

抗体药物偶联物及其制备方法和用途

技术领域

本公开属于医药技术领域，涉及多种抗体，抗体药物偶联物及其制备方法，以及其在预防和/或治疗与细胞活动异常相关的疾病，包括但不限于在预防和/或治疗肿瘤疾病中的用途。

背景技术

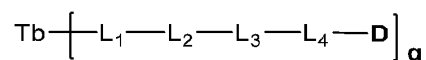
利用细胞毒的化疗一度是癌症的标准疗法，但高杀伤力的细胞毒素分子会杀伤正常细胞，引起严重的毒副作用。靶向抗肿瘤药物由于同时具有靶向性和抗肿瘤活性，已成为当今肿瘤研究领域的热点，但经常由于靶向药物的靶点选择性问题产生比较大的毒副作用，从而限制了靶向药物的治疗效果。生物大分子药物，如抗体或抗体片段，虽然靶向性强，但对实体瘤的治疗效果有限，或者根本不具有治疗效果。ADC 是抗体和小分子药物的偶联体，融合了抗体的靶向作用和生物活性分子的活性，成为一种生物导弹，具有非常可期待的疗效和安全性优势。抗体引导 ADC 结合到靶细胞，随后被细胞内化，小分子药物在细胞内通过特定酶作用下发生的酶解释放，治疗疾病。

ADC 药物近几年发展非常迅速，已经上市的 ADC 有 14 种。在很多靶点的 ADC 中，如靶向 NaPi2b 的抗体/ADC 药物均处于临床研究阶段。对很多靶点而言，开发具有差异性的、更优质的、安全性更佳单抗或 ADC 药物，可以为肿瘤患者提供更广更优的用药选择，也具有广阔的市场前景。

发明内容

为了改进抗体药物偶联物（ADC）的治疗效果，降低药物毒副作用，提高治疗窗口，本公开提供一种式（XV）所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其含有生物活性分子（药物分子）、连接体和靶向部分，所述靶向部分通过活性基团（例如巯基）与所述连接体连接形成抗体药物偶联物。本公开还开发了包含抗 NaPi2b 的可变轻链结构域（VL）和/或可变重链（VH）结构域，所述可变轻链结构域和/或可变重链结构域抗体来自人源抗体。

为此，在本公开的第一方面，本公开提供了式 XV 所示的抗体药物偶联物，



式 XV

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

Tb 为抗 NaPi2b 的抗体或其抗原结合片段；

q 为药物抗体偶联比；

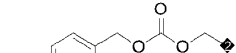
D 为生物活性分子片段；

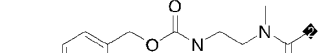
L_i 为延伸单元；

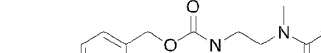
L_2 不存在或为连接单元;

L₃选自氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽;

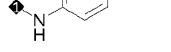
L₄ 不存在或存在, L₄ 存在时, L₄ 选自

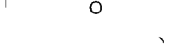


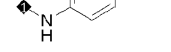


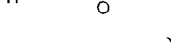








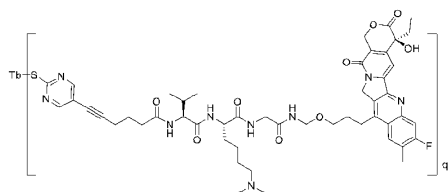




和

1 位与 L_3 相连, 2 位与 D 相连。

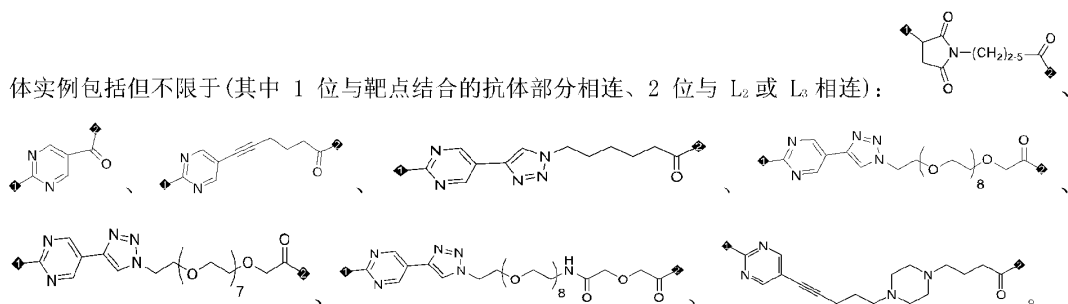
另外，还需要说明的是，对于“L₁的1位通过S原子与Tb相连”，本领域技术人员可以理解的是，L₁的1位是与打开二硫键（例如，通过还原剂TCEP还原二硫键可以打开二硫键，生成巯基-SH）后的Tb（如抗体）自身所含有巯基进行连接，也就是说，L₁与Tb之间的-S-并非另外再外接的硫原子。例如，



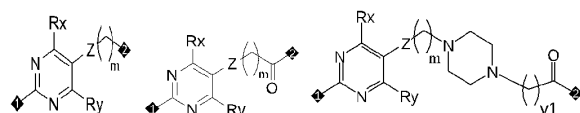
中, -S-并非另外外接的硫原子, 而是打开双硫键后的 Tb 自

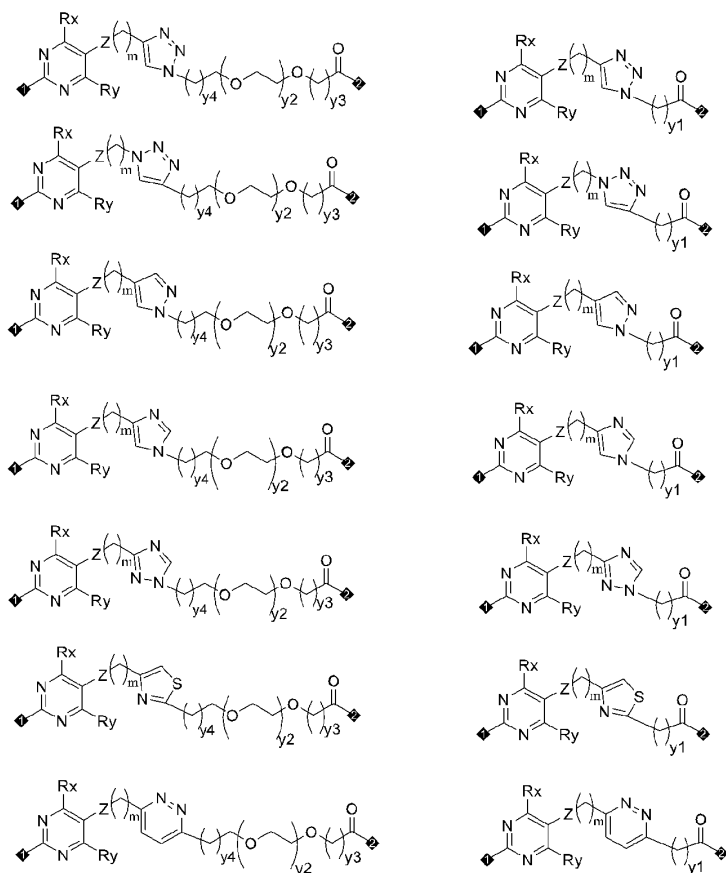
身所含有巯基与 L₁ 例如 的 1 位进行连接后形成的-S-

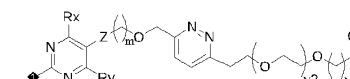
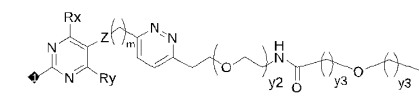
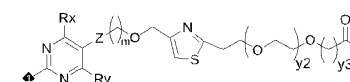
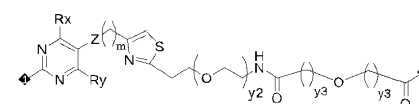
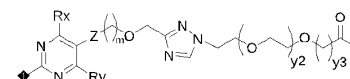
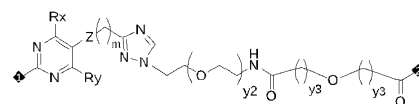
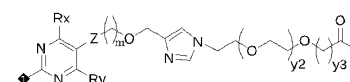
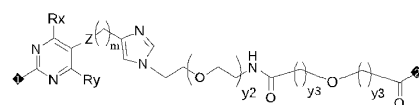
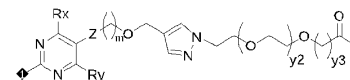
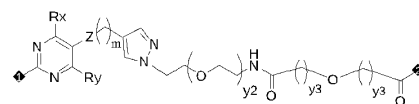
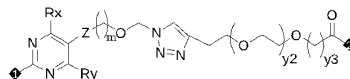
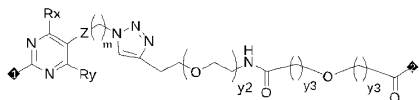
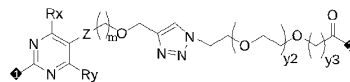
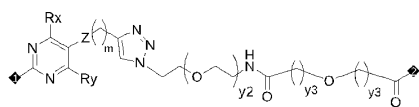
延伸单元为抗体药物偶联物或药物连接体偶联物或连接子的组分，其作用是将和靶点结合的抗体药物偶联物的其余部分或连接子的其余部分相连。延伸单元能够将 Tb 单元连接于 L₂（如果存在）或 L₃，具

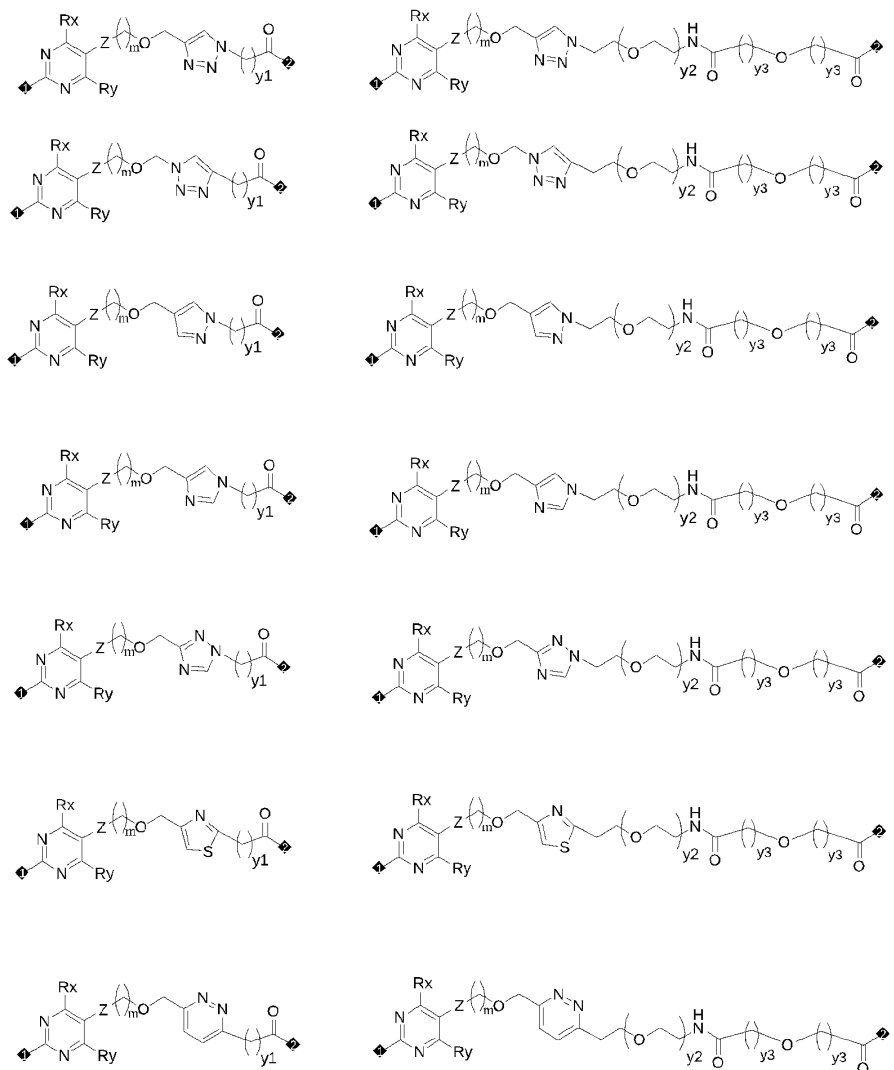


在一些实施方案中，L₁选自：









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

R_x 和 R_y 独立地选自 H 和 C1-4 烷基;

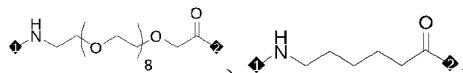
各 m 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6;

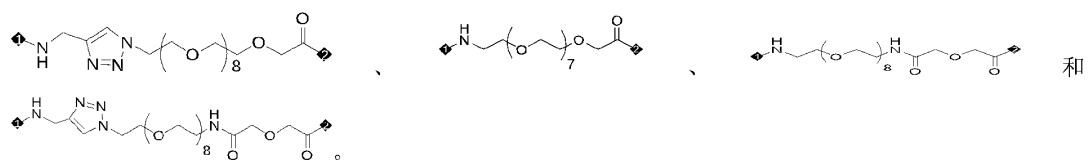
y_1 、 y_2 、 y_3 和 y_4 独立地选自 0-20 之间的任意整数;

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

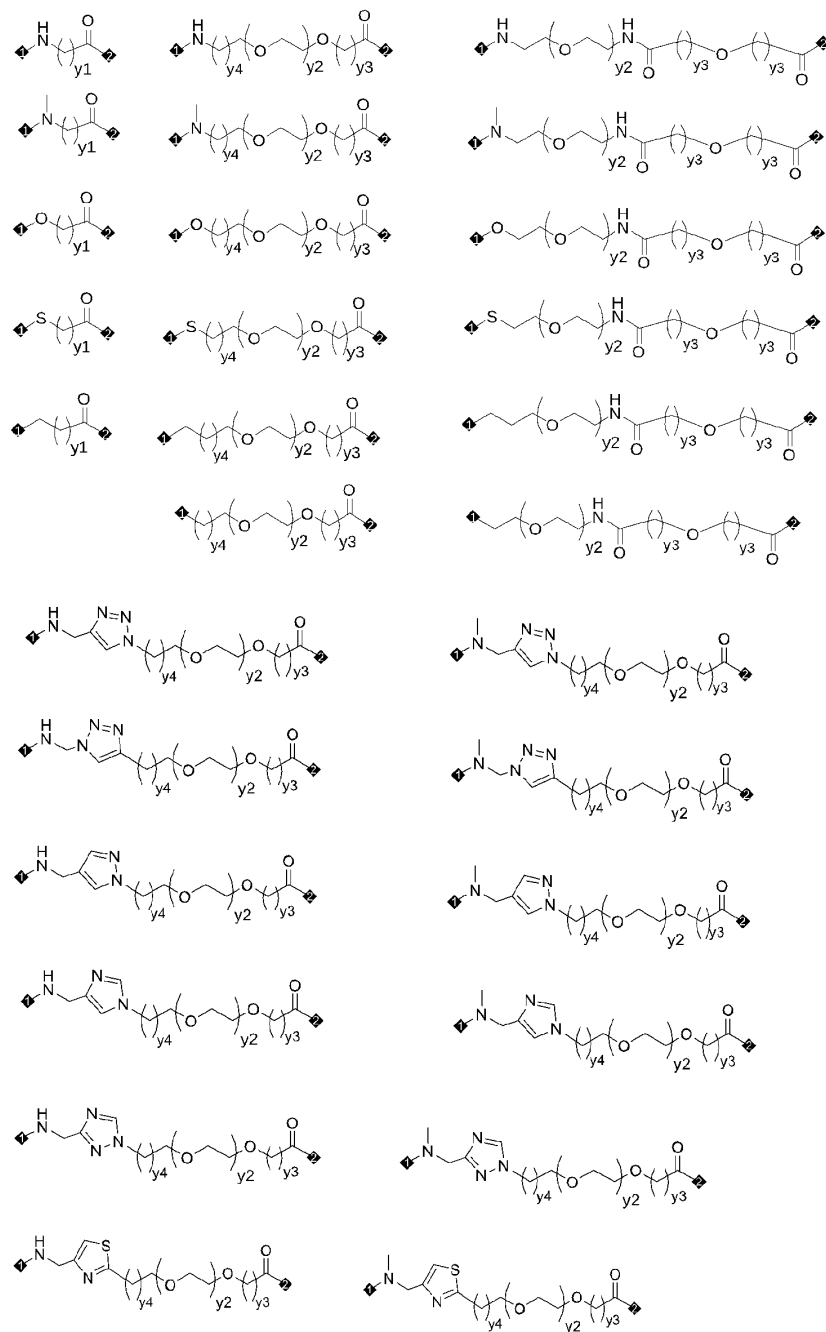
连接单元为抗体药物偶联物或药物连接体偶联物或连接子的组分, 其作用是用来结合延伸单元与氨基酸残基或由 1-10 个氨基酸残基组成的片段或短肽。连接单元存在时能够将 L_1 连接于 L_3 。具体实例包括

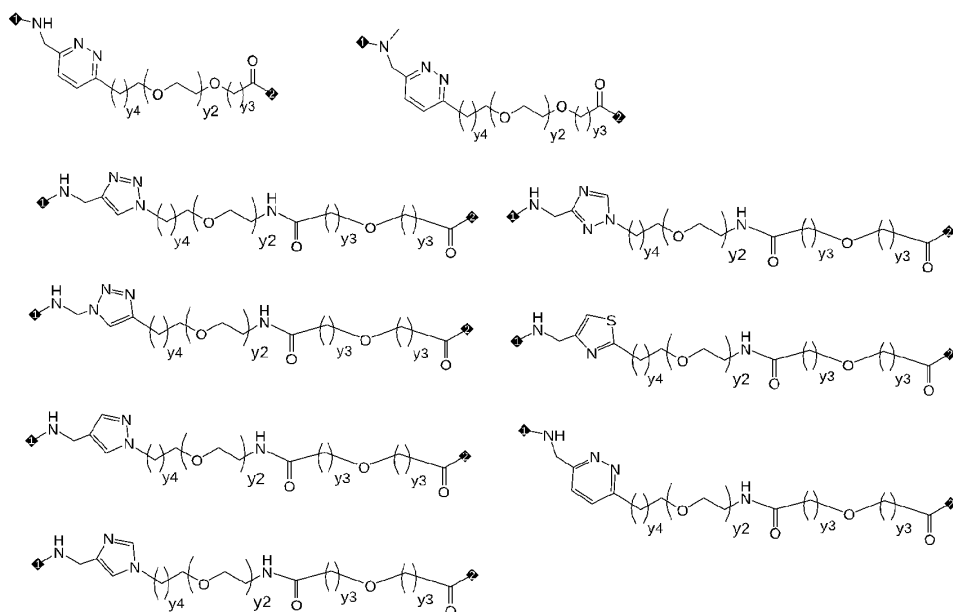
但不限于(其中 1 位与延伸单元相连、2 位与 L_3 相连):



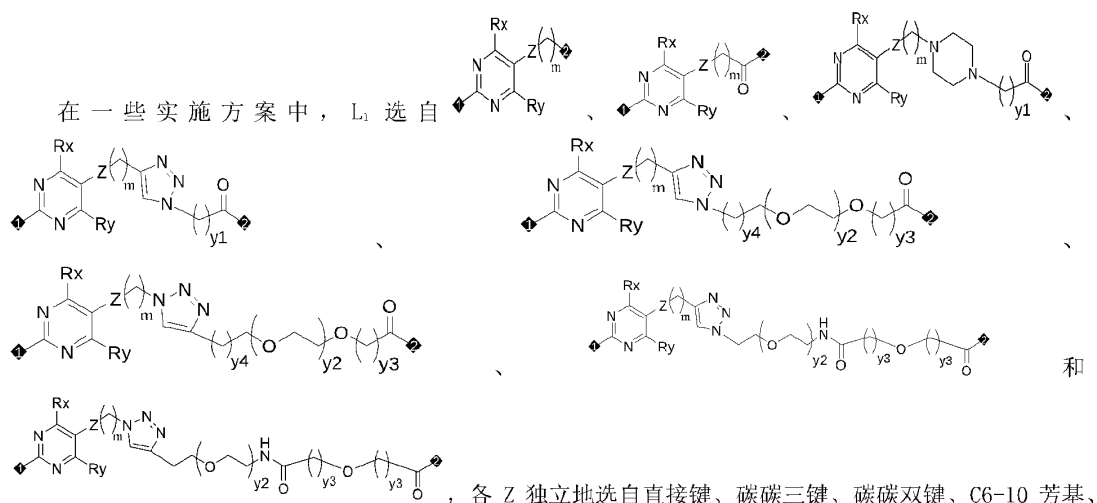
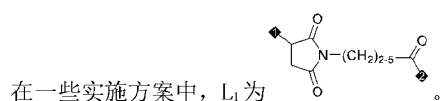


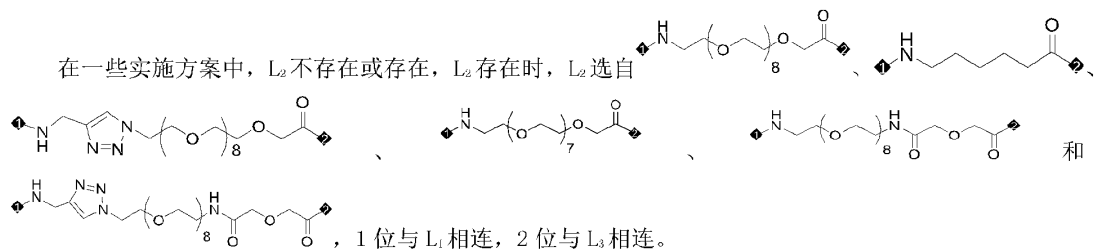
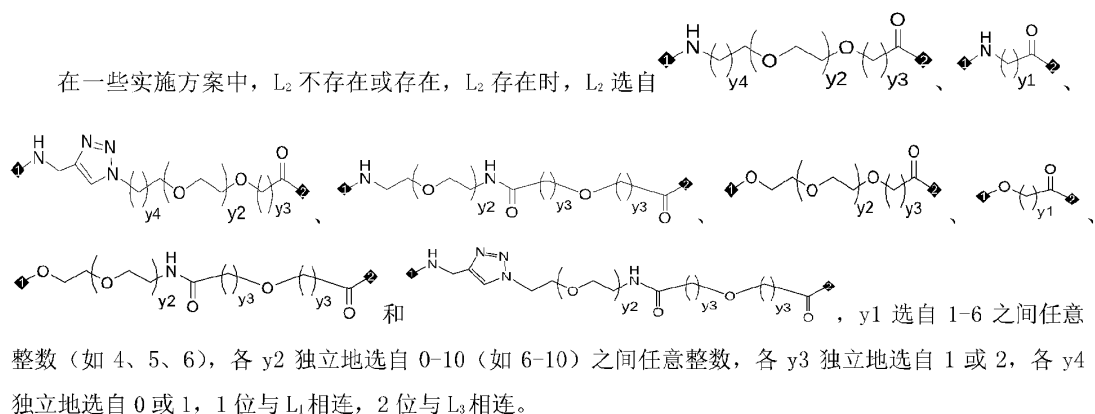
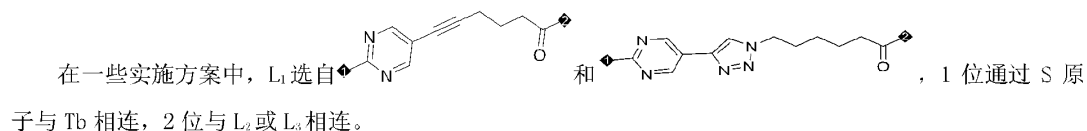
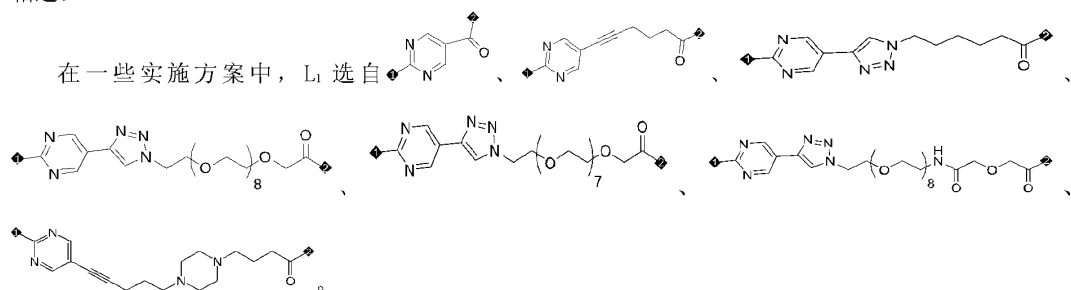
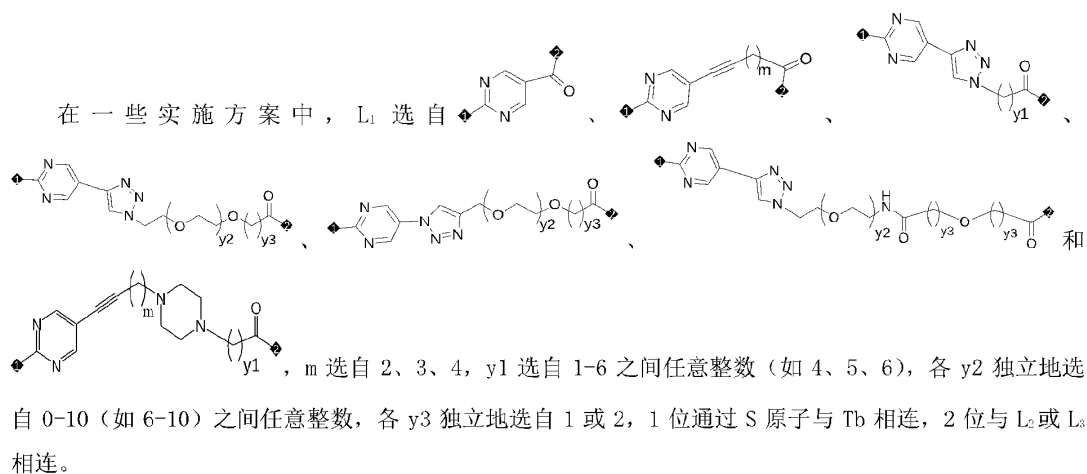
在一些实施方案中， L_2 不存在或存在， L_2 存在时， L_2 选自：



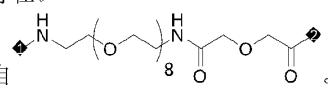


y_1 、 y_2 、 y_3 和 y_4 独立地选自 0-20 之间的任意整数，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_2 相连。





