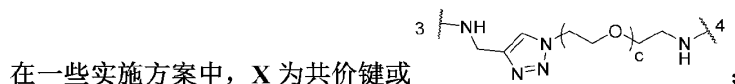
在一些实施方案中， M^1 为共价键或选自以下结构：



在一些实施方案中， X 为共价键或选自 C_{1-6} 亚烷基、 $-NH-(CH_2)_c-C(O)-$ 、



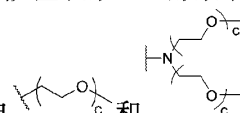
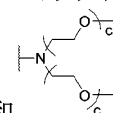
其中，各 c 独立地选自 1-10 的整数； X 的 3 位置与 M 相连，4 位置与 Aa 相连。



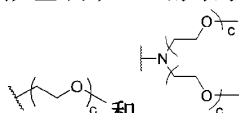
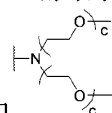
在一些实施方案中， X 为共价键或

其中，各 c 独立地选自 1-10 的整数（例如 5-10 的整数，再例如 8-10 的整数）； X 的 3 位置与 M 相连，4 位置与 Aa 相连。

在一些实施方案中， Aa 选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Gly、Phe、Ala、Val、Ser、Thr、His、Trp、Cys、Asp、Glu、Lys、Tyr 和 Arg，任选地，各氨基酸独立地被 C_{1-6} 烷基或聚乙二醇亲水结构单元修饰。在一些

实施方案中，所述聚乙二醇亲水结构单元选自  和 ，其中各 c 独立地选自 1-10 的整数（例如 5-10 的整数，再例如 8-10 的整数）。

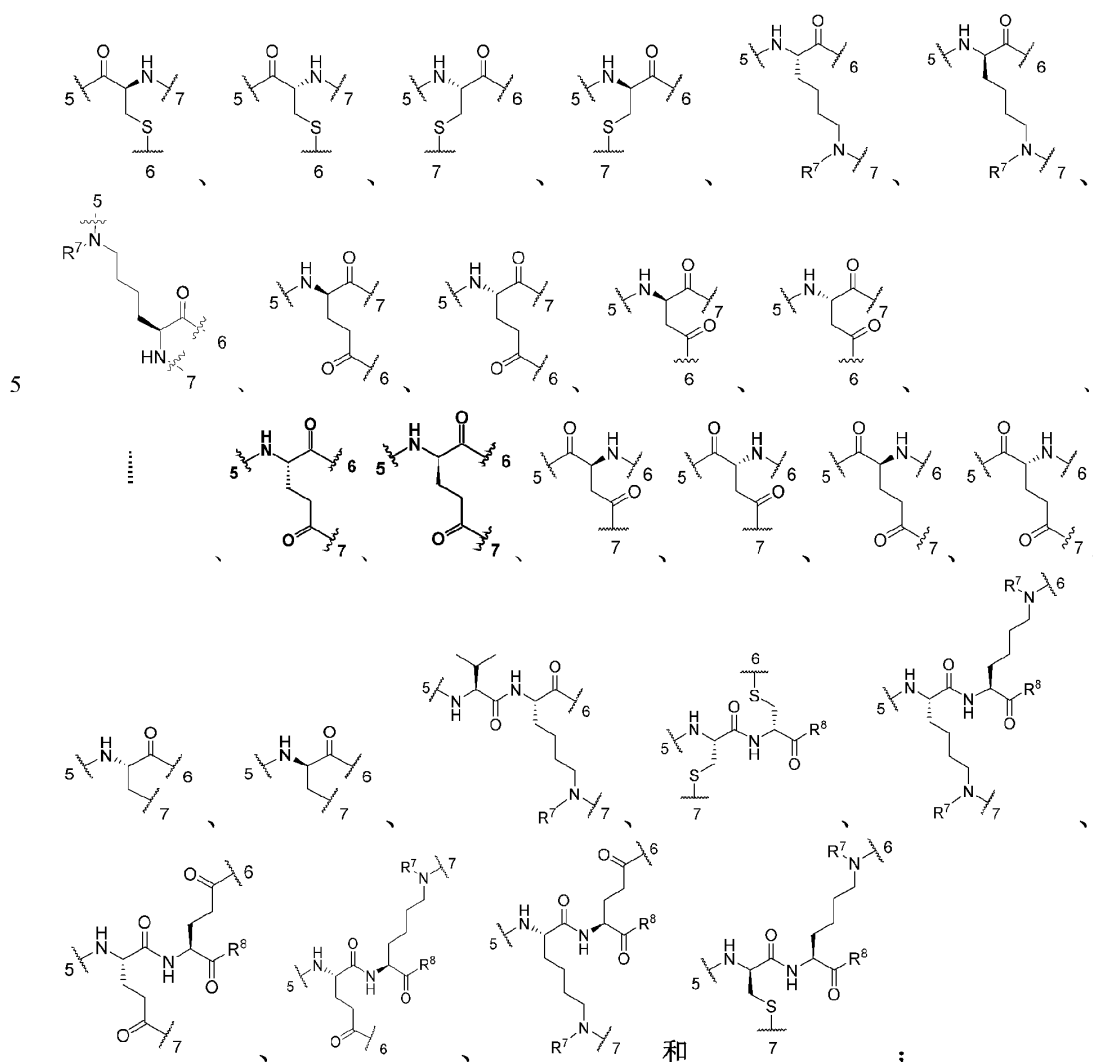
在一些实施方案中， Aa 选自下述氨基酸的片段和由它们中的两个或多个任意组合形成的肽片段：Gly、Phe、Ala、Val、Cys、Asp、Glu、Lys 和 Arg，并且各氨基酸各自独立地任选地被 C_{1-6} 烷基或聚乙二醇亲水结构单元修饰。在一些实施方案中，所述聚乙二醇

亲水结构单元选自  和 ，其中各 c 独立地选自 1-10 的整数（例如 5-10 的整数，再例如 8-10 的整数）。

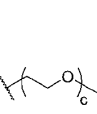
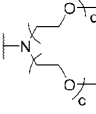
在一些实施方案中， Aa 选自下述氨基酸的片段和由它们中的两个或多个任意组合形

成的肽片段: Val、Cys、Asp、Glu 和 Lys, 其中, Glu 和 Lys 羧基端任选地被
 饰, 其中各 c 独立地选自 1-10 的整数 (例如 5-10 的整数, 再例如 8-10 的整数)。

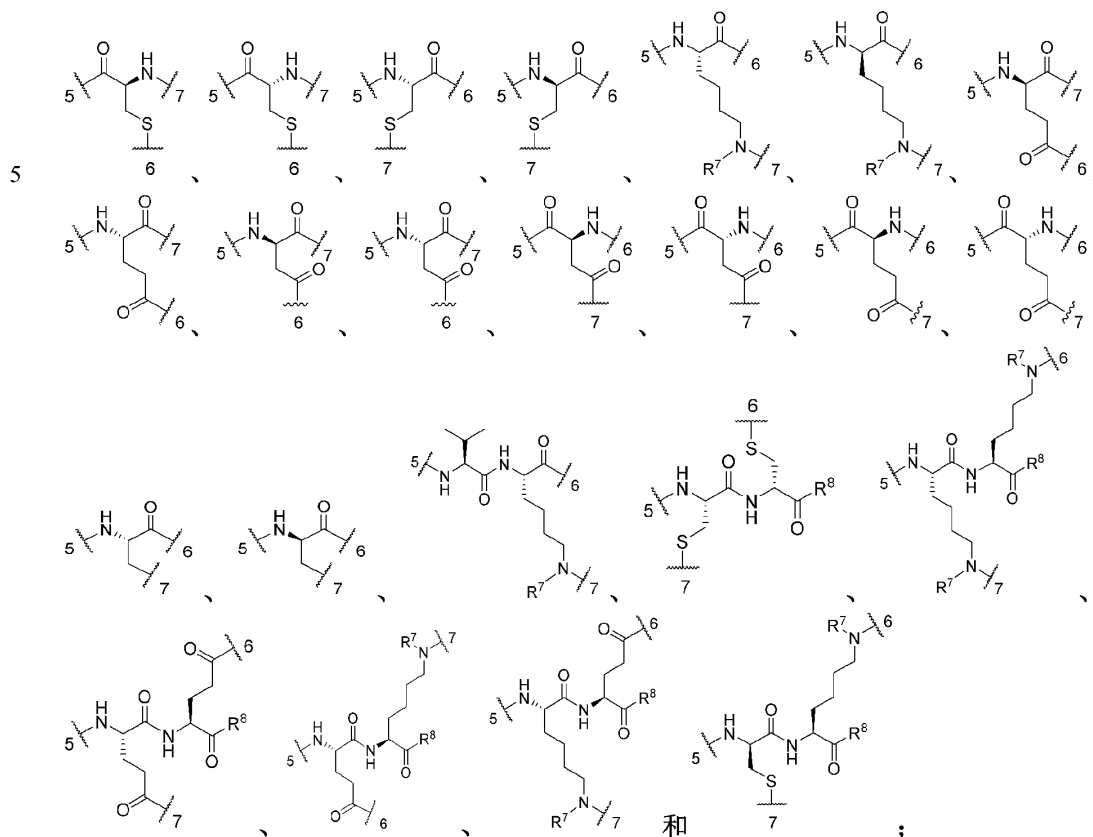
在一些实施方案中, Aa 选自以下结构:



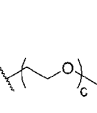
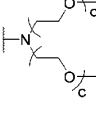
其中, 各 R^7 独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基和聚乙二醇亲水结构单元; 各 R^8 独立地选自羟
 基和聚乙二醇亲水结构单元; 5 位置与 X 相连, 6 位置与 L^1 和 L^2 中的一个相连, 7 位置与
 L^1 和 L^2 中的另一个相连。在一些实施方案中, 5 位置与 X 相连, 6 位置与 L^1 相连, 7 位
 置与 L^2 相连。在一些实施方案中, 5 位置与 X 相连, 6 位置与 L^2 相连, 7 位置与 L^1 相连。

在一些实施方案中，所述聚乙二醇亲水结构单元选自  和 ，其中各 *c* 独立地选自 1-10 的整数（例如 5-10 的整数，再例如 8-10 的整数）。在一些实施方案中，*R*⁷ 为 H。

在一些实施方案中，*Aa* 选自以下结构：



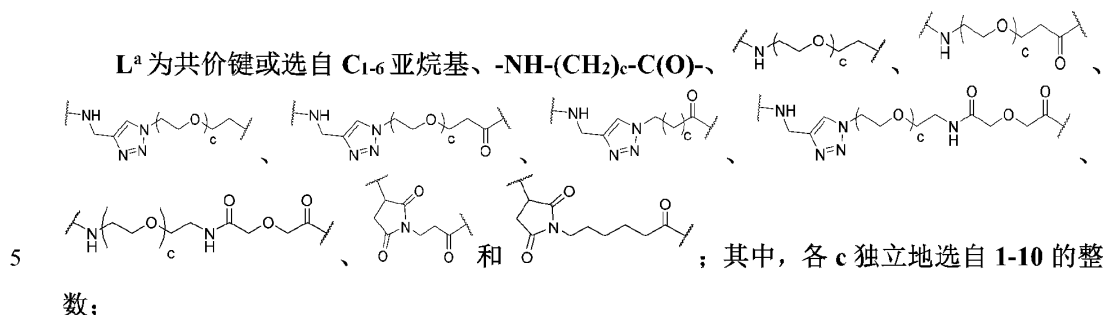
10 其中，各 *R*⁷ 独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基和聚乙二醇亲水结构单元；各 *R*⁸ 独立地选自羟基和聚乙二醇亲水结构单元；5 位置与 X 相连，6 位置与 L¹ 和 L² 中的一个相连，7 位置与 L¹ 和 L² 中的另一个相连；优选地，5 位置与 X 相连，6 位置与 L¹ 相连，7 位置与 L² 相连。

在一些实施方案中，所述聚乙二醇亲水结构单元选自  和 ，其中各 *c* 独立地选自 1-10 的整数（例如 5-10 的整数，再例如 8-10 的整数）。

15 在一些实施方案中，L¹ 为共价键或选自不可断裂连接子和可断裂连接子，其中，可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割，所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、β-葡萄糖

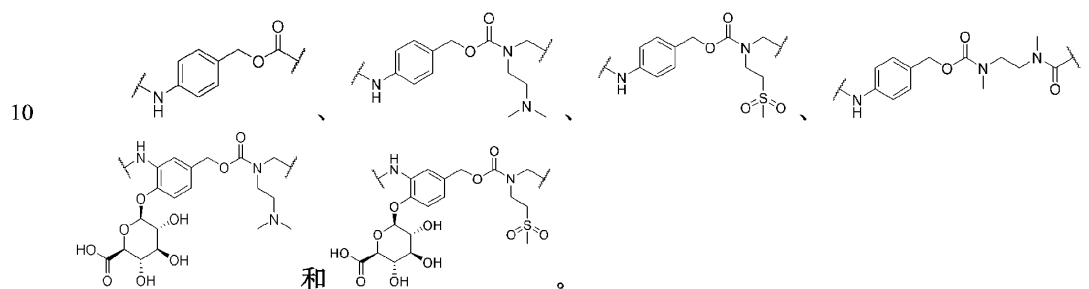
醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶。

在一些实施方案中， L^1 为共价键或 $-L^a-L^b-L^c-$ ，其中：

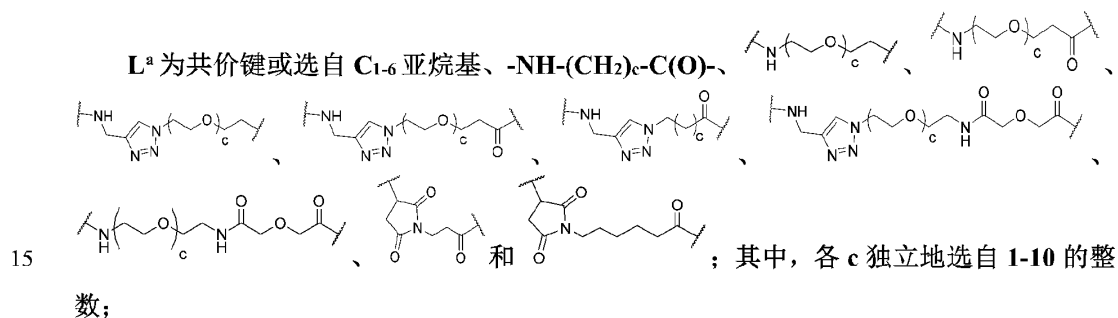


L^b 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn；

L^c 为共价键、 $-NH-CH_2-$ 或选自以下结构：

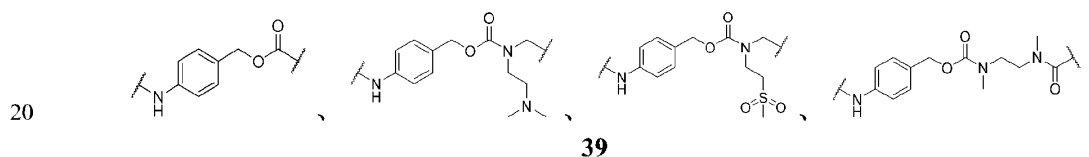


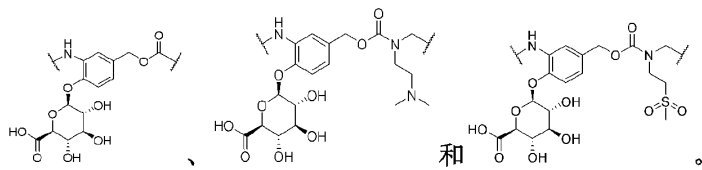
在一些实施方案中， L^1 为共价键或 $-L^a-L^b-L^c-$ ，其中：



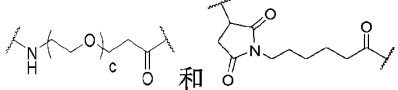
L^b 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn；

L^c 为共价键、 $-NH-CH_2-$ 或选自以下结构：

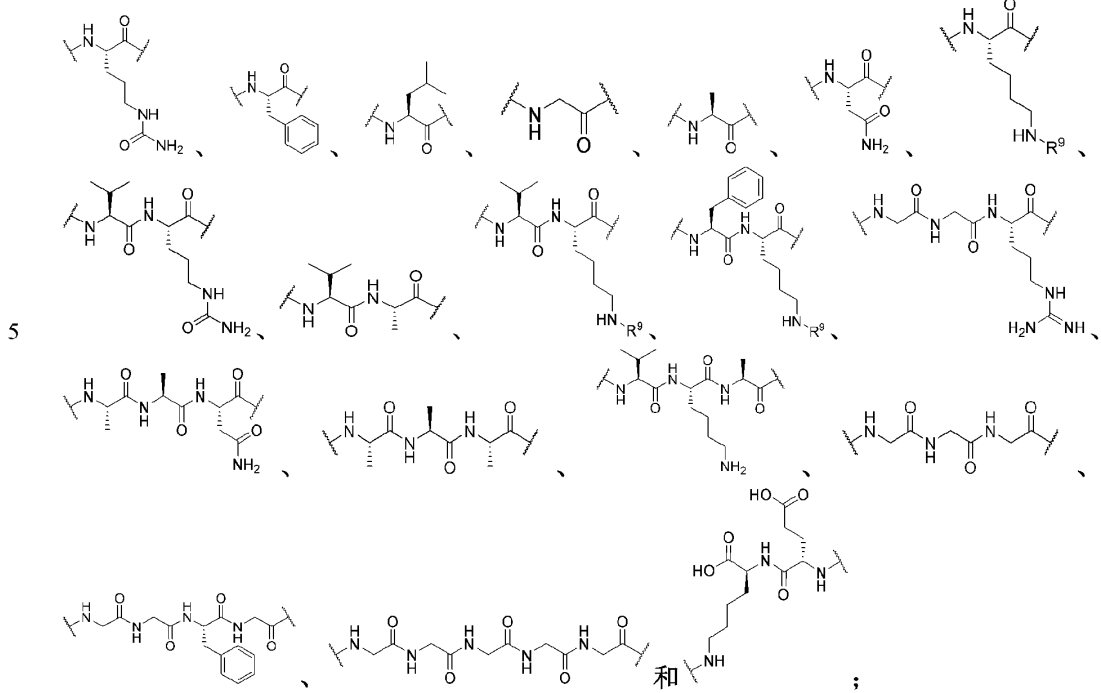




在一些实施方案中， L^a 为共价键或选自

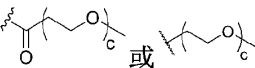


c 独立地选自 1-10 的整数。在一些实施方案中， L^b 为共价键或选自以下结构：



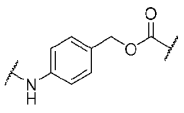
其中， R^9 选自 H、乙酰基、苄氧羰基、三苯甲基和聚乙二醇亲水结构单元。在一些实

施方案中，所述聚乙二醇亲水结构单元为



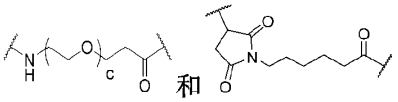
的整数。

在一些实施方案中， L^c 为 -NH-CH₂- 或

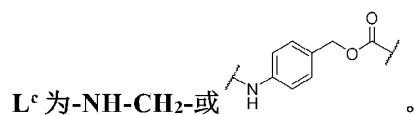
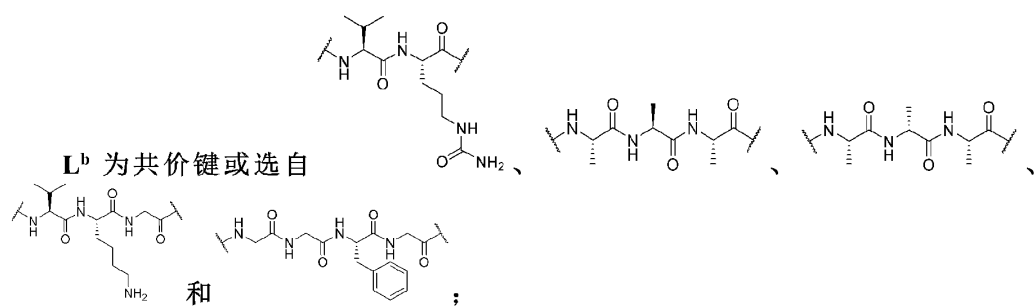


在一些实施方案中， L^1 为共价键或 - L^a - L^b - L^c -，其中：

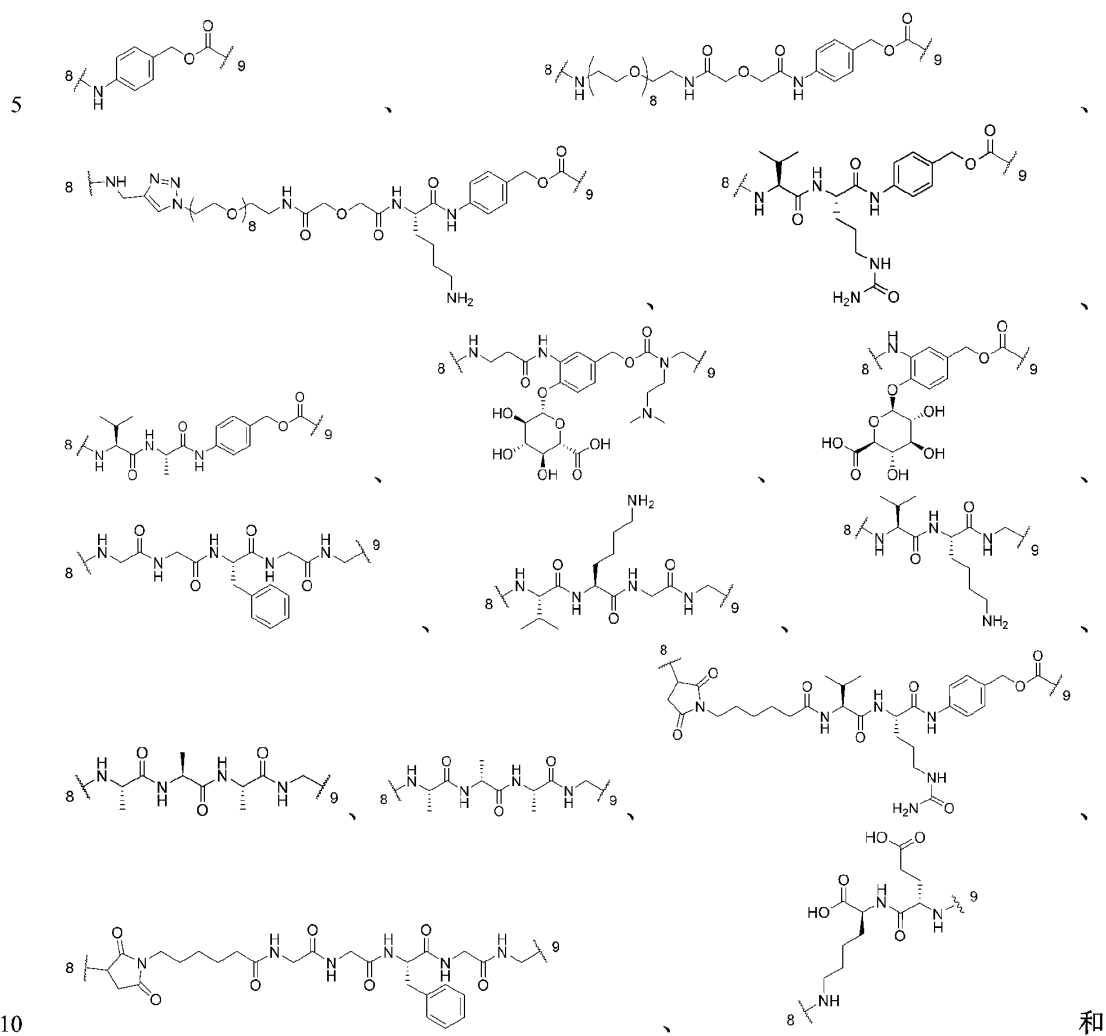
L^a 为共价键或选自

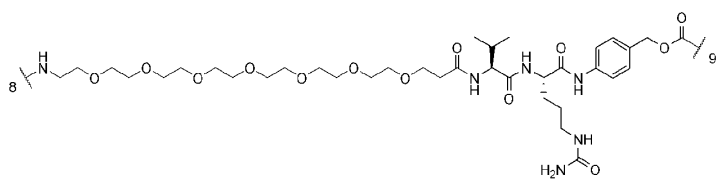


；其中，各 c 独立地选自 1-10 的整数；



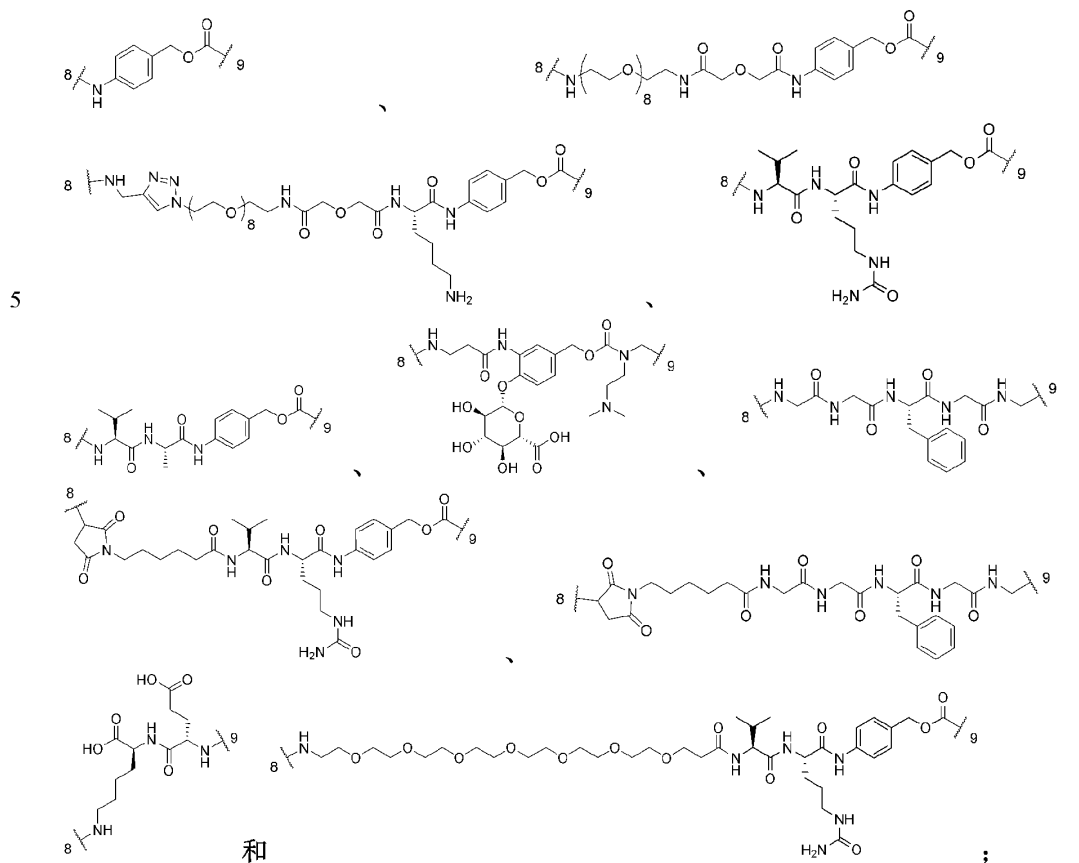
在一些实施方案中，L¹为共价键或选自以下结构：





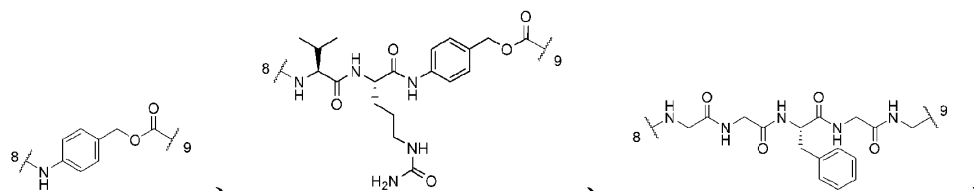
其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

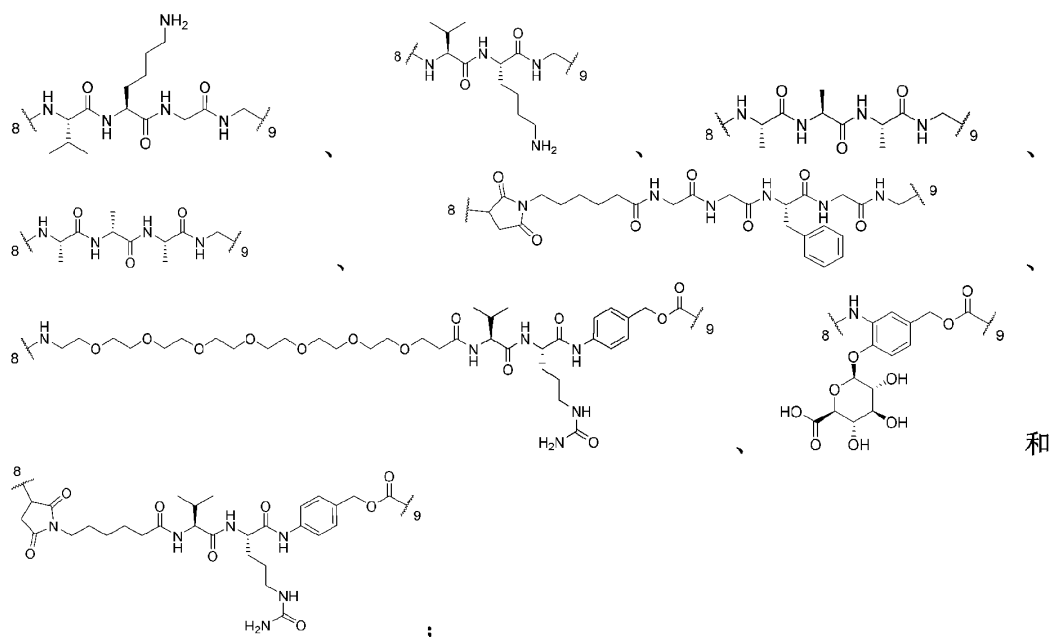
在一些实施方案中，L¹ 为共价键或选自以下结构：



其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

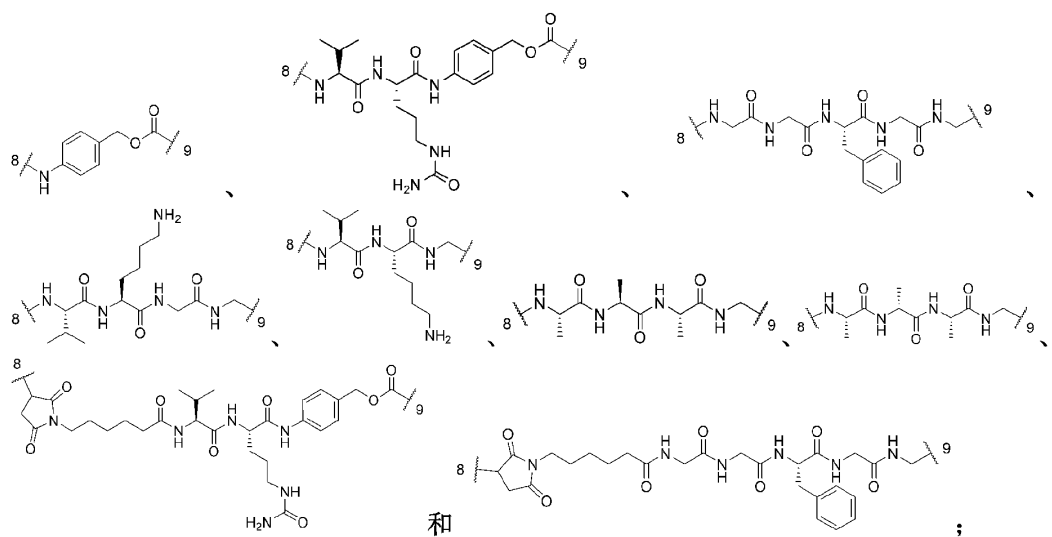
10 在一些实施方案中，L¹ 选自以下结构：





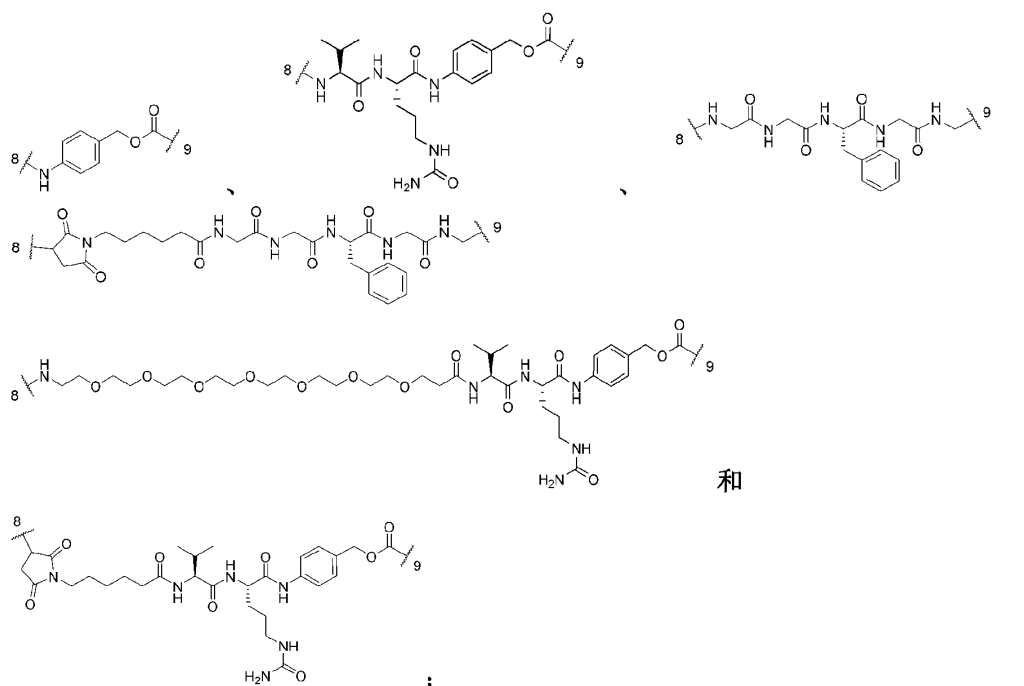
5 其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

在一些实施方案中，L¹ 选自以下结构：



10 其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

在一些实施方案中，L¹ 选自以下结构：

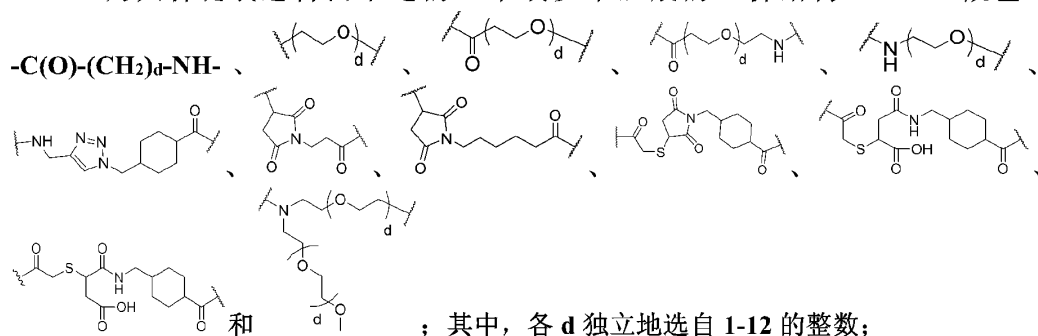


5 其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连。

在一些实施方案中，L² 选自不可断裂连接子和可断裂连接子，其中，可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割，所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶。

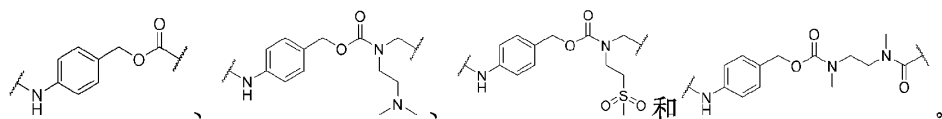
在一些实施方案中，L² 为 -L^d-L^e-L^f-，其中：

10 L^d 为共价键或选自由下述的一个或多个组成的二价结构：C₁₋₆ 亚烷基、



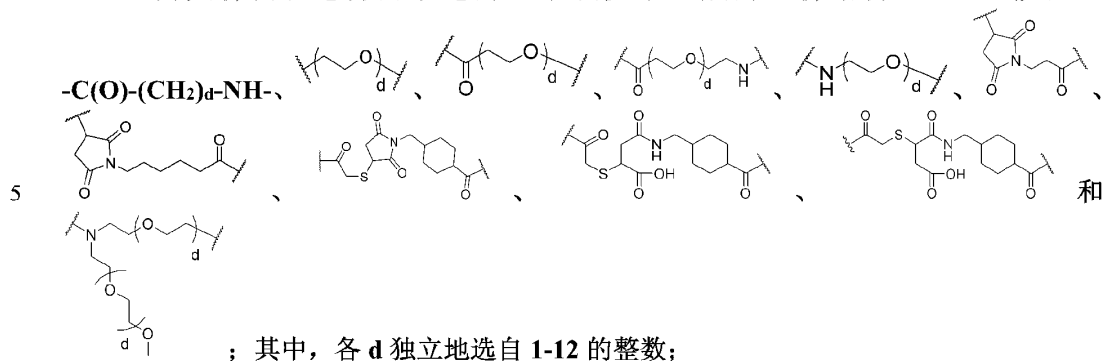
15 L^e 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn；

L^f 为共价键、-CH₂-NH-或选自以下结构：



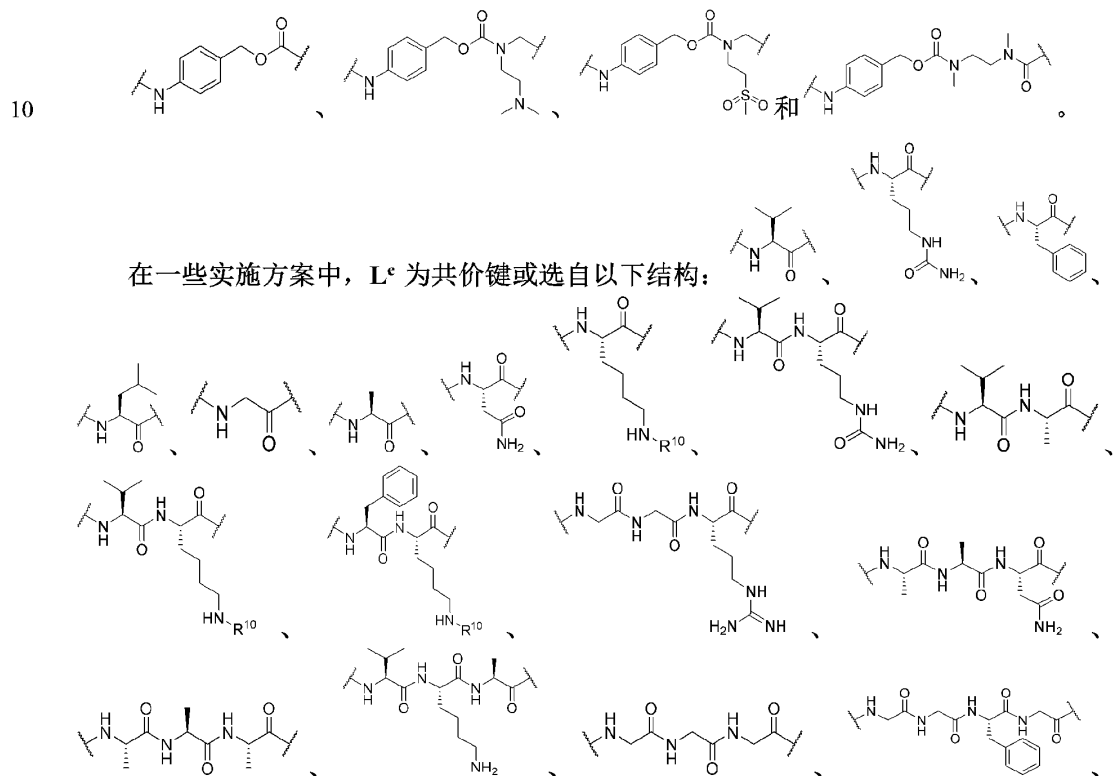
在一些实施方案中， L^2 为 $-L^d-L^e-L^f-$ ，其中：

L^d 为共价键或选自由下述的一个或多个组成的二价结构： C_{1-6} 亚烷基、

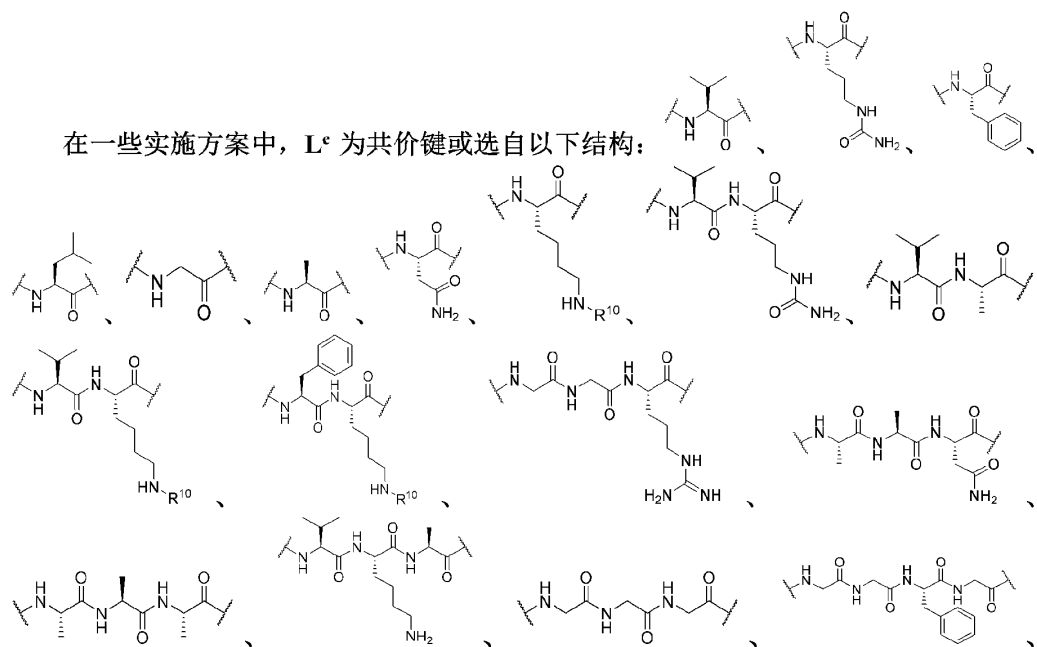


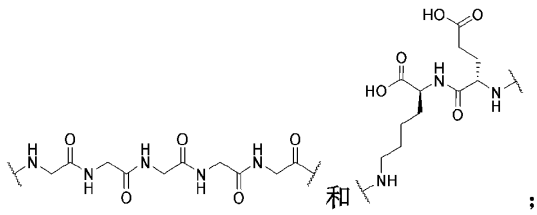
L^e 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn；

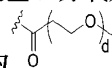
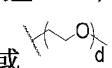
L^f 为共价键、 $-CH_2-NH-$ 或选自以下结构：



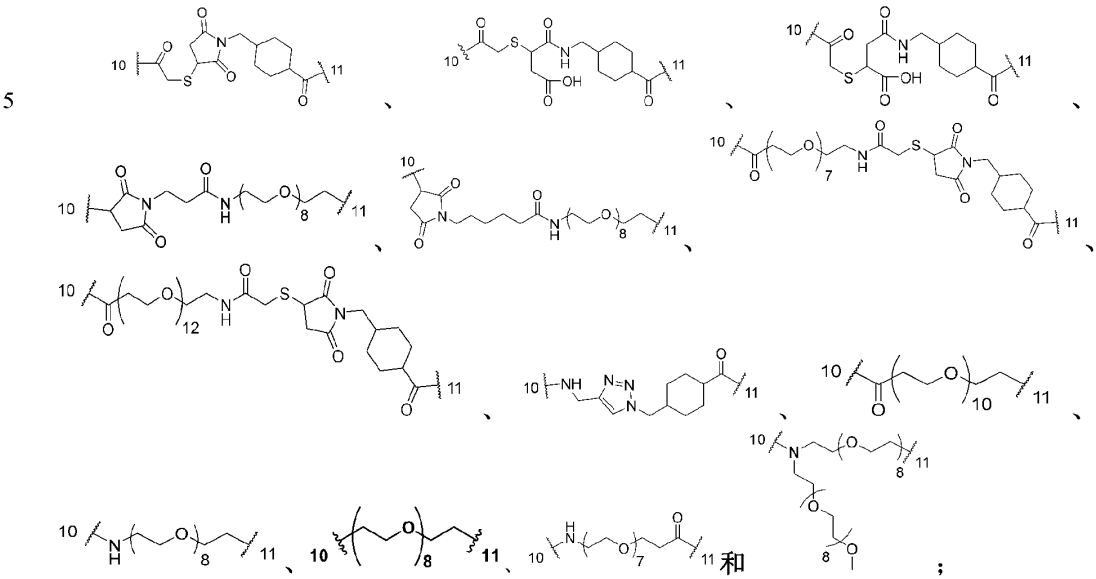
在一些实施方案中， L^e 为共价键或选自以下结构：





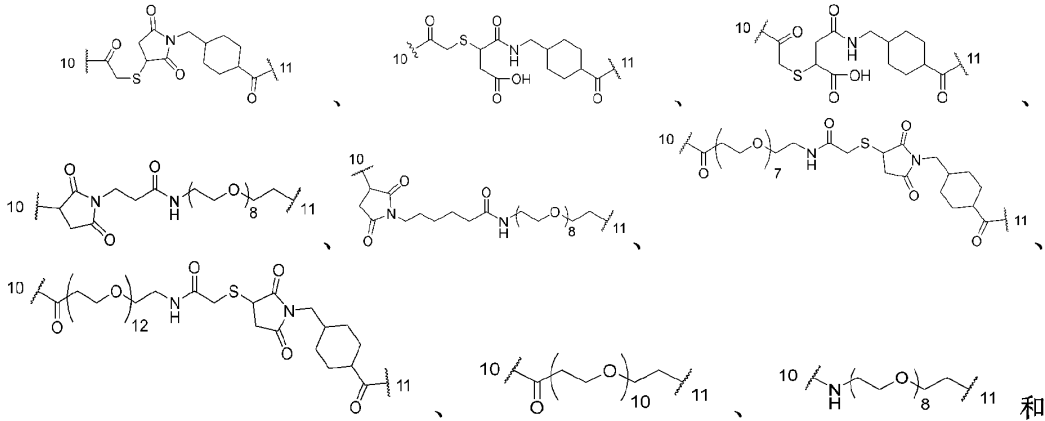
其中，各 R^{10} 独立地选自 H、乙酰基、苄氧羰基、三苯甲基和聚乙二醇亲水结构单元；
优选地，所述聚乙二醇亲水结构单元为  或 ；各 d 独立地选自 1-10 的整数。

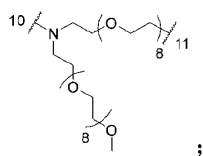
在一些实施方案中， L^2 选自以下结构：



其中，位置 10 同 Aa 相连，位置 11 同 D^2 相连。

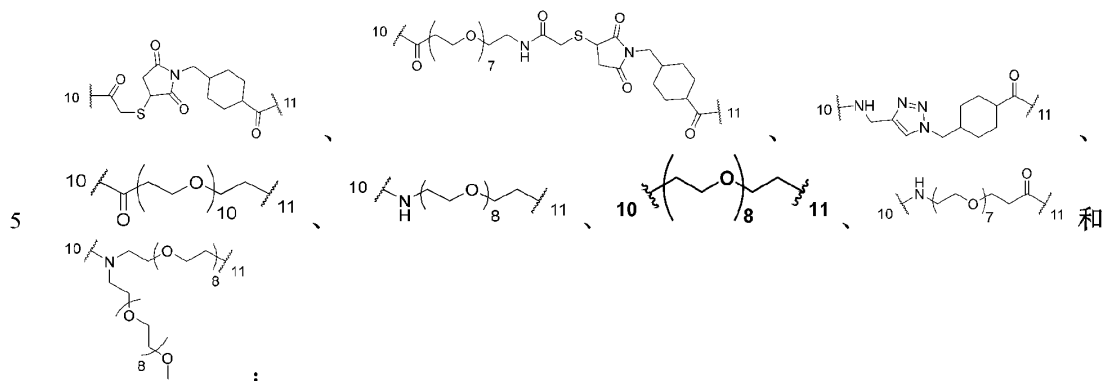
10 在一些实施方案中， L^2 选自以下结构：





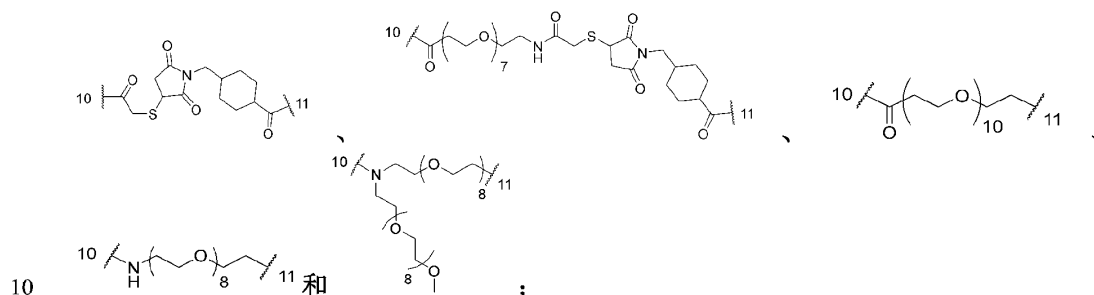
其中, 位置 10 同 Aa 相连, 位置 11 同 D² 相连;

在一些实施方案中, L² 选自以下结构:



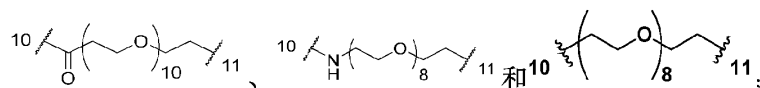
其中, 位置 10 同 Aa 相连, 位置 11 同 D² 相连。

在一些实施方案中, L² 选自以下结构:



其中, 位置 10 与 Aa 相连, 位置 11 与 D² 相连。

在一些实施方案中, L² 选自以下结构:



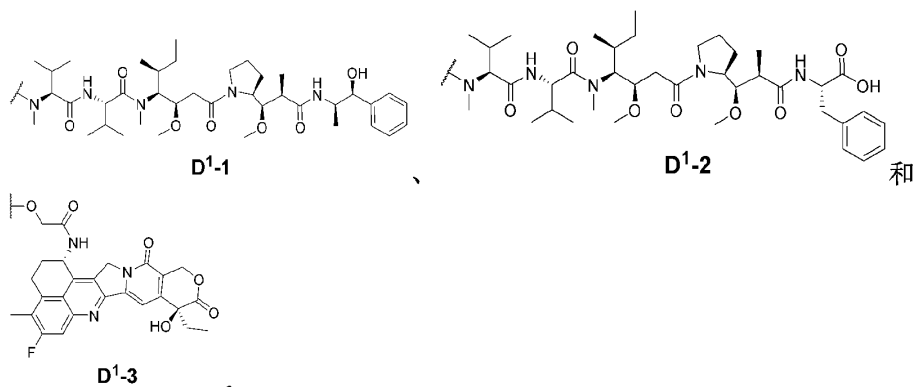
其中, 位置 10 与 Aa 相连, 位置 11 与 D² 相连。

- 15 在一些实施方案中, D¹ 选自细胞毒性药物片段, 所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂和拓扑异构酶抑制剂, 所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素 (dolastatin)、澳瑞他汀 (auristatin) 类、美登素 (maytansine) 类、微管溶素 (Tubulysins) 类和隐粘菌素 (cryptomycins) 类, 所述 DNA 损伤剂包括但不限于 PBD 类、杜卡霉素

(duocarmycin) 类和卡齐霉素 (calicheamicin) 类, 所述拓扑异构酶抑制剂包括但不限于喜树碱及其衍生物。

在一些实施方案中, 所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素 10、MMAE、MMAF、美登素、DM1、DM3 和 DM4, 所述拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱、SN-38、依喜替康、拓扑替康、贝洛替康、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、阿霉素、表柔比星和 PNU-159682。

在一些实施方案中, D¹ 选自以下结构:

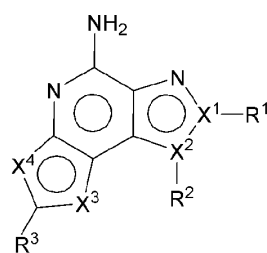


在一些实施方案中, D² 为 TLR 激动剂片段。

10 在一些实施方案中, 所述 TLR 激动剂选自 TLR2 激动剂、TLR4 激动剂、TLR6 激动剂、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂、TLR7/8 激动剂和 TLR9 激动剂。

在一些实施方案中, D² 为 TLR 激动剂片段, 所述 TLR 激动剂选自 TLR7 激动剂、TLR8 激动剂和 TLR7/8 激动剂。

在一些实施方案中, D² 为 TLR 激动剂片段, 所述 TLR 激动剂为式(II)所示化合物:



II

其中,

X¹ 选自 N 和 C;

X² 选自 N 和 C;

且 X^1 和 X^2 中至少一个选自 N;

X^3 选自 O、S 和 N;

X^4 选自 O、S、N 和 CR^4 ;

R^1 选自 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $O-C_{1-6}$ 烷基;

5 R^2 选自氢和式- $L^3-L^4-L^5-L^6$;

L^3 选自共价键和 C_{1-6} 亚烷基;

L^4 选自共价键、 C_{3-10} 环烷基、3-12 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代;

10 L^5 选自共价键、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-NR^5-$ 、 $-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-O-$ 、 $-NR^5-C(O)-NR^5-$ 、 $-S(O)_r-NR^5-$ 、 $-NR^5-S(O)_r-$ 和 $-NR^5-S(O)_r-NR^5-$;

L^6 选自氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(O-CH_2CH_2)_n-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $-(O-CH_2CH_2)_n-O-C_{1-6}$ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、

15 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代;

R^3 选自氢和式- $L^7-L^8-L^9-L^{10}$;

L^7 选自共价键和 C_{1-6} 亚烷基;

L^8 选自共价键、 C_{3-10} 环烷基、3-12 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代;

20 L^9 选自共价键、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-C(O)-NR^6-$ 、 $-NR^6-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^6-$ 、 $-NR^6-C(O)-O-$ 、 $-NR^6-C(O)-NR^6-$ 、 $-S(O)_p-NR^6-$ 、 $-NR^6-S(O)_p-$ 和 $-NR^6-S(O)_p-NR^6-$;

L^{10} 选自氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(O-CH_2CH_2)_q-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $-(O-CH_2CH_2)_q-O-C_{1-6}$ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代;

25 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代;

R^4 选自氢、卤素、氰基、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-10} 环烷基;

各 R^5 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基;

各 R^6 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基;

各 r 独立地为 1 或 2;

各 n 独立地选自 1-25 的整数;

各 p 独立地为 1 或 2;

5 各 q 独立地选自 1-25 的整数;

D^2 通过式(II)中的 R^2 或 R^3 与 L^2 相连。

在一些实施方案中, 各 n 独立地选自 1-15, 优选地, n 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 和 15。

10 在一些实施方案中, 各 q 独立地选自 1-15, 优选地, q 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 和 15。

在一些实施方案中, X^3 选自 S 和 N。

在一些实施方案中, L^3 选自共价键和 C_{1-3} 亚烷基。

15 在一些实施方案中, L^4 选自共价键、3-12 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代。

在一些实施方案中, L^5 选自共价键、 $-NR^5-$ 、 $-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-O-$ 、 $-NR^5-C(O)-NR^5-$ 、 $-S(O)_r-NR^5-$ 、 $-NR^5-S(O)_r-$ 和 $-NR^5-S(O)_r-NR^5-$, 各 R^5 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基; 优选地, L^5 选自共价键和 $-NR^5-$, 各 R^5 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基。

20 在一些实施方案中, L^6 选自氢、 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $(O-CH_2CH_2)_n-O-C_{1-6}$ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代, n 为 1-10。

在一些实施方案中, L^8 选自共价键和 3-12 元杂环基, 所述杂环基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基和 C_{1-6} 烷基所取代。

在一些实施方案中, L^9 为共价键。

25 在一些实施方案中, L^{10} 选自氢、 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $(O-CH_2CH_2)_q-O-C_{1-6}$ 烷基, q 为 1-10。

在一些实施方案中, R^3 选自氢和式- $L^7-L^8-L^9-L^{10}$;

L^8 选自共价键和 3-12 元杂环基, 所述杂环基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰

基和 C₁₋₆ 烷基所取代;

L⁹ 为共价键;

L¹⁰ 选自氢、C₁₋₆ 烷基和 -C₁₋₆ 亚烷基-(O-CH₂CH₂)_q-O-C₁₋₆ 烷基;

q 选自 1-10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

5 在一些实施方案中, X¹ 为 C;

X² 为 N;

X³ 为 S;

X⁴ 选自 CR⁴;

R¹ 选自 C₁₋₆ 烷基;

10 R² 选自式-L³-L⁴-L⁵-L⁶;

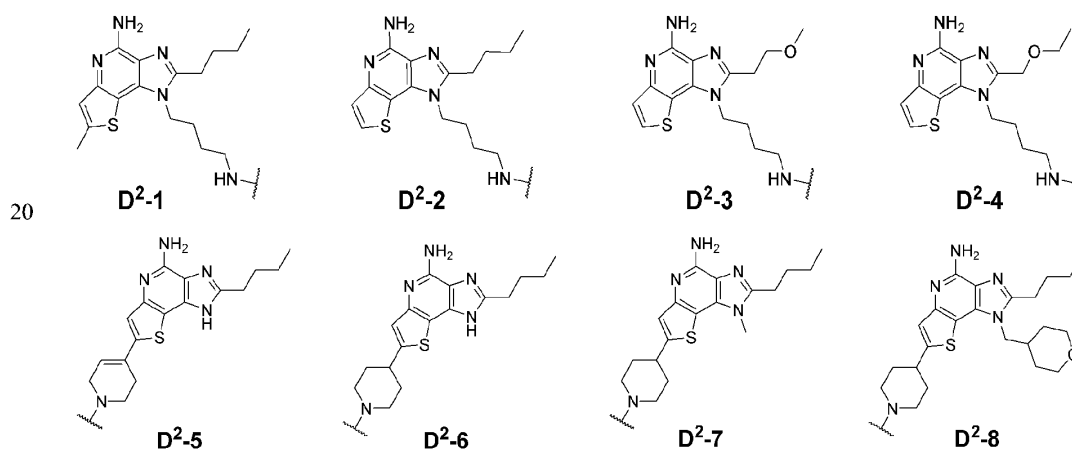
L³ 选自共价键和 C₁₋₆ 亚烷基;

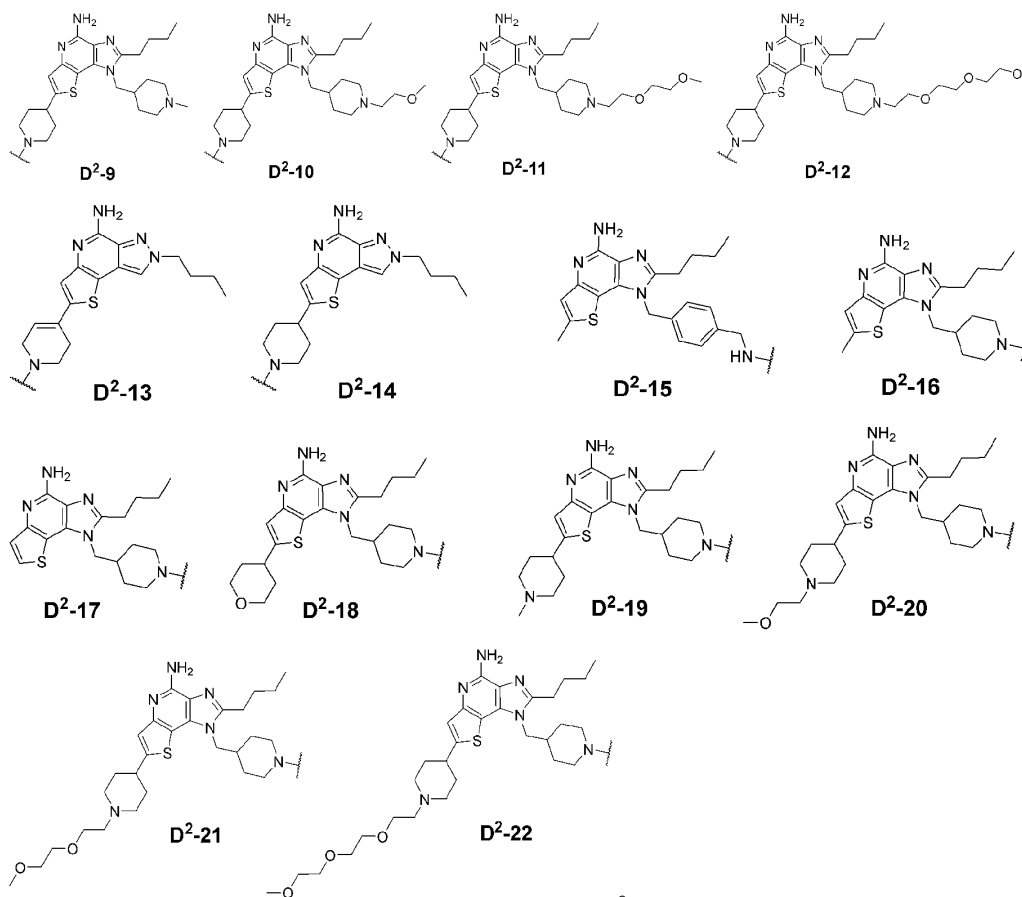
L⁴ 选自共价键、3-12 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 -C₁₋₆ 亚烷基-NH₂ 的基团所取代;

15 L⁵ 选自共价键和 -NR⁵-, 各 R⁵ 独立地选自氢和 C₁₋₆ 烷基;

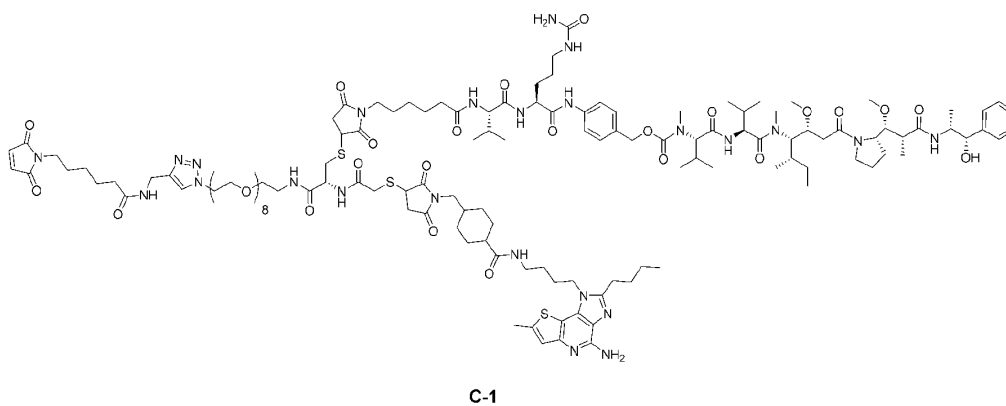
L⁶ 选自氢、C₁₋₆ 烷基和 -C₁₋₆ 亚烷基-(O-CH₂CH₂)_n-O-C₁₋₆ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、-NH₂、-NH-C(O)-O-C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、羧基和 -C(O)-O-C₁₋₆ 烷基的基团所取代。

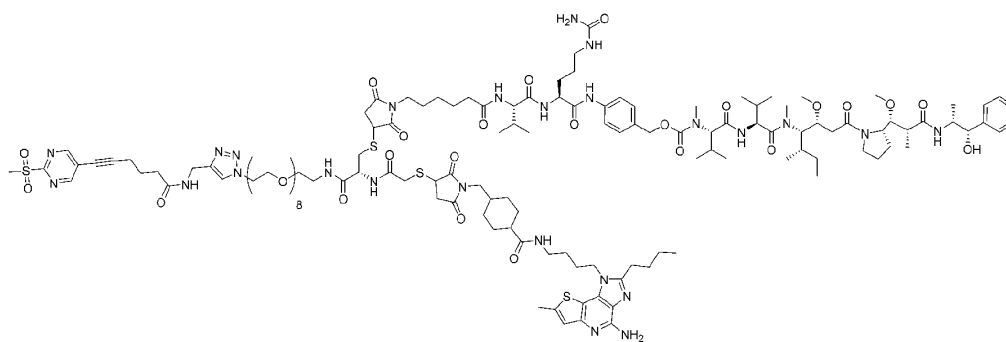
在一些实施方案中, D² 选自以下结构:



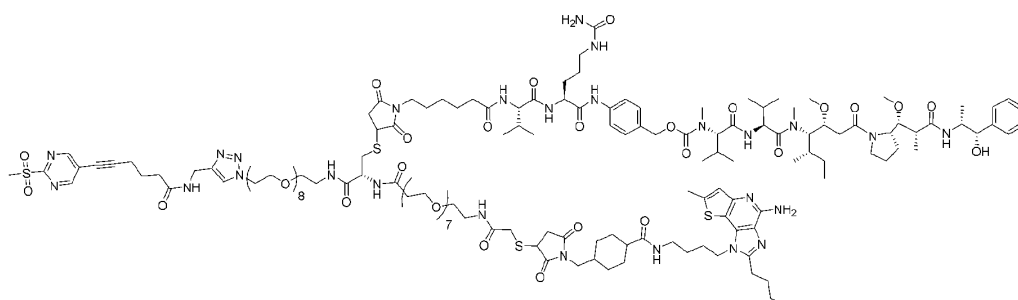


- 5 在一些实施方案中，所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药选自以下结构：

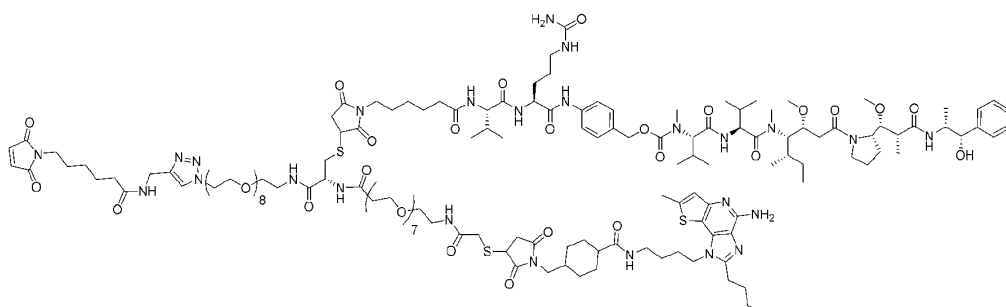




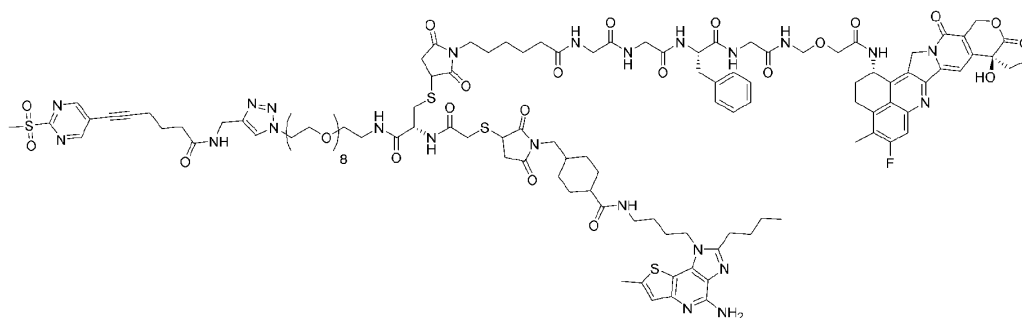
C-2



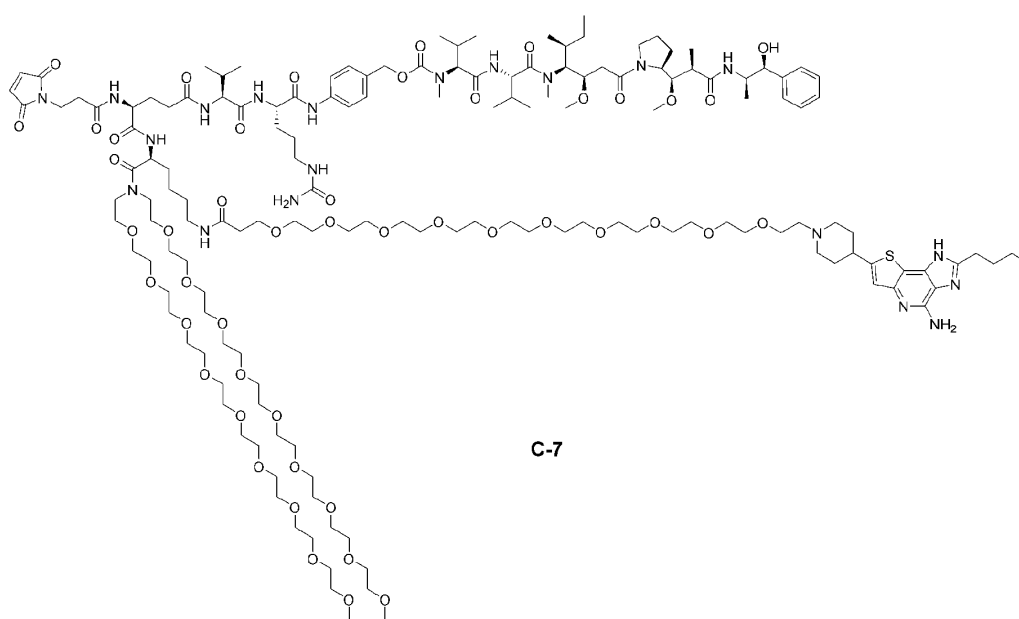
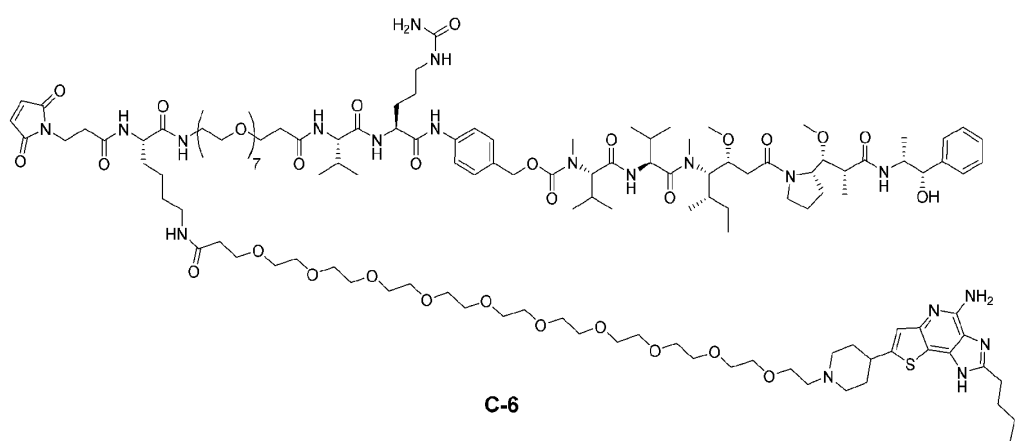
C-3

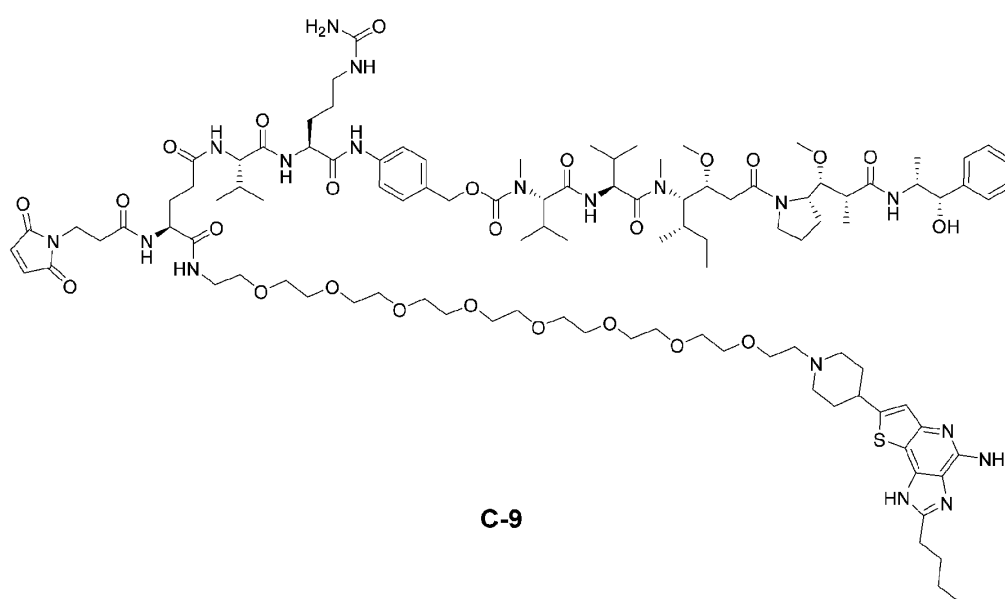
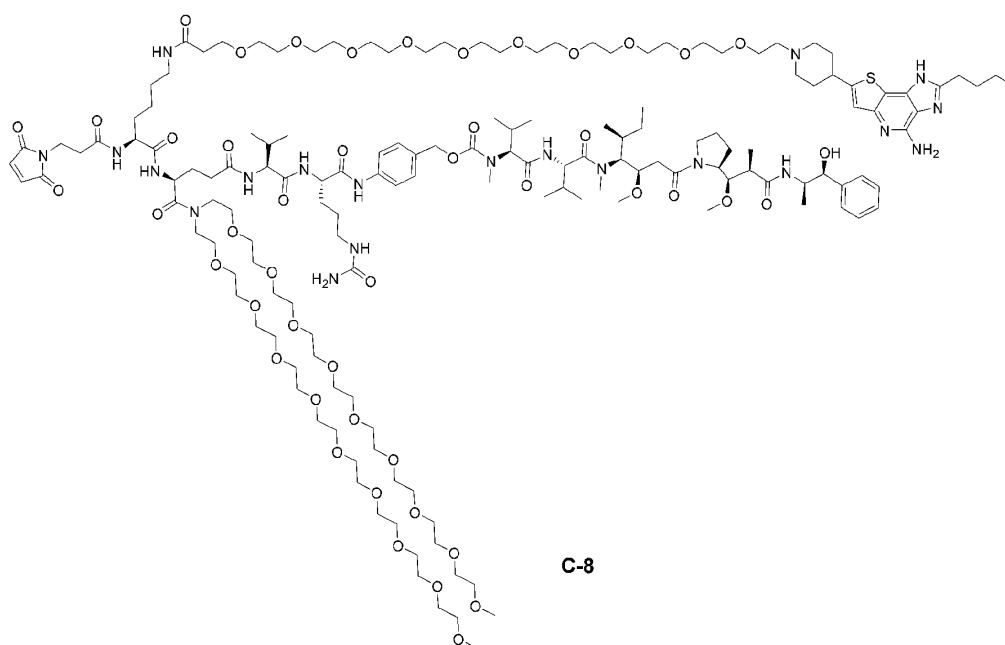


C-4

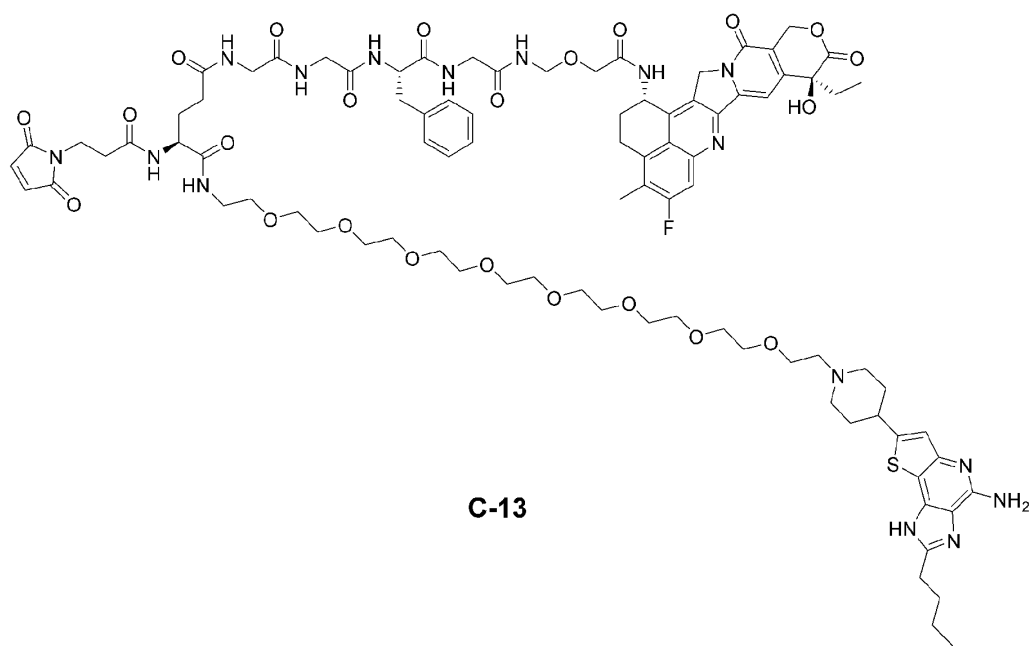
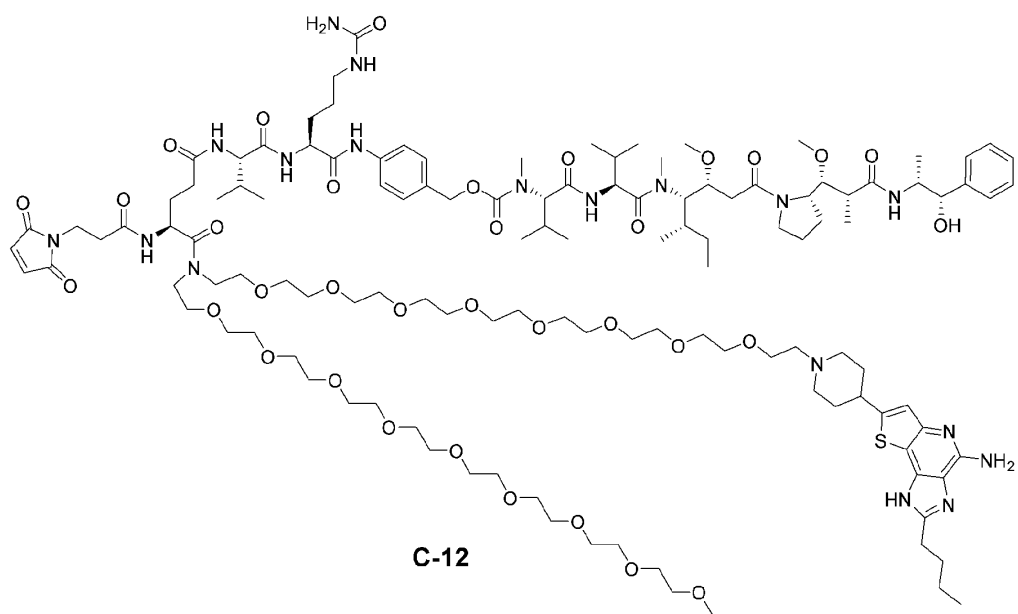


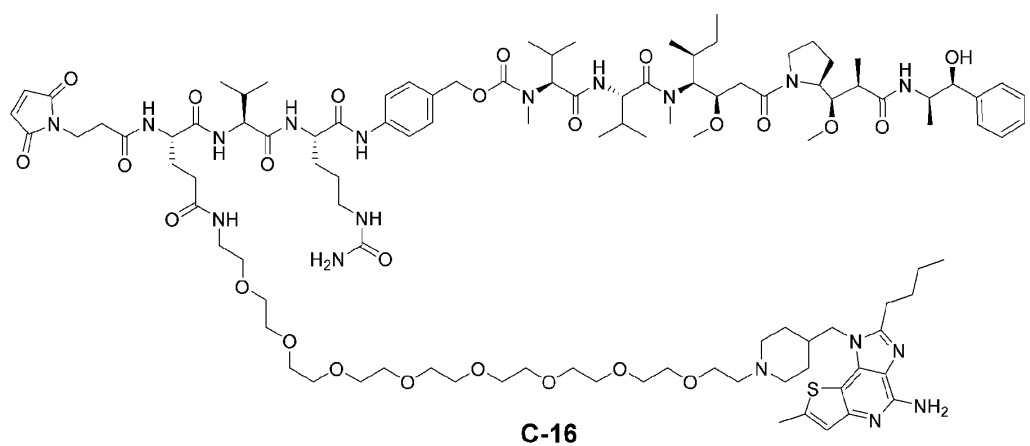
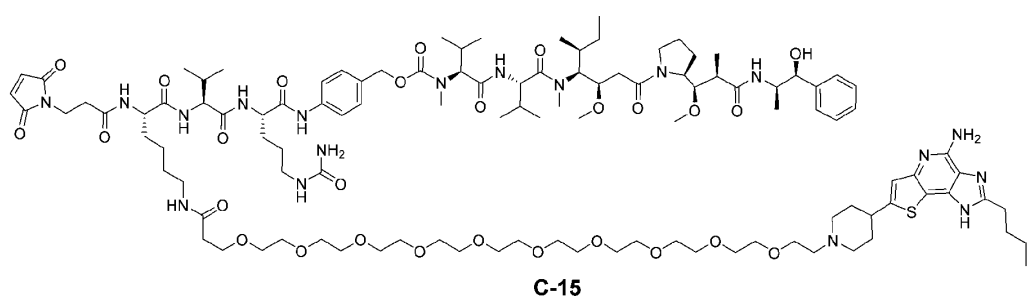
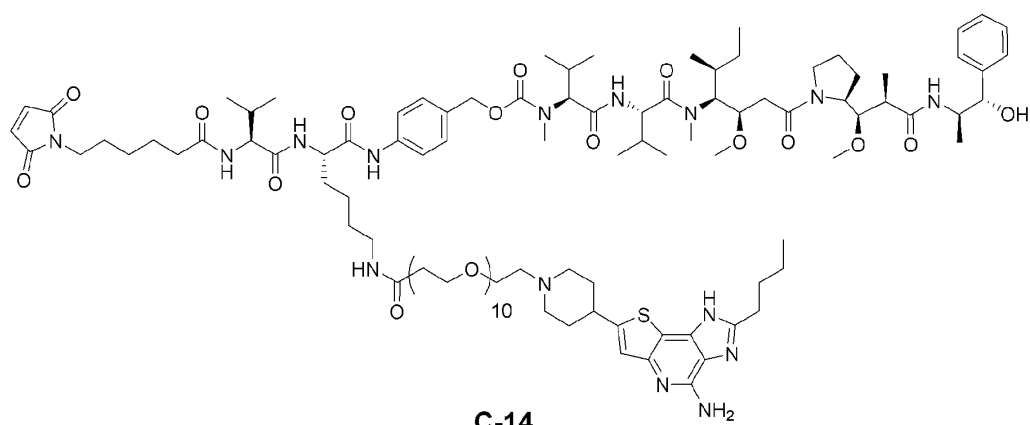
C-5



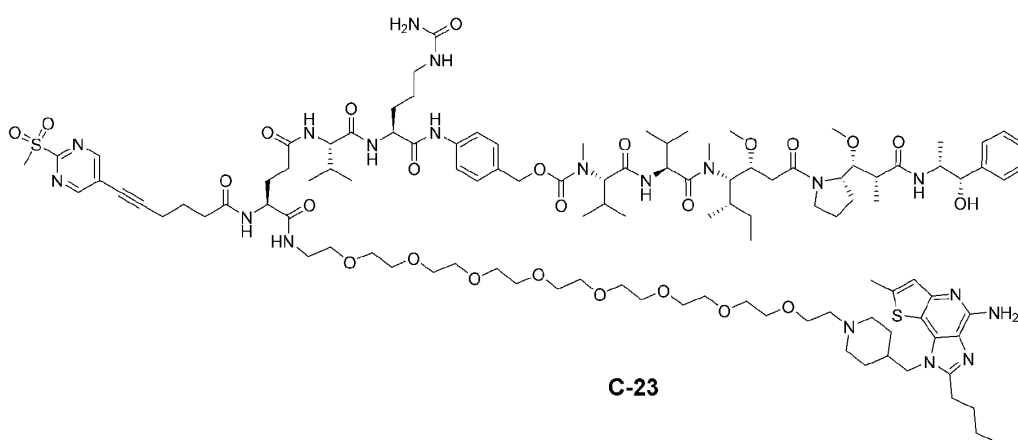
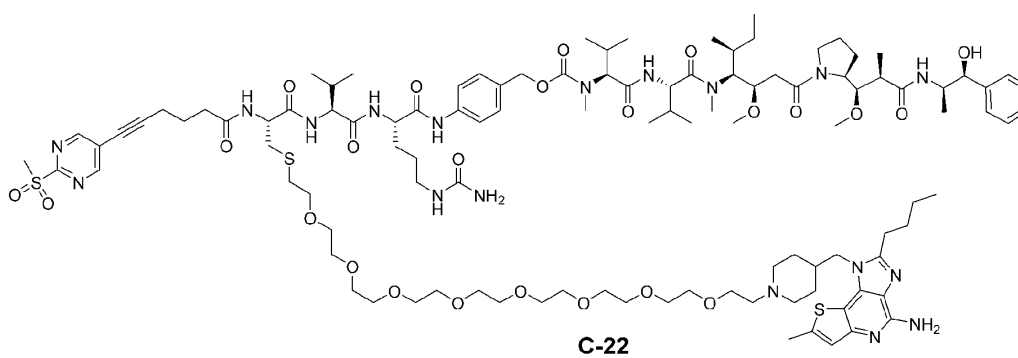
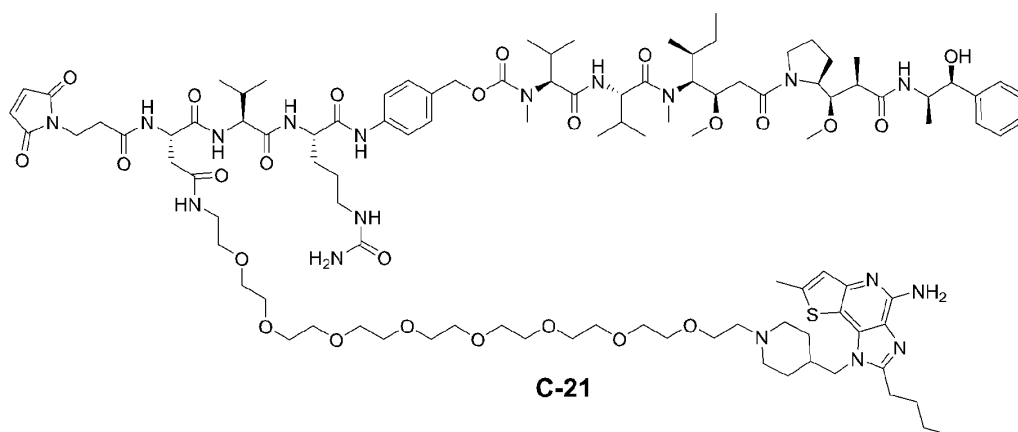


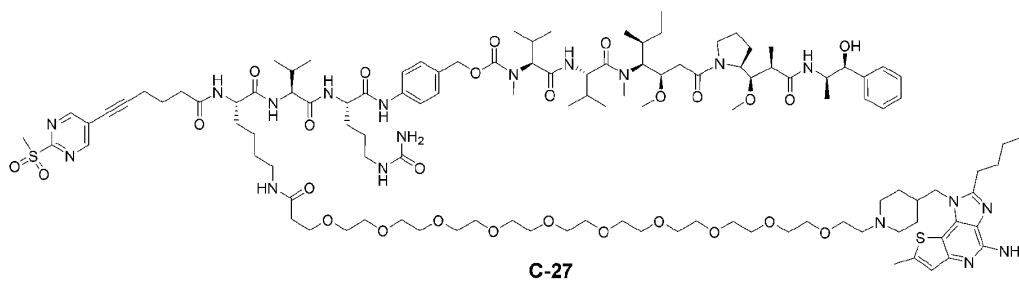
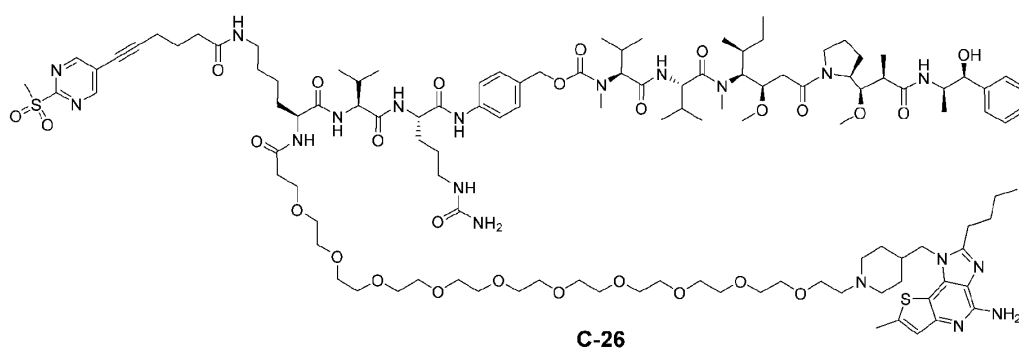
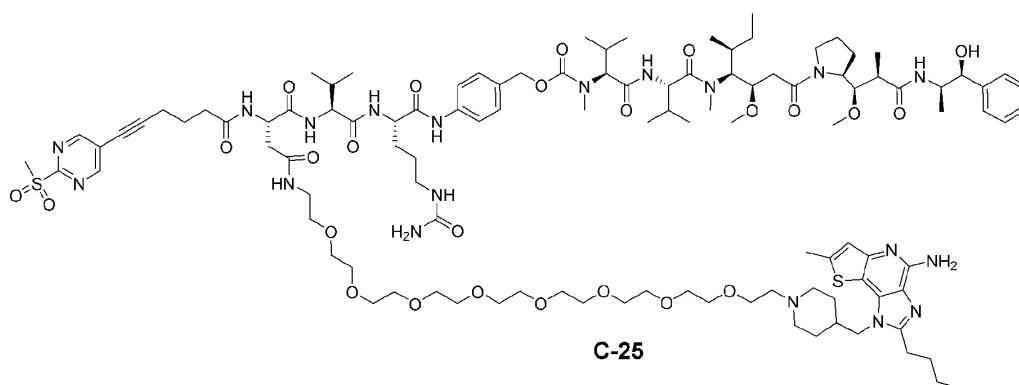
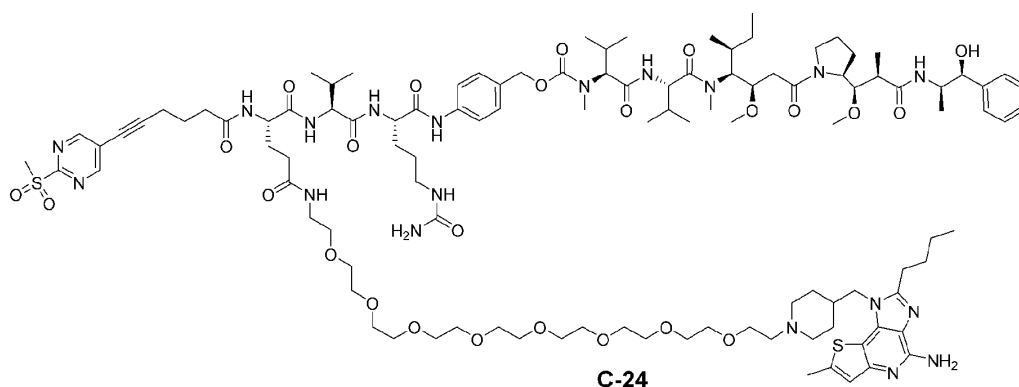


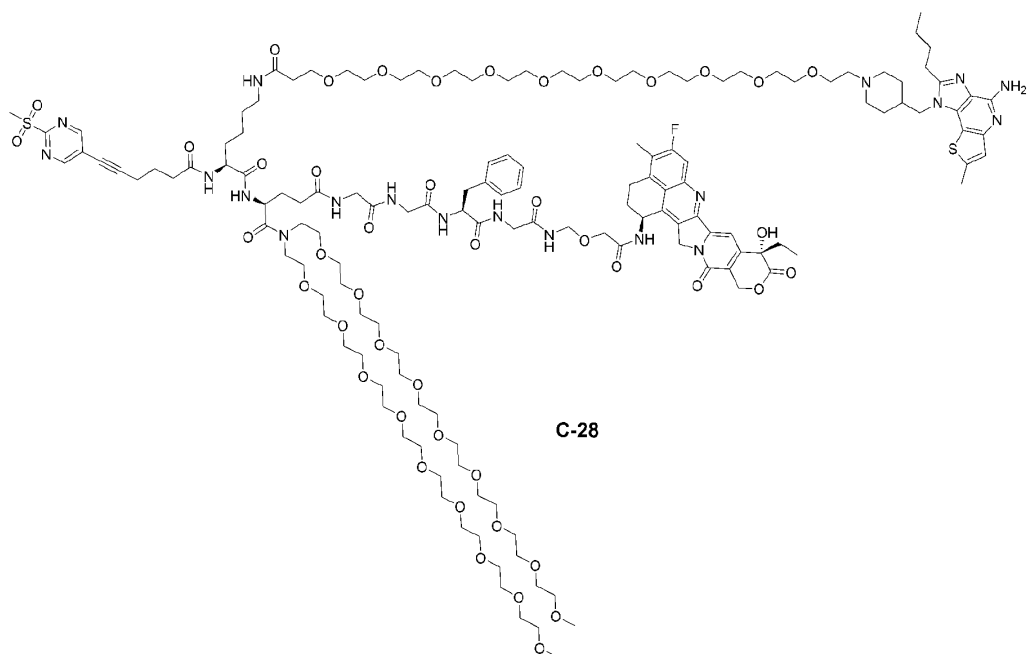




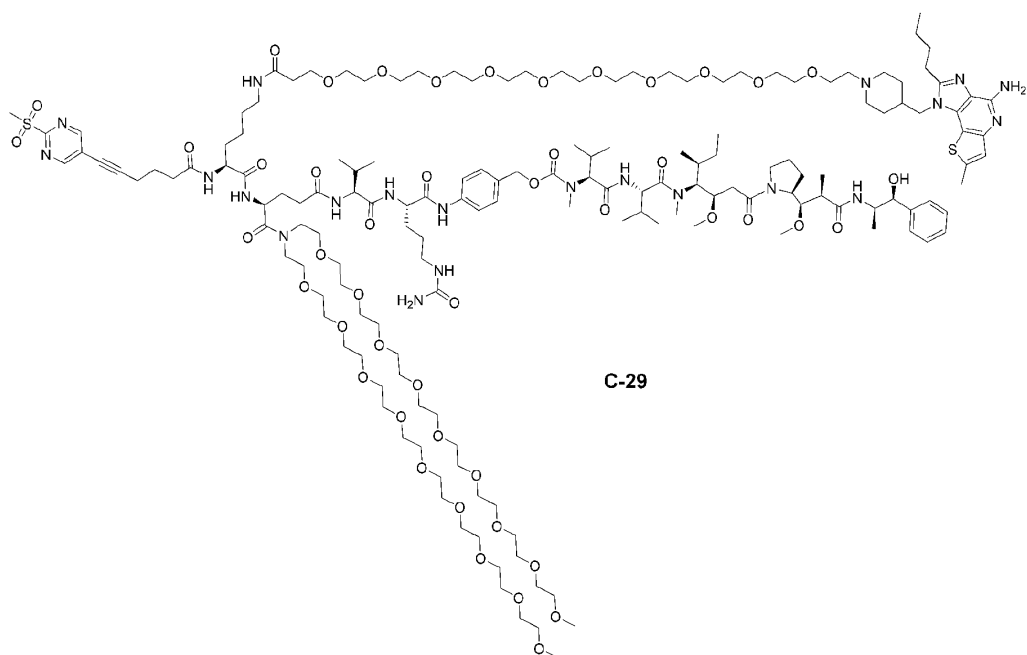






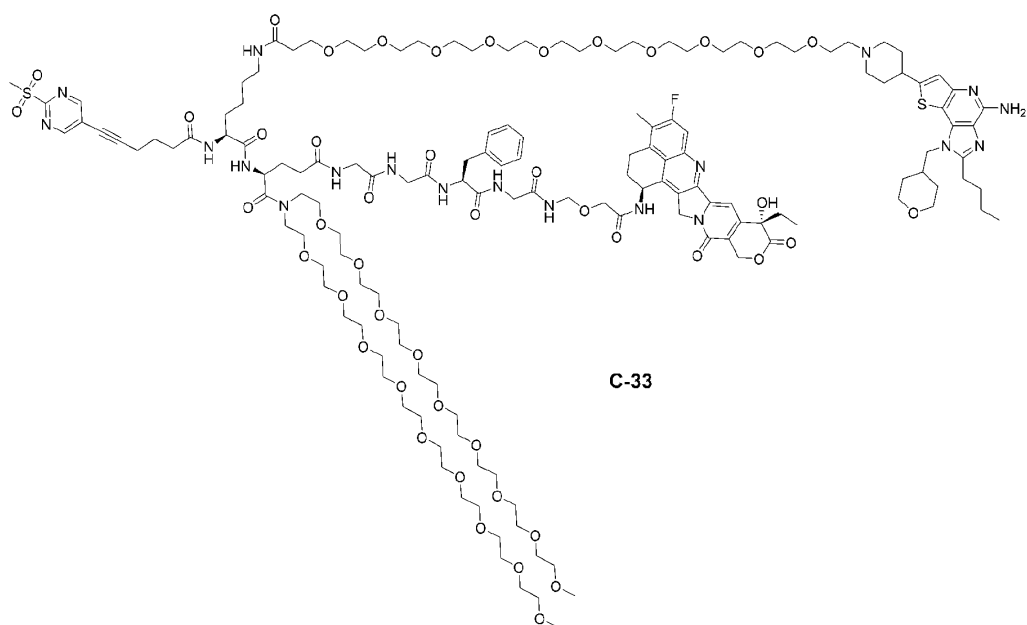


C-28

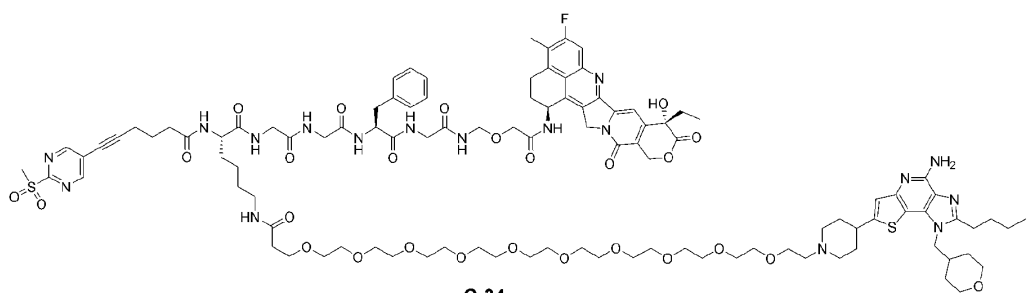


C-29

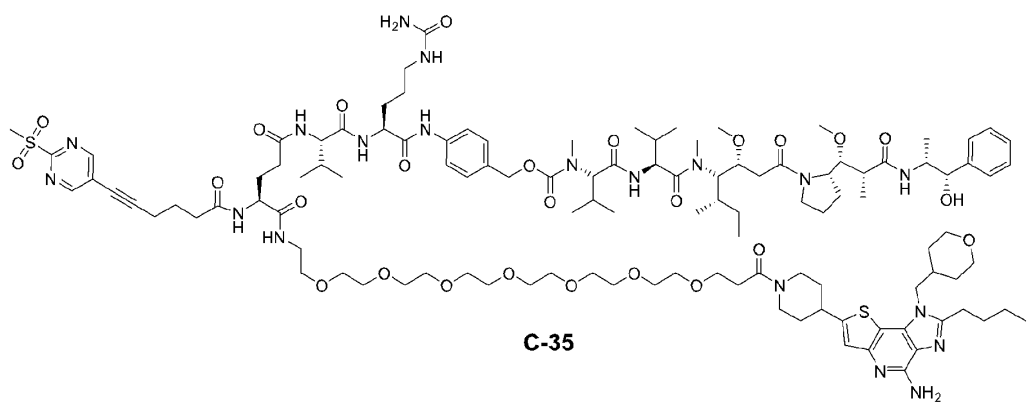




C-33

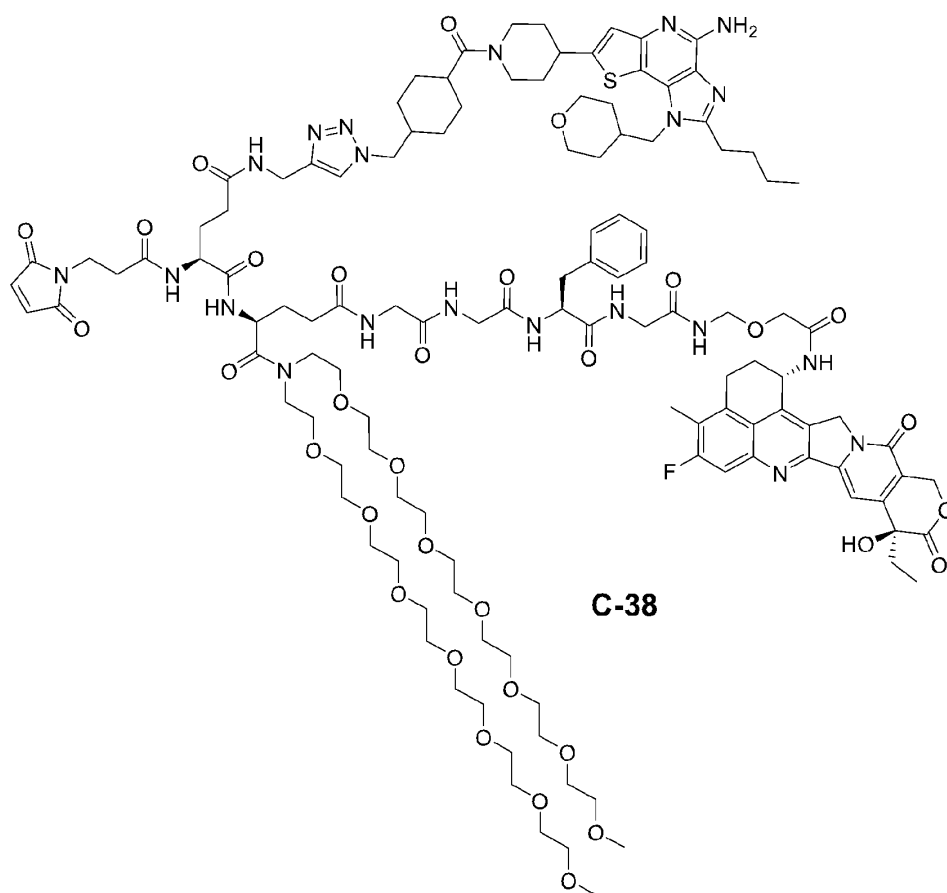
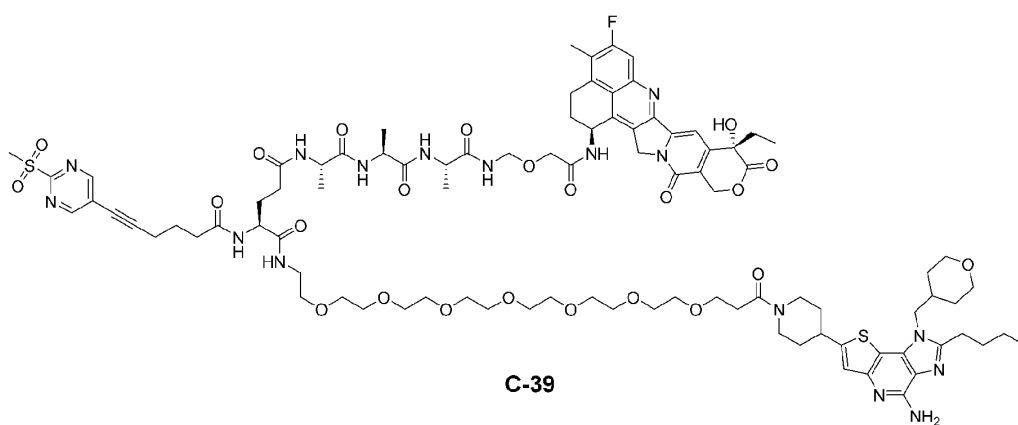


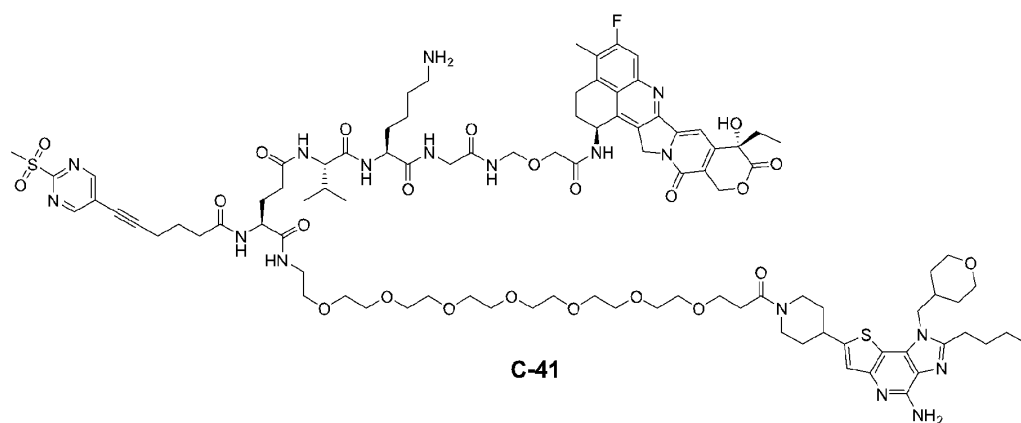
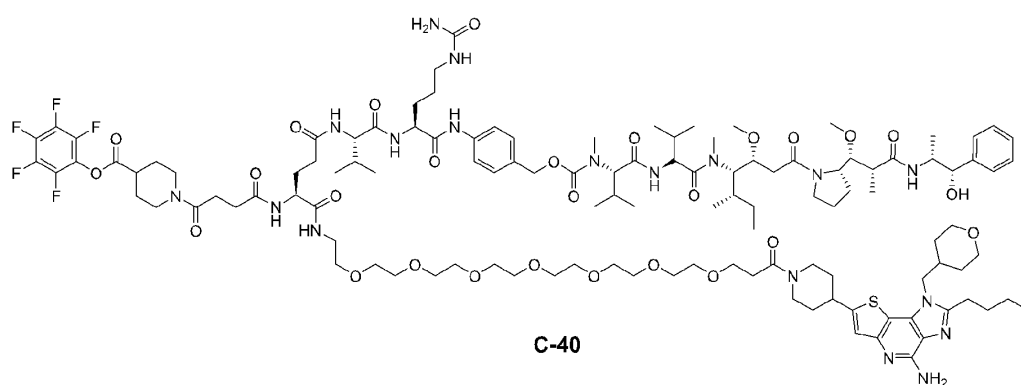
C-34



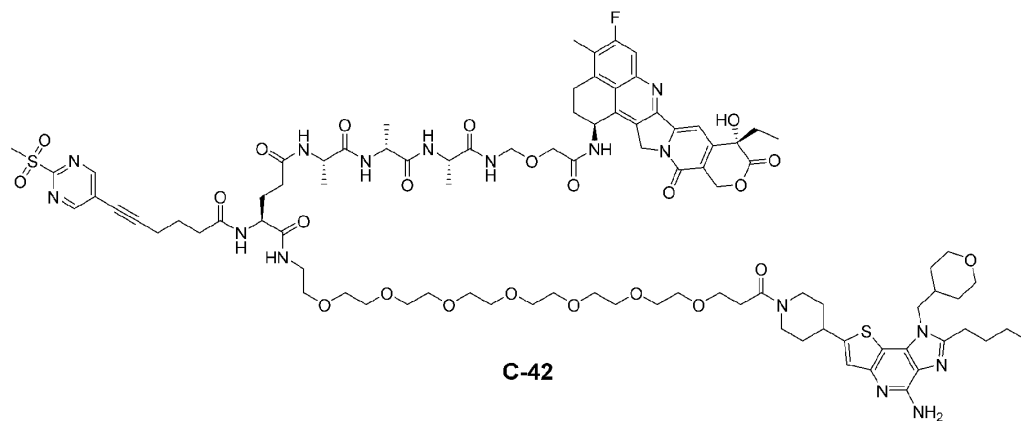
C-35



**C-38****C-39**



和



5 药物组合物

在另一个方面,本发明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、化合物(例如药物连接体、TLR激动剂或细胞毒性药物)或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药,以及一种或多种药用辅料。

制备各种含有一定量的活性成分的药物组合物的方法是已知的，或根据本发明的公开内容对于本领域技术人员是显而易见的。如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed.(1995)所述，制备所述药物组合物的方法包括掺入适当的药用辅料。

5 应用

在另一个方面，本发明提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药在制备抗体药物偶联物中的用途，特别是制备前文任一项所述的抗体药物偶联物。

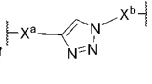
10 在另一个方面，本发明提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、或药物组合在制备治疗和/或预防癌症（例如 HER2 阳性癌症，例如 HER2 阳性胃癌、乳腺癌或非小细胞肺癌）的药物中的用途。

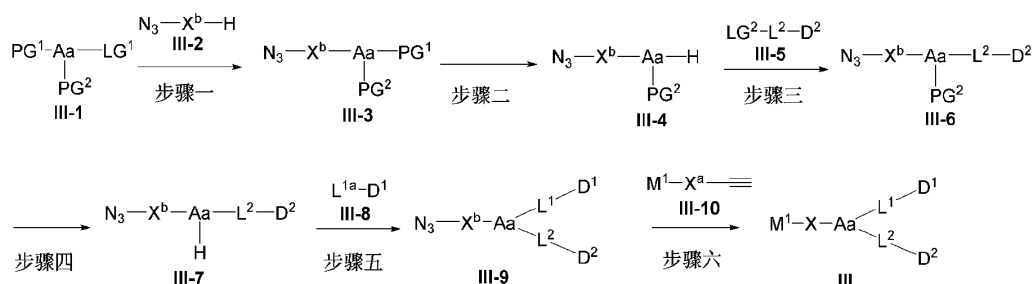
15 在另一个方面，本发明提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、或药物组合，其用于治疗 and/或预防癌症（例如 HER2 阳性癌症，例如 HER2 阳性胃癌、乳腺癌或非小细胞肺癌）。

20 在另一个方面，本发明提供一种治疗和/或预防癌症（例如 HER2 阳性癌症，例如 HER2 阳性胃癌、乳腺癌或非小细胞肺癌）的方法，包括向有此需要的受试者施用治疗和/或预防有效量的前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、或药物组合。

25 制备方法

在另一个方面，本发明提供制备本发明中式(III)所示化合物的方法。

当式(III)的化合物的X含有  结构片段时，X为 ，其中X^a和X^b分别为X中  两侧的结构；本发明提供了制备式(III)的化合物的方法，其包括以下步骤：



其中, LG^1 和 LG^2 表示离去基团, 包括但不限于卤素、羟基、丁二酰亚胺酯、活性酯等, PG^1 和 PG^2 表示保护基团, 包括但不限于苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(Boc)、芴氧羰基(Fmoc)、苄基、乙酰基、叔丁基等; L^{a} 为形成 L^1 的前体结构, 优选含不饱和双键, 并通过发生在该不饱和双键上的加成反应与 Δa 连接;

D^1 、 D^2 、 L^1 、 L^2 、 X 、 Aa 和 M^1 如上文所定义;

步骤一：化合物III-1与化合物III-2发生缩合反应得到化合物III-3；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砷、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。

10 所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐, 优选1-羟基苯并三唑和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的组合。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶, 优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

步骤二：化合物III-3发生脱保护反应得到化合物III-4；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自1,4-二氧六环、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合，优选二氯甲烷。所述反应优选在适合的酸存在下进行，所述酸可选自盐酸、三氟乙酸，优选三氟乙酸。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60℃。所述反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

步骤三：化合物III-4与化合物III-5发生缩合反应得到化合物III-6；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。

所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙

氧碳酰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐, 优选1-羟基苯并三唑和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的组合。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶, 优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

步骤四: 化合物III-6发生脱保护反应得到化合物III-7;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自1,4-二氧六环、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合, 优选二氯甲烷。所述反应优选在适合的酸存在下进行, 所述酸可选自醋酸、氢溴酸、盐酸、三氟乙酸, 优选三氟乙酸。所述反应可添加三乙基硅烷作为离子捕获剂。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

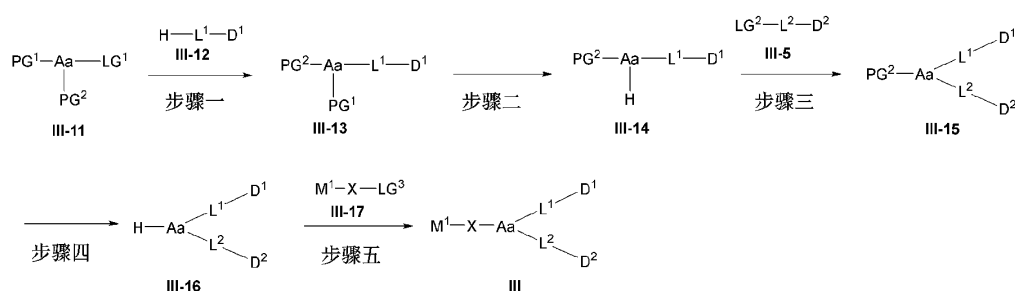
步骤五: 化合物III-7与化合物III-8发生加成反应得到化合物III-9;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自1,4-二氧六环、二氯甲烷、四氢呋喃、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶, 优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

步骤六: 化合物III-9与化合物III-10发生环合反应得到化合物III;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺、水及其任意组合, 优选二甲基亚砜和水的混合溶剂。所述反应优选在金属催化剂的存在下进行。所述金属催化剂可选自硫酸铜、碘化亚铜、溴化亚铜、醋酸铜, 优选硫酸铜。所述反应优选在抗坏血酸或抗坏血酸钠的存在下进行。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

当X为共价键时, 本发明提供了制备式(III)的化合物的另一种方法, 其包括以下步骤:



其中, LG^1 、 LG^2 和 LG^3 表示离去基团,包括但不限于卤素、羟基、丁二酰亚胺酯、活性酯等, PG^1 和 PG^2 表示保护基团,包括但不限于苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(Boc)、芴氧羰基(Fmoc)、苄基、乙酰基、叔丁基等;

5 D^1 、 D^2 、 L^1 、 L^2 、Aa和 M^1 如上文所定义;

步骤一: 化合物III-11与化合物III-12发生缩合反应得到化合物III-13;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧羰酰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐, 优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶, 优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

步骤二: 化合物III-13发生脱保护反应得到化合物III-14;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自1,4-二氧六环、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合, 优选二氯甲烷。所述反应优选在适合的酸存在下进行, 所述酸可选自盐酸、三氟乙酸、溴化锌, 优选溴化锌。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

步骤三: 化合物III-14与化合物III-5发生缩合反应得到化合物III-15;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧羰酰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲

氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐, 优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶, 优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

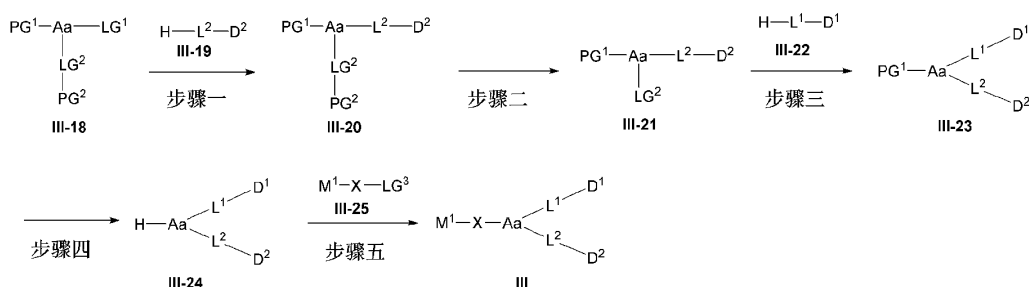
步骤四: 化合物III-15发生脱保护反应得到化合物III-16;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自*N,N*-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在适合的碱存在下进行, 所述碱可选自二乙胺、哌啶, 优选哌啶。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间, 例如1-6小时。

步骤五: 化合物III-16与化合物III-17发生取代反应得到化合物III;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自二氯甲烷、四氢呋喃、1,2-二氯乙烷、乙醚、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶, 优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

当X为共价键时, 本发明提供了制备式(III)的化合物的另一种方法, 其包括以下步骤:



其中, LG^1 、 LG^2 和 LG^3 表示离去基团, 包括但不限于卤素、羟基、丁二酰亚胺酯、活性酯等, PG^1 和 PG^2 表示保护基团, 包括但不限于苄氧羰基 (Cbz)、叔丁氧羰基 (Boc)、芴氧羰基 (Fmoc)、苄基、乙酰基、叔丁基等;

D^1 、 D^2 、 L^1 、 L^2 、Aa和 M^1 如上文所定义;

步骤一: 化合物III-18与化合物III-19发生缩合反应得到化合物III-20;

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。

所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧羰酰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐, 优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。

- 5 所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶, 优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

步骤二: 化合物III-20发生脱保护反应得到化合物III-21;

- 10 所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自1,4-二氧六环、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合, 优选二氯甲烷。所述反应优选在适合的酸存在下进行, 所述酸可选自盐酸、三氟乙酸, 优选三氟乙酸。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

步骤三: 化合物III-21与化合物III-22发生缩合反应得到化合物III-23;

- 15 所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧羰酰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐, 优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。
- 20 所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶, 优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间, 例如1-12小时。

步骤四: 化合物III-23发生脱保护反应得到化合物III-24;

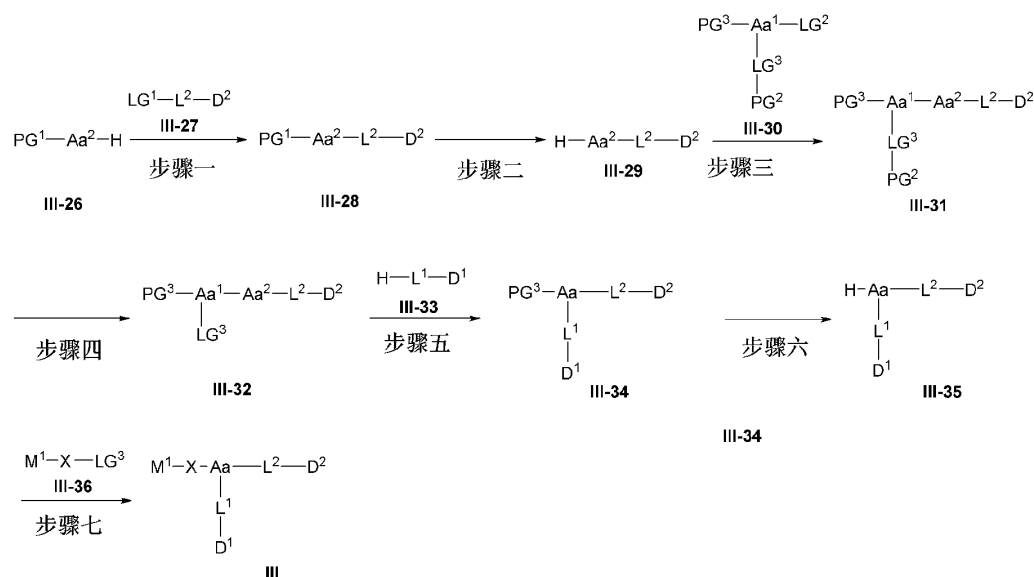
- 25 所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自*N,N*-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在适合的碱存在下进行, 所述碱可选自二乙胺、哌啶, 优选哌啶。所述反应优选在适合的温度下进行, 所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间, 例如1-6小时。

步骤五: 化合物III-24与化合物III-25发生取代反应得到化合物III;

- 30 所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自二氯甲烷、四氢呋喃、1,2-二氯乙烷、乙醚、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合, 优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反

应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶，优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

当Aa是由两个或两个以上氨基酸形成的多肽片段时，Aa为-Aa¹-Aa²-，其中Aa¹和Aa²为构成Aa的氨基酸片段；本发明提供了制备式(III)的化合物的另一种方法，其包括以下步骤：



其中，LG¹、LG²和LG³表示离去基团，包括但不限于卤素、羟基、丁二酰亚胺酯、活性酯等，PG¹、PG²和PG³表示保护基团，包括但不限于苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(Boc)、芴氧羰基(Fmoc)、苄基、乙酰基、叔丁基等；Aa¹和Aa²为构成Aa的氨基酸片段；

D¹、D²、L¹、L²、X、Aa和M¹如上文所定义；

步骤一：化合物III-26与化合物III-27发生缩合反应得到化合物III-28；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐，优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶，优选*N,N*-二异丙基乙

胺。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

步骤二：化合物III-28发生脱保护反应得到化合物III-29；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自1,4-二氧六环、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合，优选1,4-二氧六环。所述反应优选在适合的酸存在下进行，所述酸可选自醋酸、氢溴酸、盐酸、三氟乙酸，优选盐酸。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

步骤三：化合物III-29与化合物III-30发生缩合反应得到化合物III-31；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐，优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶，优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

步骤四：化合物III-31发生脱保护反应得到化合物III-32；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自1,4-二氧六环、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合，优选二氯甲烷。所述反应优选在适合的酸存在下进行，所述酸可选自盐酸、三氟乙酸，优选三氟乙酸。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

步骤五：化合物III-32与化合物III-33发生缩合反应得到化合物III-34；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐，优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶，优选*N,N*-二异丙基乙

胺。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

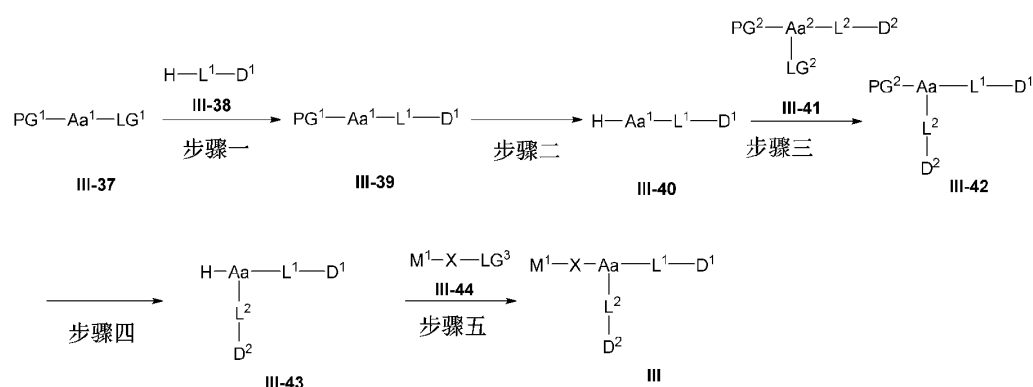
步骤六：化合物III-34发生脱保护反应得到化合物III-35；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自*N,N*-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在适合的碱存在下进行，所述碱可选自二乙胺、哌啶，优选哌啶。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间，例如1-6小时。

步骤七：化合物III-35与化合物III-36发生取代反应得到化合物III；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自二氯甲烷、四氢呋喃、1,2-二氯乙烷、乙醚、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶，优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

当Aa是由两个或两个以上氨基酸形成的多肽片段时，Aa为-Aa¹-Aa²-；本发明提供了制备式(III)的化合物的另一种方法，其包括以下步骤：



其中，LG¹、LG²和LG³表示离去基团，包括但不限于卤素、羟基、丁二酰亚胺酯、活性酯等，PG¹和PG²表示保护基团，包括但不限于苄氧羰基（Cbz）、叔丁氧羰基（Boc）、芴氧羰基（Fmoc）、苄基、乙酰基、叔丁基等；Aa¹和Aa²分别为氨基酸片段或由两个或两个以上氨基酸形成的多肽片段；

D¹、D²、L¹、L²、X、Aa和M¹如上文所定义；

步骤一：化合物III-37与化合物III-38发生缩合反应得到化合物III-39；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐，优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶，优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

10 步骤二：化合物III-39发生脱保护反应得到化合物III-40；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自*N,N*-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在适合的碱存在下进行，所述碱可选自二乙胺、哌啶，优选哌啶。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间，例如1-6小时。

15 步骤三：化合物III-40与化合物III-41发生缩合反应得到化合物III-42；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自四氢呋喃、1,4-二氧六环、二氯甲烷、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在缩合剂的存在下进行。所述缩合剂可选自1-羟基苯并三唑、2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐，优选2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶，优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述缩合反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

25 步骤四：化合物III-42发生脱保护反应得到化合物III-43；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自1,4-二氧六环、二氯甲烷、四氢呋喃及其任意组合，优选二氯甲烷。所述反应优选在适合的酸存在下进行，所述酸可选自盐酸、三氟乙酸、溴化锌，优选溴化锌。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

30 步骤五：化合物III-43与化合物III-44发生取代反应得到化合物III；

所述反应优选在适合的有机溶剂中进行。所述有机溶剂可选自二氯甲烷、四氢呋喃、1,2-二氯乙烷、乙醚、*N,N*-二甲基甲酰胺及其任意组合，优选*N,N*-二甲基甲酰胺。所述反应优选在碱的存在下进行。所述碱可选自*N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶，优选*N,N*-二异丙基乙胺。所述反应优选在适合的温度下进行，所述温度优选为-10-60°C。所述反应优选进行合适的时间，例如1-12小时。

术语定义

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
10 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。抗体轻链可分为κ(kappa)和λ(lambda)轻链。重链可分为μ、
15 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
20 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
25 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.,
30 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。

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。

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。

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变体形式为包含性的(inclusive)或开放式的，且不排除其它未列举的元素或方法步骤。

术语“烷基”表示直链或支链饱和烃基去掉 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”表示直链或支链饱和烃基去掉 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“环烷基”是指饱和环状饱和烃基，包括但不限于单环烷基和双环烷基(诸如螺环烷基、并环烷基和桥环烷基)。术语“C₃₋₁₀ 环烷基”指具有 3 至 10 个成环碳原子的环烷基，诸如环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

术语“杂环基”是指含至少一个选自 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 3-12 元杂环基、3-8 元杂环基、5-6 元杂环基等，例如四氢呋喃基、吡咯烷基、哌啶基、四氢吡喃基等。

术语“杂芳基”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 5-10 元杂芳基、5-6 元杂芳基等，例如呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、咪唑基、吡唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、1,2,3-三嗪基、1,3,5-三嗪基、1,2,4,5-四嗪基等。

术语“芳基”是指芳烃分子的芳核碳原子上去掉一个氢原子得到的基团。例如 C₆₋₁₀ 芳

基，具体实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基等。

本文中所用术语“片段”或“结构片段”，是指化合物分子失去一个或多个原子或原子团后剩余的部分。例如“细胞毒性药物片段”是指本文中所述细胞毒性药物失去一个氢原子或羟基等与所述抗体药物偶联物中连接体连接后得到的该细胞毒性药物的剩余部分。在具体的实施方案中，该细胞毒性药物片段用D¹表示。同样地，“TLR激动剂片段”表示本文中所述TLR激动剂失去一个或多个原子或原子团与抗体药物偶联物中连接体连接得到的该TLR激动剂的剩余部分。在具体的实施方案中，该TLR激动剂片段用D²表示。

如果取代基或数值被描述为“独立地选自”一组基团或数值，则各取代基或数值独立于另一者被选择。因此，各取代基或数值可与另一(其他)取代基或数值相同或不同。

10 本发明还包括所有药学上可接受的同位素标记的化合物，其与本发明的化合物相同，除了一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数不同于在自然界中占优势的原子质量或质量数的原子替代。适合包含入本发明的化合物中的同位素的实例包括但不限于氢的同位素(例如²H、³H、氘D、氚T)；碳的同位素(例如¹¹C、¹³C及¹⁴C)；氯的同位素(例如³⁷Cl)；氟的同位素(例如¹⁸F)；碘的同位素(例如¹²³I及¹²⁵I)；氮的同位素(例如¹³N及¹⁵N)；氧的同位素(例如¹⁵O、¹⁷O及¹⁸O)；磷的同位素(例如³²P)；及硫的同位素(例如³⁵S)。某些同位素标记的本发明的化合物(例如掺入放射性同位素的那些)可用于药物和/或底物组织分布研究(例如分析)中。放射性同位素氚(即³H)及碳-14(即¹⁴C)因易于掺入且容易检测而特别可用于该目的。用正电子发射同位素(例如¹¹C、¹⁸F、¹⁵O及¹³N)进行取代可在正电子发射断层显像术(PET)研究中用于检验底物受体占据情况。被同位素标记的本发明的化合物可通过与描述于随附路线和/或实施例及制备中的那些类似的方法通过使用适当的被同位素标记的试剂代替之前采用的非标记的试剂来制备。本发明的药学上可接受的溶剂合物包括其中结晶溶剂可被同位素取代的那些，例如，D₂O、丙酮-*d*₆或DMSO-*d*₆。

25 术语“立体异构体”表示由于至少一个不对称中心形成的异构体。在具有一个或多个(例如1个、2个、3个或4个)不对称中心的化合物中，其可产生外消旋混合物、单一对映异构体、非对映异构体混合物和单独的非对映异构体。特定个别分子也可以几何异构体(顺式/反式)存在。类似地，本发明的化合物可以两种或更多种处于快速平衡的结构不同的形式的混合物(通常称作互变异构体)存在。互变异构体的代表性实例包括酮-烯醇互变异构体、苯酚-酮互变异构体、亚硝基-肟互变异构体、亚胺-烯胺互变异构体等。要理解，本申请的范围涵盖所有这样的以任意比例(例如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、30 96%、97%、98%、99%)的异构体或其混合物。

本发明涵盖本发明的化合物的所有可能的结晶形式或多晶型物，其可为单一多晶型物或多种多晶型物的任意比例的混合物。

还应当理解，本发明的某些化合物可以游离形式存在用于治疗，或适当时，以其药学上可接受的衍生物形式存在。在本发明中，药学上可接受的衍生物包括但不限于：药学上可接受的盐、溶剂合物、代谢物或前药，在将它们向需要其的患者给药后，能够直接或间接提供本发明的化合物或其代谢物或残余物。因此，当在本文中提及“本发明的化合物”时，也意在涵盖化合物的上述各种衍生物形式。

本发明的化合物的药学上可接受的盐包括其酸加成盐及碱加成盐。适合的酸加成盐由形成药学上可接受盐的酸来形成。适合的碱加成盐由形成药学上可接受盐的碱来形成。适合的盐的综述参见Stahl及Wermuth的“**Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use**” (Wiley-VCH, 2002)。用于制备本发明的化合物的药学上可接受的盐的方法为本领域技术人员已知的。

本发明的化合物可以溶剂合物(优选水合物)的形式存在，其中本发明的化合物包含作为所述化合物晶格的结构要素的极性溶剂。极性溶剂特别是水的量可以化学计量比或非化学计量比存在。

本领域技术人员会理解，由于氮需要可用的孤对电子来氧化成氧化物，因此并非所有的含氮杂环都能够形成N-氧化物；本领域技术人员会识别能够形成N-氧化物的含氮杂环。本领域技术人员还会认识到叔胺能够形成N-氧化物。用于制备杂环和叔胺的N-氧化物的合成方法是本领域技术人员熟知的，包括用过氧酸如过氧乙酸和间氯过氧苯甲酸(MCPBA)、过氧化氢、烷基过氧化氢如叔丁基过氧化氢、过硼酸钠和双环氧乙烷(dioxirane)如二甲基双环氧乙烷来氧化杂环和叔胺。这些用于制备N-氧化物的方法已在文献中得到广泛描述和综述，参见例如：T. L. Gilchrist, *Comprehensive Organic Synthesis*, vol. 7, pp 748-750; A. R. Katritzky和A. J. Boulton, Eds., Academic Press; 以及G. W. H. Cheeseman和E. S. G. Werstiuk, *Advances in Heterocyclic Chemistry*, vol. 22, pp 390-392, A. R. Katritzky和A. J. Boulton, Eds., Academic Press。

在本发明的范围内还包括本发明的化合物的代谢物，即在给药本发明的化合物时体内形成的物质。这样的产物可由例如被给药的化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、酶解等产生。因此，本发明包括本发明的化合物的代谢物，包括通过使本发明的化合物与哺乳动物接触足以产生其代谢产物的时间的方法制得的化合物。

本发明在其范围内进一步包括本发明的化合物的前药，其为自身可具有较小药理学活性或无药理学活性的本发明的化合物的某些衍生物，当被给药至身体中或其上时可通过例

如水解裂解转化成具有期望活性的本发明的化合物。通常这样的前药会是所述化合物的官能团衍生物，其易于在体内转化成期望的治疗活性化合物。关于前药的使用的其他信息可参见“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”，第14卷，ACS Symposium Series (T. Higuchi 及 V. Stella) 及“Bioreversible Carriers in Drug Design,” Pergamon Press, 1987 (E. B. Roche 编辑, American Pharmaceutical Association)。本发明的前药可例如通过用本领域技术人员已知作为“前-部分(pro-moiety)(例如“Design of Prodrugs”, H. Bundgaard (Elsevier, 1985) 中所述)”的某些部分替代本发明的化合物中存在的适当官能团来制备。

在本文中，本发明抗体药物偶联物中出现的 $\text{---}\{\text{S}\}\text{---}$ 表示靶向部分为抗体或抗原结合片段时，抗体或抗原结合片段中的巯基与连接体的具体连接方式。

10 在本文中，本发明抗体药物偶联物中出现的 $\text{---}\{\text{NH}\}\text{---}$ 表示靶向部分为抗体或抗原结合片段时，抗体或抗原结合片段中的氨基与连接体的具体连接方式。

抗体药物偶联物的特征还在于药物部分（例如细胞毒性药物和 TLR 激动剂）与抗体结合部分的平均负载量，通常称为偶联样品的药物对抗体比率(DAR)。例如，从还原和去糖基化样品的 LC-MS 数据，并根据 LC 和 HC 链的平均负载量，可以计算 ADC 的平均 DAR。给定抗体药物偶联物样品的 DAR 表示连接至含有两条轻链和两条重链的四聚体抗体的药物(有效负载)分子的平均数。

虽然对于特定抗体药物偶联物分子而言，药物对抗体比率具有确切值(例如，在式(I)中为 m)，但是应理解当用来描述含有许多分子的样品时，该值将经常是平均值，这归因于典型地与偶联步骤相关的某种程度的非均匀性。抗体药物偶联物样品的平均载量在本文中称为药物对抗体比率或“DAR”。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的 DAR 值（偶联样品的药物/抗体比值）为 1-10，例如：1~2，1~3，1~4，1~5，1~6，1~7，1~8，1~9，1~10，2~3，2~4，2~5，2~6，2~7，2~8，2~9，2~10，3~4，3~5，3~6，3~7，3~8，3~9，3~10，4~5，4~6，4~7，4~8，4~9，4~10，5~6，5~7，5~8，5~9，5~10，6~7，6~8，6~9，6~10，7~8，7~9，7~10，8~9，8~10，或 9~10，优选为 3~8，例如，3.0~3.5，3.0~4.0，3.0~4.5，3.0~5.0，3.0~5.5，3.0~6.0，3.5~4.0，3.5~4.5，3.5~5.0，3.5~5.5，3.5~6.0，3.5~6.5，3.5~7.0，3.5~7.5，3.5~8.0，4.0~4.5，4.0~5.0，4.0~5.5，4.0~6.0，4.0~6.5，4.0~7.0，4.0~7.5，4.0~8.0，4.5~5.0，4.5~5.5，4.5~6.0，4.5~6.5，4.5~7.0，4.5~7.5，4.5~8.0，5.0~5.5，5.0~6.0，5.0~6.5，5.0~7.0，5.0~7.5，5.0~8.0，5.5~6.0，5.5~6.5，5.5~7.0，5.5~7.5，5.5~8.0，6.0~6.5，6.0~7.0，6.0~7.5，6.0~8.0，6.5~7.0，6.5~7.5，6.5~8.0，7.0~7.5，7.0~8.0 或 7.5~8.0。

在本发明中，“治疗”一般是指部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：**(a)**抑制疾病的症状，即阻止其发展；或**(b)**缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

在本发明中，“预防”是指抑制和延迟疾病的发作，不仅包括在发展疾病之前的预防，
5 还包括在治疗后预防疾病的复发。

在本发明中，“受试者”指脊椎动物。在一些实施方案中，脊椎动物指哺乳动物。哺乳动物包括，但不限于，牲畜(诸如牛)、宠物(诸如猫、犬、和马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。在一些实施方案中，哺乳动物指人。

在本发明中，“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗效果的量。所述
10 “治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及活性成分在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还涵盖活性成分的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。在癌症治疗中，药物的治疗有效量可减少癌细胞数；缩小肿瘤体积；抑制(即一定程度的减缓，优选停止)癌细胞浸润到周围器官中；抑制(即一定程度的减缓，优选停止)肿瘤转移；一定程度的抑制肿瘤生长；和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多
15 种症状。

具体实施方式

为了使本发明的目的和技术方案更加清楚，以下结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，均按照常规条件或制造商建议
20 的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

化合物的结构是通过核磁共振(^1H NMR)或质谱(MS)来确定的。 ^1H NMR 的测定仪器为 JEOL Eclipse 400 核磁仪，测定溶剂为氘代甲醇(CD_3OD)、氘代氯仿(CDCl_3)或六氘代二甲基亚砜($\text{DMSO}-d_6$)，内标为四甲基硅烷(TMS)，化学位移(δ)以百万分之一(ppm)的单位给出。

25 MS 的测定仪器为 Agilent (ESI)质谱仪，生产商：Agilent，型号：Agilent 6120B。

制备高效液相色谱仪的制备方法：

仪器型号：Agilent 1260，色谱柱：Waters SunFire Prep C18 OBD (19 mm×150 mm×5.0 μm)；色谱柱温：25°C；流速：20.0 mL/min；检测波长：214 nm；洗脱梯度：(0 min: 10%A, 90%B; 16.0 min: 90%A, 10%B)；流动相 A：乙腈；流动相 B：0.05%甲酸水溶液。

薄层色谱硅胶板(TLC)使用 Merck 产的铝板(20 × 20 cm), 薄层层析分离纯化采用的规格是烟台产 GF 254 (1 mm)。

反应的监测采用薄层色谱法(TLC)或 LC-MS; 使用的展开剂体系包括: 二氯甲烷和甲醇体系, 正己烷和乙酸乙酯体系, 以及石油醚和乙酸乙酯体系, 溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节或者加入三乙胺等进行调节。

反向柱层析的制备方法:

制备方法 A:

仪器型号: Biotage 快速中压制备色谱, 色谱柱: Agela C18 反向柱(Spherical; 20-35 μ m; 100A); 色谱柱温: 25°C; 流速: 28.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水;

制备方法 B:

仪器型号: Biotage 快速中压制备色谱, 色谱柱: Agela C18 反向柱(Spherical; 20-35 μ m; 100A); 色谱柱温: 25°C; 流速: 28.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 0.05%甲酸水溶液;

15 制备方法 C:

仪器型号: Biotage 快速中压制备色谱, 色谱柱: Agela C18 反向柱(Spherical; 20-35 μ m; 100A); 色谱柱温: 25°C; 流速: 28.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 0.05%碳酸氢铵水溶液;

微波反应使用 Biotage Initiator +(400 W, RT ~ 300°C)微波反应器。

20 柱层析一般使用 200 ~ 300 目硅胶为载体。洗脱剂体系包括: 二氯甲烷和甲醇体系, 以及石油醚和乙酸乙酯体系, 溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节, 也可以加入少量的三乙胺进行调节。

实施例若无特殊说明, 反应的温度为室温(20°C~35°C)。

25 本发明所使用的试剂购自 Acros Organics、Aldrich Chemical Company、特伯化学等公司。

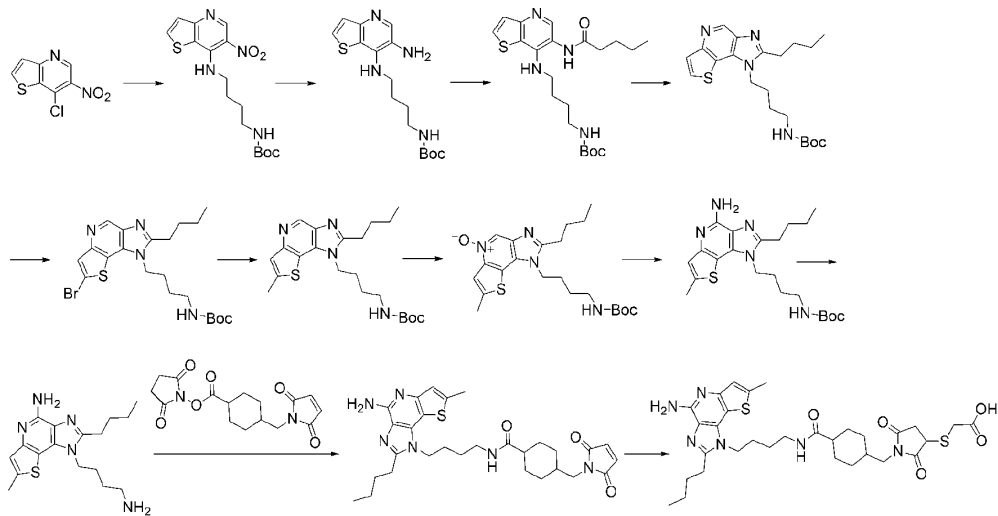
在常规的合成法以及实施例、和中间体合成例中, 各缩写的意思如以下所示。

缩写	含义	缩写	含义
TLC	薄层色谱法	DMSO- <i>d</i> ₆	六氘代二甲基亚砜

LC-MS	液相色谱-质谱联用	s	单峰(singlet)
DMSO	二甲基亚砜	d	二重峰(doublet)
TCEP	三(2-羧乙基)膦	t	三重峰(triplet)
EDTA	乙二胺四乙酸	q	四重峰(quartet)
MS	质谱	dd	双二重峰(double doublet)
NMR	核磁共振	m	多重峰(multiplet)
TMS	四甲基硅烷	br	宽峰(broad)
CD ₃ OD	氘代甲醇	J	偶合常数
CDCl ₃	氘代氯仿	Hz	赫兹

一、化合物实施例

中间体制备例 1: 2-((1-((4-((4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酰基)环己基)甲基)-2,5-二氧代吡咯烷-3-基)硫代)乙酸(化合物 Int1)的制备



5

第一步: (4-((6-硝基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)丁基)氨基甲酸叔丁酯的制备

将 7-氯-6-硝基噻吩并[3,2-*b*]吡啶(10.0 g, 46.59 mmol)和 *N*-叔丁氧羰基-1,4-丁二胺(10.53 g, 55.91 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(150 mL)中, 冰水浴降温, 0°C下向反应液中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(12.04 g, 93.18 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 6 小时。将反应液倒入水(1500 mL)中, 并用乙酸乙酯(450 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(150 mL)

10

洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物(16.61 g, 收率: 97.3%)。

MS m/z (ESI): 367.1 [M+H]⁺。

第二步: (4-((6-氨基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)丁基)氨基甲酸叔丁酯的制备

将(4-((6-硝基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(16.61 g, 49.37 mmol)
5 溶于四氢呋喃(100 mL)和甲醇(100 mL)的混合溶剂中, 加入 10% 钯碳(2.0 g, 11.97 mmol), 氢气置换三次, 反应体系在室温下搅拌 12 小时, 抽滤, 甲醇(30 mL)洗涤滤饼, 滤液浓缩, 得到本步的标题化合物(14.47 g, 收率: 87.1%)。

MS m/z (ESI): 337.1 [M+H]⁺。

第三步: (4-((6-戊酰胺基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)丁基)氨基甲酸叔丁酯的制备

10 将(4-((6-氨基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(14.47 g, 43.01 mmol) 和 *N,N*-二异丙基乙胺(11.12 g, 86.02 mmol)溶于四氢呋喃(250 mL)中, 冰水浴降温, 0°C 下向反应液中缓慢滴加正戊酰氯(7.78 g, 64.52 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 4 小时。向反应体系中加入水(100 mL)淬灭反应, 将体系浓缩尽可能除去四氢呋喃, 向所得剩余物中加入水(300 mL), 并用乙酸乙酯(300 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(150 mL)洗涤三
15 次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物(16.72 g, 收率: 92.4%)。

MS m/z (ESI): 421.0 [M+H]⁺。

第四步: (4-(2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯的制备

20 将(4-((6-戊酰胺基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(16.72 g, 39.76 mmol)和邻氯苯甲酸(3.11 g, 19.88 mmol)加入到甲苯(300 mL)中, 升温至溶剂回流并分水反应搅拌 4 小时。将反应体系冷却至室温后, 浓缩除去溶剂, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 100%乙酸乙酯), 得到本步的标题化合物(14.76 g, 收率: 92.2%)。

MS m/z (ESI): 403.2 [M+H]⁺。

25 第五步: (4-(7-溴-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯的制备

将(4-(2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(5.41 g, 13.44 mmol)完全溶解于 *N,N*-二甲基甲酰胺(75 mL)和冰醋酸(25 mL)的混合溶剂中, 冰水浴降温, 0°C 下向反应液中缓慢分批加入 *N*-溴代丁二酰亚胺(4.78 g, 26.88 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 24 小时。将反应液倒入水(300 mL)中, 并用乙酸乙酯(300 mL)萃取三次, 合

并有机相, 饱和碳酸氢钠水溶液(150 mL)洗涤三次, 饱和食盐水(150 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚=1/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(4.95 g, 收率: 76.5%)。

MS m/z (ESI): 481.0 [M+H]⁺。

- 5 第六步: (4-(2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯的制备

将(4-(7-溴-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(1.0 g, 2.08 mmol)、三甲基硼氧六环(50 wt.% 四氢呋喃溶液, 2.62 g, 10.4 mmol)、碳酸钾(575.0 mg, 4.16 mmol)和1,1'-双二苯基膦二茂铁二氯化钯(307.3 mg, 0.42 mmol)依次加入1,4-二氧
10 六环(10 mL)和水(1 mL)的混合溶剂中, 反应体系经氮气鼓泡5分钟后, 于微波下升温至100°C搅拌2小时。将反应体系冷却至室温后, 浓缩除去溶剂, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 100%乙酸乙酯), 得到本步的标题化合物(0.65 g, 收率: 75.0%)。

MS m/z (ESI): 417.1 [M+H]⁺。

- 15 第七步: 1-(4-((叔丁氧羰基)氨基)丁基)-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-5-氧化物的制备

将(4-(2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(0.65 g, 1.56 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)中, 冰水浴降温, 0°C下向反应液中缓慢分批加入间氯过氧苯甲酸(538.5 mg, 3.12 mmol), 缓慢升温至室温搅拌4小时。将反应液倒入水(100 mL)中, 并用二氯甲烷(60 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和碳酸氢钠水溶液(30 mL)洗涤
20 两次, 饱和亚硫酸钠水溶液(30 mL)洗涤两次, 饱和食盐水(45 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物(640 mg, 收率: 94.8%)。

MS m/z (ESI): 433.2 [M+H]⁺。

第八步: (4-(4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯的制备

- 25 将1-(4-((叔丁氧羰基)氨基)丁基)-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-5-氧化物(640 mg, 1.48 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)和氨水(5 mL)的混合溶剂中, 冰水浴降温, 0°C下向反应液中缓慢分批加入对甲苯磺酰氯(564.1 mg, 2.96 mmol), 缓慢升温至室温搅拌12小时。向反应体系中加入水(100 mL), 二氯甲烷(60 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(45 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层
30 析纯化(洗脱剂: 乙酸乙酯/甲醇=15/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(266 mg, 收率: 41.6%)。

MS m/z (ESI): 432.2 $[M+H]^+$ 。

第九步: 1-(4-氨基丁基)-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-4-胺(化合物 1)的制备

将(4-(4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(266 mg, 0.62 mmol)溶于甲醇(10 mL)和氯化氢的 1,4-二氧六环溶液(4*N*, 5 mL)的混合溶剂中, 室温搅拌 12 小时。浓缩除去溶剂, 依次向剩余物中加入二氯甲烷和甲醇的混合溶剂(体积比为 4:1, 10 mL)、饱和碳酸氢钠水溶液(2 mL), 室温搅拌 5 分钟后, 浓缩除去溶剂, 所得剩余物经高压液相制备色谱制备纯化, 得到标题化合物(130 mg, 收率: 63.3%)。

10 MS m/z (ESI): 332.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.34 (s, 2H), 6.98 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.06 (s, 2H), 4.24 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.86 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.56 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 1.83-1.75 (m, 4H), 1.62-1.58 (m, 2H), 1.47-1.40 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H)。

第十步: *N*-(4-(4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)-4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-甲酰胺的制备

将 1-(4-氨基丁基)-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-4-胺(200 mg, 0.60 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(155 mg, 1.2 mmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 向其中滴加 2,5-二氧代吡咯烷-1-基-4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-羧酸酯(240 mg, 0.72 mmol)的二氯甲烷(1 mL)溶液, 反应混合物 25°C 搅拌反应 12 小时。向反应体系中加水, 二氯甲烷萃取三次, 收集有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩所得粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v))得到本步的标题化合物(282 mg, 收率: 85.4%)。

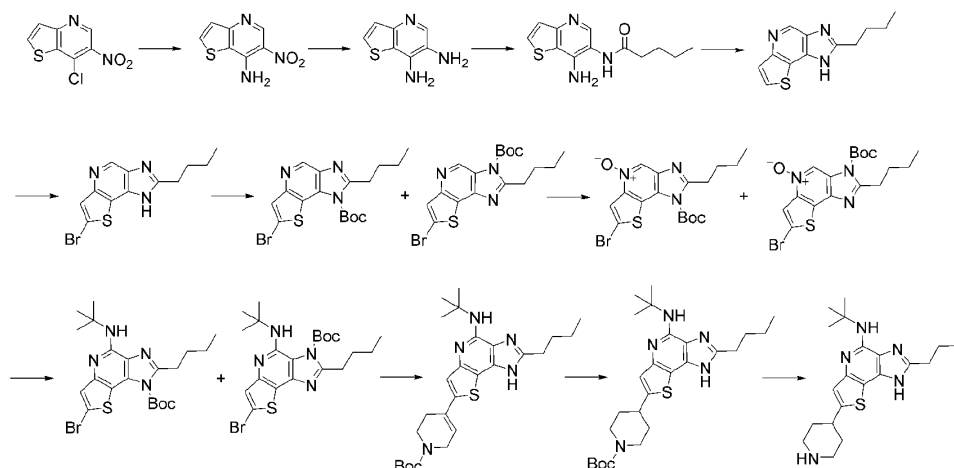
MS m/z (ESI): 551.3 $[M+H]^+$ 。

第十一步: 2-((1-((4-((4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酰基)环己基)甲基)-2,5-二氧代吡咯烷-3-基)硫代)乙酸 (Int1) 的制备

将 *N*-(4-(4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)-4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-甲酰胺(282 mg, 0.51 mmol)和巯基乙酸(94 mg, 1.02 mmol)加入二氯甲烷(50 mL)中, 反应混合物于 25°C 搅拌反应 30 分钟。反应液浓缩得黄色固体, 经甲基叔丁基醚打浆, 得到本步的标题化合物(237 mg, 收率: 72.3%)。

MS m/z (ESI): 643.3 [M+H]⁺.

中间体制备例 2: *N*-(叔丁基)-2-丁基-7-(嘧啶-4-基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-4-胺(化合物 Int2)的制备



5 第一步: 6-硝基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-胺的制备

将 7-氯-6-硝基噻吩并[3,2-*b*]吡啶(2.0 g, 9.23 mmol)溶于甲醇(20 mL)中, 加入氨的甲醇溶液(7 N, 26.4 mL, 184.8 mmol), 升温至 50°C 搅拌 4 小时。将反应体系冷却至室温后, 浓缩除去溶剂得到本步的标题化合物(1.73 g, 收率: 96.1%)。

MS m/z (ESI): 196.1 [M+H]⁺.

10 第二步: 噻吩并[3,2-*b*]吡啶-6,7-二胺的制备

采用中间体制备例 1 的合成路线, 将第二步反应原料(4-((6-硝基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)丁基)氨基甲酸叔丁酯替换为 6-硝基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-胺, 得到本步的标题化合物(1.4 g, 收率: 98.4%)。

MS m/z (ESI): 166.1 [M+H]⁺.

15 第三步: *N*-(7-氨基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-6-基)戊酰胺的制备

采用中间体制备例 1 的合成路线, 将第三步反应原料(4-((6-氨基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)丁基)氨基甲酸叔丁酯替换为噻吩并[3,2-*b*]吡啶-6,7-二胺, 得到本步的标题化合物(2.5 g, 收率: 97.6%)。

MS m/z (ESI): 250.1 [M+H]⁺.