在一些实施方案中, L_2 不存在。

在一些实施方案中, L_2 选自 。

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

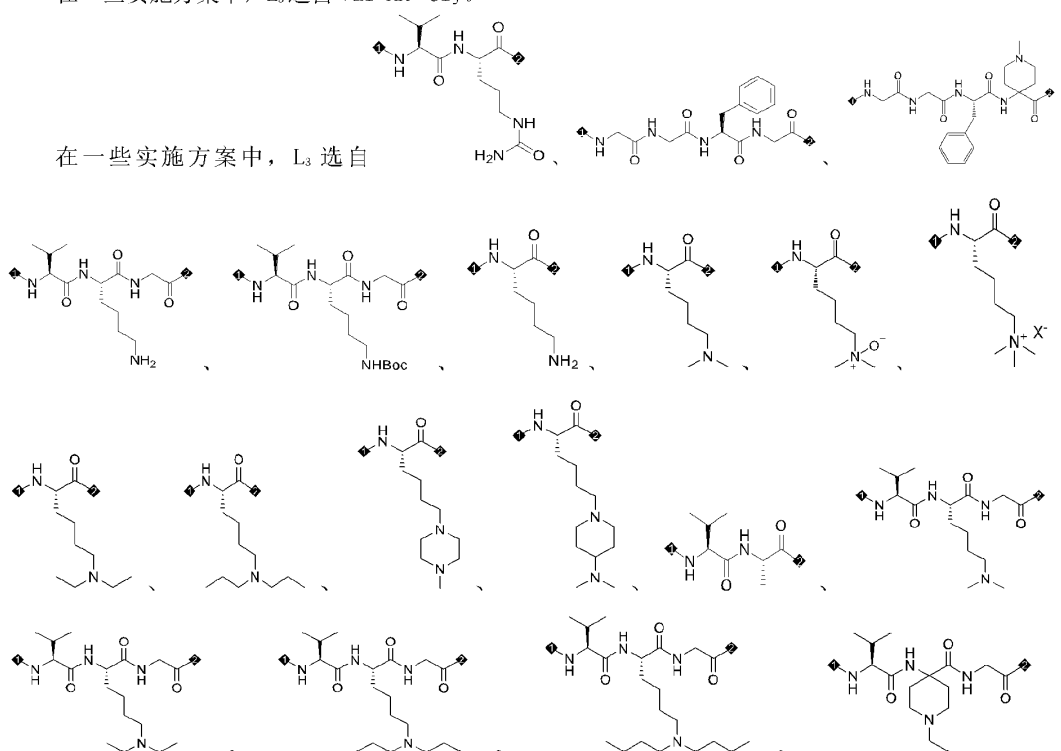
在一些实施方案中, L_3 选自氨基酸残基 Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、 AA^1 或由 2-10 个选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、 AA^1 的氨基酸残基组成的短肽。

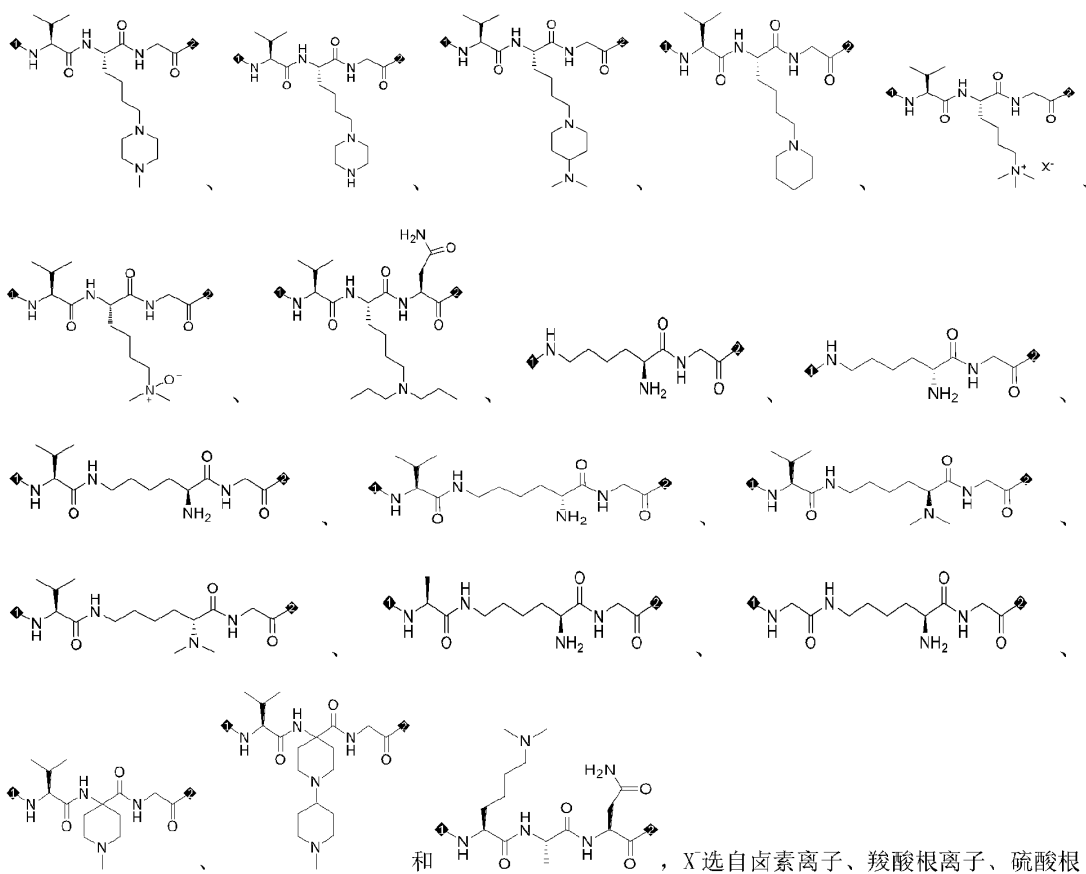
在一些实施方案中, L_3 选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、 AA^1 、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val- AA^1 、Ala- AA^1 、Gly- AA^1 、 AA^1 -Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val- AA^1 -Gly、Ala- AA^1 -Gly、Gly- AA^1 -Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn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

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

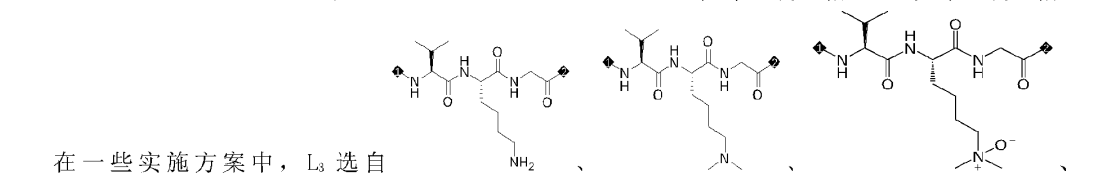
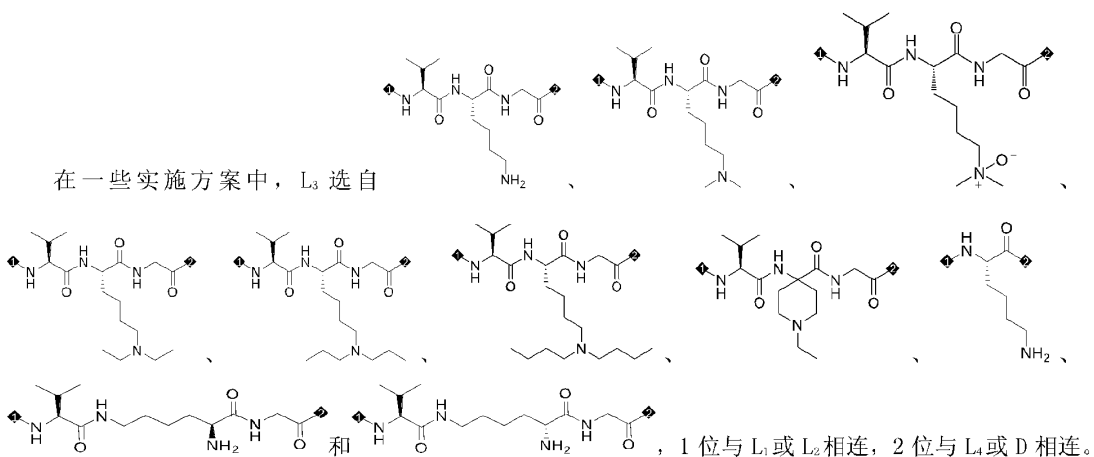
在一些实施方案中, L_3 选自 AA^1 和 Val- AA^1 -Gly。

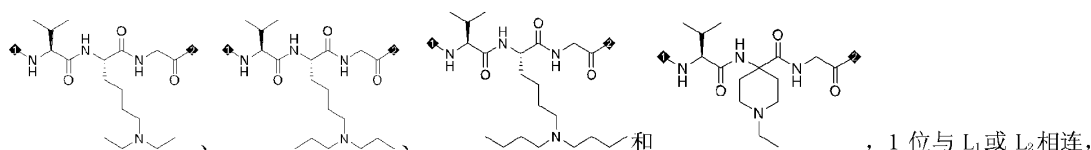
在一些实施方案中, L_3 选自 Val- AA^1 -Gly。





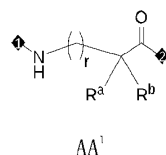
离子、硫酸氢根离子和OH⁻, 1位与L₁或L₂相连, 2位与L₄或D相连。



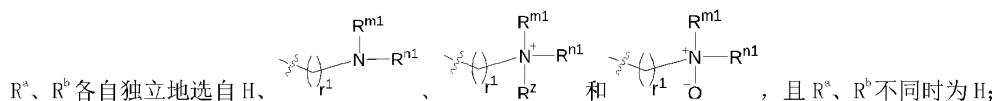


2 位与 L₁ 或 D 相连。

在一些实施方案中，AA¹ 所示氨基酸残基的结构如下所示，



其中：



或者，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R⁰ 所取代；

r、r¹ 各自独立地选自 0 到 20 的任意整数；

R^{m1}、Rⁿ¹ 各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基和 -C(=O)OR^{s1}；

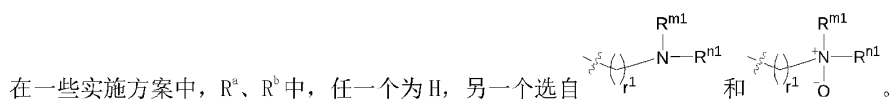
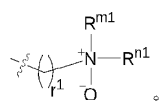
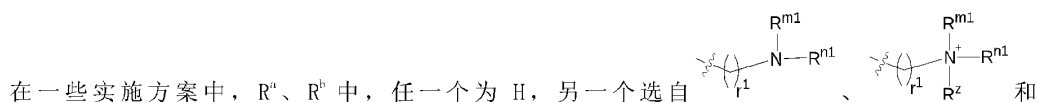
R^{x1} 选自 C1-6 烷基；

或者，R^{m1} 与 Rⁿ¹ 和与它们共同相连的氮原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R^{0'} 所取代；

R^z 选自 C1-6 烷基；

R⁰、R^{0'} 各自独立地选自 C1-6 烷基、C3-6 环烷基、-NR^{m2}Rⁿ² 和任选被 C1-6 烷基取代的 4-10 元杂环基；

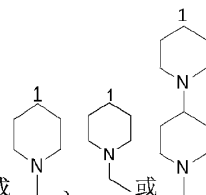
R^{m2}、Rⁿ² 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基。

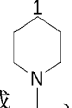
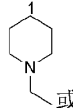
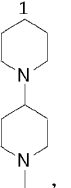


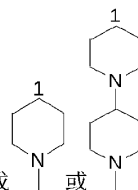
在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R⁰ 取代的 5-6 元杂环。

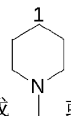
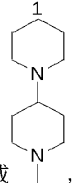
在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R⁰ 取代的嘧啶环或哌嗪环。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R⁰ 取代的嘧啶环。



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



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

在一些实施方案中, r 、 r^1 各自独立地选自 0、1、2、3、4 和 5。

在一些实施方案中, r 、 r^1 各自独立地选自 0 和 4。

在一些实施方案中, r 、 r^1 中, 任一个为 0, 另一个为 4。

在一些实施方案中, R^{n1} 、 R^{n1} 各自独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、 $-COOCH_3$ 、 $-COOCH_2CH_3$ 、 $-COOCH_2CH_2CH_3$ 、 $-COOCH(CH_3)_2$ 、 $-COOC(CH_3)_3$ 和 $-COOCH_2CH_2CH_2CH_3$ 。

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

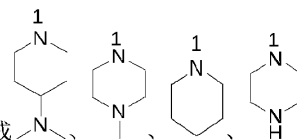
在一些实施方案中, R^{n1} 、 R^{n1} 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基。

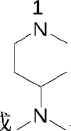
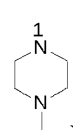
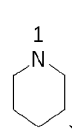
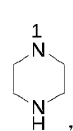
在一些实施方案中, R^{n1} 、 R^{n1} 各自独立地选自 H、甲基、乙基和正丙基。

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

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

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



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

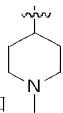
在一些实施方案中, R^z 为甲基。

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

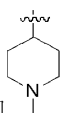
在一些实施方案中, R^0 选自 C1-6 烷基和被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基, 所述 5-6 元杂环基选自哌啶基和哌嗪基。

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

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



在一些实施方案中, R^0 选自甲基、乙基和



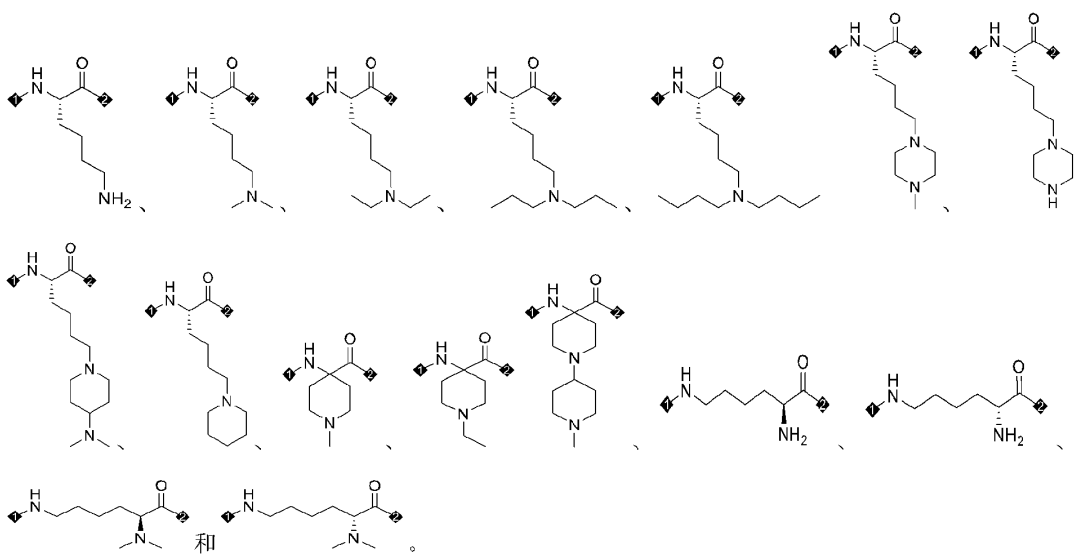
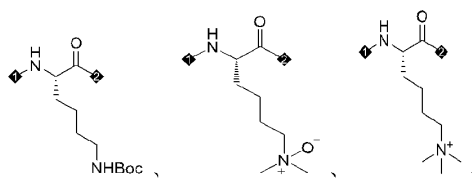
在一些实施方案中, R^0 选自甲基和

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

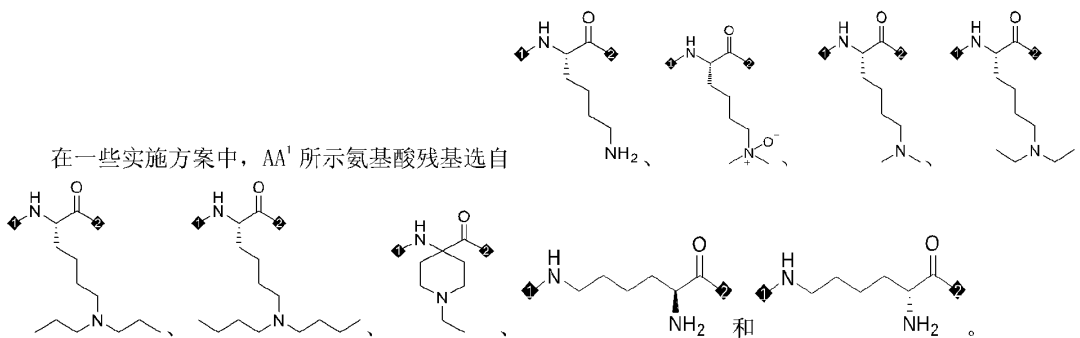
在一些实施方案中, $R^{0'}$ 选自甲基和 $-NR^{n2}R^{n2}$ 。

在一些实施方案中, R^{m2} 、 R^{n2} 为甲基。

在一些实施方案中, AA^1 所示氨基酸残基选自



在一些实施方案中, AA^1 所示氨基酸残基选自



在一些实施方案中, q 选自 2-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中, q 选自 3-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中, q 选自 4-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中, q 选自 6-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中, q 选自 2-8 之间的任意整数。

在一些实施方案中, q 选自 3-8 之间的任意整数。

在一些实施方案中, q 选自 4-8 之间的任意整数。

在一些实施方案中, q 选自 6-8 之间的任意整数。

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

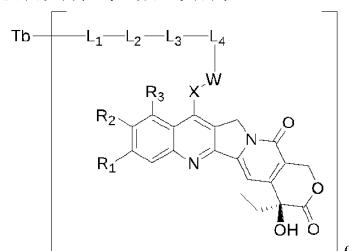
在一些实施方案中, q 选自 2、4、6 和 8。

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

在一些实施方案中, D 为具有抗肿瘤生物活性分子片段。

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

在一些实施方案中, 抗体药物偶联物具有式 I 所示结构:



其中,

R₁、R₂各自独立地选自 H、卤素、-OH、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基, 或者,

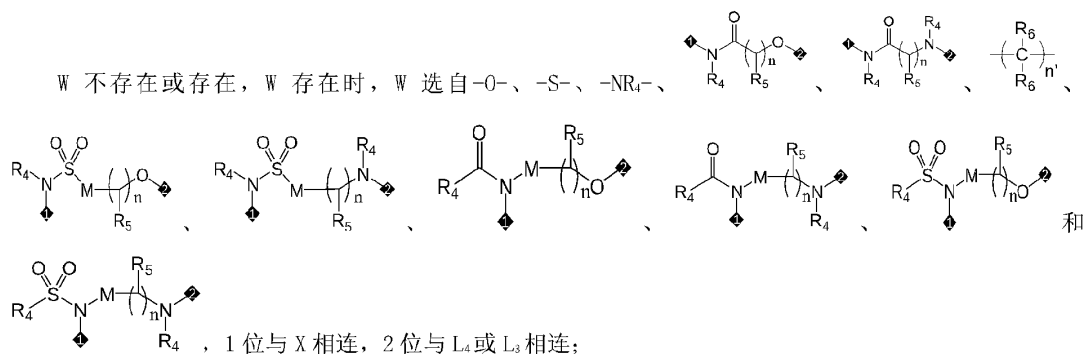
R₁和 R₂和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环, 所述杂环含有 1 个或多个 O, S, N, 羰基, 亚砷基或砷基或其任意组合;

R₃选自 H、卤素、-OH、-NH₂、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基, 或者,

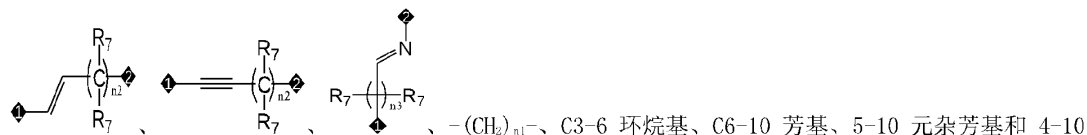
R₃和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环, 所述杂环含有 1 个或多个 O, S, N, 羰基, 亚砷基或砷基或其任意组合, 或者,

R₃和 R₂和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环, 所述杂环含有 1 个或多个 O, S, N,

羰基, 亚砷基或砷基或其任意组合;



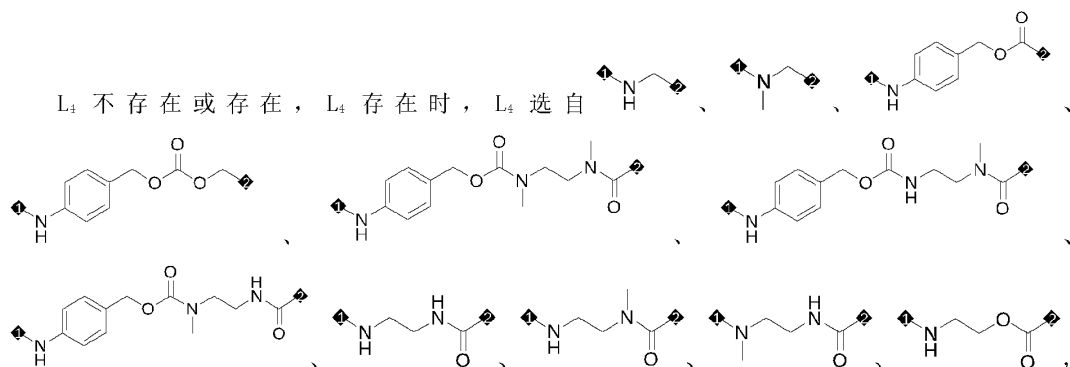
X 选自直接键, 任选取代的 $-O-(CH_2)_{n3}-$ 、 $-N(R_4)-(CH_2)_{n3}-$ 、 $-S-(CH_2)_{n3}-$ 、羰基 $-(CH_2)_{n3}-$ 、 $-SO_2-(CH_2)_{n3}-$ 、



各 M 独立地选自直接键和 $-CR^{5a}R^{5b}-$;

R_1 、 R_5 、 R^{5a} 、 R^{5b} 、 R_6 、 R_7 各自独立地选自 H、任选取代的 C1-4 烷基、任选取代的 C1-4 烷氧基和任选取代的 C3-6 环烷基;

n 、 n' 、 n_1 、 n_2 、 n_3 各自独立地选自 0 到 6 之间的任意整数;



1 位与 L_3 相连, 2 位与 W 或 X 相连。

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

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

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

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

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

在一些实施方案中, R_1 为 H 或 F, R_2 为 H 或甲基。

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

在一些实施方案中, R_1 为 F, R_2 为甲基。

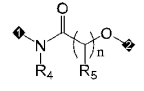
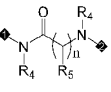
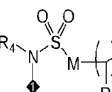
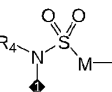
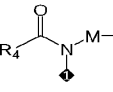
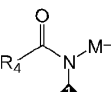
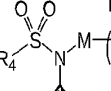
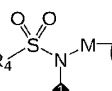
在一些实施方案中, R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 .

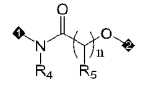
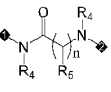
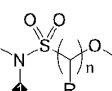
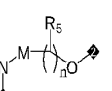
在一些实施方案中, R_3 选自 H 和 C1-4 烷基。

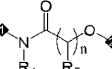
在一些实施方案中, R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元碳环。

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

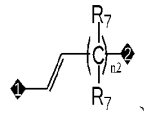
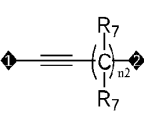
在一些实施方案中, R_3 为 H。

在一些实施方案中, W 不存在或存在, W 存在时, W 选自 -O-、-S-、-NR₄-、、、、、、、和，1 位与 X 相连, 2 位与 L₄ 或 L₃ 相连。

在一些实施方案中, W 不存在或存在, W 存在时, W 选自 -O-、-S-、-NR₄-、、、和，1 位与 X 相连, 2 位与 L₄ 或 L₃ 相连。

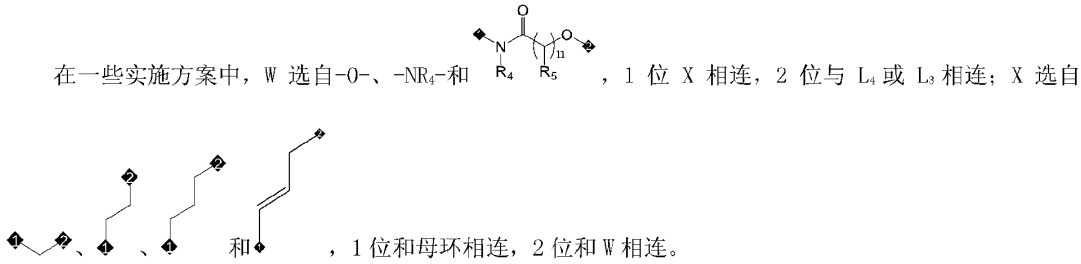
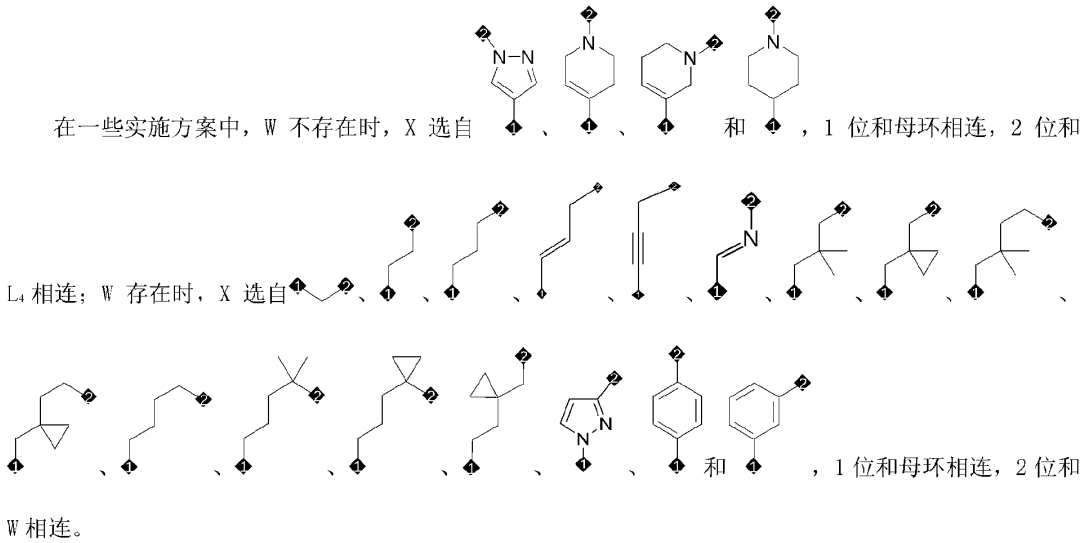
在一些实施方案中, W 选自 -O-、-NR₄-和，1 位 X 相连, 2 位与 L₄ 或 L₃ 相连。

在一些实施方案中, W 选自 -O-和-NR₄-, 1 位 X 相连, 2 位与 L₄ 或 L₃ 相连。

在一些实施方案中，X 选自任选取代的 $-(CH_2)_{n1}-$ 、、、 $R_7-(CH_2)_{n3}-R_7$ 、C6-10 芳

基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L₄相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基，或者 2 个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基。

在一些实施方案中，X 选自任选取代的 、、、、、、、、、、、、



在一些实施方案中，R₄、R₅各自独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基。

在一些实施方案中，各 R₄独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基，R₅为 H。

在一些实施方案中，各 R₄独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基和环丙基，R₅为 H。

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

在一些实施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自独立地选自 H 和甲基。

在一些实施方案中，各 R₇独立地选自 H 和 C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R₇为 H。