20 第四步: 2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶的制备

将 *N*-(7-氨基噻吩并[3,2-*b*]吡啶-6-基)戊酰胺(2.5 g, 8.48 mmol)加入乙醇(30 mL)中, 室温下加入氢氧化钠(1.7 g, 42.4 mmol), 升温至 50°C 搅拌 6 小时。向反应体系中加入水(150 mL)淬灭反应, 用稀盐酸调节 pH = 6, 并用乙酸乙酯(150 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和碳酸氢钠溶液(60 mL)洗涤两次, 饱和食盐水(60 mL)洗涤两次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物(1.5 g, 收率: 76.5%)。

MS *m/z* (ESI): 232.0 [M+H]⁺。

第五步: 7-溴-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶的制备

采用中间体制备例 1 的合成路线, 将第五步反应原料(4-(2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酸叔丁酯替换为 2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶, 得到本步的标题化合物(1.4 g, 收率: 65.7%)。

MS *m/z* (ESI): 310.0 [M+H]⁺。

第六步: 7-溴-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-羧酸叔丁酯和 7-溴-2-丁基-3*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-3-羧酸叔丁酯混合物的制备

将 7-溴-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶(1 g, 3.20 mmol)和 4-二甲氨基吡啶(40 mg, 0.32 mmol)溶解于四氢呋喃(10 mL)中, 室温下依次加入三乙胺(0.65 g, 6.40 mmol)和二碳酸二叔丁酯(1.1 g, 4.8 mmol), 升温至 40°C 搅拌 12 小时。将反应液倒入水(100 mL)中, 并用二氯甲烷(60 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(30 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚 = 3/1(v/v)), 得到本步标题化合物所示的混合物(1.0 g, 收率: 76.7%)。

MS *m/z* (ESI): 410.0 [M+H]⁺。

第七步: 7-溴-1-(叔丁氧羰基)-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶 5-氧化物和 7-溴-3-(叔丁氧羰基)-2-丁基-3*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶 5-氧化物混合物的制备

将 7-溴-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-羧酸叔丁酯和 7-溴-2-丁基-3*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-3-羧酸叔丁酯的混合物(1.0 g, 2.43 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)中, 冰水浴降温, 0°C 下向反应液中缓慢分批加入间氯过氧苯甲酸(0.98 g, 4.86 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 4 小时。将反应液倒入水(100 mL)中, 并用二氯甲烷(60 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和碳酸氢钠水溶液(30 mL)洗涤两次, 饱和亚硫酸钠水溶液(30 mL)洗涤两次, 饱和食盐水(45 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步标题化合物所示的混合物(1.0 g, 收率: 90.9%)。

MS *m/z* (ESI): 426.0 [M+H]⁺。

第八步：7-溴-2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-羧酸叔丁酯和 7-溴-2-丁基-4-(叔丁基氨基)-3*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-3-羧酸叔丁酯混合物的制备

将 7-溴-1-(叔丁氧羰基)-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶 5-氧化物和 7-溴-3-(叔丁氧羰基)-2-丁基-3*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶 5-氧化物的混合物(1.0 g, 2.34 mmol)、叔丁胺(0.85 g, 11.7 mmol)溶于二氯甲烷(20 mL)中，冰水浴降温，0°C下向反应液中缓慢分批加入对甲苯磺酰氯(0.89 g, 4.68 mmol)，缓慢升温至室温搅拌 12 小时。向反应体系中加入水(100 mL)，二氯甲烷(60 mL)萃取三次，合并有机相，饱和食盐水(45 mL)洗涤三次，有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩，所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂：乙酸乙酯/石油醚=5/1(v/v))，得到本步标题化合物所示的混合物(0.6 g，收率：53.1%)。

MS *m/z* (ESI): 481.2 [M+H]⁺。

第九步：4-(2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)-3,6-二氢吡啶-1(2*H*)-羧酸叔丁酯的制备

将 7-溴-2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-羧酸叔丁酯和 7-溴-2-丁基-4-(叔丁基氨基)-3*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-3-羧酸叔丁酯混合物(1 g, 2.1 mmol)加入 1,4-二氧六环(20 mL)和水(2 mL)的混合溶液中，再加入 4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-5,6-二氢吡啶-1(2*H*)-羧酸叔丁酯(0.85 g, 2.73 mmol)和碳酸钾(0.6 g, 4.2 mmol)。置换氮气三次，加入 1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(76 mg, 0.1 mmol)，微波加热至 90°C 反应 2 小时。反应完全后，冷却至室温，用水稀释反应。再用二氯甲烷萃取，合并有机相后用盐水洗涤，有机相浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂：石油醚/乙酸乙酯=3/1(v/v))得到本步的标题化合物(0.8 g，收率：80.0%)。

MS *m/z* (ESI): 484.3 [M+H]⁺。

第十步：4-(2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯的制备

氮气下，向 4-(2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)-3,6-二氢吡啶-1(2*H*)-羧酸叔丁酯(0.8 g, 1.66 mmol)的甲醇(20 mL)溶液中加入 10% 钯碳(50 mg)，置换氢气三次，室温搅拌 24 小时。反应完毕后，过滤除去钯碳，滤液浓缩后所得固体真空干燥，得到本步的标题化合物(0.78 g，收率：97.5%)。

MS *m/z* (ESI): 486.3 [M+H]⁺。

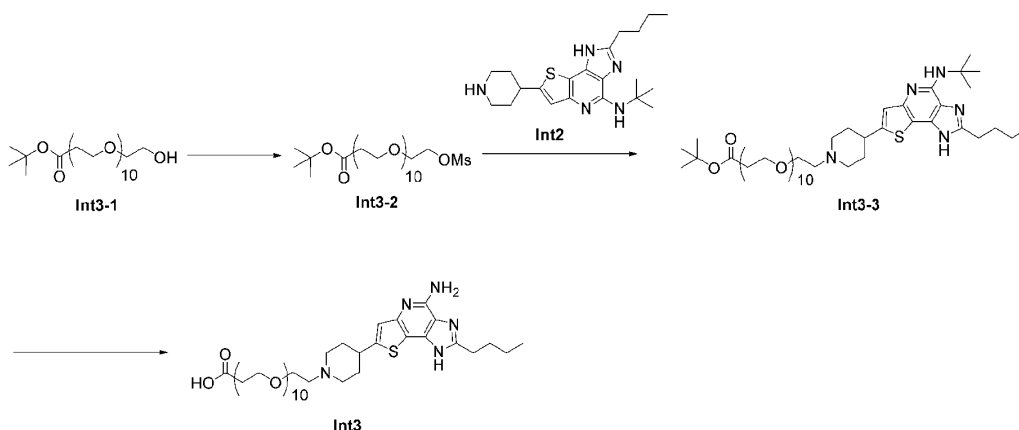
第十一步：*N*-(叔丁基)-2-丁基-7-(哌啶-4-基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-4-胺

(Int2) 的制备

向 4-(2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯(0.78 g, 1.61 mmol)的甲醇(10 mL)溶液中加入氯化氢的 1,4-二氧六环溶液(2 mL, 4 M, 8 mmol), 室温反应 12 小时。反应完毕后, 反应液浓缩所得固体真空干燥, 得到本步的标题化合物(0.57 g, 收率: 91.9%)。

MS *m/z* (ESI): 386.2 [M+H]⁺。

中间体制备例 3: 化合物 Int3 的制备



第一步: 化合物 Int3-2 的制备

向化合物 Int3-1 (2 g, 3.41 mmol)的二氯甲烷(30 mL)溶液中加入三乙胺(0.69 g, 6.82 mmol), 反应液在冰水浴冷却下加入甲基磺酰氯(0.58 g, 5.12 mmol), 然后室温下搅拌过夜。反应完全后, 用二氯甲烷稀释反应。再依次用碳酸钠溶液和盐水洗涤, 有机相浓缩得到本步的标题化合物(2.2 g, 收率: 95.6%)。

MS *m/z* (ESI): 682.4 [M+NH₄]⁺。

第二步: 化合物 Int3-3 的制备

向化合物 Int2 (1 g, 2.59 mmol)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)溶液中加入化合物 Int3-2 (2.2 g, 3.37 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙基胺(0.88 g, 6.74 mmol), 反应混合物在 90°C 下反应 24 小时。反应完毕后, 用水稀释, 二氯甲烷萃取, 合并有机相后用盐水洗涤, 有机相浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v))得到本步的标题化合物(1.2 g, 收率: 37.5%)。

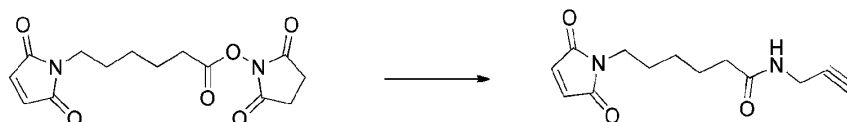
MS *m/z* (ESI): 954.4 [M+H]⁺。

第三步: 化合物 Int3 的制备

向化合物 Int3-3 (1.2 g, 1.26 mmol) 的 1,4-二氧六环(10 mL)溶液中加入氯化氢的 1,4-二氧六环溶液(3.2 mL, 4 M, 12.6 mmol), 反应混合物在 90°C 下反应 12 小时。反应完全后, 反应液浓缩得到本步的标题化合物粗品(1 g, 收率: 90.9%)。

MS m/z (ESI): 842.4 [M+H]⁺。

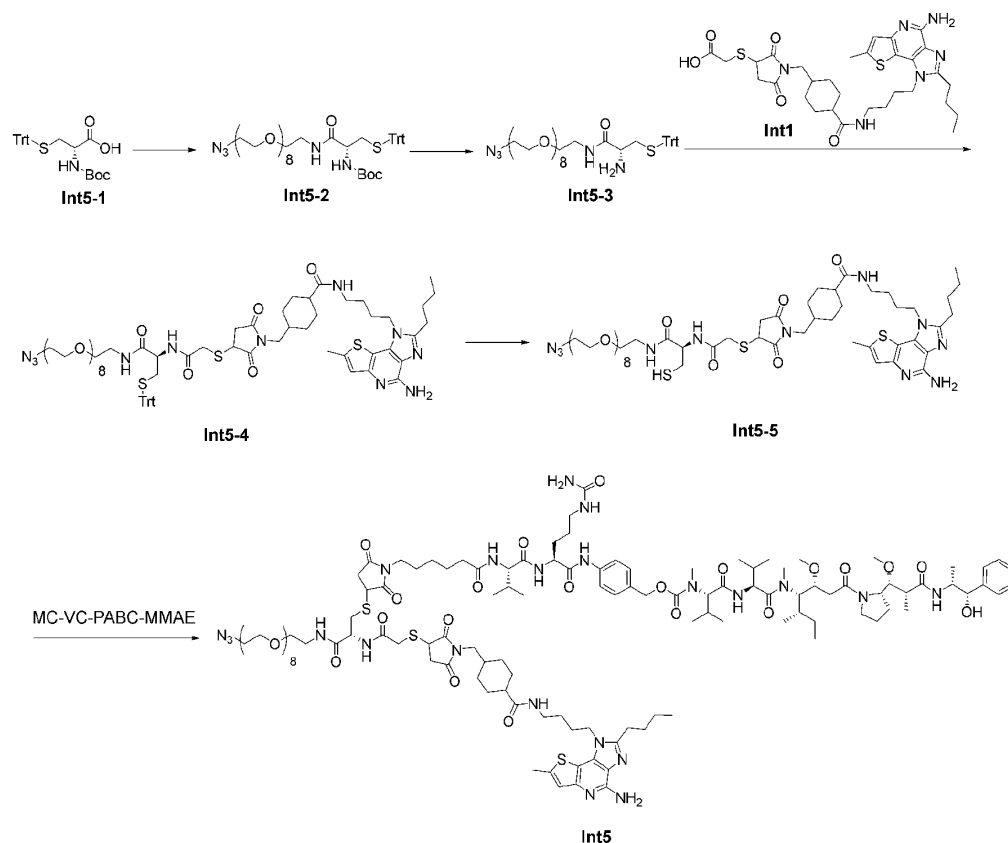
5 中间体制备例 4: 6-(2,5-二氧基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(丙-2-炔-1-基)己酰胺的制备



将 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(631.58 mg, 2.05 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 加入炔丙胺(124.12 mg, 2.25 mmol)和三乙胺(414.87 mg, 4.1 mmol), 25°C 搅拌 12 小时, 浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=20/1(v/v))得到本步的标题化合物(256 mg, 收率: 50.2%)。

MS m/z (ESI): 249.1 [M+H]⁺。

中间体制备例 5: 化合物 Int5 的制备



第一步：化合物 Int5-2 的制备

将 *N*-叔丁氧羰基-*S*-三苯甲基-*L*-半胱氨酸(384 mg, 0.83 mmol)和 26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧六氧烷-1-胺(435 mg, 0.99 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 在冰浴下加入 1-羟基苯并三唑(167.58 mg, 1.24 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(320.43 mg, 2.48 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(238 mg, 1.24 mmol), 20°C 搅拌 3 小时, 将反应液滴入水中, 二氯甲烷萃取, 有机相干燥, 浓缩, 得到本步的标题化合物(0.69 g, 收率: 78.4%)。

MS *m/z* (ESI): 884.4 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int5-3 的制备

10 将化合物 Int5-2 (0.69 g, 0.78 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)中, 滴加三氟乙酸(10 mL), 室温搅拌 2 小时, 浓缩, 二氯甲烷(20 mL)稀释, 有机相用碳酸氢钠溶液洗, 干燥, 浓缩, 得到本步的标题化合物(0.6 g, 收率: 98%)。

MS *m/z* (ESI): 784.4 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int5-4 的制备

15 将化合物 Int1 (136 mg, 211 mmol)和化合物 Int5-3 (182 mg, 233 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 在冰浴下加入 1-羟基苯并三唑(43.2 mg, 0.32 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(81.6 mg, 0.63 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(61.3 mg, 0.32 mmol), 20°C 搅拌 3 小时, 将反应液滴入水中, 二氯甲烷萃取, 有机相干燥, 浓缩, 得到本步的标题化合物(0.23 g, 收率: 95.8%)。

20 MS *m/z* (ESI): 1408.6 [M+H]⁺。

第四步：化合物 Int5-5 的制备

将化合物 Int5-4 (0.23 g, 0.16 mmol)溶于二氯甲烷(2 mL)和三乙基硅烷(0.52 mL)中, 滴加三氟乙酸(1 mL), 室温搅拌 1 小时, 浓缩, 二氯甲烷(20 mL)稀释, 有机相用碳酸氢钠溶液洗, 干燥, 浓缩, 得到本步的标题化合物(0.15 g, 收率: 78.9%)。

25 MS *m/z* (ESI): 1166.5 [M+H]⁺。

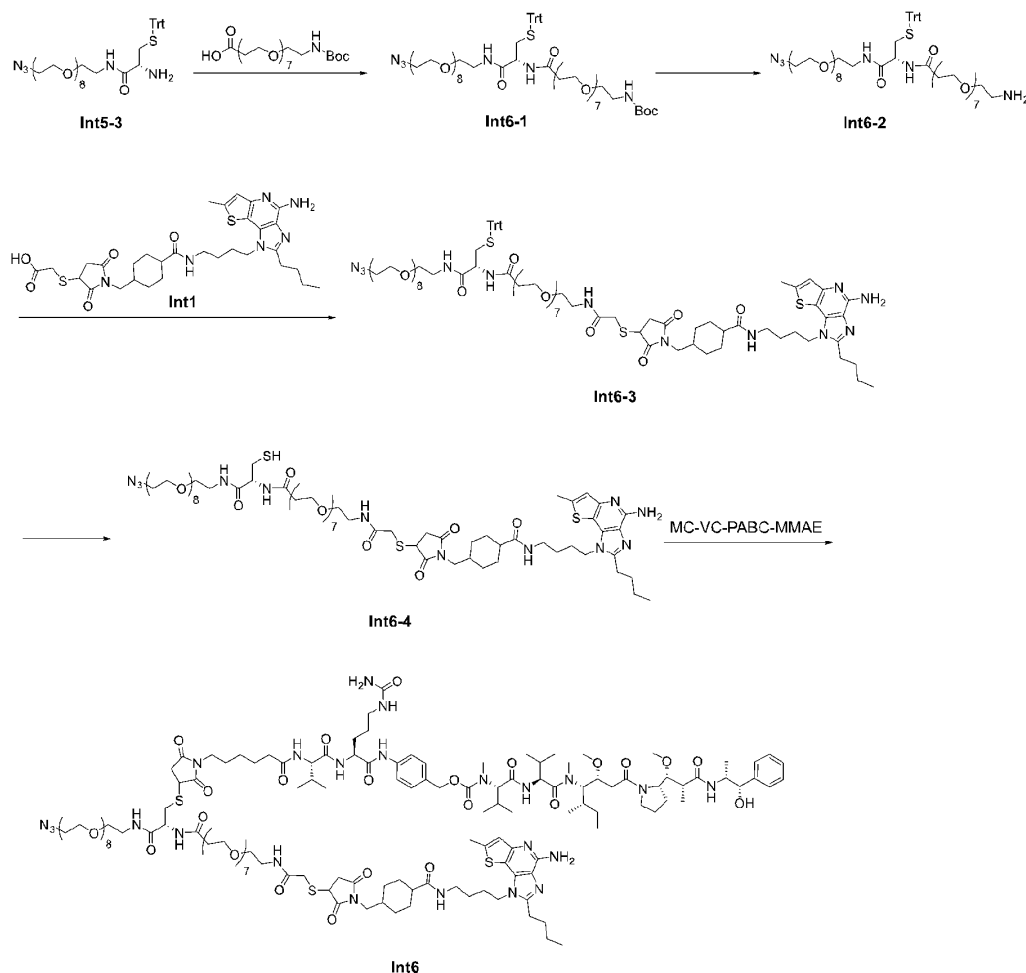
第五步：化合物 Int5 的制备

将化合物 Int5-5 (0.15 g, 0.13 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 加入 MC-VC-PABC-MMAE(0.17 g, 0.13 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(50.3 mg, 0.39 mmol), 室温搅拌 1 小时, 加入氯化铵的水溶液(10 mL), 用二氯甲烷(10 mL)萃取三次, 有机相干燥,

浓缩得到的粗品用制备薄层硅胶板纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(150 mg, 收率: 47.0%)。

MS m/z (ESI): 1241.7 $[M/2+H]^+$ 。

中间体制备例 6: 化合物 Int6 的制备



5

第一步: 化合物 Int6-1 的制备

将化合物 Int5-3 (192 mg, 0.244 mmol) 和 *N*-叔丁氧羰基-七聚乙二醇-羧酸(110.53 mg, 0.222 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 在冰浴下加入 1-羟基苯并三唑(45 mg, 0.333 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(85.9 mg, 0.666 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(63.8 mg, 0.333 mmol), 20°C 搅拌 6 小时, 将反应液滴入水(10 mL)中, 二氯甲烷(10 mL)萃取三次, 有机相干燥, 浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(145 mg, 收率: 51.6%)。

MS m/z (ESI): 1263.6 [M+H]⁺.

第二步：化合物 Int6-2 的制备

将化合物 Int6-1 (145 mg, 0.11 mmol)溶于二氯甲烷(2 mL)中，滴加三氟乙酸(1 mL)，
室温搅拌 2 小时，浓缩，二氯甲烷(10 mL)稀释，有机相用碳酸氢钠溶液洗，干燥，浓缩，
5 得到本步的标题化合物(130 mg，收率：97%)。

MS m/z (ESI): 1163.6 [M+H]⁺.

第三步：化合物 Int6-3 的制备

将化合物 Int1 (65 mg, 0.10 mmol)和化合物 Int6-2 (130 mg, 0.11 mmol)溶于 *N,N*-二甲
基甲酰胺(5 mL)中，在冰浴下加入 1-羟基苯并三唑(20.3 mg, 0.15 mmol)、*N,N*-二异丙基乙
10 胺(38.7 mg, 0.3 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(28.8 mg, 0.15 mmol)，
20°C搅拌 3 小时，将反应液滴入水(10 mL)中，二氯甲烷(10 mL)萃取三次，有机相干燥，
浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v))，得到本步的标题化
合物(110 mg，收率：60.8%)。

MS m/z (ESI): 1787.8 [M+H]⁺.

15 第四步：化合物 Int6-4 的制备

将化合物 Int6-3 (110 mg, 0.06 mmol)溶于二氯甲烷(2 mL)和三乙基硅烷(0.4 mL)中，滴
加三氟乙酸(1 mL)，室温搅拌 1 小时，浓缩，二氯甲烷(20 mL)稀释，有机相用碳酸氢钠溶
液洗，干燥，浓缩，得到本步的标题化合物(95 mg，收率：100%)。

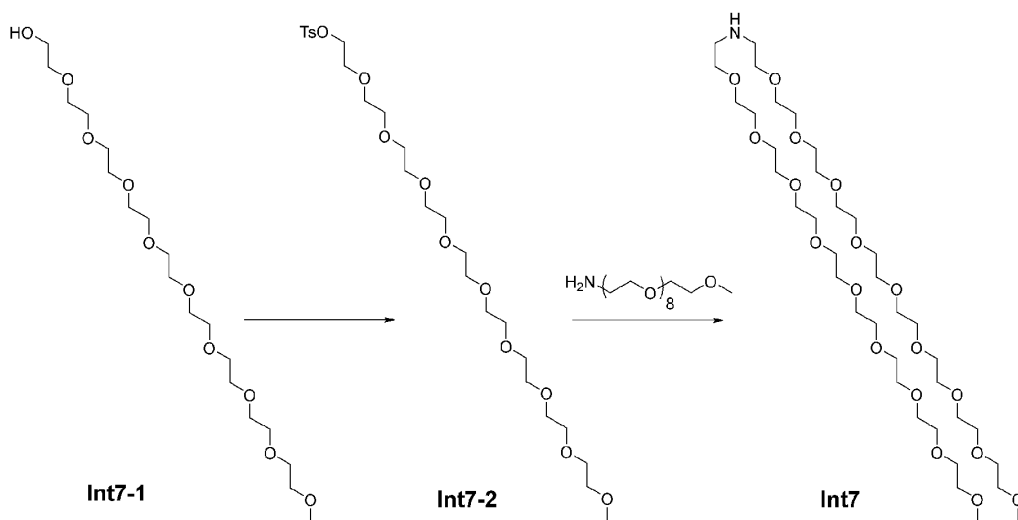
MS m/z (ESI): 1545.7 [M+H]⁺.

20 第五步：化合物 Int6 的制备

将化合物 Int6-4 (95 mg, 0.06 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(25 mL)中，加入
MC-VC-PABC-MMAE (79 mg, 0.06 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(23.2 mg, 0.18 mmol)，室
温搅拌 1 小时，加入氯化铵的水溶液(10 mL)，用二氯甲烷(10 mL)萃取三次，有机相干燥，
浓缩得到的粗品用制备薄层硅胶板纯化(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=8/1(v/v))，得到本步的标
25 题化合物(73 mg，收率：41.4%)。

MS m/z (ESI): 1431.3 [M/2+H]⁺.

中间体制备例 7：化合物 Int7 的制备



第一步：化合物 Int7-2 的制备

将壬己二醇单甲醚(2 g, 4.43 mmol)和对甲苯磺酰氯(1.07 g, 5.32 mmol)加入二氯甲烷(10 mL)中，降温至 0~10°C，加入氢氧化钾(1.26 g, 22.17 mmol)后，25°C反应 12 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析色谱法纯化(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=20/1(v/v))，得到本步的标题化合物(2.5 g，收率：91.9%)。

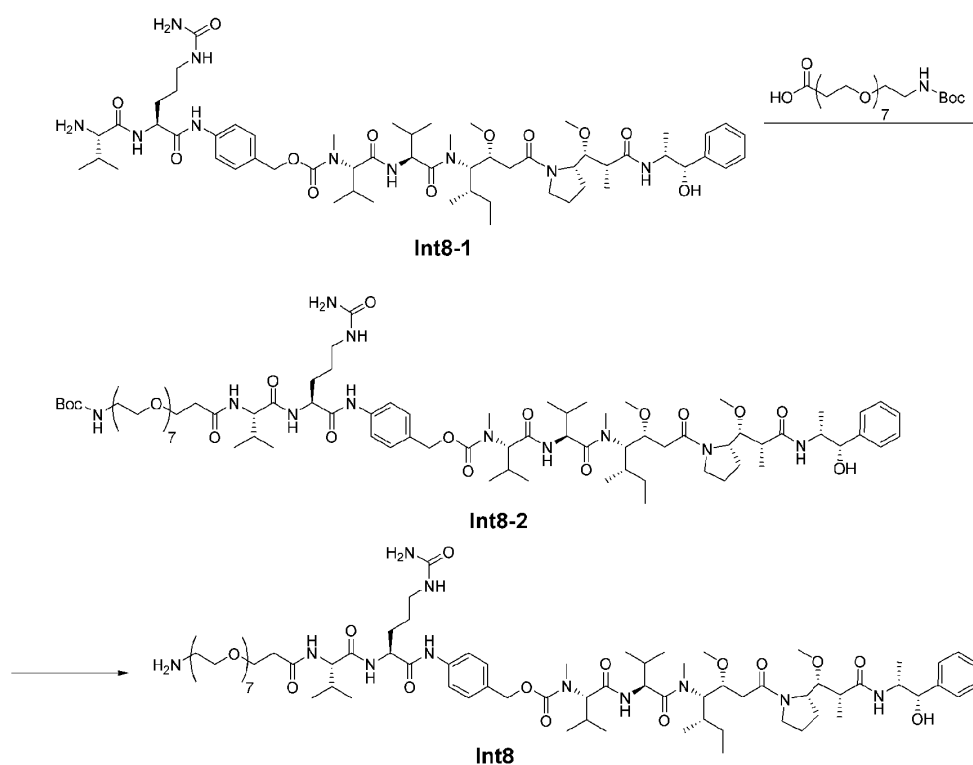
MS m/z (ESI): 583.5 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int7 的制备

依次将化合物 Int7-2 (1.30 g, 2.12 mmol)、2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧杂二十八烷-28-胺(1 g, 2.22 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(828.80 mg, 6.35 mmol, 1.06 mL)和碘化钾(35.48 mg, 211.63 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)中，70°C反应 24 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析色谱法纯化(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=19/1(v/v))，得到本步的标题化合物(1.5 g，收率：71.9%)。

MS m/z (ESI): 838.3 [M+H]⁺。

中间体制备例 8：化合物 Int8 的制备



第一步：化合物 **Int8-2** 的制备

将化合物 **Int8-1** (155 mg, 131.07 μmol)和 *N*-叔丁氧羰基-七聚乙二醇-羧酸(68.65 mg, 131.07 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 向其中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(42.78 mg, 327.68 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(75.53 mg, 196.61 μmol), 25°C反应 5 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=20/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(193 mg, 收率: 87.3%)。

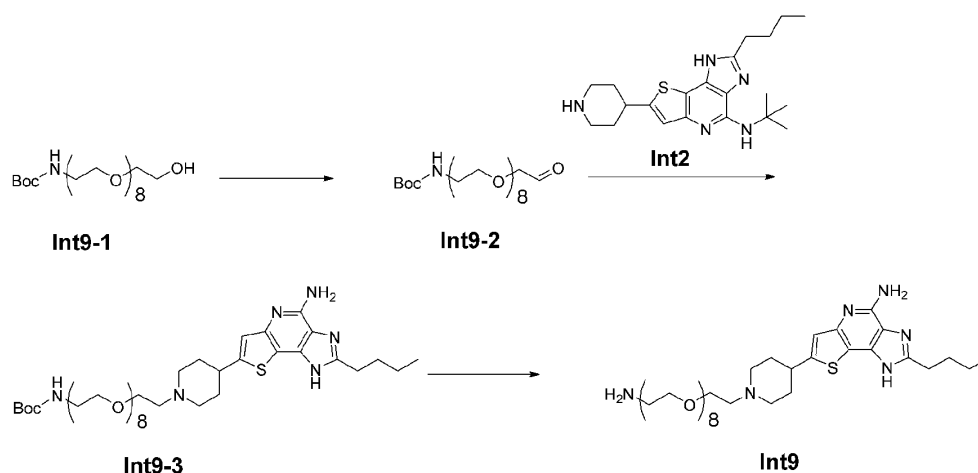
MS m/z (ESI): 1603.0 [M+H]⁺。

第二步：化合物 **Int8** 的制备

氮气保护下依次将化合物 **Int8-2** (165 mg, 97.79 μmol)和溴化锌(139.08 mg, 586.72 μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中, 25°C反应 2 小时。浓缩反应液得到本步标题化合物的粗品, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 1502.9 [M+H]⁺。

中间体制备例 9：化合物 **Int9** 的制备



第一步：化合物 Int9-2 的制备

向化合物 Int9-1 (1 g, 19.5 mmol)的二氯甲烷(20 mL)溶液中加入戴斯-马丁氧化剂(1.23 g, 29.3 mmol), 室温搅拌过夜。二氯甲烷稀释反应液, 依次加入饱和硫代硫酸钠溶液(10 mL)和碳酸氢钠溶液(10 mL), 搅拌 20 分钟, 分液, 二氯甲烷萃取两次, 合并有机相, 用盐水洗涤, 有机相浓缩得到的粗品用硅胶柱层析色谱法纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=12/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(0.9 g, 收率: 90.9%)。

MS m/z (ESI): 512.3 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int9-3 的制备

向化合物 Int2 (0.5 g, 1.29 mmol)的二氯乙烷(10 mL)溶液中依次加入化合物 Int9-2 (0.86 g, 1.68 mmol)、冰醋酸(0.16 g, 2.60 mmol)和氰基硼氢化钠(0.42 g, 6.45 mmol), 室温反应 12 小时。反应液倒入水中, 二氯甲烷萃取, 合并有机相后用盐水洗涤, 有机相浓缩得到的粗品用硅胶柱层析色谱法纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(0.6 g, 收率: 52.6%)。

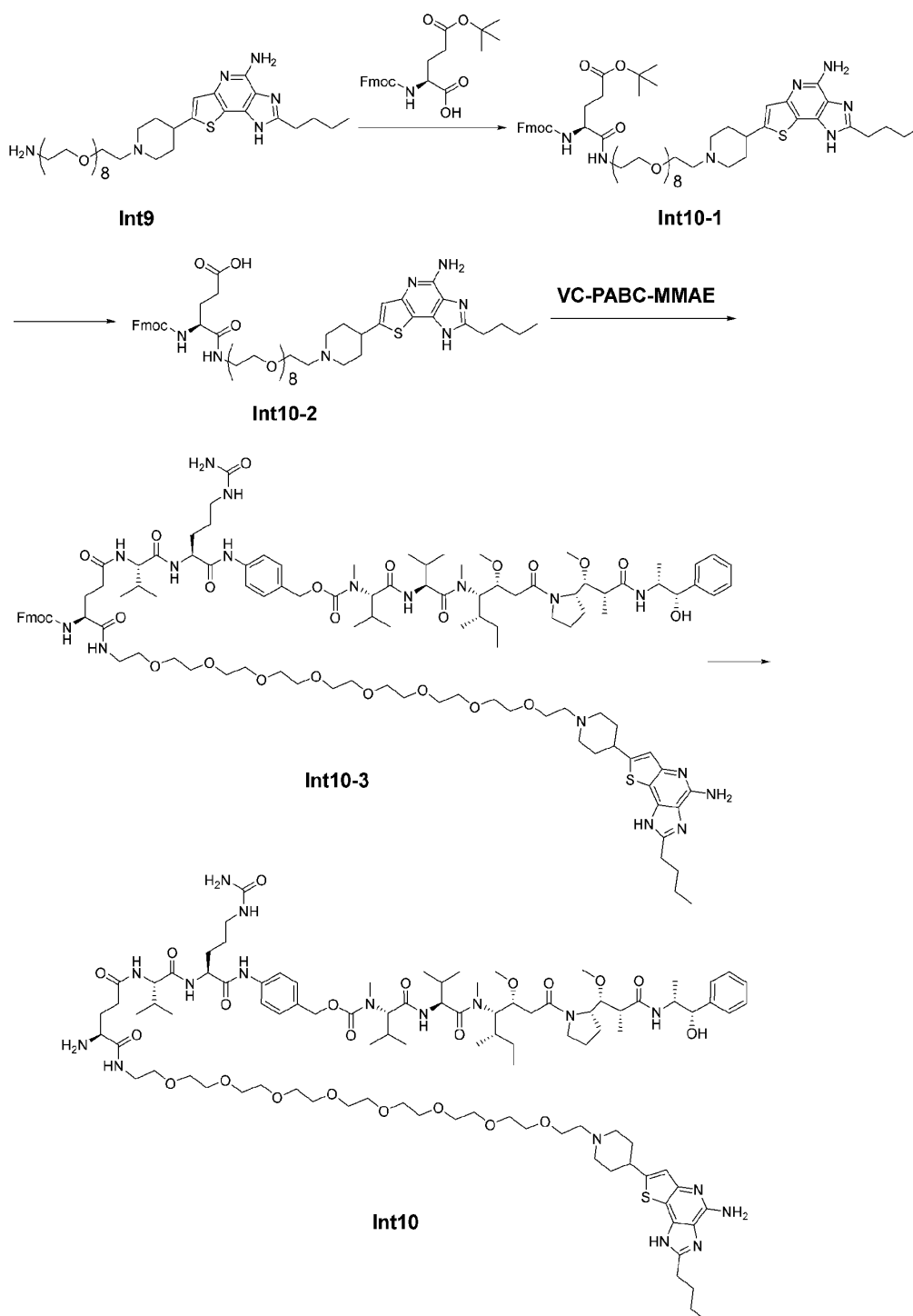
MS m/z (ESI): 825.5 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int9 的制备

向化合物 Int9-3 (0.6 g, 0.68 mmol)的 1,4-二氧六环(4 mL)溶液中加入氯化氢的 1,4-二氧六环溶液(1.7 mL, 4 M, 6.8 mmol), 70°C反应 12 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=15%-25%), 得到本步的标题化合物(0.3 g, 收率: 61.2%)。

MS m/z (ESI): 725.4 [M+H]⁺。

中间体制备例 10: 化合物 Int10 的制备



第一步: 化合物 Int10-1 的制备

依次将化合物 Int9 (186 mg, 243.74 μmol)、(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(131 mg, 292.49 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(66.32 mg, 487.48 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(136.58 mg, 341.24 μmol)加入无水 N,N-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(270 mg, 收率: 92.9%)。

MS m/z (ESI): 1132.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步: 化合物 Int10-2 的制备

将化合物 Int10-1 (340 mg, 285.23 μmol)和三氟乙酸(2 mL)加入二氯甲烷(6 mL)中, 25°C反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析色谱法纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=4/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(250mg, 收率: 77.4%)。

MS m/z (ESI): 1076.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步: 化合物 Int10-3 的制备

依次将化合物 Int10-2 (150 mg, 132.40 μmol)、VC-PABC-MMAE (156.57 mg, 132.40 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(25.93 mg, 198.60 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(61.02 mg, 158.88 μmol)加入无水 N,N-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(250 mg, 收率: 82.2%)。

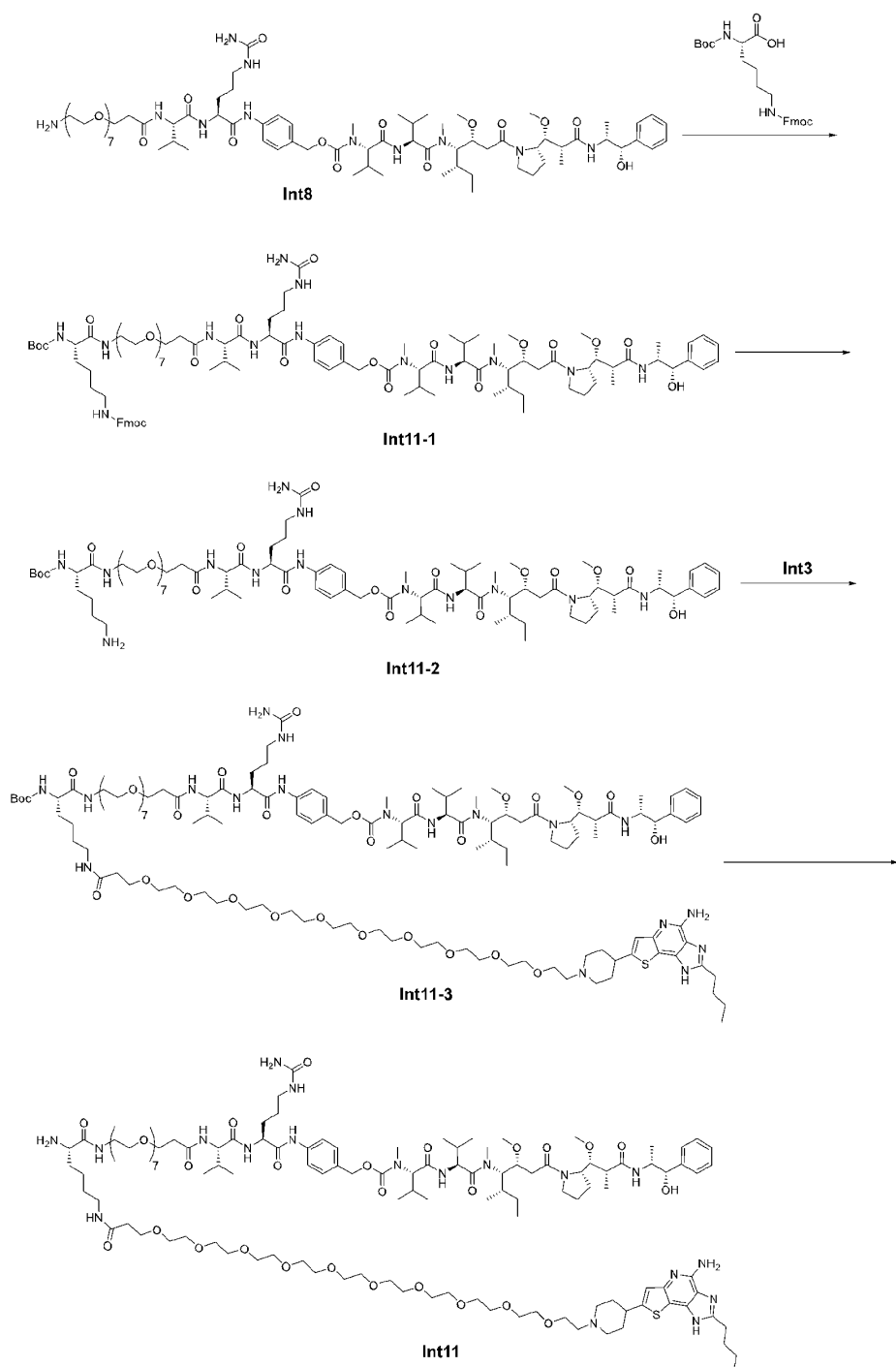
MS m/z (ESI): 1091.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第四步: 化合物 Int10 的制备

将化合物 Int10-3 (250 mg, 8.86 μmol)和哌啶(37.45 mg, 435.44 μmol)加入 N,N-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(185 mg, 收率: 82.4%)。

MS m/z (ESI): 980.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 11: 化合物 Int11 的制备



第一步：化合物 Int11-1 的制备

将化合物 Int8 (114 mg, 72.06 μmol)和 *N*⁶-(((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)-*N*²-(叔丁氧基羰基)-*L*-赖氨酸(37.43 mg, 72.06 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 向其中加入

N,N-二异丙基乙胺(23.52 mg, 180.16 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(41.53 mg, 108.09 μmol), 25°C下反应 5 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=50/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(110 mg, 收率: 70.4%)。

5 MS m/z (ESI): 1953.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步: 化合物 Int11-2 的制备

将化合物 Int11-1 (100 mg, 46.07 μmol)溶于二氯甲烷(3 mL)中, 加入二乙胺(67.40 mg, 921.47 μmol), 20°C下反应 10 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=20/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(40 mg, 收率: 42.8%)。

10 MS m/z (ESI): 1731.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步: 化合物 Int11-3 的制备

将化合物 Int11-2 (100 mg, 54.88 μmol)和化合物 Int3 (46.64 mg, 54.88 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 向其中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(10.75 mg, 82.31 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(25.29 mg, 65.85 μmol), 25°C下反应 5 小

15 时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(60 mg, 收率: 40.7%)。

MS m/z (ESI): 1277.8 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

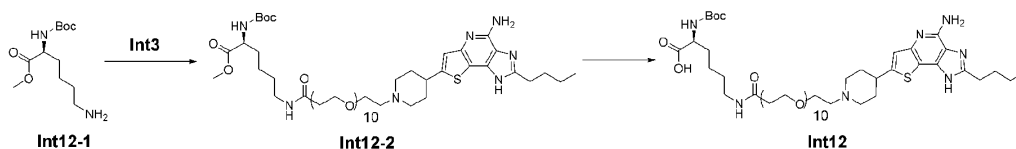
第四步: 化合物 Int11 的制备

氮气保护下依次将化合物 Int11-3 (45 mg, 7.04 μmol)和溴化锌(6.68 mg, 28.18 μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中, 25°C下反应 2 小时。浓缩反应液得到本步标题化合物的粗品,

20 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 1227.8 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 12: 化合物 Int12 的制备



第一步: 化合物 Int12-2 的制备

25 将化合物 Int3 (150 mg, 169.23 μmol)和 *N*-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯盐酸盐(46.37 mg, 169.23 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 然后依次加入 *N,N*-二异丙基乙胺(44.18 mg, 338.46 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(78.01 mg,

203.08 μmol), 25°C 反应 2 小时。减压浓缩反应液得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=6/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(160mg, 收率: 95.8%)。

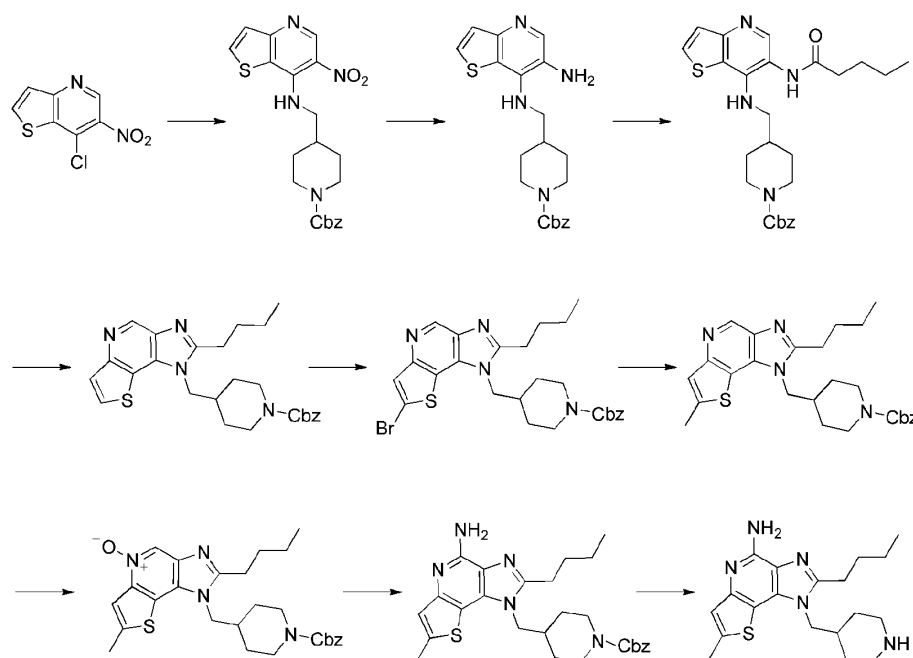
MS m/z (ESI): 1084.6 [M+H]⁺.

第二步：化合物 Int12 的制备

5 将化合物 Int12-2 (185 mg, 162.08 μmol)溶于四氢呋喃(1 mL)、甲醇(1 mL)和水(1 mL)的混合溶剂中,加入一水合氢氧化锂(28.63 mg, 648.31 μmol), 25°C反应 3 小时。反应液浓缩,加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL),所得溶液用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=25%-35%),得到本步的标题化合物(160 mg, 收率: 87.6%)。

MS m/z (ESI): 1070.6 [M+H]⁺.

10 中间体制备例 13: 化合物 Int13 的制备



第一步：4-(((6-硝基嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯的制备

将 7-氯-6-硝基嘧啶并[3,2-*b*]吡啶(1.0 g, 4.67 mmol)和 4-(氨甲基)四氢-1(2*H*)-吡啶甲酸苄酯(1.38 g, 5.60 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL)中, 冰水浴降温, 0°C 下向反应液
15 中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(1.08 g, 8.4 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 6 小时。将反应液倒入水(100 mL)中, 并用乙酸乙酯(50 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(50 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物(1.91 g, 收率: 96.3%)。

MS m/z (ESI): 427.0 [M+H]⁺.

第二步：4-(((6-氨基嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯的制备

将 4-(((6-硝基嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯(1.91 g, 4.47 mmol)完全溶于无水乙醇(30 mL)中，加入水(5 mL)。冰水浴降温，0°C下向反应液中加入保险粉(0.8 g, 45 mmol)，缓慢升温至室温搅拌 4 小时。将反应液倒入水(100 mL)中，搅拌析出固体，过滤，并用水洗涤固体，干燥后得到本步的标题化合物(1.5 g, 收率：84.2%)。

MS *m/z* (ESI): 397.1 [M+H]⁺。

第三步：4-(((6-戊酰胺基嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯的制备

将 4-(((6-氨基嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯(1.5 g, 3.78 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(0.97 g, 7.57 mmol)溶于四氢呋喃(20 mL)中，冰水浴降温，0°C下向反应液中缓慢滴加正戊酰氯(0.68 g, 5.67 mmol)，缓慢升温至室温搅拌 4 小时。向反应体系中加入水(10 mL)淬灭反应，将体系浓缩尽可能除去四氢呋喃，向所得剩余物中加入水(50 mL)，并用乙酸乙酯(30 mL)萃取三次，合并有机相，饱和食盐水(50 mL)洗涤三次，有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩，得到本步的标题化合物(1.63 g, 收率：90%)。

MS *m/z* (ESI): 481.1 [M+H]⁺。

15 第四步：4-((2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯的制备

将 4-(((6-戊酰胺基嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)氨基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯(1.63 g, 3.38 mmol)和邻氯苯甲酸(260 mg, 1.7 mmol)加入到甲苯(50 mL)中，升温至溶剂回流并分水反应搅拌 4 小时。将反应体系冷却至室温后，浓缩除去溶剂，所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂：100%乙酸乙酯)，得到本步的标题化合物(1.39 g, 收率：89.3%)。

MS *m/z* (ESI): 463.1 [M+H]⁺。

第五步：4-((7-溴-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯的制备

将 4-((2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]嘧吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯(1.1 g, 2.37 mmol)完全溶解于 *N,N*-二甲基甲酰胺(9 mL)和冰醋酸(3 mL)的混合溶剂中，冰水浴降温，0°C下向反应液中缓慢分批加入 *N*-溴代丁二酰亚胺(0.63 g, 3.55 mmol)，缓慢升温至室温搅拌 24 小时。将反应液倒入水(100 mL)中，并用乙酸乙酯(30 mL)萃取三次，合并有机相，饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)洗涤三次，饱和食盐水(50 mL)洗涤三次，有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩，所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂：乙酸乙酯/石油醚=1/1(v/v))，得到本步的标题化合物(0.87 g, 收率：68.5%)。

MS m/z (ESI): 541.1 [M+H]⁺。

第六步：4-((2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯的制备

将 4-((7-溴-2-丁基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯
5 (0.87 g, 1.61 mmol)、三甲基硼氧六环(50 wt.%四氢呋喃溶液, 2.0 g, 8.05 mmol)、碳酸钾(0.67 g, 4.83 mmol)和 1,1'-双二苯基膦二茂铁二氯化钯(0.23 g, 0.32 mmol)依次加入 1,4-二氧六环(10 mL)和水(1 mL)的混合溶剂中, 反应体系经氮气鼓泡 5 分钟后, 于微波下升温至 100°C 搅拌 2 小时。将反应体系冷却至室温后, 浓缩除去溶剂, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 100% 乙酸乙酯), 得到本步的标题化合物(0.54 g, 收率: 71.0%)。

10 MS m/z (ESI): 477.1 [M+H]⁺。

第七步：1-((1-((苄氧基)羰基)哌啶)-4-基)甲基)-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-5-氧化物的制备

将 4-((2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯
15 (0.5 g, 1.04 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)中, 冰水浴降温, 0°C下向反应液中缓慢分批加入间氯过氧苯甲酸(0.42 g, 2.05 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 4 小时。将反应液倒入水(100 mL)中, 并用二氯甲烷(20 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和碳酸氢钠水溶液(30 mL)洗涤两次, 饱和亚硫酸钠水溶液(30 mL)洗涤两次, 饱和食盐水(30 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物(0.52g, 收率: 100%)。

MS m/z (ESI): 493.2 [M+H]⁺。

20 第八步：4-((4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯的制备

将 1-((1-((苄氧基)羰基)哌啶)-4-基)甲基)-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-5-氧化物(0.52 g, 1.04 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)和氨水(5 mL)的混合溶剂中, 冰水浴降温, 0°C下向反应液中缓慢分批加入对甲苯磺酰氯(0.4 g, 2.09 mmol), 缓慢升温至室温
25 搅拌 12 小时。向反应体系中加入水(100 mL), 二氯甲烷(20 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(30 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 乙酸乙酯/甲醇=20/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(230 mg, 收率: 45%)。

MS m/z (ESI): 492.2 [M+H]⁺。

30 第九步：2-丁基-7-甲基-1-(哌啶-4-基甲基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-4-胺(Int13)的制备

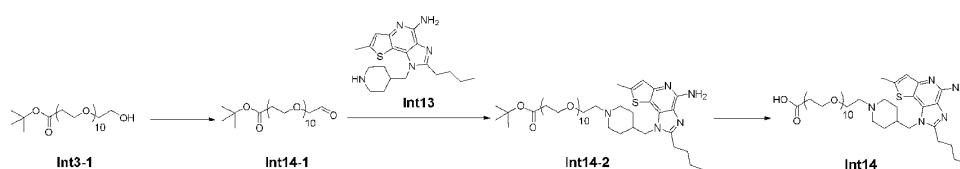
将 4-((4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)甲基)哌啶-1-羧酸苄酯(150 mg, 0.31 mmol)加入三氟醋酸(6 mL)中, 升温至 50°C 搅拌 3 小时。浓缩除去溶剂, 依次向剩余物中加入二氯甲烷和甲醇的混合溶剂(体积比为 4:1, 10 mL)、饱和碳酸氢钠水溶液(10 mL), 室温搅拌 5 分钟后, 浓缩除去溶剂, 所得剩余物经制备高效液相色谱

5 制备纯化, 得到本步的标题化合物(22 mg, 收率: 19.9%)。

MS *m/z* (ESI): 358.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.24 (s, 1H), 6.99-6.98 (m, 1H), 6.11 (br, 2H), 4.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.26-3.23 (m, 2H), 2.88-2.76 (m, 4H), 2.57-2.55 (m, 3H), 2.19-2.12 (m, 1H), 1.87-1.76 (m, 2H), 1.68-1.62 (m, 2H), 1.56-1.39 (m, 4H), 0.96 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H)。

10 中间体制备例 14: 化合物 Int14 的制备



第一步: 化合物 Int14-1 的制备

将化合物 Int3-1 (1 g, 1.7 mmol)和戴斯马丁氧化剂(1.08 g, 2.56 mmol)加入二氯甲烷(15 mL)中, 25°C 反应 10 小时。向反应液加入饱和硫代硫酸钠溶液(5 mL)和饱和碳酸氢钠水溶液(10 mL), 搅拌至澄清, 再加入二氯甲烷萃取三次, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(900 mg, 收率: 91.3%)。

15

MS *m/z* (ESI): 585.5 [M+H]⁺。

第二步: 化合物 Int14-2 的制备

将化合物 Int14-1 (472.48 mg, 799.99 μmol)、化合物 Int13 (191 mg, 533.33 μmol)、氰基硼氢化钠(99.08 mg, 1576.7 μmol)和冰乙酸(51.72 mg, 853.33 μmol)依次加入 1,2-二氯乙烷(6 mL)和甲醇 (3 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品溶于甲醇(3 mL)中, 用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=15%-25%), 得到本步的标题化合物(250 mg, 收率: 50.6%)。

20

25 MS *m/z* (ESI): 926.5 [M+H]⁺。

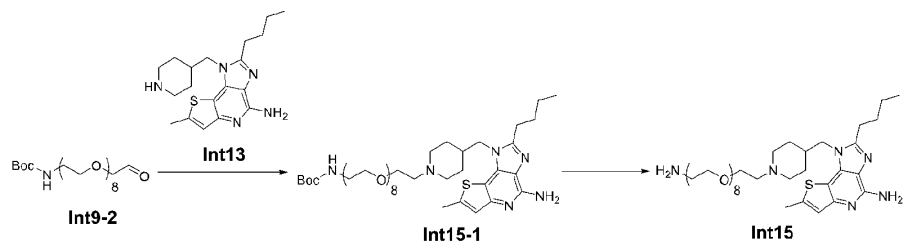
第三步: 化合物 Int14 的制备

将化合物 Int14-2 (250 mg, 269.83 μmol)溶于盐酸二氧六环溶液(6 mL, 4M)中, 25°C 反

应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(203 mg, 收率: 86.5%)。

MS m/z (ESI): 870.4 [M+H]⁺。

中间体制备例 15: 化合物 Int15 的制备



5 第一步: 化合物 Int15-1 的制备

将化合物 Int9-2 (390.27 mg, 794.96 μmol)、化合物 Int13 (200 mg, 529.98 μmol)、氰基硼氢化钠(159.79 mg, 2.52 mmol)和冰乙酸(7.88 mg, 1.51 mmol)依次加入 1,2-二氯乙烷(6 mL)和甲醇(3 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品溶于甲醇(3 mL)中, 用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物 (330 mg, 收率: 76.8%)。

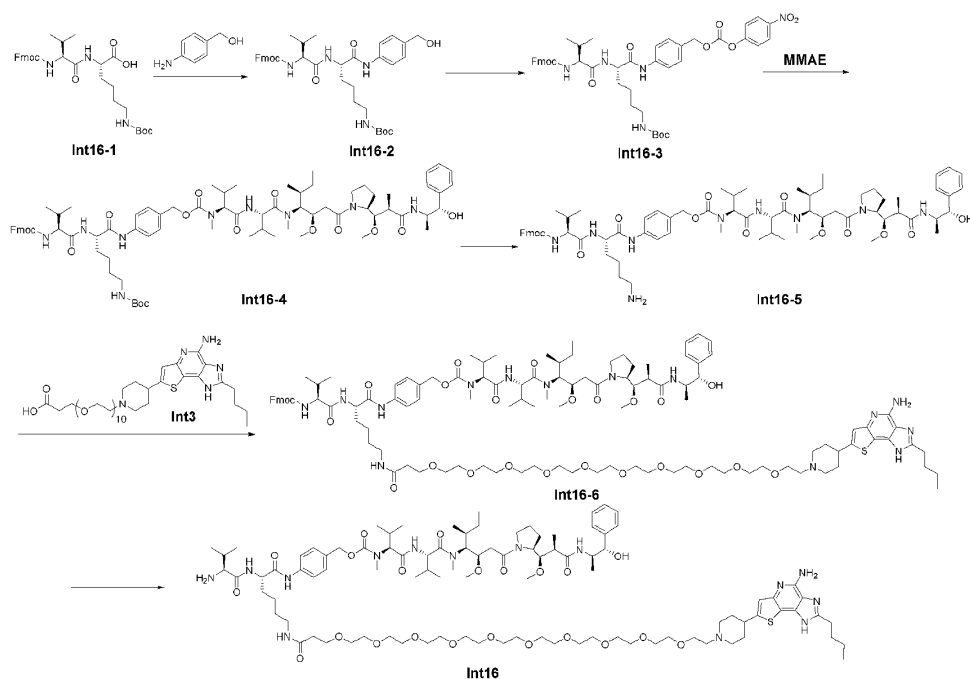
MS m/z (ESI): 853.5 [M+H]⁺。

第二步: 化合物 Int15 的制备

将化合物 Int15-1 (330 mg, 386.82 μmol)溶于盐酸二氧六环溶液(6 mL, 4M)中, 25°C 下反应 5 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(250 mg, 收率: 86.2%)。

15 MS m/z (ESI): 753.4 [M+H]⁺。

中间体制备例 16: 化合物 Int16 的制备



第一步：化合物 Int16-2 的制备

依次将化合物 Int16-1 (270 mg, 428.06 μ mol)、对氨基苯醇(106.50 mg, 856.13 μ mol)和 2-乙氧基-1-乙氧碳酸基-1,2-二氢喹啉(213.60 mg, 856.13 μ mol)加入无水甲醇(1 mL)和无水二氯甲烷(3 mL)中，室温搅拌过夜。反应液浓缩得到的剩余物用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(130 mg, 收率: 40.62%)。

MS m/z (ESI): 673.3 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int16-3 的制备

依次将化合物 Int16-2 (125 mg, 167.21 μ mol)、二(对硝基苯)碳酸酯(77.07 mg, 250.81 μ mol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(54.47 mg, 418.02 μ mol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，室温搅拌 5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=65%-75%), 得到本步的标题化合物(95 mg, 收率: 64.42%)。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.14 (br, 1H), 8.31 (d, *J* = 8Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 8Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 4Hz, 2H), 7.76-7.72 (m, 2H), 7.65 (d, *J* = 8Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8Hz, 2H), 7.48-7.39 (m, 5H), 7.32 (t, *J* = 8Hz, 2H), 6.76 (br, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.38-4.22 (m, 4H), 3.92 (t, *J* = 8Hz, 1H), 2.88 (d, *J* = 4Hz, 2H), 2.01-1.96 (m, 1H), 1.68-1.59 (m, 2H), 1.40-1.24 (m, 15H), 0.89-0.85 (m, 6H)

MS m/z (ESI): 838.3 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int16-4 的制备

依次将一甲基溴瑞他汀 E (77 mg, 101.88 μmol)、化合物 Int16-3 (94.85 mg, 101.88 μmol)、1-羟基苯并三唑(2.09 mg, 15.28 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(26.55 mg, 203.77 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 35°C 搅拌 5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=50%-60%), 得到本步的标题化合物(65 mg, 收率: 42.78%)。

MS m/z (ESI): 1416.8 $[M+H]^+$ 。

第四步：化合物 Int16-5 的制备

将化合物 Int16-4 (30 mg, 19.06 μmol)和无水溴化锌(21.68 mg, 95.29 μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中, 35°C 搅拌 2 小时。反应液用乙酸乙酯(10 mL)稀释, 饱和食盐水(3 mL*2)洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩得到本步的标题化合物(31 mg, 收率: 98.84%)。

MS m/z (ESI): 1316.8 $[M+H]^+$ 。

第五步：化合物 Int16-6 的制备

依次将化合物 Int3 (20 mg, 21.38 μmol)、化合物 Int16-5 (31.0 mg, 21.38 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(5.57 mg, 42.75 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(9.85 mg, 25.65 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温搅拌 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=40%-50%), 得到本步的标题化合物(29 mg, 收率: 57.04%)。

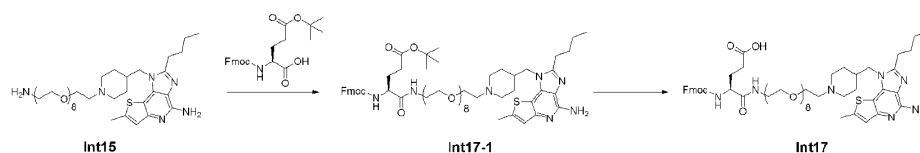
MS m/z (ESI): 1070.6 $[M/2+H]^+$ 。

第六步：化合物 Int16 的制备

将化合物 Int16-6 (29 mg, 12.19 μmol)和哌啶(2.10 mg, 24.38 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温搅拌 2 小时。反应液浓缩后, 加入甲基叔丁基醚(5 mL), 超声 5 分钟后, 静置, 过滤, 固体干燥得到本步的标题化合物(22 mg, 收率: 94.06%)。

MS m/z (ESI): 959.6 $[M/2+H]^+$ 。

中间体制备例 17: 化合物 Int17 的制备



第一步：化合物 Int17-1 的制备

- 依次将(*S*)-2-(((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(85.29 mg, 200.46 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(45.2 mg, 346.26 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(103.94 mg, 270.22 μmol)和化合物 Int15 (150 mg, 182.24 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(170 mg, 收率: 79.8%)。

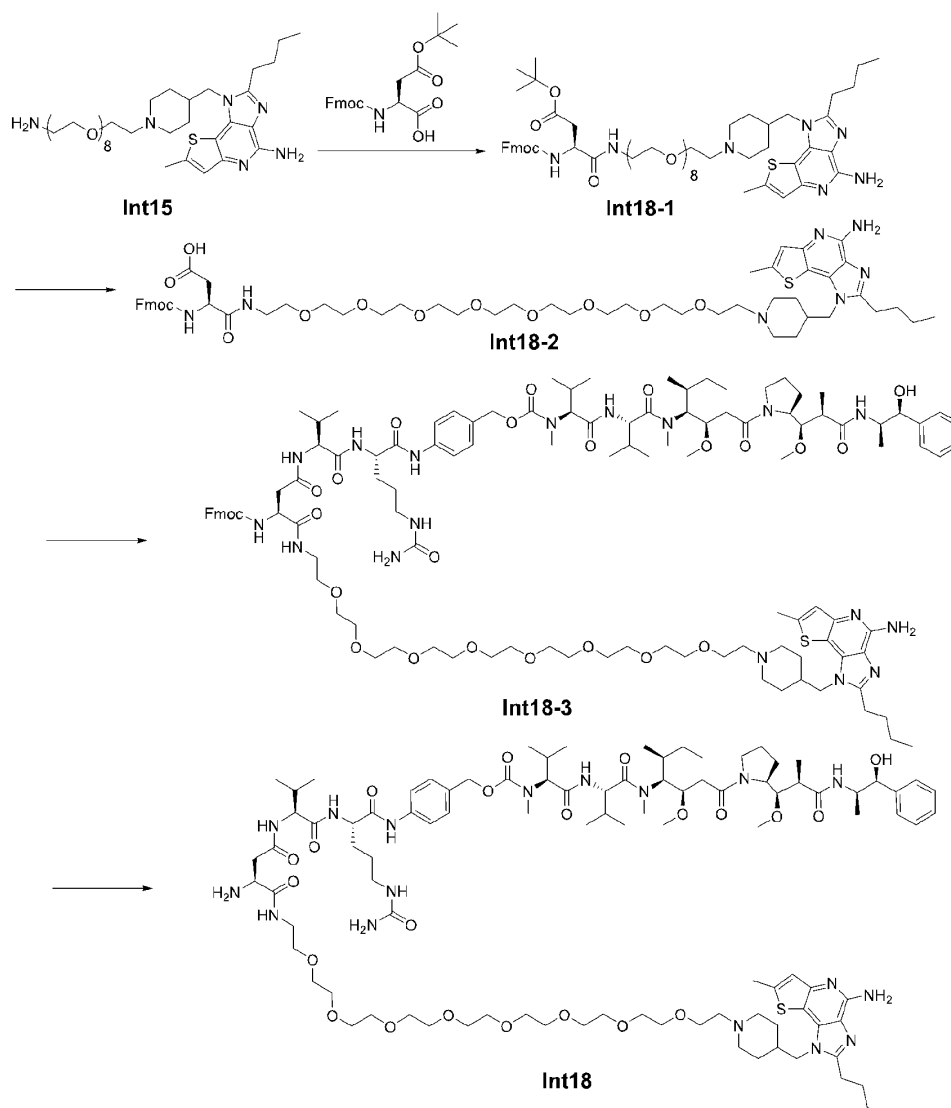
MS m/z (ESI): 1160.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步: 化合物 Int17 的制备

将化合物 Int17-1 (170 mg, 138.15 μmol)溶于无水二氯甲烷(6 mL)和三氟乙酸(3 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(133 mg, 收率: 86.3%)。

- 10 MS m/z (ESI): 1104.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 18: 化合物 Int18 的制备



第一步：化合物 Int18-1 的制备

依次将化合物 Int15 (60 mg, 79.78 μmol)、(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基基)-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酸(32.78 mg, 79.78 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(25.73 mg, 199.46 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(36.38 mg, 95.73 μmol)加入 N,N-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温搅拌 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-40%), 得到本步的标题化合物(52 mg, 收率: 56.94%)。

MS m/z (ESI): 1146.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 Int18-2 的制备

依次将化合物 Int18-1 (50 mg, 43.60 μmol)和 48%氢溴酸水溶液(0.5 mL)加入乙腈(1 mL)中, 室温搅拌 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-40%), 得到本步的标题化合物(52 mg, 收率: 56.94%)。

mL)中, 室温搅拌 3 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(35 mg, 收率: 73.42%)。

MS m/z (ESI): 1090.6 [M+H]⁺。

第三步: 化合物 Int18-3 的制备

依次将化合物 Int18-2 (35 mg, 32.09 mmol)、VC-PABC-MMAE (36.04 mg, 32.09
5 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(10.34 mg, 80.22 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲
基脲六氟磷酸酯(14.63 mg, 38.50 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温搅拌 2 小时。
反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=40%-45%), 得到本步的标题
化合物(63 mg, 收率: 89.31%)。

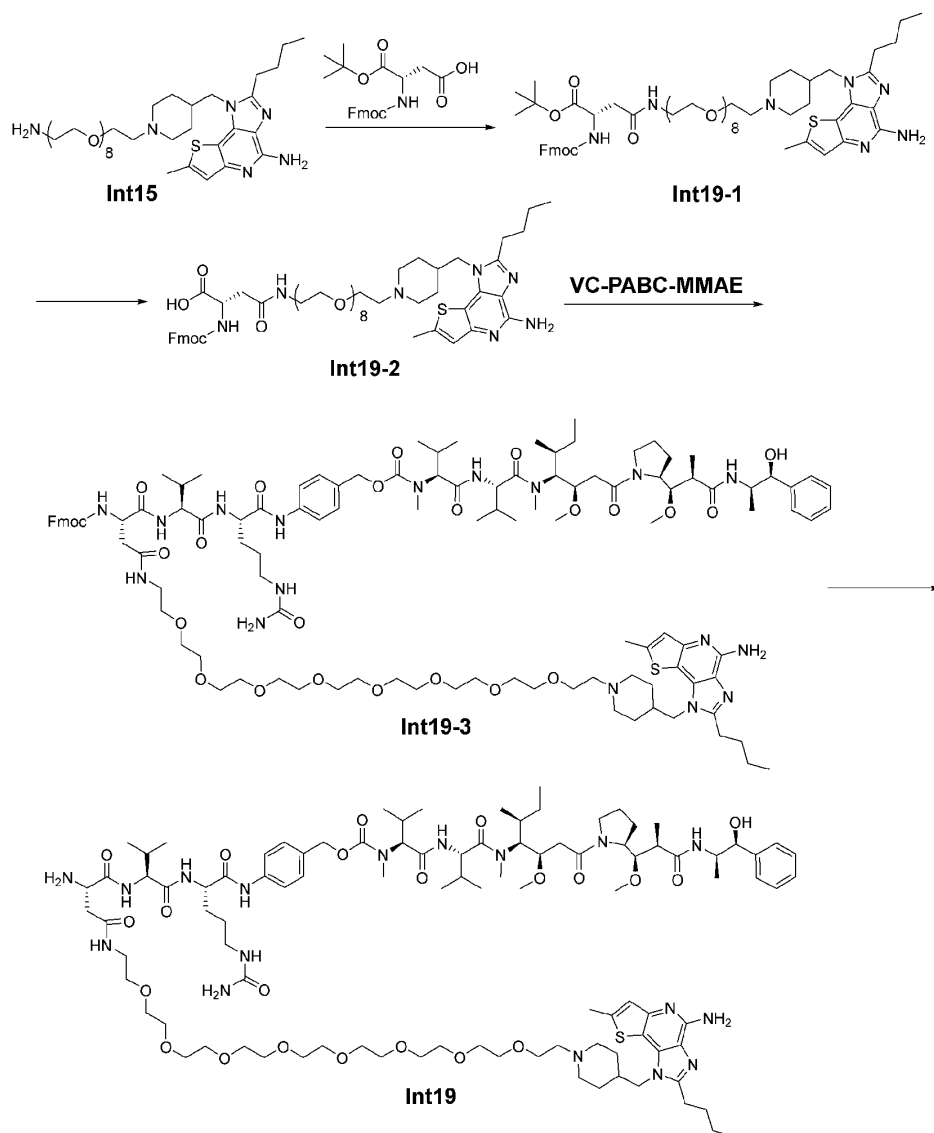
MS m/z (ESI): 1098.1 [M/2+H]⁺。

10 第四步: 化合物 Int18 的制备

将化合物 Int18-3 (63 mg, 28.7 μmol)和哌啶(4.82 mg, 57.40 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰
胺(1 mL)中, 室温搅拌 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度:
A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(28 mg, 收率: 49.45%)。

MS m/z (ESI): 1973.2 [M+H]⁺。

15 中间体制备例 19: 化合物 Int19 的制备



第一步：化合物 Int19-1 的制备

依次将(*S*)-3-(((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酸(35.52 mg, 86.33 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(14.16 mg, 109.56 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(38.88 mg, 102.25 μmol)和化合物 Int15 (65 mg, 86.33 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(50 mg, 收率: 53.2%)。

MS m/z (ESI): 1146.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 Int19-2 的制备

将化合物 Int19-1 (50 mg, 43.18 μmol)溶于无水二氯甲烷(3 mL)和三氟乙酸(1.5 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 4 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(45 mg, 收率: 89.2%)。

MS m/z (ESI): 1090.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

5 第三步: 化合物 Int19-3 的制备

依次将化合物 Int19-2 (41.53 mg, 38.09 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(6.82 mg, 52.37 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(18.07 mg, 47.05 μmol)和 VC-PBAC-MMAE (42.8 mg, 38.09 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-25%), 得到本步的标题化合物(52 mg, 收率: 65.4%)。

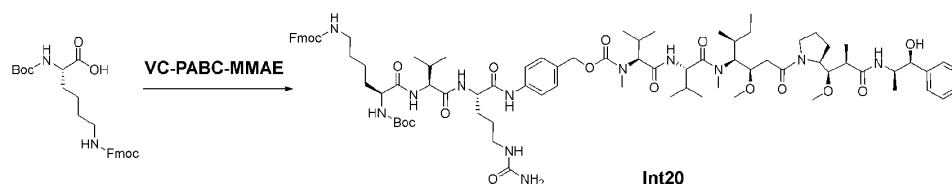
MS m/z (ESI): 1098.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第四步: 化合物 Int19 的制备

将化合物 Int19-3 (52 mg, 23.69 μmol)和哌啶(6.52 mg, 76.54 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(31 mg, 收率: 82.9%)。

MS m/z (ESI): 658.4 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$ 。

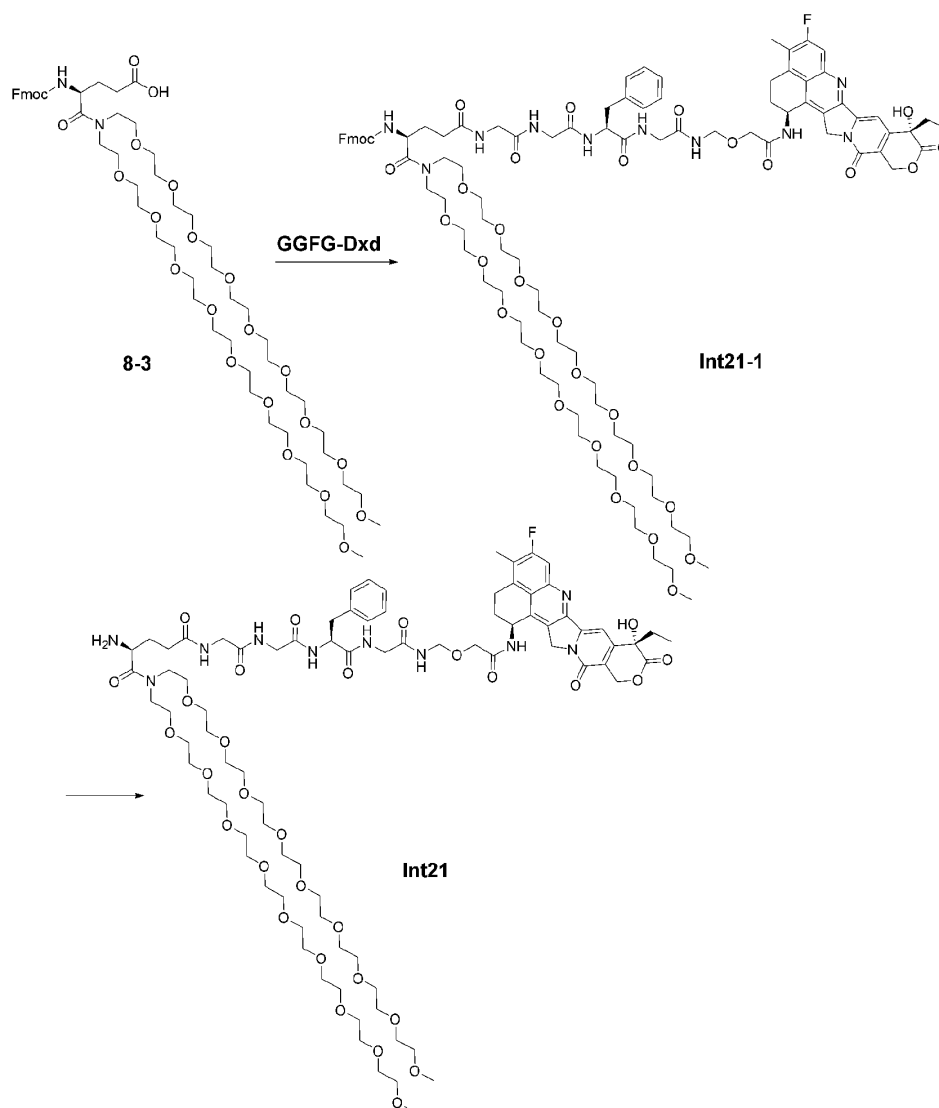
中间体制备例 20: 化合物 Int20 的制备



依次将 VC-PABC-MMAE (150 mg, 133.52 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(22.43 mg, 173.58 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(66 mg, 173.58 μmol)和 *N*⁶-(((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)-*N*²-(叔丁氧基羰基)-*L*-赖氨酸(62.56 mg, 133.52 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=60%-70%), 得到本步的标题化合物(170 mg, 收率: 85.1%)。

MS m/z (ESI): 1573.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

25 中间体制备例 21: 化合物 Int21 的制备



第一步：化合物 Int21-1 的制备

依次将化合物 8-3 (86 mg, 72.3 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(12.15 mg, 94 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(35.74 mg, 94 μmol)和 GGFG-Dxd (60.8 mg, 72.3 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(60 mg, 收率: 43.4%)。

MS m/z (ESI): 1006.5 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

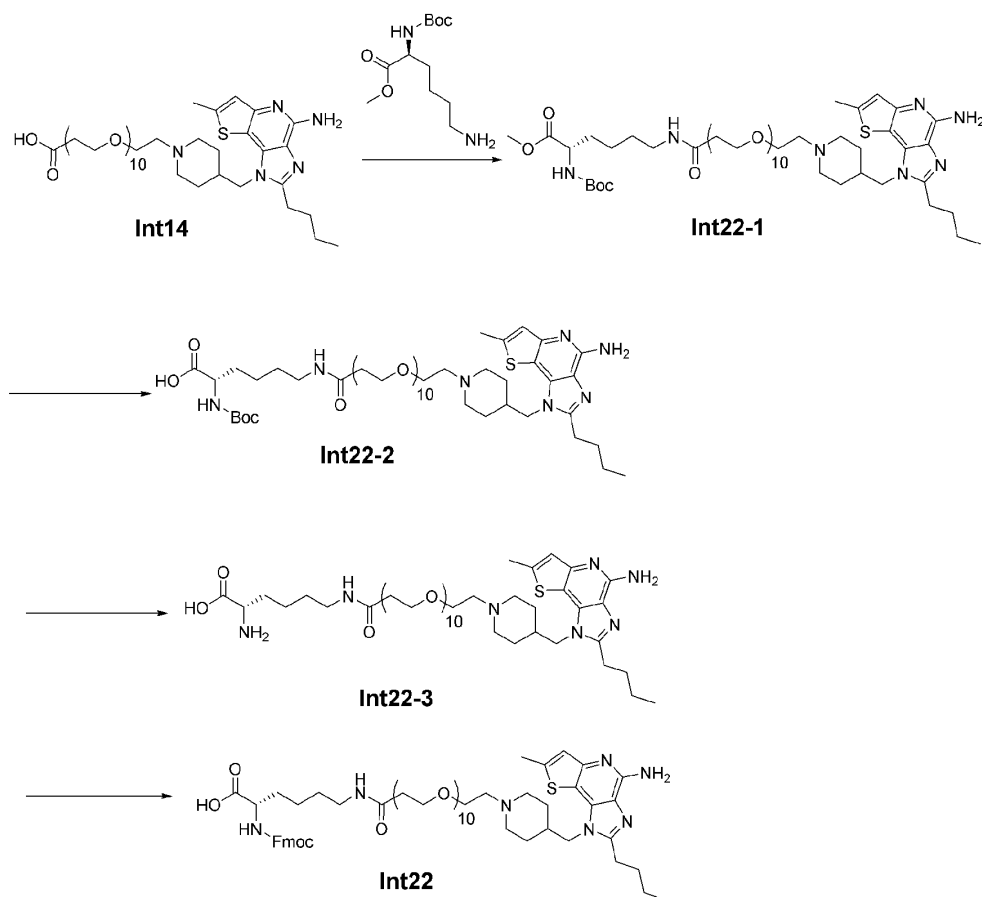
第二步：化合物 Int21 的制备

将化合物 Int21-1 (60 mg, 29.82 μmol)和二乙胺(10.46 mg, 141.64 μmol)加入 *N,N*-二甲

基甲酰胺(2mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=15%-25%), 得到本步的标题化合物(45 mg, 收率: 88.8%)。

MS m/z (ESI): 1789.9 [M+H]⁺。

中间体制备例 22: 化合物 Int22 的制备



5

第一步: 化合物 Int22-1 的制备

依次将化合物 Int14 (280 mg, 321.84 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(68.42 mg, 524.08 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(114.8 mg, 350 μmol)和 *N*-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯盐酸盐(92 mg, 350 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(300 mg, 收率: 83.8%)。

MS m/z (ESI): 1112.6 [M+H]⁺。

第二步: 化合物 Int22-2 的制备

将化合物 Int22-1 (300 mg, 269.68 μmol)溶于甲醇(6 mL)和水(2 mL)的混合溶剂中, 然后加入氢氧化锂(56.58 mg, 1348.4 μmol), 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(280 mg, 收率: 94.5%)。

MS m/z (ESI): 1098.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

5 第三步: 化合物 Int22-3 的制备

将化合物 Int22-2 (280 mg, 254.93 μmol)溶于无水二氯甲烷(6 mL)和三氟乙酸(3 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(180 mg, 收率: 74.5%)。

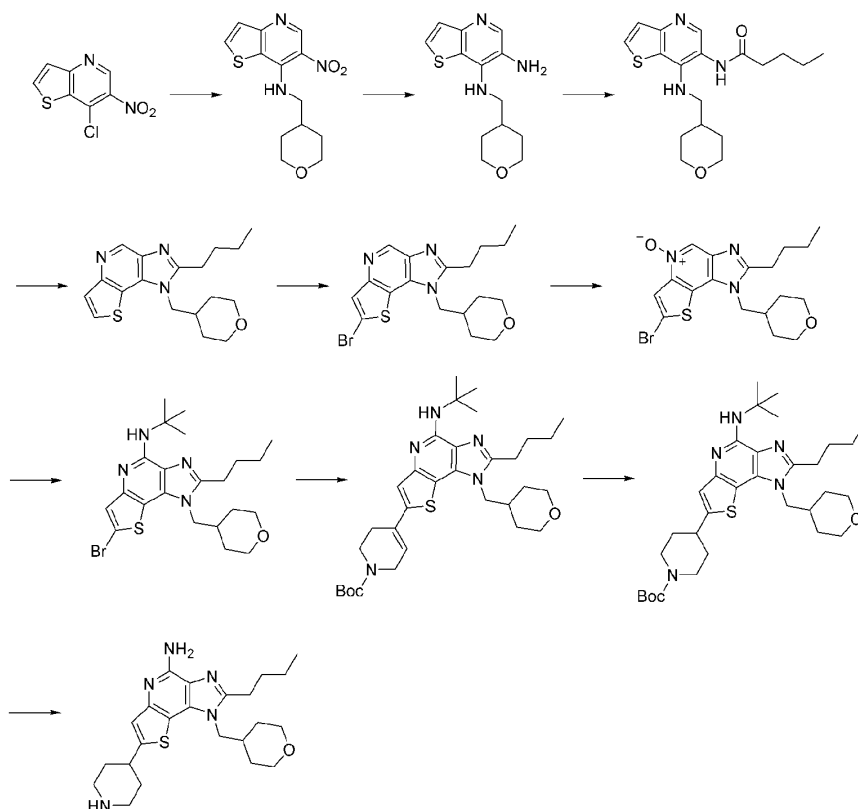
MS m/z (ESI): 998.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

10 第四步: 化合物 Int22 的制备

将化合物 Int22-3 (180 mg, 178.51 μmol)和 9-苄甲基-N-琥珀酰亚胺基碳酸酯(91.24 mg, 267.76 μmol)溶于无水二氯甲烷(3 mL)中, 然后加入 N,N-二异丙基乙胺(46.14 mg, 357.02 μmol), 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(180 mg, 收率: 82.9%)。

15 MS m/z (ESI): 1220.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 23: 化合物 Int23 的制备



第一步：6-硝基-*N*-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-胺的制备

将 7-氯-6-硝基噻吩并[3,2-*b*]吡啶(2 g, 9.34 mmol)和 4-氨基甲基四氢吡喃(1.29 g, 11.2 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(20 mL)中, 冰水浴降温, 0°C下向反应液中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(1.81 g, 14 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 6 小时。将反应液倒入水(100 mL)中, 并用乙酸乙酯(50 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(50 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物(2.52 g, 收率: 92.3%)。

MS m/z (ESI): 294.1 [M+H]⁺.

第二步：*N*'-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)噻吩并[3,2-*b*]吡啶-6,7-二胺的制备

10 将 6-硝基-*N*-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-胺(2.52 g, 8.53 mmol)溶于四氢呋喃(50 mL)和甲醇(50 mL)的混合溶剂中, 加入 10%钯碳(0.2 g), 氢气置换三次, 将反应体系在室温下搅拌 12 小时, 抽滤, 甲醇(30 mL)洗涤滤饼, 滤液浓缩, 得到本步的标题化合物(2.1 g, 收率: 93.7%)。

MS m/z (ESI): 264.1 [M+H]⁺.

15 第三步：*N*-(7-(((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)氨基)噻吩并[3,2-*b*]吡啶-6-基)戊酰胺的制备

- 将 *N*⁷-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)噻吩并[3,2-*b*]吡啶-6,7-二胺(2.1 g, 7.98 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.1 g, 15.9 mmol)溶于四氢呋喃(40 mL)中, 冰水浴降温, 0°C下向反应液中缓慢滴加正戊酰氯(1.45 g, 11.97 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 4 小时。向反应体系中加入水(10 mL)淬灭反应, 将体系浓缩尽可能除去四氢呋喃, 向所得剩余物中加入水(50 mL),
- 5 并用乙酸乙酯(30 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(50 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物(2.8 g, 收率: 100%)。

MS *m/z* (ESI): 348.1 [M+H]⁺。

第四步: 2-丁基-1-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶的制备

- 10 将 *N*-(7-(((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)氨基)噻吩并[3,2-*b*]吡啶-6-基)戊酰胺(2.8 g, 7.98 mmol)加入乙醇(30 mL)中, 室温下加入氢氧化钠(1.3 g, 31.9 mmol), 升温至 50°C 搅拌 6 小时。向反应体系中加入水(150 mL)淬灭反应, 用稀盐酸调节 pH = 6, 并用乙酸乙酯(100 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和碳酸氢钠溶液(60 mL)洗涤两次, 饱和食盐水(60 mL)洗涤两次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到本步的标题化合物 (1.9 g, 收率: 72.2%)。

- 15 MS *m/z* (ESI): 330.1 [M+H]⁺。

第五步: 7-溴-2-丁基-1-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶的制备

- 将 2-丁基-1-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶(1.9 g, 5.75 mmol)完全溶解于 *N,N*-二甲基甲酰胺(20 mL)和冰醋酸(6 mL)的混合溶剂中, 冰水浴降温,
- 20 0°C下向反应液中缓慢分批加入 *N*-溴代丁二酰亚胺(1.54 g, 8.63 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 24 小时。将反应液倒入水(100 mL)中, 并用乙酸乙酯(30 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)洗涤三次, 饱和食盐水(50 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚=1/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(1.64 g, 收率: 70%)。

- 25 MS *m/z* (ESI): 408.0 [M+H]⁺。

第六步: 7-溴-2-丁基-1-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-5-氧化物的制备

- 将 7-溴-2-丁基-1-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶(1.64 g, 4.0 mmol)溶于二氯甲烷(30 mL)中, 冰水浴降温, 0°C下向反应液中缓慢分批加入间氯过氧苯甲酸(1.63 g, 8.0 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 4 小时。将反应液倒入水(100 mL)中,
- 30

并用二氯甲烷(30 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和碳酸氢钠水溶液(30 mL)洗涤两次, 饱和亚硫酸钠水溶液(30 mL)洗涤两次, 饱和食盐水(30 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 得到标题化合物(1.7 g, 收率: 100%)。

MS m/z (ESI): 424.0 [M+H]⁺。

- 5 第七步: 7-溴-N-(叔丁基)-2-丁基-1-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-1H-咪唑并[4,5-d]噻吩并[3,2-b]吡啶-4-胺的制备

将 7-溴-2-丁基-1-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-1H-咪唑并[4,5-d]噻吩并[3,2-b]吡啶-5-氧化物(1.7 g, 4.0 mmol)和叔丁胺(0.73 g, 20 mmol)溶于二氯甲烷(20 mL)中, 冰水浴降温, 0°C 下向反应液中缓慢分批加入对甲苯磺酰氯(1.53 g, 8.0 mmol), 缓慢升温至室温搅拌 12 小时。向反应体系中加入水(100 mL), 二氯甲烷(30 mL)萃取三次, 合并有机相, 饱和食盐水(30 mL)洗涤三次, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚=5/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(1.1 g, 收率: 57.3%)。

MS m/z (ESI): 479.0 [M+H]⁺。

- 15 第八步: 4-(2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-1H-咪唑并[4,5-d]噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)-3,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸叔丁酯的制备

将 7-溴-N-(叔丁基)-2-丁基-1-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-1H-咪唑并[4,5-d]噻吩并[3,2-b]吡啶-4-胺(0.8 g, 1.71 mmol)、4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)-3,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸叔丁酯(0.8 g, 2.56 mmol)、碳酸钾(4.73 g, 3.4 mmol)和 1,1'-双二苯基膦二茂铁二氯化钨(62 mg, 0.08 mmol)加入到 1,4-二氧六环(10 mL)和水(2 mL)的混合溶剂中。反应体系经氮气鼓泡 5 分钟后, 升温至 100°C 搅拌 2 小时。将反应体系冷却至室温后, 浓缩除去溶剂, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=1/3(v/v)), 得到本步的标题化合物(0.5 g, 收率: 50.5%)。

MS m/z (ESI): 582.3 [M+H]⁺。

- 25 第九步: 4-(2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-1H-咪唑并[4,5-d]噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯的制备

将 4-(2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-1H-咪唑并[4,5-d]噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)-3,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸叔丁酯(0.5 g, 0.86 mmol)、甲酸铵(1.08 g, 17.2 mmol)和 10% 钯炭(20 mg, 0.019 mmol)依次加入无水乙醇(10 mL)中, 缓慢升温至 80°C 搅拌 12 小时。将反应体系冷却至室温后, 抽滤, 乙醇(15 mL)洗涤滤饼, 滤液浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(0.40 g,

收率：79.7%)。

MS m/z (ESI): 584.3 $[M+H]^+$ 。

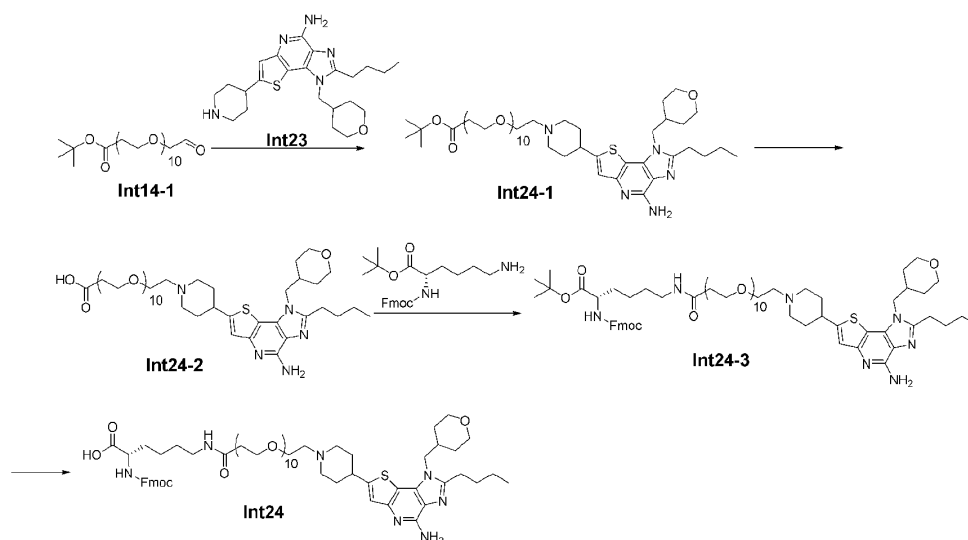
第十步：2-丁基-7-(哌啶-4-基)-1-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-1H-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-4-胺 (Int23) 的制备

- 5 将 4-(2-丁基-4-(叔丁基氨基)-1-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-1H-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-7-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯(0.3 g, 0.51 mmol)溶于甲醇(3 mL)中，室温下加入浓盐酸(0.5 mL)，升温至 50°C 搅拌 4 小时。将反应体系冷却至室温后，浓缩除去溶剂，所得剩余物经制备高效液相色谱纯化，得到本步的标题化合物(0.19 g，收率：87.1%)。

MS m/z (ESI): 428.3 $[M+H]^+$ 。

- 10 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.11 (s, 1H), 4.23 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.95-3.92 (m, 2H), 3.47-3.44 (m, 2H), 3.15-3.08 (m, 2H), 2.98-2.94 (m, 2H), 2.31-2.15 (m, 3H), 2.02-1.86 (m, 4H), 1.57-1.49 (m, 5H), 1.37-1.26 (m, 4H), 1.03 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H)。

中间体制备例 24：化合物 Int24 的制备



- 15 第一步：化合物 Int24-1 的制备

依次将化合物 Int14-1 (472.48 mg, 799.99 μmol)、化合物 Int23 (250 mg, 533.33 μmol)、氰基硼氢化钠(99.08 mg, 1576.7 μmol)和冰乙酸(51.72 mg, 853.33 μmol)加入 1,2-二氯乙烷(6 mL)和甲醇 (3 mL)的混合溶剂中，25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品溶于甲醇(3 mL)中，用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-30%)，得到本步的标题化合物

20 (475 mg，收率：89.4%)。

MS m/z (ESI): 996.6 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int24-2 的制备

将化合物 Int24-1 (475 mg, 476.76 μmol)溶于盐酸二氧六环溶液(6 mL, 4M)中, 25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(400 mg, 收率: 99.3%)。

5 MS m/z (ESI): 940.6 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int24-3 的制备

依次将化合物 Int24-2 (280 mg, 297.81 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(116.63 mg, 893.44 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(160.13 mg, 416.94 μmol)和(((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)-*L*-赖氨酸叔丁酯(133.08 mg, 313.48 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(248 mg, 收率: 61.8%)。

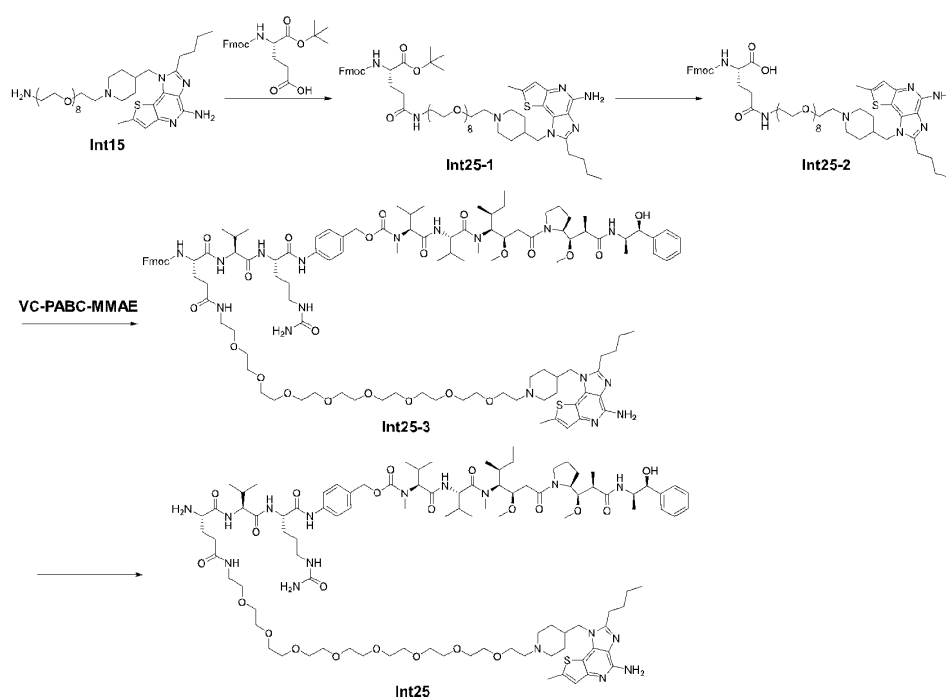
MS m/z (ESI): 1346.7 [M+H]⁺。

第四步：化合物 Int24 的制备

15 将化合物 Int24-3 (94.74 mg, 70.34 μmol)溶于无水二氯甲烷(4 mL)和三氟乙酸(2 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(70 mg, 收率: 81.2%)。

MS m/z (ESI): 1290.7 [M+H]⁺。

中间体制备例 25: 化合物 Int25 的制备



第一步：化合物 Int25-1 的制备

依次将(*S*)-2-(((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(37.29 mg, 87.65 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(14.16 mg, 109.56 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(38.88 mg, 102.25 μmol)和化合物 Int15 (55 mg, 73.04 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(80 mg, 收率: 99.4%)。

MS m/z (ESI): 1160.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 Int25-2 的制备

10 将化合物 Int25-1 (50 mg, 43.09 μmol)溶于无水二氯甲烷(3 mL)和三氟乙酸(1.5 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 4 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(45 mg, 收率: 62.2%)。

MS m/z (ESI): 1104.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步：化合物 Int25-3 的制备

15 将化合物 Int25-2 (45 mg, 40.74 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(7.58 mg, 58.07 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯 (20.81 mg, 54.19 μmol) 和 VC-PABC-MMAE (45.78 mg, 40.74 μmol)，加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反

应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 35.1%)。

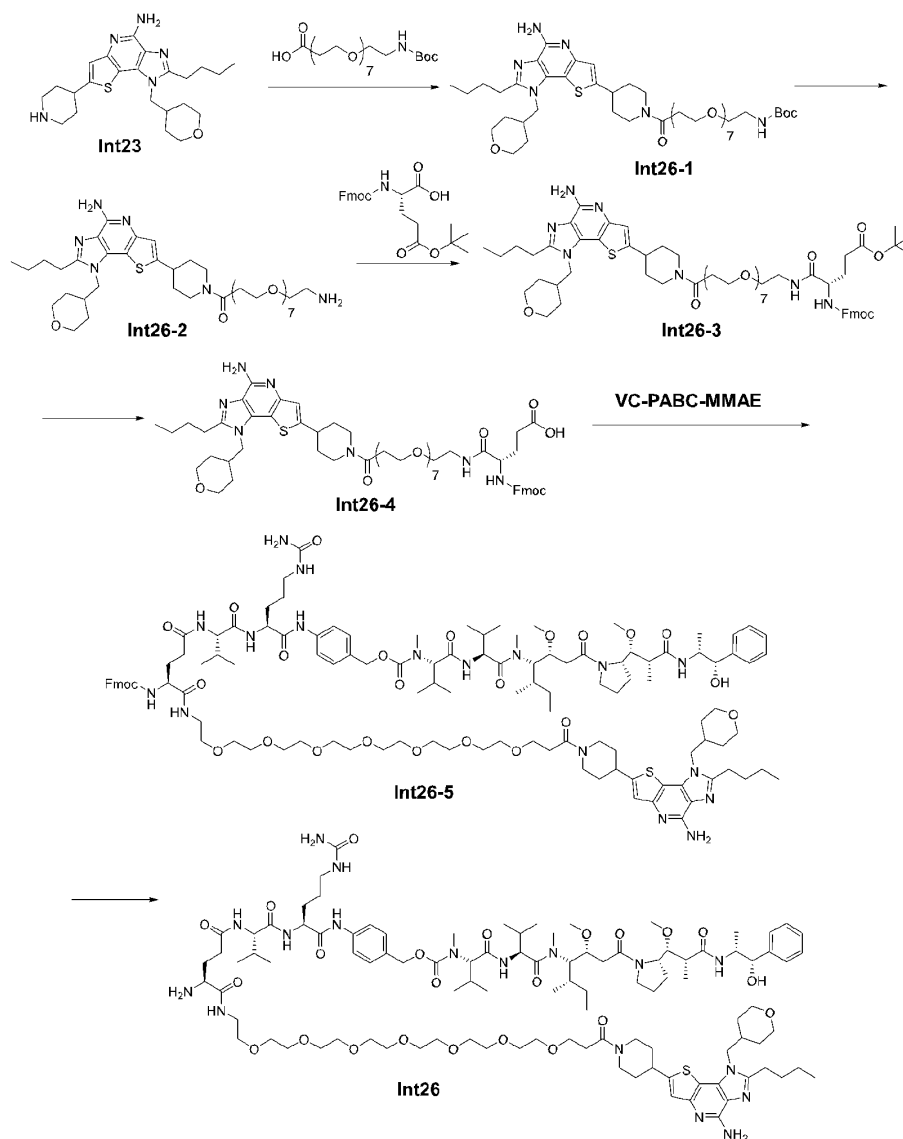
MS m/z (ESI): 1105.2 $[M/2+H]^+$ 。

第四步: 化合物 Int25 的制备

- 5 将化合物 Int25-3 (30 mg, 13.44 μmol)和二乙胺(4.58 mg, 53.76 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(25 mg, 收率: 93.6%)。

MS m/z (ESI): 994.1 $[M/2+H]^+$ 。

中间体制备例 26: 化合物 Int26 的制备



第一步：化合物 Int26-1 的制备

依次将化合物 *N*-叔丁氧羰基-七聚乙二醇-羧酸(450 mg, 895.34 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(466.66 mg, 3.58 mmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脒六氟磷酸酯(412.4 mg, 1.07 mmol)和化合物 Int23 (419.69 mg, 895.34 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=55%-65%)，得到本步的标题化合物(800 mg，收率：98.5%)。

MS m/z (ESI): 907.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 Int26-2 的制备

将化合物 Int26-1 (800 mg, 881.87 μmol)溶于盐酸二氧六环溶液(6 mL, 4M)中, 25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(610 mg, 收率: 90.2%)。

MS m/z (ESI): 807.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步: 化合物 Int26-3 的制备

5 依次将(*S*)-2-(((9*H*-茚-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(276.97 mg, 644.45 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(209.93 mg, 1610 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(296.84 mg, 773.34 μmol)和化合物 Int26-2 (604 mg, 644.45 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(747.9 mg, 收率: 95.6%)。

10 MS m/z (ESI): 1214.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第四步: 化合物 Int26-4 的制备

将化合物 Int26-3 (460 mg, 378.75 μmol)溶于无水二氯甲烷(6 mL)和三氟乙酸(3 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(400 mg, 收率: 91.2%)。

MS m/z (ESI): 1158.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

15 第五步: 化合物 Int26-5 的制备

将化合物 Int26-4 (113.74 mg, 91.19 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(23.24 mg, 178.03 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(51.28 mg, 133.52 μmol)和 VC-PABC-MMAE (95 mg, 84.56 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=55%-65%), 得到本步

20 的标题化合物(170 mg, 收率: 93.5%)。

MS m/z (ESI): 1132.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

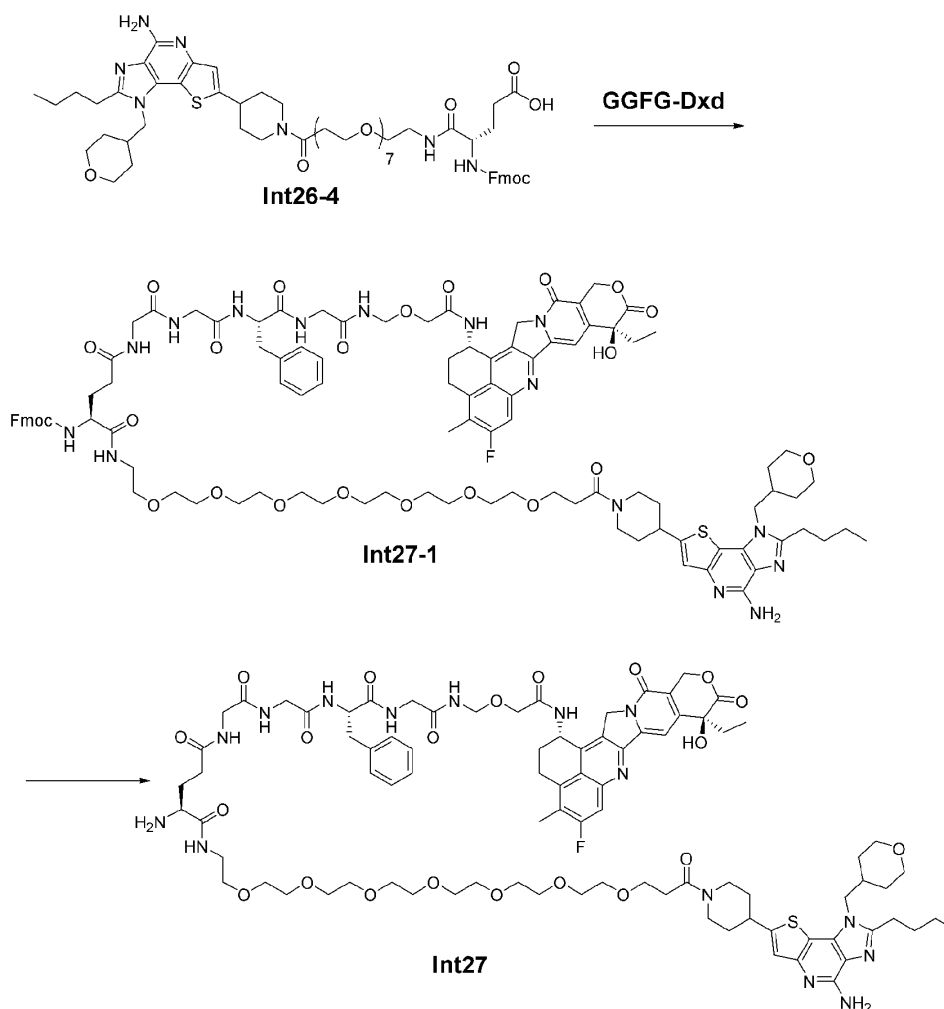
第六步: 化合物 Int26 的制备

将化合物 Int26-5 (170 mg, 75.09 μmol)和二乙胺(27.74 mg, 375.47 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱

25 梯度: A%=55%-65%), 得到本步的标题化合物(110 mg, 收率: 71.9%)。

MS m/z (ESI): 1021.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 27: 化合物 Int27 的制备



第一步：化合物 Int27-1 的制备

将化合物 Int26-4 (440 mg, 379.83 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(98.18 mg, 759.66 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(173.31 mg, 455.8 μmol)和
 5 GGFG-Dxd (319.38 mg, 379.83 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(250 mg, 收率: 35.0%)。

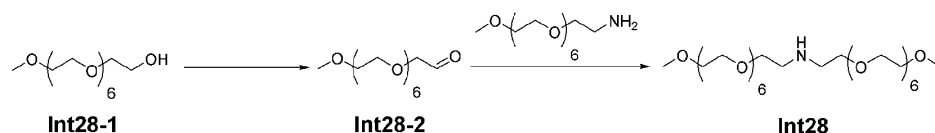
MS m/z (ESI): 991.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 Int27 的制备

10 将化合物 Int27-1 (205 mg, 103.47 μmol)和二乙胺(36.31 mg, 491.49 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(160 mg, 收率: 93.1%)。

MS m/z (ESI): 586.9 [M/3+H]⁺。

中间体制备例 28: 化合物 Int28 的制备



第一步: 化合物 Int28-2 的制备

- 5 将七甘醇单甲醚(1 g, 2.91 mmol)和戴斯马丁氧化剂(1.87 g, 4.36 mmol)加入二氯甲烷(15 mL)中, 25°C 反应 10 小时。向反应液加入饱和硫代硫酸钠溶液(5 mL)和饱和碳酸氢钠水溶液(10 mL), 搅拌至澄清, 再加入二氯甲烷萃取三次, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=15/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(890 mg, 收率: 90.4%)。

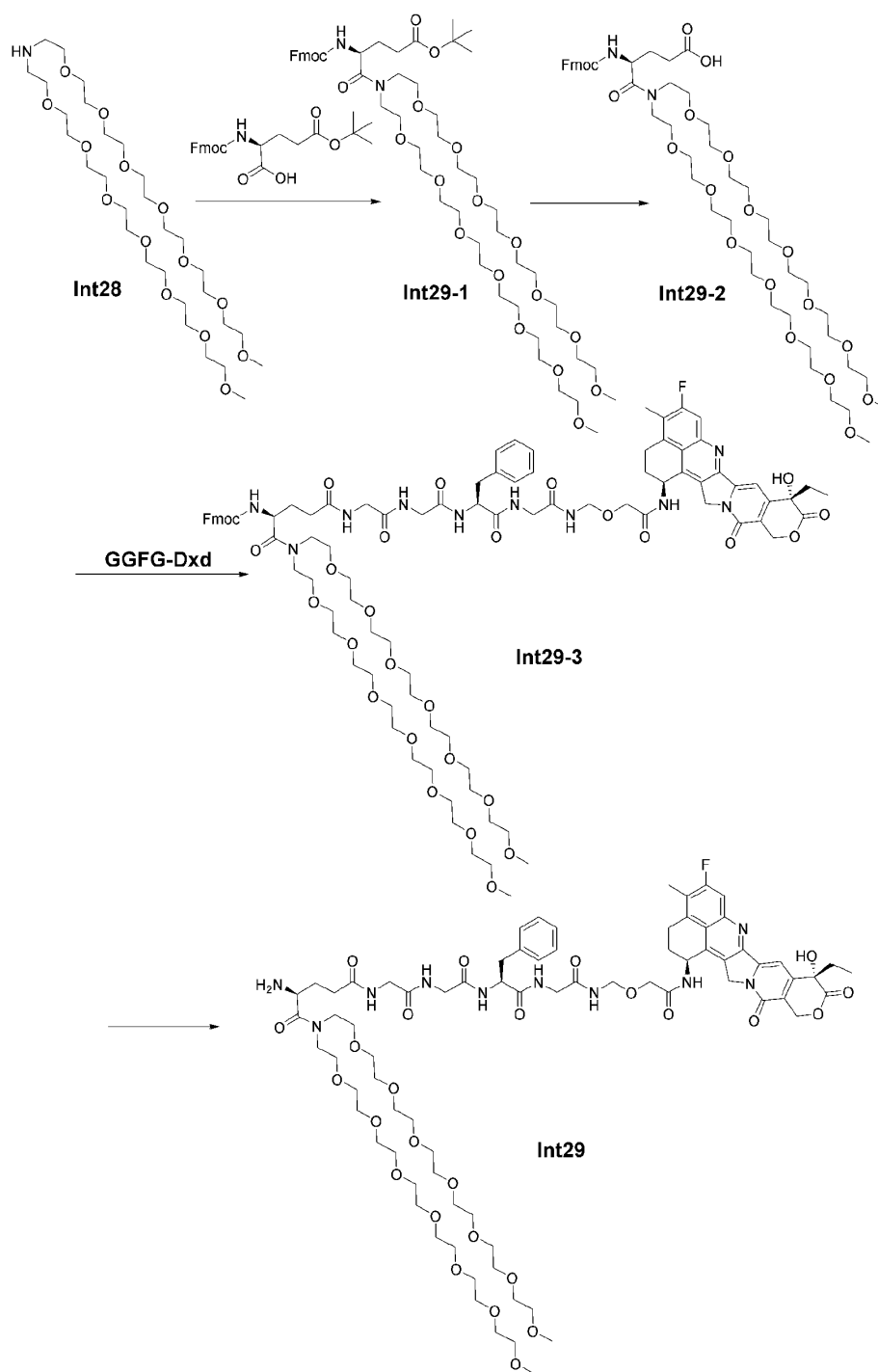
- 10 **MS m/z (ESI): 339.2 [M+H]⁺。**

第二步: 化合物 Int28 的制备

- 15 将化合物 Int28-2 (600 mg, 1.78 mmol)、氰基硼氢化钠(143.5 mg, 2.26 mmol)和冰乙酸(137.13 mg, 2.26 mmol)加入 1,2-二氯乙烷(6 mL)和甲醇(4 mL)的混合溶剂中, 25°C 搅拌均匀, 然后将 2,5,8,11,14,17,20-七氧杂二十二烷-22-胺(592.33 mg, 1.74 mmol)溶解于 1,2-二氯乙烷(6 mL)中, 用恒压滴液漏斗 3 小时内滴入上述体系中。滤液浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=17/3(v/v)), 得到本步的标题化合物(650 mg, 收率: 65.2%)。

MS m/z (ESI): 662.3 [M+H]⁺。

中间体制备例 29: 化合物 Int29 的制备



第一步：化合物 Int29-1 的制备

将(*S*)-2-(((9*H*-苻-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(496.25 mg, 1.17 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(188.43 mg, 1.39 mmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲

基脲六氟磷酸酯(554.36 mg, 1.39 mmol)和化合物 Int28 (650 mg, 982.14 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(650 mg, 收率: 65.8%)。

MS m/z (ESI): 1069.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

5 第二步: 化合物 Int29-2 的制备

将化合物 Int29-1 (235.79 mg, 220.51 μmol)溶于盐酸二氧六环溶液(5 mL, 4M)中, 25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(180 mg, 收率: 84.8%)。

MS m/z (ESI): 1013.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步: 化合物 Int29-3 的制备

10 将化合物 Int29-2 (151.82 mg, 149.85 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(25.18 mg, 194.8 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(62.67 mg, 164.83 μmol)和 GGFG-Dxd (126 mg, 149.85 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(160 mg, 收率: 61.2%)。

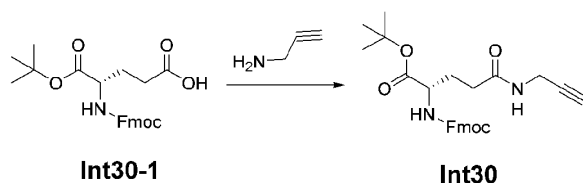
15 MS m/z (ESI): 1835.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第四步: 化合物 Int29 的制备

将化合物 Int29-3 (160 mg, 87.16 μmol)和二乙胺(63.74 mg, 871.6 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(145 mg, 收率: 596.7%)。

20 MS m/z (ESI): 1613.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 30: 化合物 Int30 的制备

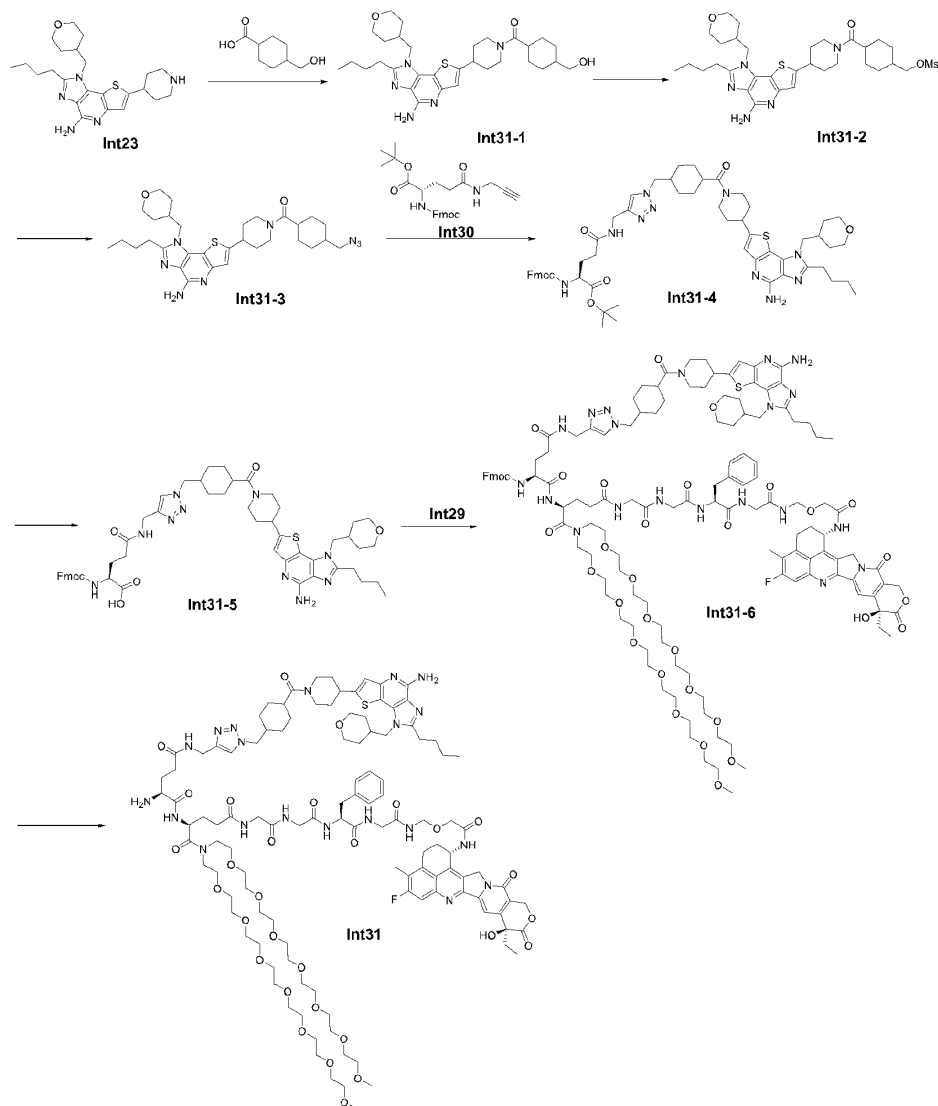


25 将(*S*)-2-(((9*H*-苕-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(400 mg, 930.73 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(243 mg, 1.86 mmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(500.45 mg, 1.3 mmol)和炔丙胺(77.67 mg, 1.4 mmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 反应 3 小时。反应液浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 石

油醚/乙酸乙酯=3/2(v/v)), 得到本步的标题化合物(420 mg, 收率: 97.7%)。

MS m/z (ESI): 463.2 $[M+H]^+$ 。

中间体制备例 31: 化合物 Int31 的制备



5 第一步: 化合物 Int31-1 的制备

将 4-羟甲基-1-环己羧酸(125.94 mg, 788.14 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(292.42 mg, 2.26 mmol, 373.94 μL)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(315.45 mg, 788.14 μmol)和化合物 Int23 (350 mg, 754.2 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(380 mg, 收率: 93.4%)。

MS m/z (ESI): 568.3 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int31-2 的制备

将化合物 Int31-1 (325 mg, 503.19 μmol)溶于无水吡啶(5 mL)中，在 1 小时内分批次加入甲基磺酰氯(65.43 mg, 1006.39 μmol)，加完后 25°C 下反应 3 小时。反应液浓缩后，加入
5 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)稀释，直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=60%-70%)，得到本步的标题化合物(325 mg，收率：82.5%)。

MS m/z (ESI): 646.3 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int31-3 的制备

将化合物 Int31-2 (325 mg, 503.19 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中，再加入
10 叠氮化钠(65.43 mg, 1006.39 μmol)，80°C 反应 4 小时。向反应液中加入水(20 mL)，乙酸乙酯(20 mL*3)萃取，饱和食盐水洗涤，有机相用无水硫酸镁干燥，过滤，滤液浓缩得到本步的标题化合物(260 mg，收率：91.9%)。

MS m/z (ESI): 593.3 [M+H]⁺。

第四步：化合物 Int31-4 的制备

15 将化合物 Int31-3 (230.69 mg, 389.16 μmol)、化合物 Int30 (180 mg, 389.16 μmol)、抗坏血酸钠(154.19 mg, 778.32 μmol)和无水硫酸铜(291.5 mg, 1170 μmol)加入水(0.25 mL)、二甲基亚砜(2 mL)和四氢呋喃(1 mL)的混合溶剂中，0°C 反应 3 小时。反应液浓缩得到的剩余物用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=25%-35%)，得到本步的标题化合物(405 mg，收率：98.8%)。

20 MS m/z (ESI): 1055.5 [M+H]⁺。

第五步：化合物 Int31-5 的制备

将化合物 Int31-4 (190 mg, 180.04 μmol)溶于无水二氯甲烷(6 mL)和三氟乙酸(2 mL)的混合溶剂中，25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-30%)，得到本步的标题化合物(150 mg，收率：84.7%)。

25 MS m/z (ESI): 999.6 [M+H]⁺。

第六步：化合物 Int31-6 的制备

将化合物 Int31-5 (24.77 mg, 24.79 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(4.16 mg, 32.22 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(11.31 mg, 29.75 μmol)和化合物 Int29 (40 mg, 24.79 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液

直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(50 mg, 收率: 81.8%)。

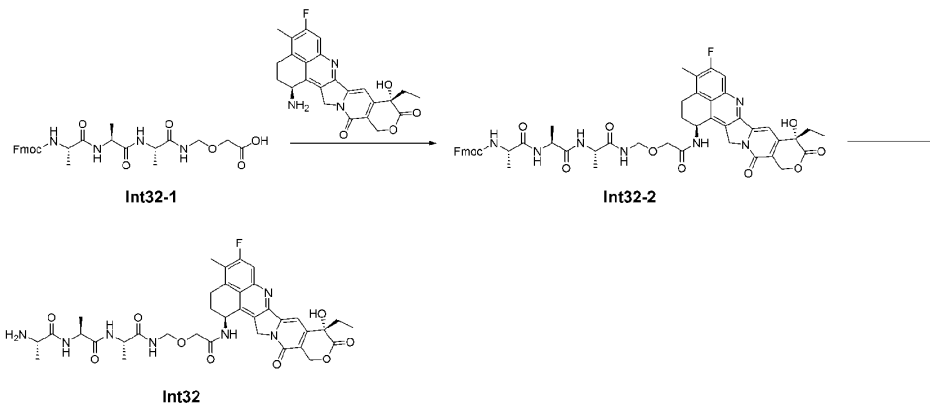
MS m/z (ESI): 1297.6 [M/2+H]⁺。

第七步: 化合物 Int31 的制备

- 5 将化合物 Int31-6 (50 mg, 19.26 μmol)和二乙胺(6.76 mg, 91.52 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(25 mg, 收率: 57.6%)。

MS m/z (ESI): 1186.6 [M/2+H]⁺。

中间体制备例 32: 化合物 Int32 的制备



10

第一步: 化合物 Int32-2 的制备

- 将化合物 Int32-1 (75 mg, 138.75 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(26.9 mg, 208.12 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脒六氟磷酸酯(65.58 mg, 180.36 μmol)和甲磺酸依喜替康(73.75 mg, 138.75 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(115 mg, 收率: 91.1%)。
- 15

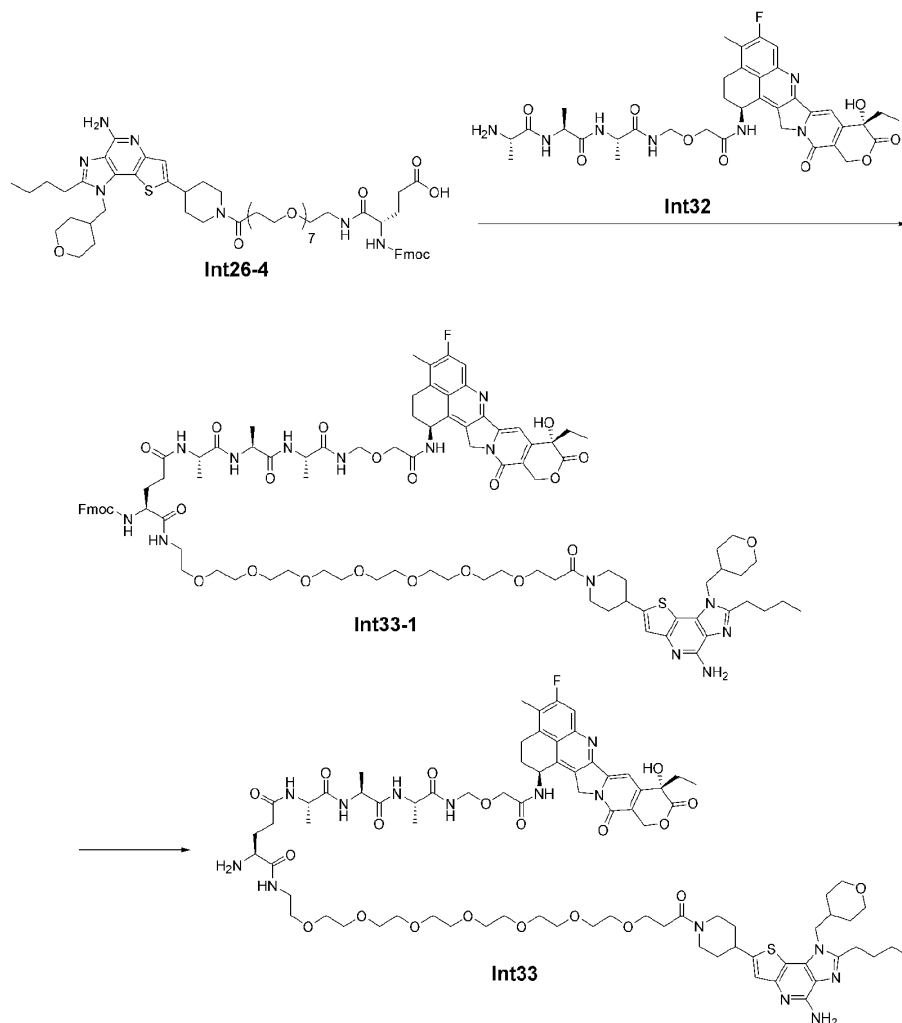
MS m/z (ESI): 958.3 [M+H]⁺。

第二步: 化合物 Int32 的制备

- 将化合物 Int32-2 (115 mg, 120.04 μmol)和二乙胺(42.13 mg, 570.2 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(75 mg, 收率: 89.4%)。
- 20

MS m/z (ESI): 736.3 [M+H]⁺。

中间体制备例 33: 化合物 Int33 的制备



第一步: 化合物 Int33-1 的制备

将化合物 Int26-4 (75.54 mg, 61.78 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(15.97 mg, 123.56 μmol)、
 5 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(30.54 mg, 80.32 μmol)和化合物
 Int32(50 mg, 67.96 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 小时。反应液
 直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物
 (85 mg, 收率: 77.2%)。

MS m/z (ESI): 1875.9 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 。

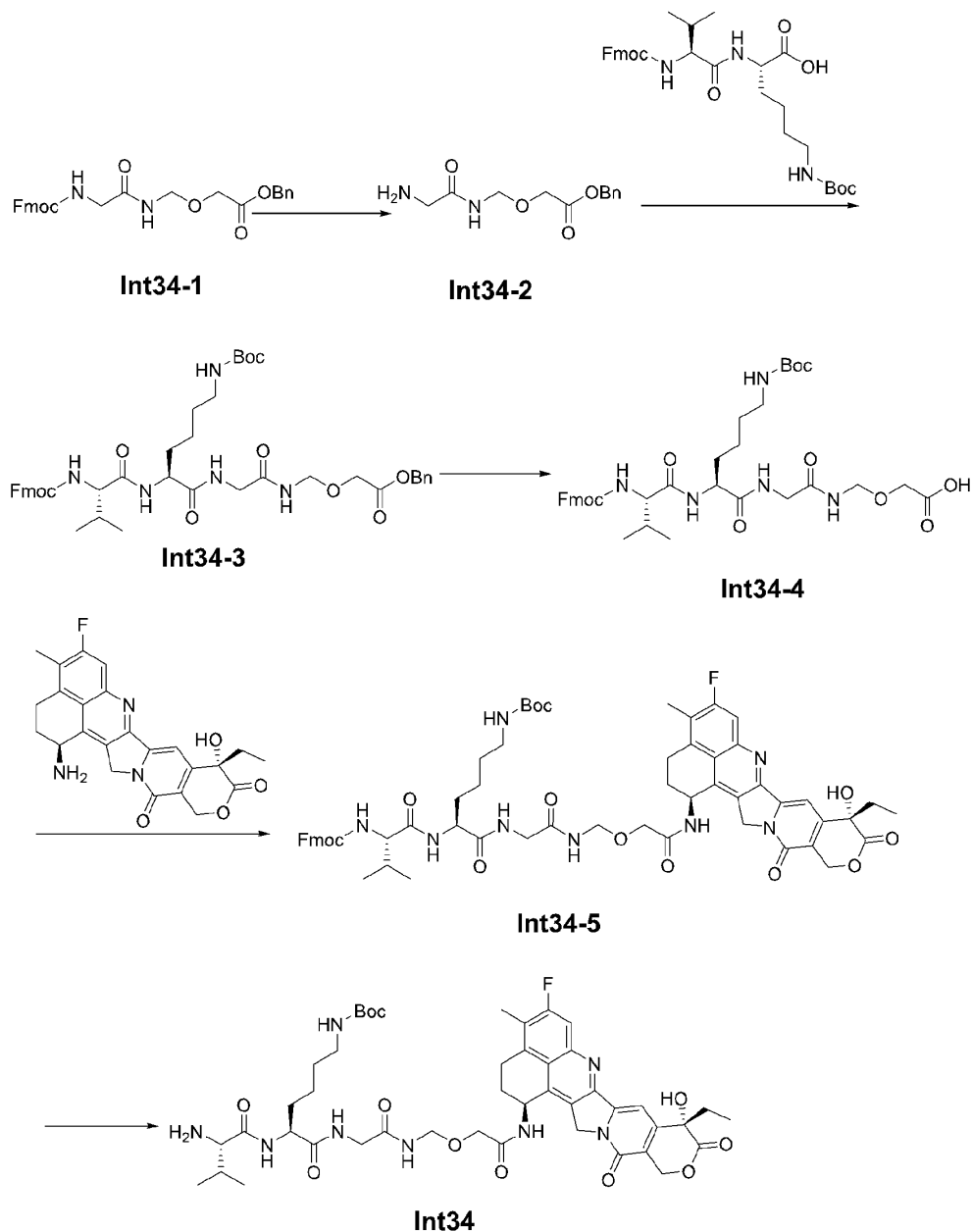
10 第二步: 化合物 Int33 的制备

将化合物 Int33-1 (85 mg, 45.3 μmol)和二乙胺(15.9 mg, 215.2 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲

酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(70 mg, 收率: 98.3%)。

MS m/z (ESI): 1653.8 [M+H]⁺。

中间体制备例 34: 化合物 Int34 的制备



5

第一步: 化合物 Int34-2 的制备

将化合物 Int34-1 (800 mg, 1.67 mmol)和哌啶(287.11 mg, 3.34 mmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液浓缩后, 加入甲基叔丁基醚(20 mL), 超声 5 分钟后, 静置, 过滤, 固体干燥得到本步的标题化合物(315 mg, 收率: 73.47%)

MS m/z (ESI): 253.1 [M+H]⁺。

5 第二步: 化合物 Int34-3 的制备

将化合物 Int34-2 (90 mg, 321.09 μmol)、*N*²-((((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)-*L*-缬氨酸)-*N*⁶-(叔丁氧羰基)-*L*-赖氨酸(202.53 mg, 321.09 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(104.60 mg, 802.72 μmol)、1-羟基苯并三唑(49.23 mg, 353.20 μmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(77.43 mg, 401.36 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=50%-55%), 得到本步的标题化合物(142 mg, 收率: 47.43%)。

MS m/z (ESI): 802.4 [M+H]⁺。

第三步: 化合物 Int34-4 的制备

将化合物 Int34-3 (142 mg, 159.37 μmol)、甲酸铵(50.75 mg, 796.84 μmol)和 10%钯碳(15 mg)加入无水甲醇(4 mL)中, 室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=30%-35%), 得到本步的标题化合物(101 mg, 收率: 80.13%)。

MS m/z (ESI): 712.4 [M+H]⁺。

第四步: 化合物 Int34-5 的制备

将化合物 Int34-4 (95 mg, 133.46 μmol)、甲磺酸依喜替康(70.94 mg, 133.46 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(43.04 mg, 333.66 μmol)和双(2-氧代-3-恶唑烷基)次磷酰氯(50.85 mg, 200.20 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(105 mg, 收率: 69.67%)。

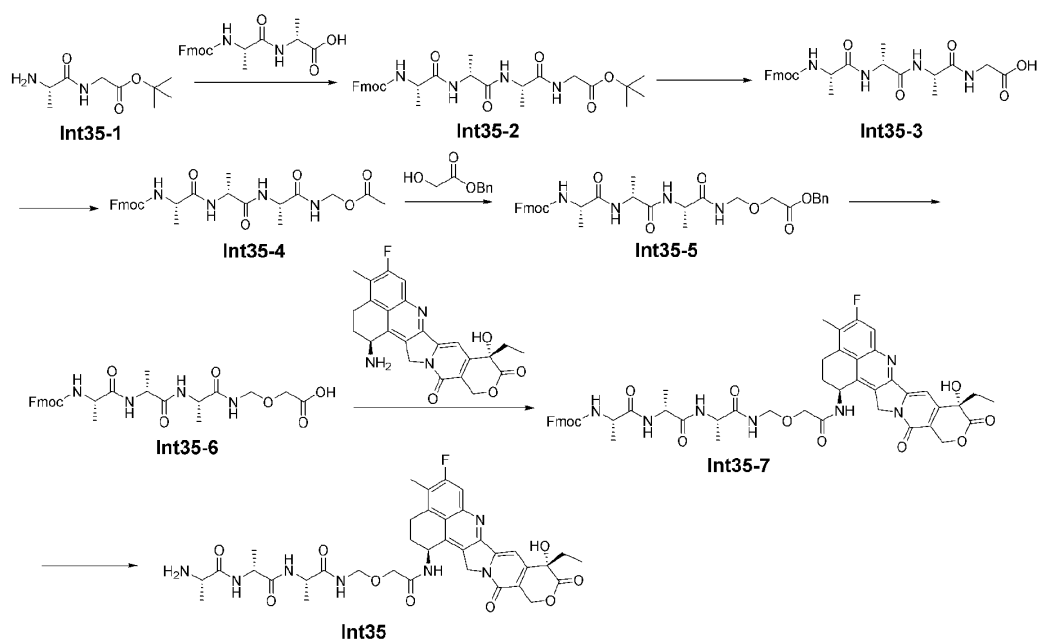
MS m/z (ESI): 1129.5 [M+H]⁺。

第五步: 化合物 Int34 的制备

25 将化合物 Int34-5 (105 mg, 92.98 μmol)和哌啶(15.83 mg, 185.97 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=27%-33%), 得到本步的标题化合物(46 mg, 收率: 54.54%)。

MS m/z (ESI): 907.4 [M+H]⁺。

中间体制备例 35: 化合物 Int35 的制备



第一步：化合物 Int35-2 的制备

将(((9*H*-苈-9-基)甲氧基)羰基)-*L*-丙氨酸-*D*-丙氨酸(537.38 mg, 1.33 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(345.07 mg, 3.67 μ mol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(641.18 mg, 16.84 mmol)和化合物 Int35-1 (300 mg, 1.33 mmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(400 mg, 收率: 52.9%)。

MS *m/z* (ESI): 567.3 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int35-3 的制备

10 将化合物 Int35-2 (400 mg, 635.32 μ mol)溶于盐酸二氧六环溶液(4 mL, 4M)中, 25°C 反应 3 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(310 mg, 收率: 95.6%)。

MS *m/z* (ESI): 511.2 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int35-4 的制备

15 氮气保护下依次将化合物 Int35-3 (350 mg, 651.27 μ mol)、四乙酸铅(437.51 mg, 976.91 μ mol)、醋酸铜(13.13 mg, 64.13 μ mol)和冰乙酸(59.26 mg, 976.91 μ mol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL)中, 60°C 反应 0.5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(285 mg, 收率: 83.4%)。

MS *m/z* (ESI): 547.2 [M+Na]⁺。

第四步：化合物 Int35-5 的制备

将化合物 Int35-4 (280 mg, 533.76 μmol)和乙醇酸苄酯(373.47 mg, 2.14 mmol)加入二氯甲烷(6 mL)和三氟乙酸(2 mL)混合溶剂中, 25°C 反应 0.5 小时。反应液浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=7/3(v/v)), 得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 98.1%)。

MS m/z (ESI): 653.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

第五步：化合物 Int35-6 的制备

将化合物 Int35-5 (160 mg, 237.84 μmol)、10%钨碳(28.89 mg)和醋酸铵(89.99 mg, 1430 μmol)加入甲醇(6 mL)中, 25°C 反应 3 小时。反应液垫硅藻土过滤, 滤液浓缩得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 23.3%)。

MS m/z (ESI): 541.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第六步：化合物 Int35-7 的制备

将化合物 Int35-6 (30 mg, 55.49 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(11.09 mg, 85.84 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(22.85 mg, 60.08 μmol)和甲磺酸依喜替康(32.45 mg, 61.05 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(45 mg, 收率: 89.1%)。

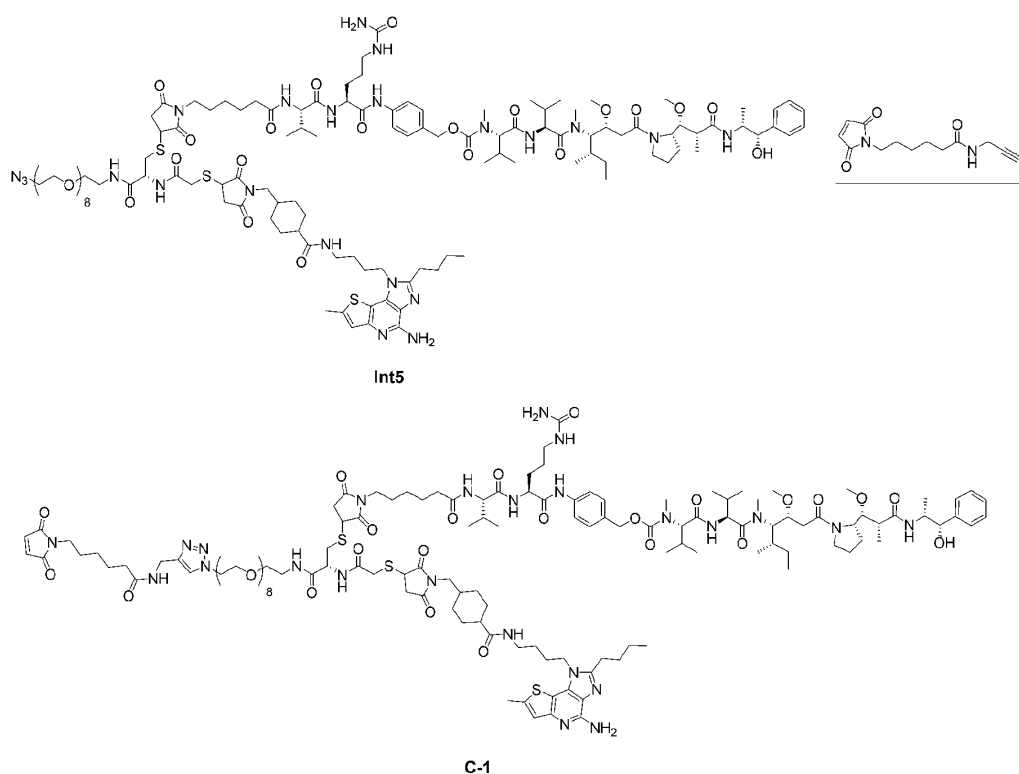
MS m/z (ESI): 958.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第七步：化合物 Int35 的制备

将化合物 Int35-7 (39.8 mg, 41.55 μmol)和二乙胺(15.35 mg, 207.74 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=55%-65%), 得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 98.1%)。

MS m/z (ESI): 736.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

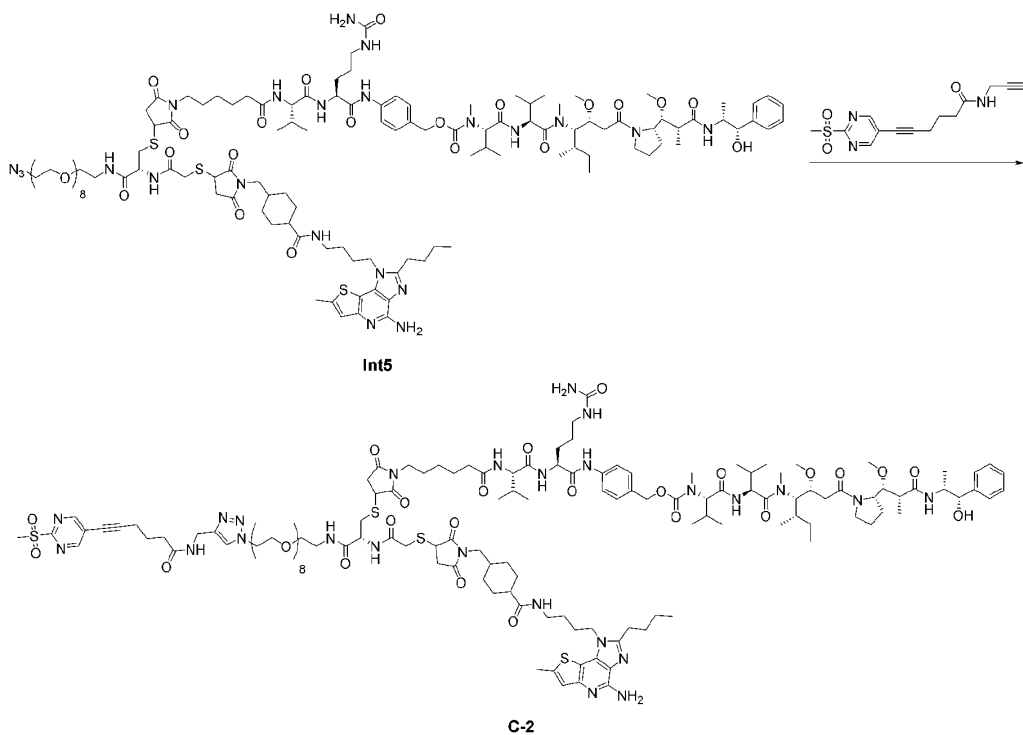
实施例 1-1: 化合物 C-1 的制备



将化合物 Int5 (50 mg, 0.02 mmol)溶于 DMSO (6 mL)和水(0.6 mL)中, 氮气保护下, 加入 6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-(丙-2-炔-1-基)己酰胺(5.99 mg, 0.024 mmol)、抗坏血酸钠(5.94 mg, 0.03 mmol)和无水硫酸铜(6.4 mg, 0.04 mmol), 室温搅拌 1 小时, 加水
5 和乙酸乙酯萃取, 有机相干燥, 浓缩得到的粗品经制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(15 mg, 收率: 27.2%)。

MS m/z (ESI): 1365.7 [M/2+H]⁺。

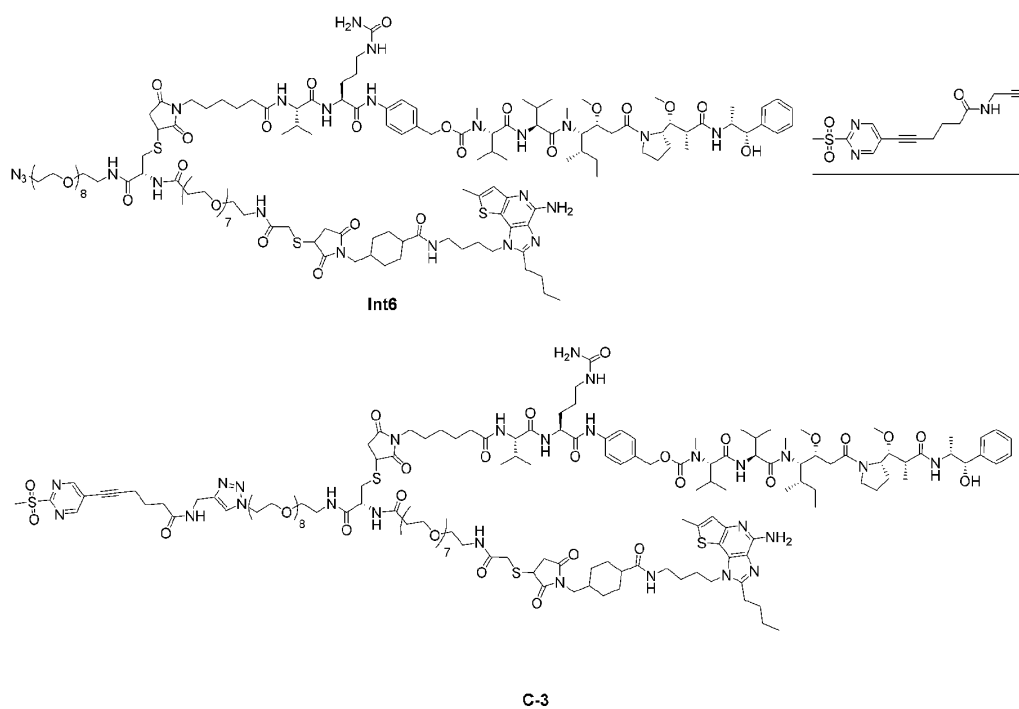
实施例 1-2: 化合物 C-2 的制备



采用实施例 1-1 的合成路线，将反应原料 6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-(丙-2-炔-1-基)己酰胺替换为 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-*N*-(丙-2-炔-1-基)六-5-炔酰胺，得到本步的标题化合物(3 mg，收率：5.6%)。

5 **MS m/z (ESI): 1394.2 [M/2+H]⁺。**

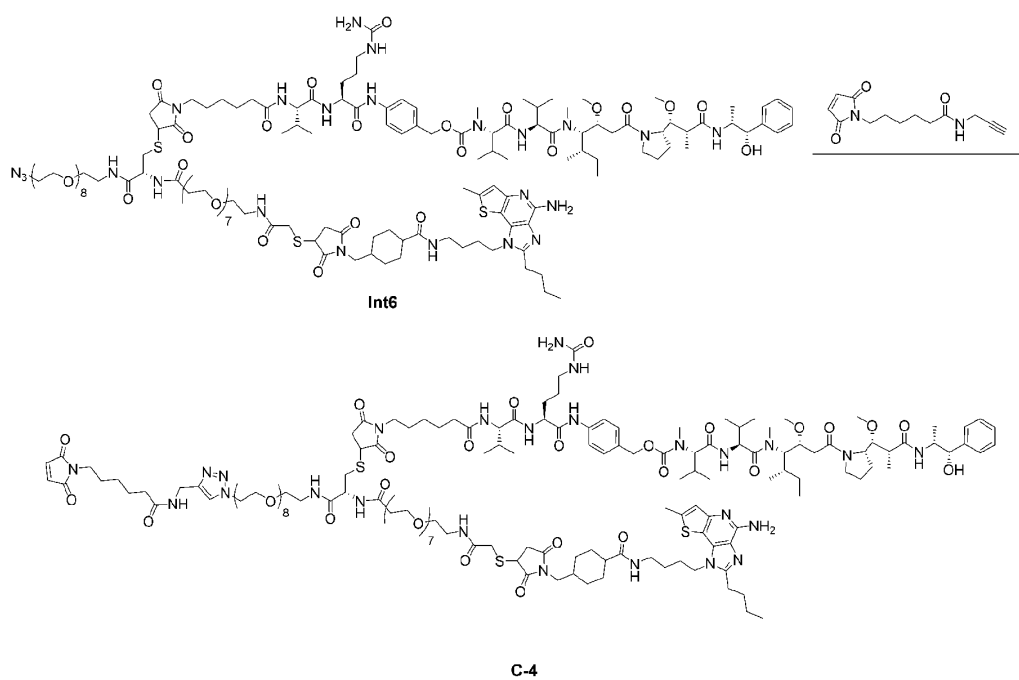
实施例 1-3：化合物 C-3 的制备



采用实施例 1-1 的合成路线，将反应原料化合物 Int5 替换为化合物 Int6，6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-(丙-2-炔-1-基)己酰胺替换为 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-*N*-(丙-2-炔-1-基)六-5-炔酰胺，得到本步的标题化合物(5 mg，收率：8%)。

5 **MS m/z (ESI): 1583.8 [M/2+H]⁺。**

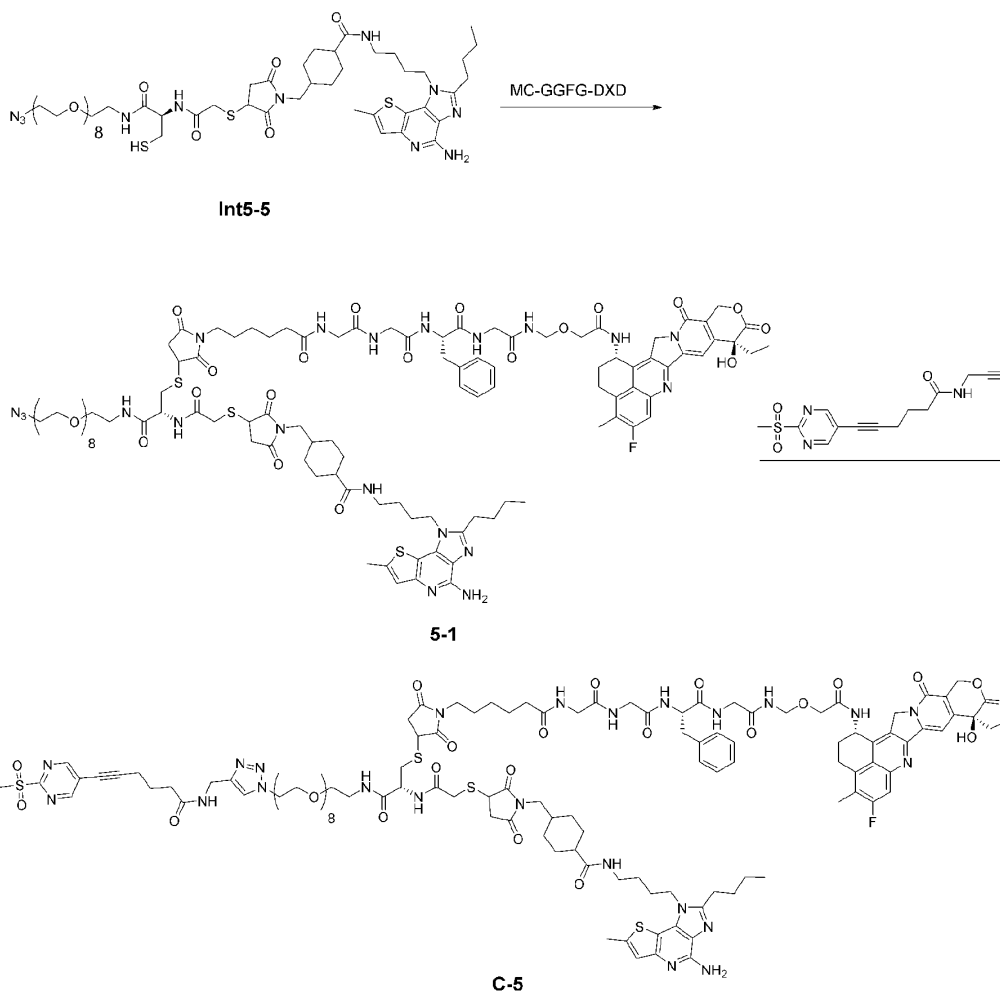
实施例 1-4：化合物 C-4 的制备



采用实施例 1-1 的合成路线，将反应原料化合物 **Int5** 替换为化合物 **Int6**，得到本步的标题化合物(**10 mg**，收率：**6%**)。

MS m/z (ESI): 1555.3 [M/2+H]⁺。

5 实施例 1-5：化合物 **C-5** 的制备



第一步：化合物 5-1 的制备

采用化合物 Int5 的合成路线，将反应原料 MC-VC-PABC-MMAE 替换为 MC-GGFG-Dxd，得到本步的标题化合物(30 mg，收率：21.3%)。

5 MS m/z (ESI): 1100.5 [M/2+H]⁺。

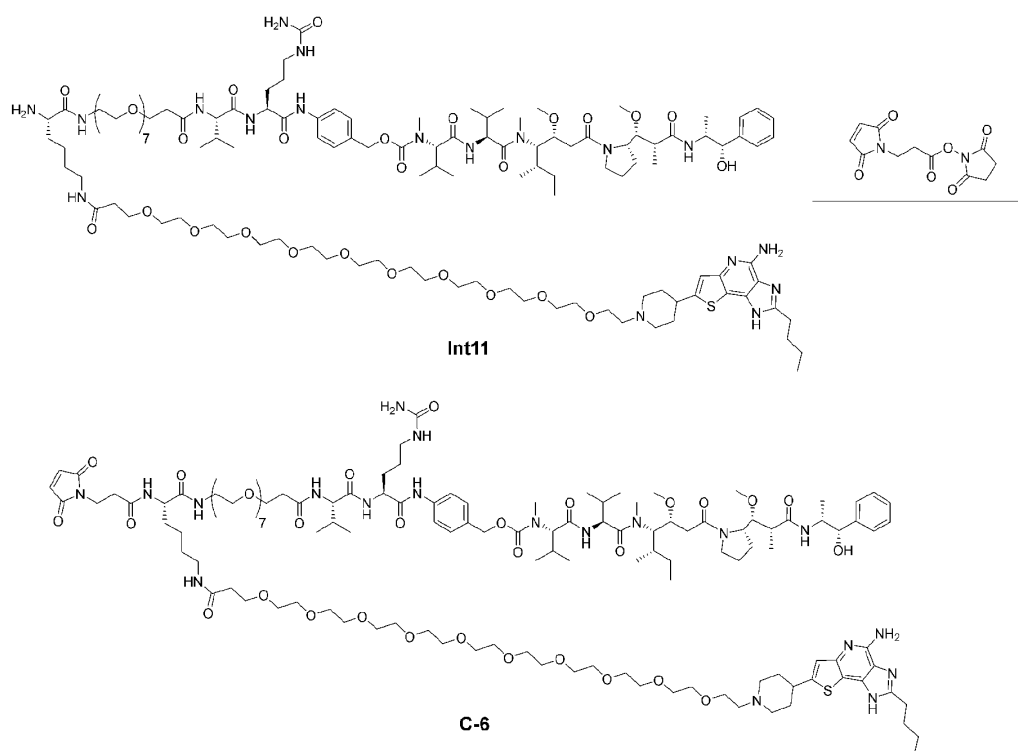
第二步：化合物 C-5 的制备

将化合物 5-1 (30 mg, 0.014 mmol)溶于 DMSO (3 mL)和水(0.3 mL)中，氮气保护下，加入 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-N-(丙-2-炔-1-基)六-5-炔酰胺(4.99 mg, 0.016 mmol)、抗坏血酸钠(4.16 mg, 0.021 mmol)和无水硫酸铜(4.5 mg, 0.028 mmol)，室温搅拌 1 小时，加水和乙酸乙酯萃取，有机相干燥，浓缩得到的粗品经制备高效液相色谱仪纯化，得到本步的标题化合物(3 mg，收率：8.8%)。

10

MS m/z (ESI): 1252.0 [M/2+H]⁺。

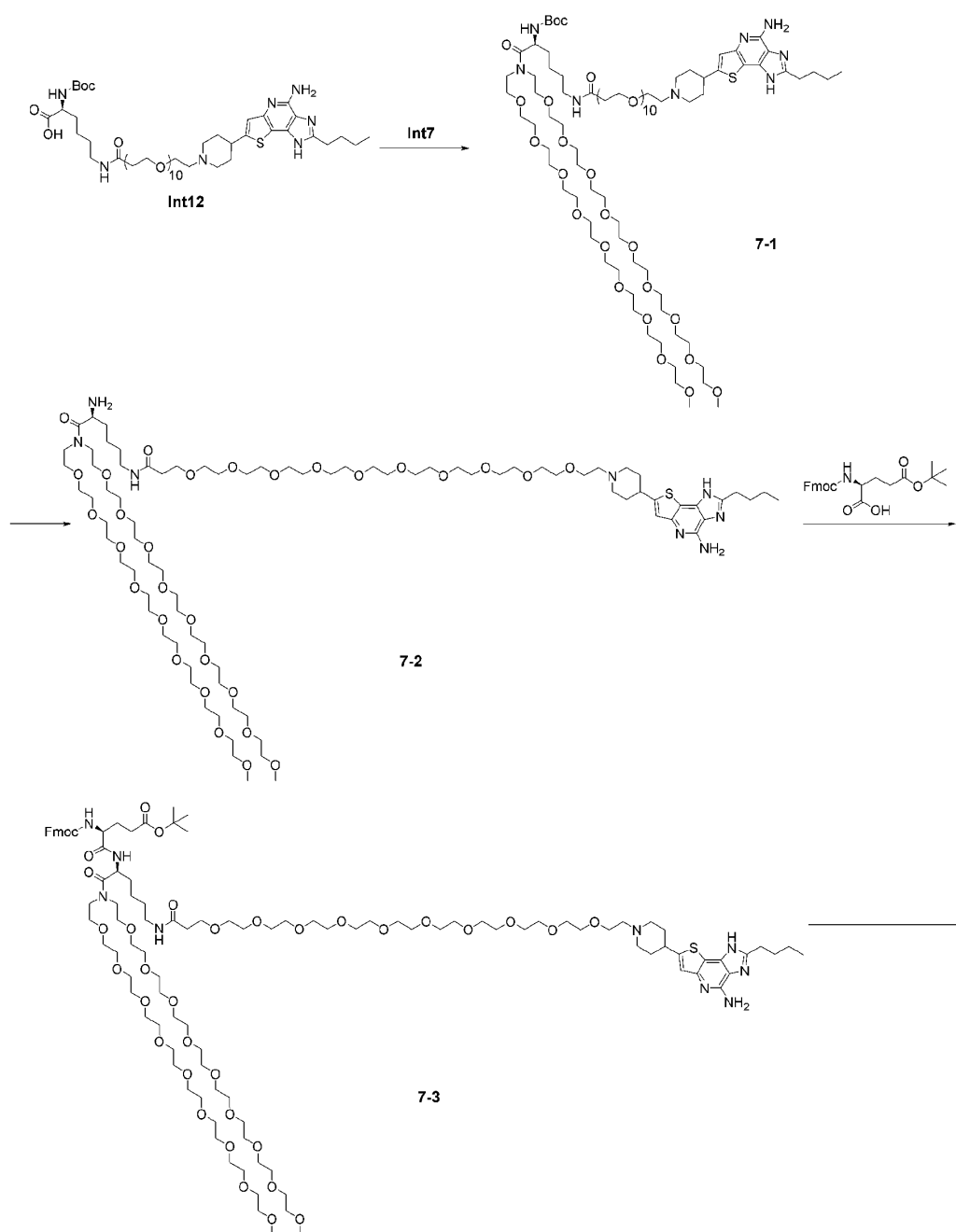
实施例 1-6: 化合物 C-6 的制备

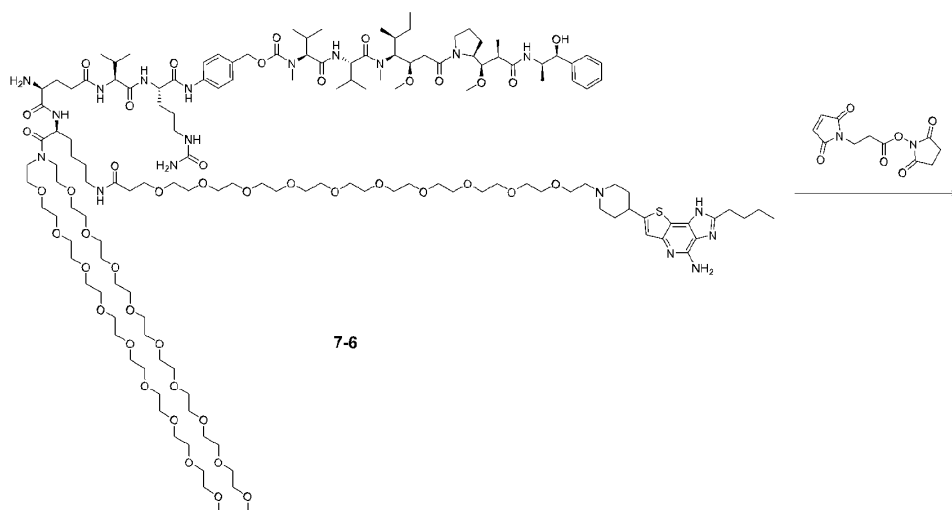
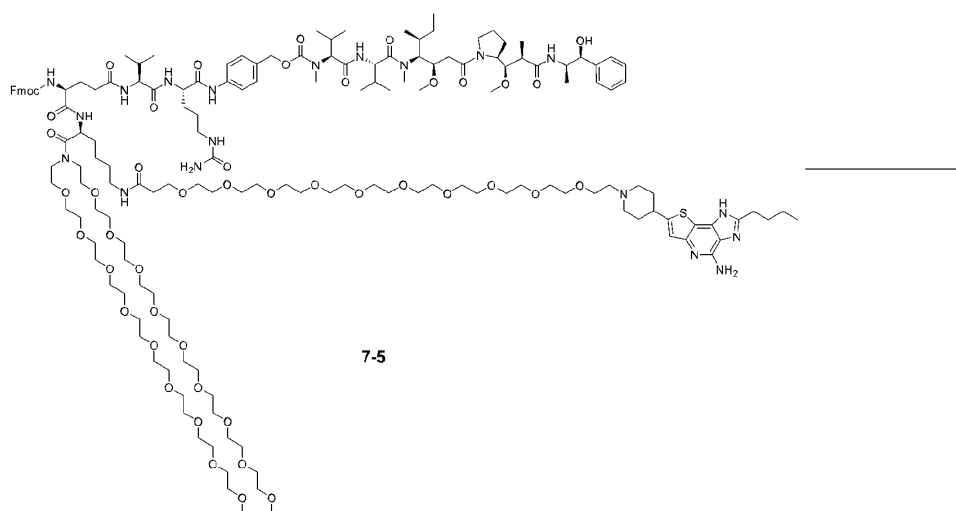
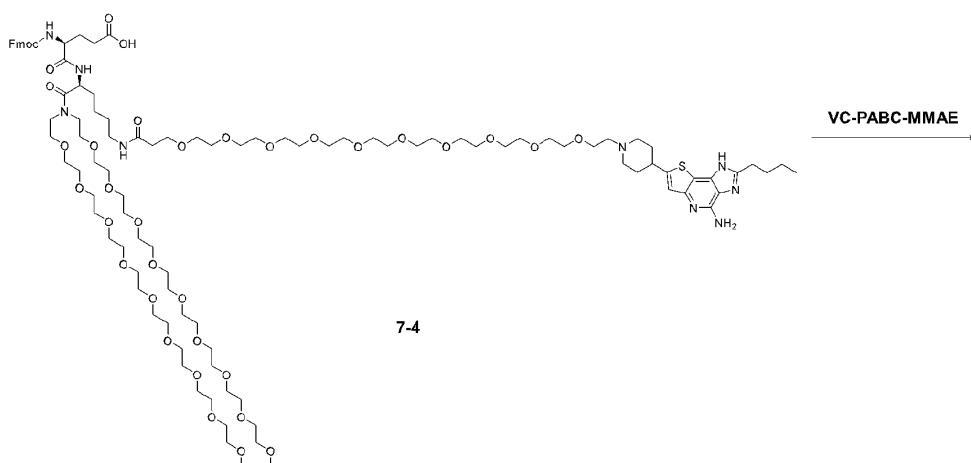


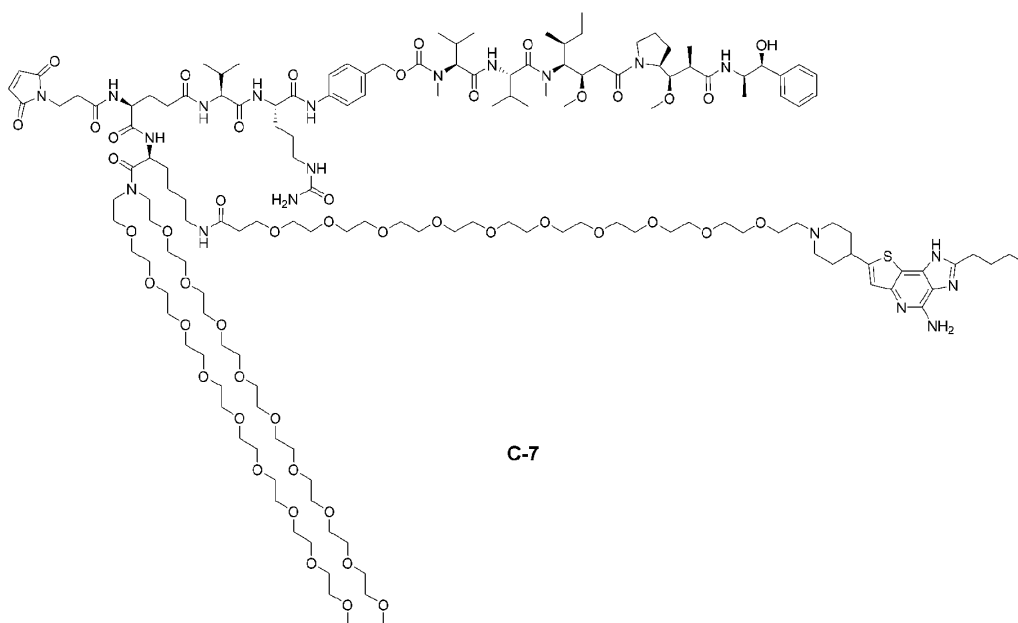
依次将化合物 Int11 (20 mg, 7.74 μ mol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(2.17 mg, 7.74 μ mol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(1.52 mg, 11.61 μ mol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(1.5 mL)中, 25 $^{\circ}$ C下反应 3 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物 (0.64 mg, 收率: 3%)。

MS m/z (ESI): 1303.3 [M/2+H]⁺.