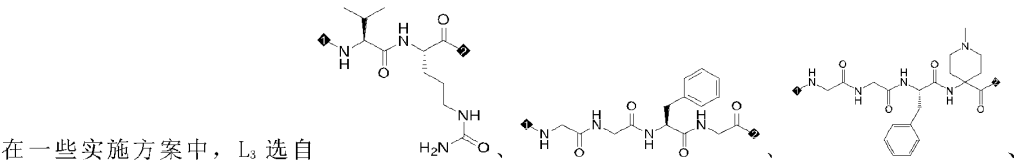
在一些实施方案中，n 选自 1、2 和 3。

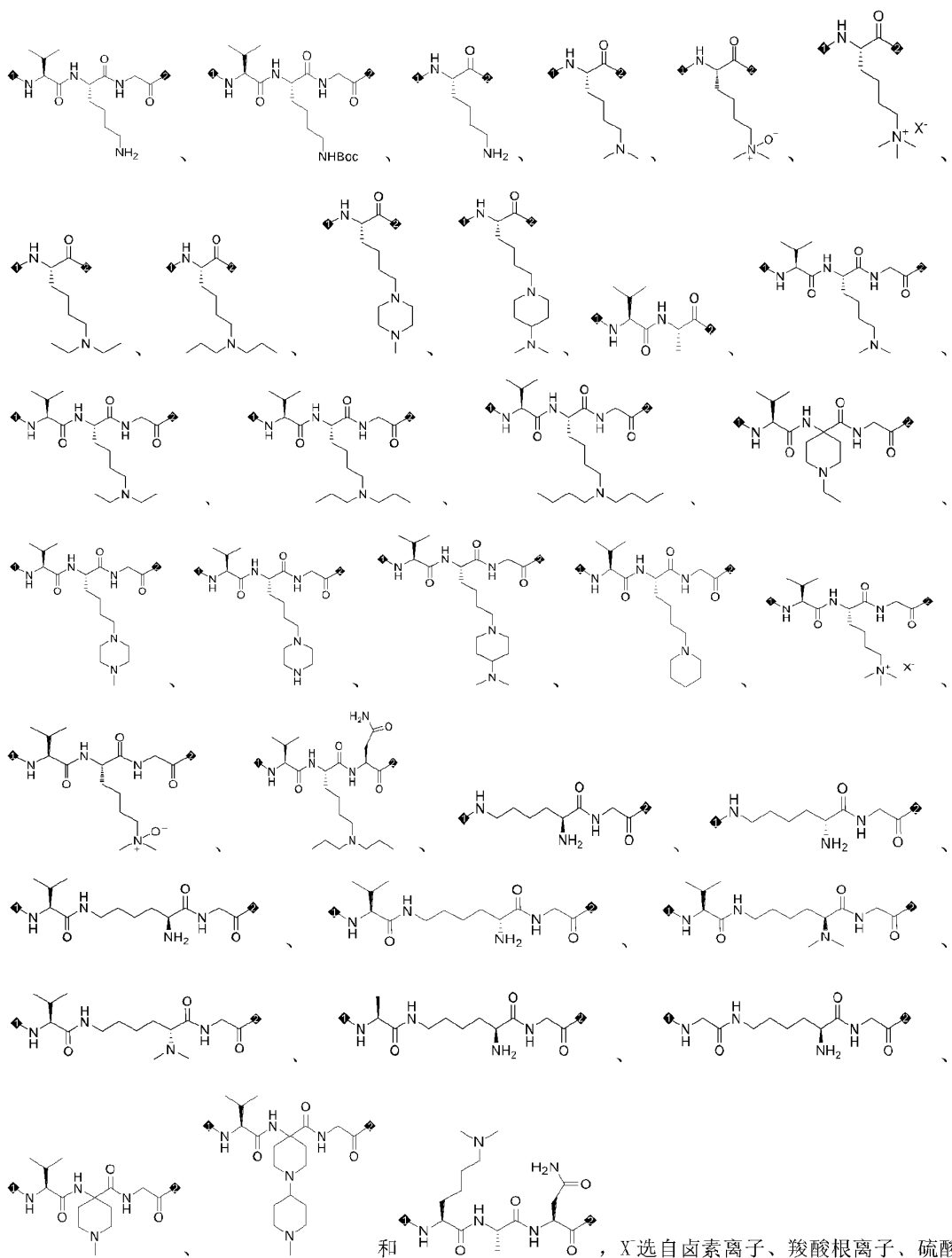
在一些实施方案中，n 为 1。

在一些实施方案中，n₁ 选自 1、2、3 和 4。

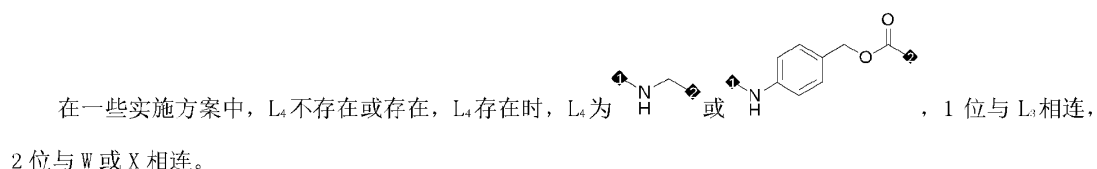
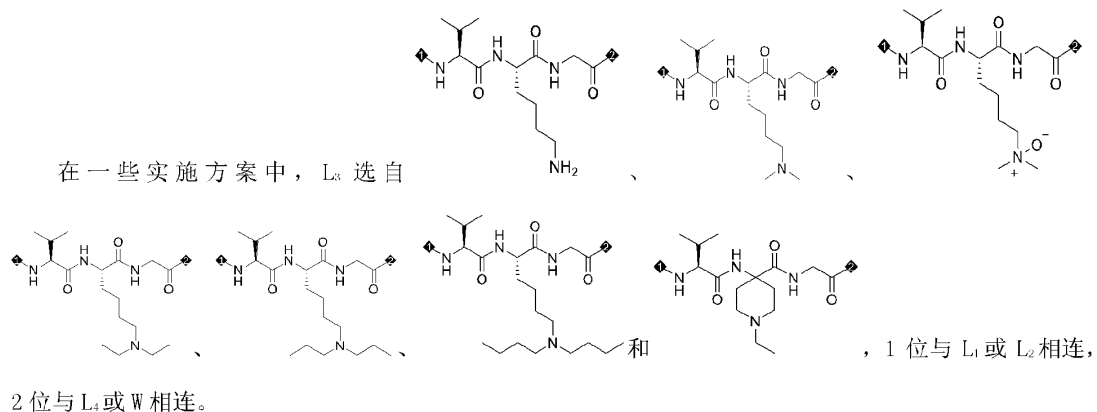
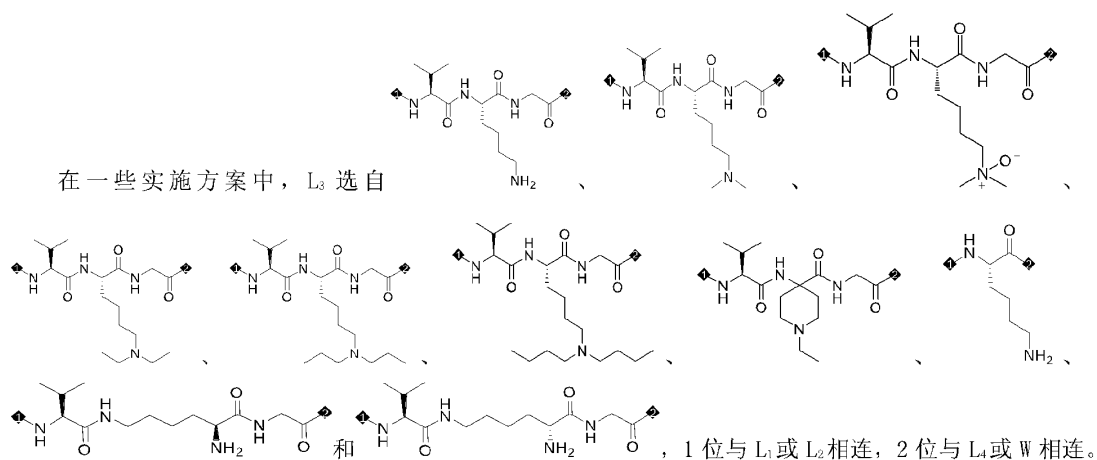
在一些实施方案中，n₂ 为 1。

在一些实施方案中，n₃ 为 0。

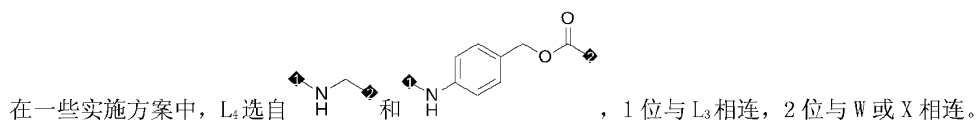




根离子、硫酸氢根离子和 OH^- ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

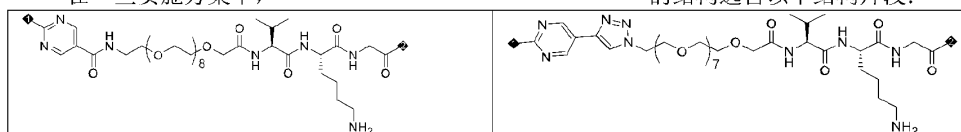


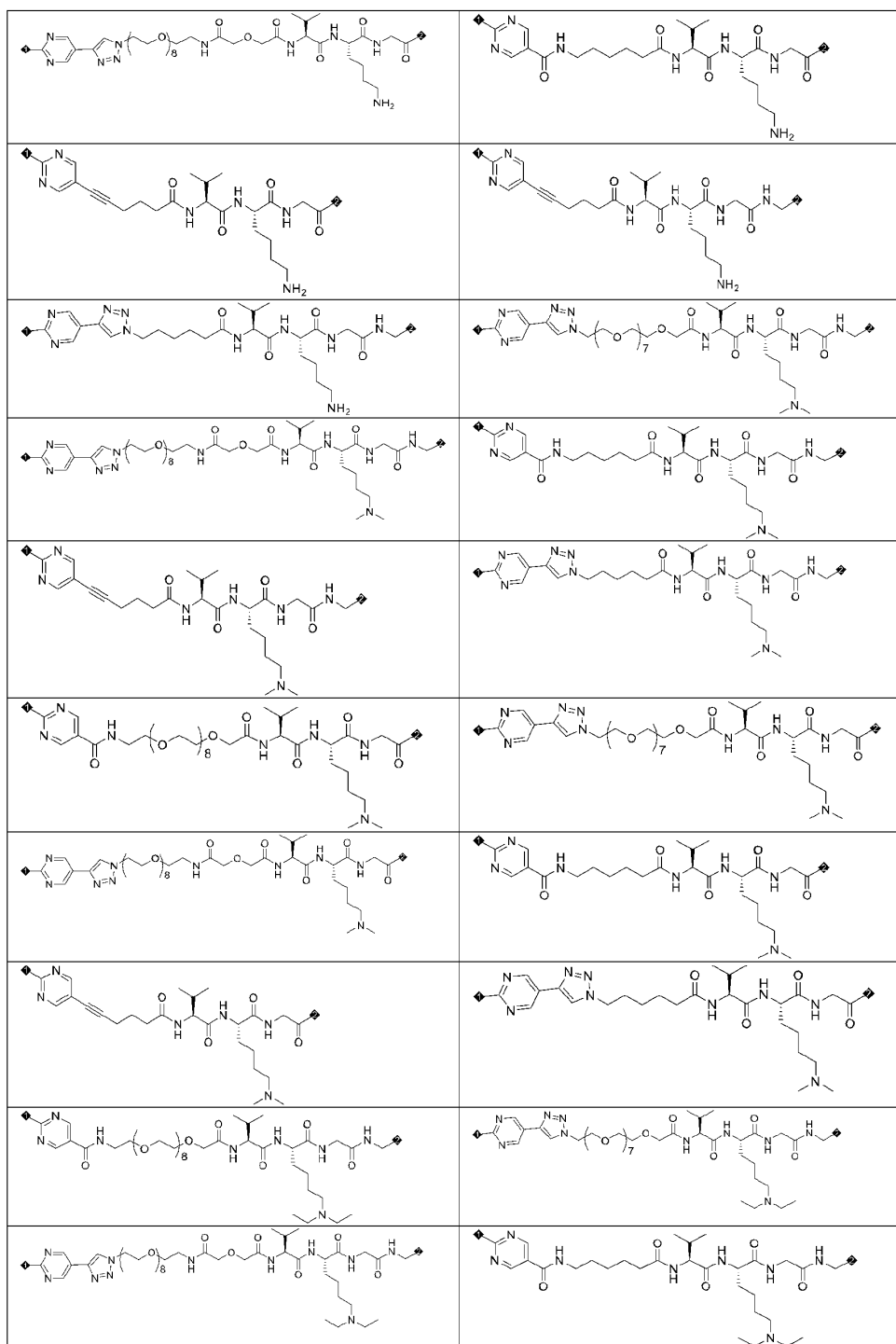
在一些实施方案中， L_4 不存在。

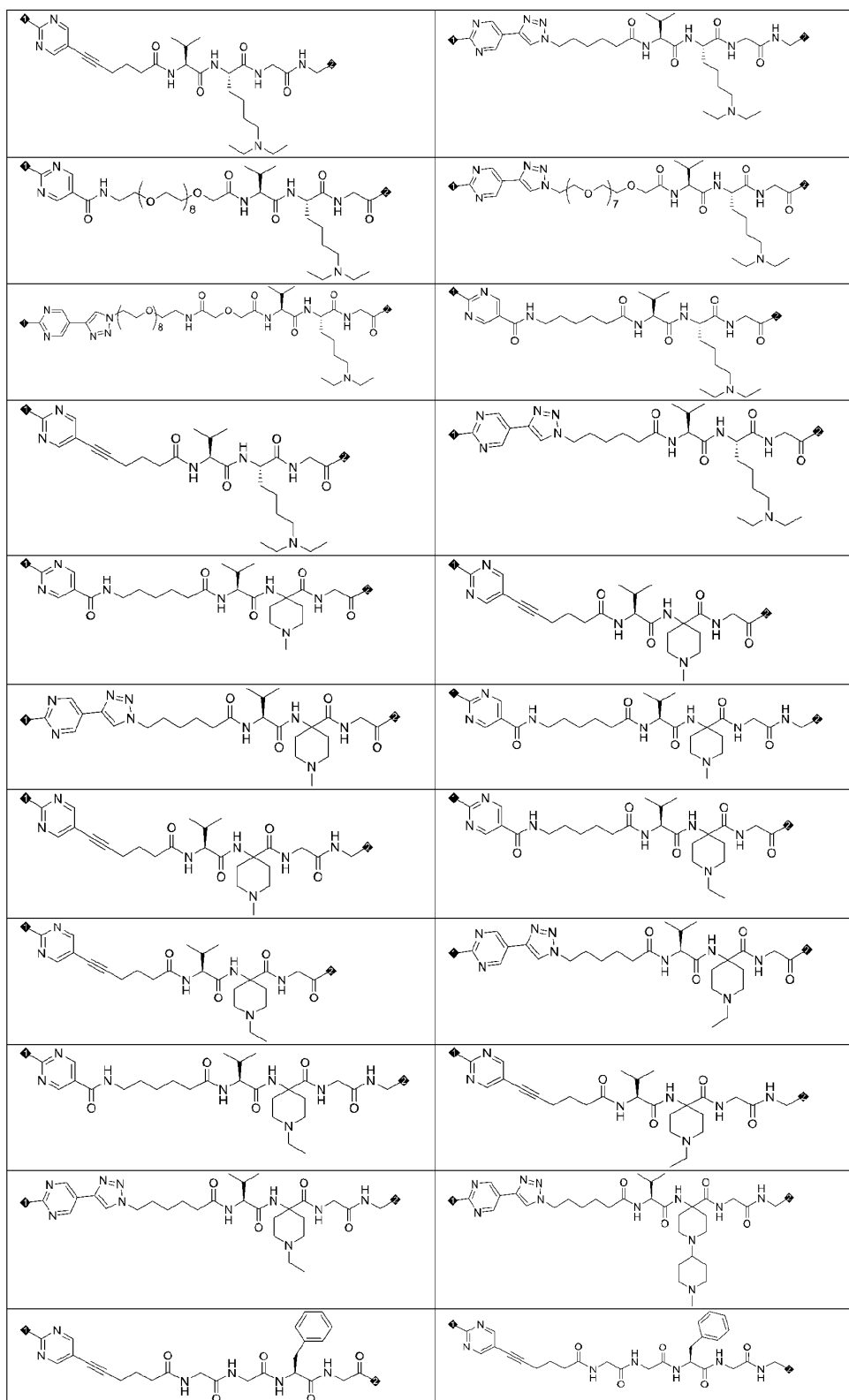


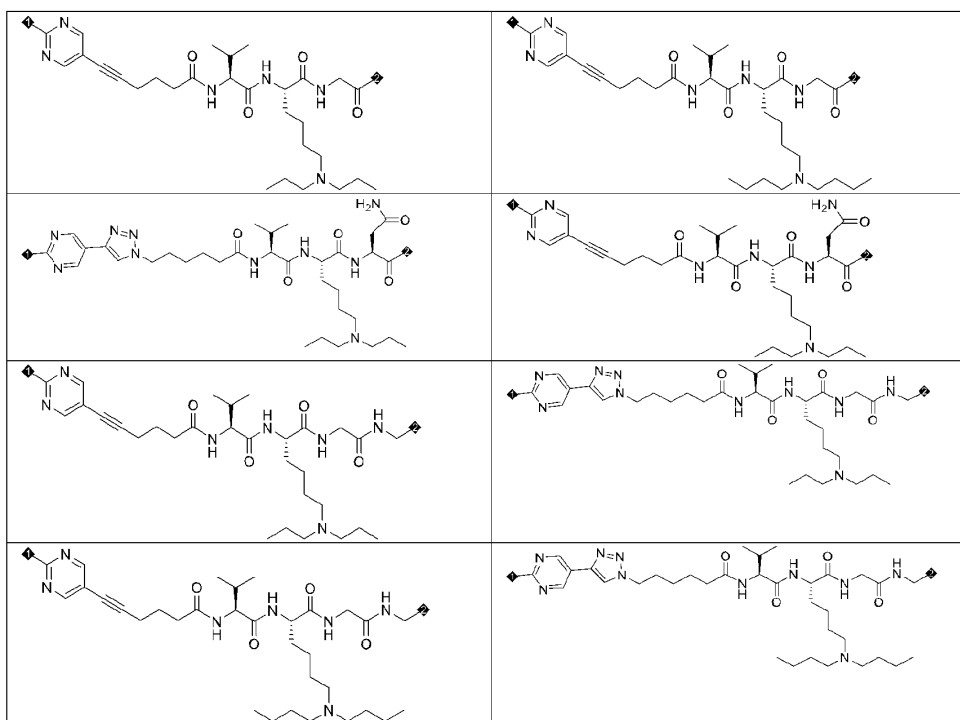
需要说明的是，如前所述， W 不存在或存在，由此， W 不存在时， L_4 的 1 位与 L_3 相连，2 位与 X 相连； W 存在时， L_4 的 1 位与 L_3 相连，2 位与 W 相连。以下关于 L_4 的连接关系可参照前述内容进行理解。