实施例 1-7: 化合物 C-7 的制备







第一步：化合物 7-1 的制备

将化合物 Int12 (115 mg, 102.07 μmol)和化合物 Int7 (135.06 mg, 153.11 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 依次加入 *N,N*-二异丙基乙胺(27.77 mg, 204.14 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(61.29 mg, 153.11 μmol), 0°C反应 1 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=40%-50%), 得到本步的标题化合物(125 mg, 收率: 58.3%)。

MS m/z (ESI): 945.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 7-2 的制备

氮气保护下将化合物 7-1 (125 mg, 59.51 μmol)溶于氯化氢的 1,4-二氧六环溶液(2 mL, 4M)中, 25°C反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用二氯甲烷(15 mL)溶解后再次减压浓缩除去溶剂, 反复三次, 得到本步的标题化合物(140 mg, 收率: 90.4%)。

MS m/z (ESI): 895.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第三步：化合物 7-3 的制备

依次将化合物 7-2 (95 mg, 50.41 μmol)、(S)-2-(((9*H*-苻-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(135.06 mg, 153.11 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(13.72 mg, 100.82 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(30.27 mg, 75.62 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=40%-50%), 得到本步的标题化合物(120 mg, 收率: 97.5%)。

MS m/z (ESI): 1099.0 [M/2+H]⁺。

第四步：化合物 7-4 的制备

将化合物 7-3 (110 mg, 45.05 μmol)和三氟乙酸(2 mL)溶于二氯甲烷(6 mL)中，25°C反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：

5 A%=25%-35%)，得到本步的标题化合物(76 mg，收率：74.8%)。

MS m/z (ESI): 1071.1 [M/2+H]⁺。

第五步：化合物 7-5 的制备

依次将化合物 7-4 (60 mg, 26.62 μmol)、VC-PABC-MMAE (43.19 mg, 34.60 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(5.21 mg, 39.92 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(14.31 mg, 37.26 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，0°C反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=35%-45%)，得到本步的标题化合物(65 mg，收率：71.5%)。

MS m/z (ESI): 1623.5 [M/2+H]⁺。

第六步：化合物 7-6 的制备

15 依次将化合物 7-5 (65 mg, 19.02 μmol)和哌啶(3.27 mg, 129.16 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，25°C反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A，洗脱梯度：A%=25%-35%)，得到本步的标题化合物(55.6 mg，收率：91.8%)。

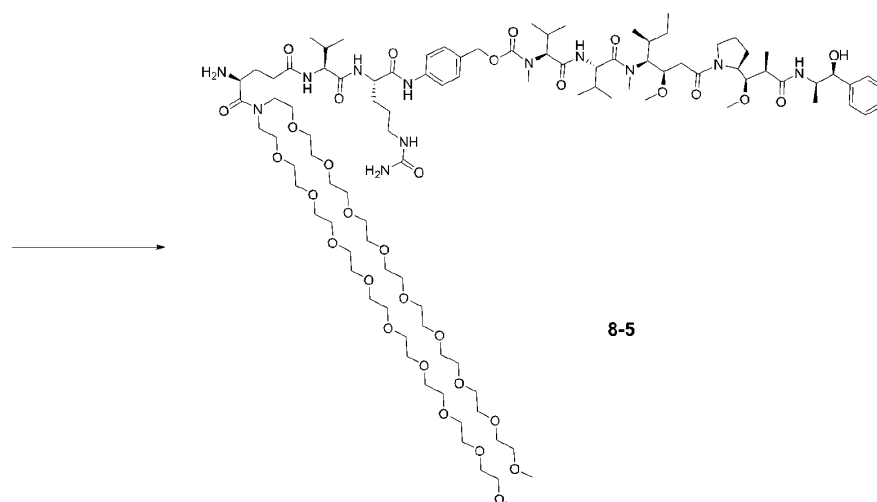
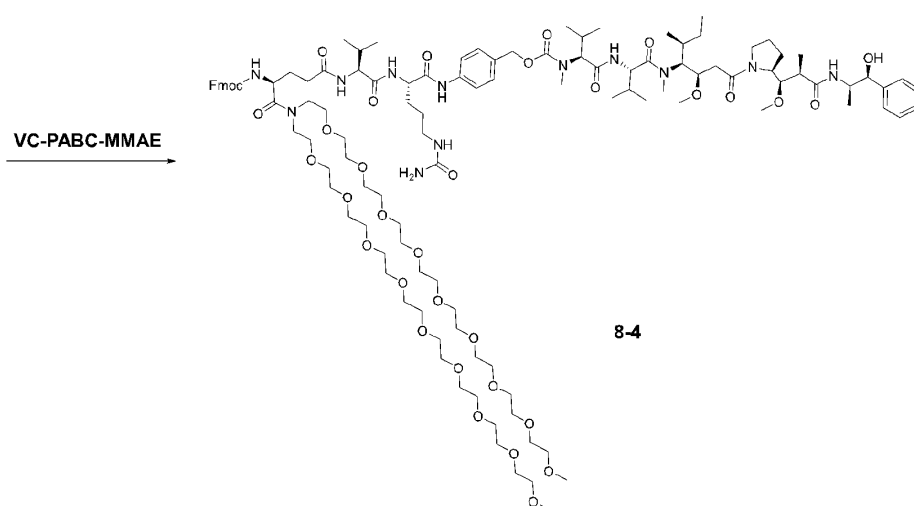
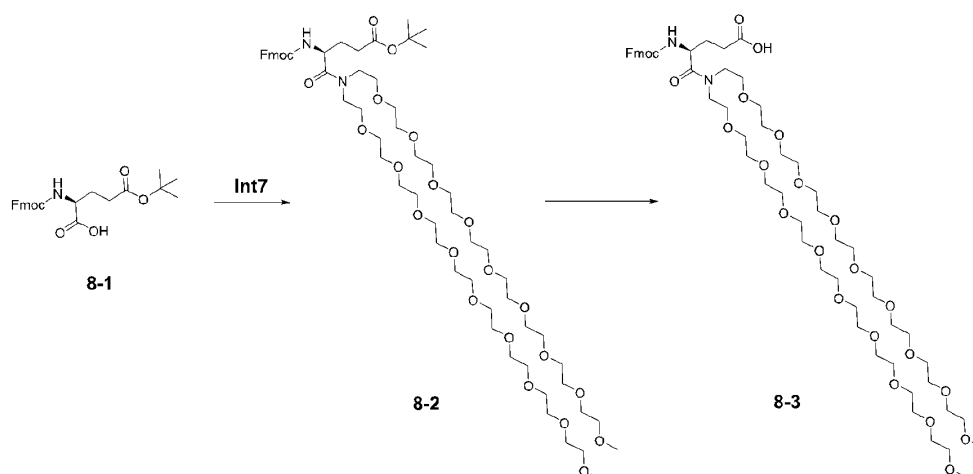
MS m/z (ESI): 1008.6 [M/3+H]⁺。

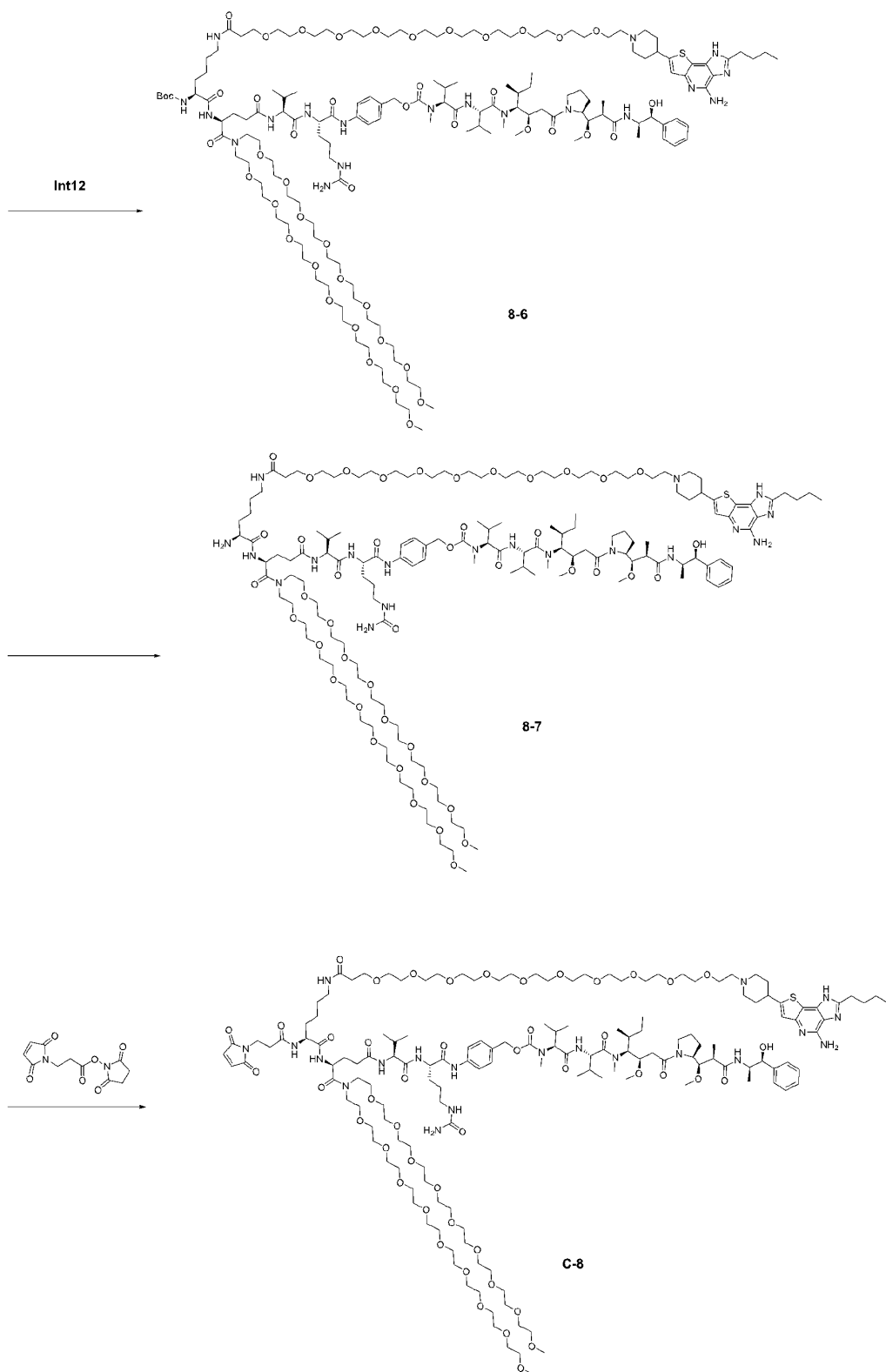
第七步：化合物 C-7 的制备

20 依次将化合物 7-6 (58 mg, 18.22 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(5.10 mg, 18.22 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.57 mg, 27.32 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(1.5 mL)中，25°C反应 3 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化，得到本步的标题化合物(28.33 mg，收率：46.5%)。

MS m/z (ESI): 1587.9 [M/2+H]⁺。

25 实施例 1-8：化合物 C-8 的制备





第一步：化合物 8-2 的制备

依次将化合物 Int7 (300 mg, 340.08 μmol)、(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(228.47 mg, 425.47 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(92.53 mg, 680.17 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(204.22 mg, 510.13 μmol)溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析色谱法纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=9/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(371mg, 收率: 78.8%)。

MS m/z (ESI): 1245.7 [M+H]⁺。

第二步：化合物 8-3 的制备

将化合物 8-2 (350 mg, 252.91 μmol)和三氟乙酸(2 mL)加入二氯甲烷(6 mL)中, 25°C反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(250 mg, 收率: 74.8%)。

MS m/z (ESI): 1189.6 [M+H]⁺。

第三步：化合物 8-4 的制备

依次将化合物 8-3 (105mg, 83.87 μmol)、VC-PABC-MMAE (110.85 mg, 83.87 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(19.71 mg, 150.96 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(45.11 mg, 117.44 μmol)溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(170 mg, 收率: 79.5%)。

MS m/z (ESI): 1147.7 [M/2+H]⁺。

第四步：化合物 8-5 的制备

将化合物 8-4 (156 mg, 64.58 μmol)和哌啶(11.11 mg, 129.16 μmol)加入 N,N-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 25°C反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(125 mg, 收率: 88.7%)。

MS m/z (ESI): 1036.7 [M/2+H]⁺。

第五步：化合物 8-6 的制备

依次将化合物 8-5 (120.05mg, 55.03 μmol)、化合物 Int12 (62 mg, 55.03 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(10.78 mg, 82.54 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(25.36 mg, 66.02 μmol)溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C反应 1 小时。反应液直

接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(170 mg, 收率: 89.0%)。

MS m/z (ESI): 1562.6 [M/2+H]⁺。

第六步: 化合物 8-7 的制备

- 5 氮气保护下依次将化合物 8-6 (160 mg, 48.64 μmol)和溴化锌(46.12 mg, 194.67 μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中, 25°C反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=30%-40%), 得到本步的标题化合物(140 mg, 收率: 90.4%)。

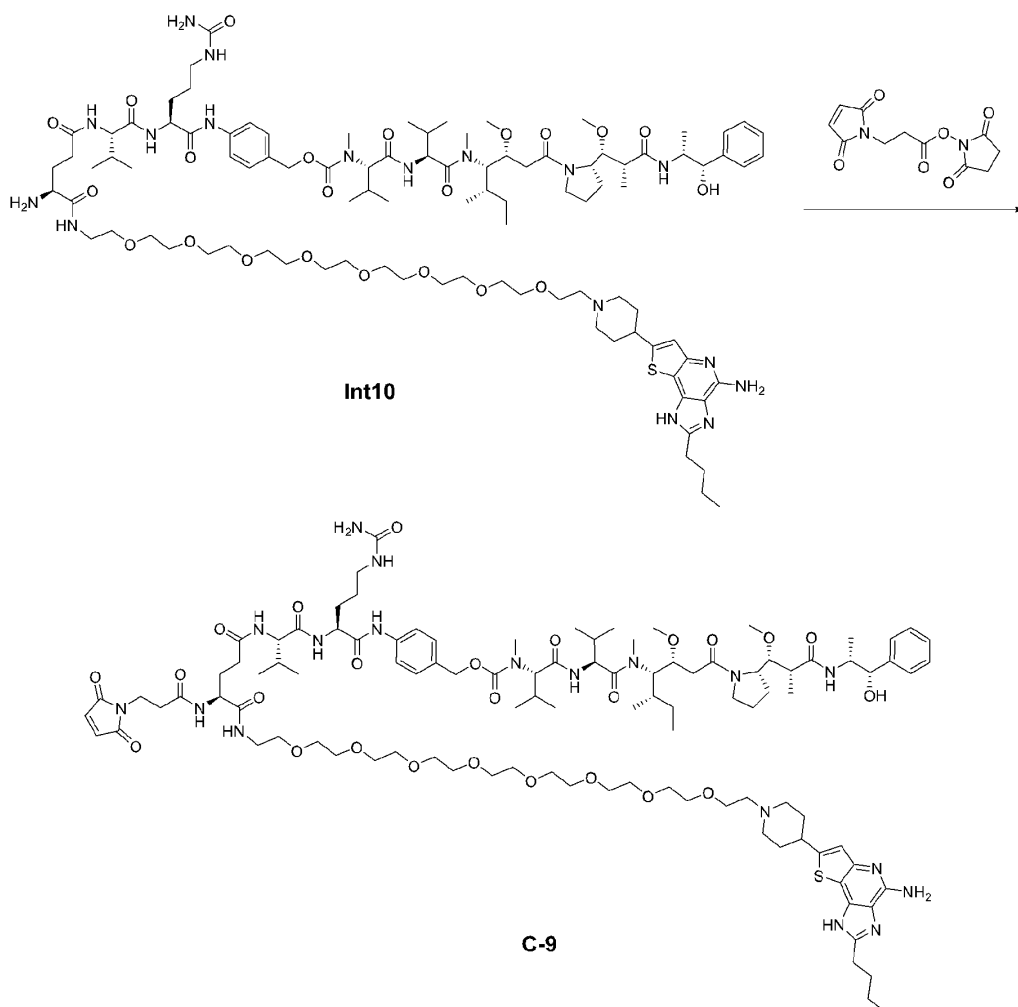
MS m/z (ESI): 1512.4 [M/2+H]⁺。

第七步: 化合物 C-8 的制备

- 10 依次将化合物 8-7 (80 mg, 125.13 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(7.04 mg, 25.13 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(4.92 mg, 37.69 μmol, 6.29 μL)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(1.5 mL)中, 25°C反应 3 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(19.4 mg, 收率: 23.1%)。

MS m/z (ESI): 1587.9 [M/2+H]⁺。

- 15 实施例 1-9: 化合物 C-9 的制备

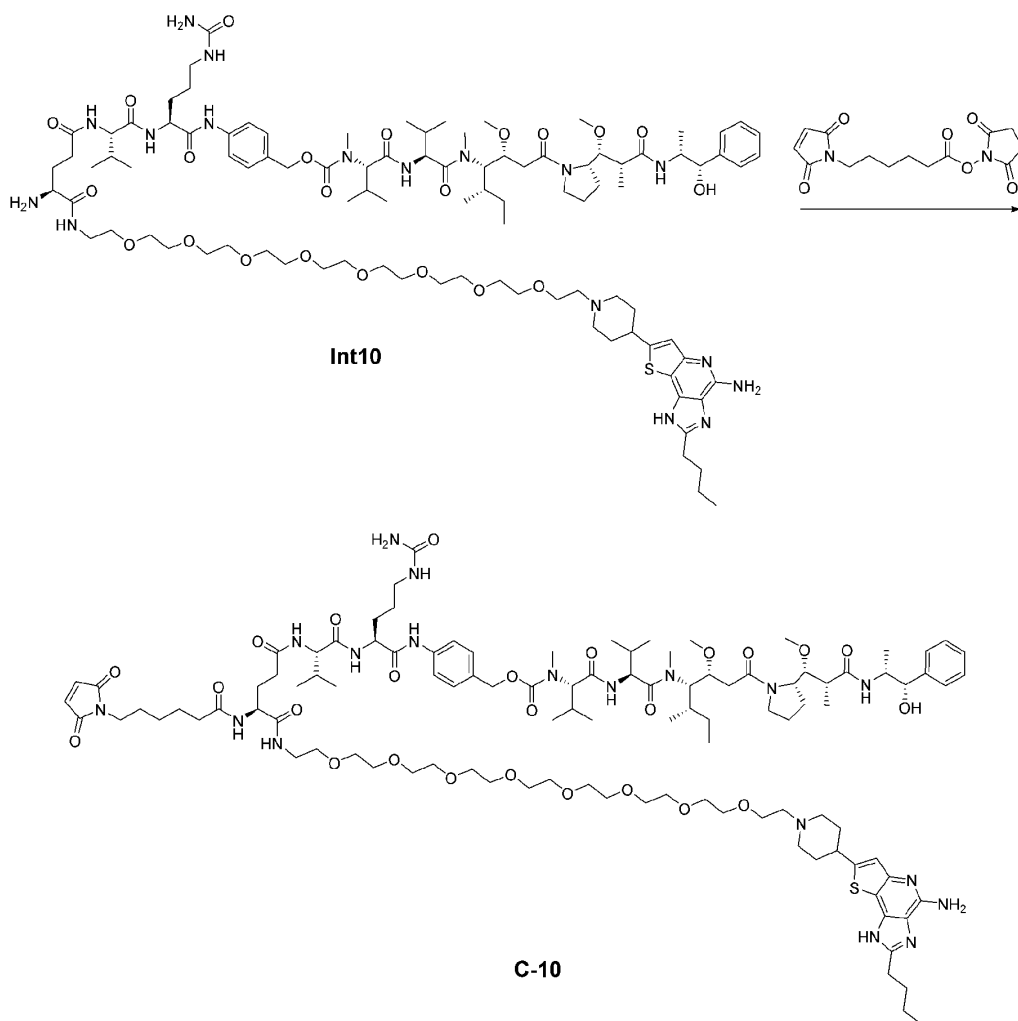


依次将化合物 Int10 (50 mg, 24.24 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯 (20.38 mg, 72.72 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(4.75 mg, 36.36 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化

5 合物(11 mg, 收率: 20.2%)。

MS m/z (ESI): 1055.5 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

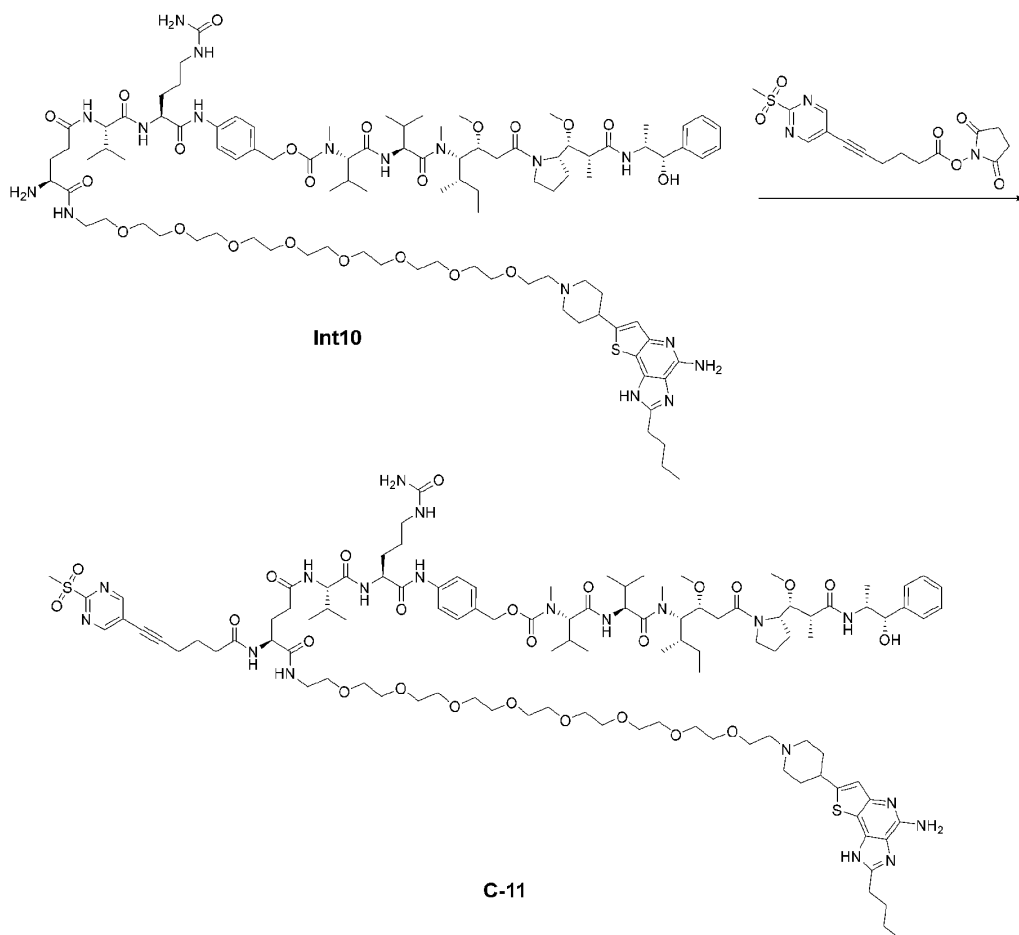
实施例 1-10: 化合物 C-10 的制备



依次将化合物 Int10 (60 mg, 29.09 μmol)、6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(9.44 mg, 09.09 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(45.70 mg, 43.63 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(11 mg, 5 收率: 16.3%)。

MS m/z (ESI): 1076.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

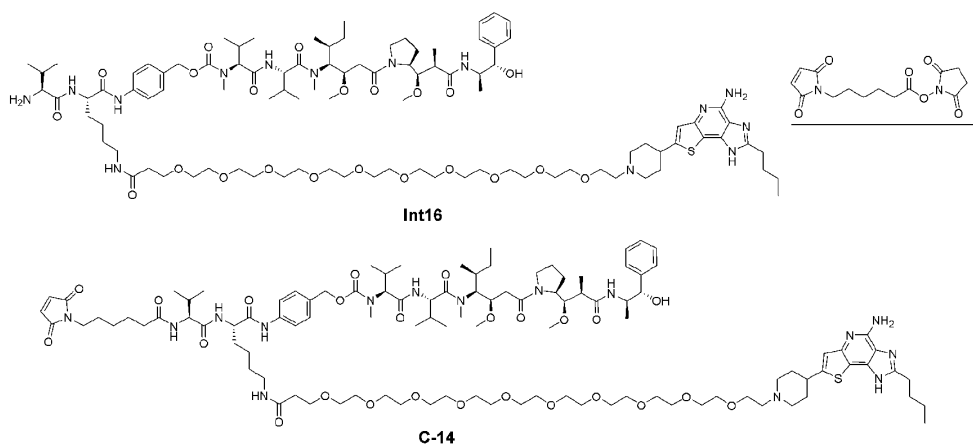
实施例 1-11: 化合物 C-11 的制备



- 依次将化合物 Int10 (60 mg, 29.09 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸盐(22.38 mg, 58.18 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(5.7 mg, 43.63 μmol)和 1-羟基苯并三唑(5.09 mg, 14.55 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C反应 2 小时。
- 5 反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(4 mg, 收率: 5.8%)。

MS m/z (ESI): 1105.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-12: 化合物 C-14 的制备

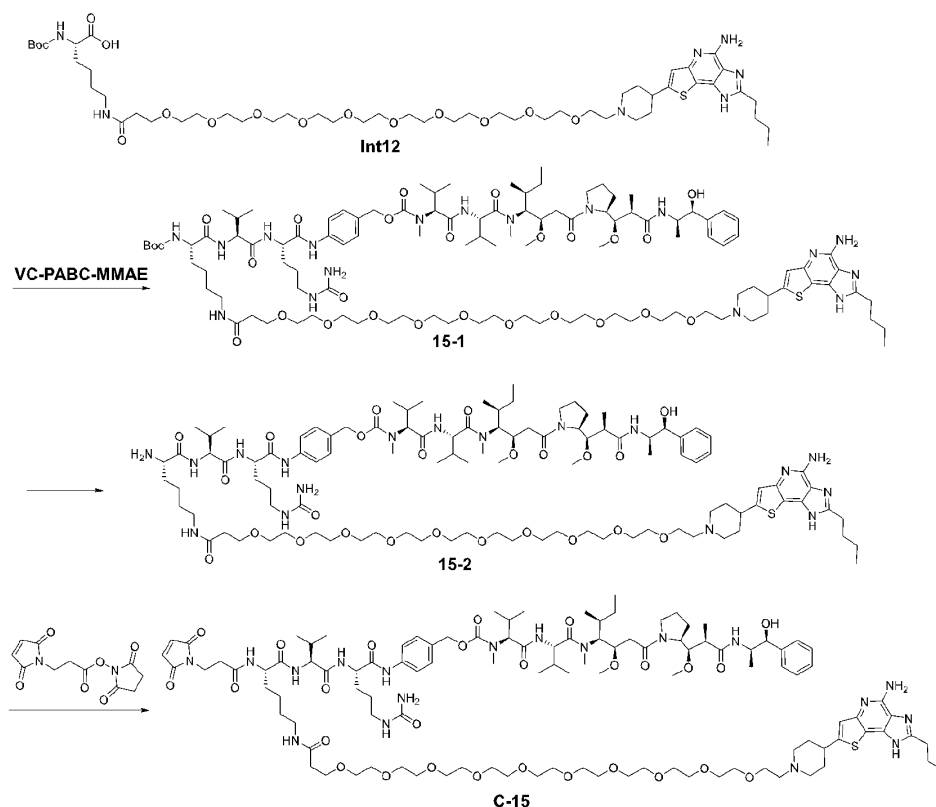


第一步：化合物 C-14 的制备

依次将化合 Int16 (22 mg, 10.32 μmol)、6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(4.82 mg, 15.48 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.36 mg, 25.80 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，
 5 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=25%-30%)，得到本步的标题化合物(12.73 mg，收率：54.31%)。

MS m/z (ESI): 1056.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-13：化合物 C-15 的制备



第一步：化合物 15-1 的制备

依次将化合物 Int12 (50 mg, 42.04 μmol)、VC-PABC-MMAE (52.48 mg, 42.04 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(13.70 mg, 105.11 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六
5 氟磷酸酯(19.37 mg, 50.45 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1.5 mL)中，室温反应 1.5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=45%-55%)，得到本步的标题化合物(41 mg，收率：40.34%)。

MS m/z (ESI): 1088.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 15-2 的制备

10 将化合物 15-1 (38 mg, 15.72 μmol)和无水溴化锌(17.88 mg, 78.59 μmol)加入无水二氯甲烷(3 mL)中，室温反应 5 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-30%)，得到本步的标题化合物(30 mg，收率：82.76%)。

MS m/z (ESI): 1038.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

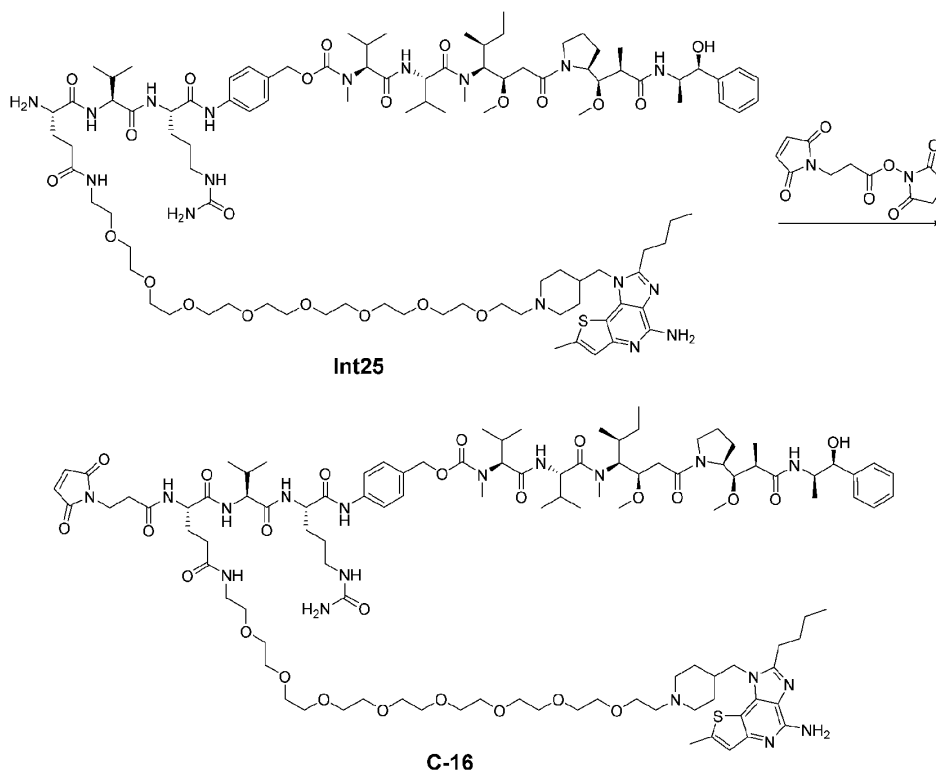
第三步：化合物 C-15 的制备

15 依次将化合物 15-2 (30 mg, 13.01 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(5.25

mg, 19.51 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.54 mg, 19.51 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 1.5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-40%), 得到本步的标题化合物(9.81 mg, 收率: 31.52%)。

MS m/z (ESI): 1113.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

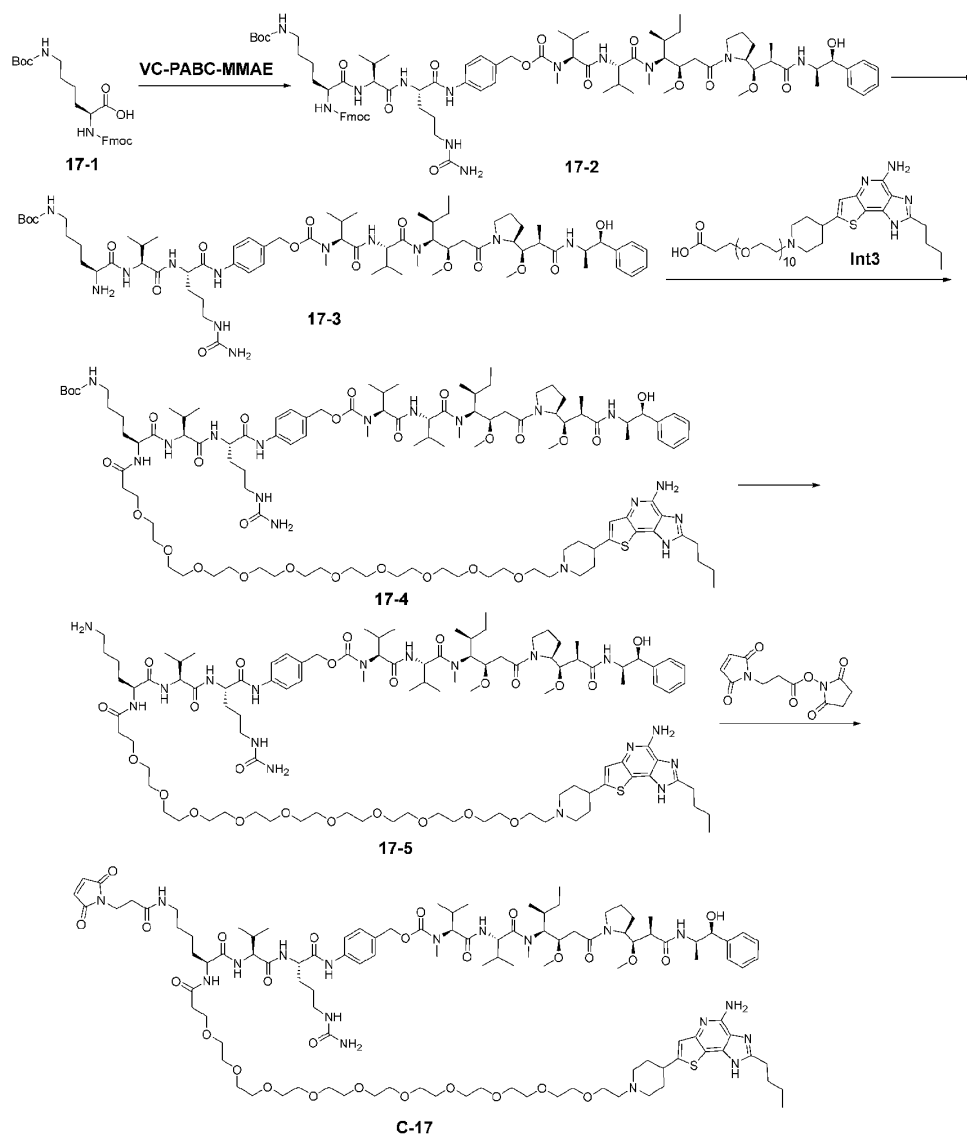
5 实施例 1-14: 化合物 C-16 的制备



依次将化合物 Int25 (25 mg, 12.58 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯 (10.05 mg, 37.74 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.34 mg, 17.92 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(8 mg, 收率: 31.3%)。

MS m/z (ESI): 1069.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-15: 化合物 C-17 的制备



第一步：化合物 17-2 的制备

依次将 VC-PABC-MMAE (60 mg, 53.41 μmol)、*N*²-(((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)-*N*⁶-(叔丁氧羰基)-*L*-赖氨酸(25 mg, 53.41 μmol)、*N*,*N*-二异丙基乙胺(17.2 mg, 133.52 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(24.35 mg, 64.09 μmol)加入 *N*,*N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 1 小时。将反应体系倒入冰水中(10 mL), 乙酸乙酯萃取(5 mL*3), 合并有机相并用饱和食盐水反洗(3 mL*2), 无水硫酸钠干燥有机相, 有机相浓缩得到本步的标题化合物(82 mg, 粗品)。

MS *m/z* (ESI): 1574.0 [*M*+*H*]⁺。

第二步：化合物 17-3 的制备

依次将化合物 17-2 (82.00 mg, 粗品)和哌啶(8.07 mg, 93.78 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(41 mg, 两步总收率: 56.75%)。

5 MS m/z (ESI): 1351.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步：化合物 17-4 的制备

依次将化合物 17-3 (41.00 mg, 30.32 μmol)、化合物 Int3 (25.52 mg, 30.32 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(9.78 mg, 75.81 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(17.28 mg, 45.48 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-50%), 得到本步的标题化合物(35 mg, 收率: 53.06%)。

10 MS m/z (ESI): 1088.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第四步：化合物 17-5 的制备

将化合物 17-4 (35 mg, 16.09 μmol)和无水溴化锌(14.28 mg, 64.36 μmol)加入二氯甲烷(2 mL)中, 室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-30%), 得到本步的标题化合物(25 mg, 收率: 74.87%)。

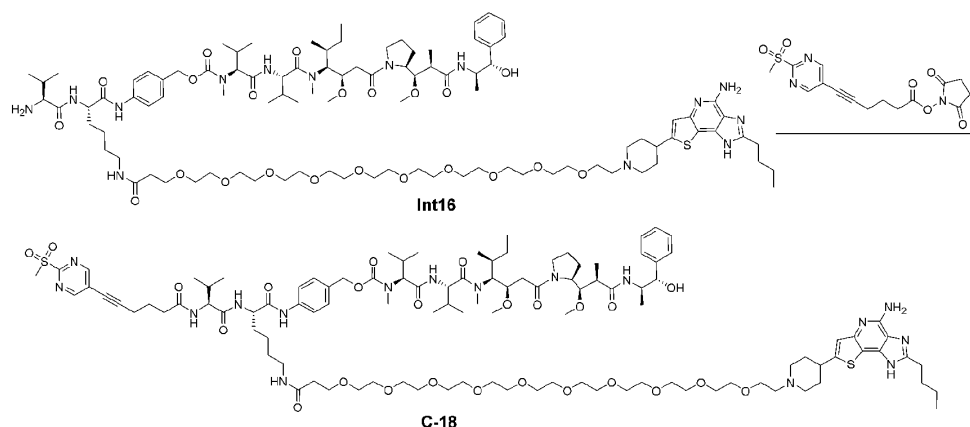
15 MS m/z (ESI): 1038.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第五步：化合物 C-17 的制备

依次将化合物 17-5 (25 mg, 12.05 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(4.37 mg, 16.26 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.12 mg, 24.10 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=30%-45%), 得到本步的标题化合物(11.1 mg, 收率: 41.38%)。

20 MS m/z (ESI): 1113.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

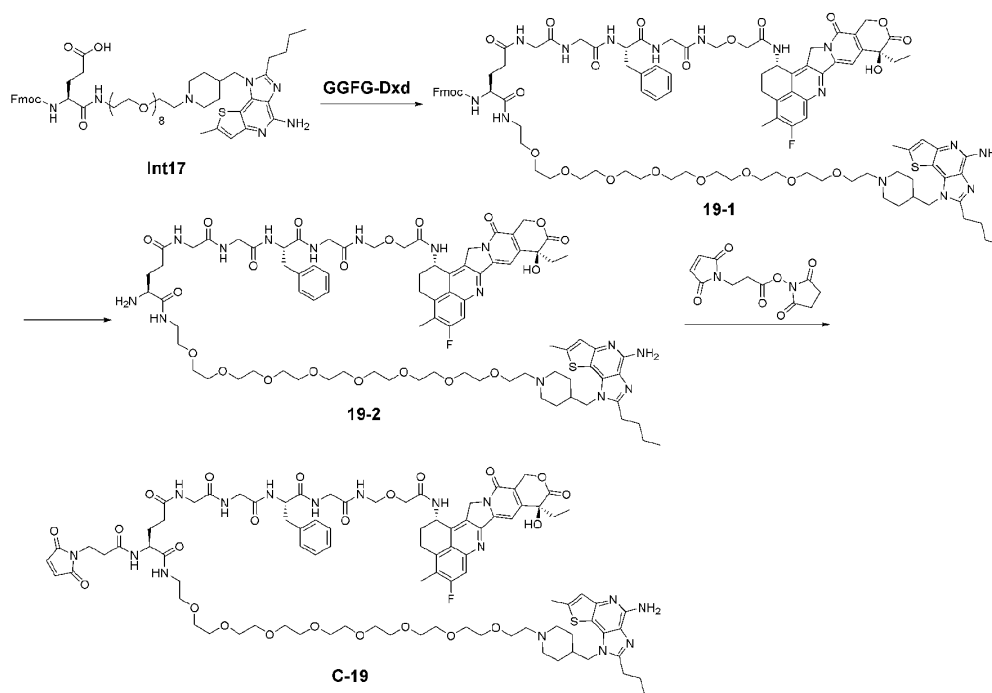
实施例 1-16：化合物 C-18 的制备



依次将化合物 Int16 (16 mg, 8.34 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(4.57 mg, 12.51 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.15 mg, 16.68 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(0.5 mL)中, 室温反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 5 B, 洗脱梯度: A%=25%-40%), 得到本步的标题化合物(2.87 mg, 收率: 15.87%)。

MS m/z (ESI): 1084.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-17: 化合物 C-19 的制备



第一步: 化合物 19-1 的制备

依次将化合物 Int17 (25 mg, 22.64 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(4.21 mg, 32.26 μmol)、

2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(9.91 mg, 25.81 μmol)和 GGFG-Dxd (20.09 mg, 22.64 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 C, 洗脱梯度: A%=15%-25%), 得到本步的标题化合物(38 mg, 收率: 91.7%)。

5 MS m/z (ESI): 964.0 $[M/2+H]^+$ 。

第二步: 化合物 19-2 的制备

将化合物 19-1 (31 mg, 16.08 μmol)和二乙胺(6.85 mg, 80.4 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=50%-60%), 得到本步的标题化合物(20 mg, 收率: 72.9%)。

10 MS m/z (ESI): 852.8 $[M/2+H]^+$ 。

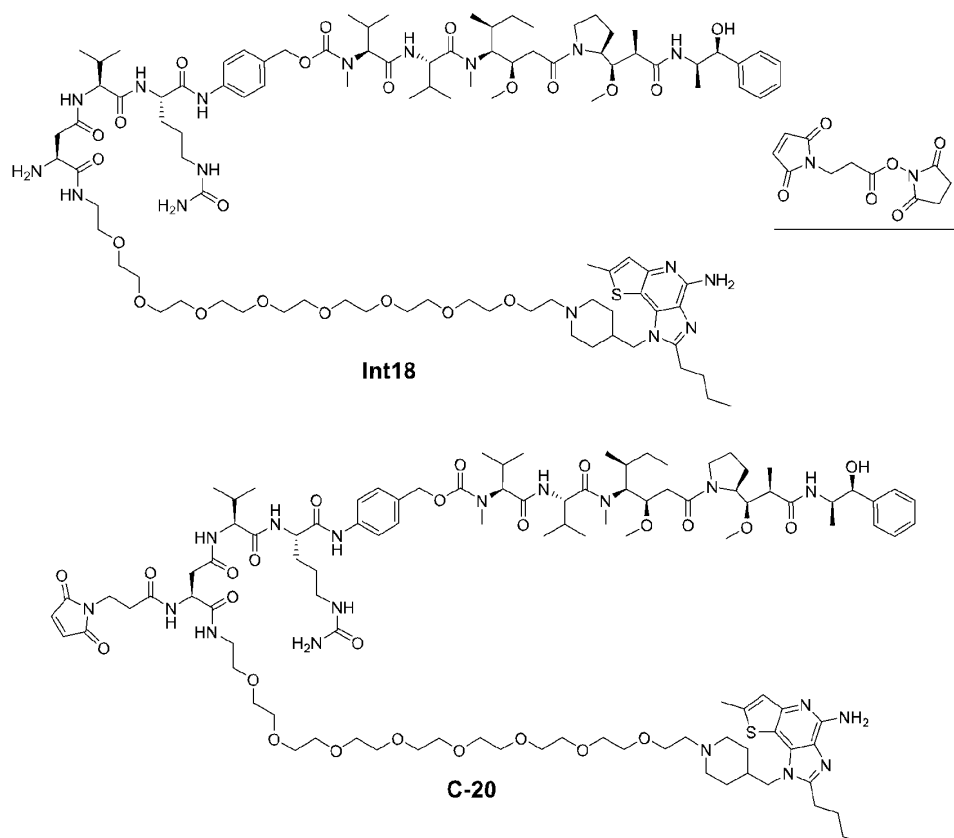
第三步: 化合物 C-19 的制备

依次将化合物 19-2(20 mg, 11.73 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(6.25 mg, 23.46 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.18 mg, 16.72 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(15 mg, 收率: 72.5%)。

15

MS m/z (ESI): 928.4 $[M/2+H]^+$ 。

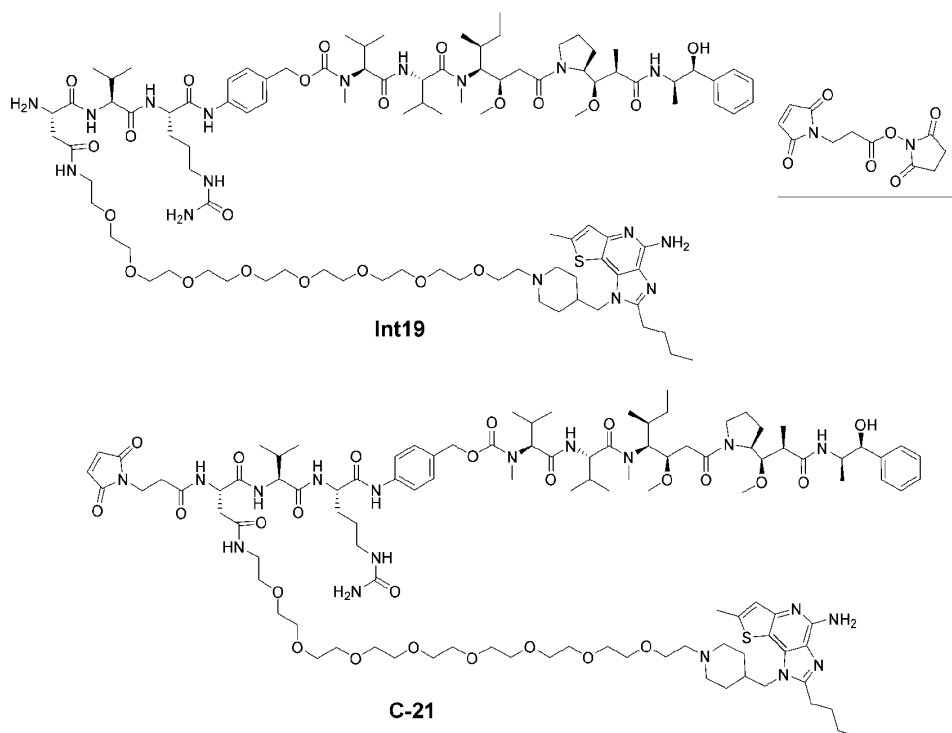
实施例 1-18: 化合物 C-20 的制备



- 依次将化合物 Int18 (28 mg, 14.19 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(5.66 mg, 21.28 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.75 mg, 21.28 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(0.5 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：
 5 A%=20%-35%)，得到本步的标题化合物(7.64 mg，收率：25.34%)。

MS m/z (ESI): 1062.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

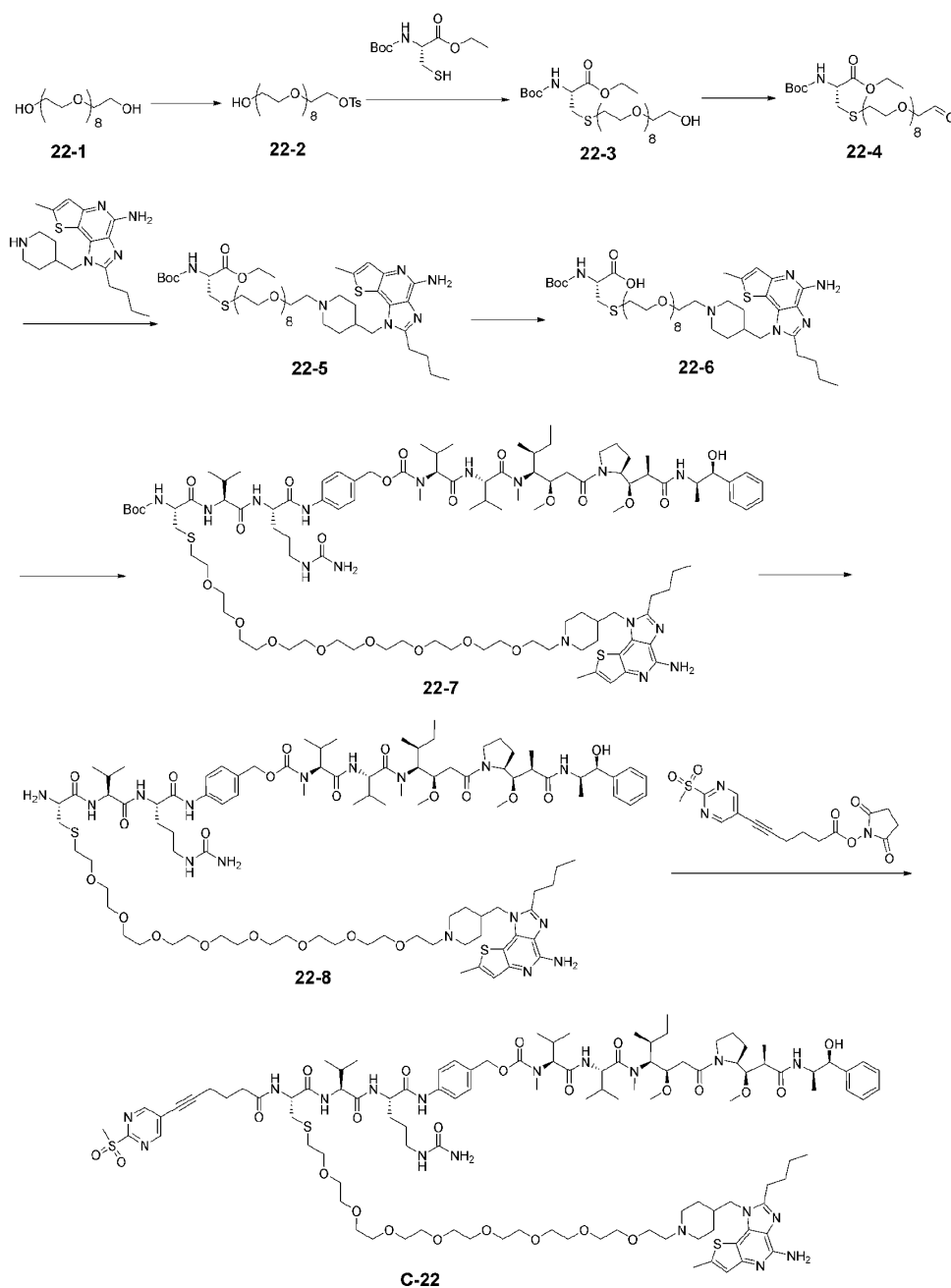
实施例 1-19：化合物 C-21 的制备



依次将化合物 Int19 (23.15 mg, 11.73 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯 (6.25 mg, 23.46 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.18 mg, 16.72 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(12 mg, 收率: 50.7%)。

MS m/z (ESI): 1062.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-20: 化合物 C-22 的制备



第一步：化合物 22-2 的制备

将九甘醇(1.2 g, 2.9 mmol)和对甲苯磺酰氯(250.52 mg, 2.9 mmol)溶于无水二氯甲烷(20 mL)中，再加入氢氧化钾(324.89 mg, 5.79 mmol)，25°C 反应 10 小时。反应液浓缩，所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=30/1(v/v))，得到本步的标题化合物(1.1 g，收率：66.7%)。

MS m/z (ESI): 586.4 [M+NH₄]⁺。

第二步：化合物 22-3 的制备

将化合物 22-2 (460 mg, 808.9 μmol)和 *N*-叔丁氧羰基-*L*-半胱氨酸乙酯(242 mg, 970.67 μmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL)中，再加入碘化钾(13.43 mg, 80.89 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(150 mg, 1152.68 μmol)，25°C 反应 10 小时。反应液浓缩，所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=5/1(v/v))，得到本步的标题化合物(320 mg, 收率：64.5%)。

MS m/z (ESI): 646.1 [M+H]⁺。

第三步：化合物 22-4 的制备

将化合物 22-3 (220 mg, 337.26 μmol)和戴斯马丁氧化剂(216.66 mg, 505.89 μmol)加入二氯甲烷(15 mL)中，25°C 反应 10 小时。向反应液中加入饱和硫代硫酸钠溶液(5 mL)和饱和碳酸氢钠水溶液(10 mL)，搅拌至澄清，再加入二氯甲烷萃取三次，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液浓缩，所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=20/1(v/v))，得到本步的标题化合物(185 mg, 收率：85.2%)。

MS m/z (ESI): 644.3 [M+H]⁺。

15 第四步：化合物 22-5 的制备

依次将化合物 22-4 (146.31 mg, 227.26 μmol)、化合物 Int13 (65 mg, 181.81 μmol)、氰基硼氢化钠(31.56 mg, 502.2 mmol)和冰乙酸(31.4 mg, 518.16 mmol)加入 1,2-二氯乙烷(4 mL)和甲醇(2 mL)的混合溶剂中，25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品溶于甲醇(3 mL)中，用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-30%)，得到本步的标题化合物(109 mg, 收率：63.8%)。

MS m/z (ESI): 985.5 [M+H]⁺。

第五步：化合物 22-6 的制备

将化合物 22-5 (100 mg, 101.49 μmol)溶于甲醇(4 mL)中，加入氢氧化锂(21.31 mg, 507.46 μmol)的水溶液(1 mL)，25°C 反应 4 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=35%-45%)，得到本步的标题化合物(85 mg, 收率：87.5%)。

MS m/z (ESI): 957.5 [M+H]⁺。

第六步：化合物 22-7 的制备

依次将化合物 22-6 (65 mg, 67.91 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(12.63 mg, 96.76 μmol, 16.15 μL)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(34.69 mg, 90.31 μmol)和

VC-PABC-MMAE (76.28 mg, 67.91 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=30%-45%), 得到本步的标题化合物(85 mg, 收率: 63.9%)。

MS m/z (ESI): 1031.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

5 第七步: 化合物 22-8 的制备

将化合物 22-7 (38 mg, 18.42 μmol)和溴化锌(31.85 mg, 140.01 μmol)加入无水二氯甲烷 (2 mL)中, 25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 87.0%)。

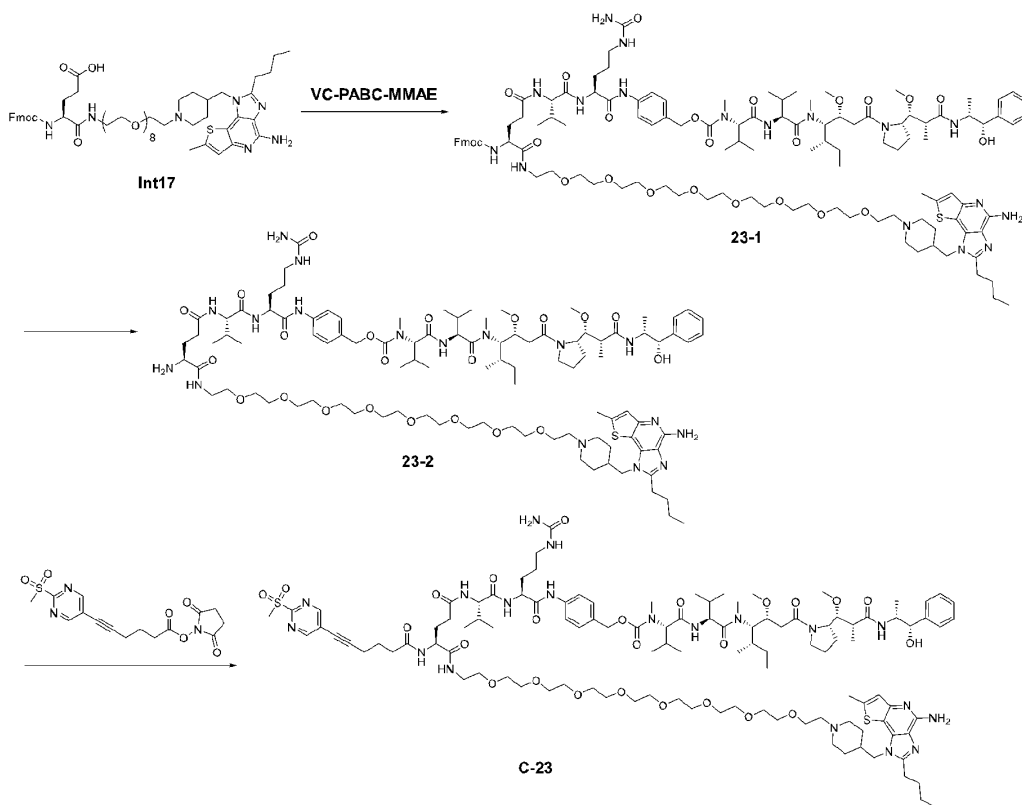
MS m/z (ESI): 981.5 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

10 第八步: 化合物 C-22 的制备

依次将化合物 22-8 (30 mg, 15.28 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(8.94 mg, 24.46 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.84 mg, 21.75 μmol , 3.64 μL)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL), 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(20 mg, 收率: 62.2%)。

15 MS m/z (ESI): 1106.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-21: 化合物 C-23 的制备



第一步：化合物 23-1 的制备

依次将化合物 Int17 (51 mg, 46.19 μmol)、VC-PABC-MMAE (51.88 mg, 46.19 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(24.37 mg, 187.03 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六
5 氟磷酸酯(19.14 mg, 49.88 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 1.5 小时。将反应体系倒入冰水(10 mL)中，乙酸乙酯萃取(5 mL*3)，合并有机相并用饱和食盐水反洗(3 mL*2)，无水硫酸钠干燥有机相，有机相浓缩得到本步的标题化合物(86 mg，收率：84.27%)。

MS m/z (ESI): 1105.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 23-2 的制备

10 将化合物 23-1 (86 mg, 38.93 μmol)和哌啶(5.36 mg, 62.27 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：
A%=20%-25%)，得到本步的标题化合物(47 mg，收率：60.79%)。

MS m/z (ESI): 1987.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

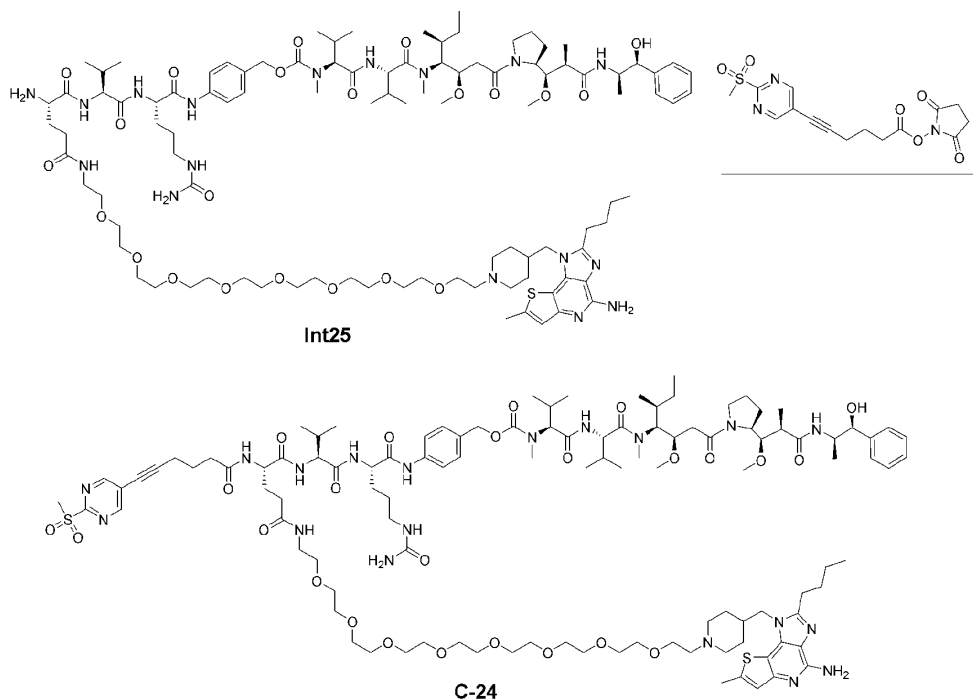
第三步：化合物 C-23 的制备

15 依次将化合物 23-2 (47 mg, 23.66 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶

-5-基)六-5-炔酸酯(12.99 mg, 35.49 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(5.55 mg, 42.57 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(0.5 mL)中, 室温反应 1.5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步的标题化合物(37.38 mg, 收率: 70.60%)。

MS m/z (ESI): 1119.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

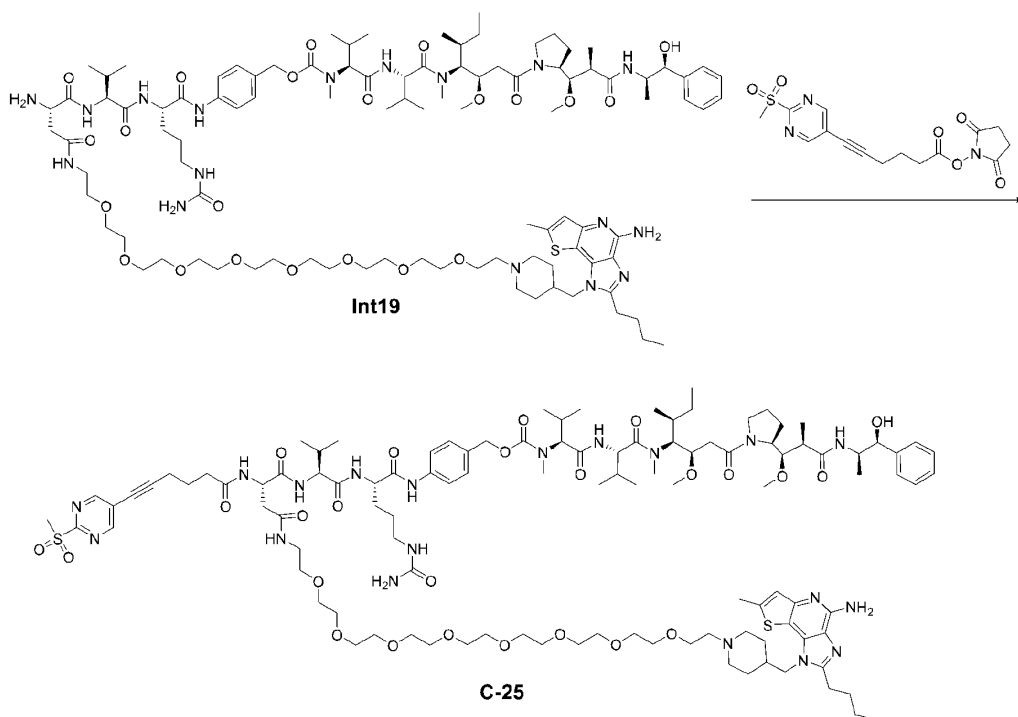
5 实施例 1-22: 化合物 C-24 的制备



依次将化合物 Int25 (28.80 mg, 14.49 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(5.88 mg, 14.49 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.78 mg, 28.98 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(0.5 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步的标题化合物(13.57 mg, 收率: 41.83%)。

MS m/z (ESI): 1119.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

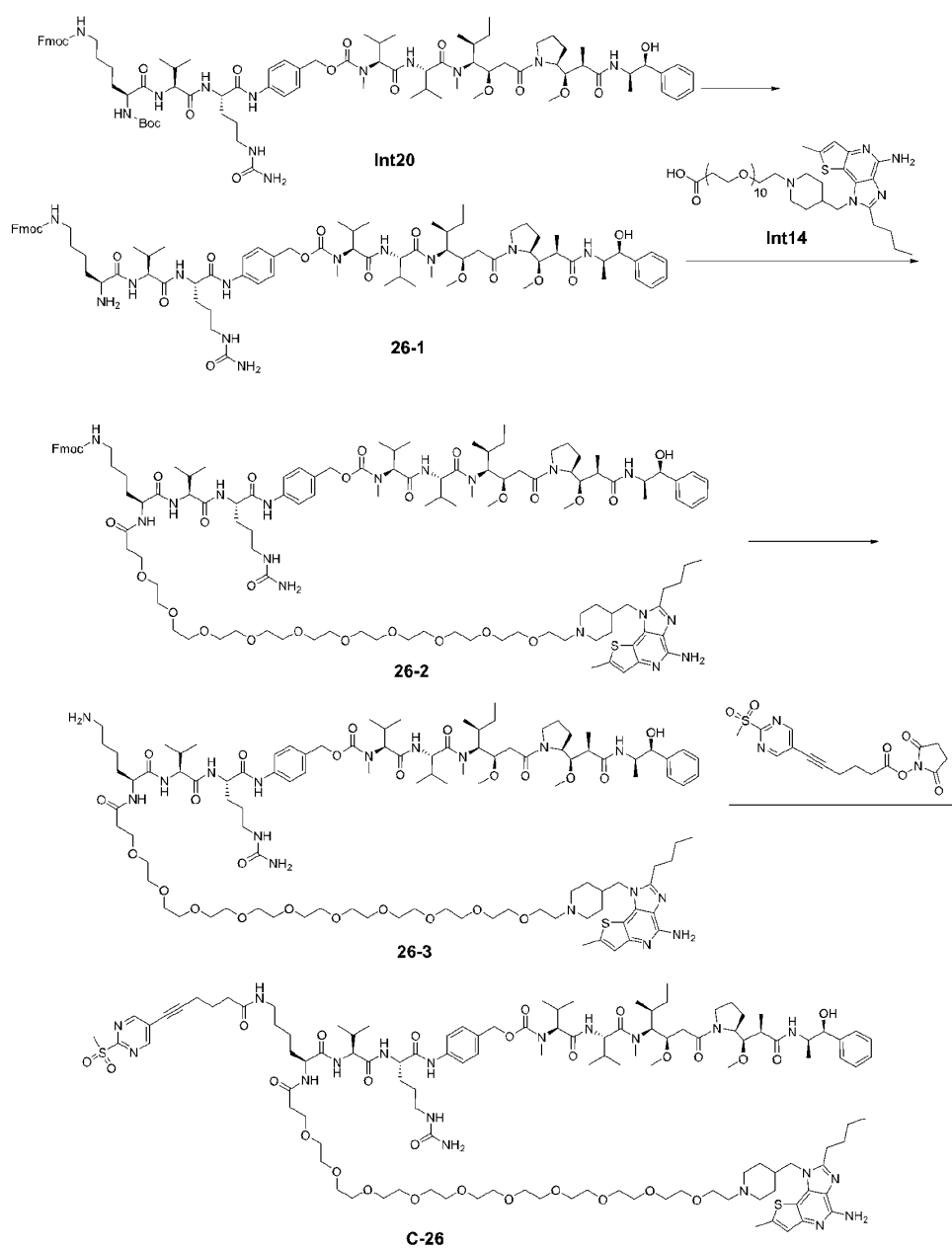
10 实施例 1-23: 化合物 C-25 的制备



- 依次将化合物 Int19 (24.7 mg, 12.52 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(5.08 mg, 12.52 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.26 mg, 25.03 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步的标题化合物(17.16 mg, 收率: 61.66%)。

MS m/z (ESI): 1112.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-24: 化合物 C-26 的制备



第一步：化合物 26-1 的制备

将化合物 Int20 (87 mg, 55.27 μmol)和溴化锌(95.56 mg, 420.09 μmol)加入无水二氯甲烷(3 mL)中, 25°C 反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: 5 A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(61 mg, 收率: 78.8%)。

MS m/z (ESI): 1473.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 26-2 的制备

依次将化合物 Int14 (21.25 mg, 24.42 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(4.54 mg, 34.81 μmol)、
2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(12.48 mg, 32.49 μmol)和化合物 26-1
(36 mg, 24.42 μmol)，加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中，0°C 反应 1 小时。反应液直
接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-35%)，得到本步的标题化合物(45
5 mg，收率：83.4%)。

MS m/z (ESI): 1163.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第三步：化合物 26-3 的制备

将化合物 26-2 (40 mg, 17.03 μmol)和二乙胺(6.29 mg, 85.13 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲
酰胺(4 mL)中，25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：
10 A%=25%-35%)，得到本步的标题化合物(30 mg，收率：83.8%)。

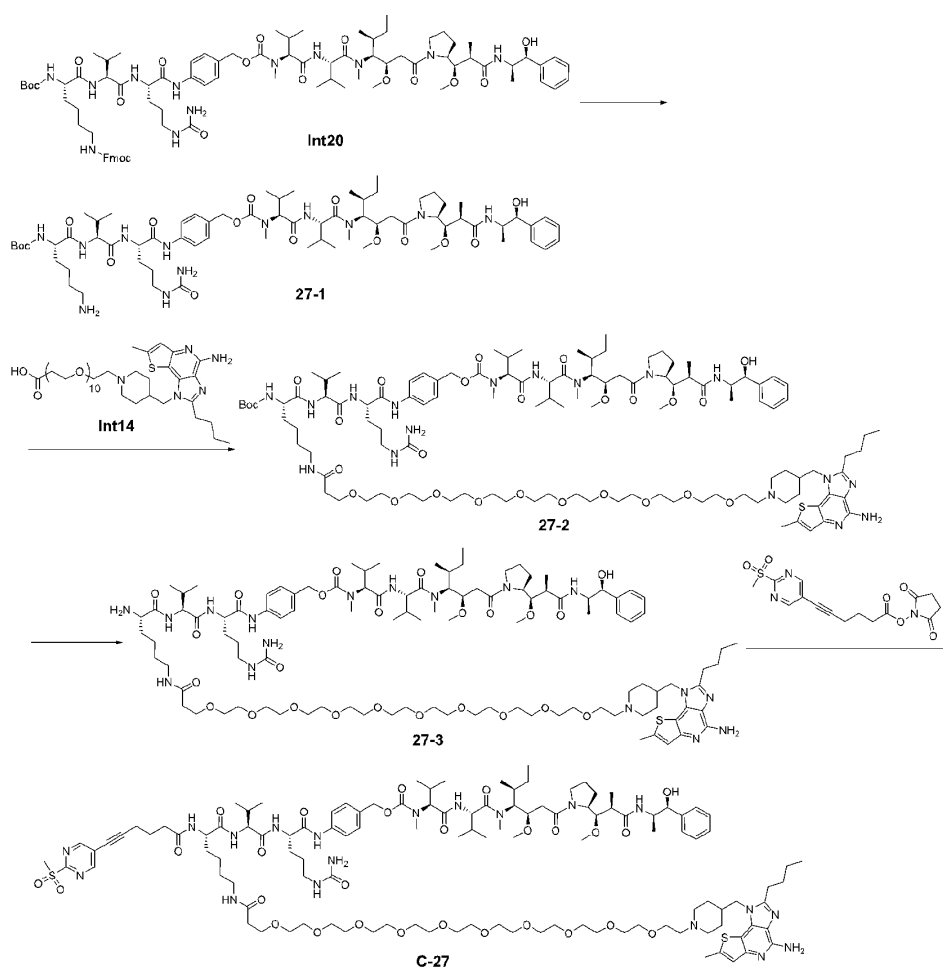
MS m/z (ESI): 1052.3 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第四步：化合物 C-26 的制备

依次将化合物 26-3 (20 mg, 9.50 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-
基)六-5-炔酸酯(5.56 mg, 15.21 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(1.77 mg, 13.67 μmol)加入无水
15 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化，得到
本步的标题化合物(8 mg，收率：37.6%)。

MS m/z (ESI): 1177.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-25：化合物 C-27 的制备



第一步：化合物 27-1 的制备

将化合物 Int20 (85 mg, 53.46 μmol)和二乙胺(19.75 mg, 267.32 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(73 mg, 收率: 98.6%)。

MS m/z (ESI): 1351.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 27-2 的制备

依次将化合物 Int14 (55.52 mg, 63.81 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(10.32 mg, 79.07 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(28.34mg, 73.8 μmol)和化合物 27-1 (75 mg, 55.48 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-40%), 得到本步的标题化合物(38 mg, 收率: 32.7%)。

MS m/z (ESI): 1102.2 [M/2+H]⁺。

第三步：化合物 27-3 的制备

将化合物 27-2 (38 mg, 17.24 μmol)和溴化锌(29.81 mg, 131.05 μmol)加入无水二氯甲烷 (3 mL)中，25°C 反应 3 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-30%)，得到本步的标题化合物(61 mg，收率：78.8%)。

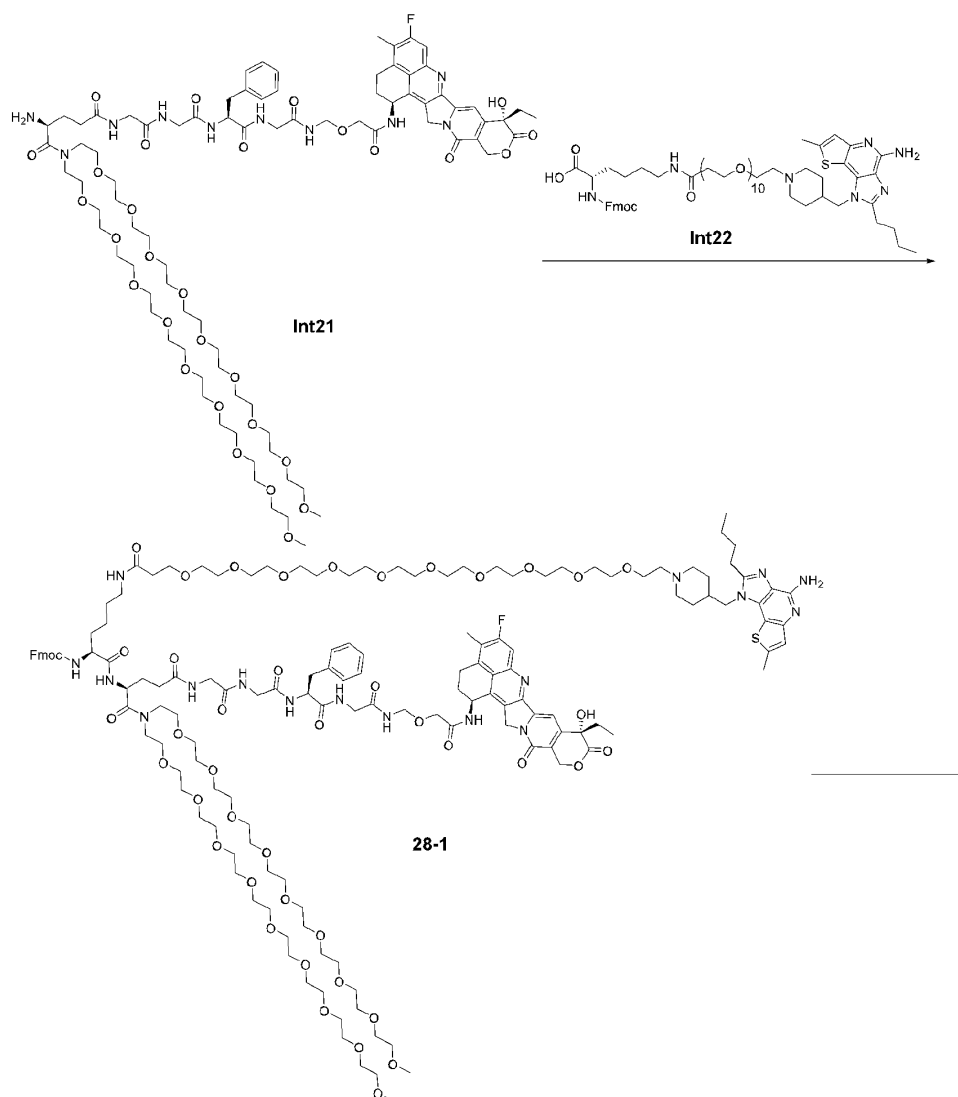
MS m/z (ESI): 701.8 [M/3+H]⁺。

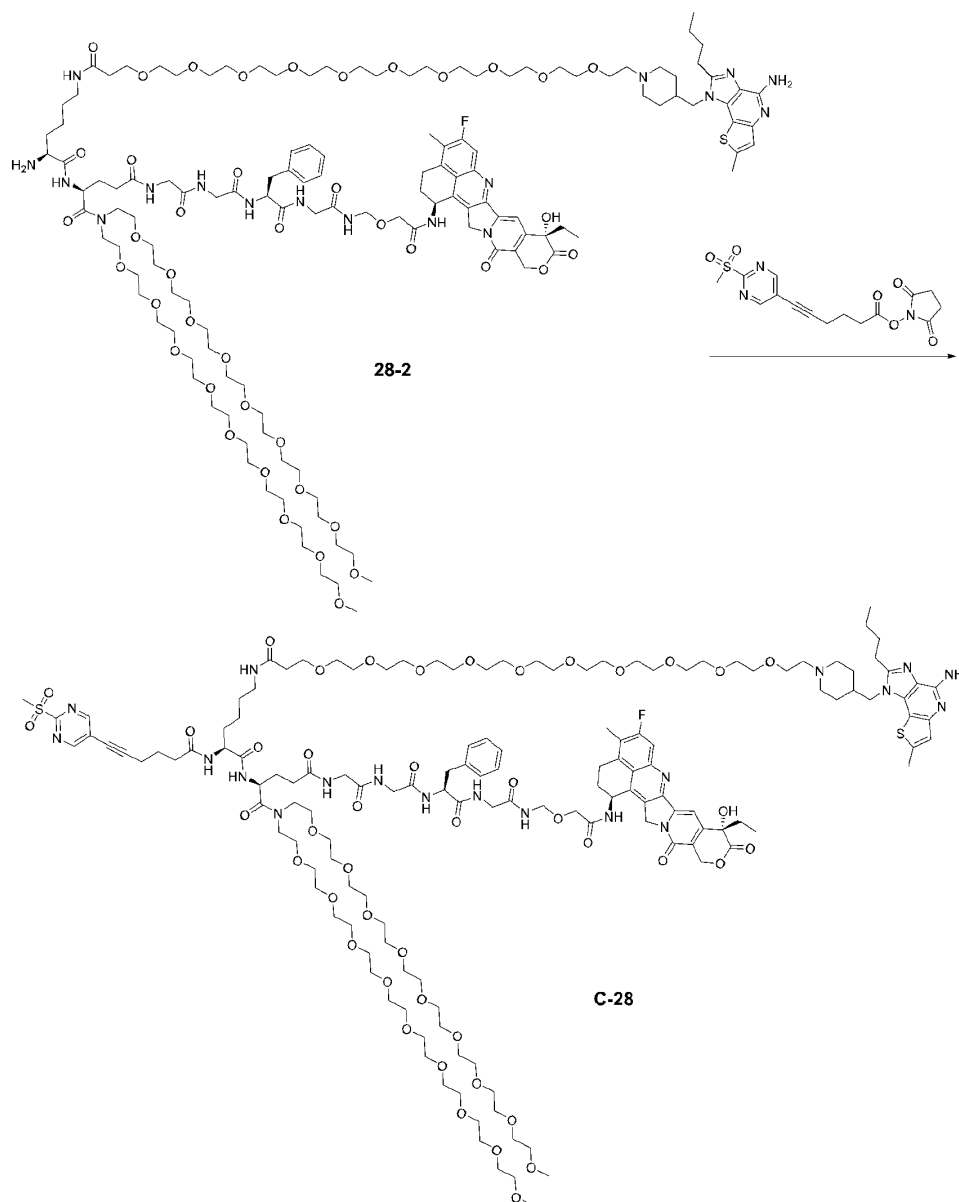
第四步：化合物 C-27 的制备

依次将化合物 27-3 (20 mg, 9.50 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(5.56 mg, 15.21 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(1.77 mg, 13.67 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化，得到本步的标题化合物(6 mg，收率：28.2%)。

MS m/z (ESI): 1177.2 [M/2+H]⁺。

实施例 1-26：化合物 C-28 的制备





第一步：化合物 28-1 的制备

将化合物 Int22 (10.23 mg, 8.38 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(1.62 mg, 12.57 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(3.82 mg, 10.04 μmol)和化合物 Int21(15 mg, 8.38 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化，得到本步的标题化合物(16 mg，收率：67.2%)。

MS m/z (ESI): 1496.3 [M/2+H]⁺。

第二步：化合物 28-2 的制备

将化合物 28-1 (16 mg, 5.35 μmol)和二乙胺(1.88 mg, 25.40 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步的标题化合物(14 mg, 收率: 99.5%)。

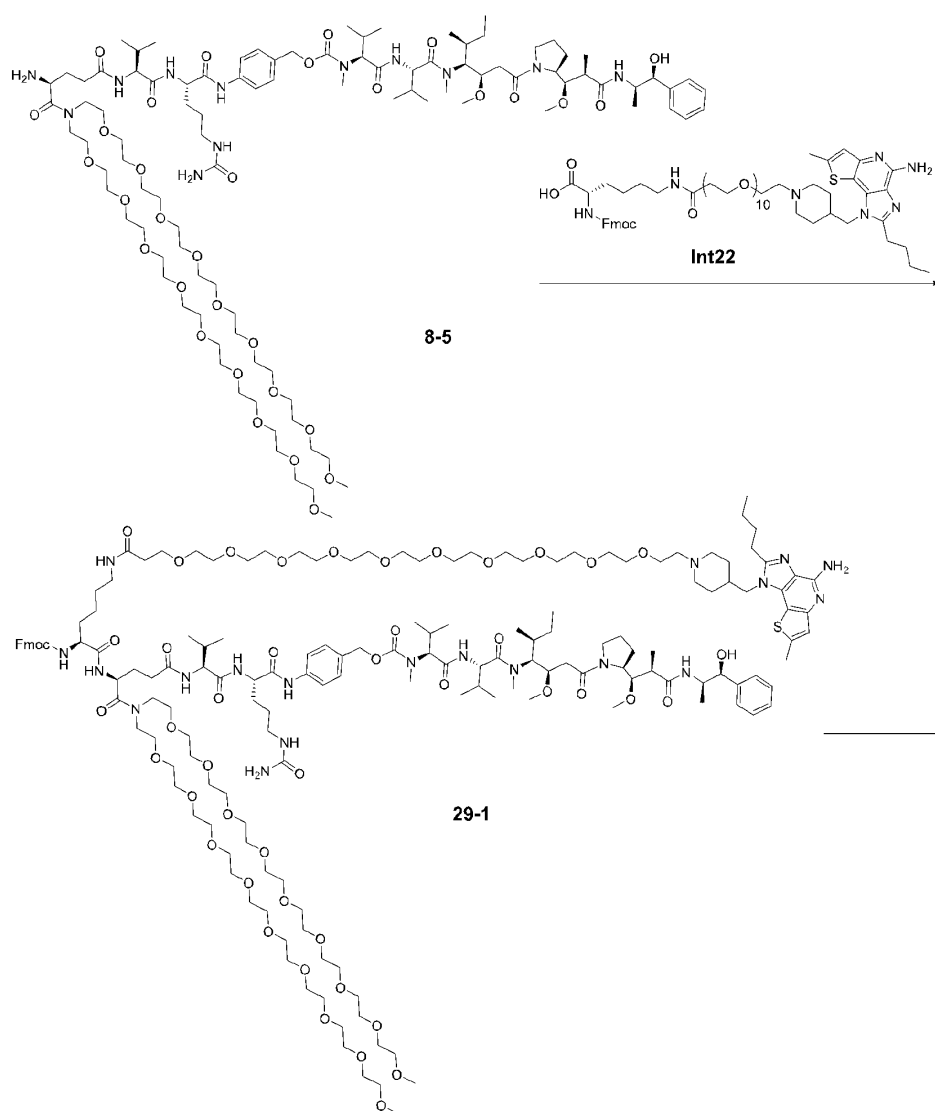
MS m/z (ESI): 1385.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

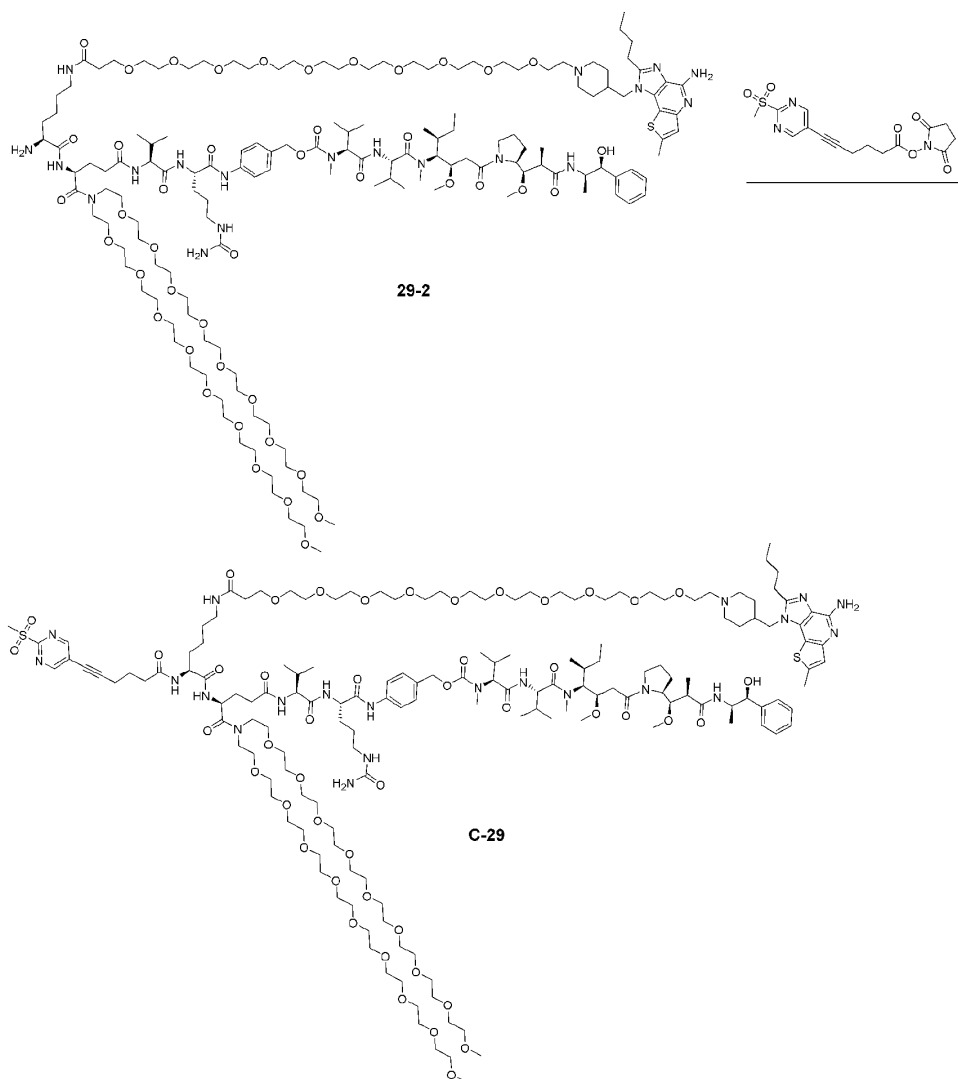
5 第三步: 化合物 C-28 的制备

依次将化合物 28-2 (14 mg, 5.05 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(2.95 mg, 8.08 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(0.94 mg, 7.22 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(1.61 mg, 收率: 11.4%)。

10 MS m/z (ESI): 1510.3 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-27: 化合物 C-29 的制备





第一步：化合物 29-1 的制备

依次将化合物 Int22 (16.25 mg, 13.31 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(2.06 mg, 15.81 μmol , 2.64 μL)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(5.26 mg, 713.71 μmol)和
5 化合物 8-5 (23 mg, 11.1 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(16 mg, 收率: 46.3%)。

MS m/z (ESI): 1092.0 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 29-2 的制备

将化合物 29-1 (16 mg, 4.88 μmol)和二乙胺(1.71 mg, 23.21 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合
10

物(9 mg, 收率: 63.5%)。

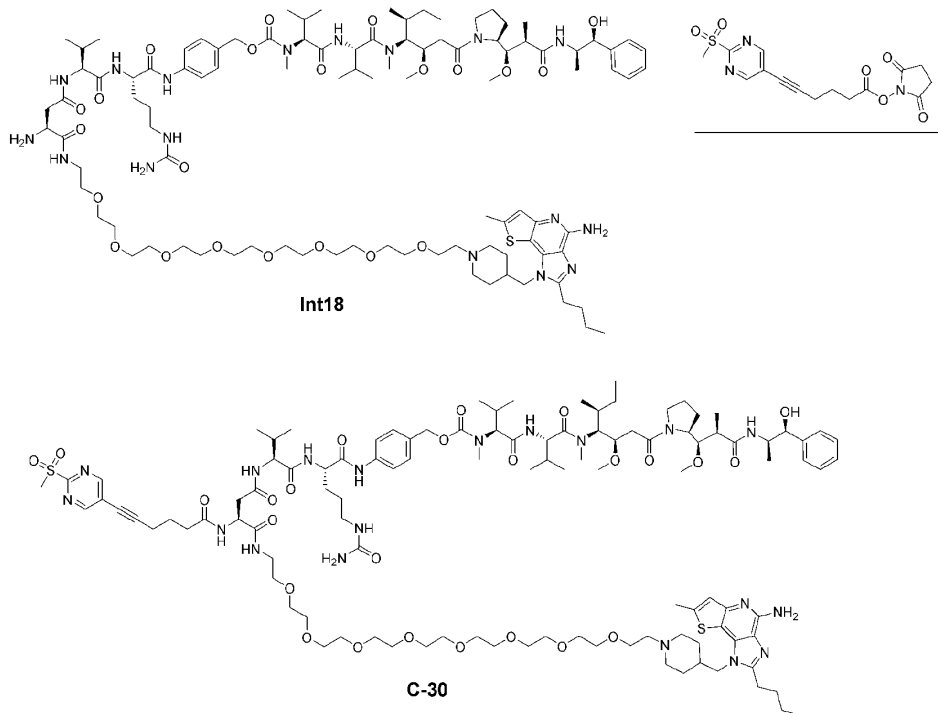
MS m/z (ESI): 1017.9 [M/3+H]⁺。

第三步: 化合物 C-29 的制备

依次将化合物 29-2 (9 mg, 2.95 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(1.72 mg, 4.71 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(0.55 mg, 4.2 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL), 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(4.59 mg, 收率: 48.9%)。

MS m/z (ESI): 1101.3 [M/3+H]⁺。

实施例 1-28: 化合物 C-30 的制备



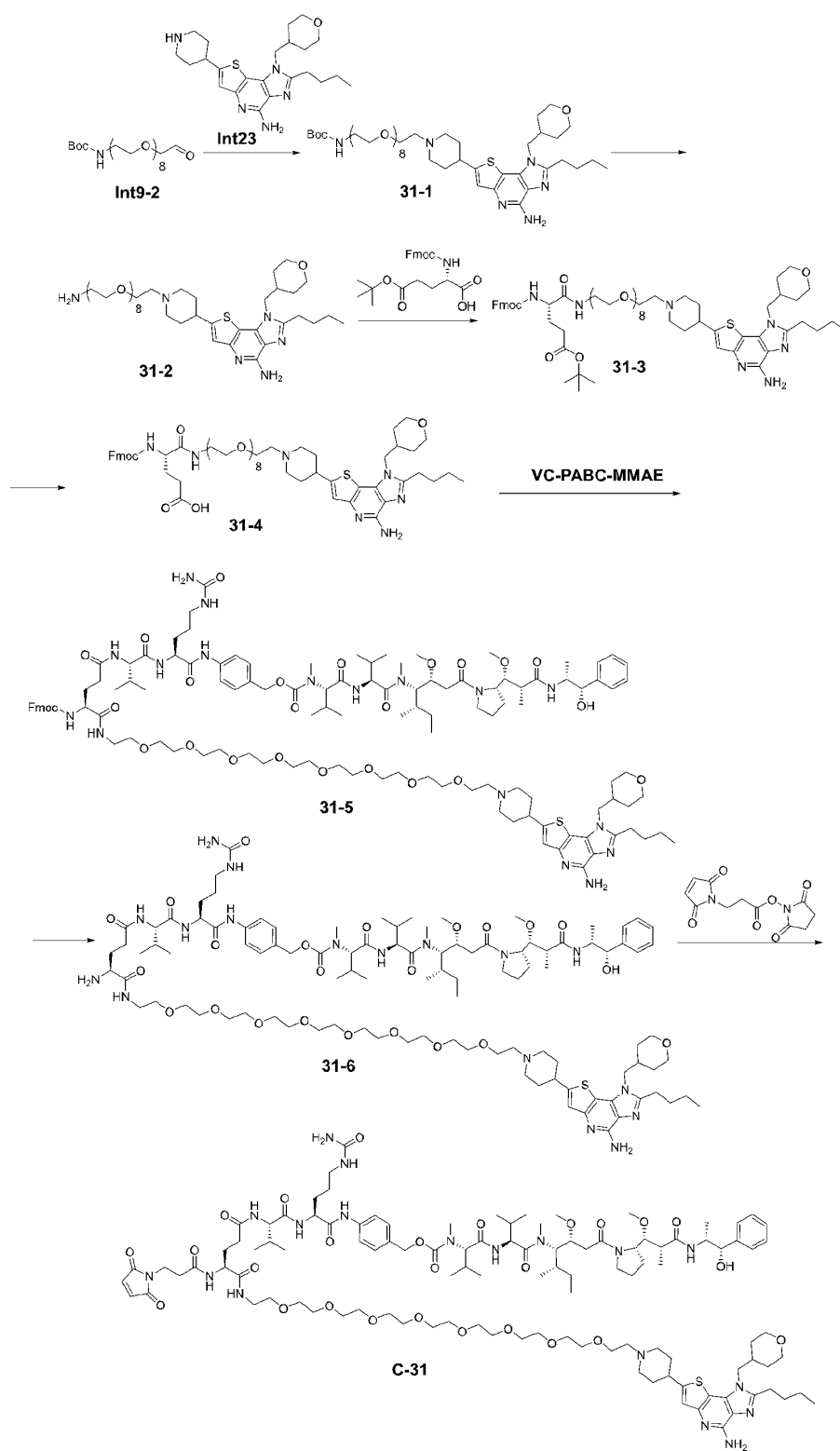
10

依次将化合物 Int18 (27.90 mg, 14.14 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(5.22 mg, 14.14 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.68 mg, 28.27 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步的标题化合物(7.88 mg, 收率: 25.07%)。

15

MS m/z (ESI): 1112.1 [M/2+H]⁺。

实施例 1-29: 化合物 C-31 的制备



第一步：化合物 31-1 的制备

依次将化合物 Int9-2 (727.61 mg, 1347.36 μmol)、化合物 Int23 (400 mg, 853.33 μmol)、
氰基硼氢化钠(99.08 mg, 1576.7 μmol)和冰乙酸(51.72 mg, 853.33 μmol)加入 1,2-二氯乙烷(6
mL)和甲醇(3 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品溶于甲醇(3 mL)
中, 用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步的标题化合物
5 (600 mg, 收率: 76.2%)。

MS m/z (ESI): 923.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步: 化合物 31-2 的制备

将化合物 31-1 (180 mg, 194.97 μmol)加入盐酸二氧六环溶液(6 mL, 4M)中, 25°C 反应
2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(150 mg, 收率: 93.3%)。

10 MS m/z (ESI): 823.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步: 化合物 31-3 的制备

依次将(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(85.29 mg,
200.46 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(45.2 mg, 346.26 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-
四甲基脒六氟磷酸酯(103.94 mg, 270.22 μmol)和化合物 31-2 (150 mg, 182.24 μmol)加入无
15 水 N,N-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方
法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(170 mg, 收率: 79.8%)。

MS m/z (ESI): 1230.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第四步: 化合物 31-4 的制备

将化合物 31-3 (170 mg, 138.15 μmol)溶于无水二氯甲烷(6 mL)和三氟乙酸(3 mL)的混
20 合溶剂中, 25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(133 mg, 收率: 86.3%)。

MS m/z (ESI): 1174.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第五步: 化合物 31-5 的制备

依次将化合物 31-4 (132.05 mg, 112.44 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(23.24 mg, 178.03
 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(51.28 mg, 133.52 μmol)和
25 VC-PABC-MMAE (105.26 mg, 93.69 μmol)加入无水 N,N-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反
应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=55%-65%), 得到
本步的标题化合物(110 mg, 收率: 54.2%)。

MS m/z (ESI): 1140.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第六步: 化合物 31-6 的制备

将化合物 31-5 (80 mg, 35.09 μmol)和二乙胺(12.19 mg, 166.68 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=55%-65%), 得到本步的标题化合物(50 mg, 收率: 72.9%)。

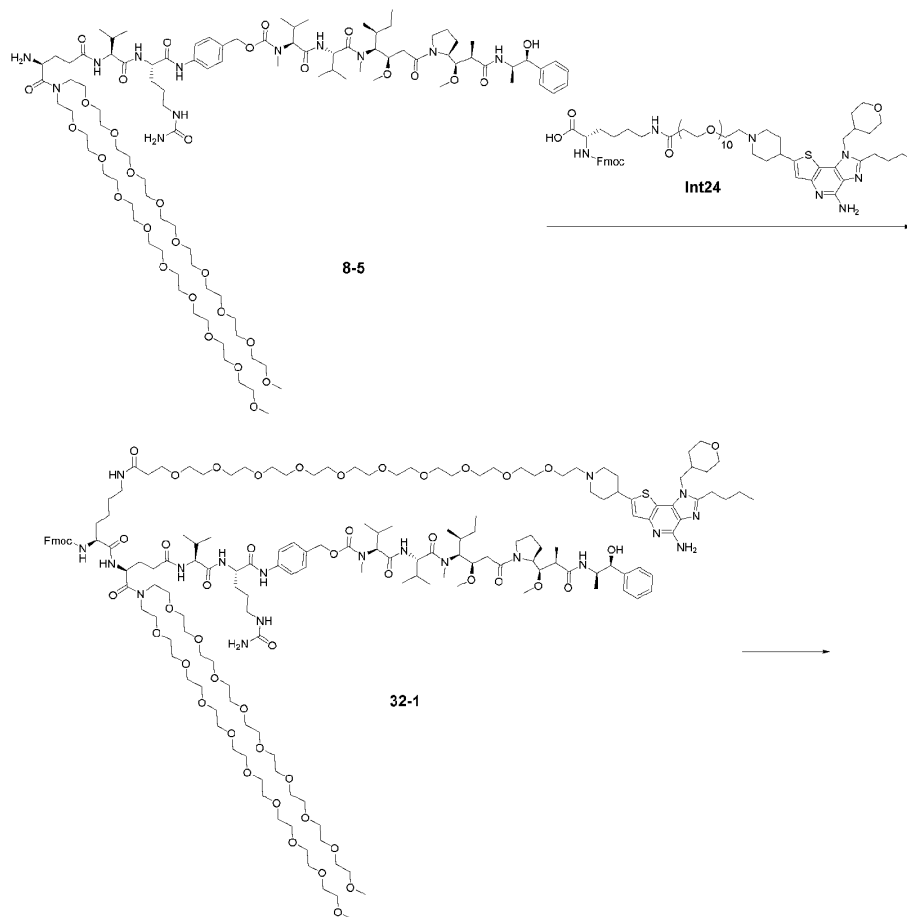
MS m/z (ESI): 686.4 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$ 。

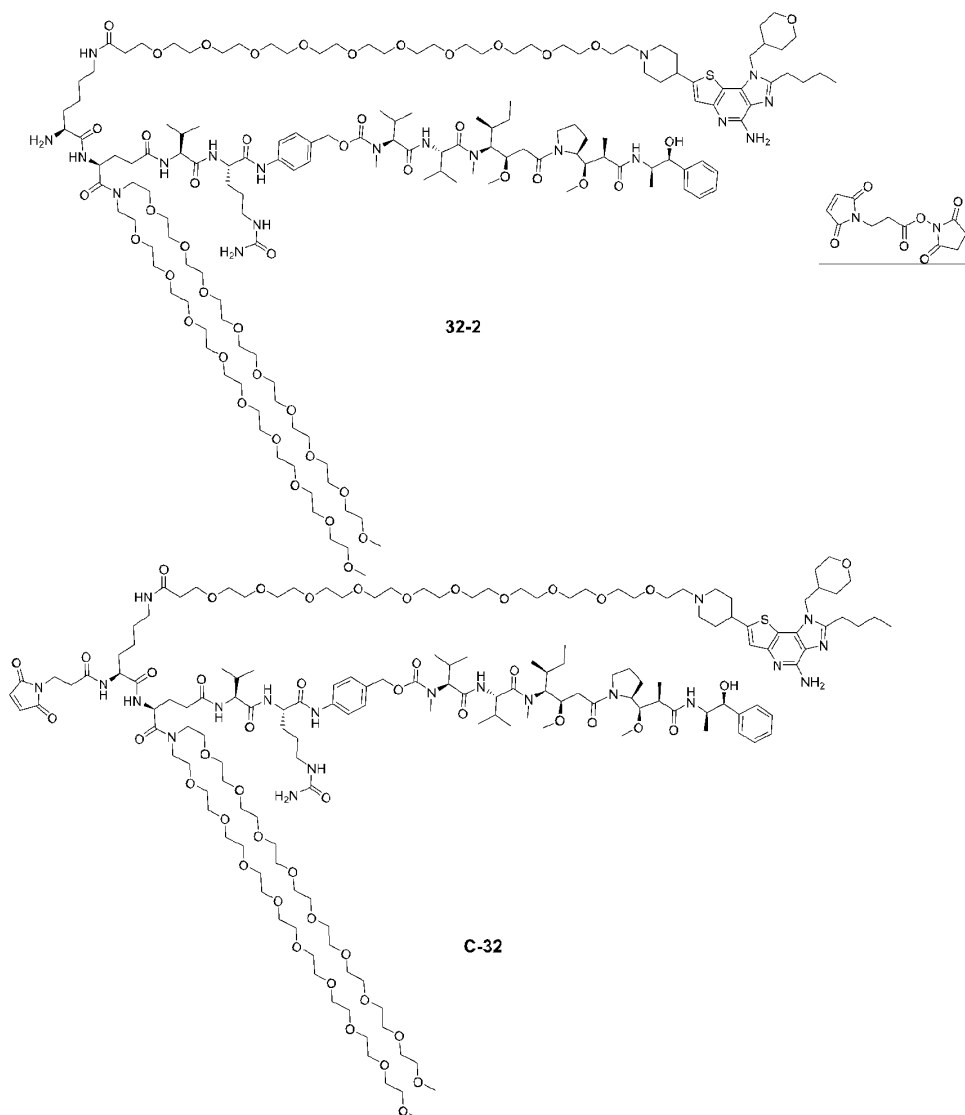
5 第七步: 化合物 C-31 的制备

依次将化合物 31-6 (50 mg, 24.31 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(7.76 mg, 29.16 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(4.52 mg, 34.63 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(21.5 mg, 收率: 41.3%)。

10 MS m/z (ESI): 1104.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-30: 化合物 C-32 的制备





第一步：化合物 32-1 的制备

依次将化合物 Int24 (31.38 mg, 22.31 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(3.77 mg, 28.88 μmol)、**2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯**(9.61 mg, 25.03 μmol)和化合物 **8-5** (42 mg, 20.26 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(38 mg, 收率: 59.0%)。

MS m/z (ESI): 1672.5 [M/2+H]⁺。

第二步：化合物 32-2 的制备

将化合物 32-1 (38 mg, 11.36 μmol)和二乙胺(3.95 mg, 53.96 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(12 mg, 收率: 61.2%)。

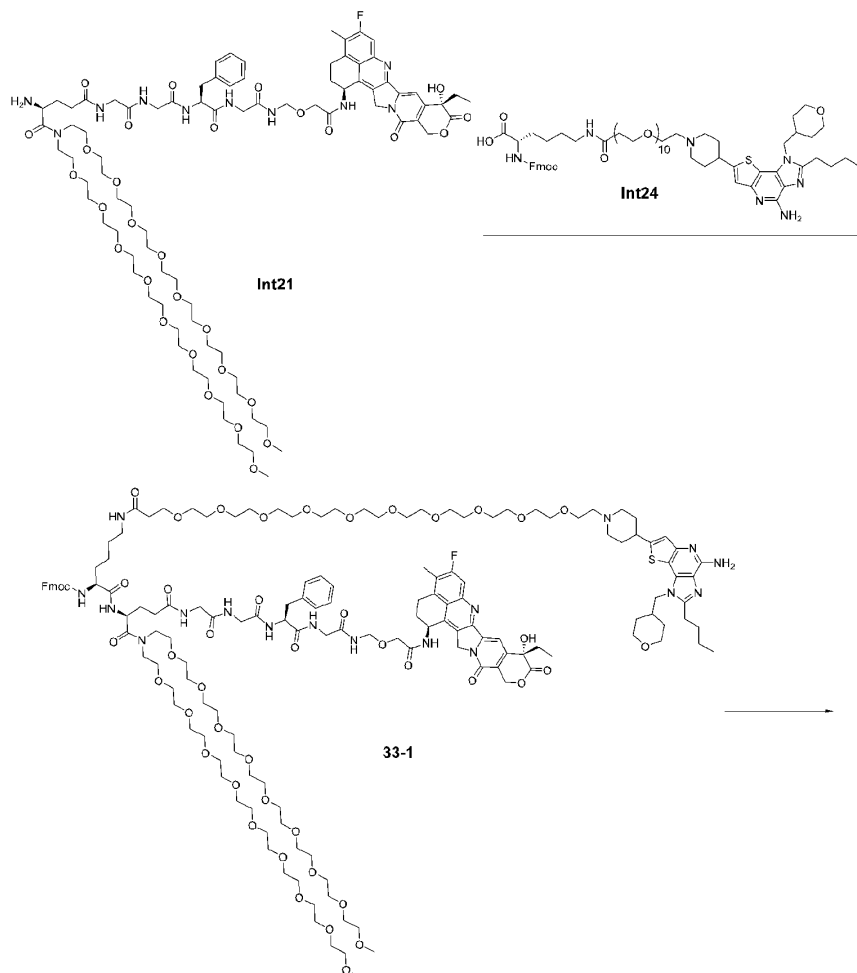
MS m/z (ESI): 1041.3 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$ 。

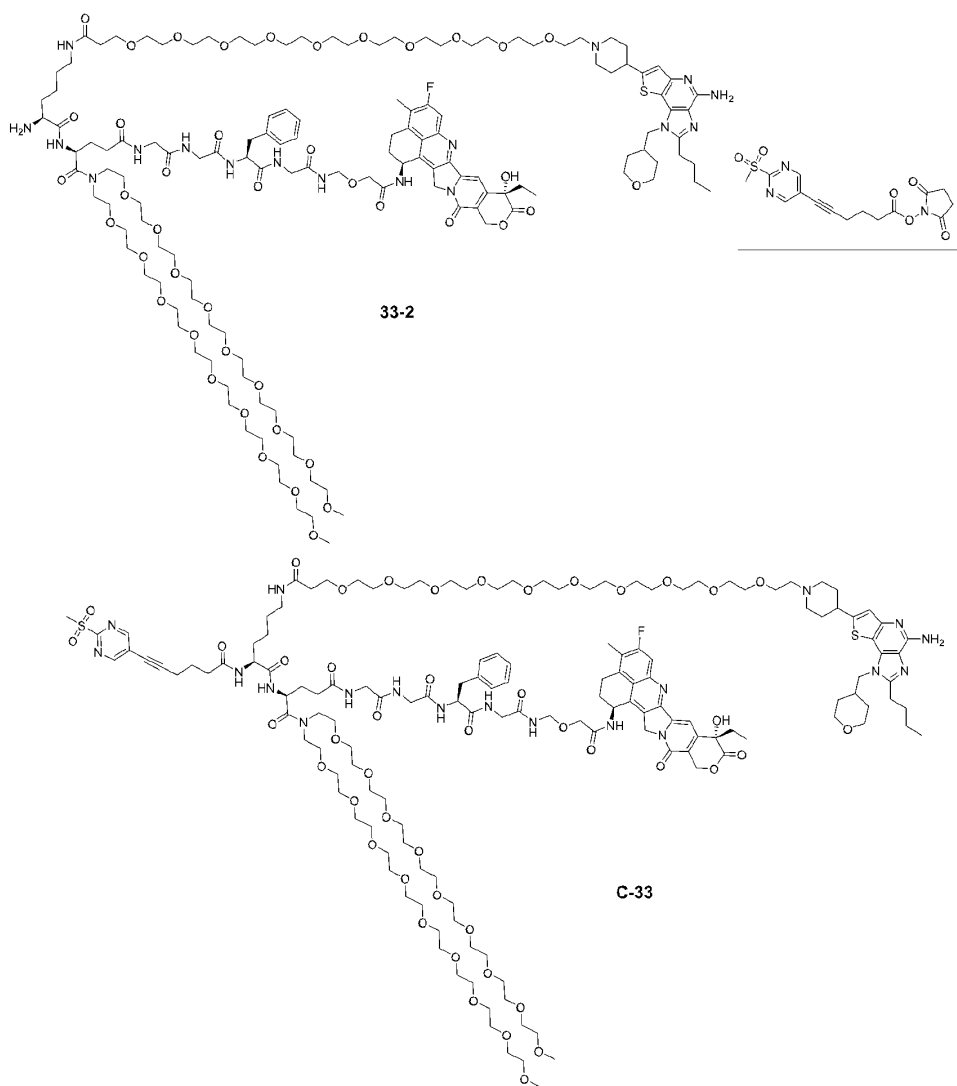
5 第三步: 化合物 C-32 的制备

依次将化合物 32-2 (10 mg, 3.21 μmol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯 (1.02mg, 3.84 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(0.6 mg, 4.56 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(6.18 mg, 收率: 35.6%)。

10 MS m/z (ESI): 1637.0 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-31: 化合物 C-33 的制备





第一步：化合物 33-1 的制备

依次将化合物 Int24 (39.66 mg, 27.94 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(6.93 mg, 53.07 μmol)、
 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(15.93 mg, 33.48 μmol)和化合物
 5 Int21 (50 mg, 27.94 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液
 直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物
 (66 mg, 收率: 81.2%)。

MS m/z (ESI): 1531.3 [M/2+H]⁺。

第二步：化合物 33-2 的制备

10 将化合物 33-1 (66 mg, 21.55 μmol)和二乙胺(7.56 mg, 102.37 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲

酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(22 mg, 收率: 37.8%)。

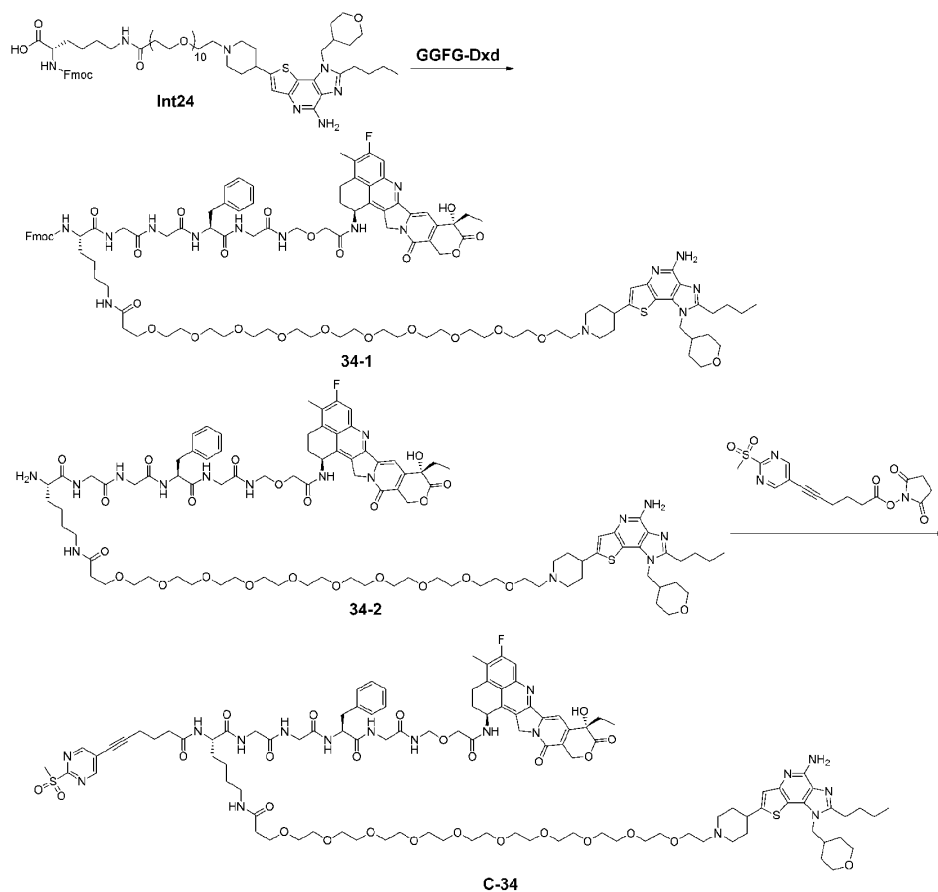
MS m/z (ESI): 1420.3 $[M/2+H]^+$ 。

第三步: 化合物 C-33 的制备

- 5 依次将化合物 33-2 (14 mg, 4.93 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(2.88 mg, 7.88 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(0.92 mg, 7.02 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(6.28 mg, 收率: 43.4%)。

MS m/z (ESI): 1545.3 $[M/2+H]^+$ 。

10 实施例 1-32: 化合物 C-34 的制备



第一步: 化合物 34-1 的制备

依次将化合物 Int24 (85 mg, 65.86 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(14.85 mg, 113.76 μmol)、

2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(29.6 mg, 77.83 μmol)和 GGFG-Dxd (50.34 mg, 59.87 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=15%-25%), 得到本步的标题化合物(66 mg, 收率: 54.9%)。

5 MS m/z (ESI): 1057.0 $[M/2+H]^+$ 。

第二步: 化合物 34-2 的制备

将化合物 34-1 (65 mg, 30.76 μmol)和二乙胺(4.5 mg, 61.51 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(36 mg, 收率: 65.1%)。

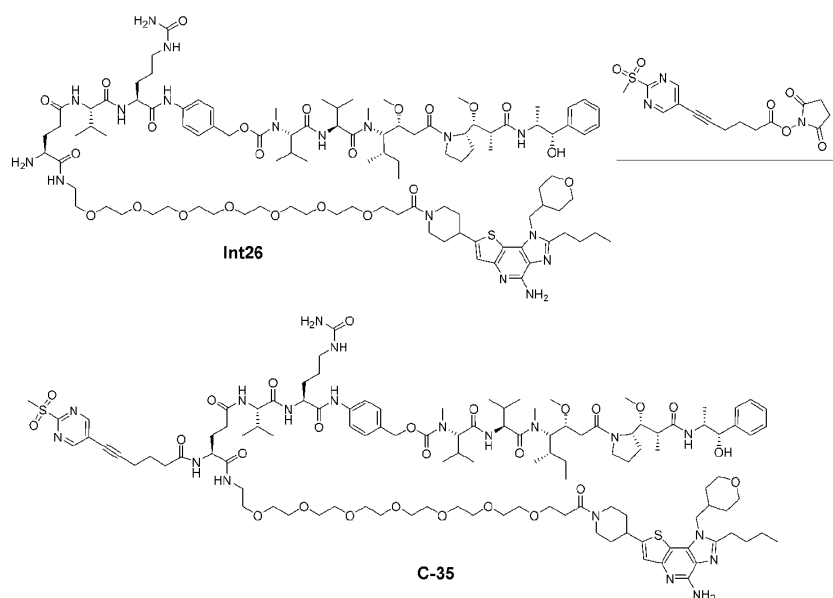
10 MS m/z (ESI): 946.0 $[M/2+H]^+$ 。

第三步: 化合物 C-34 的制备

依次将化合物 34-2 (36 mg, 19.03 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(10.43 mg, 28.56 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.54 mg, 27.13 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(8.47 mg, 收率: 21.9%)。

MS m/z (ESI): 1071.0 $[M/2+H]^+$ 。

实施例 1-33: 化合物 C-35 的制备

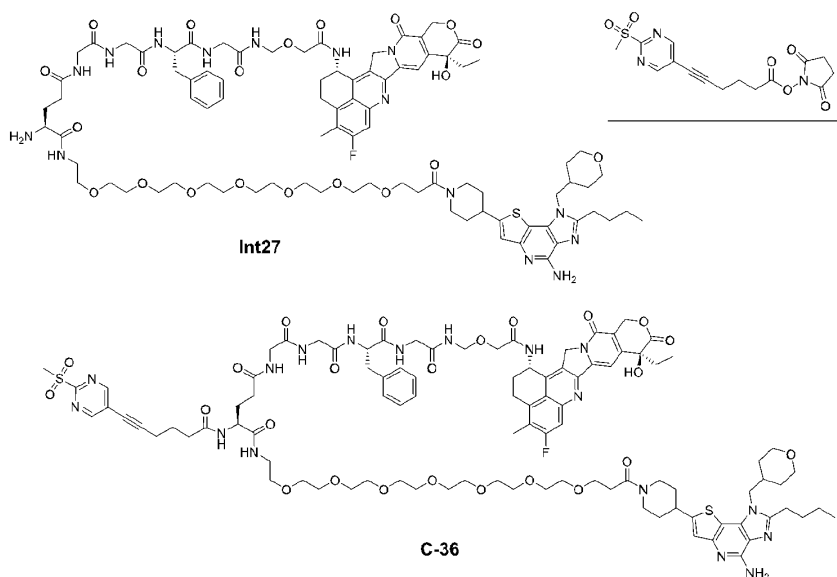


依次将化合物 Int26 (113.67 mg, 55.68 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)

嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(22.27 mg, 60.95 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(11.63 mg, 89.08 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(55 mg, 收率: 53.9%)。

MS m/z (ESI): 1146.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

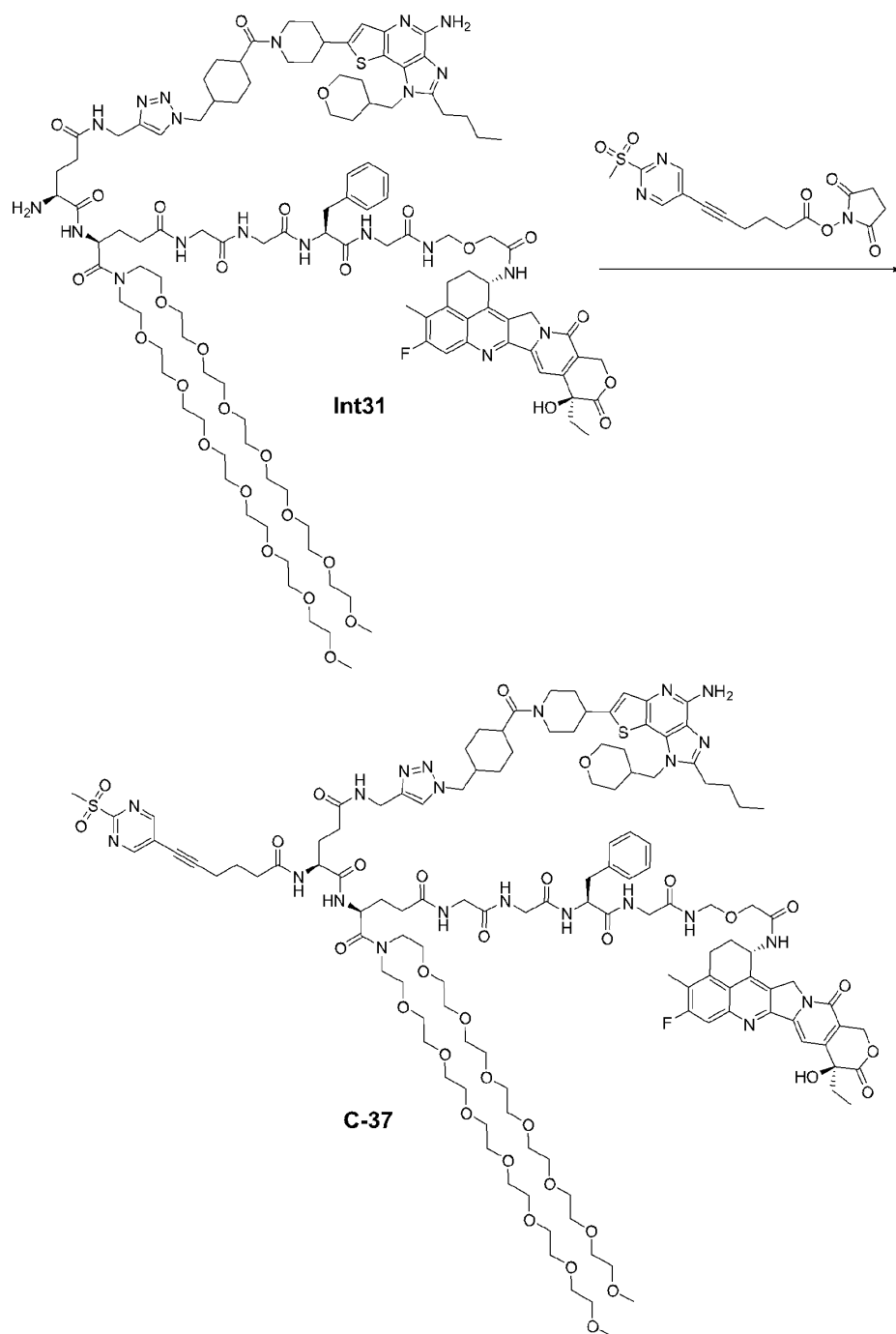
5 实施例 1-34: 化合物 C-36 的制备



依次将化合物 Int27 (90 mg, 51.17 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(23.02 mg, 63.01 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(12.02 mg, 92.1 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(27 mg, 收率: 29.2%)。

MS m/z (ESI): 1005.0 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-35: 化合物 C-37 的制备

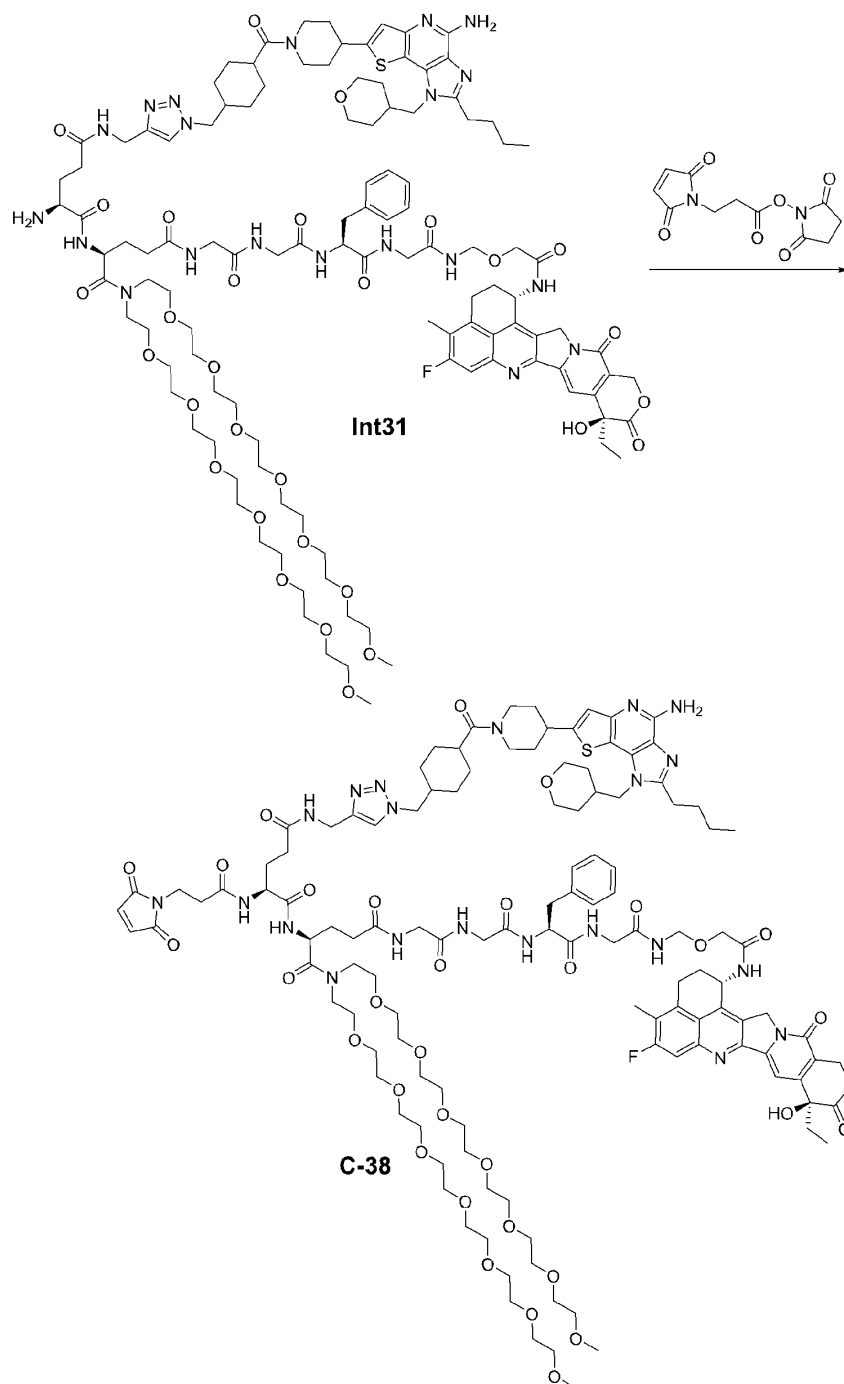


依次将化合物 Int31 (12 mg, 5.05 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(2.4 mg, 6.58 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(1.25 mg, 9.61 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到

5 本步的标题化合物(1.67 mg, 收率: 13.3%)。

MS m/z (ESI): 1311.6 $[M/2+H]^+$.

实施例 1-36: 化合物 C-38 的制备

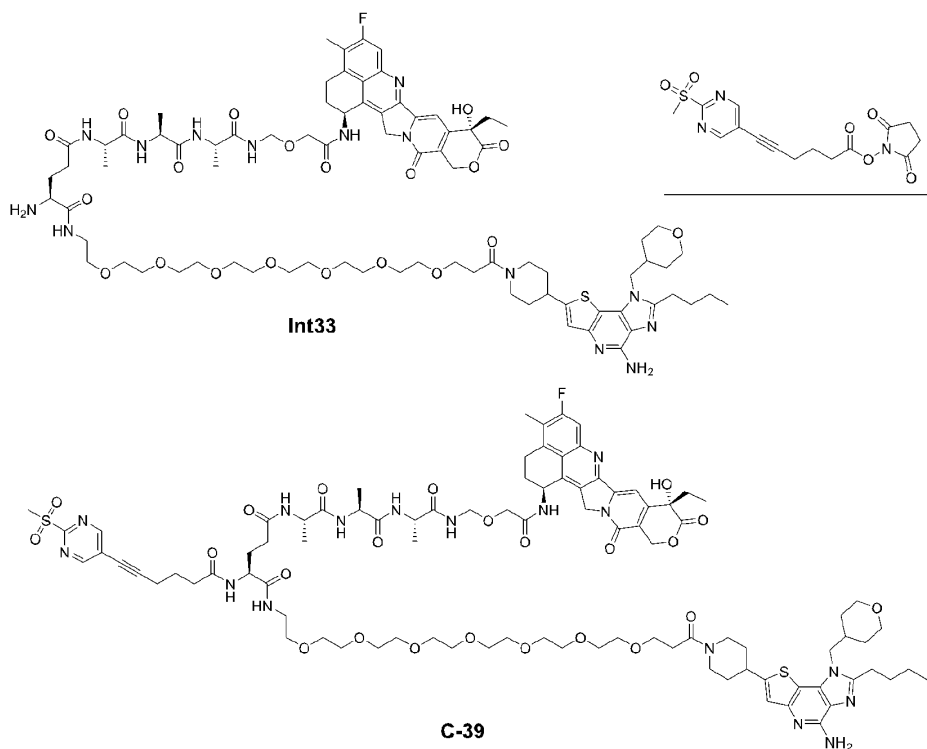


依次将化合物 Int31 (12 mg, 5.05 μ mol)、3-马来酰亚胺基丙酸羟基琥珀酰亚胺酯(1.75

mg, 6.58 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(1.25 mg, 9.61 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(1.92 mg, 收率: 15.8%)。

MS m/z (ESI): 1262.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

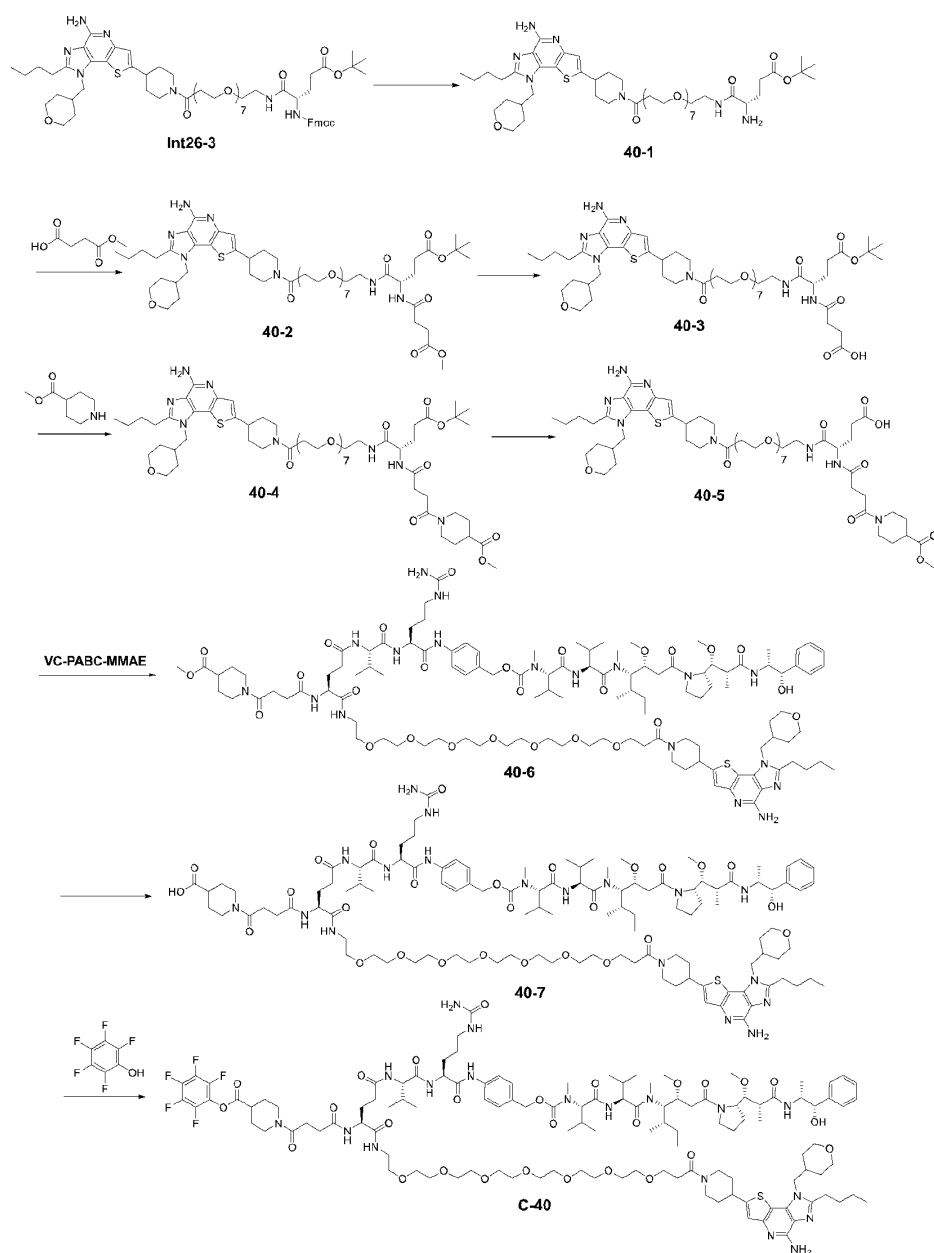
5 实施例 1-37: 化合物 C-39 的制备



依次将化合物 Int33 (70 mg, 42.33 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(20.1 mg, 55.02 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(7.87 mg, 60.31 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(2.53 mg, 收率: 7.1%)。

MS m/z (ESI): 1903.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 1-38: 化合物 C-40 的制备



第一步：化合物 40-1 的制备

将化合物 Int26-3 (250 mg, 205.84 μmol)和二乙胺(73.14 mg, 1 mmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(175 mg, 收率: 85.7%)。

MS m/z (ESI): 992.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 40-2 的制备

依次将丁二酸单甲酯(26.47 mg, 200.35 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(52.71 mg, 407.85 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(62.03 mg, 163.14 μmol)和化合物 40-1 (142 mg, 143.11 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(120 mg, 收率: 79.8%)。

MS m/z (ESI): 1106.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步: 化合物 40-3 的制备

将化合物 40-2 (145 mg, 131.06 μmol)溶于甲醇(5 mL)中, 加入氢氧化锂(15.06 mg, 622.53 μmol)的水溶液(2 mL), 25°C 反应 4 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(100 mg, 收率: 73.5%)。

MS m/z (ESI): 1092.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第四步: 化合物 40-4 的制备

依次将化合物 40-3 (50 mg, 47.16 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(12.63 mg, 96.76 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(119.84 mg, 52.18 μmol)和 4-哌啶甲酸甲酯(6.55 mg, 47.16 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(50 mg, 收率: 94.4%)。

MS m/z (ESI): 1217.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第五步: 化合物 40-5 的制备

将化合物 40-4 (50 mg, 41.06 μmol)溶于无水二氯甲烷(3 mL)和三氟乙酸(1 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=40%-55%), 得到本步的标题化合物(40 mg, 收率: 88.3%)。

MS m/z (ESI): 1161.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第六步: 化合物 40-6 的制备

依次将化合物 40-5 (42mg, 36.16 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(12.63 mg, 96.76 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(15.68 mg, 41.23 μmol)和 VC-PABC-MMAE (40.63 mg, 36.16 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(60 mg, 收率: 77.1%)。

MS m/z (ESI): 1133.7 $[M/2+H]^+$ 。

第七步：化合物 40-7 的制备

将化合物 40-6 (60 mg, 26.47 μmol)溶于甲醇(3 mL)中，加入氢氧化锂(3.04 mg, 125.73 μmol)的水溶液(1 mL)，25°C 反应 4 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=35%-45%)，得到本步的标题化合物(40 mg，收率：70.6%)。

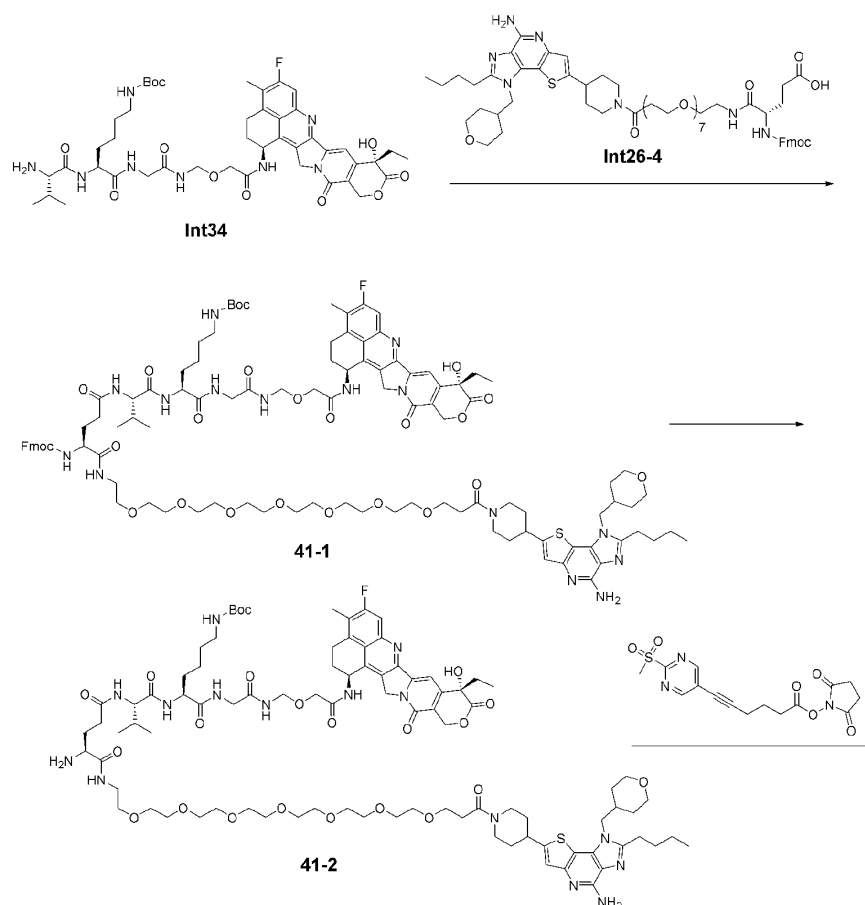
MS m/z (ESI): 1126.7 $[M/2+H]^+$ 。

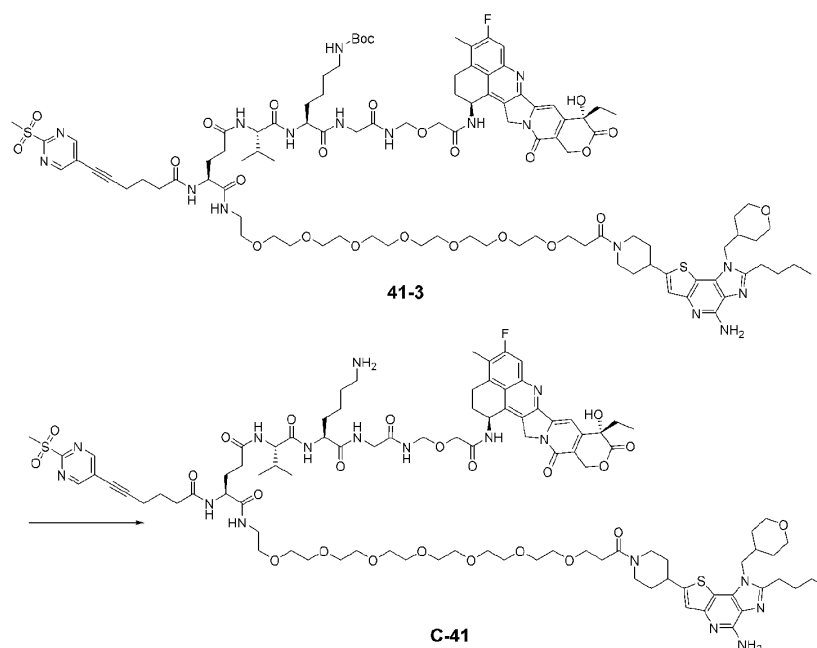
第八步：化合物 C-40 的制备

依次将化合物 40-7 (10 mg, 4.44 μmol)、五氟苯酚(1.62 mg, 8.8 μmol)和 *N,N'*-二环己基碳二亚胺(1.83 mg, 8.88 μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中，25°C 反应 3 小时。反应液浓缩得到的粗品用制备高效液相色谱仪纯化，得到本步的标题化合物(3 mg，收率：29.4%)。

MS m/z (ESI): 1209.7 $[M/2+H]^+$ 。

实施例 1-39：化合物 C-41 的制备





第一步：化合物 41-1 的制备

依次将化合物 Int26-4 (50 mg, 41.85 μmol)、化合物 Int34 (37.95 mg, 41.85 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(13.63 mg, 104.61 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(19.27 mg, 50.21 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接

5 用反相柱层析纯化(制备方法 A，洗脱梯度：A%=40%-48%)，得到本步的标题化合物(43 mg，收率：50.19%)。

MS m/z (ESI): 1024.0 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 41-2 的制备

10 将化合物 41-1 (40 mg, 19.54 μmol)和哌啶(3.33 mg, 39.07 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。反应液浓缩后，加入甲基叔丁基醚(5 mL)，超声 5 分钟后，静置，过滤，固体干燥得到本步的标题化合物(28 mg，收率：70.67%)。

MS m/z (ESI): 1824.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步：化合物 41-3 的制备

15 依次将化合物 41-2 (28 mg, 15.34 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(8.41 mg, 23.01 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(4.00 mg, 30.68 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A，洗脱梯度：A%=35%-40%)，得到本步的标题化合物(30 mg，收率：94.22%)。

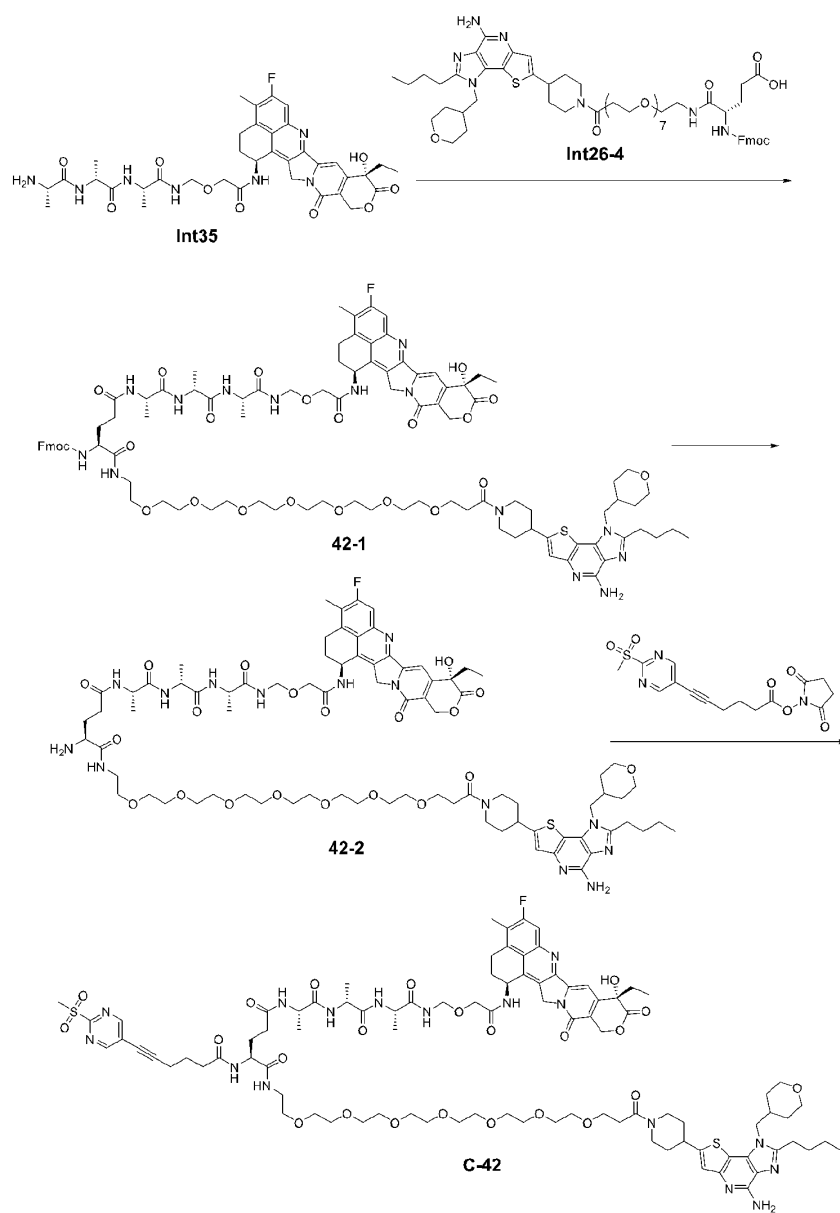
MS m/z (ESI): 1038.0 [M/2+H]⁺。

第四步：化合物 C-41 的制备

将化合物 41-3 (30 mg, 13.01 μmol)和无水溴化锌(11.72 mg, 52.04 μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A，洗脱梯度：
5 A%=25%-35%)，得到本步的标题化合物(4.65 mg，收率：16.80%)。

MS m/z (ESI): 1974.9 [M+H]⁺。

实施例 1-40：化合物 C-42 的制备



第一步：化合物 42-1 的制备

依次将化合物 Int26-4 (51.95 mg, 44.85 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(11.09 mg, 85.84 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(22.85 mg, 60.08 μmol)和化合物 Int35 (30 mg, 40.77 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=45%-50%)，得到本步的标题化合物(56 mg，收率：73.2%)。

MS m/z (ESI): 1875.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 42-2 的制备

将化合物 42-1 (57 mg, 30.38 μmol)和二乙胺(11.22 mg, 151.91 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=45%-55%)，得到本步的标题化合物(30 mg，收率：59.7%)。

MS m/z (ESI): 827.4 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

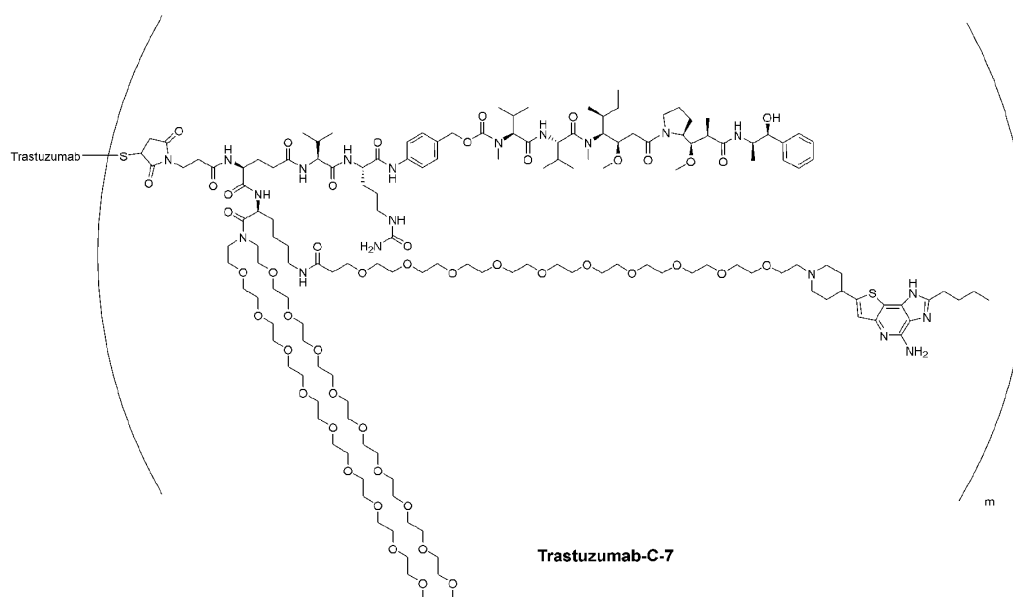
第三步：化合物 C-42 的制备

依次将化合物 42-2 (30 mg, 18.14 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)六-5-炔酸酯(8.62 mg, 23.58 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.55 mg, 27.21 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化，得到本步的标题化合物(11 mg，收率：31.8%)。

MS m/z (ESI): 952.4 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

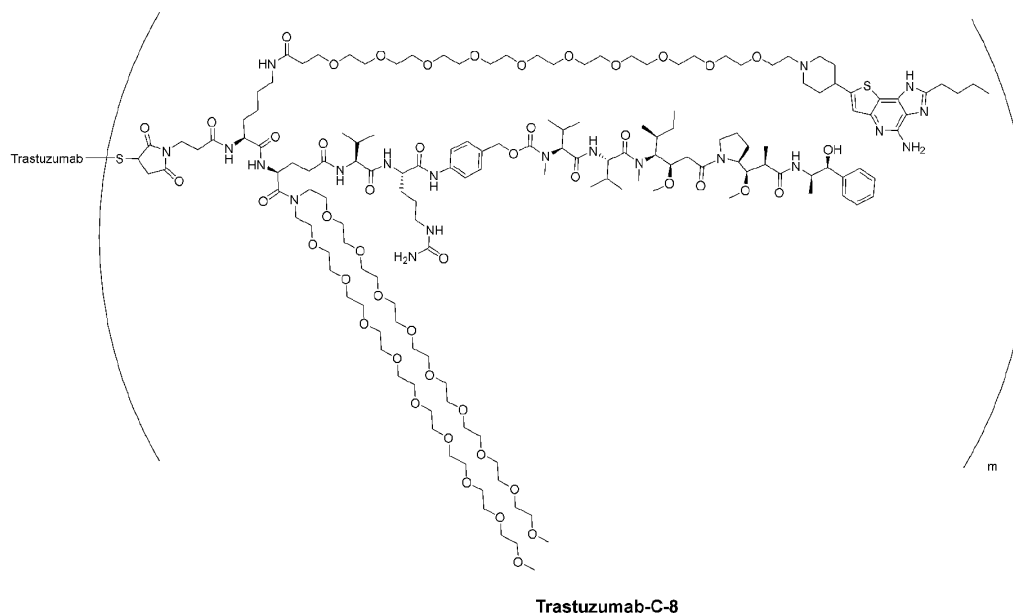
二、免疫刺激抗体药物偶联物(iADC)的制备

20 实施例 2-1 Trastuzumab-C-7



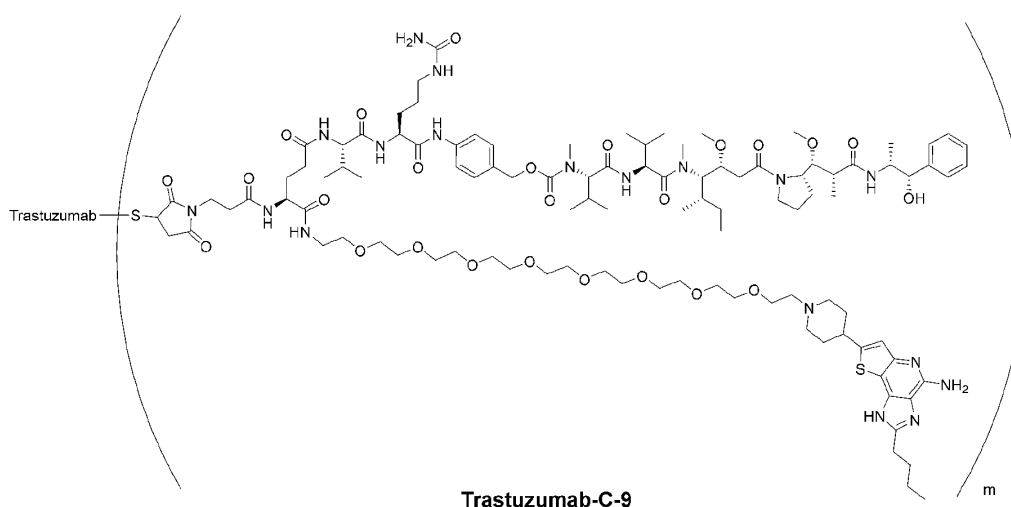
用 1 M 磷酸溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.59, 得 9.5 mg/mL 的 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 21°C 反应 4 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5 倍摩尔当量的化合物 C-7 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时, 4°C 放置过夜, 用 NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-7 的盐酸组氨酸缓冲液(2.4 mg/mL, 1.5 mL), 于 -40°C 储存。

实施例 2-2 Trastuzumab-C-8



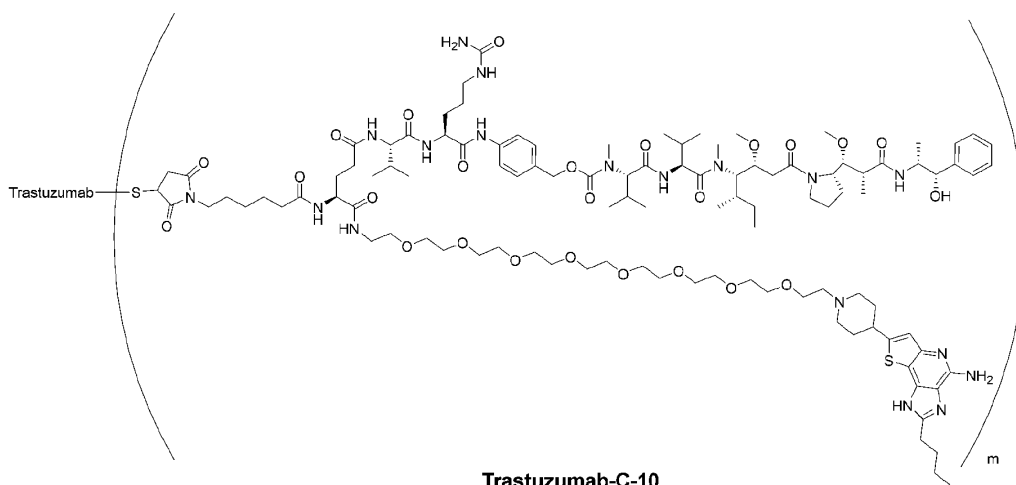
用 1 M 磷酸溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.55, 得 9.5 mg/mL 的 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 21°C 反应 4 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5 倍摩尔当量的化合物 C-8 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时, 4°C 放置过夜, 用 NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-8 的盐酸组氨酸缓冲液(2.3 mg/mL, 1.5 mL), 于-40°C 储存。

实施例 2-3 Trastuzumab-C-9



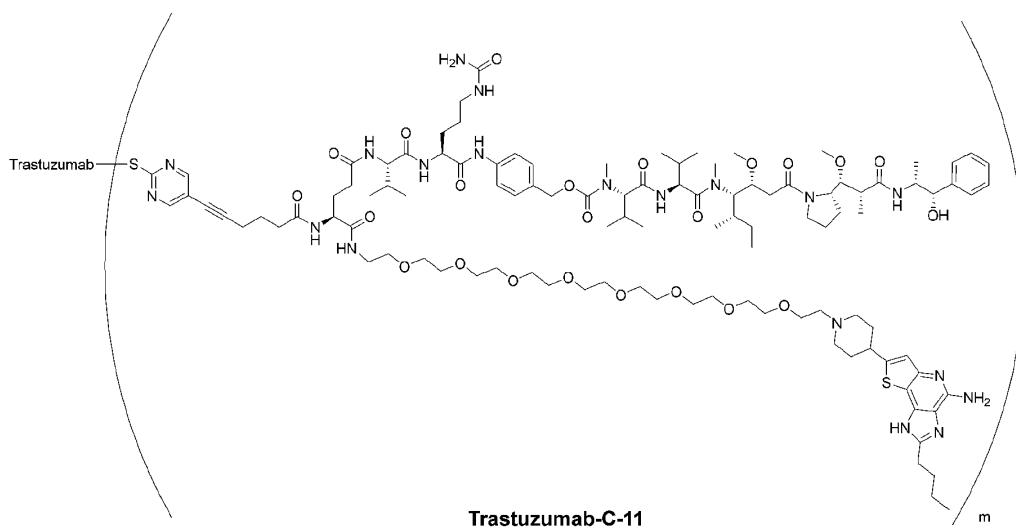
用 1 M 磷酸溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.55, 得 9.5 mg/mL 的 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 21°C 反应 4 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5 倍摩尔当量的化合物 C-9 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时, 4°C 放置过夜, 用 NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-9 的盐酸组氨酸缓冲液(3.8 mg/mL, 2.5 mL), 于-40°C 储存。

实施例 2-4 Trastuzumab-C-10



用 1 M 磷酸溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.53, 得 9.5 mg/mL 的 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 21°C 反应 4 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5 倍摩尔当量的化合物 C-10 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时, 4°C 放置过夜, 用 NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-10 的盐酸组氨酸缓冲液(3.4 mg/mL, 2.5 mL), 于-40°C 储存。

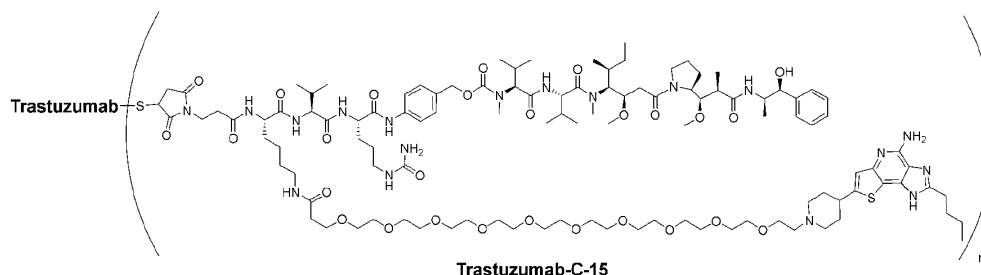
实施例 2-5 Trastuzumab-C-11



用 1 M 磷酸溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.59, 得 9.5 mg/mL 的 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 21°C 反应 4 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5 倍摩尔当量的化合物 C-11 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时, 4°C 放置过夜,

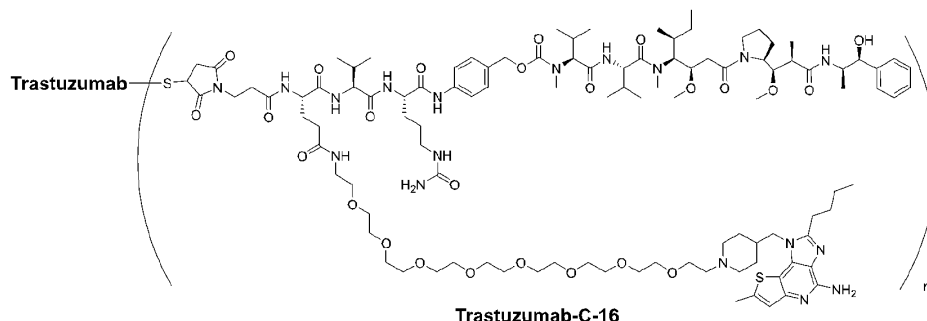
用 NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-10 的盐酸组氨酸缓冲液(4.0 mg/mL, 2.5 mL), 于-40°C储存。

实施例 2-6 Trastuzumab-C-15



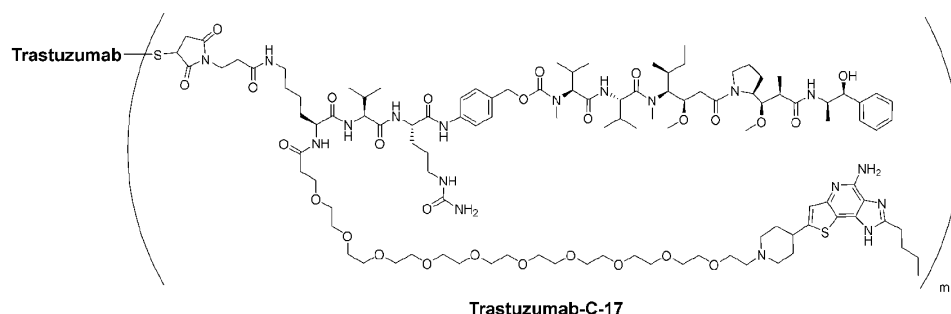
- 5 用 1 M 磷酸氢二钠溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.56, 再用 pH = 6.5-6.6 磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至 10 mg/mL, 得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5.5 倍摩尔当量的化合物 C-15 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 用 NAP-10, NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1
- 10 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-15 的盐酸组氨酸缓冲液 (3.4 mg/mL, 2.5 mL), 于 4°C 储存。

实施例 2-7 Trastuzumab-C-16



- 15 用 1 M 磷酸氢二钠溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.54, 再用 pH = 6.5-6.6 磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至 10 mg/mL, 得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5 倍摩尔当量的化合物 C-16 的 DMSO 溶液 (10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 用 NAP-10, NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-16 的盐酸组氨酸缓冲液 (3.1
- 20 mg/mL, 2.5 mL), 于 4°C 储存。

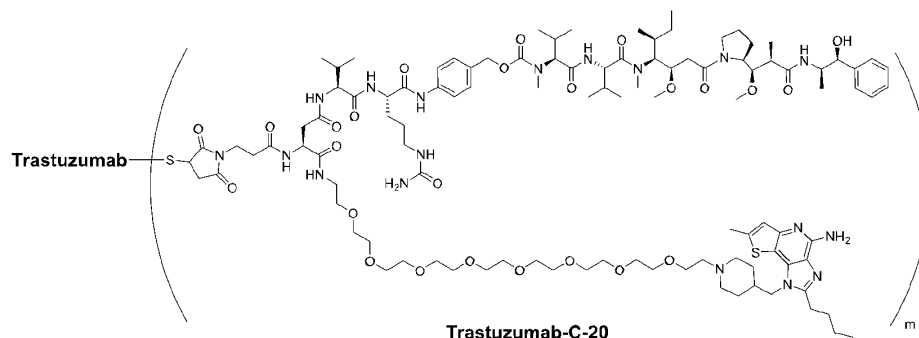
实施例 2-8 Trastuzumab-C-17



用 1 M 磷酸氢二钠溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.57, 再用 pH = 6.5-6.6 磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至 10 mg/mL, 得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得

5 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5 倍摩尔当量的化合物 C-17 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 用 NAP-10, NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-17 的盐酸组氨酸缓冲液 (3.5 mg/mL, 2.5 mL), 于 4°C 储存。

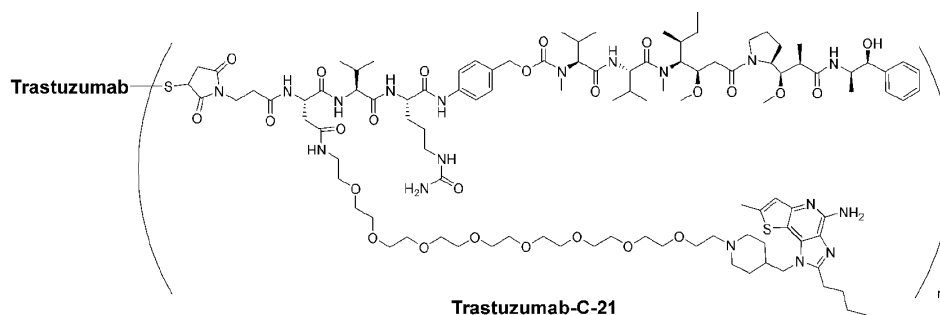
10 实施例 2-9 Trastuzumab-C-20



用 1 M 磷酸氢二钠溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.55, 再用 pH = 6.5-6.6 磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至 10 mg/mL, 得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得

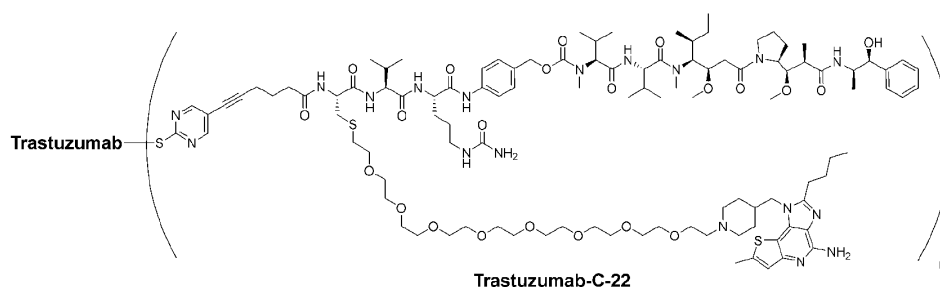
15 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5.5 倍摩尔当量的化合物 C-20 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 用 NAP-10, NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-20 的盐酸组氨酸缓冲液 (3.0 mg/mL, 2.5 mL), 于 4°C 储存。

实施例 2-10 Trastuzumab-C-21



用 1 M 磷酸氢二钠溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.55, 再用 pH = 6.5-6.6 磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至 10 mg/mL, 得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5.5 倍摩尔当量的化合物 C-21 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 用 NAP-10, NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-21 的盐酸组氨酸缓冲液 (3.2 mg/mL, 2.5 mL), 于 4°C 储存。

实施例 2-11 Trastuzumab-C-22



10

用 1 M 磷酸氢二钠溶液调节 Trastuzumab 单抗储备液使其 pH = 6.55, 再用 pH = 6.5-6.6 磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至 10 mg/mL, 得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液。向所得 Trastuzumab 单抗缓冲溶液加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (2.5 eq, 10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 向其中加入 Trastuzumab 单抗 5.5 倍摩尔当量的化合物 C-22 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 用 NAP-10, NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤液, 得到 Trastuzumab-C-22 的盐酸组氨酸缓冲液 (3.8 mg/mL, 2.5 mL), 于 4°C 储存。

15

三、免疫刺激抗体药物偶联物(iADC)的药物/抗体比值: DAR 值的测定

LC-MS 测定 iADC 分子量, 计算药物/抗体比 DAR 值。

20 色谱测定条件:

液相色谱柱: Thermo MAbPac RP 3.0*100mm;

流动相 A: 0.1%FA/H₂O; 流动相 B: 0.1%FA/ACN;

流速: 0.25 ml/min; 样品室温度: 8 °C; 柱温: 60 °C; 进样量: 1 µl;

时间(分钟)	2	20	22	25	26	30
流动相 A (体积%)	75	60	5	5	75	75
流动相 B (体积%)	25	40	95	95	25	25

质谱测定条件:

5 质谱型号: AB Sciex Triple TOF 5600+;

GS1 35; GS2 35; CUR 30; TEM 350; ISVF 5500; DP 250; CE 10; Accumulation time 0.5 s;

m/z 600-4000; Time bins to sum 40。

CE-SDS 计算抗体药物偶联物 Trastuzumab-C-7 的 DAR 值: 4.42; Trastuzumab-C-8 的 DAR 值: 3.56; Trastuzumab-C-9 的 DAR 值: 3.53; Trastuzumab-C-10 的 DAR 值: 3.3; Trastuzumab-C-11 的 DAR 值: 2.3; Trastuzumab-C-15 的 DAR 值: 3.58; Trastuzumab-C-16 的 DAR 值: 2.84; Trastuzumab-C-17 的 DAR 值: 3.37; Trastuzumab-C-20 的 DAR 值: 3.53; Trastuzumab-C-21 的 DAR 值: 2.89; Trastuzumab-C-22 的 DAR 值: 3.38。