在一些实施方案中， $L_1-L_2-L_3-L_4$ 的结构选自以下结构片段：

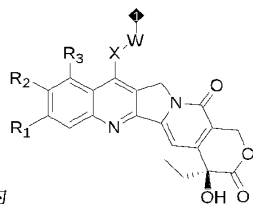






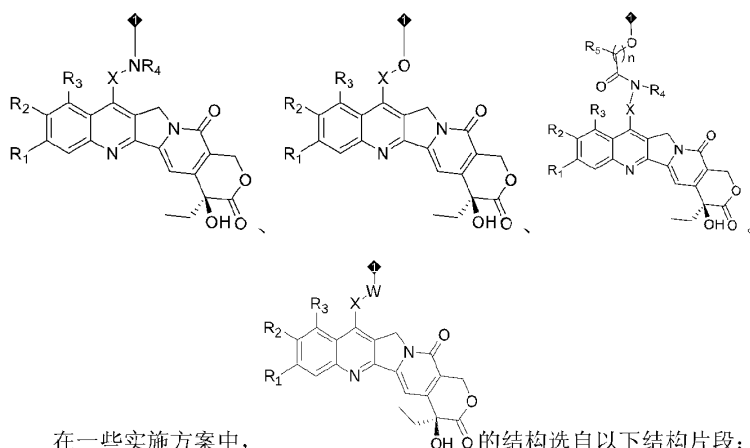


其中，1 位与 Tb 相连，2 位与 W 相连。



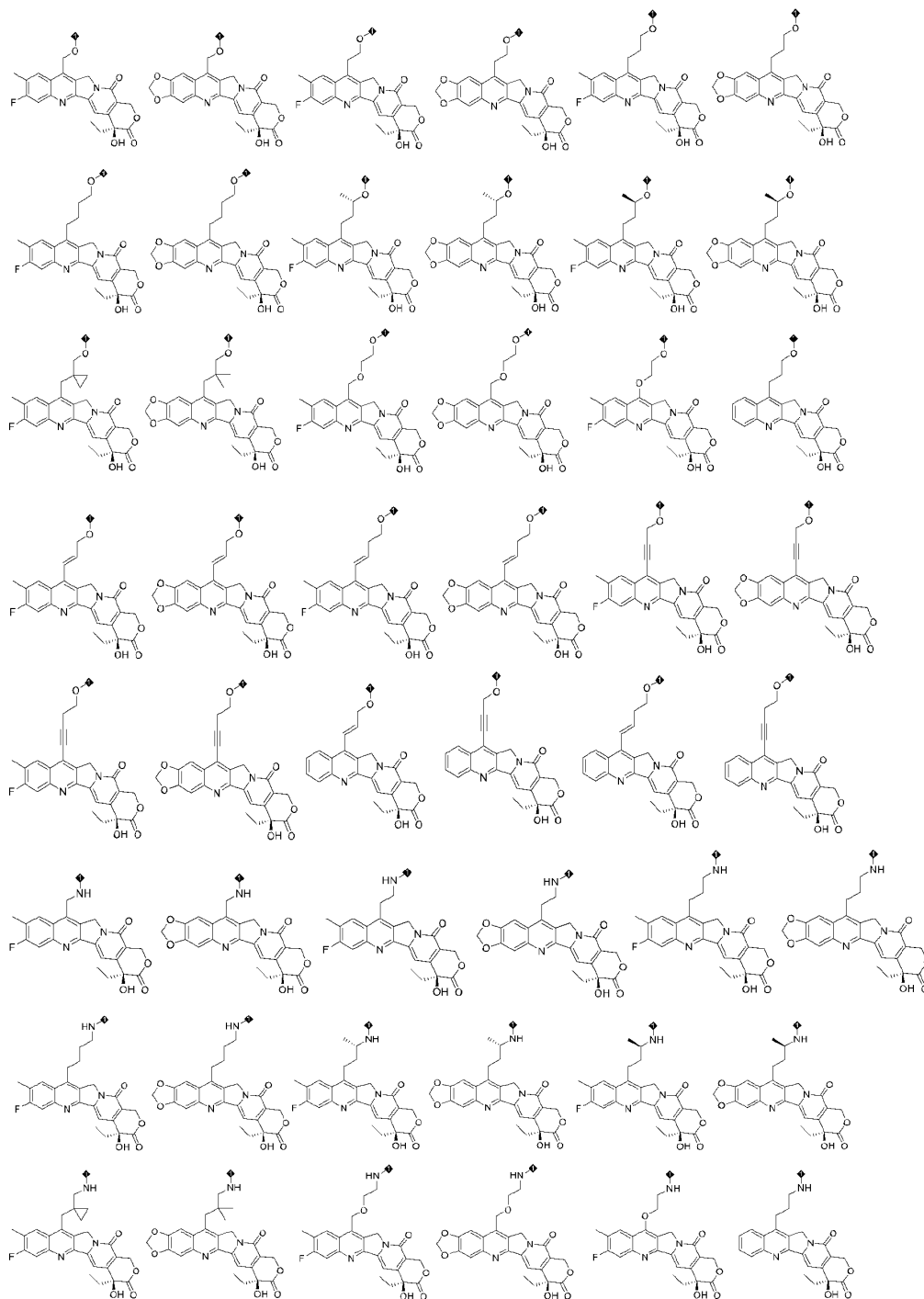
在一些实施方案中，D 为

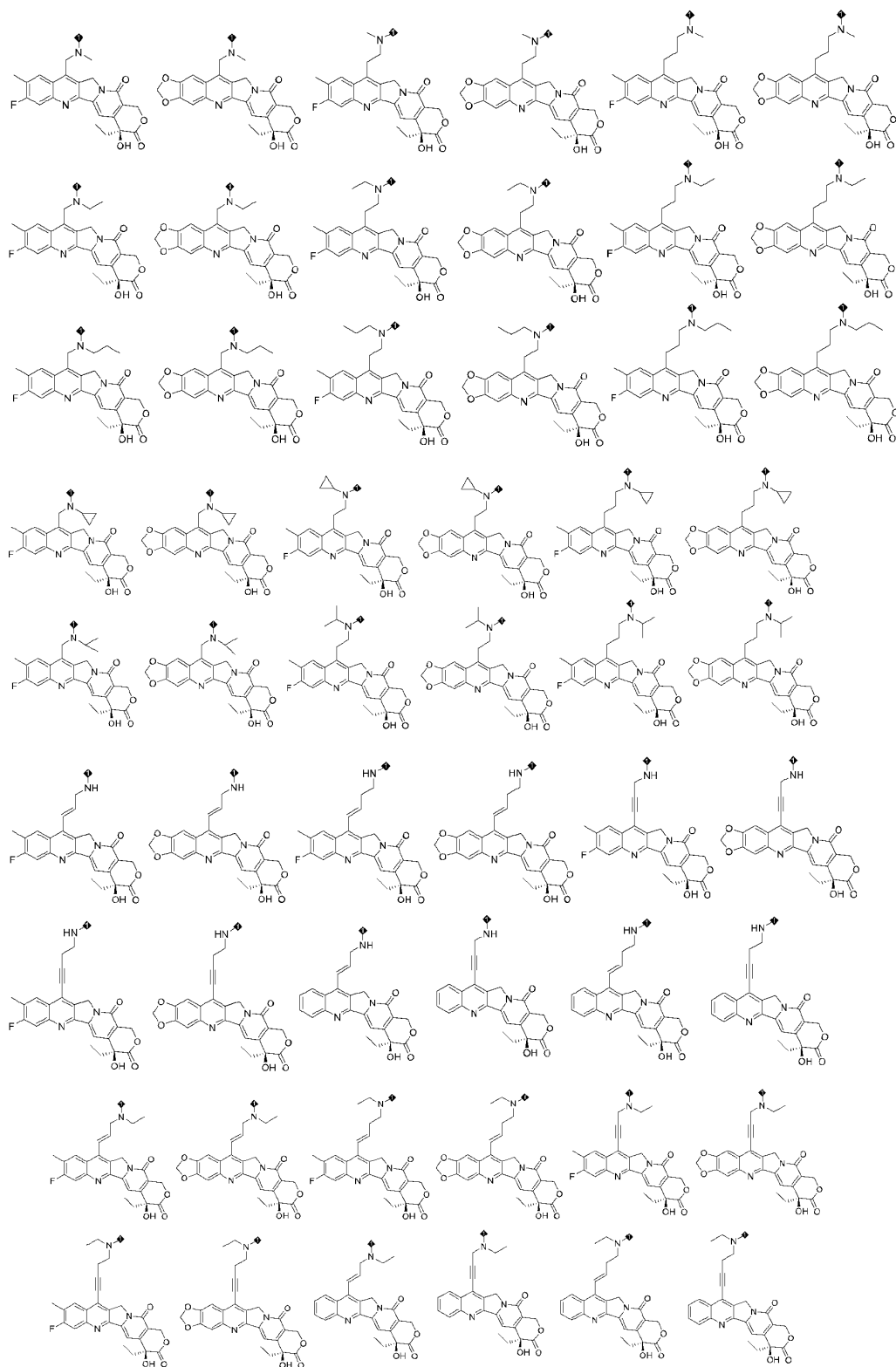
所示的结构片段；1 位与 L₃ 或 L₄ 连接；例如

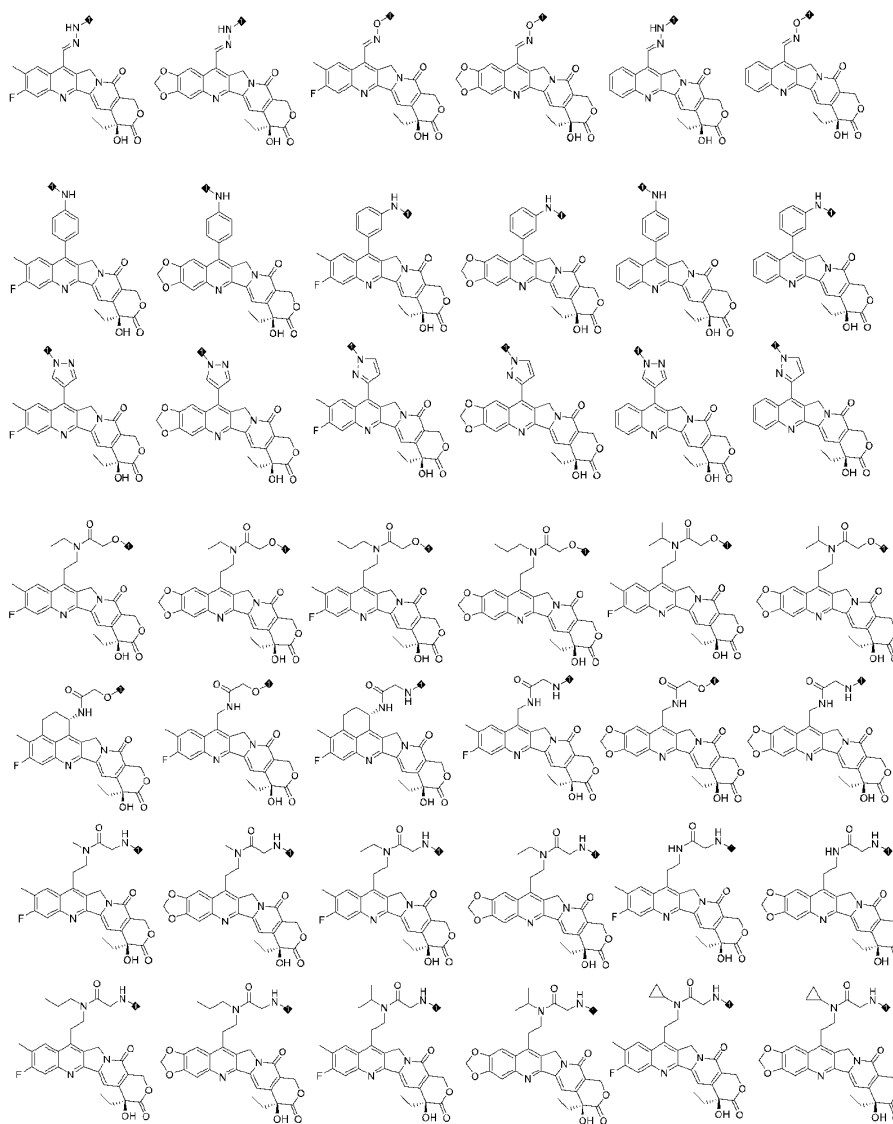


在一些实施方案中，

的结构选自以下结构片段：

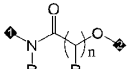
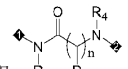


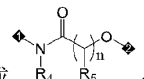


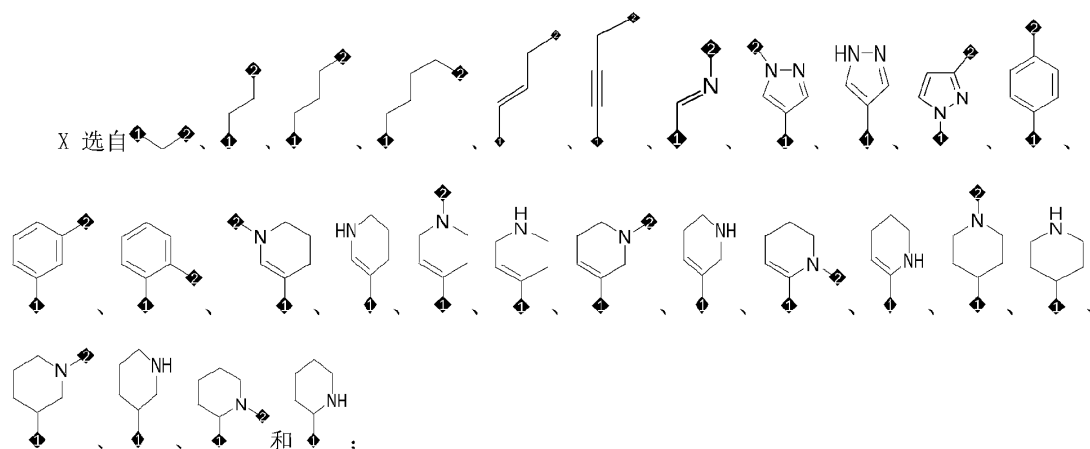


其中，1 位与 L_3 相连；当 L_4 不存在时，1 位与 L_3 相连。

在一些实施方案中，

W 不存在或存在，W 存在时，W 选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_4-$ 、 和 ；例如不存在、 $-O-$ 、

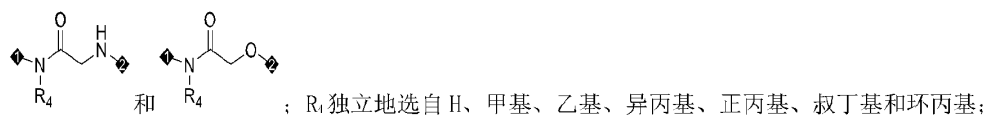
； R_4 和 R_5 各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基；n 独立地选自 0、1、2、3 和 4；
 $-NR_4-$ 或



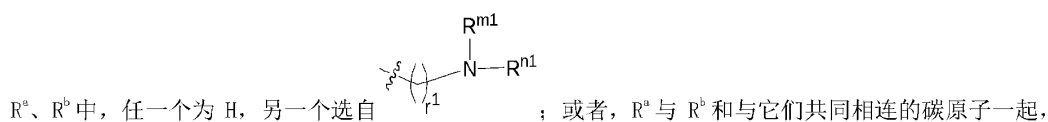
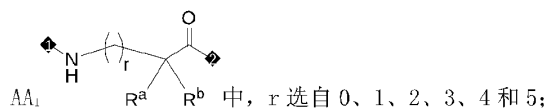
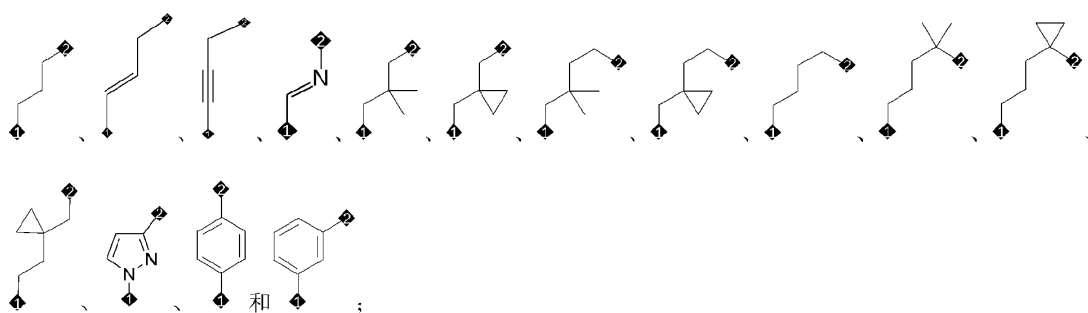
R_1 选自 H、卤素, R_2 选自 H、C1-4 烷基, 或, R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子形成 、、、
或 , 虚线表示所述杂环与苯环耦合的位置;

R₃选自H和C1-4烷基，或，R₃和X和与其相连的碳原子一起形成5-6元碳环；

优选地，W 不存在或存在，W 存在时，W 选自 -O-、-NR₄-（例如 -NH-、-N(CH₃)-、-N(C₂H₅)-）、



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

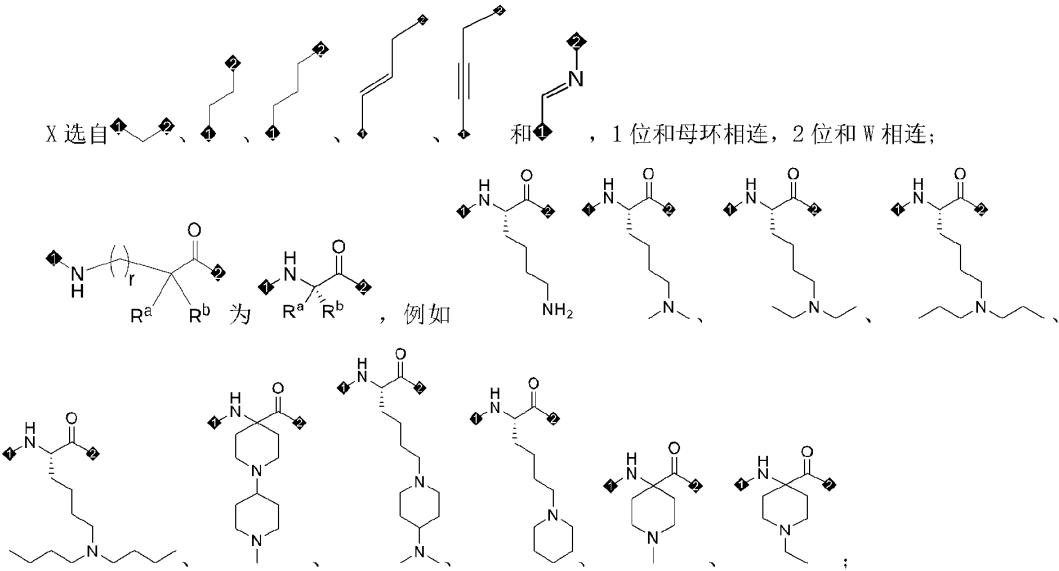


形成被 R^0 取代的 5-6 元杂环；

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

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

更优选地，W 选自 -O- 和 -NR₄-, 1 位 X 相连，2 位与 L₄ 或 L₃ 相连；

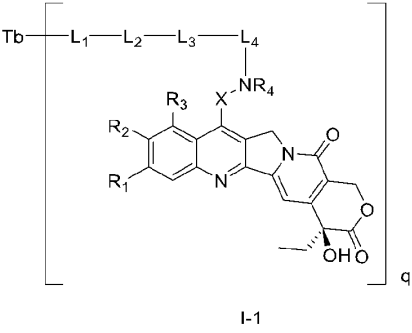


R_1 为 F，

R_2 为甲基或 R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 ；

R_3 为 H。

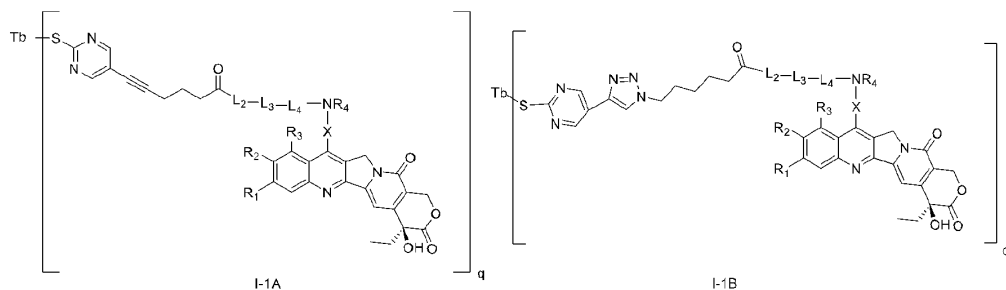
在一些实施方案中，抗体药物偶联物具有式 I-1 所示结构：



其中，Tb、L₁、L₂、L₃、L₄、X、R₁、R₂、R₃、R₄ 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提

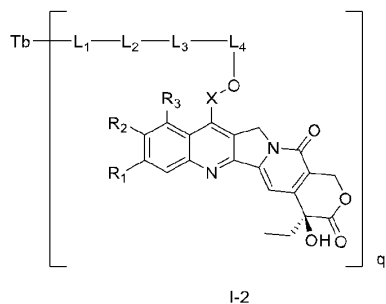
供的含义。

在一些实施方案中，抗体药物偶联物具有式 I-1A 或 I-1B 所示结构：



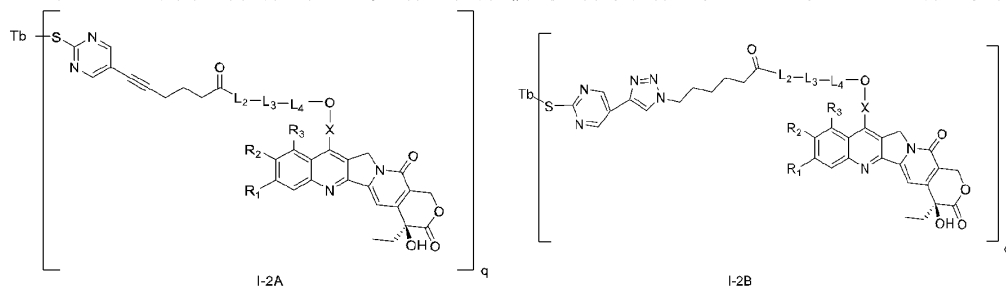
其中，Tb、 L_2 、 L_3 、 L_4 、X、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，抗体药物偶联物具有式 I-2 所示结构：



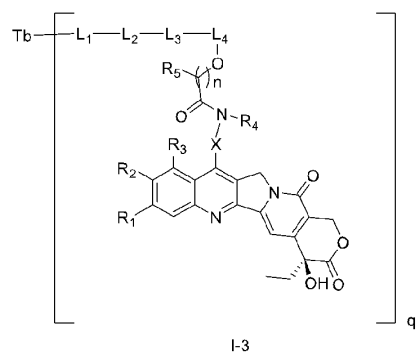
其中，Tb、 L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、X、 R_1 、 R_2 、 R_3 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，抗体药物偶联物具有式 I-2A 或 I-2B 所示结构：



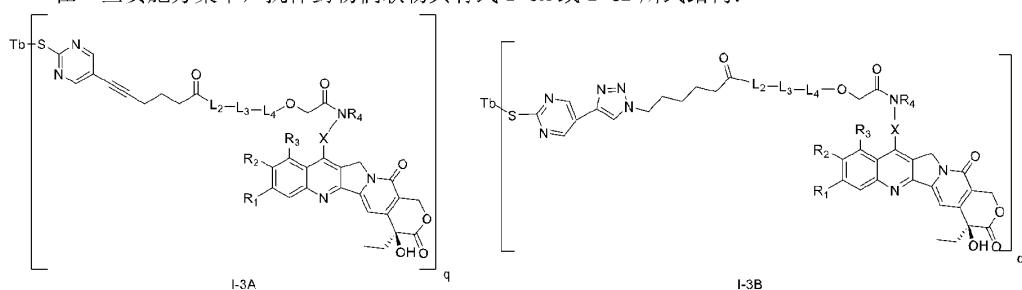
其中，Tb、 L_2 、 L_3 、 L_4 、X、 R_1 、 R_2 、 R_3 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，抗体药物偶联物具有式 I-3 所示结构：



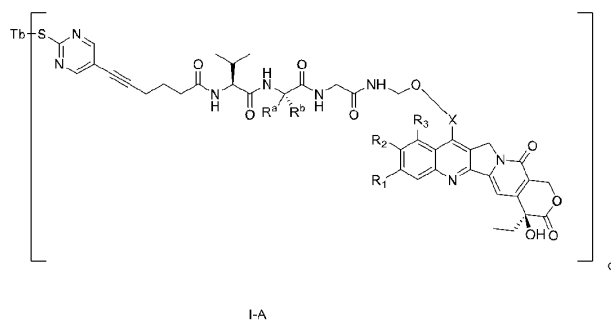
其中, Tb、L₁、L₂、L₃、L₄、X、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、n 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中, 抗体药物偶联物具有式 I-3A 或 I-3B 所示结构:



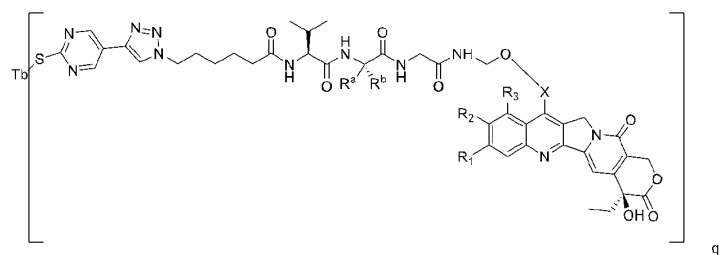
其中, Tb、L₂、L₃、L₄、X、R₁、R₂、R₃、R₄ 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中, 抗体药物偶联物具有式 I-A 所示结构:



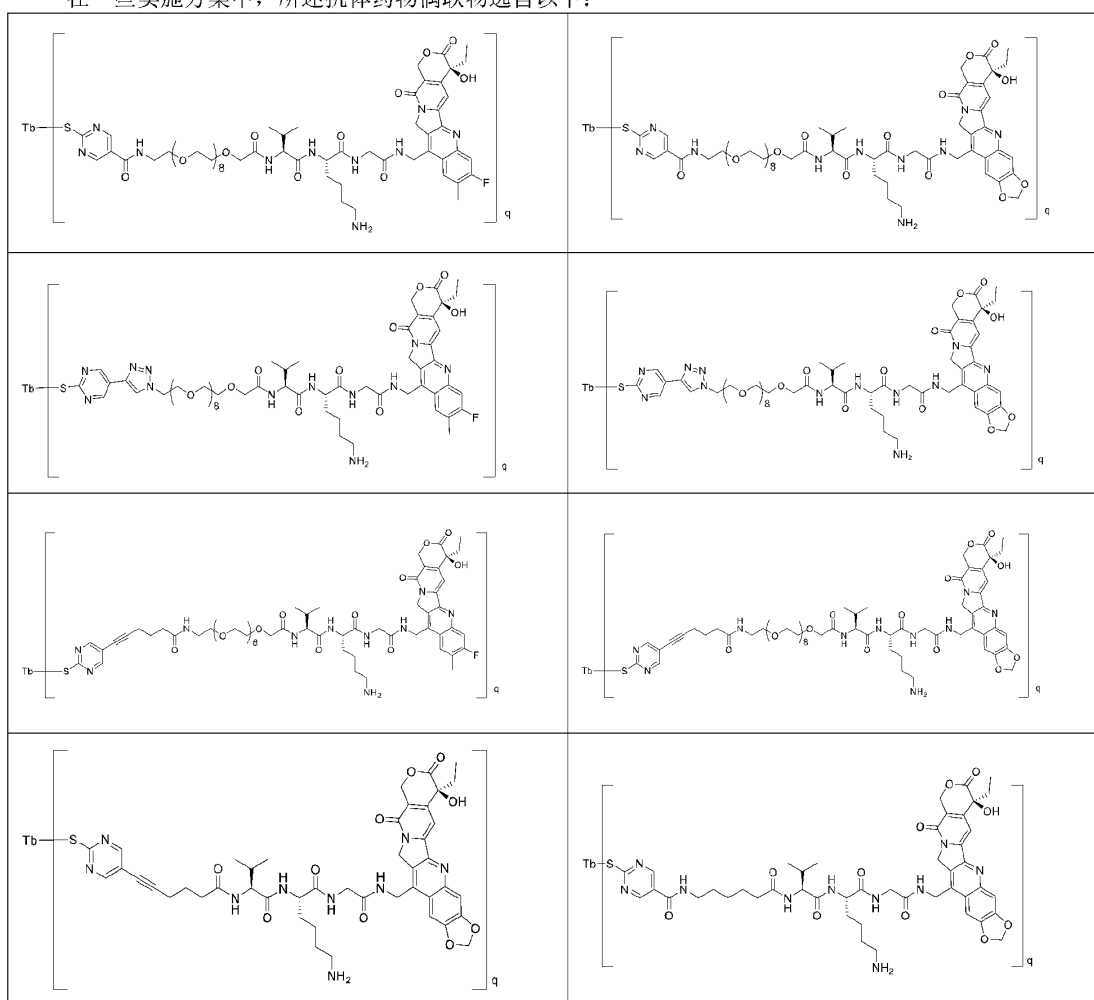
其中, Tb、X、R₁、R₂、R₃、R^a、R^b 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

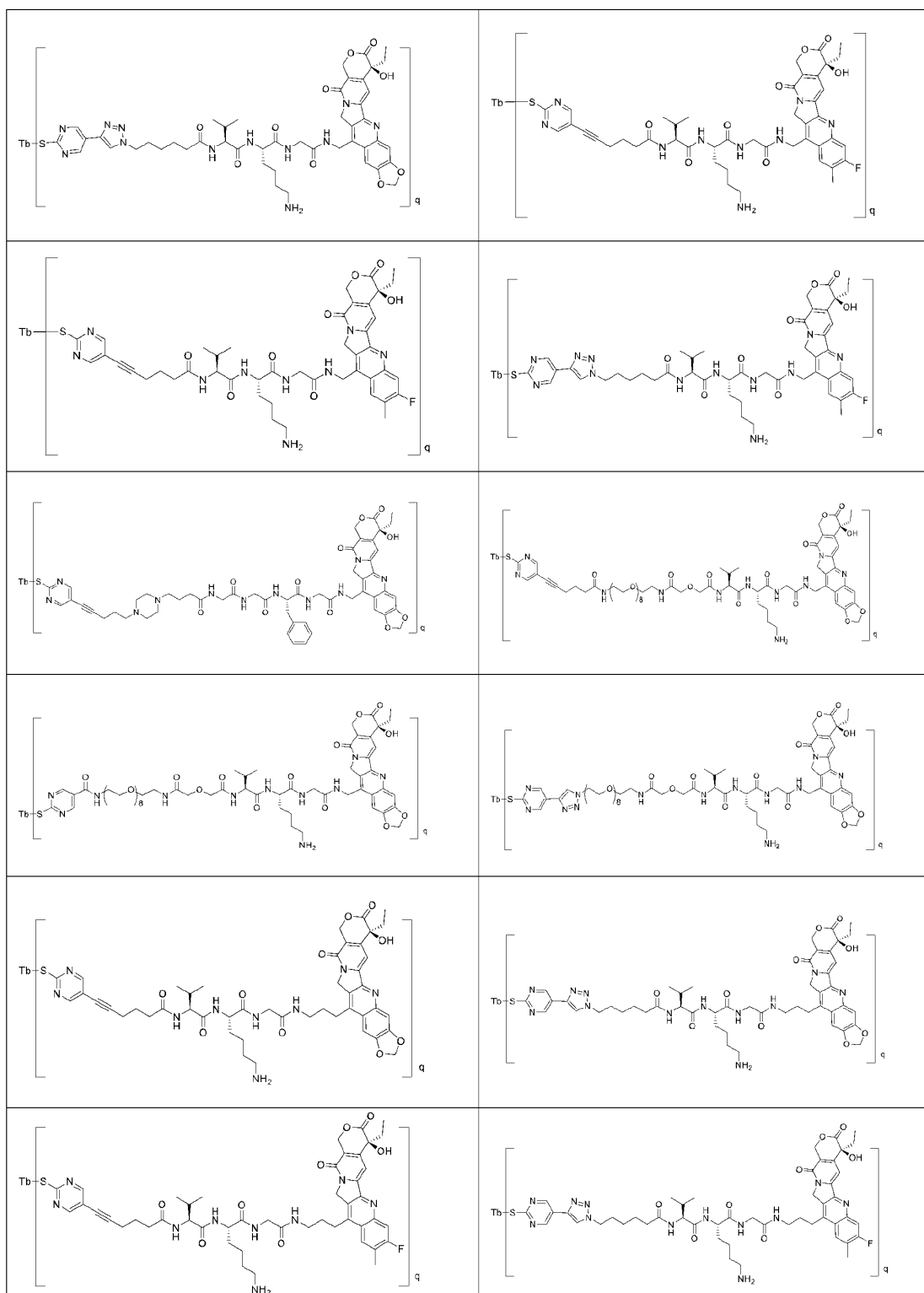
在一些实施方案中, 抗体药物偶联物具有式 I-B 所示结构:

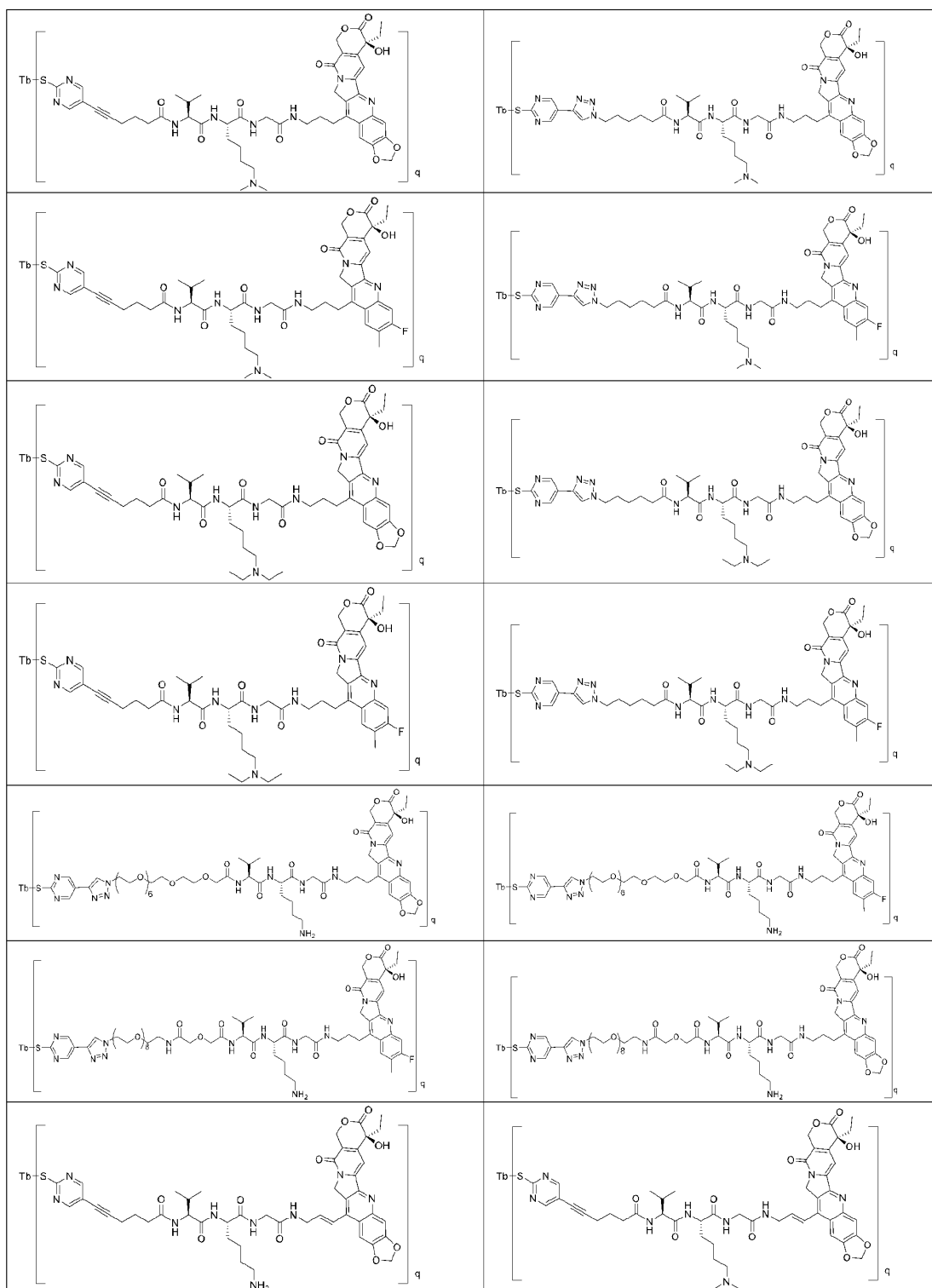


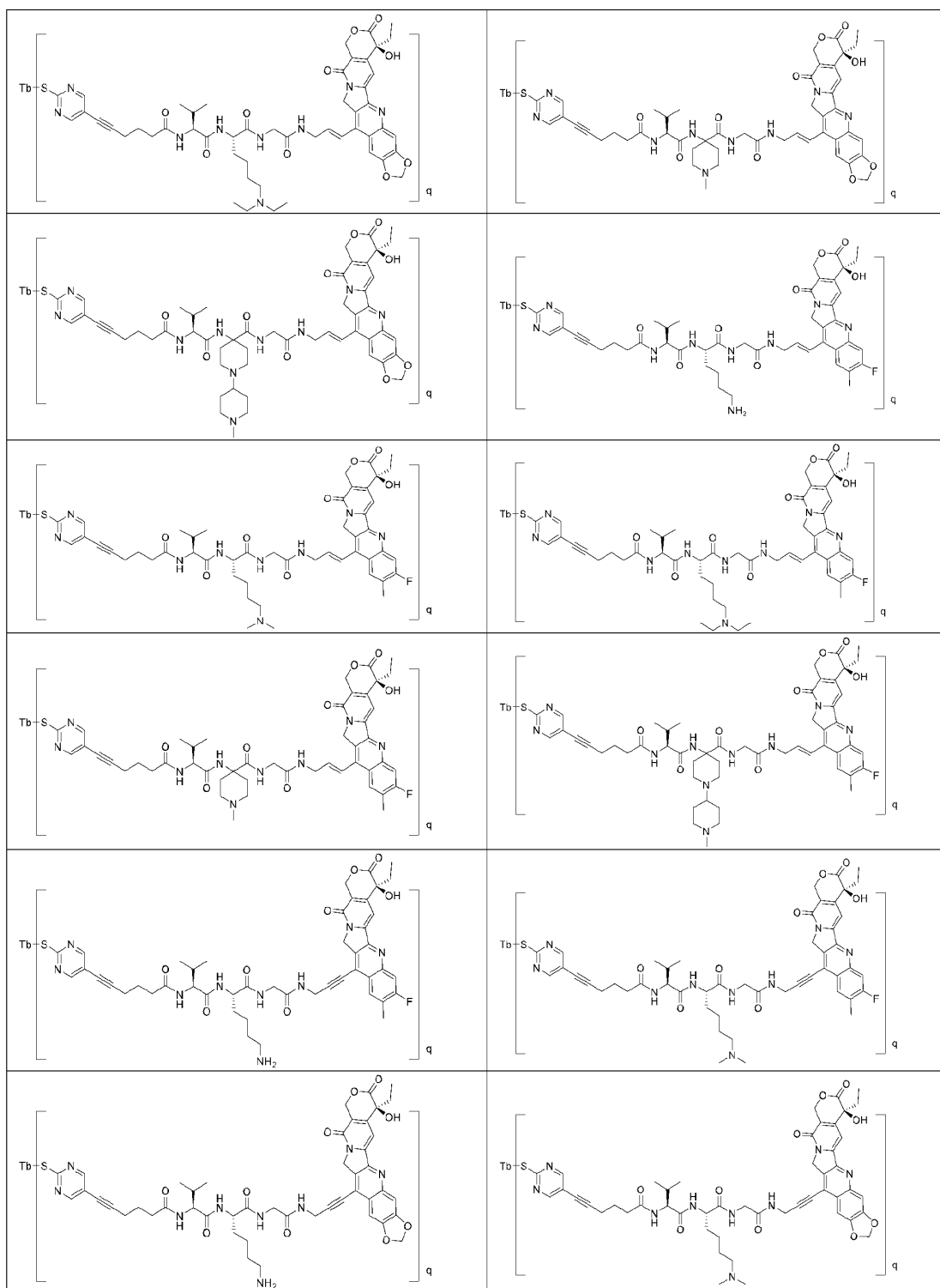
其中, Tb、X、R₁、R₂、R₃、R^a、R^b和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

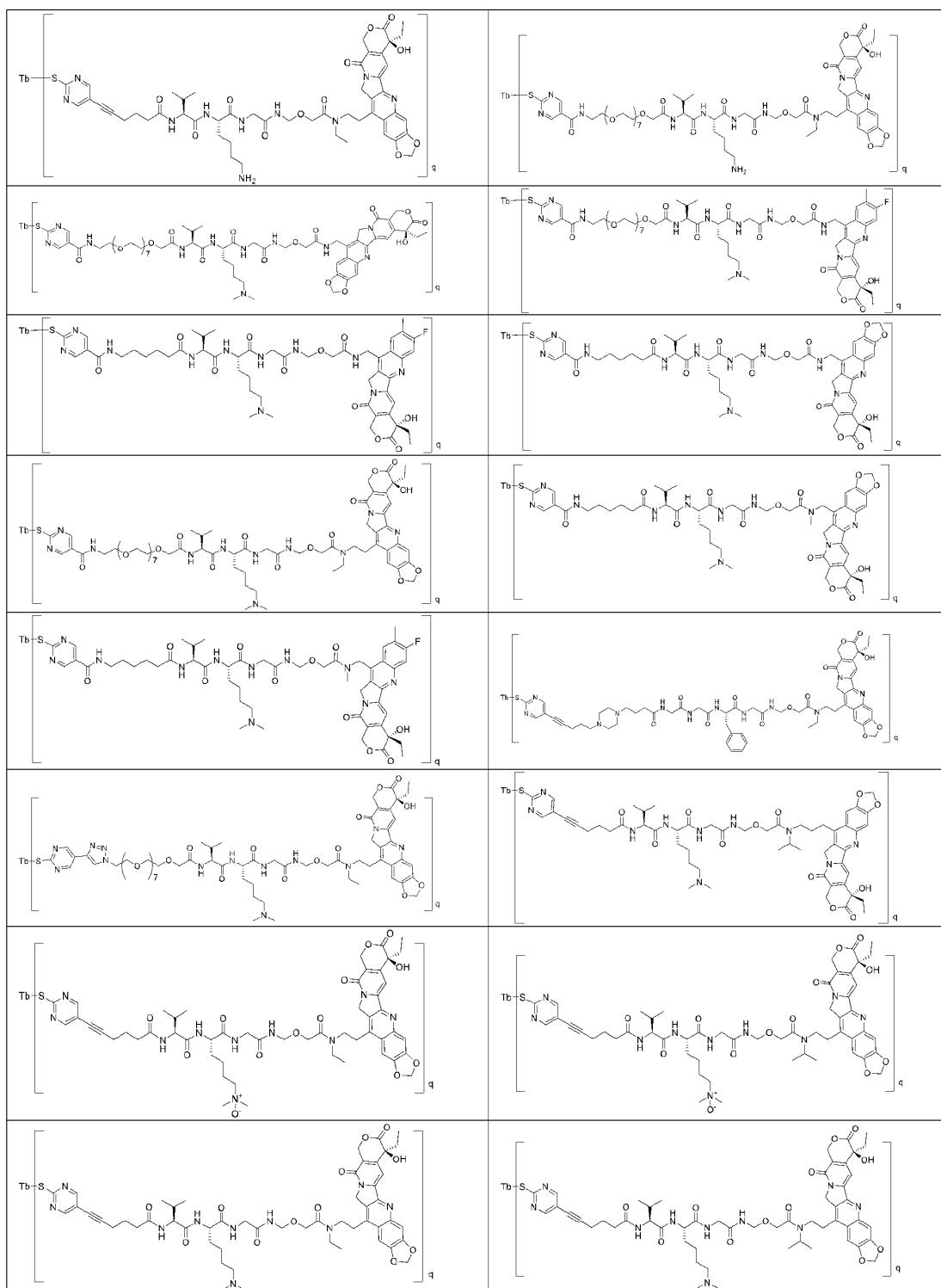
在一些实施方案中, 所述抗体药物偶联物选自以下:

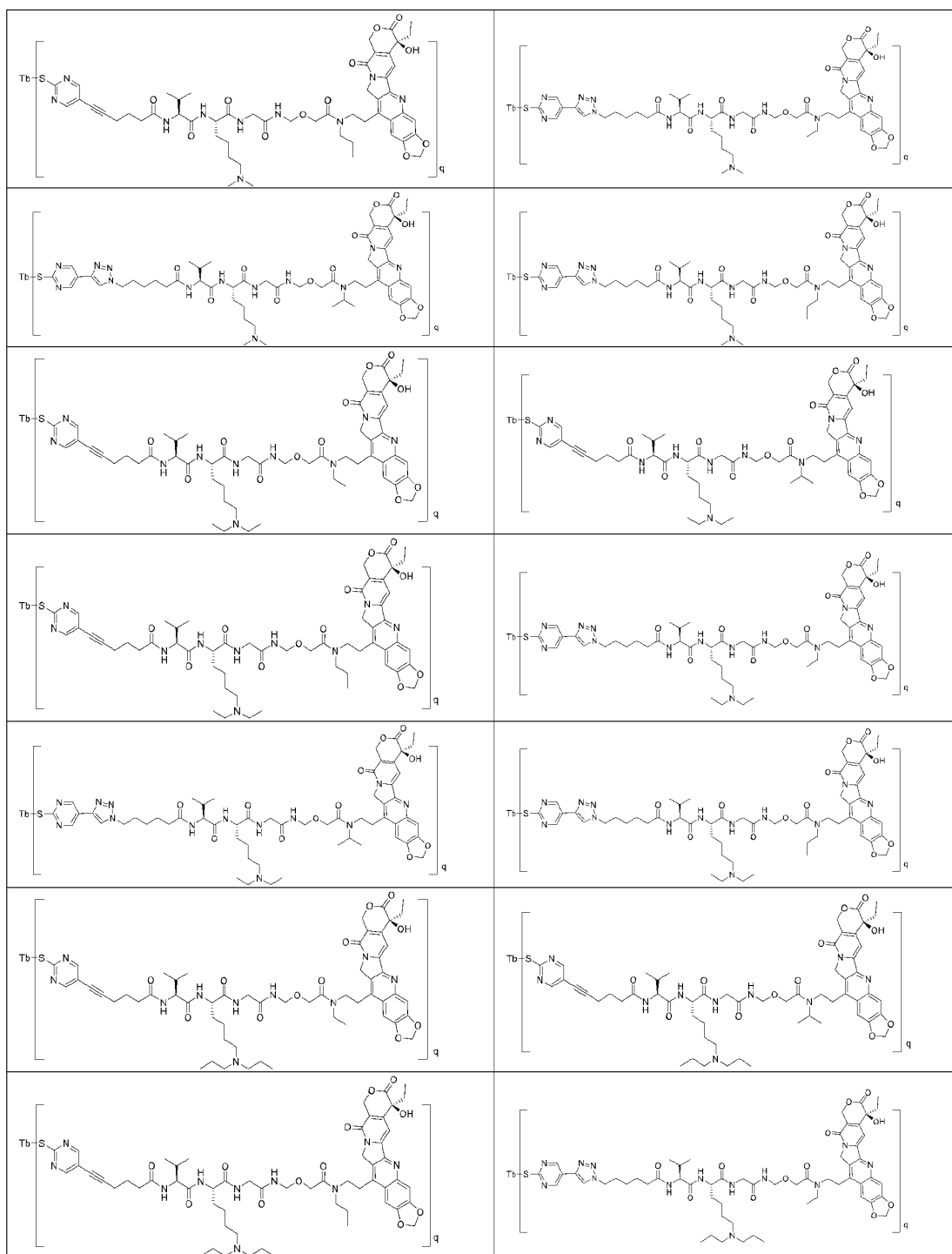


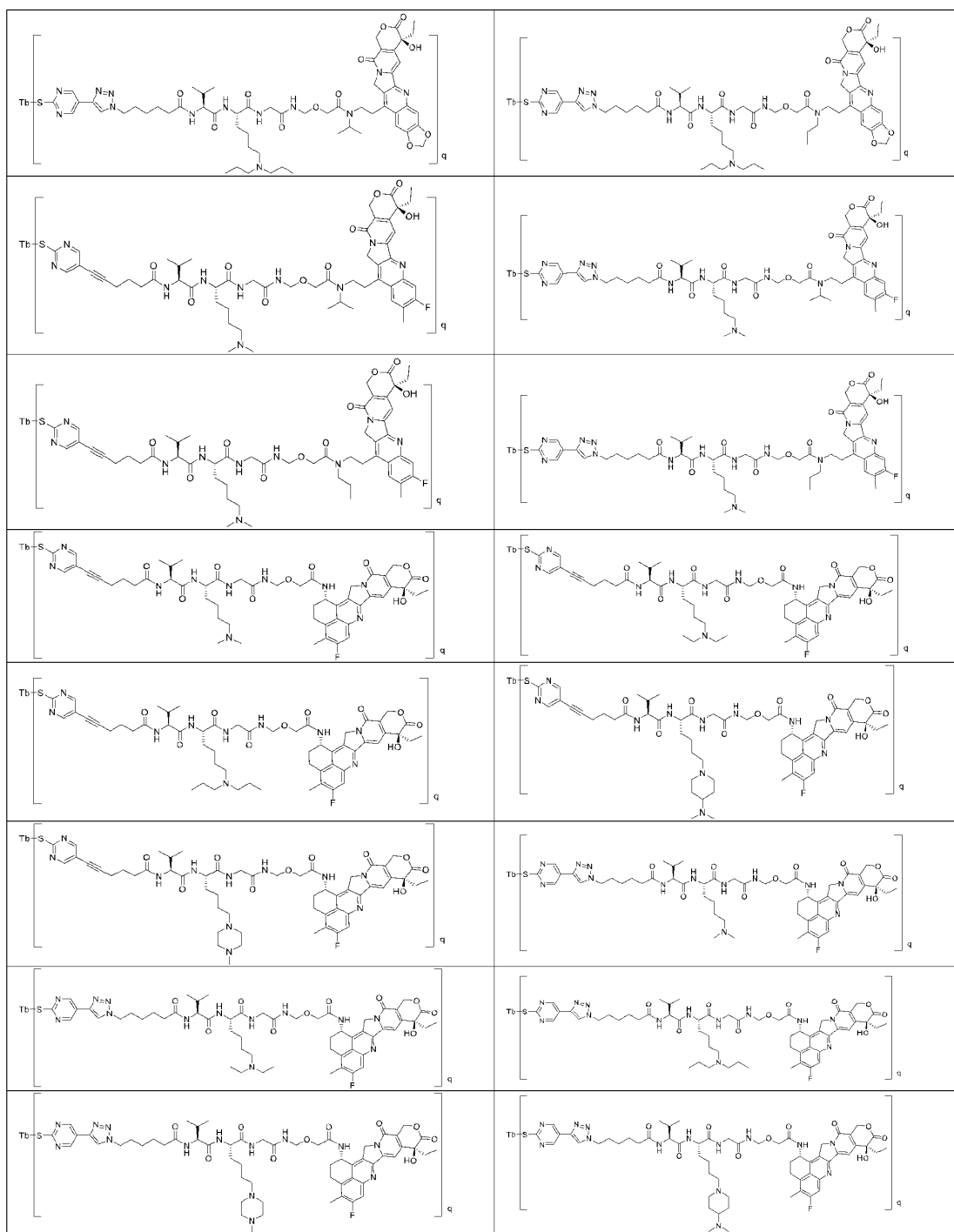


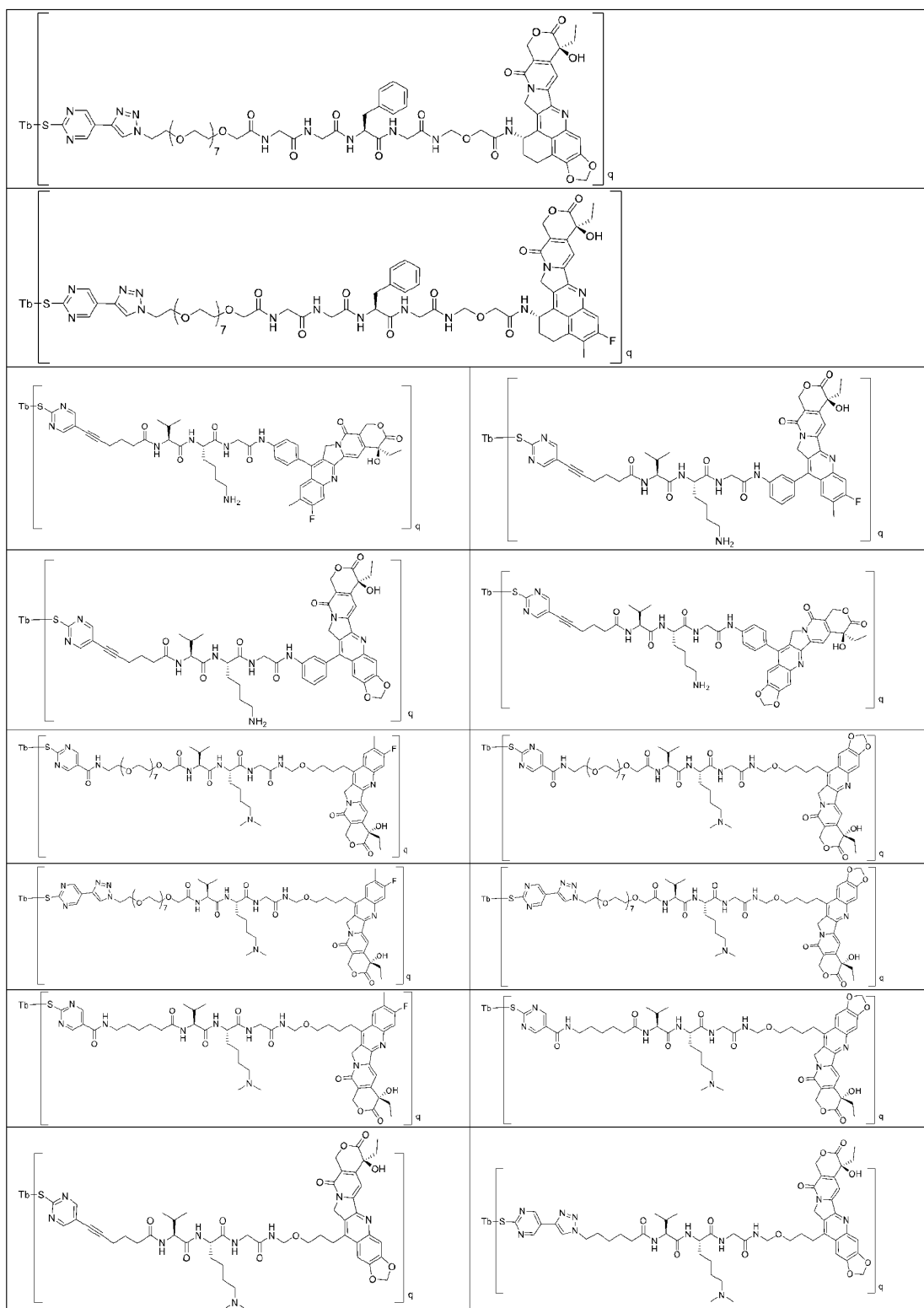


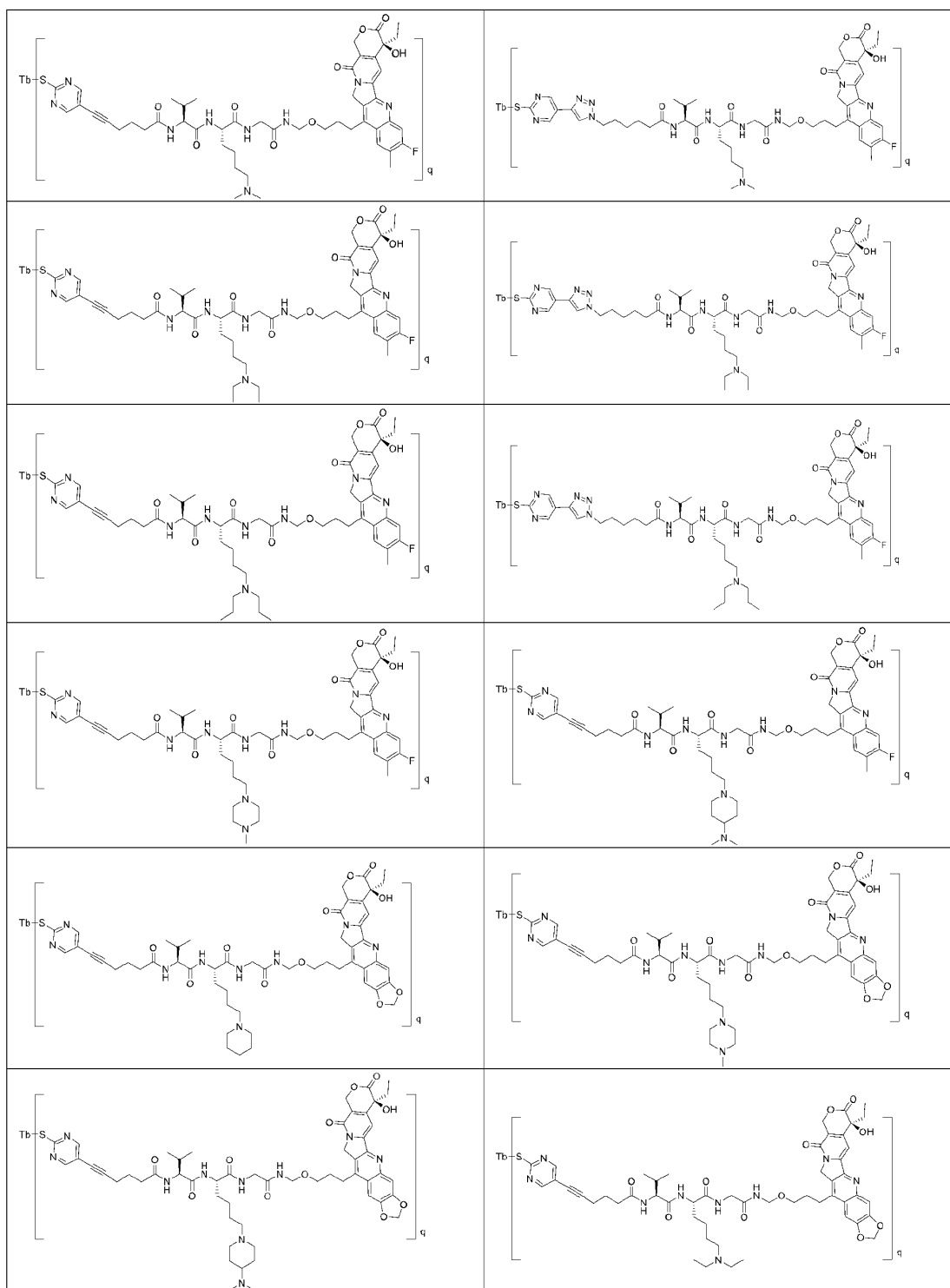


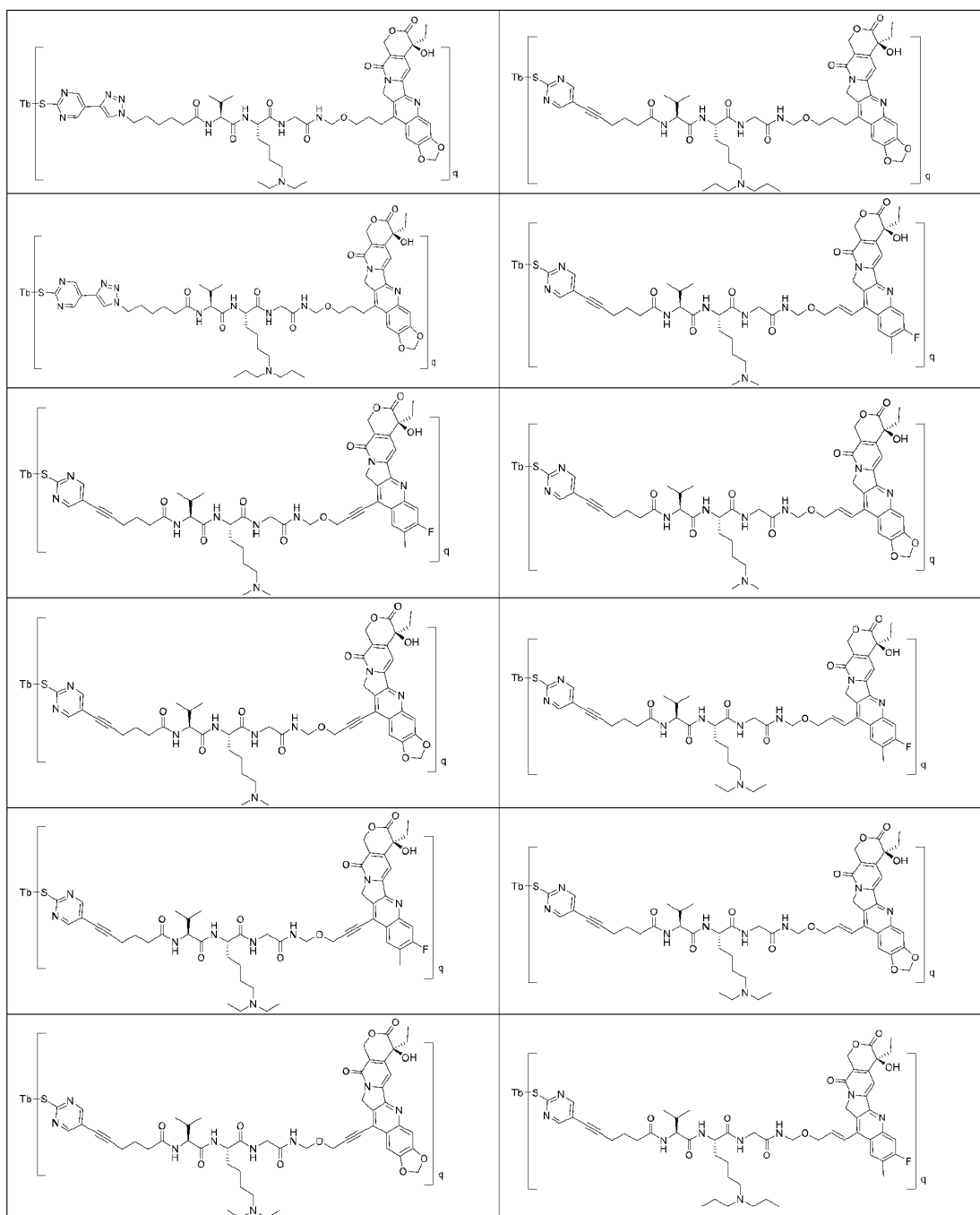


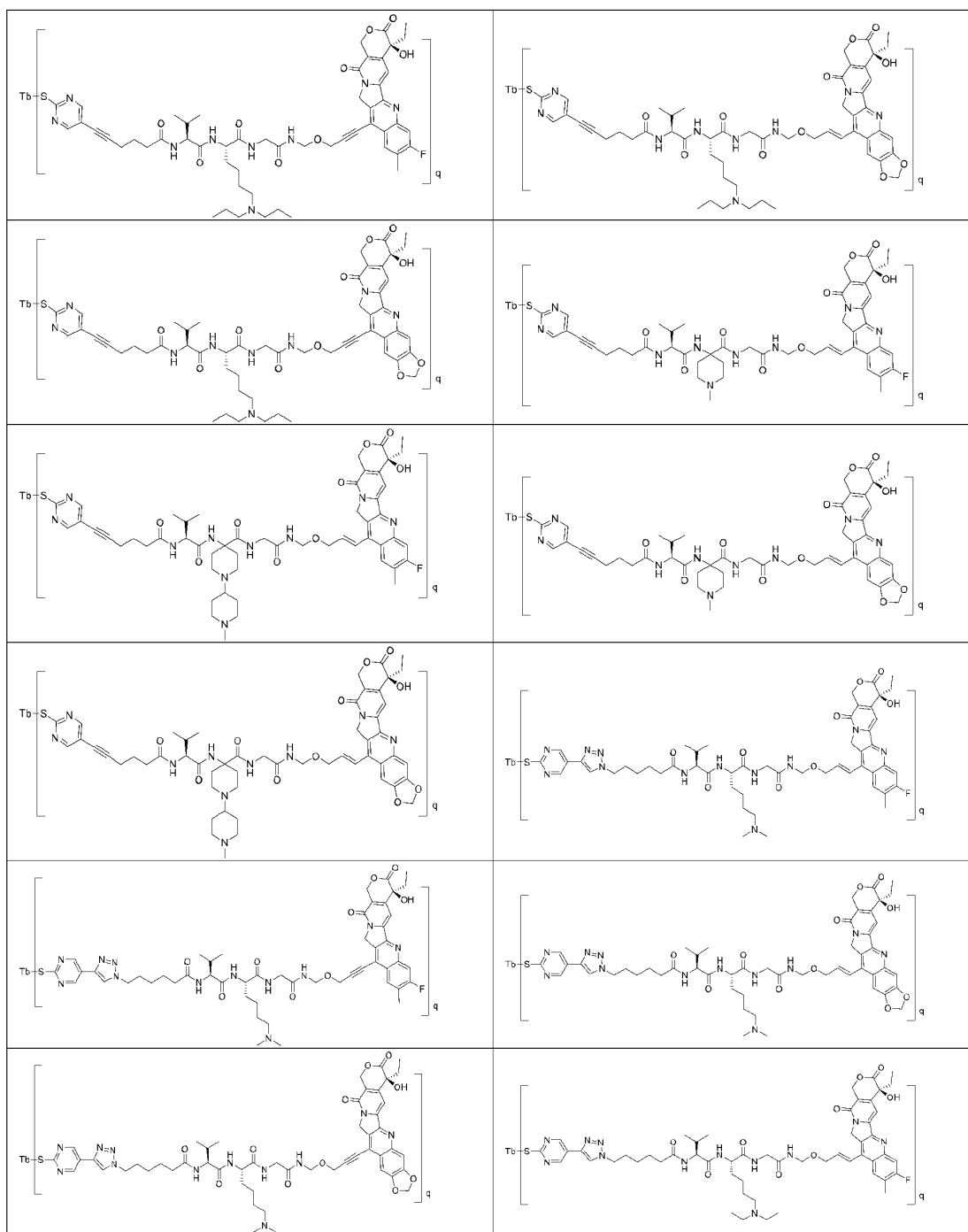


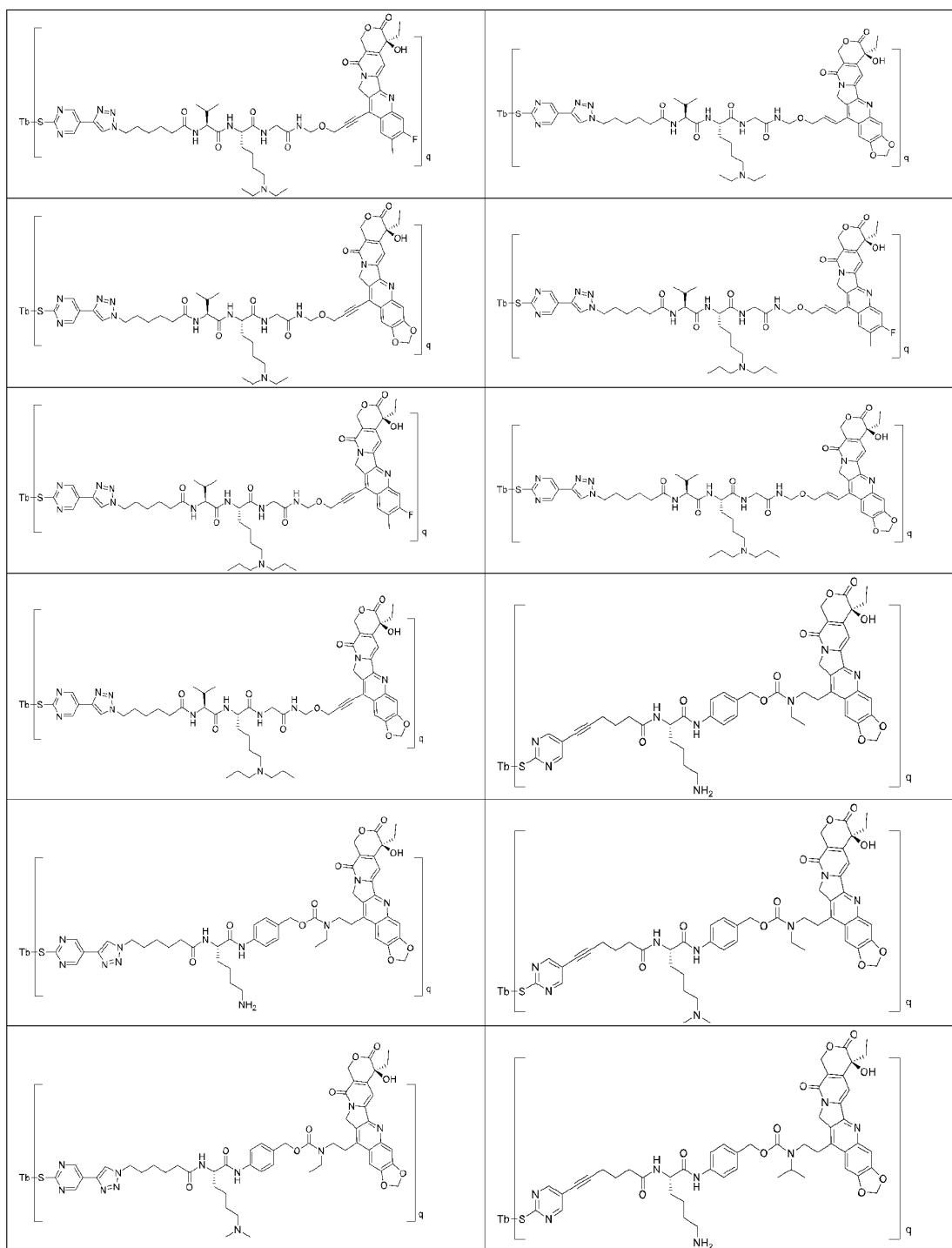


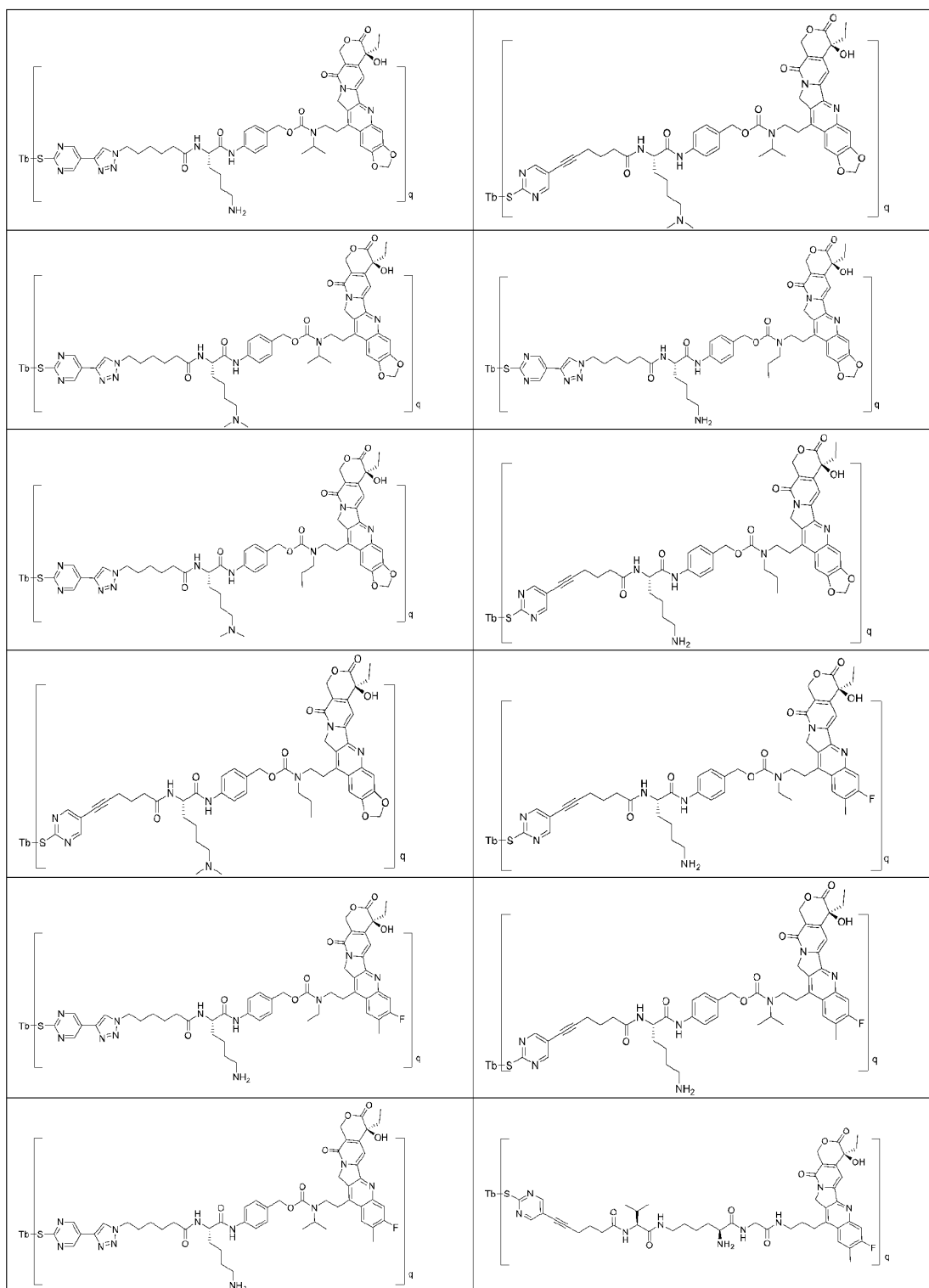


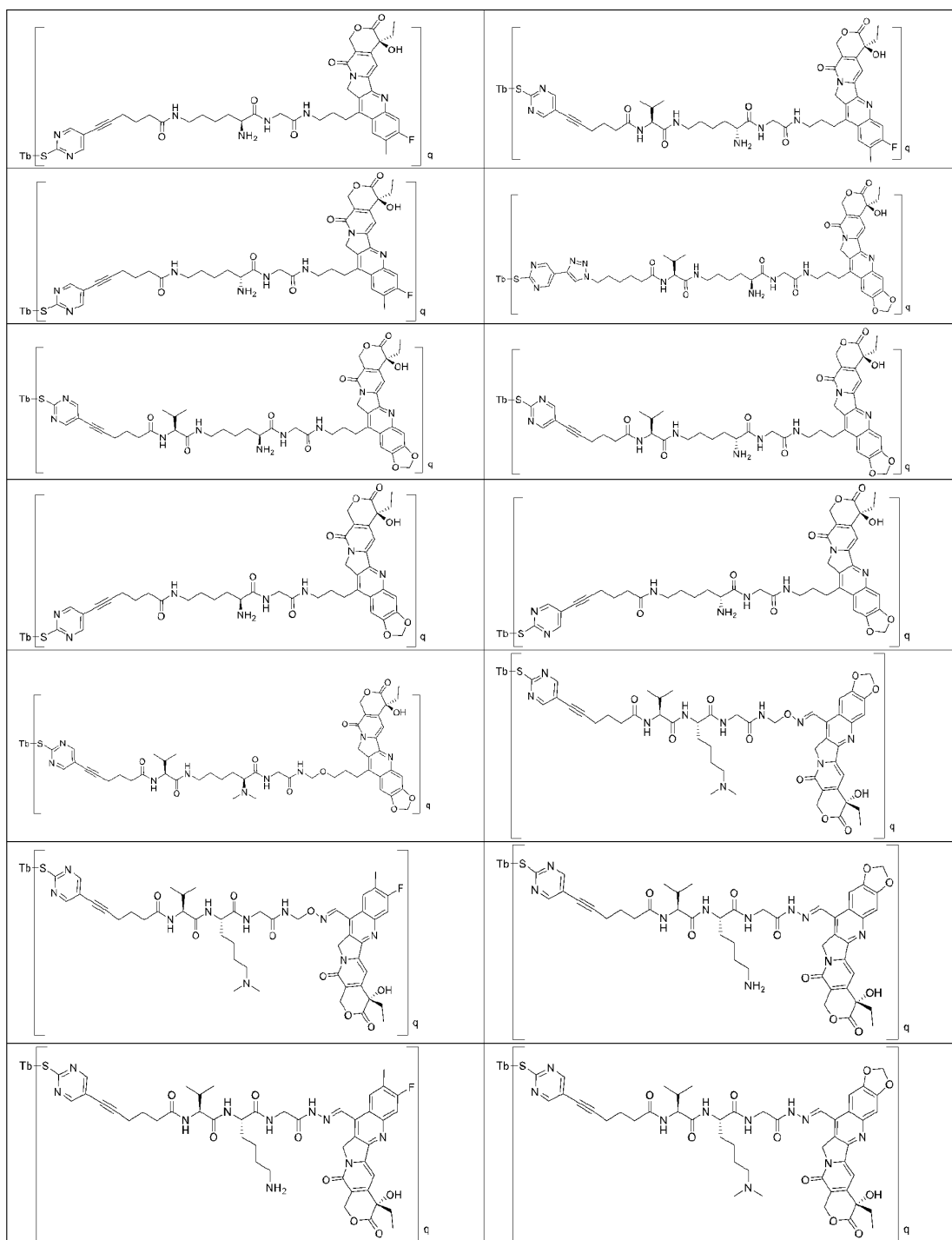


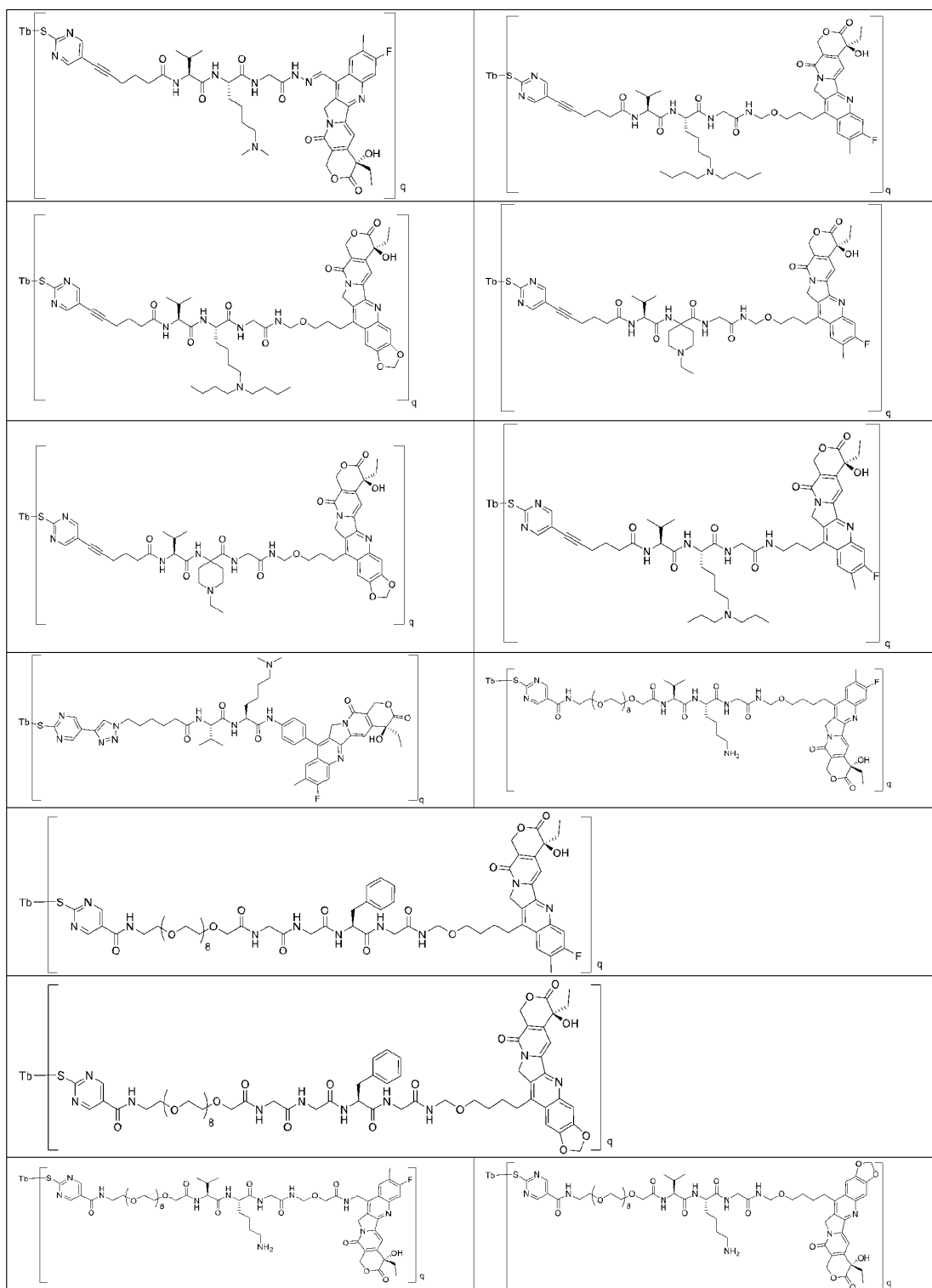


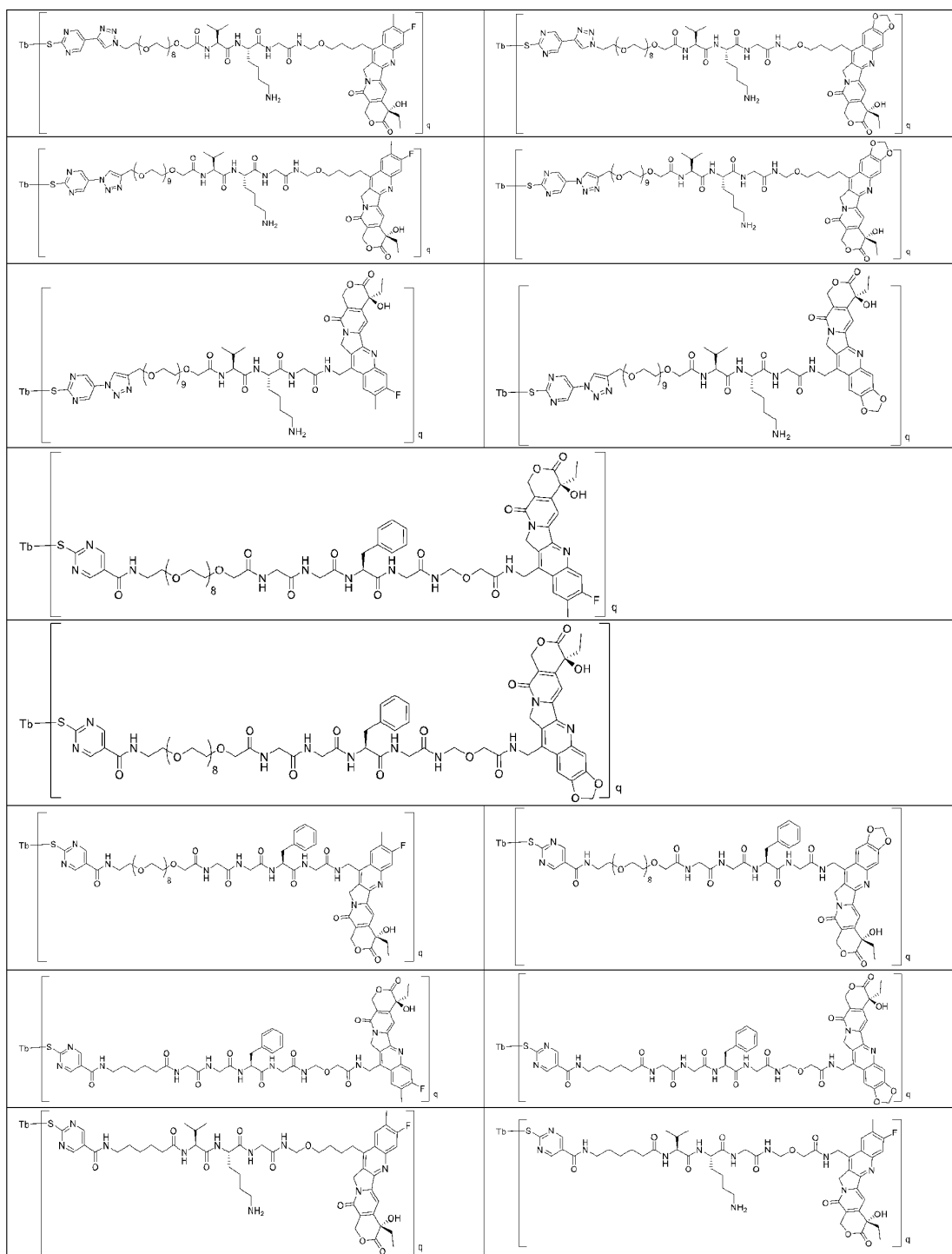


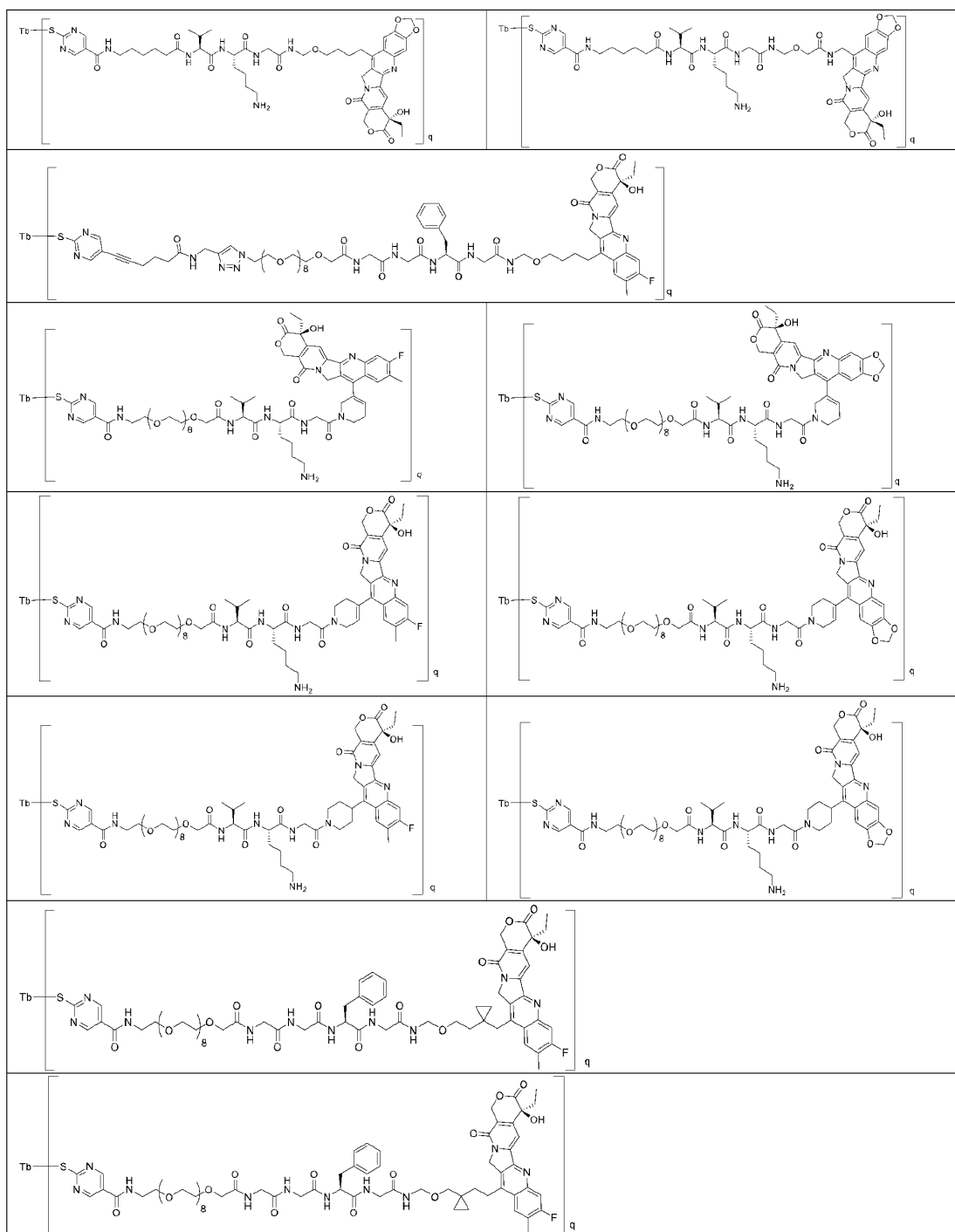


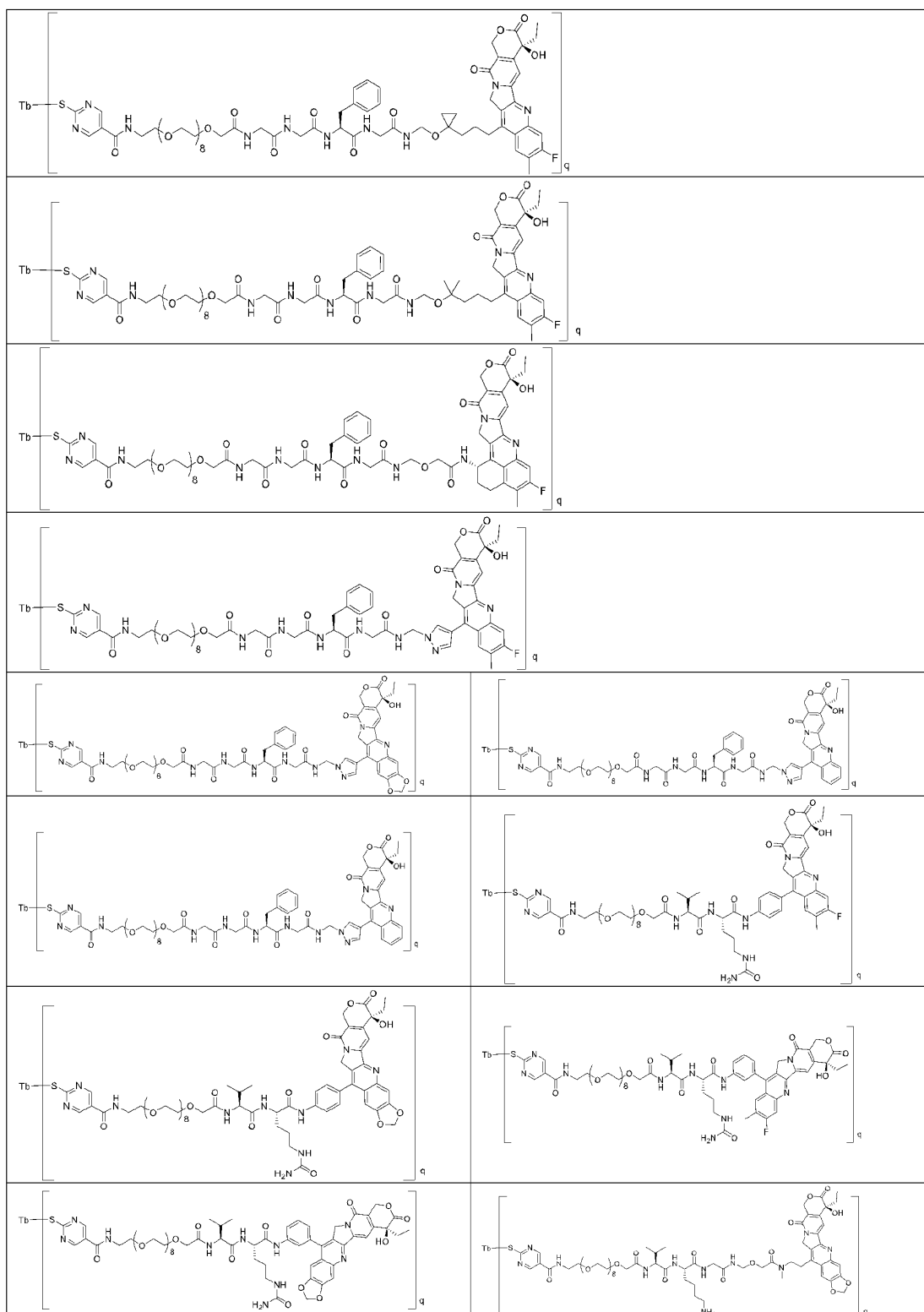


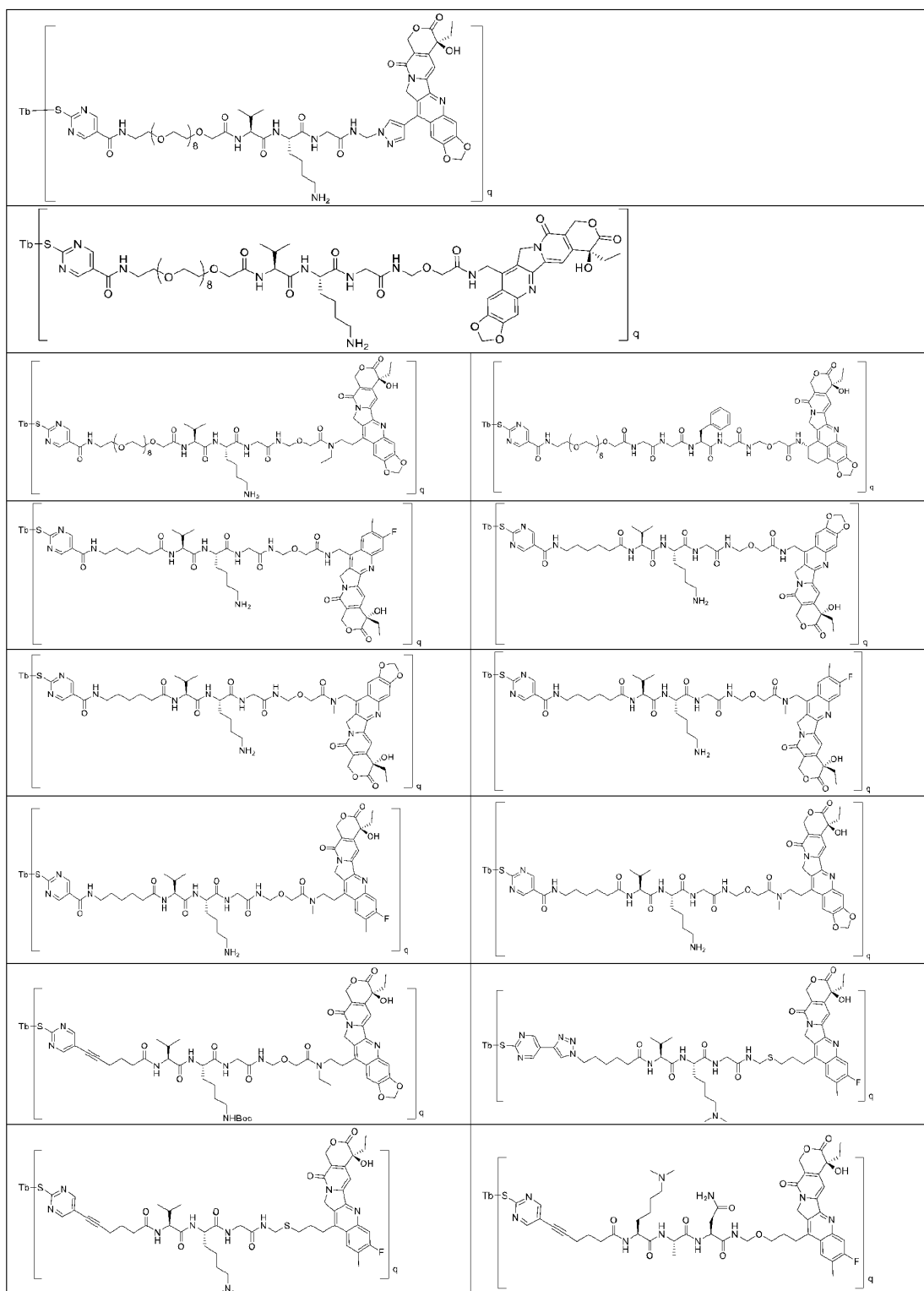












在一些实施方案中，Tb 为抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段。

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

在一些实施方案中，Tb 为具有内吞，没有内吞活性的或内吞较弱的抗 NaPi2b 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有内吞活性的抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为没有内吞活性的、或内吞活性弱的抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，抗 NaPi2b 抗体为非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、全人抗体。

在一些实施方案中，抗 NaPi2b 抗体为单克隆抗体，双特异性抗体或多特异性抗体。

在一些实施方案中，抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段为单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段选自：lifastuzumab 或其抗原结合片段，upifitamab 或其抗原结合片段，抗体 C1。

在一些优选地实施方案中，所述抗 NaPi2b 抗体选自：16G5B3、60A12B3、22H9C4、66C12D12 和 34F2A10 鼠源抗体，或它们的人源化的抗体。

在一些优选地实施方案中，其中所述抗 NaPi2b 抗体选自：60A12B3-hz1 抗体、22H9C4-hz1 抗体、66C12D12-hz1 抗体和 34F2A10-hz1 抗体。

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

在一些优选实施方案中，在所述的抗体-药物偶联物中，Tb 为第二方面所述的抗体 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段。

第二方面，本公开提供一种抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR）：

SEQ ID NO: 1、17、19、34、36、52、54、71、73、74 或 33 所示的重链可变区（VH）中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体、以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或

SEQ ID NO: 2、18、20、35、37、53、55、72、75 或 51 所示的轻链可变区（VL）中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体、以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 1 或 17 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 2 或 18 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 NaPi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 19 或 34 所示的 VH 中含

有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 20 或 35 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 36 或 52 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 37 或 53 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 54、71 或 73 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 55 或 72 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 74 或 33 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 75 或 51 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 17 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 18 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 34 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 35 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 53 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 71 或 73 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 72 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 33 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或 SEQ ID NO: 51 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

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

在某些优选实施方案中，所述的置换为保守置换。

在某些实施方案中，所述 CDR 根据 AbM、Chothia、Kabat 或 IMGT 编号系统定义。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含：重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL）。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 Kabat 编号系统定义：

(a) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO: 3 或与其相比具有一个或几个氨基

酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 4 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 6 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3：和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 7 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 9 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 10 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR3:

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

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 8 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 9 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 10 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR3;

(c) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH): 序列为 SEQ ID NO: 21 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 22 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 24 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 HCDR3; 和/或,

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 25 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 26 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 27 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 LCDR3;

(d) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH): 序列为 SEQ ID NO: 21 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 23 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 24 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列的 HCDR3; 和/或,

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 25 或与其相比具有一个或几个氨基酸的

酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 58 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 60 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO: 62 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 63 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；或

(i) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO: 56 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 59 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 60 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO: 62 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 63 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 Kabat 编号系统定义：

(a) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 3 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 4 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 7 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 9 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 10 的 LCDR3；

(b) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 3 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 5 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 8 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 9 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 10 的 LCDR3；

(c) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 21 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 22 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 24 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 25 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 26 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 27 的 LCDR3；

(d) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 21 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 23 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 24 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 25 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 26 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 27 的 LCDR3；

(e) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 38 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 39 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 41 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 42 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 44 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 45 的 LCDR3；

(f) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 38 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 40 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 41 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 43 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 44 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 45 的 LCDR3；

(g) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 56 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 57 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 60 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 61 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 63 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3；

(h) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 56 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 58 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 60 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 62 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 63 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3；或

(i) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 56 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 59 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 60 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 62 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 63 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)，其中 CDR 按 IMGT 编号系统定义：

(a) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 11 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 12 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 14 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 15 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 WAS 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 10 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 11 或与其相比具有一个或几个氨基

酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 77 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 78 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO: 79 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 HTS 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 16 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 IMGT 编号系统定义：

(a) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 11 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 12 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 14 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 15 的 LCDR1，序列为 WAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 10 的 LCDR3；

(b) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 11 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 13 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 14 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 15 的 LCDR1，序列为 WAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 10 的 LCDR3；

(c) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 28 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 29 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 31 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 32 的 LCDR1，序列为 YTS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 27 的 LCDR3；

(d) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 28 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 30 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 31 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 32 的 LCDR1，序列为 YTS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 27 的 LCDR3；

(e) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 46 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 47 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 49 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 50 的 LCDR1，序列为 SAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 45 的 LCDR3；

(f) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 46 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 48 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 49 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 50 的 LCDR1，序列为 SAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 45 的 LCDR3；

(g) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 65 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 66 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 68 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 69 的 LCDR1，序列为 WAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3；