15 生物学测试

实验例 1: 免疫刺激抗体药物偶联物 (immunomodulatory antibody drug conjugate, iADC) 对 HER2 阳性肿瘤细胞和 HER2 阴性肿瘤细胞的增殖抑制作用

实验步骤:

1. 收集对数生长期的 HER2 阳性肿瘤细胞 HCC1954 (康诺泰) 和 NCI-N87 (ATCC), 20 以及 HER2 阴性肿瘤细胞 NCI-H358 (南京科佰), 并计数。

2. 将三种肿瘤细胞分别接种于 96 孔板 (康宁) 中, 每孔 2000 个细胞 (HCC1954 或 NCI-H358) 或 3000 个细胞 (NCI-N87), 体积 80 µL, 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜使细胞贴壁 (18~24h)。

3. 按照试验设计进行梯度浓度配制 5×药物工作液。取出 96 孔细胞板, 从化合物板中 25 转 20 µL 工作液加到细胞板中。细胞板置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。

4. 测板：取出细胞板，在显微镜下观察细胞状态。观察结束后，按照 CellCounting-Lite® 2.0 试剂盒（诺唯赞）说明书，细胞板加检测液，并通过 PHERA Star FS 获得原始数据。

5. 计算抑制率（Inhibition Rate, IR%）=1-（实验孔发光均值/ DMSO 对照孔发光均值）*100%。使用 Graphpad Prism 8.0 软件进行数据分析与作图，以细胞存活率与药物浓度的对数经四参数拟合曲线，计算 IC₅₀ 值。

实验结果：

按照上述方法测定各 iADC 对三种肿瘤细胞的增殖抑制作用，如表 1 所示：

表 1. iADC 对三种肿瘤细胞的增殖抑制作用

iADC 名称	IC ₅₀ (HCC1954, nM)	IC ₅₀ (NCI-N87, nM)	IC ₅₀ (NCI-H358, nM)
Trastuzumab-C-7	0.108	0.293	83.769
Trastuzumab-C-8	0.112	0.250	374.766
Trastuzumab-C-9	0.021	0.058	136.77
Trastuzumab-C-10	0.011	0.023	164.13
Trastuzumab-C-11	0.017	0.026	331.62
Trastuzumab-C-15	0.017	0.17	/
Trastuzumab-C-16	0.018	0.15	/
Trastuzumab-C-17	0.014	0.32	/
Trastuzumab-C-20	0.010	0.09	/
Trastuzumab-C-21	0.018	0.12	/
Trastuzumab-C-22	0.053	0.103	/

10 结果表明：各 iADC 对 HCC1954 和 NCI-N87 细胞(HER2 阳性)有很强的增殖抑制作用，对 NCI-H358 细胞(HER2 阴性)的增殖抑制作用明显减弱，表明各 iADC 对 HER2 阳性细胞杀伤具有选择性。

实验例 2：免疫刺激抗体药物偶联物（immunomodulatory antibody drug conjugate, iADC）在肿瘤细胞存在的情况下刺激外周血单个核细胞(PBMC)分泌 TNF-α 能力的测定

实验步骤:

1. 收集表达 HER2 的对数生长期的 HCC1954 肿瘤细胞(康诺泰),用 PBS 清洗两遍,并用 RPMI1640+10%热灭活 FBS 完全培养基重悬细胞调整细胞密度为 2×10^5 个/mL,将 HCC1954 肿瘤细胞接种于 96 孔板(康宁)中,每孔 1×10^4 个细胞。
- 5 2. 复苏 PBMC(赛笠生物),用 RPMI1640+10%热灭活 FBS 完全培养基重悬细胞,调整密度为 6×10^5 个/mL,加入接种了肿瘤细胞的 96 孔板中,每孔 3×10^4 个 PBMC 细胞。
3. 将 100 μ L 不同浓度待测药物加入孔板中,使其终浓度分别为 500 nM、166.7 nM、55.6 nM、18.52 nM、6.17 nM、2.06 nM、0.69 nM,空白孔加入 100 μ L RPMI1640+10%热灭活 FBS 完全培养基。
- 10 4. 放在 5% CO₂, 37°C培养箱中培养,培养 24 小时后,各孔取 50 μ L 上清检测,根据 human TNF- α ELISA 检测试剂盒(Invitrogen)步骤孵育一抗抗体及 HRP 标记的二抗,显色,并读取 450 nm 波长下的吸光度。使用 Graphpad Prism 软件根据标准曲线,计算出 TNF- α 的浓度。

实验结果:

- 15 按照上述方法测定各免疫刺激抗体药物偶联物 iADC 在 HCC1954 肿瘤细胞存在的情况下刺激人外周血单个核细胞(PBMC)分泌 TNF- α 的能力,结果如表 2 所示:

表 2. 体外 HCC1954 肿瘤细胞和 PBMC 共孵育体系中 iADC 刺激 TNF- α 的分泌结果

药物	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (TNF- α , pg/mL)
Trastuzumab-C-7	11.25	1791.26
Trastuzumab-C-8	17.72	1836.92
Trastuzumab-C-9	24.41	470.23
Trastuzumab-C-10	7.54	522.28
Trastuzumab-C-11	32.59	427.95
Trastuzumab-C-15	74.62	817.79
Trastuzumab-C-16	4.61	411.5
Trastuzumab-C-17	3.39	788.8
Trastuzumab-C-20	2.18	791.6
Trastuzumab-C-21	3.13	573.7
Trastuzumab-C-22	14.05	1562.5

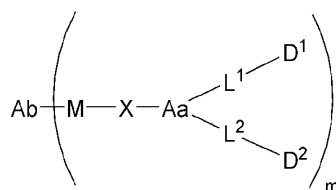
结果表明: 各 iADC 在体外 HCC1954 肿瘤细胞和 PBMC 共孵育体系下均能有效刺激 PBMC 分泌 TNF- α 。

20

除本文中描述的那些外,根据前述描述,本发明的各种修改对本领域技术人员而言会是显而易见的。这样的修改也意图落入所附权利要求书的范围内。

权 利 要 求

1. 一种如式(I)所示的抗体药物偶联物:



I

其中,

Ab 为靶向基团;

M 为和靶向基团连接的接头部位;

X 为连接 M 和 Aa 的连接子;

Aa 选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段;

L¹ 为共价键或连接 Aa 和 D¹ 的连接子;

L² 为连接 Aa 和 D² 的连接子;

D¹ 选自细胞毒性药物片段;

D² 选自 TLR 激动剂片段;

m 选自 1 到 10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

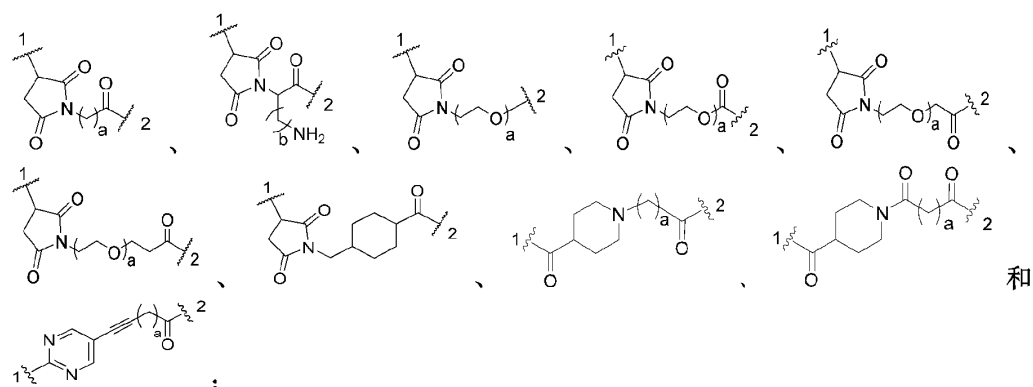
2. 权利要求 1 所述的抗体药物偶联物中, Ab 为靶向细胞表面受体或肿瘤表面抗原的靶向基团。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗体药物偶联物中, Ab 为抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包括单克隆抗体、多克隆抗体、线性抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、嵌合抗体、鼠源抗体、人源化抗体、全人抗体或包含抗体的抗原结合部分的融合蛋白。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物中, Ab 为抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的 Fv 和 scFv。

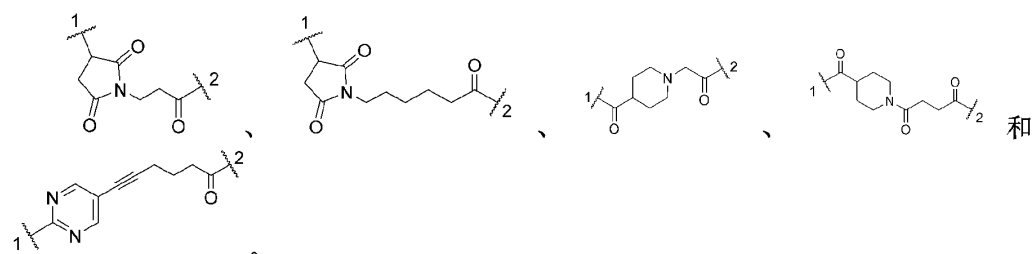
5. 权利要求 1-4 任一项所述的抗体药物偶联物中, 所述抗体或其抗原结合片段选自抗-Her-2 抗体、抗-EGFR 抗体、抗-VEGFR 抗体、抗-PD-L1 抗体、抗-PD-1 抗体、抗-CTLA-4 抗体和抗-Trop-2 抗体。

6. 权利要求 1-5 任一项所述的抗体药物偶联物中, **M** 为共价键或选自以下结构:

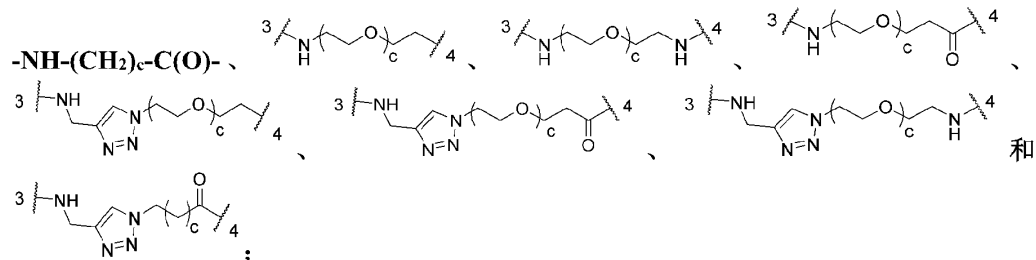


其中, 各 **a** 独立地选自 1-5 的整数, **b** 选自 1-3 的整数, 并且 **M** 的 1 位置与 **Ab** 相连, 2 位置与 **X** 相连。

7. 权利要求 1-6 任一项所述的抗体药物偶联物中, **M** 为共价键或选自以下结构:



8. 权利要求 1-7 任一项所述的抗体药物偶联物中, **X** 为共价键或选自 **C**₁₋₆ 亚烷基、



其中, 各 **c** 独立地选自 1-10 的整数; **X** 的 3 位置与 **M** 相连, 4 位置与 **Aa** 相连。

9. 权利要求 1-8 任一项所述的抗体药物偶联物中, **Aa** 选自氨基酸片段和由两个或

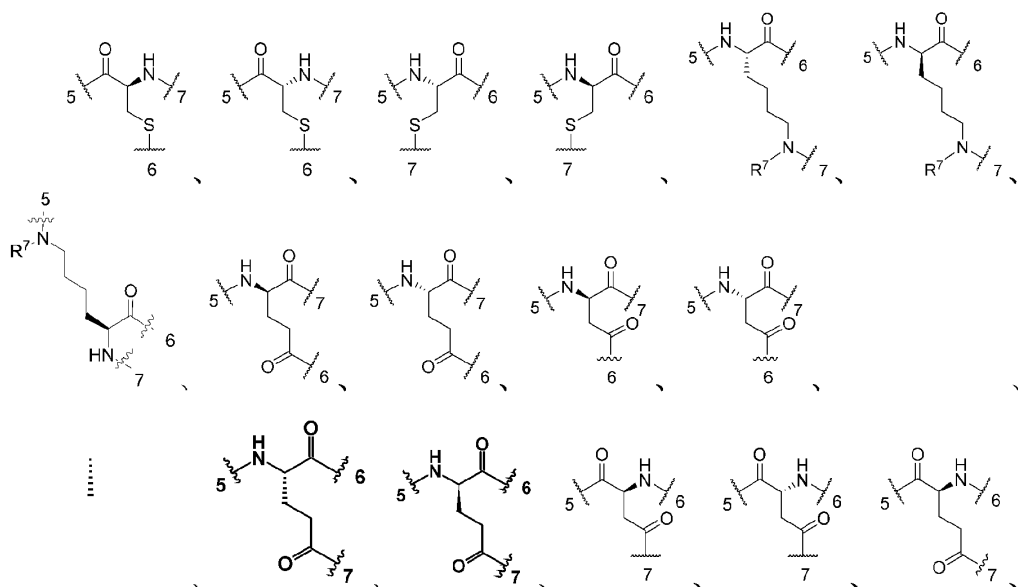
两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Gly、Phe、Ala、Val、Ser、Thr、His、Trp、Cys、Asp、Glu、Lys、Tyr 和 Arg，任选地，各氨基酸独立地被 C₁₋₆ 烷基或聚乙二醇亲水结构单元修饰；

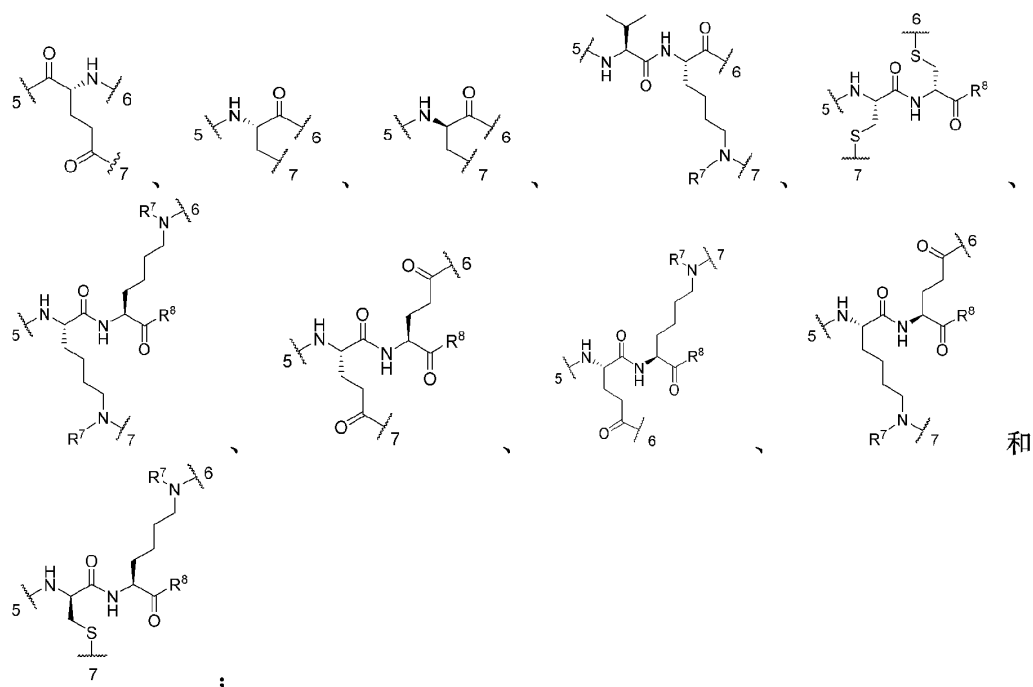
优选地, 所述聚乙二醇亲水结构单元选自  和 , 其中各 c 独立地选自 1-10 的整数。

10. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体药物偶联物中, Aa 选自下述氨基酸的片段和由它们中的两个或多个任意组合形成的肽片段: Gly、Phe、Ala、Val、Cys、Asp、Glu、Lys 和 Arg, 并且各氨基酸各自独立地任选地被 C₁₋₆ 烷基或聚乙二醇亲水结构单元修饰;

优选地, 所述聚乙二醇亲水结构单元选自  和 , 其中各 c 独立地选自 1-10 的整数。

11. 权利要求 1-10 任一项所述的抗体药物偶联物, Aa 选自以下结构:



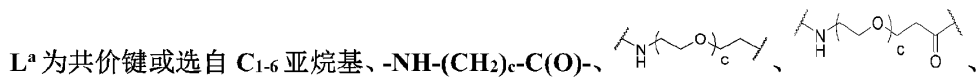


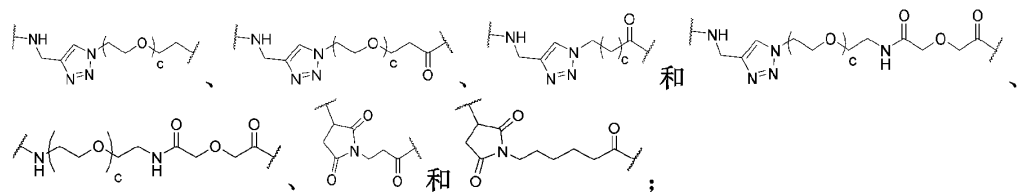
其中, 各 R^7 独立地选自 H 、 C_{1-6} 烷基和聚乙二醇亲水结构单元; 各 R^8 独立地选自羟基和聚乙二醇亲水结构单元; 5 位置与 X 相连, 6 位置与 L^1 和 L^2 中的一个相连, 7 位置与 L^1 和 L^2 中的另一个相连; 优选地, 5 位置与 X 相连, 6 位置与 L^1 相连, 7 位置与 L^2 相连;

优选地,所述聚乙二醇亲水结构单元选自 $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_c\text{-}$ 和 $\text{-(CH}_2\text{CH(CH}_3\text{)O)}_c\text{-}$, 其中各 c 独立地选自 1-10 的整数。

12. 权利要求 1-11 任一项所述的抗体药物偶联物中, L¹ 为共价键或选自不可断裂连接子和可断裂连接子, 其中, 可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割, 所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶。

13. 权利要求 1-12 任一项所述的抗体药物偶联物中, L^1 为共价键或 $-L^a-L^b-L^c-$, 其中:

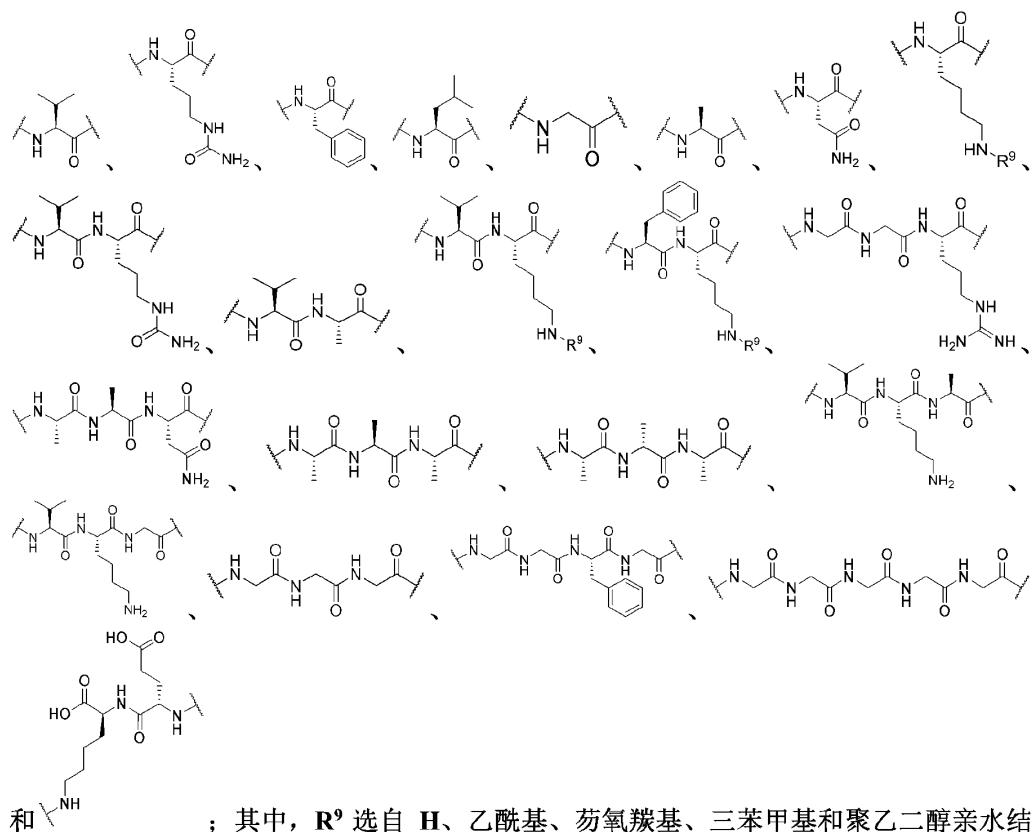




其中, 各 c 独立地选自 1-10 的整数;

L^b 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段, 其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn;

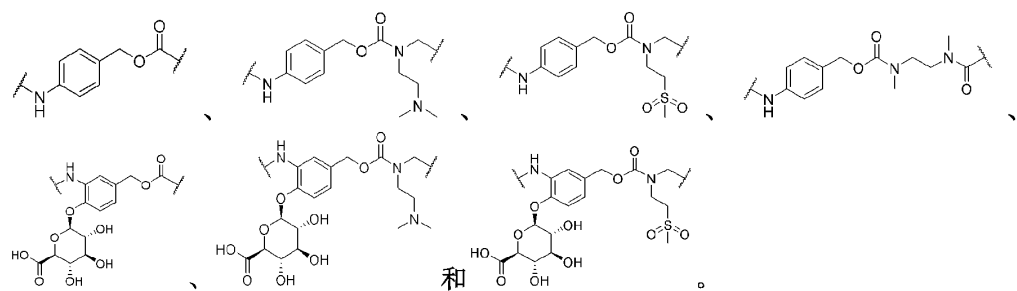
优选地, L^b 为共价键或选自以下结构:



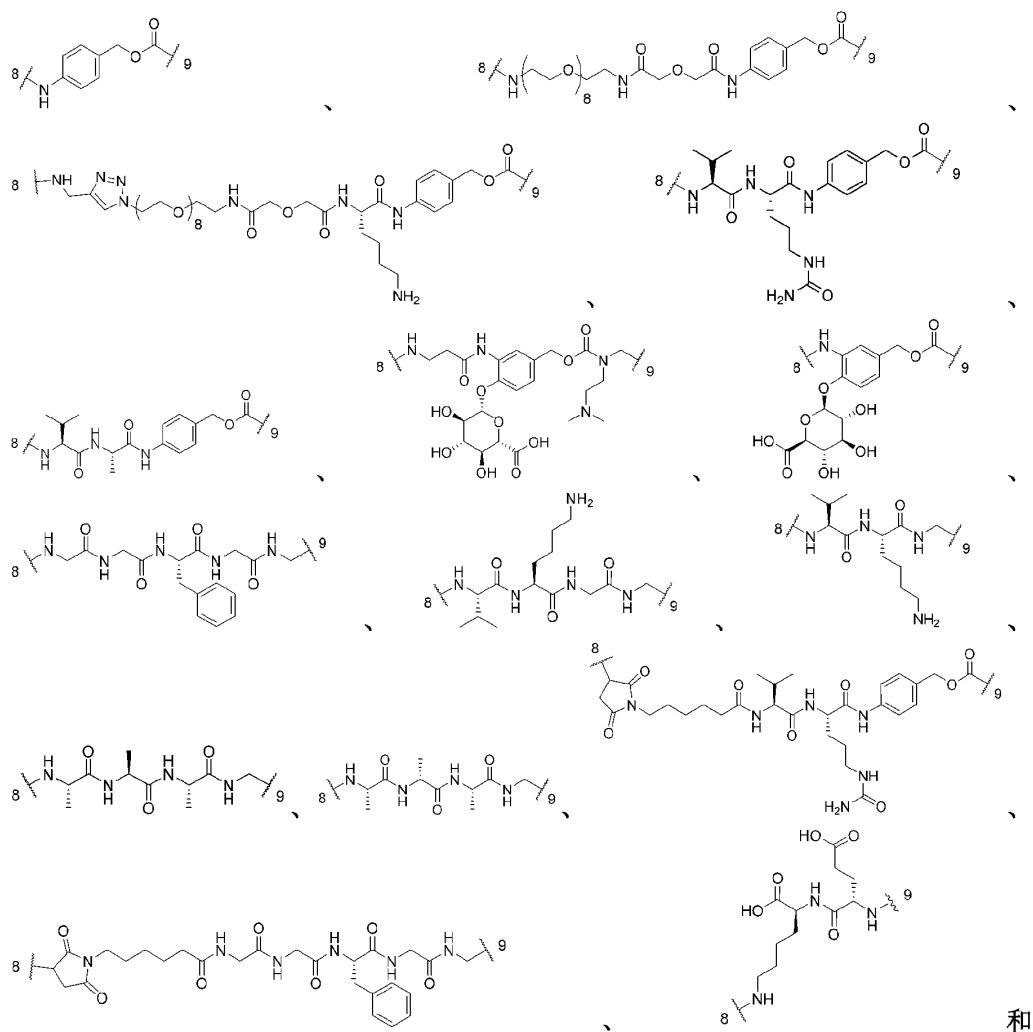
和 L^c 为共价键、 $-NH-CH_2-$ 或选自以下结构:

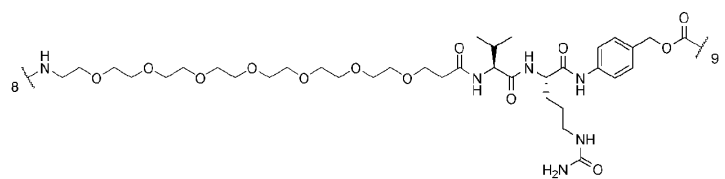
其中, R^9 选自 H、乙酰基、苄氧羰基、三苯甲基和聚乙二醇亲水结构单元; 优选地, 所述聚乙二醇亲水结构单元为 $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_c\text{-}$ 或 $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_c\text{-}$, 其中各 c 独立地选自 1-10 的整数;

L^c 为共价键、 $-NH-CH_2-$ 或选自以下结构:



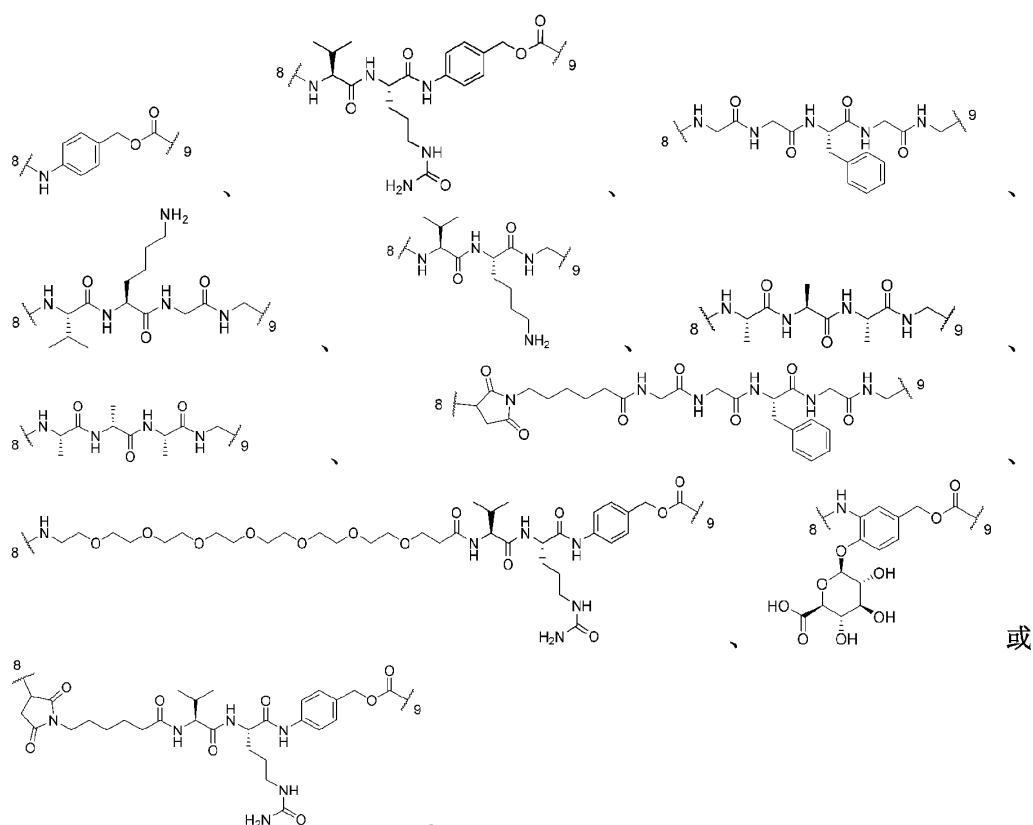
14. 权利要求 1-13 任一项所述的抗体药物偶联物中， L^1 为共价键或选自以下结构：





其中，位置 8 与 Aa 相连，位置 9 与 D¹ 相连；

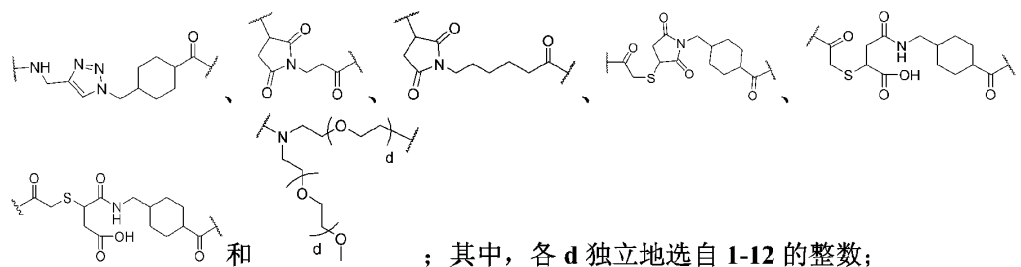
优选地，L¹ 为：



15. 权利要求 1-14 任一项所述的抗体药物偶联物中，L² 选自不可断裂连接子和可断裂连接子，其中，可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割，所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶。

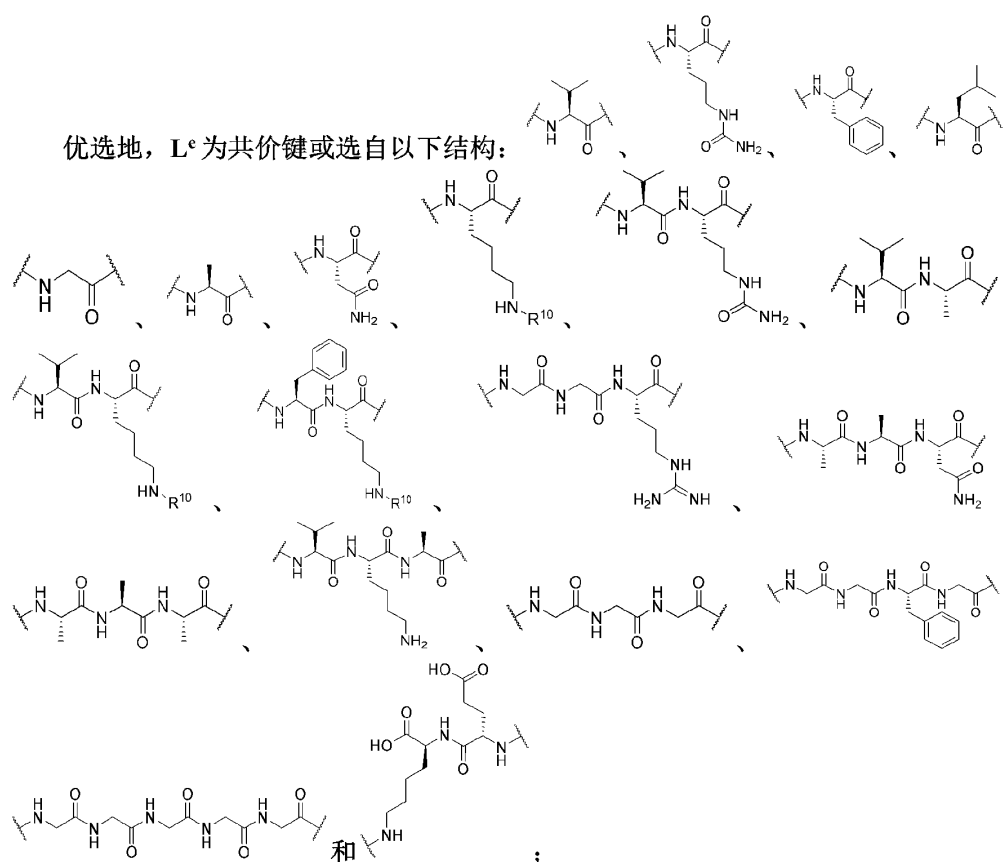
16. 权利要求 1-15 任一项所述的抗体药物偶联物中，L² 为 -L^d-L^e-L^f-，其中：

L^d 为共价键或选自由下述的一个或多个组成的二价结构：C₁₋₆ 亚烷基、
 $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_d-\text{NH}-$ 、
 $\text{-(CH}_2\text{O)}_d\text{-}$ 、
 $\text{-(CH}_2\text{O)}_d\text{-C(=O)-}$ 、
 $\text{-(CH}_2\text{O)}_d\text{-NH-}$ 、
 $\text{-(NHCH}_2\text{O)}_d\text{-}$ 、



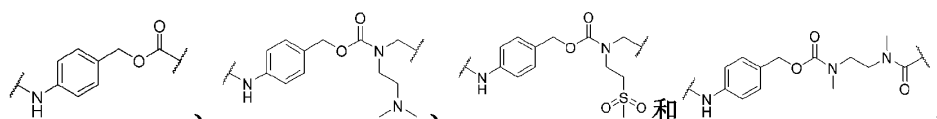
L^e 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn；

优选地， L^e 为共价键或选自以下结构：

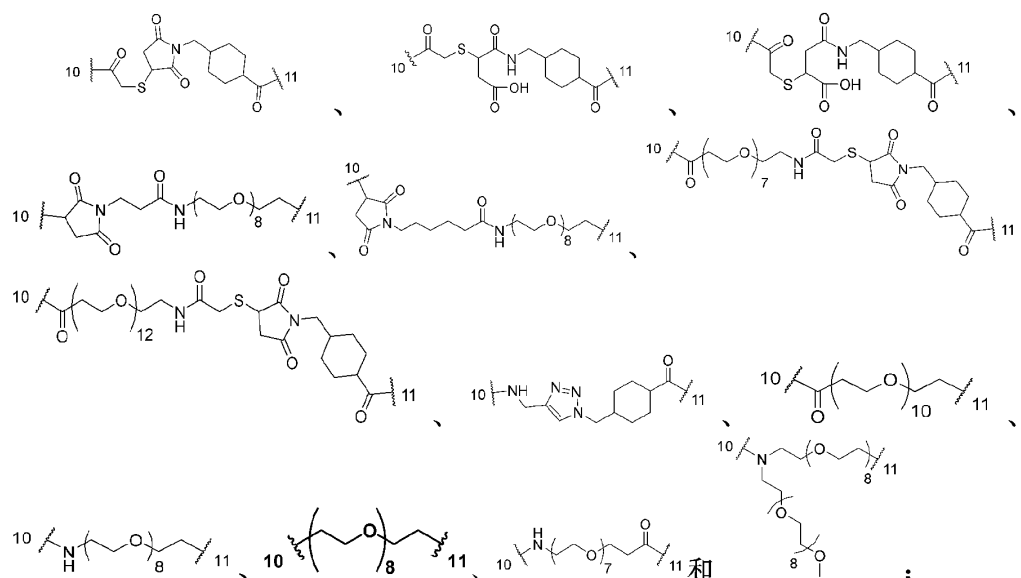


其中，各 R^{10} 独立地选自 H、乙酰基、苄氧羰基、三苯甲基和聚乙二醇亲水结构单元；优选地，所述聚乙二醇亲水结构单元为 $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_d\text{-}$ 或 $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_d\text{-}$ ；各 d 独立地选自 1-10 的整数；

L^f 为共价键、 $\text{-NH-CH}_2\text{-}$ 或选自以下结构：

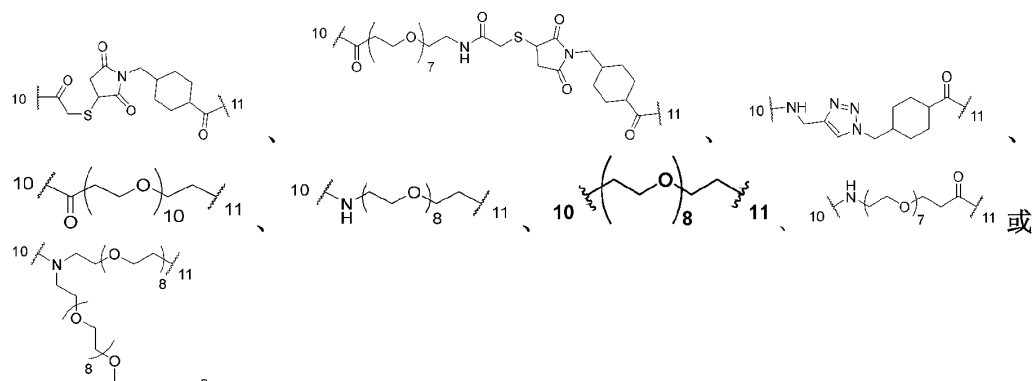


17. 权利要求 1-16 任一项所述的抗体药物偶联物中, L^2 选自以下结构:



其中, 位置 10 同 Aa 相连, 位置 11 同 D^2 相连;

优选地, L^2 为:

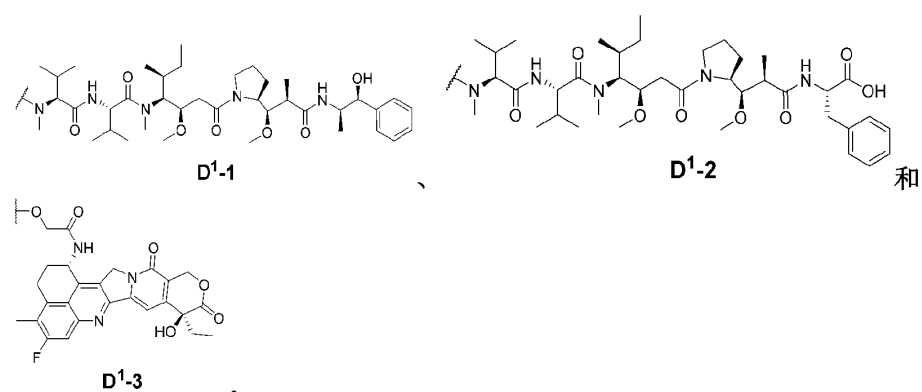


18. 权利要求 1-17 任一项所述的抗体药物偶联物中, D^1 选自细胞毒性药物片段, 所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂和拓扑异构酶抑制剂, 所述微管蛋白抑制剂包括海兔毒素 (dolastatin)、澳瑞他汀 (auristatin) 类、美登素 (maytansine) 类、微管溶素 (Tubulysins) 类和隐粘菌素 (cryptomycins) 类, 所述 DNA 损伤剂包括

PBD 类、杜卡霉素 (duocarmycin) 类和卡齐霉素 (calicheamicin) 类, 所述拓扑异构酶抑制剂包括喜树碱及其衍生物。

19. 权利要求 1-18 任一项所述的抗体药物偶联物中, 所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素 10、MMAE、MMAF、美登素、DM1、DM3 和 DM4, 所述拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱、SN-38、依喜替康、拓扑替康、贝洛替康、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、阿霉素、表柔比星和 PNU-159682。

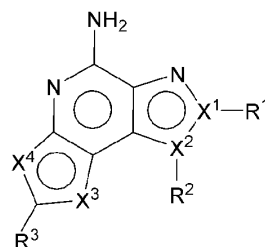
20. 权利要求 1-19 任一项所述的抗体药物偶联物中, D^1 选自以下结构:



21. 权利要求 1-20 任一项所述的抗体药物偶联物中, D^2 为 TLR 激动剂片段, 其中所述 TLR 激动剂选自 TLR2 激动剂、TLR4 激动剂、TLR6 激动剂、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂、TLR7/8 激动剂和 TLR9 激动剂。

22. 权利要求 1-21 任一项所述的抗体药物偶联物中, D^2 为 TLR 激动剂片段, 所述 TLR 激动剂选自 TLR7 激动剂、TLR8 激动剂和 TLR7/8 激动剂。

23. 权利要求 1-22 任一项所述的抗体药物偶联物中, D^2 为 TLR 激动剂片段, 所述 TLR 激动剂为式(II)所示化合物:



II

其中,

X^1 选自 N 和 C;

X^2 选自 N 和 C;

且 X^1 和 X^2 中至少一个选自 N;

X^3 选自 O、S 和 N;

X^4 选自 O、S、N 和 CR^4 ;

R^1 选自 C_{1-6} 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $O-C_{1-6}$ 烷基;

R^2 选自氢和式- $L^3-L^4-L^5-L^6$;

L^3 选自共价键和 C_{1-6} 亚烷基;

L^4 选自共价键、 C_{3-10} 环烷基、3-12 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代;

L^5 选自共价键、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-NR^5-$ 、 $-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^5-$ 、 $-NR^5-C(O)-O-$ 、 $-NR^5-C(O)-NR^5-$ 、 $-S(O)_r-NR^5-$ 、 $-NR^5-S(O)_r-$ 和 $-NR^5-S(O)_r-NR^5-$;

L^6 选自氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(O-CH_2CH_2)_n-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $(O-CH_2CH_2)_n-O-C_{1-6}$ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代;

R^3 选自氢和式- $L^7-L^8-L^9-L^{10}$;

L^7 选自共价键和 C_{1-6} 亚烷基;

L^8 选自共价键、 C_{3-10} 环烷基、3-12 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基, 所述环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个选自氢、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- NH_2 的基团所取代;

L^9 选自共价键、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-C(O)-NR^6-$ 、 $-NR^6-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^6-$ 、 $-NR^6-C(O)-O-$ 、 $-NR^6-C(O)-NR^6-$ 、 $-S(O)_p-NR^6-$ 、 $-NR^6-S(O)_p-$ 和 $-NR^6-S(O)_p-NR^6-$;

L^{10} 选自氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(O-CH_2CH_2)_q-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $(O-CH_2CH_2)_q-O-C_{1-6}$ 烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自氢、卤素、羟基、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羧基和 $-C(O)-O-C_{1-6}$ 烷基的基团所取代;

R^4 选自氢、卤素、氰基、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-10} 环烷基;

各 R^5 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基;

各 R^6 独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基;

各 r 独立地为 1 或 2;

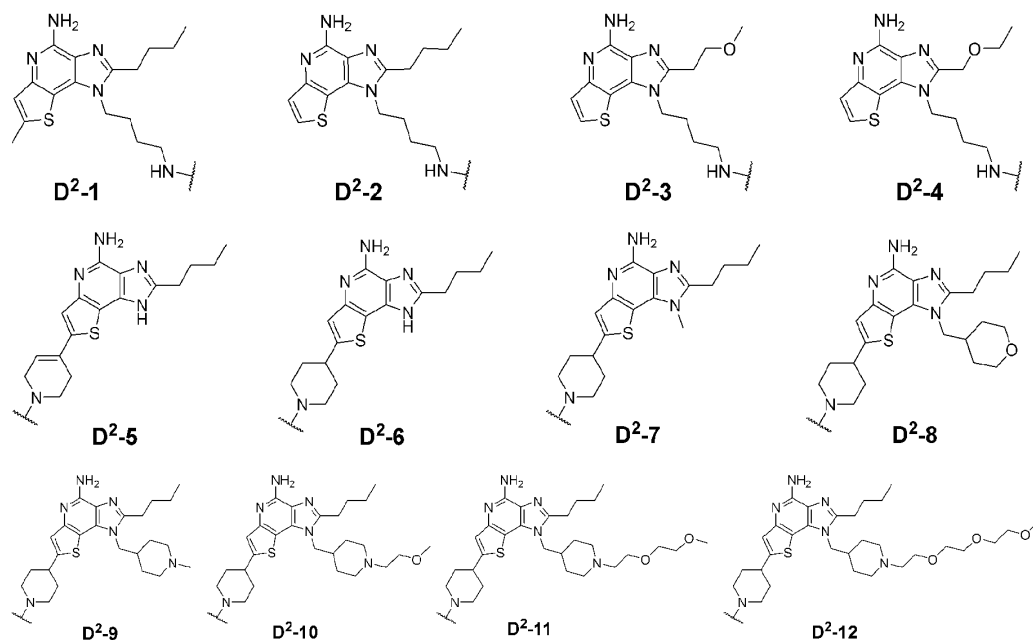
各 n 独立地选自 1-25 的整数;

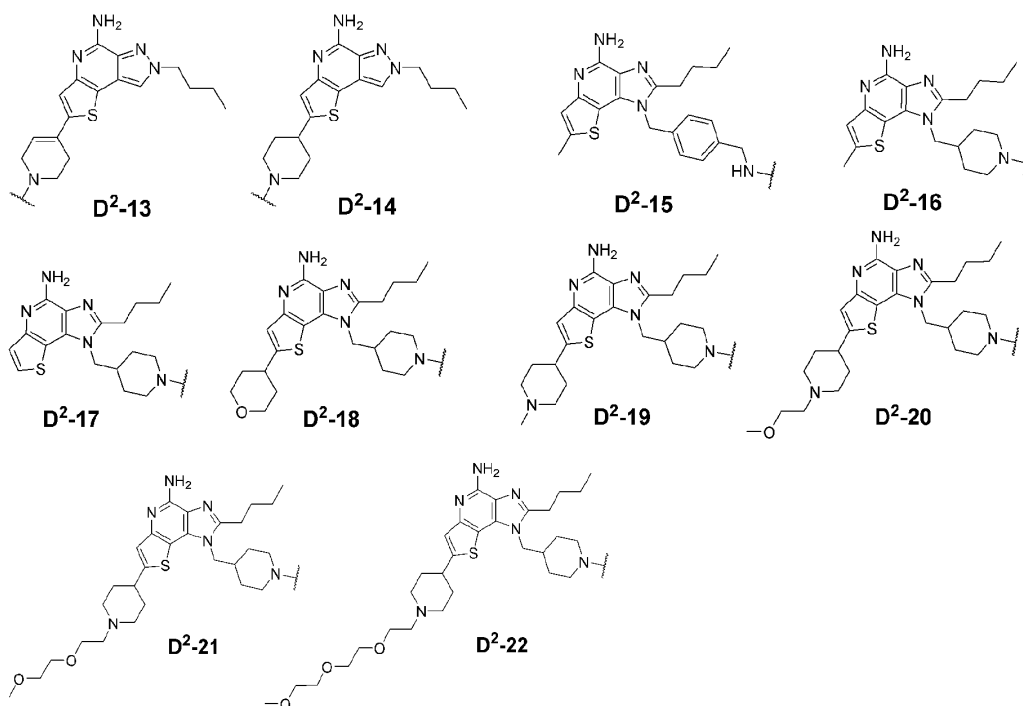
各 p 独立地为 1 或 2;

各 q 独立地选自 1-25 的整数;

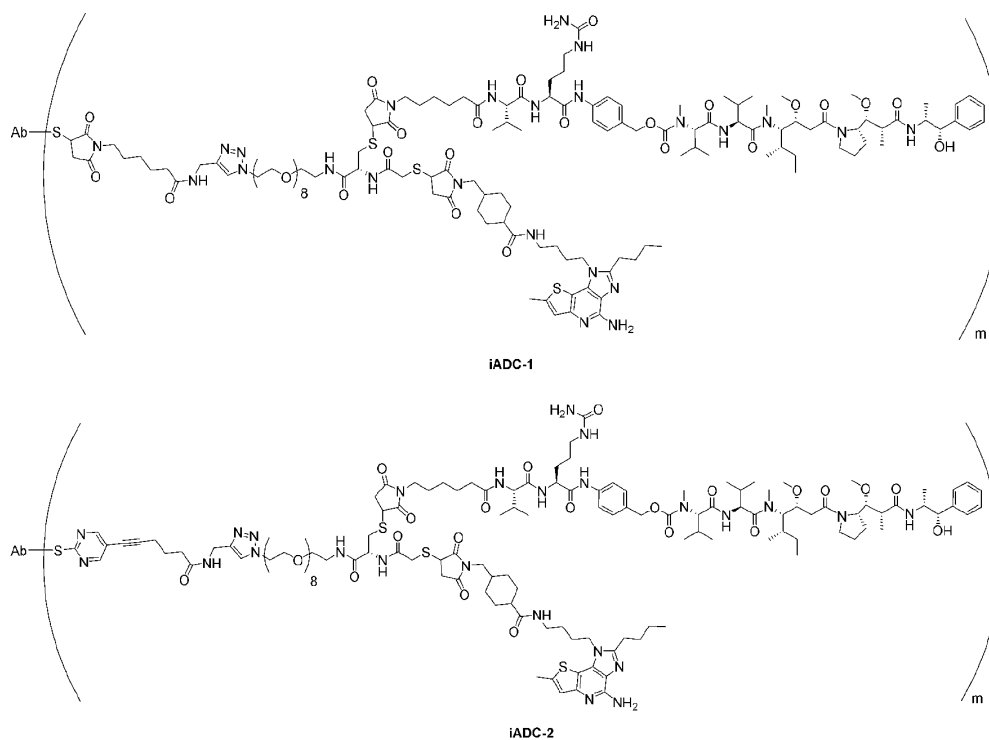
D^2 通过式(II)中的 R^2 或 R^3 与 L^2 相连。

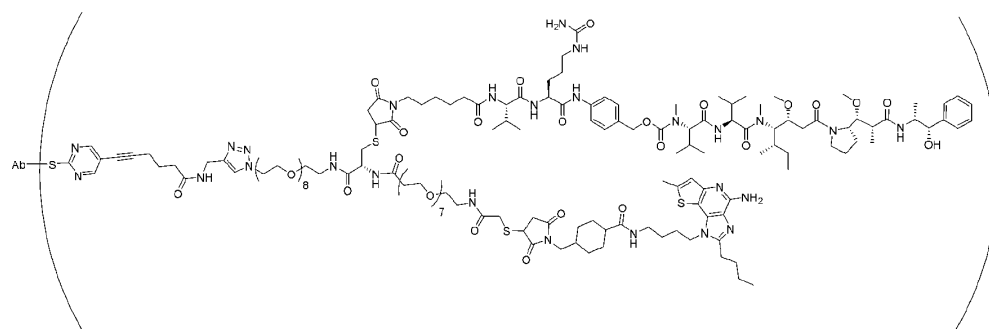
24. 权利要求 1-23 任一项所述的抗体药物偶联物中, D^2 选自以下结构:



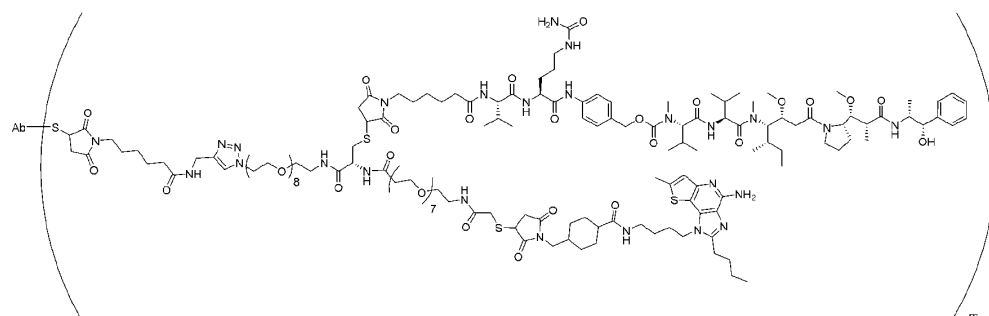


25. 权利要求 1-24 任一项所述的抗体药物偶联物选自以下结构:

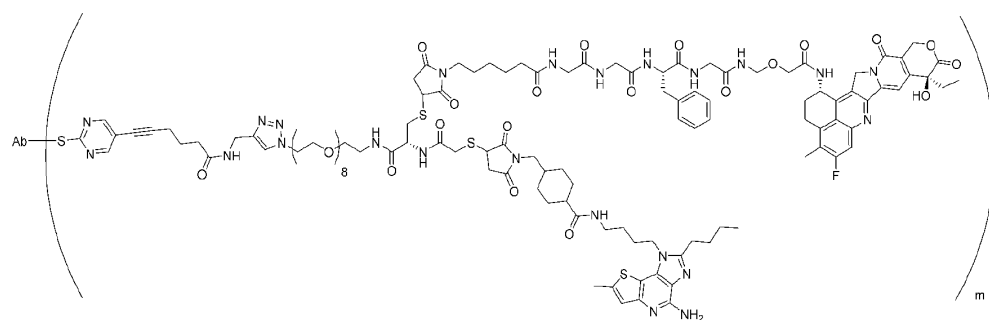




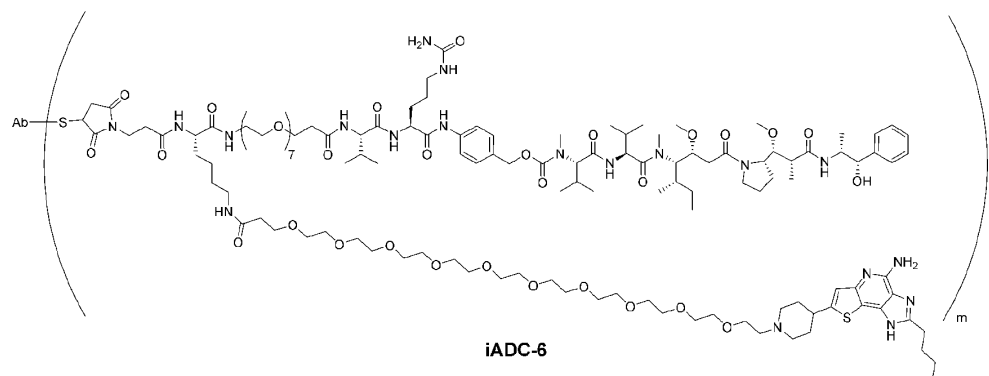
iADC-3



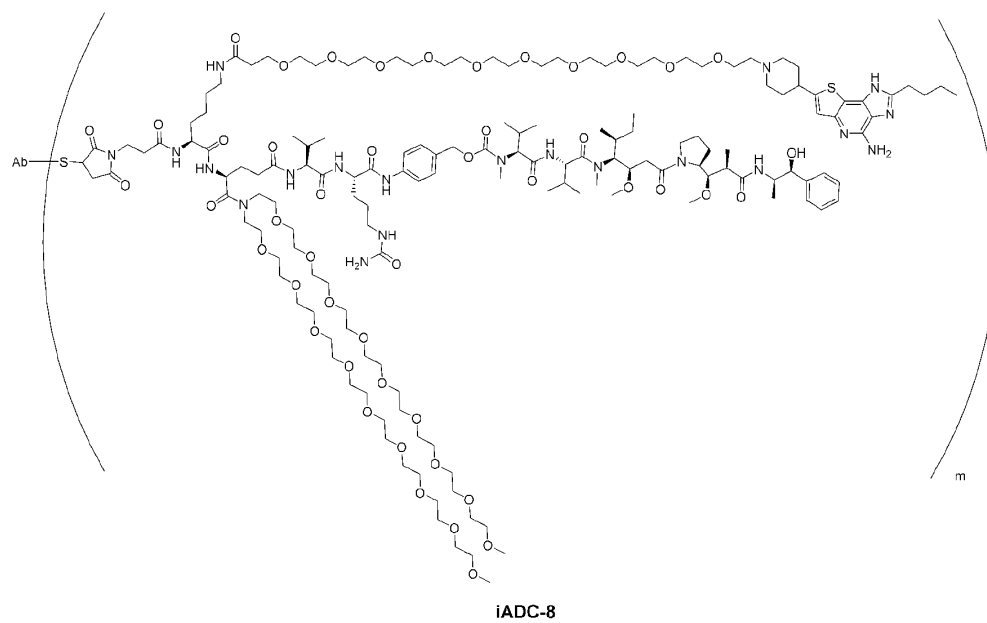
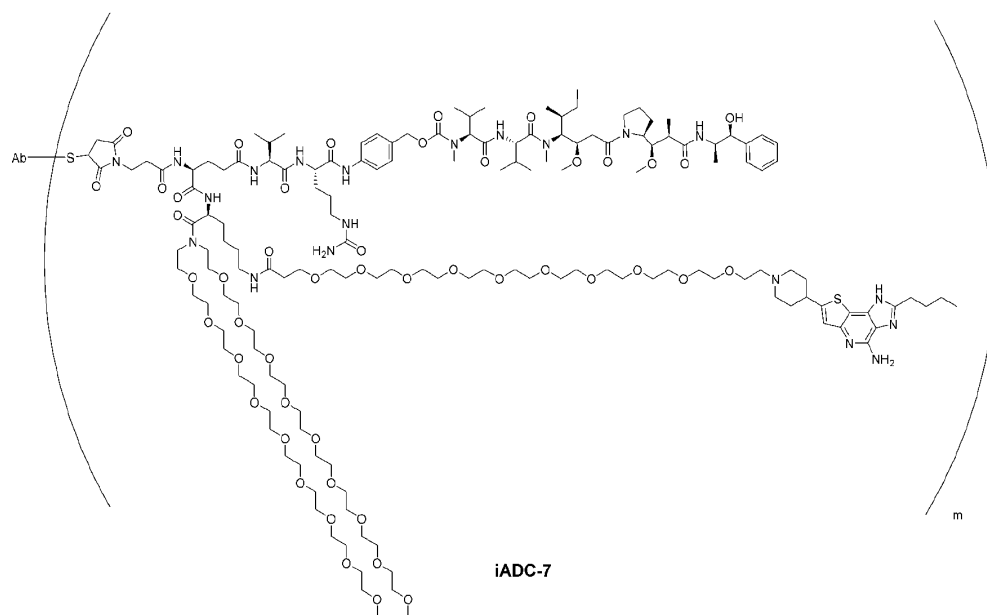
iADC-4

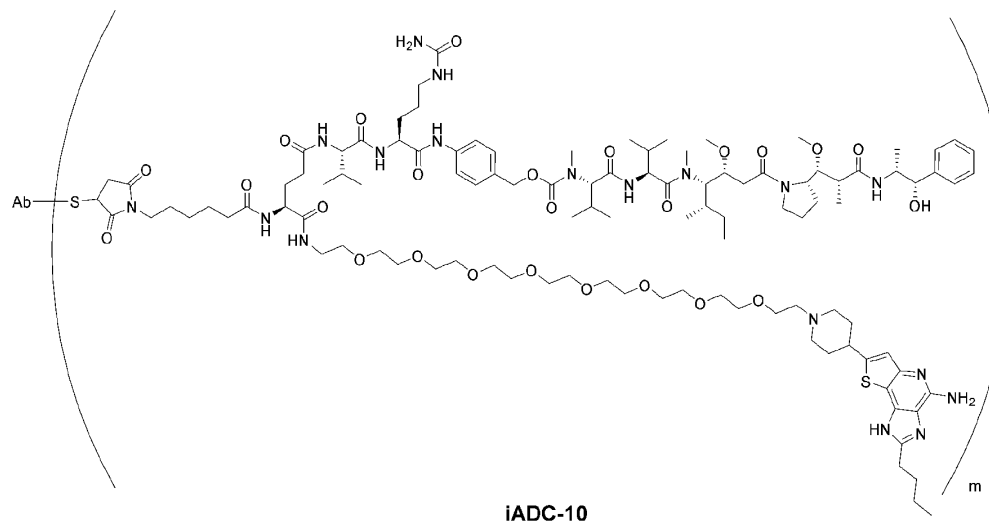
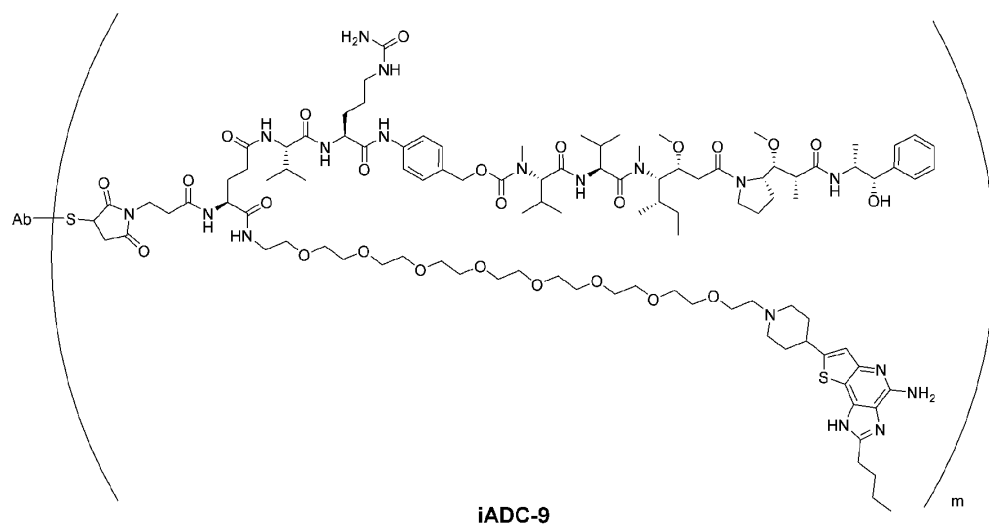


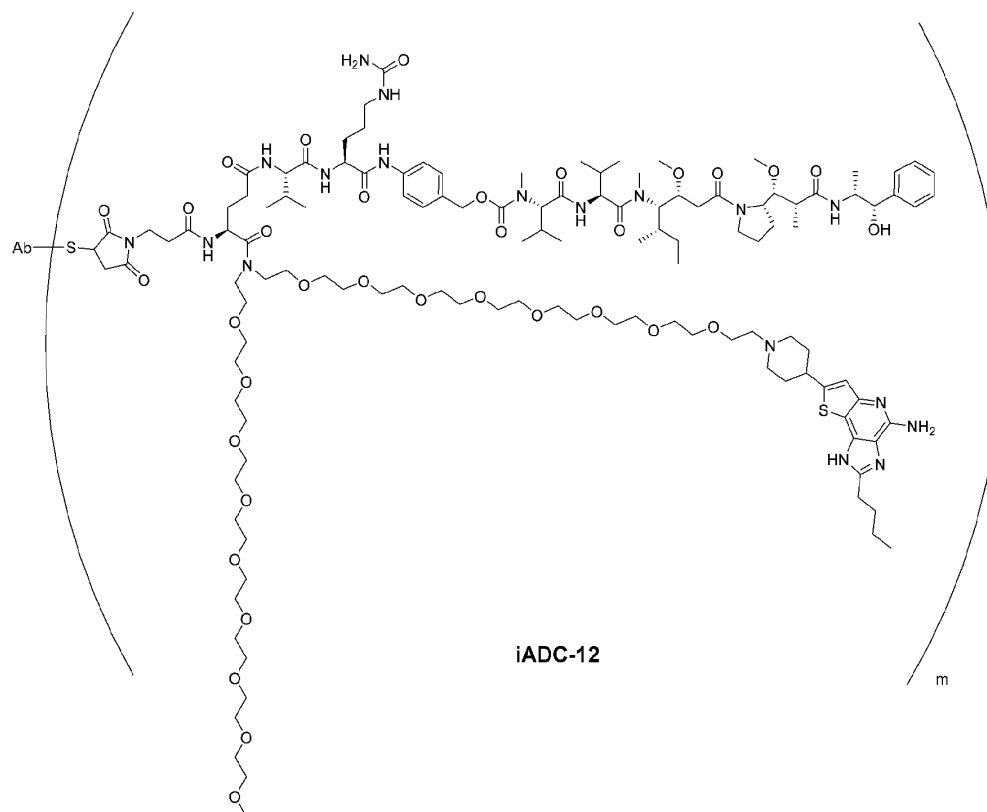
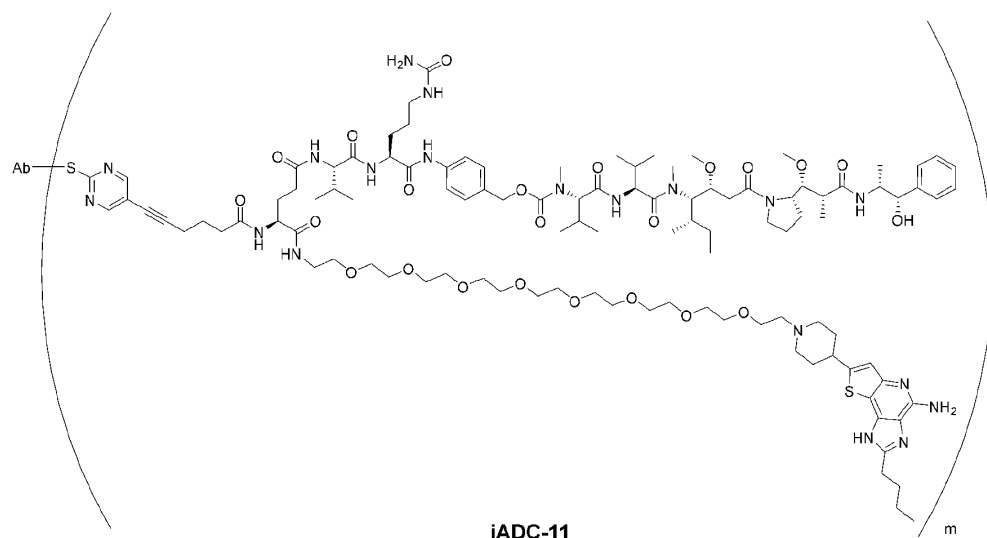
iADC-5



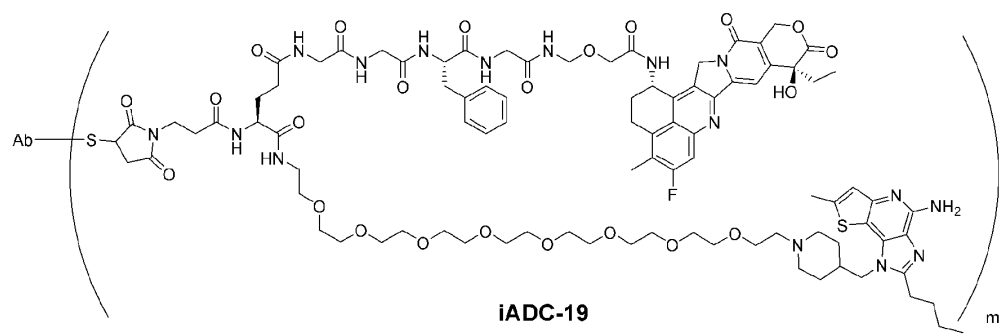
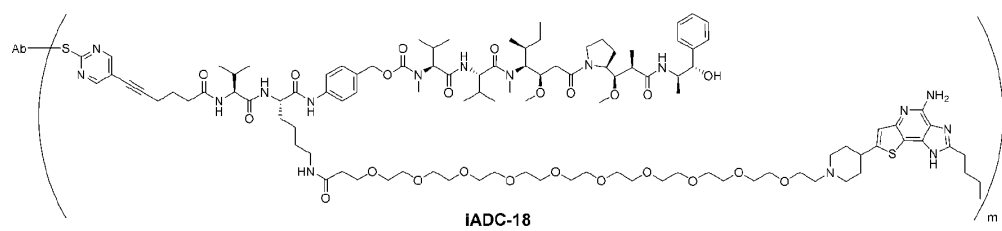
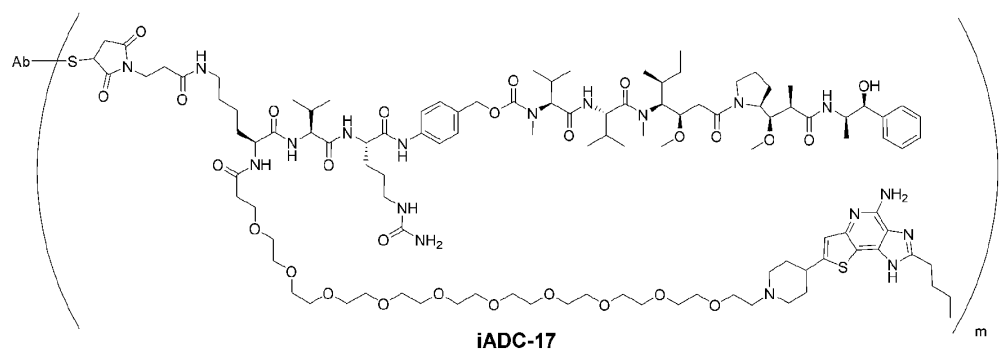
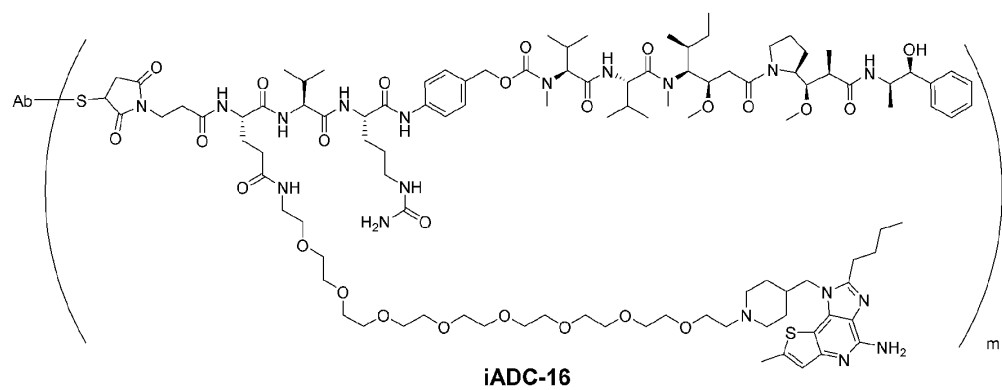
iADC-6

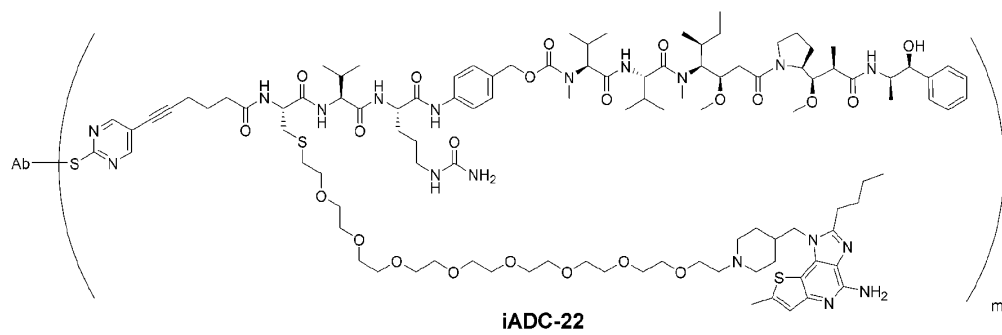
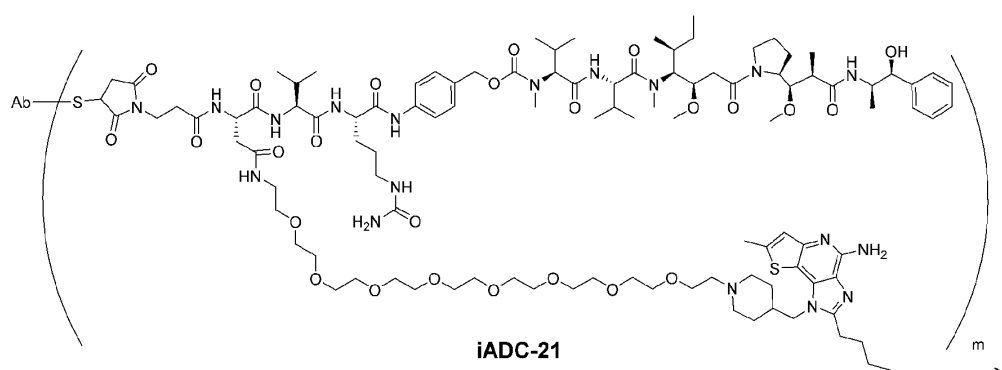
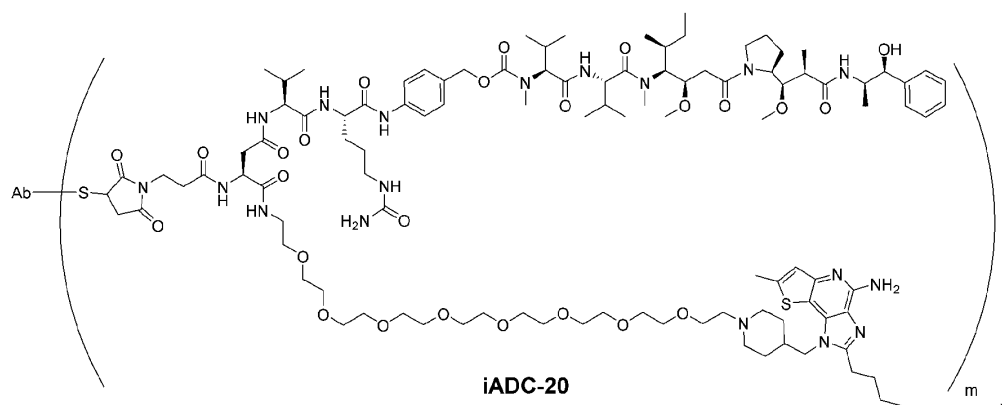


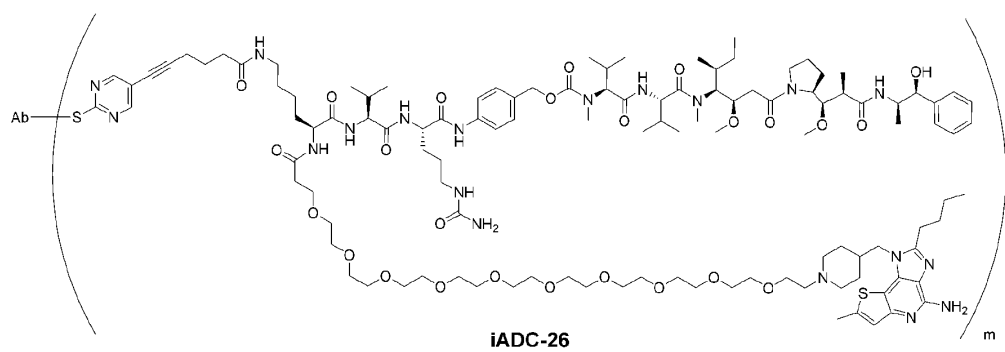
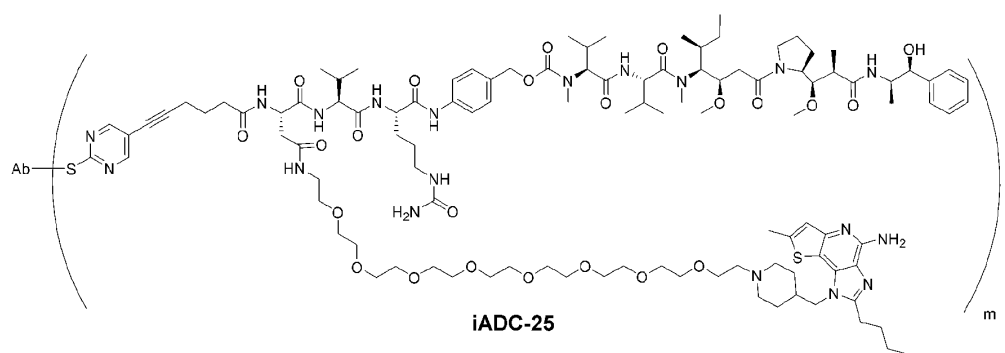
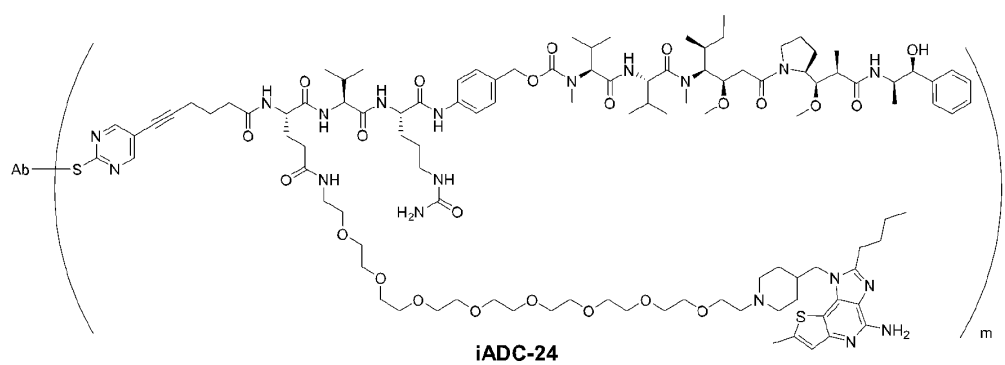
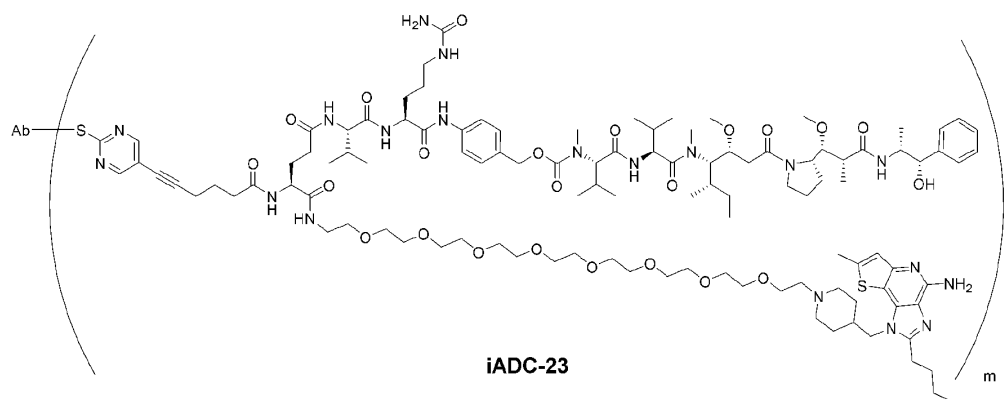