(h) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 65 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 67 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 68 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 69 的 LCDR1，序列为 WAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3；

或

(i) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 76 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 77 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 78 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 79 的 LCDR1，序列为 HTS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 16 的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)，其中，与前述 Kabat 编号系统或 IMGT 编号系统定义的 CDR 相比，所述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) 中至少一个 CDR 含有突变，所述突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合），且仍具有结合 Napi2b 活性。

在某些优选地实施方案中，本公开所述的置换为保守置换。

在某些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段结合人 Napi2b、猴 Napi2b 和/或大鼠 Napi2b。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段的 VH 包含来源于人免疫球蛋白的重链可变区 (VH) 的构架区 (FR)，和/或所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含来源于人免疫球蛋白的轻链可变区 (VL) 的构架区 (FR)。因此，在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段是全人源的。在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含：

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

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

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段的人源化程度为至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列或由其组成：

(i) SEQ ID NO: 1、17、19、34、36、52、54、71、73、74 或 33 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 1、17、19、34、36、52、54、71、73、74 或 33 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID 1、17、19、34、36、52、54、71、73、74 或 33 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性的序列；

和/或

(b) 轻链可变区 (VL)，其包含选自下列的氨基酸序列或由其组成：

(iv) SEQ ID NO: 2、18、20、35、37、53、55、72、75 或 51 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 2、18、20、35、37、53、55、72、75 或 51 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO: 2、18、20、35、37、53、55、72、75 或 51 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性的序列。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 1 或 17 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO: 2 或 18 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 19 或 34 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO: 20 或 35 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 36 或 52 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO: 37 或 53 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 54、71 或 73 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO: 55 或 72 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 74 或 33 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO: 75 或 51 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含上述 5 个方案组中，任一组的 VH 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性的 VH；和/或，与该组 VL 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性的 VL；或者

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含上述 5 个方案组中，任一组的 VH 相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、

7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的 VH；和/或，与该组 VL 具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的 VL；在某些优选地实施方案中，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含：

- (a) SEQ ID NO: 1 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 2 所示序列的 VL；
- (b) SEQ ID NO: 17 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 18 所示序列的 VL；
- (c) SEQ ID NO: 19 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 20 所示序列的 VL；
- (d) SEQ ID NO: 34 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 35 所示序列的 VL；
- (e) SEQ ID NO: 36 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 37 所示序列的 VL；
- (f) SEQ ID NO: 52 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 53 所示序列的 VL；
- (g) SEQ ID NO: 54 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 55 所示序列的 VL；
- (h) SEQ ID NO: 71 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 72 所示序列的 VL；
- (i) SEQ ID NO: 73 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 72 所示序列的 VL；
- (j) SEQ ID NO: 74 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 75 所示序列的 VL；
- (k) SEQ ID NO: 33 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 51 所示序列的 VL；

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

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

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体是嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv 片段例如 scFv 或二硫键连接的 Fv(dsFv)、双抗体(diabody) 和多特异性抗体。在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体是 scFv。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区 (CH) 或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 50 个氨基酸的保守置换（例如至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段的轻链包含人免疫球蛋白的轻链恒定区 (CL) 或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 50 个氨基酸的保守置换（例如至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。

在一些实施方案中，恒定区被改变，例如被突变，以修饰抗 Napi2b 抗体分子的性质（例如改变下列中的一个或多个特性：Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基，产生功能改变，例如，改变抗体对效应子配体（如 FcR 或补体 C1q）的亲和力，从而改变效应子功能（例如降低）。抗体的 Fc 区介导几种重要的效应子功能，例如 ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC 等。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段具有重链恒定区（CH），其选自例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区；特别地选自例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区，更特别地选自 IgG1（例如是人 IgG1）的重链恒定区。在一些实施方案中，人 IgG1 重链恒定区如 SEQ ID NO: 70 所示。在一些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段具有轻链恒定区，其选自例如 κ 或 λ 轻链恒定区，优选 κ 轻链恒定区（例如人 κ 轻链恒定区）。在一些实施方案中，轻链恒定区具有如 SEQ ID NO: 80 所示的序列。

在一些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 或其变体，所述变体与 SEQ ID NO: 70 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换），或者与 SEQ ID NO: 70 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

在一些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含轻链恒定区或其变体。在一些实施方案中，所述轻链恒定区包含 κ 轻链恒定区。在一些实施方案中，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 80 所示的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与 SEQ ID NO: 80 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换），或者与 SEQ ID NO: 80 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

在一些实施方案中，所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 70 所示的重链恒定区（CH）和 SEQ ID NO: 80 所示的轻链恒定区（CL）。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链，其包含选自下列的氨基酸序列或由其组成：

(i) 包含 SEQ ID NO: 71 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 序列的序列；

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

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

(b) 轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO: 72 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 序列的序列;

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

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

在某些实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中, 本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链, 其包含选自下列的氨基酸序列或由其组成:

(i) 包含 SEQ ID NO: 73 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 序列的序列;

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

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

(b) 轻链, 其包含选自下列的氨基酸序列或由其组成:

(iv) 包含 SEQ ID NO: 72 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 序列的序列;

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

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

在某些实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中, 本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链, 其包含选自下列的氨基酸序列或由其组成:

(i) 包含 SEQ ID NO: 17 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 序列的序列;

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

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

(b) 轻链，其包含选自下列的氨基酸序列或由其组成：

(iv) 包含 SEQ ID NO: 18 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 序列的序列；

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

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

在某些实施方案中，(ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，

所述重链包含或由下述序列组成：

(i) SEQ ID NO: 81 所示的序列；

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

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

所述轻链包含或由下述序列组成：

(iv) SEQ ID NO: 82 所示的序列；

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

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

在某些优选地实施方案中，(ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，

所述重链包含或由下述序列组成：

(i) SEQ ID NO: 83 所示的序列；

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

(iii) 与 (i) 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少

94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述轻链包含或由下述序列组成：

(iv) SEQ ID NO: 84 所示的序列；

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

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

在某些优选地实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体包含选自以下组的重链和轻链：

(a) 包括 SEQ ID NO: 71 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 的重链，和，包括 SEQ ID NO: 72 所示的 VL 和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 的轻链；

(b) 包括 SEQ ID NO: 73 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 的重链，和，包括 SEQ ID NO: 72 所示的 VL 和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 的轻链；优选包括 SEQ ID NO: 81 所示的重链和 SEQ ID NO: 82 所示的轻链；

(c) 包括 SEQ ID NO: 17 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 的重链，和，包括 SEQ ID NO: 18 所示的 VL 和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 的轻链。优选包括 SEQ ID NO: 83 所示的重链和 SEQ ID NO: 84 所示的轻链；

在某些实施方案中，本公开提供的抗体是一种多特异性抗体，其结合 Napi2b 以及一种或多种其他抗原。在某些优选地实施方案中，所述多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体或四特异性抗体。在一些实施方案中，本公开的多特异性抗体包含上述所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，和另外的抗体或其片段或抗体类似物。

本公开抗体衍生物

本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段可进行衍生化，例如被连接至另一个分子（例如另一个多肽或蛋白）。通常，抗体或其抗原结合片段的衍生化（例如，标记）不会对其与 Napi2b 的结合产生不利影响。因此，本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。例如，可以将本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段连接（通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其他方式）于一个或多个其它分子基团，例如另一个抗体（例如，形成双特异性抗体），检测试剂，药用试剂，和/或能够介导抗体或其抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽（例如，抗生物素蛋白或多组氨酸标签）。

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

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

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

抗体的制备

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

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

第三方面，本公开提供一种分离的核酸分子，其包含编码本公开的第二方面抗体或其抗原结合片段、或其重链可变区和/或轻链可变区、或其一个或多个 CDR 的核苷酸序列；在某些实施方案中，所述核苷酸序列是可以根据密码子简并性进行替换的。在某些实施方案中，所述核苷酸序列是密码子最优化的。

在某些实施方案中，本公开所述分离的核酸分子包含：(i) 分别编码本公开的第二方面的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区的第一核酸和第二核酸，或 (ii) 分别编码本公开的第二方面

的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和重链恒定区的第一核酸，和轻链可变区和轻链恒定区的第二核酸，或 (iii) 分别编码本公开的第二方面的抗体或其抗原结合片段的重链和轻链的第一核酸和第二核酸。在某些实施方案中，所述第一核酸和第二核酸包含与上述 (i) - (iii) 中任一第一核酸和第二核酸的简并序列或基本上相同序列的核酸。在某些实施方案中，所述简并序列或基本上相同序列指与 (i) - (iii) 中所述核酸分子相比具有至少大约 85%、90%、95%、99% 或更高序列同一性的序列或具有一个或多个核苷酸取代的序列，或相差不超过 3、6、15、30 或 45 个核苷酸的序列。

第四方面，提供了一种载体（例如克隆载体或表达载体），其包含本公开第三方面的分离的核酸分子。在某些实施方案中，本公开的载体是克隆载体或表达载体。在某些实施方案中，本公开的载体是例如质粒，粘粒，噬菌体，慢病毒等。在某些实施方案中，所述载体能够在受试者（例如哺乳动物，例如人）体内表达本公开的抗体或其抗原结合片段。

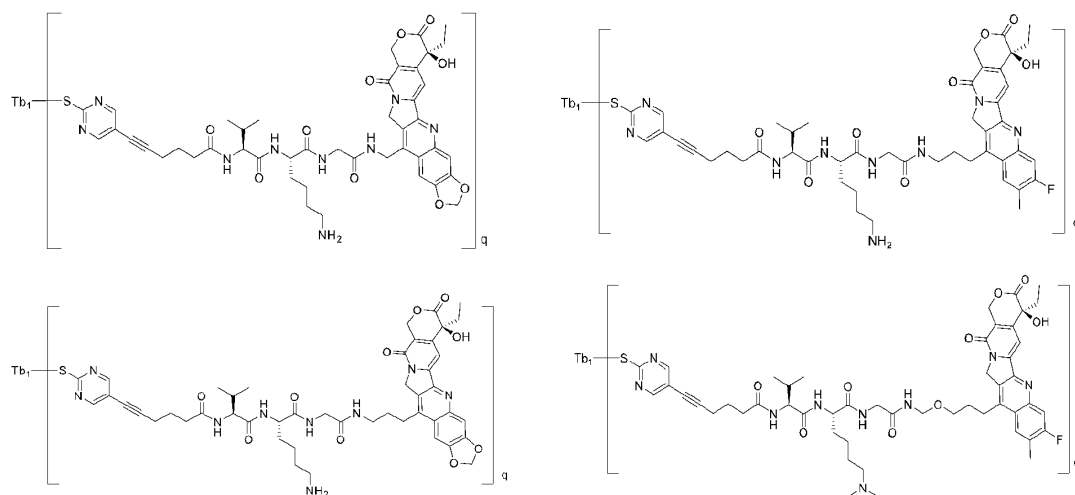
第五方面，提供了一种宿主细胞，其包含本公开第三方面的分离的核酸分子或本公开的第四方面载体。宿主细胞可以是真核细胞（例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞）或原核细胞（例如大肠杆菌）。合适的真核细胞包括但不限于 NS0 细胞、SP2/0 细胞、Vero 细胞、Hela 细胞、COS 细胞、CHO 细胞、HEK293 细胞、BHK 细胞、和 MDCKII 细胞。适宜的昆虫细胞包括但不限于 Sf9 细胞。在某些实施方案中，本公开的宿主细胞是哺乳动物细胞，例如 CHO（例如 CHO-K1、CHO-S、CHO DXB11、CHO DG44）。

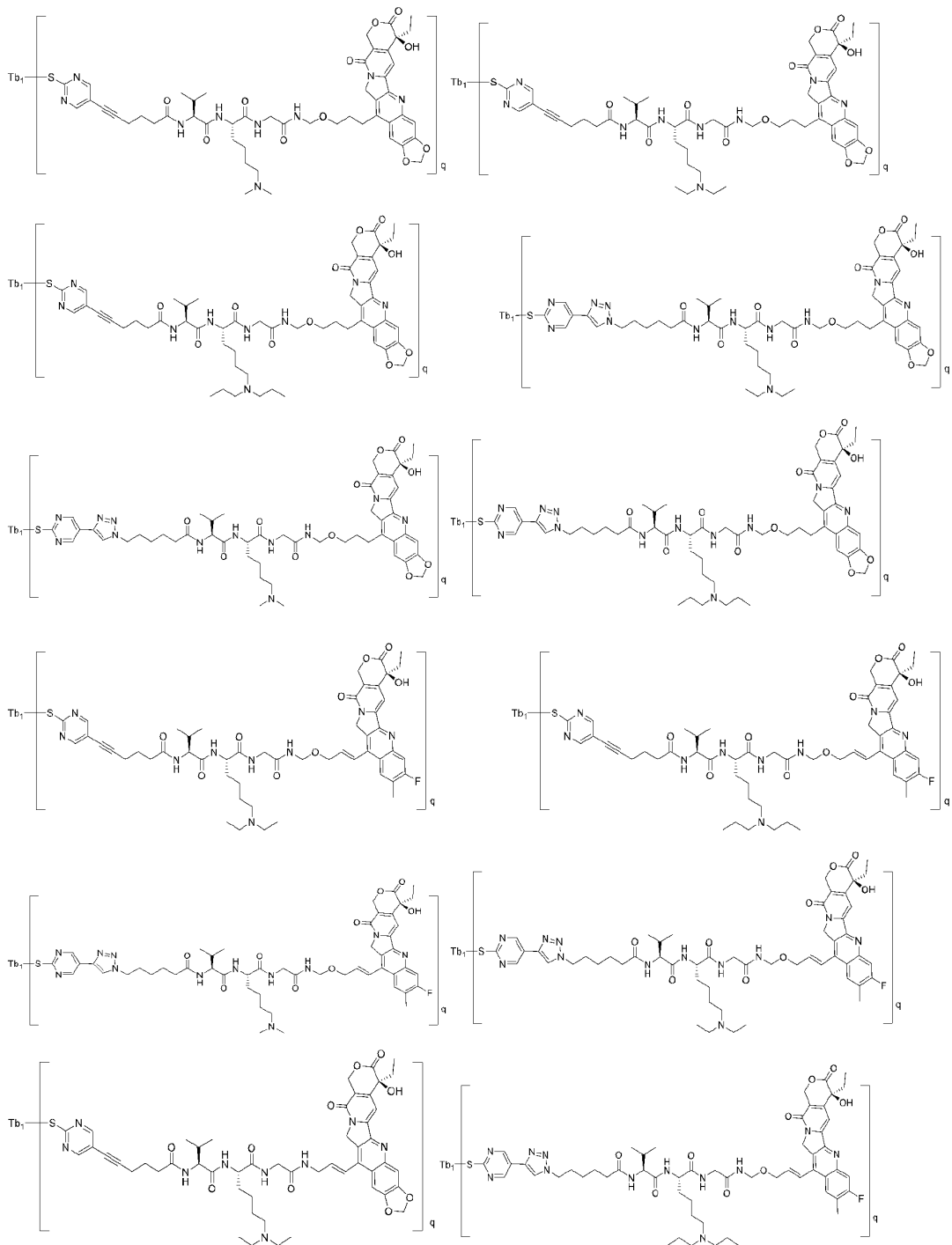
第六方面，提供了制备本公开的第二方面抗体或其抗原结合片段，或本公开的多特异性抗体的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段、或所述多特异性抗体表达的条件下，培养本公开的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