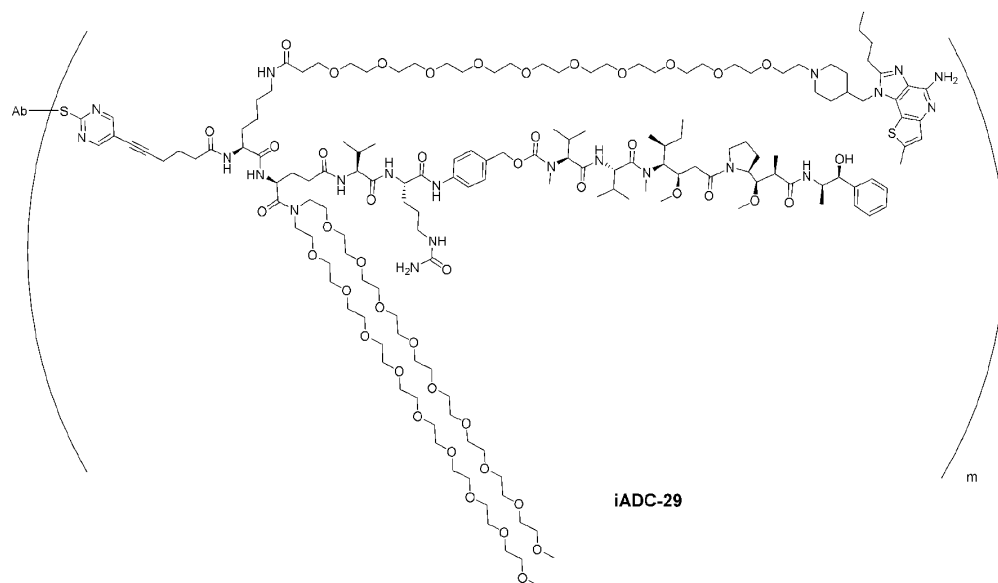
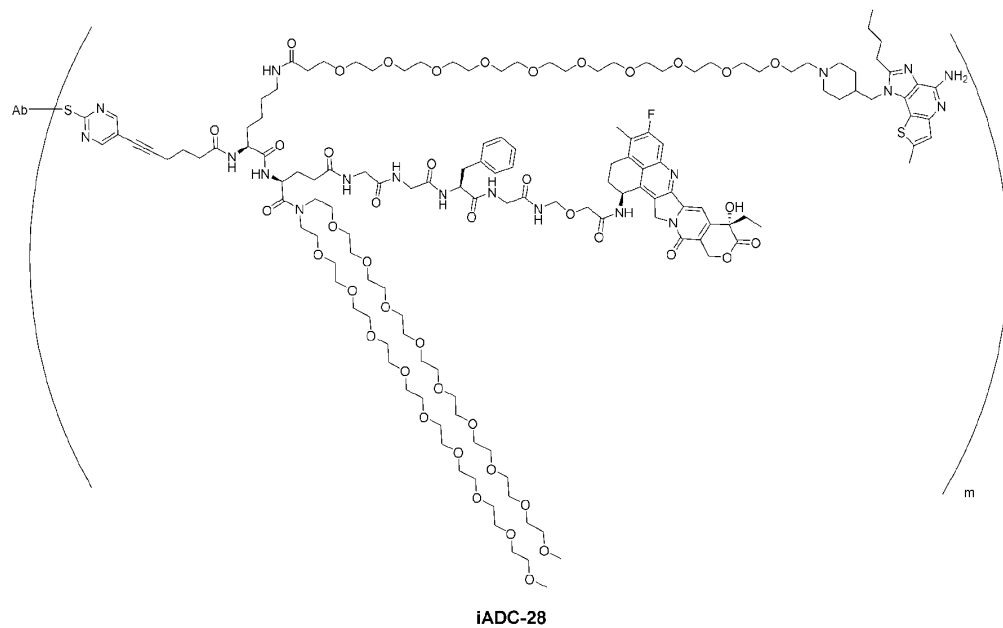
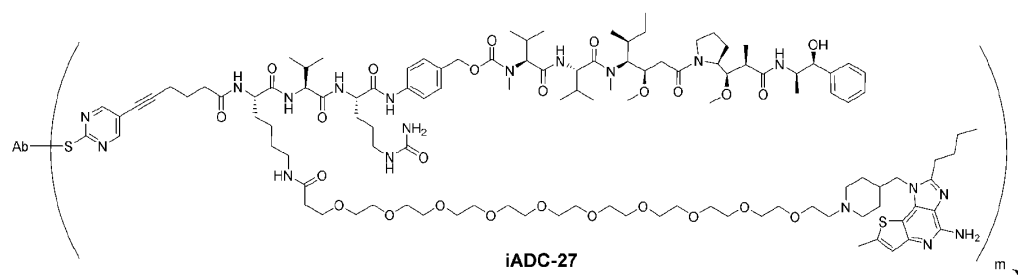


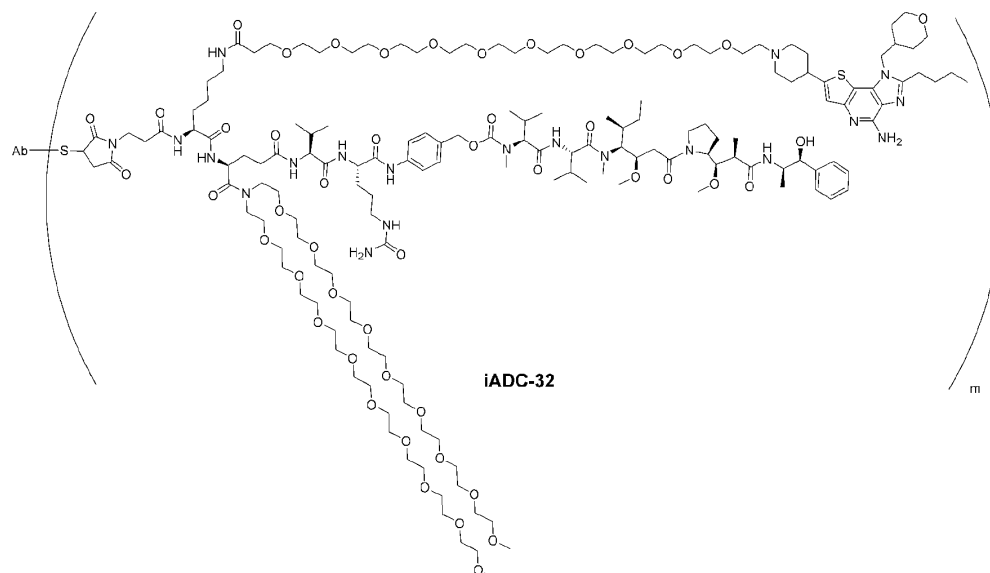
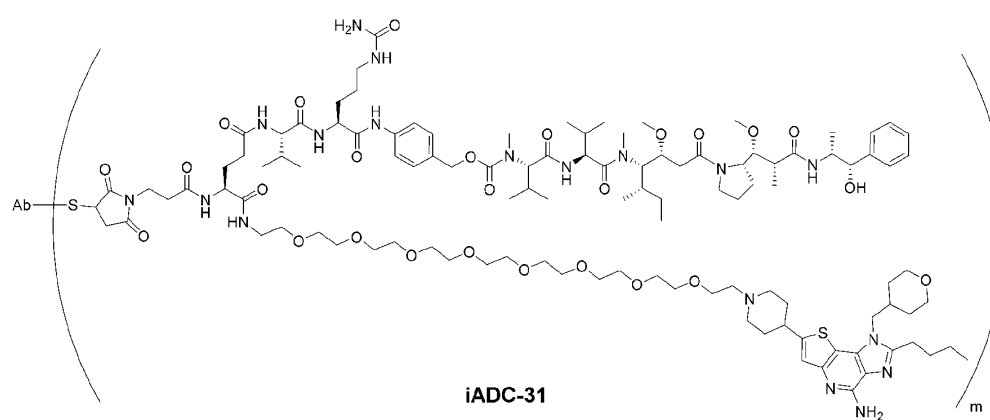
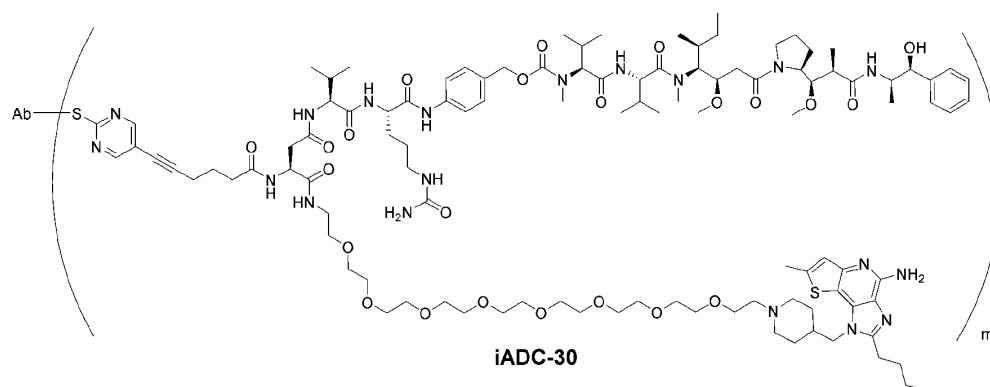


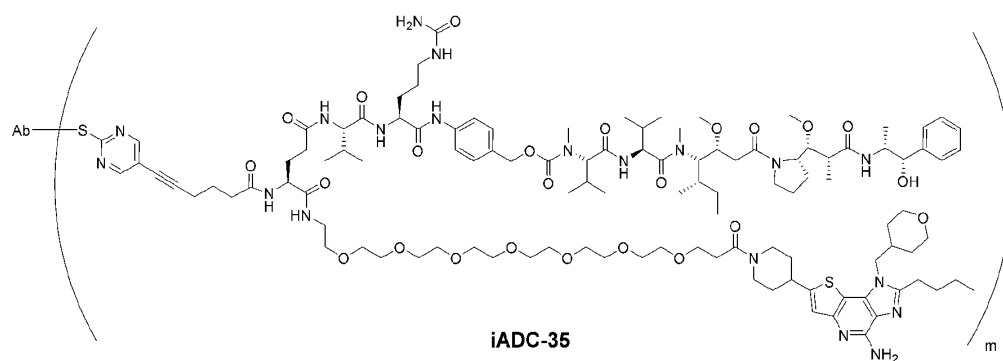
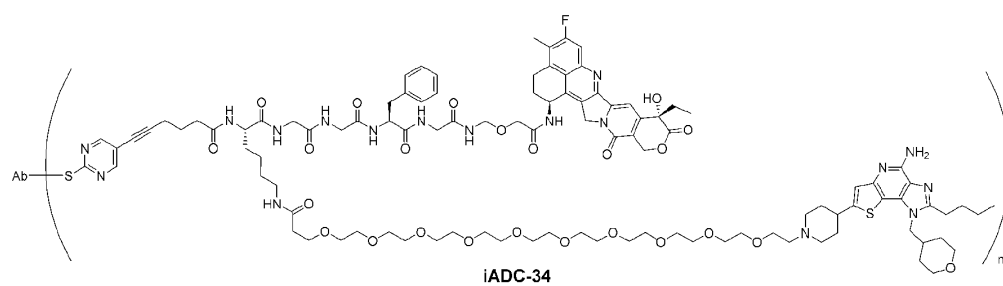
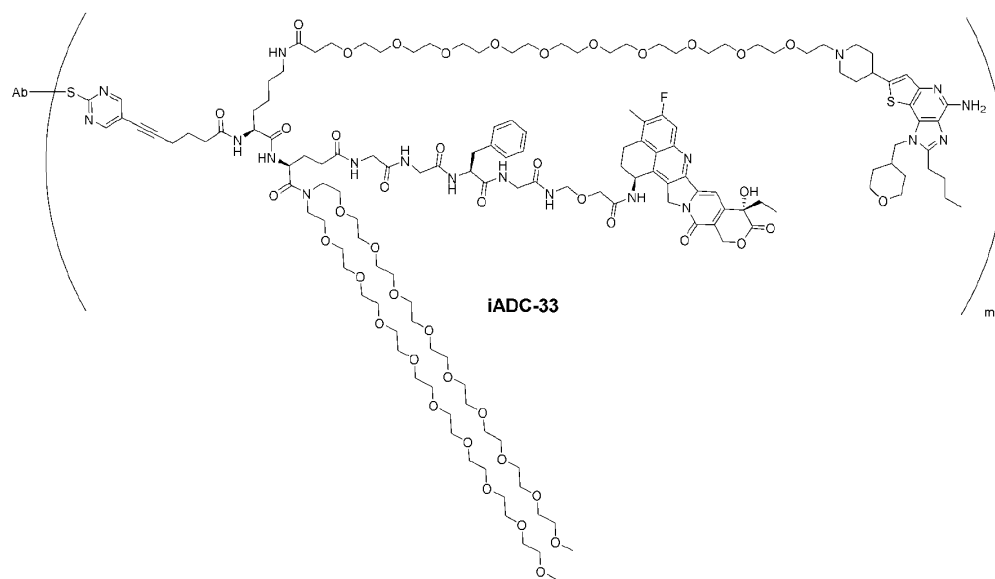


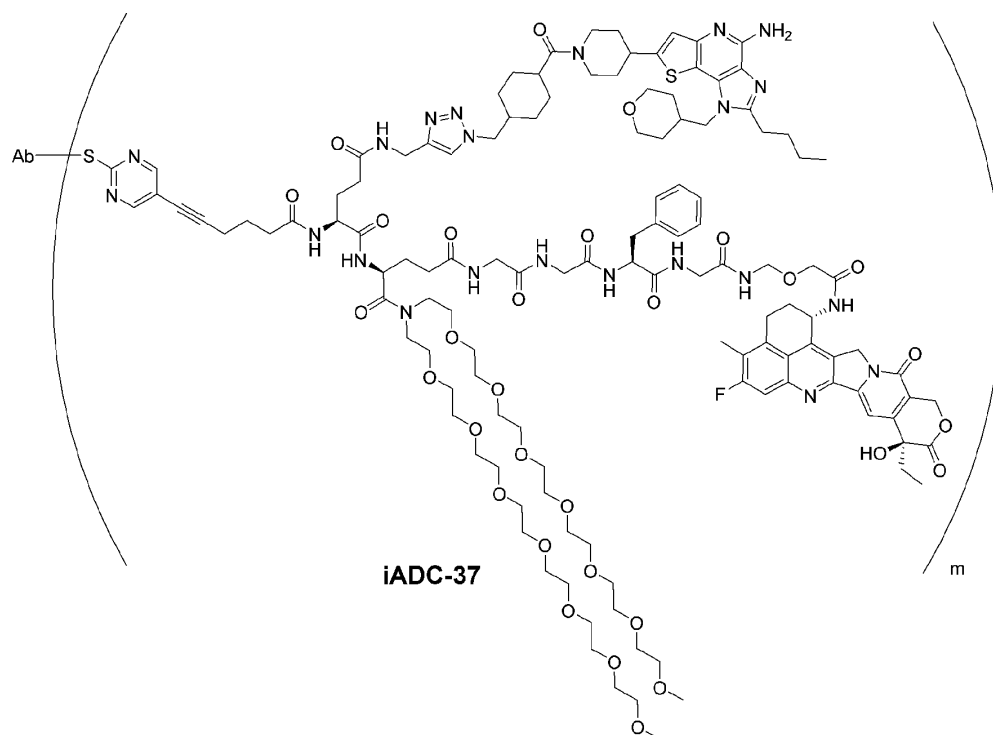
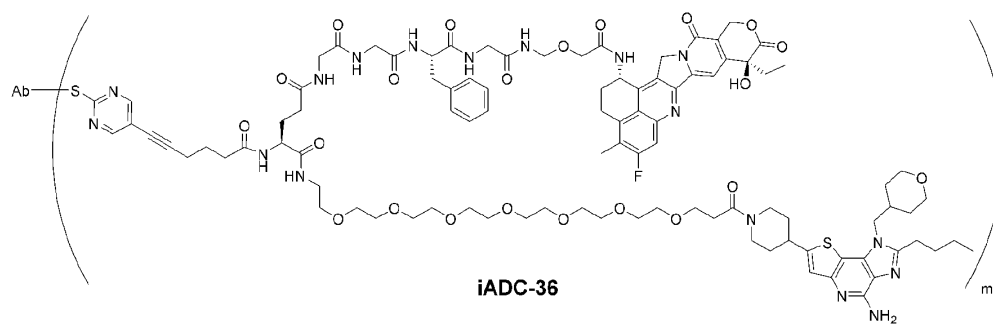


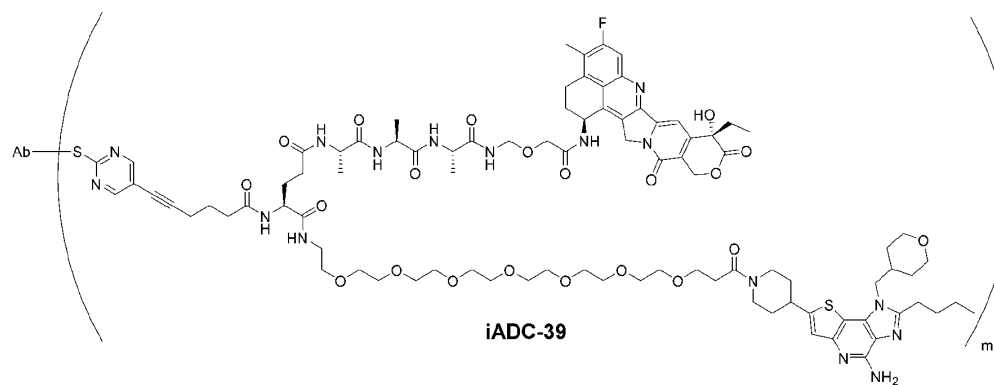
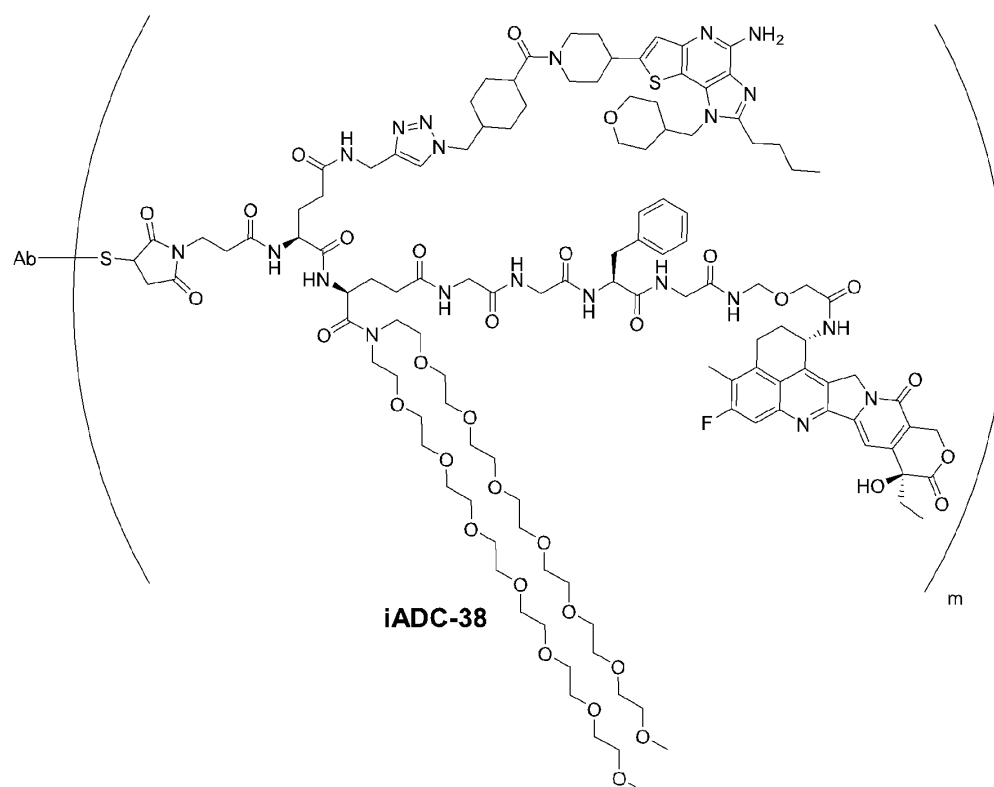


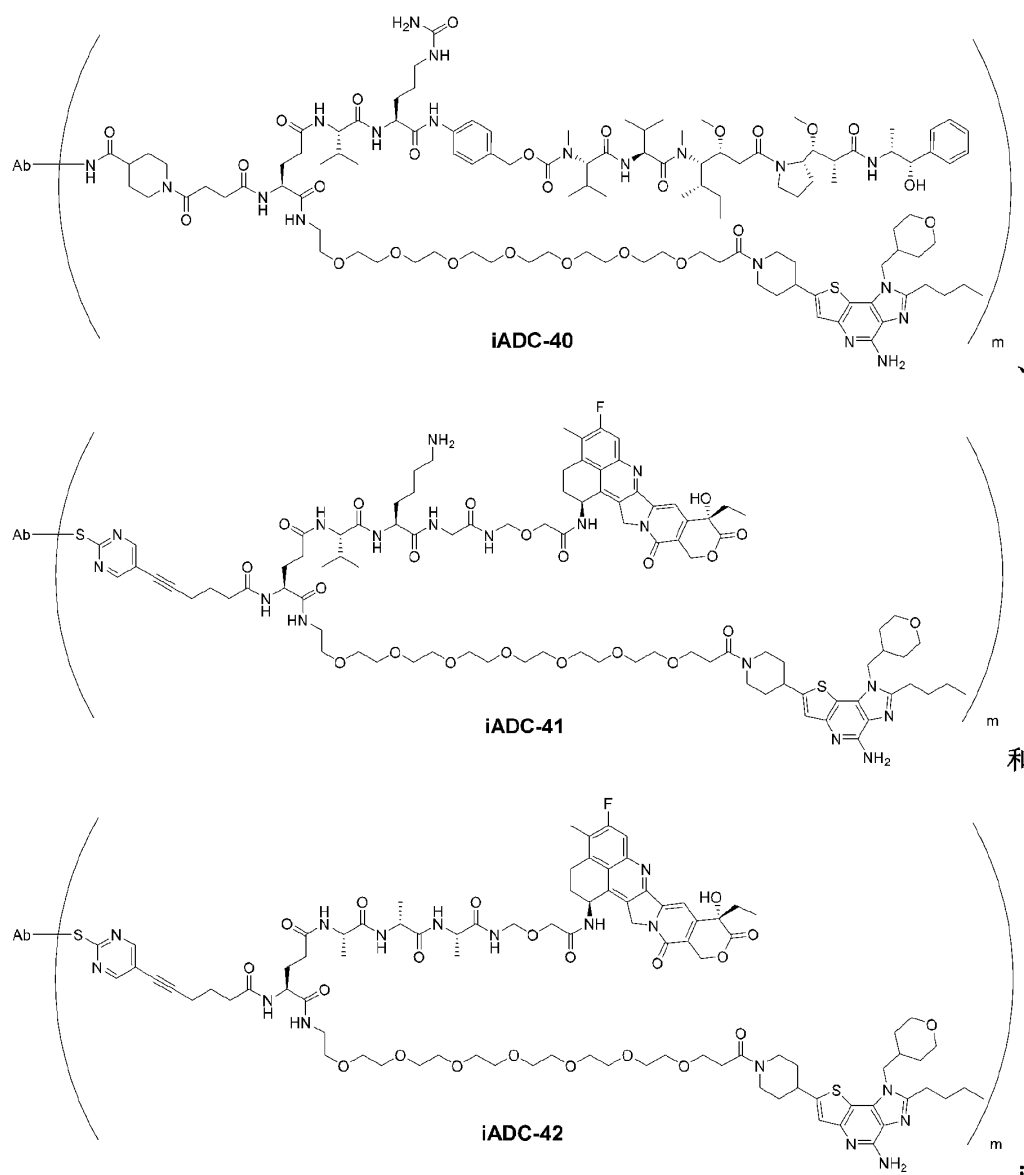












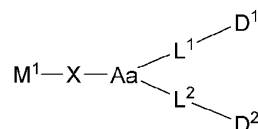
各 m 独立地选自 1-10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

优选地, 所述 **Ab** 为曲妥珠单抗;

优选地, 所述抗体药物偶联物的 DAR 值为 2.0-5.0, 例如 2.0-2.5, 2.0-3.0, 2.0-3.5, 2.0-4.0, 2.0-4.5, 2.0-5.0, 2.5-3.0, 2.5-3.5, 2.5-4.0, 2.5-4.5, 2.5-5.0, 3.0-3.5, 3.0-4.0, 3.0-4.5, 3.0-5.0, 3.5-4.0, 3.5-4.5, 3.5-5.0, 4.0-4.5, 4.0-5.0, 或 4.0-5.0。

26. 式(III)的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶

型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



III

其中，

M^1 为和靶向基团连接的接头部位的前体，其中所述靶向基团如权利要求 1-25 中任一项所定义；

X 为连接 M 和 Aa 的连接子；

Aa 选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段；

L^1 为共价键或连接 Aa 和 D^1 的连接子；

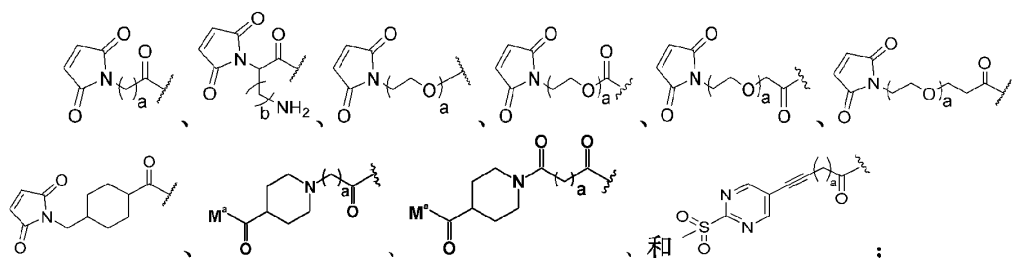
L^2 为连接 Aa 和 D^2 的连接子；

D^1 选自细胞毒性药物片段；

D^2 选自 TLR 激动剂片段；

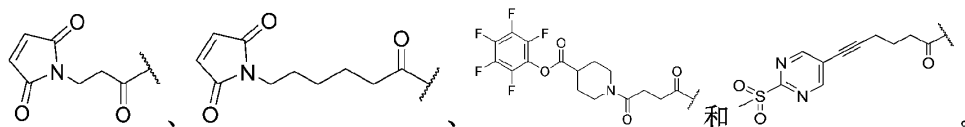
优选地， X 、 Aa 、 L^1 、 L^2 、 D^1 和 D^2 如权利要求 1-25 中任一项所定义。

27. 权利要求 26 所述的化合物， M^1 选自以下结构：

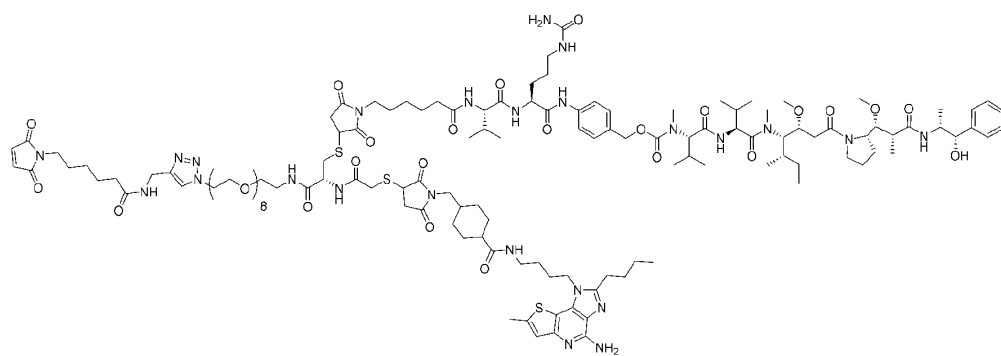


其中，各 a 独立地选自 1-5 的整数， b 选自 1-3 的整数， M^a 为羧基的活化基团（例如，五氟苯氧基）；

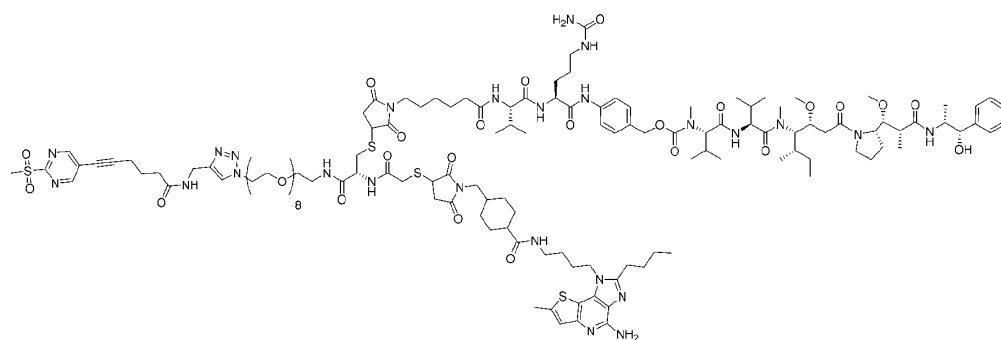
优选地， M^1 为共价键或选自以下结构：



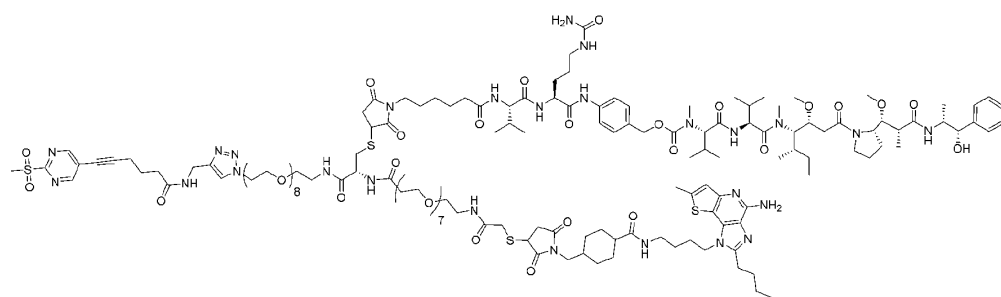
28. 权利要求 26 或 27 所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药选自以下结构：



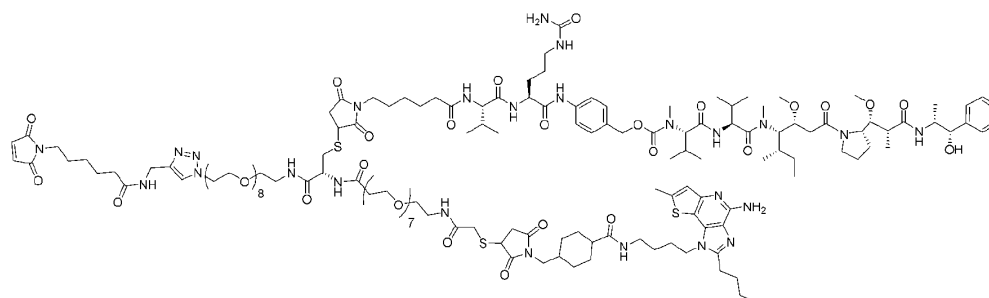
C-1



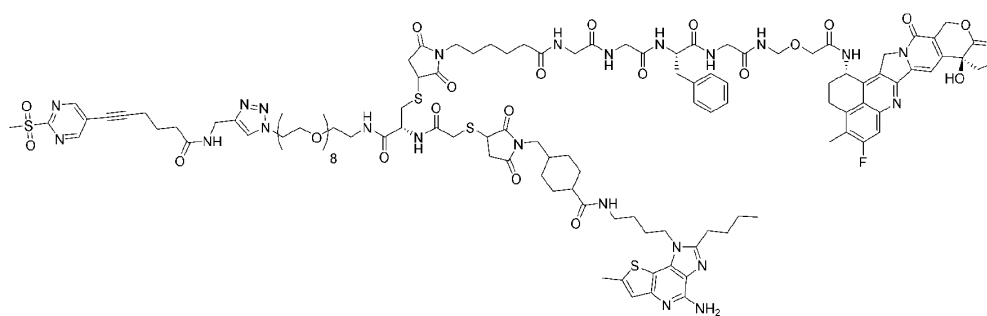
C-2



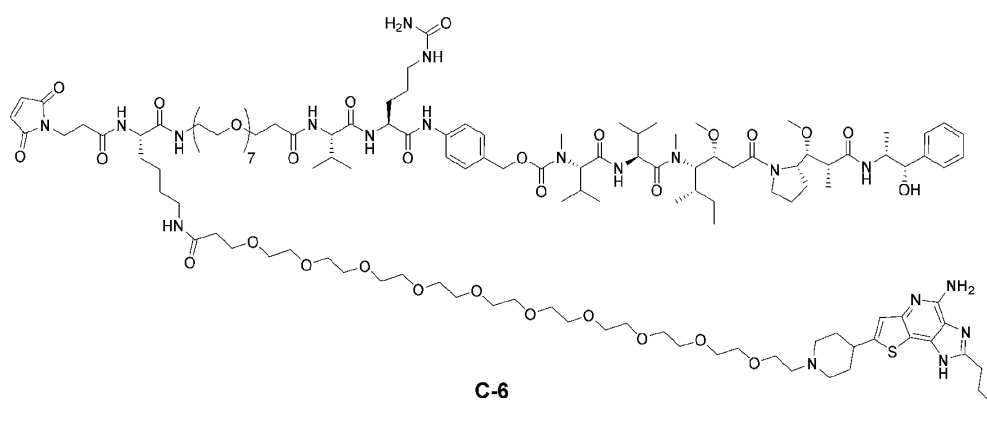
C-3



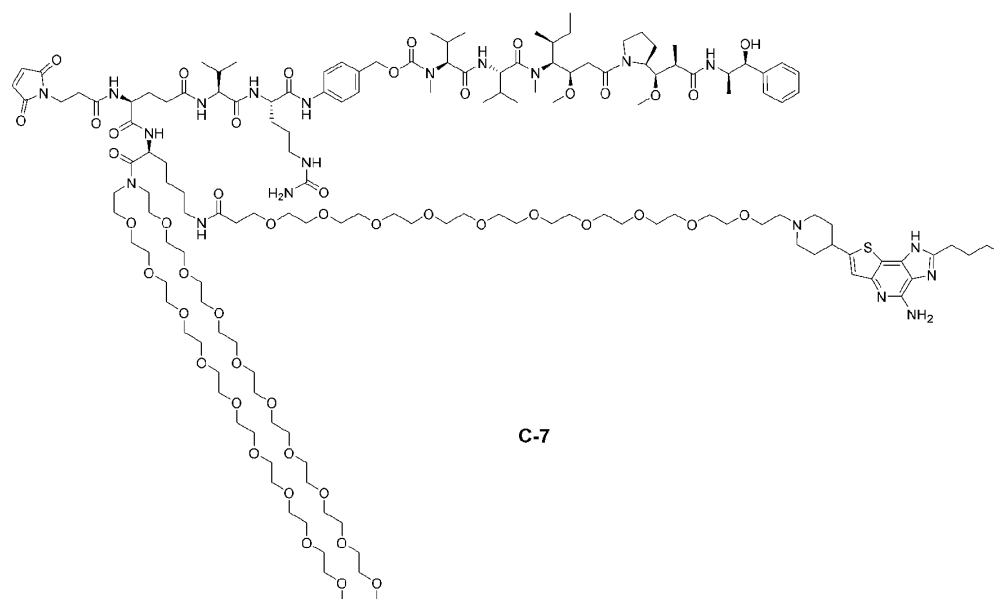
C-4



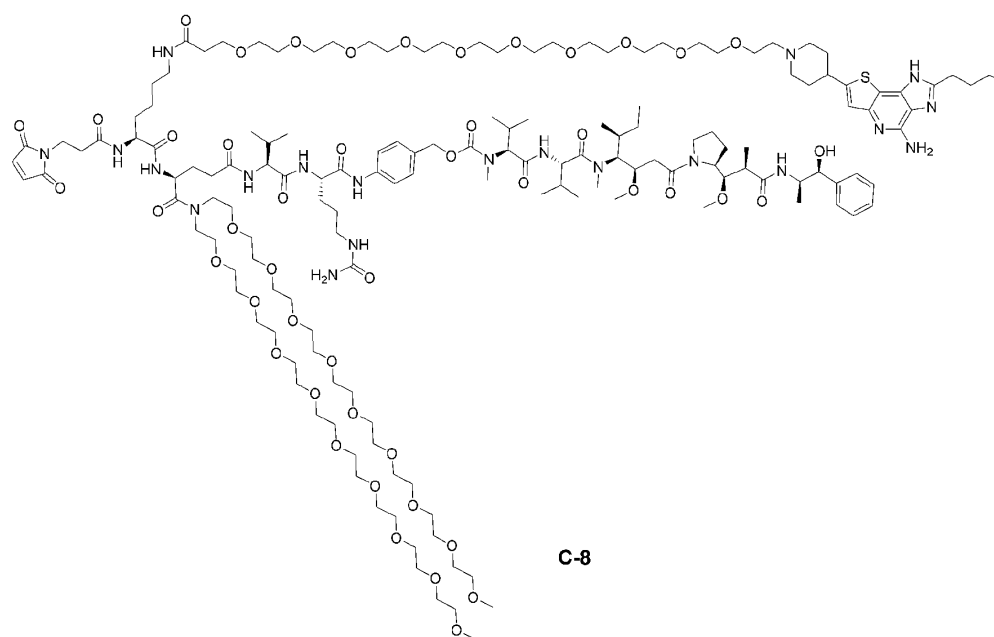
C-5



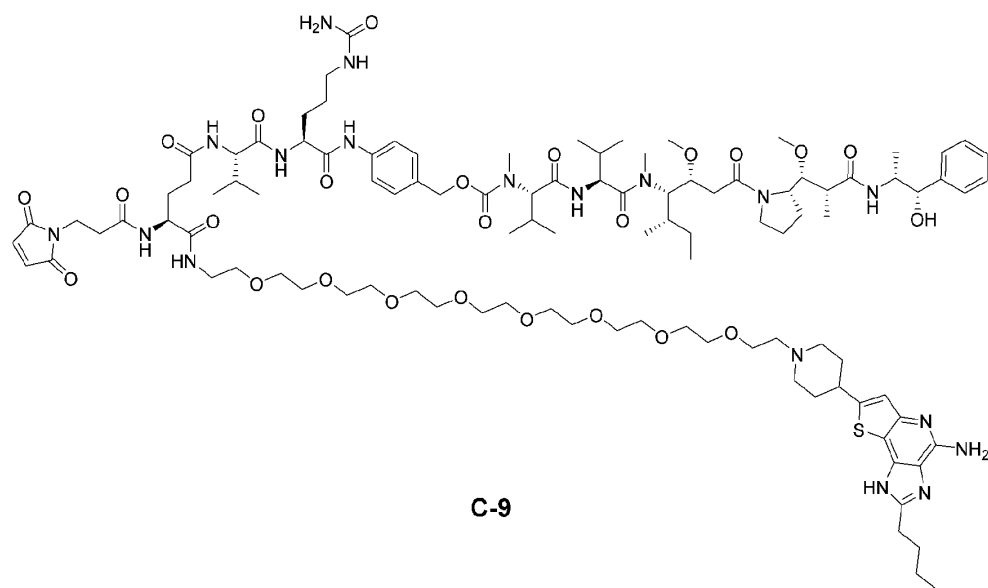
C-6



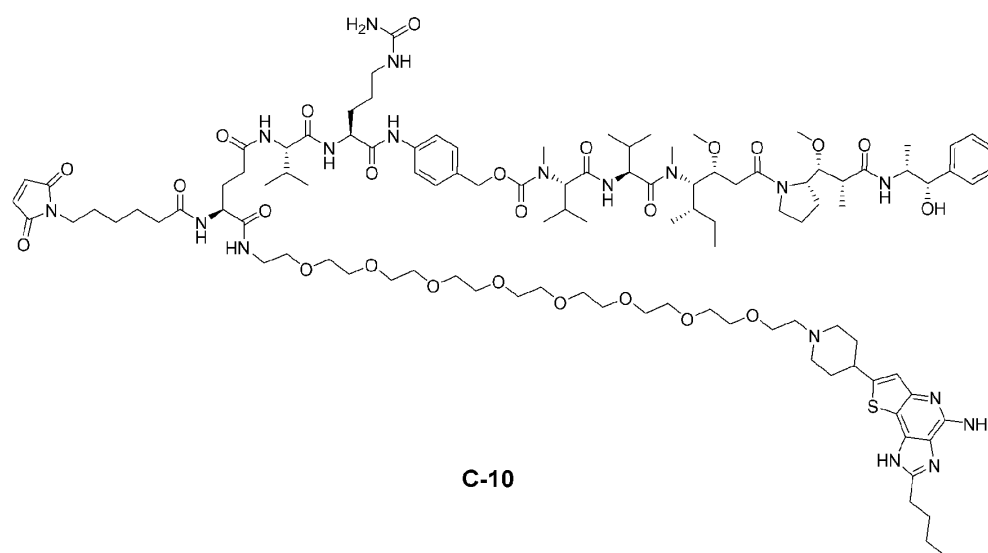
C-7



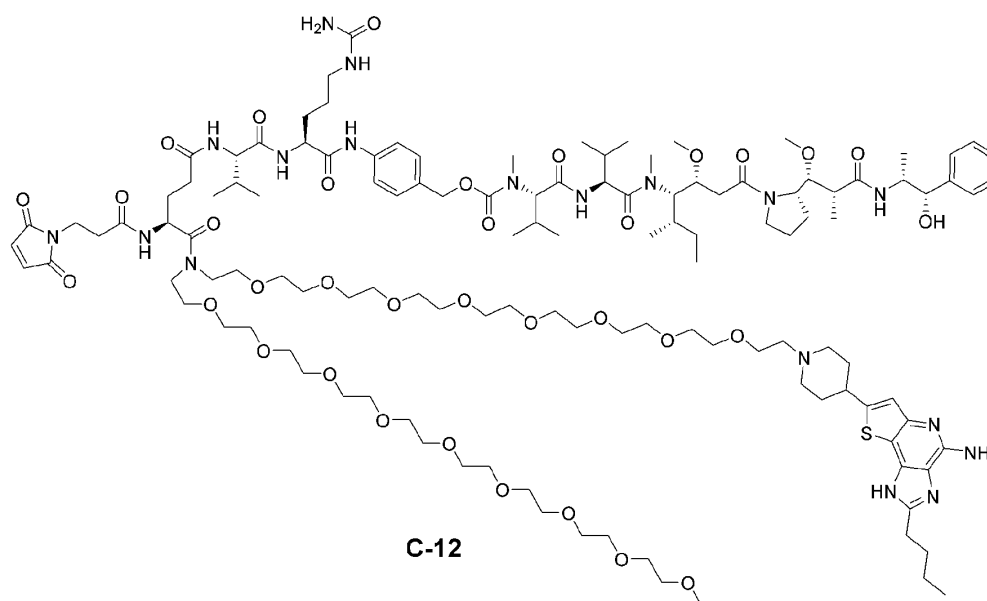
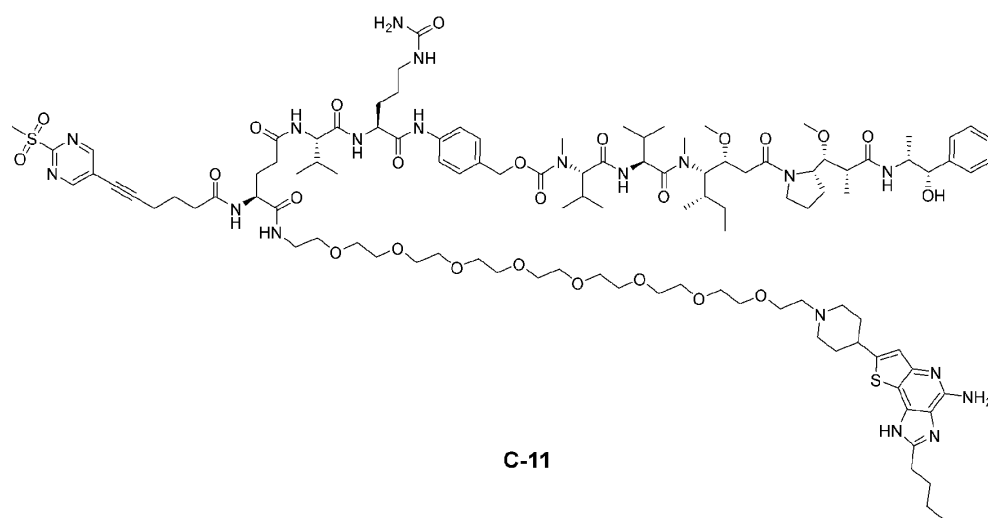
C-8

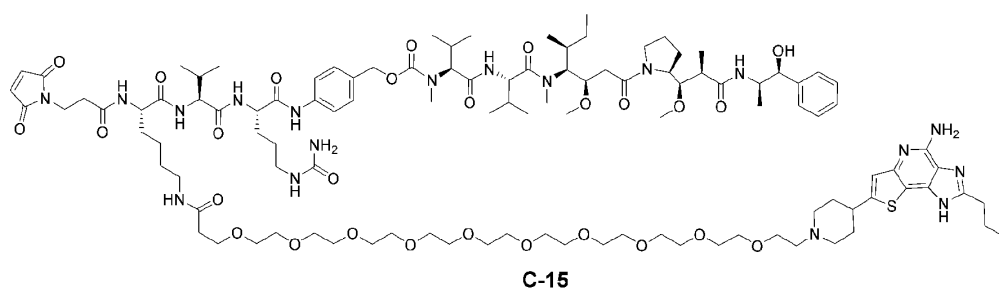
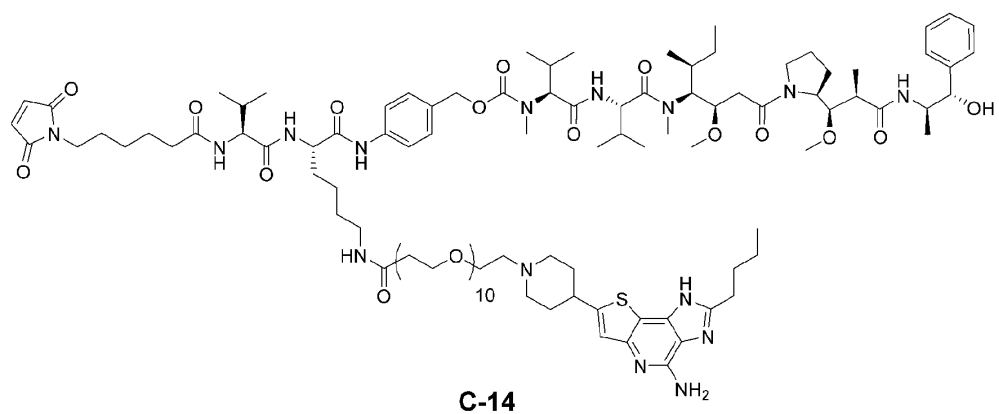
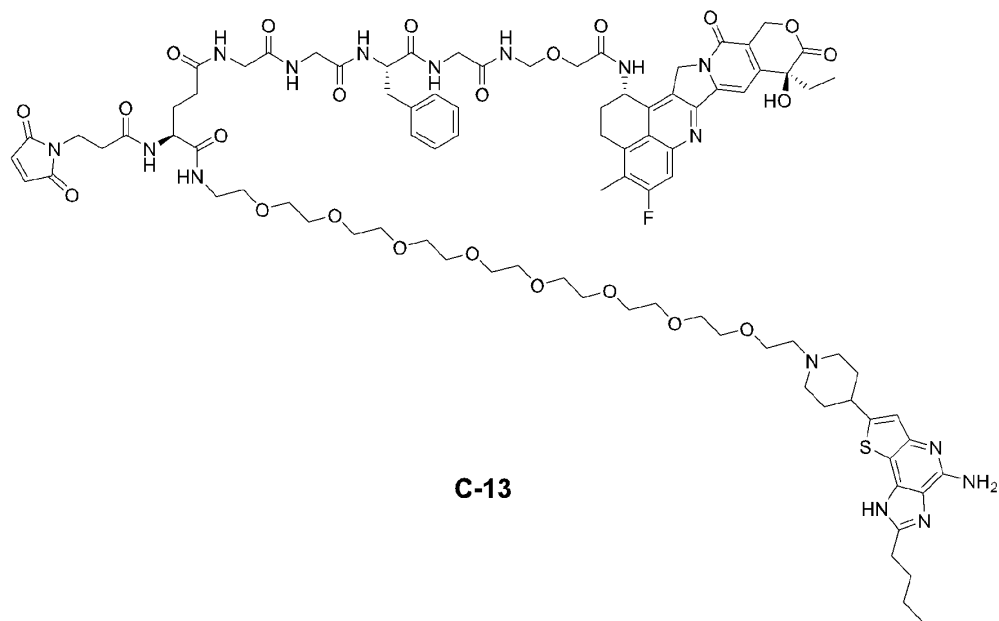


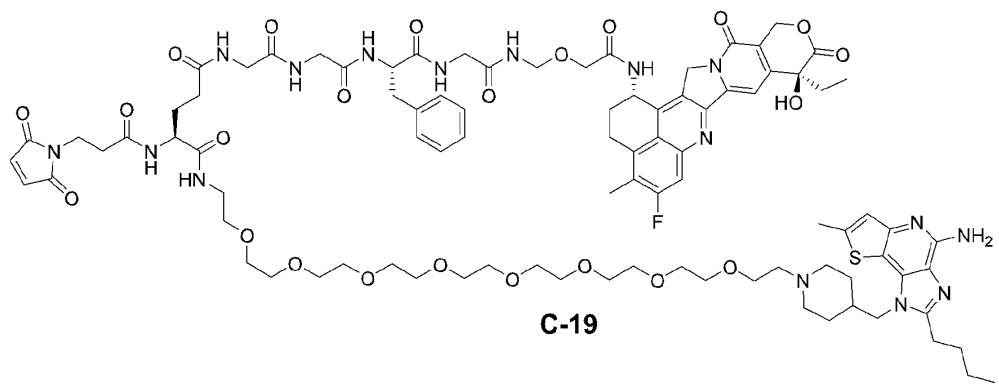
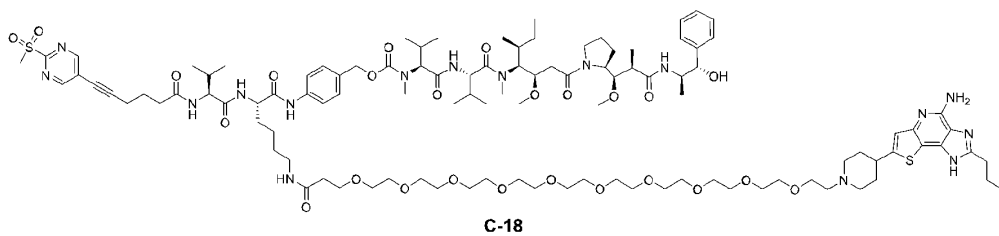
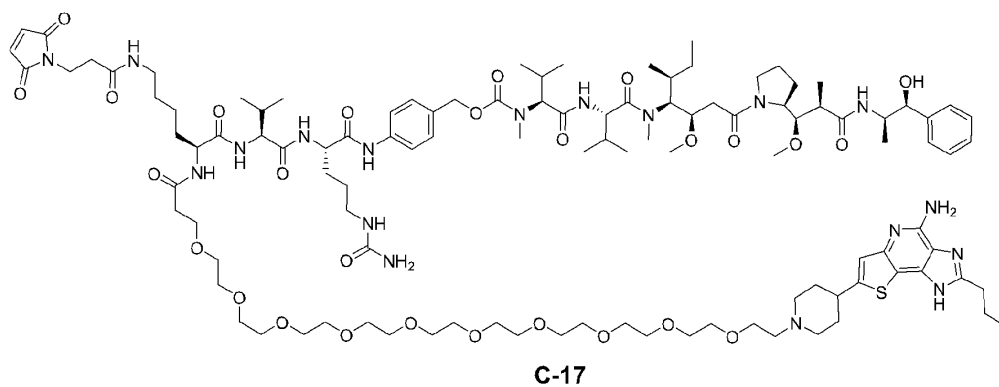
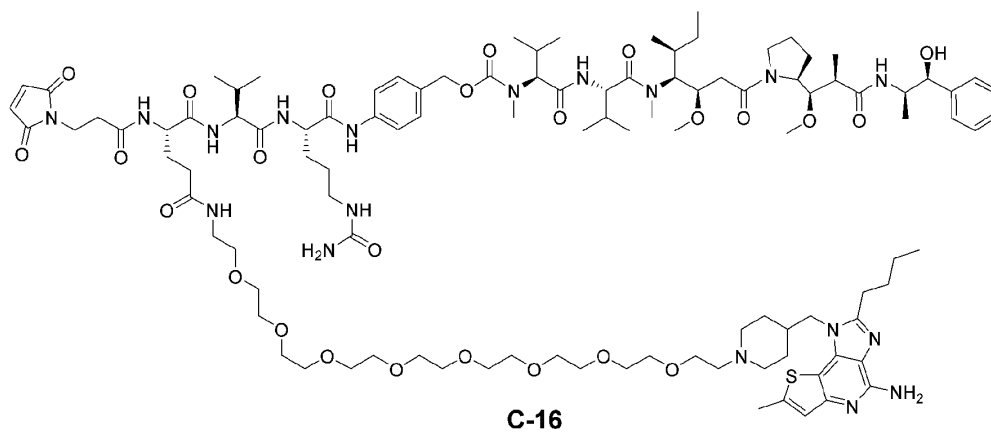
C-9

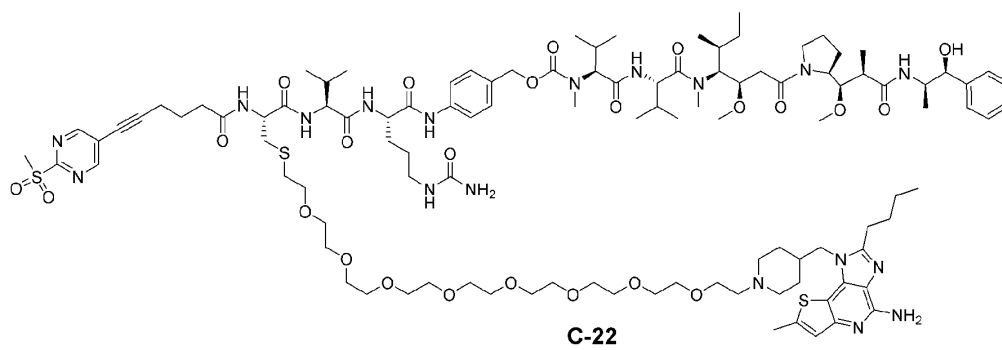
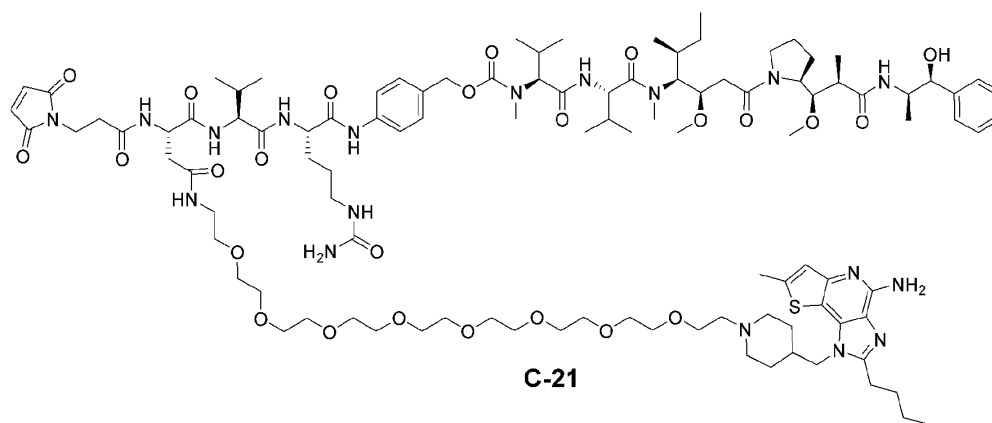
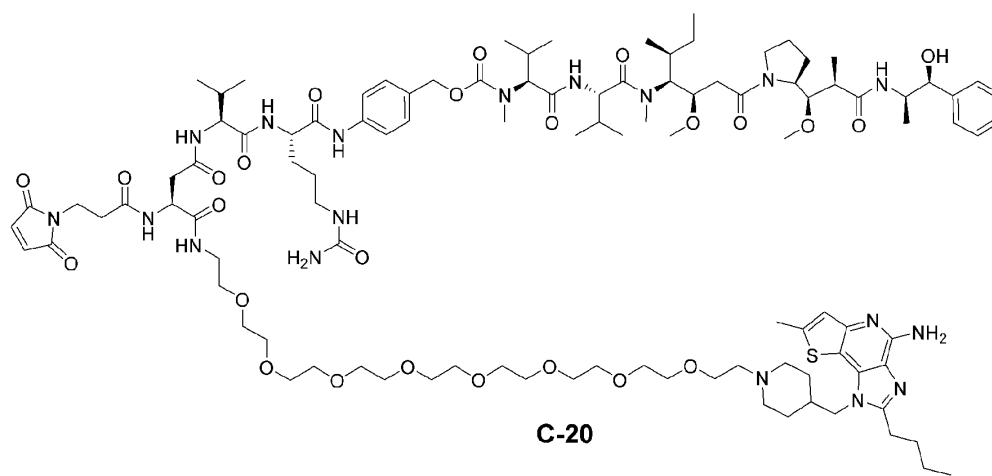


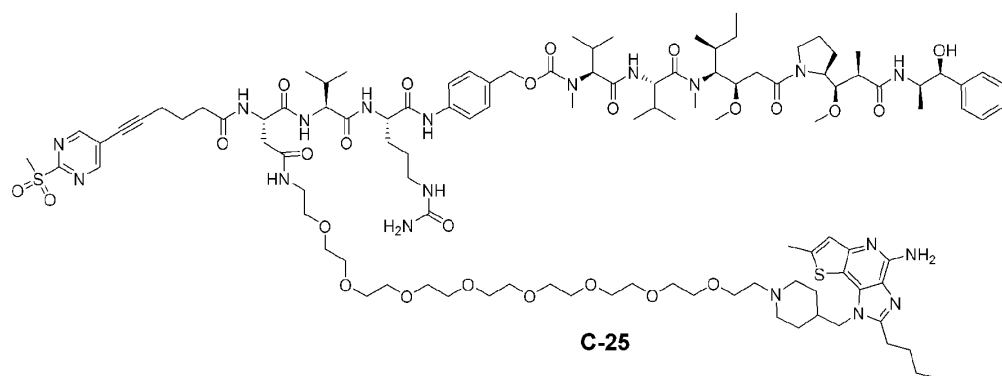
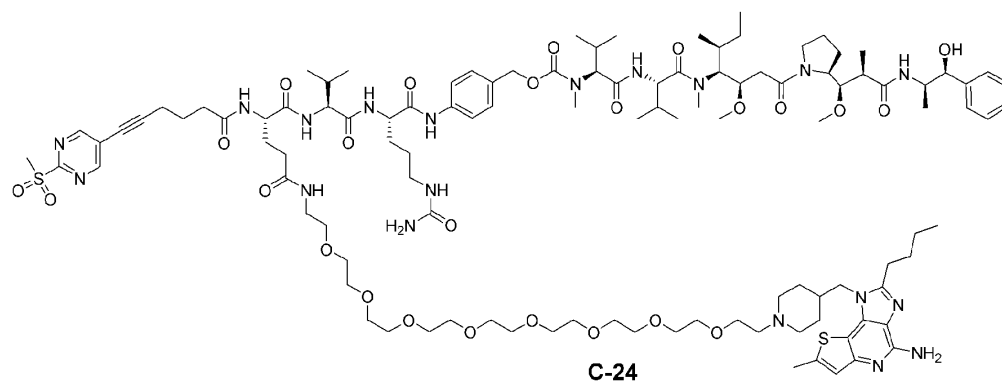
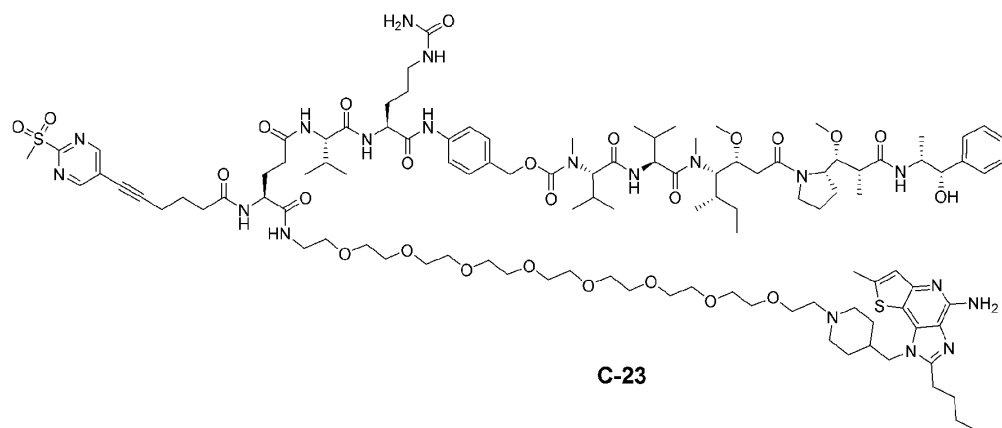
C-10

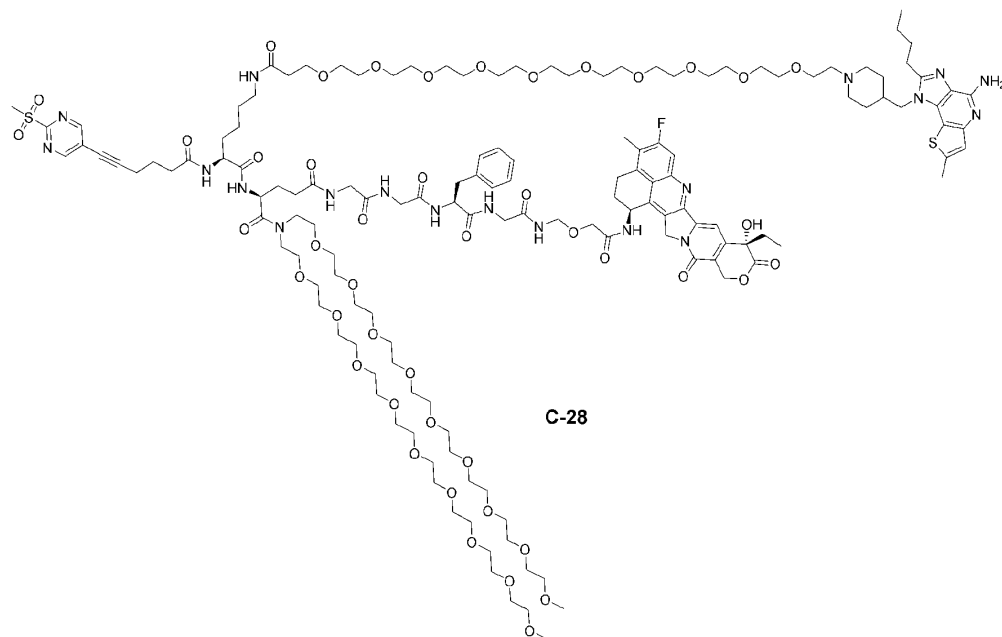
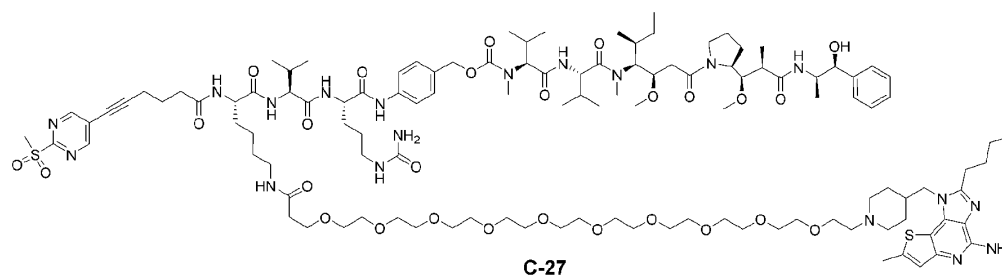
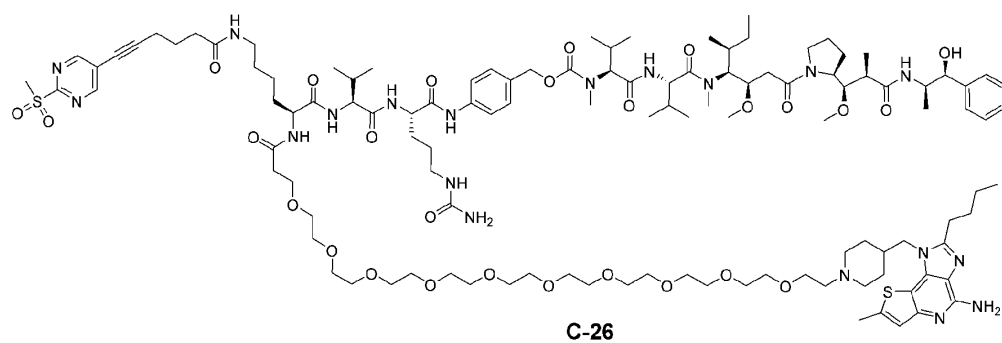




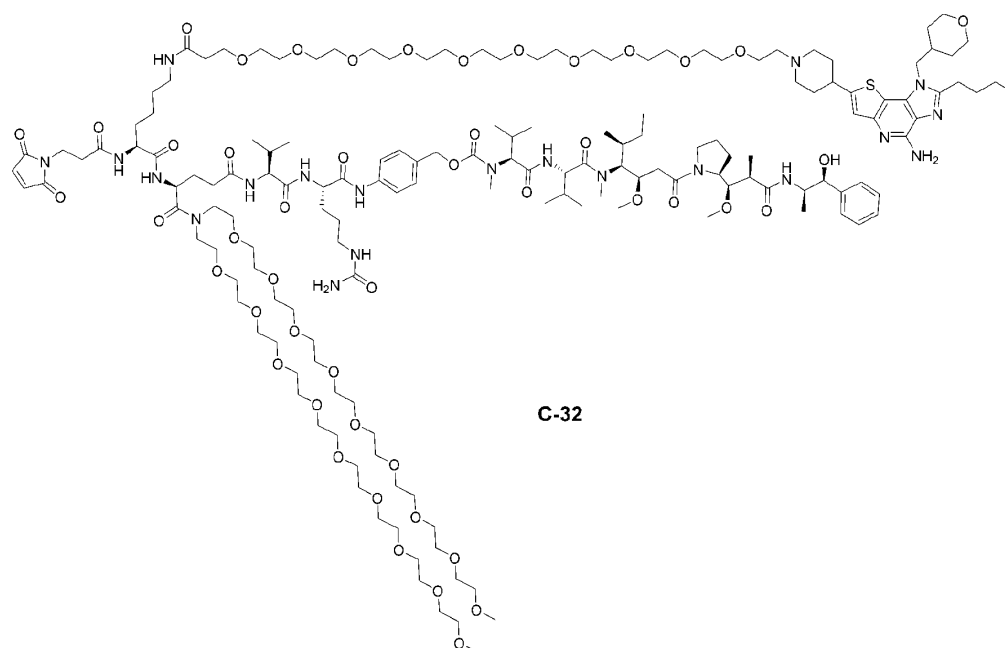
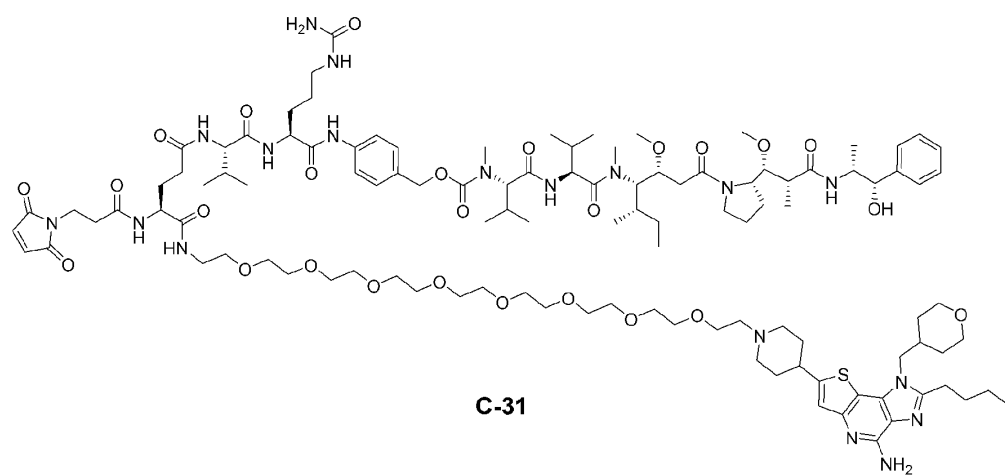


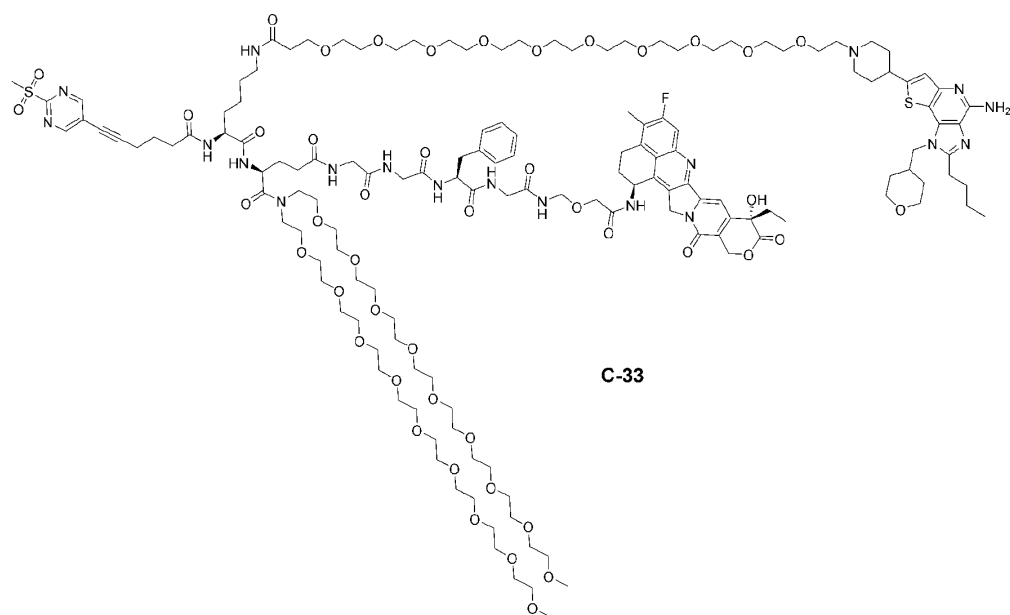




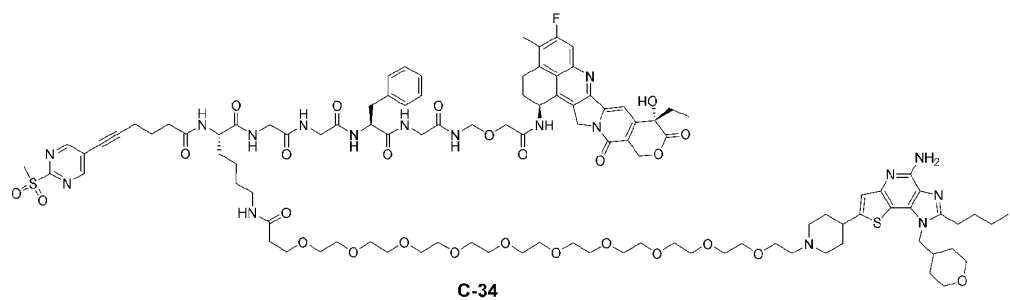




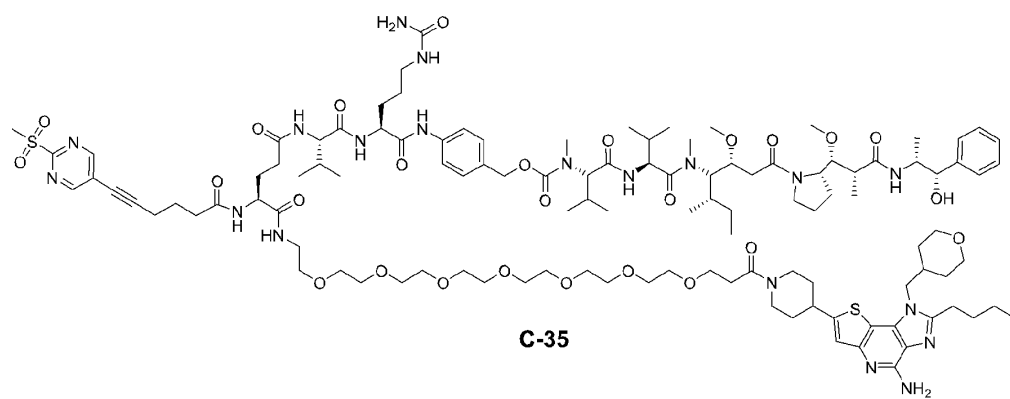




C-33

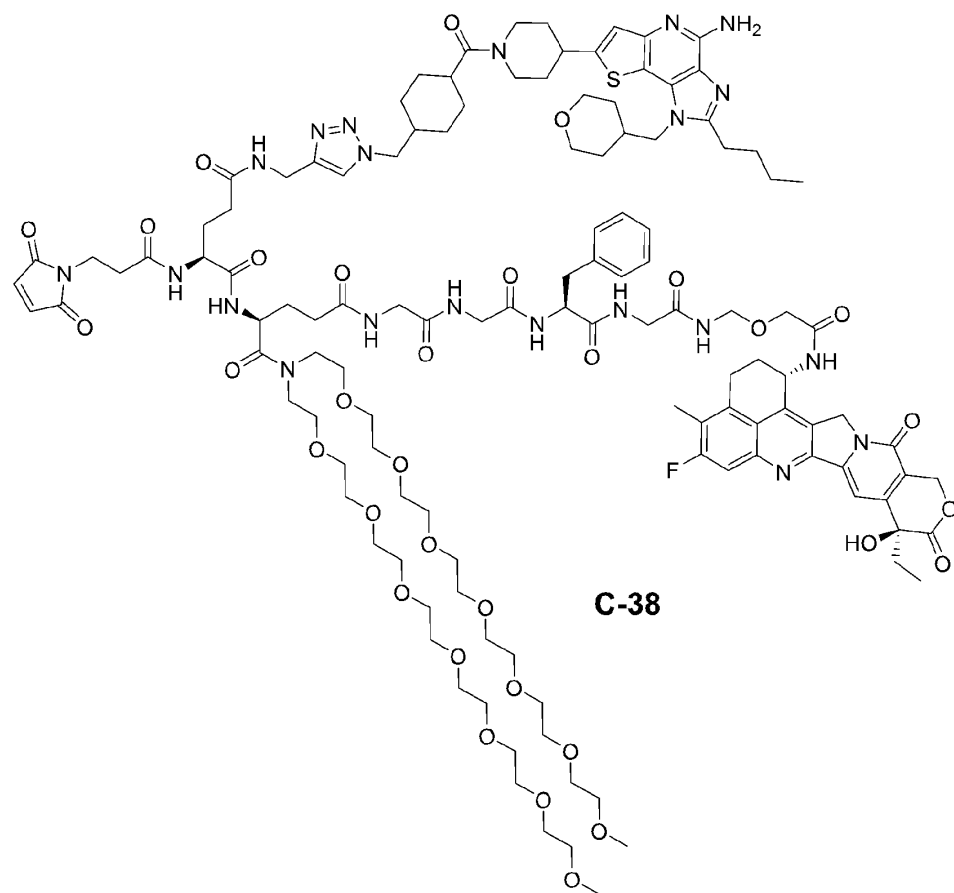
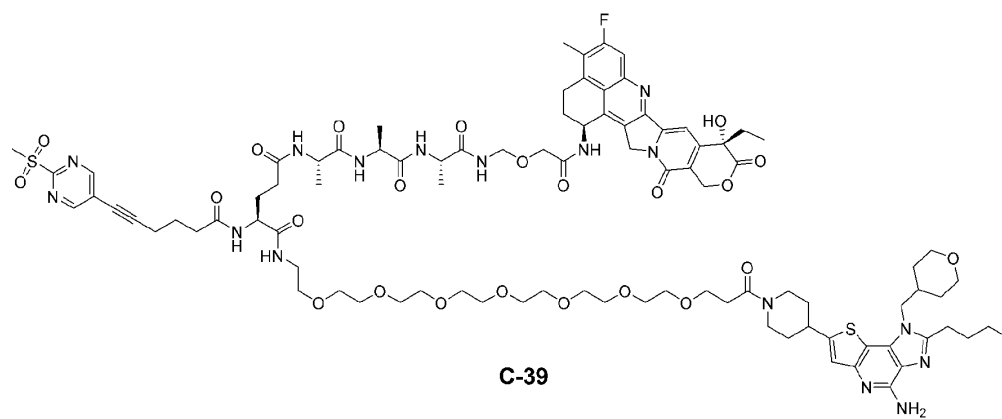


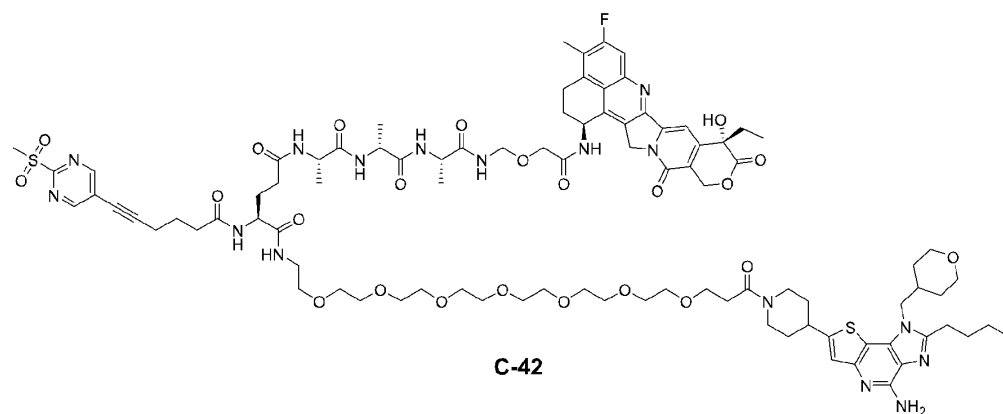
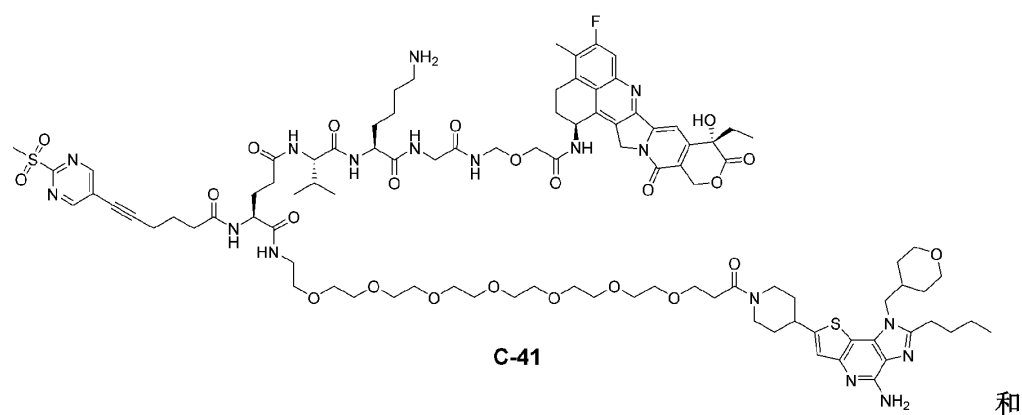
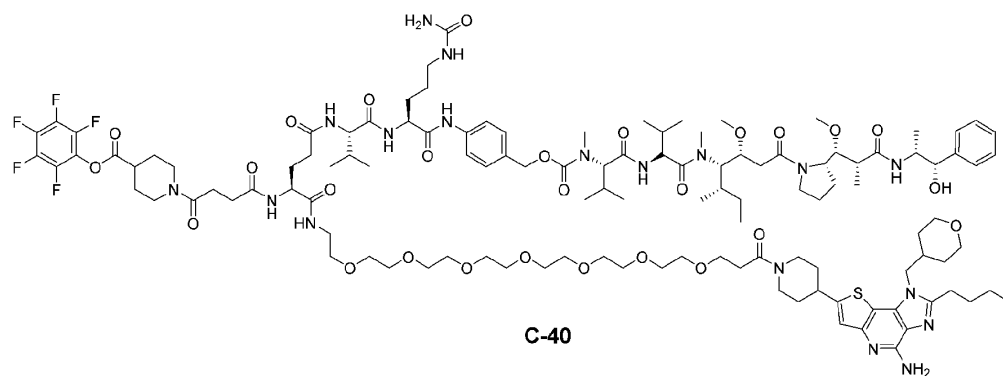
C-34



C-35



**C-38****C-39**



29. 一种药物组合物,其含有权利要求1-25任一项所述的抗体药物偶联物和任选的权利要求26-28任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药,以及一种或多种药用辅料。

30. 权利要求26-28任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、

互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药在制备抗体药物偶联物（例如，权利要求1-25任一项所述的抗体药物偶联物）中的用途。

31. 权利要求 1-25 任一项所述的抗体药物偶联物、权利要求 26-28 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、或权利要求 29 所述的药物组合物在制备治疗和/或预防癌症（例如 HER2 阳性癌症，例如 HER2 阳性胃癌、乳腺癌或非小细胞肺癌）的药物中的用途。

32. 权利要求 1-25 任一项所述的抗体药物偶联物、权利要求 26-28 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、或权利要求 29 所述的药物组合物，其用于治疗 and/或预防癌症（例如 HER2 阳性癌症，例如 HER2 阳性胃癌、乳腺癌或非小细胞肺癌）。

33. 一种治疗和/或预防癌症（例如 HER2 阳性癌症，例如 HER2 阳性胃癌、乳腺癌或非小细胞肺癌）的方法，包括向有此需要的受试者施用治疗和/或预防有效量的权利要求 1-25 任一项所述的抗体药物偶联物、权利要求 26-28 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、或权利要求 29 所述的药物组合物。