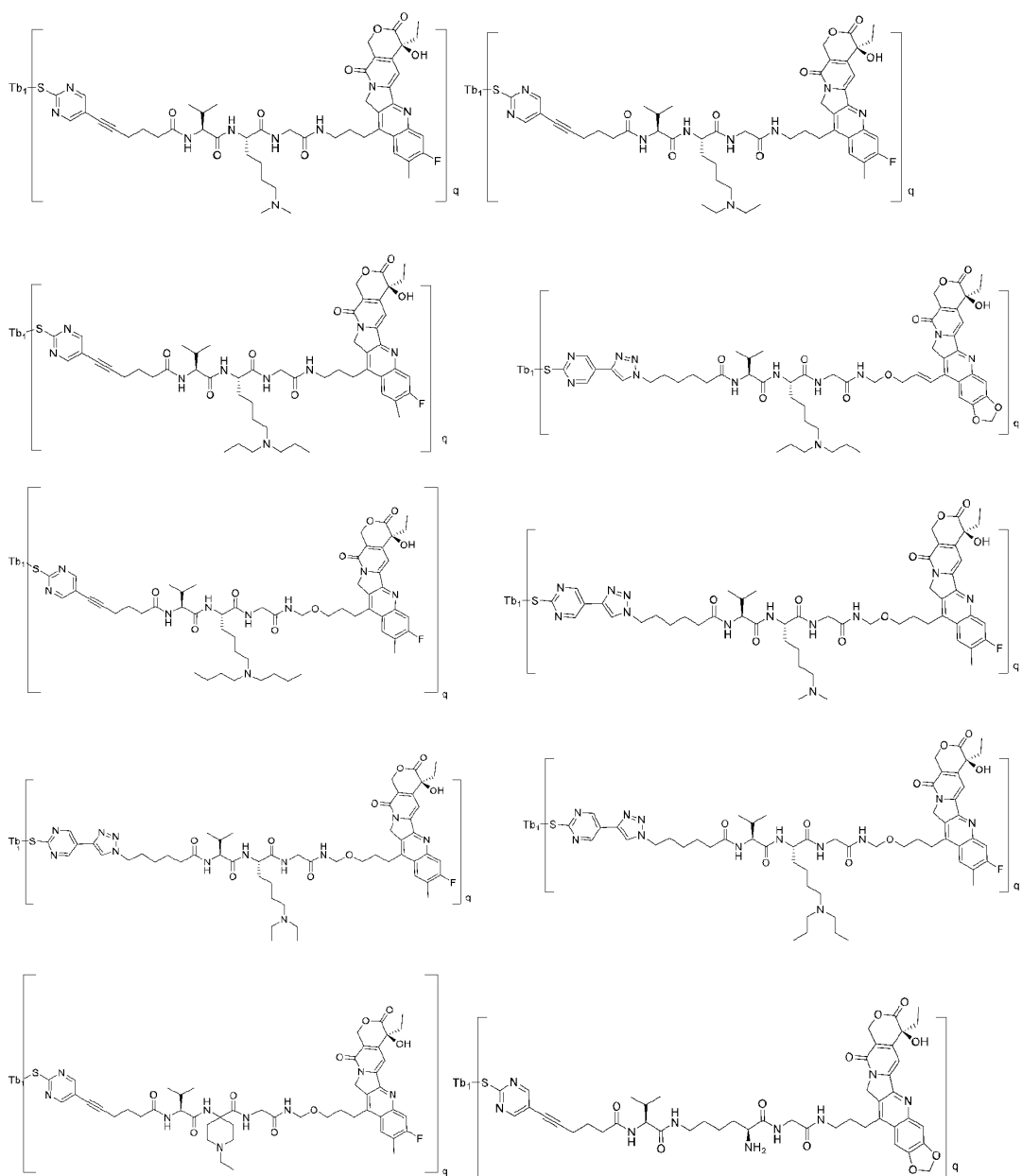
抗体-药物偶联物

第七方面，提供一种抗 Napi2b 抗体-药物偶联物、其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其中抗体为上述结合 Napi2b 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物选自：







其中,

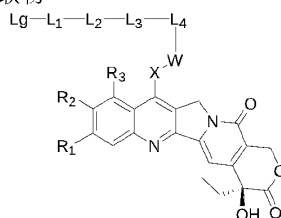
Tb₁ 为抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段, 例如: lifastuzumab, upifitamab, 60A12B3-hz1、22H9C4-hz1、66C12D12-hz1、34F2A10-hz1、C1, 16G5B3-hz2 和 16G5B3-hz1 抗体。

q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值, 优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中, q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中, q 为 2、4、6 或 8。

抗体-药物偶联物制备

在本公开的第八方面，本公开提供了制备前述抗体药物偶联物的方法，其包括：

将 Tb 与式 III 所示的药物连接体偶联物



式 III

在合适的溶剂和条件下进行偶联反应；

其中：

Tb 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义；

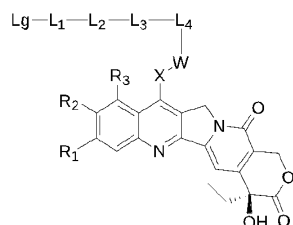
R₁、R₂、R₃、X、W、L₁、L₂、L₃、L₄ 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

Lg 为离去基团，Lg 选自卤素、砷基、三级胺盐基（Me₃N⁺、Et₃N⁺）、重氮盐基、-OMs、MeSO₂-、CF₃SO₃-。

在一些实施方案中，Lg 选自 F、Cl、MeSO₂-。

在一些实施方案中，Lg 选自 F、MeSO₂-。

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



在合适的溶剂和条件下进行偶联反应形成 C-S 键的步骤。

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

在一些实施方案中，所述偶联反应在水和/或有机溶剂中进行。

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

在一些实施方案中，所述方法进一步包括将偶联产物进行纯化的步骤。

在一些实施方案中，通过层析方法对所述偶联产物进行纯化。

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

在本公开的第九方面，本公开提供了一种抗体药物偶联物的群，其包含本公开上前述的抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其中所述的抗体药物偶联物具有一种，两种或多种 q 值。

在一些实施方案中，当所述群中的的抗体药物偶联物具有一种 q 值时， q 值和 DAR 值相等。

在一些实施方案中，当所述群中的的抗体药物偶联物具有两种或多种 q 值时，其中一个特定 q 值的抗体药物偶联物中占群中所有抗体药物偶联物的比例大于 50%，60%，70%，80%，90%，95%，96%，97%，98%，99%。

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

在一些实施方案中，所述群的药物与抗体的比例（DAR）选自 1.5-2.5、3.5-4.5、5.5-6.5 和 7.5-8.5；

在一些实施方案中，所述群的药物与抗体的比例（DAR）选自约 2.0、4.0、6.0 和 8.0；

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

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

在本公开的第十方面，本公开提供了一种药物组合物，其包含上述第一方面或第七方面抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，第二方面抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，第三方面所述核酸，第四方面所述载体，第五方面所述宿主细胞，或者第九方面的抗体药物偶联物群，以及任选的一种或多种药用辅料。

在某些实施方案中，所述药物组合物包含的上述第一方面或第七方面抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，第二方面抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，第三方面所述核酸，第四方面所述载体，第五方面所述宿主细胞，或者第九方面的抗体药物偶联物群的剂量均为治疗有效量的。

在某些实施方案中，所述药物组合物包含的上述第一方面或第七方面抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，本公开的药物组合物包含第九方面的抗体药物偶联物群，及药学上可接受的载体和/或赋形剂。在某些优选地实施方案中，本公开的药物组合物包含上述抗体药物偶联物群，或包含抗体药物偶联物群和缓冲剂。在某些进一步优选地实施方案中，本公开的药物组合物还包括赋形剂和/或表面活性剂。

在某些实施方案中，本公开的药物组合物包含本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。在某些优选的实施方案中，本公开的药物组合物包含抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，和缓冲剂。在某些进一步优选的实施方案中，本公开的药物组合物还包括赋形剂和/或表面活性剂。

在一些实施方案中，所述缓冲剂为组氨酸缓冲液。在某些优选的实施方案中，所述缓冲剂为 pH 为 6.0 的 20mM 组氨酸缓冲液。

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

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

在一些实施方案中，所述药物组合物中药物与抗体的比例（DAR）选自 1-10 中的整数或小数。

在一些实施方案中，所述药物组合物中药物与抗体的比例（DAR）选自 1.5-2.5、3.5-4.5、5.5-6.5 和 7.5-8.5；

在一些实施方案中，所述药物组合物中药物与抗体的比例（DAR）选自约 2.0、4.0、6.0 和 8.0；

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

在第十一方面，提供了本公开的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 Napi2b 在样品中的存在或其水平。在另一个方面，本公开提供了诊断性或治疗性试剂盒，其包括一个或多个以下物质：本公开所述的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体、抗体药物偶联物，抗体药物偶联物群或者药物组合物。可选地，所述诊断性或治疗性试剂盒还包括使用说明书。

在本公开的第十二方面，本公开提供了前述的抗体药物偶联物组合物或者前述的药物组合物在制备治疗和/或预防与细胞活动异常相关的疾病（例如癌症疾病）的药物中的用途。所述的抗体药物偶联物组合物或者前述的药物组合物可为治疗有效量的。

在一些实施例中，提供本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞，或者多特异性抗体在制备药物中的用途，所述药物用于调整（抑制或阻断）Napi2b 的活性。

在一些实施例中，提供本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞，或者多特异性抗体在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防与 Napi2b 的活性有关的疾病。

在一些实施例中，提供本公开的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物偶联物，或者多特异性抗体在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防与 Napi2b 的活性有关的肿瘤。

在一些实施例中，提供本公开的上述第一方面或第七方面抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、

其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，第二方面抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，第三方面所述核酸，第四方面所述载体，第五方面所述宿主细胞，第九方面的抗体药物偶联物群，或第十方面的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防肿瘤。

在一些实施例中，提供本公开的上述第一方面或第七方面抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，第九方面的抗体药物偶联物群，或第十方面的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防与 Tb 的靶点相关的肿瘤。

在一些实施例中，提供本公开的上述第一方面或第七方面抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，第九方面的抗体药物偶联物群，或第十方面的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防与 NaPi2b 相关的肿瘤。

在一些优选地实施例中，提供本公开的上述第一方面或第七方面抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，第二方面抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，第三方面所述核酸，第四方面所述载体，第五方面所述宿主细胞，第九方面的抗体药物偶联物群，第十方面的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防与 Napi2b 相关的肿瘤。

在本公开的第十三方面，本公开提供了一种将上述第一方面或第七方面抗体药物偶联物，其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，第二方面抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段，第三方面所述核酸，第四方面所述载体，第五方面所述宿主细胞，第九方面的抗体药物偶联物群，或第十方面的药物组合物，用于治疗或预防与细胞活动异常相关的疾病（例如肿瘤）的方法。

在上述第十二和十三方面的中，所述肿瘤选自食管癌（例如食管腺癌和食管鳞状细胞癌）、脑瘤、肺癌（例如小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌或肺腺癌）、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌（例如人结肠腺癌）、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤（例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲状腺癌。

在一些实施方案中，所述肿瘤与 NaPi2b 相关的肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为与 Napi2b 相关的肿瘤。

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

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

如本文所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如 Remington's Pharmaceutical

Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), 并且包括但不限于: pH 调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂, 稀释剂, 维持渗透压的试剂, 延迟吸收的试剂, 防腐剂。

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

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

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

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

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

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

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

本公开中, 术语“生物活性物”、“生物活性分子”或“药物分子”指抑制或防止细胞的功能和/或

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

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

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

本公开中，抗体或其抗原结合片段包括衍生化的抗体或其抗原结合片段，例如具有巯基的抗体或其抗原结合片段，其中所述衍生化使得抗体具有与药物连接体偶联物反应的基团或能力。所述巯基-SH 可以打开二硫键（例如，通过还原剂 TCEP 还原）衍生获得。

本文中使用的术语“癌症”和“肿瘤”以相同的含义使用。

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

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

本文中使用的术语“多肽”和“蛋白”无区别地使用。

本文中使用的术语“细胞”也包括动物个体内的细胞和培养的细胞。

本公开中所述的抗 Napi2b 抗体中涉及的 Napi2b 可为本领域常规的 Napi2b，当然还表示 Napi2b 变体。

术语“NaPi2b”，NaPi2b 由 SLC34A2 基因编码，由 690 个氨基酸组成，结构上 8 次跨膜，存在 4 个胞外环。钠离子依赖性磷酸转运蛋白 2B (NaPi2b) 通过选择性转运二价 Pi (HPO_4^{2-}) 以维持体内 Pi 内稳态。人 NaPi2b 与大鼠同源率为 85.3%，与食蟹猴同源率为 95.8%。NaPi2b 与该家族 NaPi2a/2c 氨基酸序列相似度高（和 NaPi2a 同源率为 51.29%，和 NaPi2c 同源率为 44.64%），特别在跨膜区同源率 > 80%。

KD 指获得自 K_d (具体结合分子-靶蛋白相互作用的解离速率) 与 K_a (具体结合分子-靶蛋白相互作用的结合速率) 之比 (或 K_d/K_a ，以摩尔浓度 (M) 表示) 的解离常数。可使用本领域充分建立的方法测定 KD 值。

测定结合分子的 KD 的优选方法是通过使用表面等离子共振, 例如生物传感器系统, 如 Biacore™ (GE Healthcare Life Sciences) 系统。

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

术语“表位”是指在动物体优选哺乳动物体内具有抗原性或免疫原性活性的抗原多肽或蛋白的一部分。本公开的抗体或其抗原结合片段的表位可以通过现有技术测定, 例如合成肽法, 免疫信息学预测, 多肽活性的测定, 表位肽扫描法, 噬菌体展示技术, X 射线衍射和核磁共振分析, 抗体同源建模蛋白对接预测法。本文中使用的短语“结合相同表位的抗体”表示, 结合共同表位的不同抗体。如果 第二抗体结合第一抗体所结合的部分肽或部分三级结构, 那么可以确定, 所述第一抗体和 所述第二抗体结合相同表位。

本公开中, 术语“抗体”取其最广义的解释, 包括完整的单克隆抗体、多克隆抗体以及由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体), 只要它们具有所需的生物学活性。在本公开中, “抗体”和“免疫球蛋白”可以互换使用。如本文所述的“抗体分子”或“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分, 即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。因此, 术语抗体广义上不仅涵盖完整抗体分子, 还包括所述抗体的片段以及所述抗体和抗体片段的变体(包括衍生物)。当“抗体分子”或“抗体”与抗原结合片段在同一语境下使用时, “抗体分子”或“抗体”指完整抗体分子或全长抗体。在本说明书中所述术语抗体分子例如包括但不限于单链 Fv(scFv), Fab 片段, Fab' 片段, F(ab')₂, 二硫键连接的 Fv(sdFv), Fv, 及完整抗体或全长抗体。术语“单链 Fv”或“scFv”是指一种多肽, 其包含与抗体 VH 结构域连接的抗体的 VL 结构域。例如免疫特异性结合 Napi2b 的抗体可以与其它抗原发生交叉反应。优选地, 免疫特异性结合 Napi2b 的抗体与其它抗原不发生交叉反应。免疫特异性结合可以例如通过免疫测定或其它本领域技术人员已知的方法鉴别。“完整”抗体或“全长”抗体指包含两条重链(H)和两条轻链(L)的蛋白, 所述重链和轻链通过二硫键相互连接, 所述蛋白包含: (1)就重链而言, 包含可变区(本文缩写为“VH”)和含有三个结构域 CH1、CH2、CH3 的重链恒定区; 和(2)就轻链而言, 包含轻链可变区(本文缩写为“VL”)和含有一个结构域 CL 的轻链恒定区。本公开的抗体包括但不限于单克隆, 多特异性, 人或嵌合抗体, 单链抗体, Fab 片段, F(ab')₂ 片段, 抗独特型(抗-Id)抗体(包括例如本公开抗体的抗-Id 抗体), 和上述任何抗体的表位结合片段。本公开的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白的任何类型(例如 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 和 IgY), 类别(例如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 和 IgA2)或亚类。优选地, 本公开的抗体包含或由具有序列及其具体信息表所述任一氨基酸序列或其片段或变体的 VH 结构域, VH CDR (本文中多用 HCDR 表示), VL 结构域, 或 VL CDR (本文中多用 LCDR

表示)组成。

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

在本公开的部分实施方案中,单克隆抗体还特别包括嵌合抗体,即重链和/或轻链的一部分与某种、某类或某亚类抗体相同或同源,其余部分则与另一种、另一类或另一亚类抗体相同或同源,只要它们具有所需的生物学活性(参见例如 US 4,816,567;和 Morrison 等人,1984,PNAS, 81: 6851-6855)。可用于本公开的嵌合抗体包括灵长类化(primatized)抗体,其包含来自非人灵长类(例如古猴、猩猩等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列。

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

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

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

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

术语“双特异性抗体”亦称为“双功能抗体偶联物”,是指由第一抗体(片段)和第二抗体(片段)通

过偶联臂所形成的偶联物，该偶联物保留了各自抗体的活性，故具有双功能和双特异性。

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

术语“完整抗体”或“全长抗体”指包含抗原结合可变区和轻链恒定区(CL)、重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的抗体。恒定区可以是天然序列(例如人天然恒定区序列)或其氨基酸序列变体。完整抗体优选是具有一种或多种效应功能的完整抗体。

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

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

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

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

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

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

作为氨基酸取代，在本说明书中，保守的氨基酸取代是优选的。保守的氨基酸取代表示，在与氨基酸侧链有关的氨基酸集合内发生的取代。优选的氨基酸集合如下：酸性集合(天冬氨酸和谷氨酸)；碱性集合(赖氨酸、精氨酸和组氨酸)；非极性集合(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸

酸、蛋氨酸和色氨酸)；和不带电荷的极性家族(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)。更优选的氨基酸集合如下：脂族 羟基(丝氨酸和苏氨酸)；含有酰胺的集合(天冬酰胺和谷氨酰胺)；脂族集合(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)；和芳族集合(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)。这样的氨基酸取代优选地在不会损害具有原始氨基酸序列的物质的性能的集合内进行。

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

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

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

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

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

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

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

术语“抗体药物偶联物群”是指一组或一群本发明的抗体-药物偶联物、其立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐、其互变异构体、或其药学上可接受的溶剂合物组成的混合物，其中抗体药物偶联物

的 q 可以相同或不同。另外，也可将其称为“抗体药物偶联物混合物”。

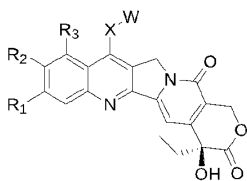
使用实验动物可以确定抗体和抗体-药物偶联物对癌症的体内治疗效果，例如，将抗体施用给植入了表达 Napi2b 的肿瘤细胞系的裸鼠，并测量癌细胞的任何变化。

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

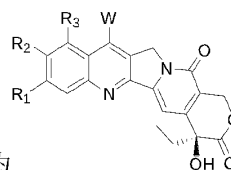
本公开所用的单克隆抗体可以由许多方法生产。例如，用于本公开的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法，使用许多物种(包括小鼠、仓鼠、大鼠和人的细胞)获得(参见例如 Kohler 等人，1975，Nature，256: 495)，或者通过重组 DNA 技术制得(参见例如 US 4,816,567)，或者从噬菌体抗体库中分离得到(参见例如 Clackson 等人，1991，Nature，352: 624-628；和 Marks 等人，1991，Journal of Molecular Biology，222: 581-597)。

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

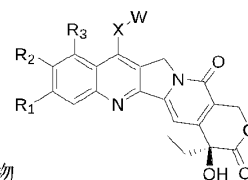
本文中，术语“直接键”表示其两侧的基团直接相连，例如，式 II 所示的化合物



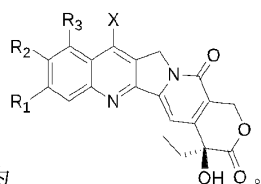
中，若 X 为直接键，则其结构式为



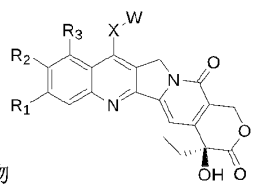
。其余直接键可参照前述内容进行理解。



本文中，术语“不存在”表示该基团不存在，例如，式 II 所示的化合物



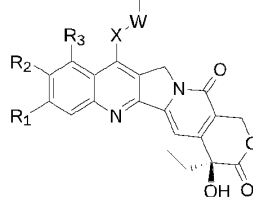
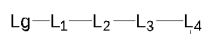
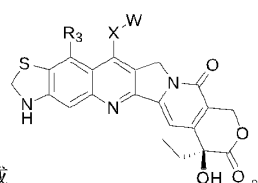
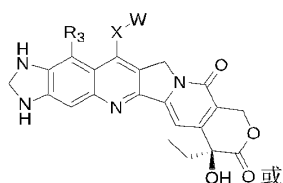
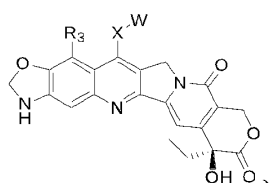
若 W 不存在，则其结构式为



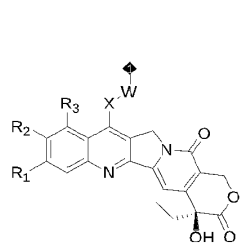
式 II 所示的化合物



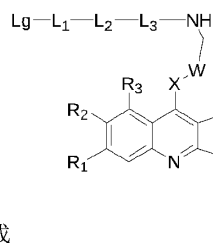
或 HN—, “虚线”键表示所述杂环与苯环耦合的位置, 例如, 形成



本文中, 式 III 所示的药物连接体偶联物

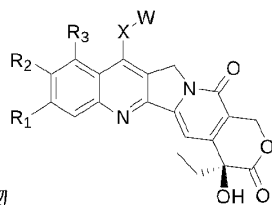


相连时, 形成



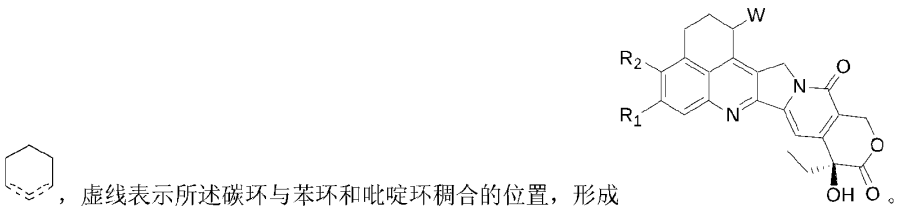
。其余标号 1、2 可参照前述内容进行

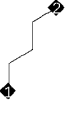
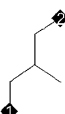
理解。

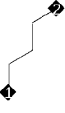
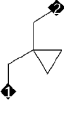


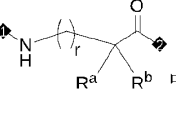
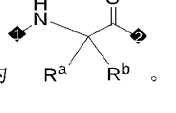
本文中, 式 II 所示的化合物

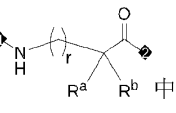
中, R₃ 和 X 和与其相连的碳原子一起形成



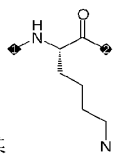
本文中，X 的定义例如为，“X 选自任选取代的 ，所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基（如甲基）”，则 X 例如可以为  或 。X 其余类似的定义可参照前述内容进行理解。

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

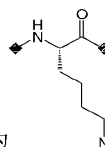
AA¹ 所示氨基酸残基的结构  中，若 r 为 0，则本领域技术人员可以理解的是，AA¹ 所示氨基酸残基的结构将变为 。

AA¹ 所示氨基酸残基的结构  中，若 R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R⁰ 所取代，其中，术语“所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R⁰ 所取代”的含义为，所述 4-10 元杂环可以不被取代，也可以被一个或多个 R⁰ 所取代，且所述多个 R⁰ 中，各 R⁰ 的定义可以相同，也可以不同。其余类似的定义可以参照前述内容进行理解。

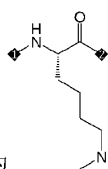
本文中，例如，L₃ 选自 Lys、Val-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Ala、Lys-Ala-Asn 时，“所述赖氨酸（Lys）的远端氨基任选地被 1 个、2 个或 3 个选自叔丁氧羰基、C1-6 烷基（优选甲基）、0 的取代基所取代”的含义为，所述 L₃ 各选项中的 Lys 的远端氨基任选地被 1 个、2 个或 3 个选自叔丁氧羰基、C1-6 烷基（优选甲基）、0 的取代基所取代。其中，“Lys 的远



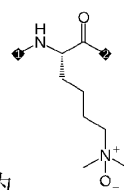
端氨基”指的是赖氨酸残基 NH_2 中裸露的氨基- NH_2 。“所述赖氨酸 (Lys) 的远端氨基任选地被 1 个、2 个或 3 个选自叔丁氧羰基、C1-6 烷基 (优选甲基)、O 的取代基所取代”表示所述赖氨酸 (Lys) 的远端氨基可以不被取代,也可以被 1 个、2 个或 3 个选自叔丁氧羰基、C1-6 烷基 (优选甲基)、O 的取代



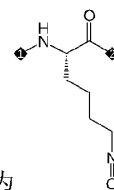
基所取代,例如,可以被 1 个叔丁氧羰基取代,即变为



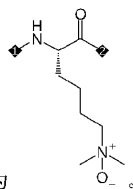
变为 $\text{-N(CH}_3)_2$, 或者被 2 个甲基和 1 个 O 同时取代,即变为



。需要说明的是,“所述赖氨酸 (Lys) 的远端氨基被 O 取代”指的是所述赖氨酸 (Lys) 的远端氨基被氧代,即变为



酸 (Lys) 的远端氨基被 O 取代”指的是所述赖氨酸 (Lys) 的远端氨基被氧代,即变为



远端氨基进一步被两个甲基所取代,则其变为

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

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

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

在本文中,术语“C2-6 烯基”是指含有至少一个双键且碳原子数为 2-6 的直链、支链或环状的烯基,包括例如“C2-4 烯基”等。其实例包括但不限于:乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、

1,3-丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,4-己二烯基、环戊烯基、1,3-环戊二烯基、环己烯基、1,4-环己二烯基等。

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

在本文中，术语“卤素”包括氟、氯、溴、碘。

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

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

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

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

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

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

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

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

己二烯基、2*H*-1,2-噁嗪基、4*H*-1,2-噁嗪基、6*H*-1,2-噁嗪基、4*H*-1,3-噁嗪基、6*H*-1,3-噁嗪基、4*H*-1,4-噁嗪基、哒嗪基、吡嗪基、1,2,3-三嗪基、1,3,5-三嗪基、1,2,4,5-四嗪基、氮杂环庚三烯基、1,3-二氮杂环庚三烯基、氮杂环辛四烯基等。

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

术语“药物与抗体比”或“DAR”是指在群(或混合物)或组合物或 ADC 分子中药物和抗体的比例，例如，与 ADC 的抗体附接的小分子毒素。ADC 的 DAR 可以在 1 到 16 的范围内，但是取决于抗体上的连接位点的数量，更高的负载(例如 20)也是可能的。提及负载到单个抗体上的药物的数量时，或可替代地，提及一组 ADC 的平均或均值 DAR 时，可以使用术语 DAR。应当理解，后者通常称为平均 DAR。在质谱法测定 DAR 值的过程中，抗体已经被还原为分离的重轻链，DAR1 代表包含轻链或重链偶联 1 个毒素分子的偶联物；DAR2 代表包含轻链或重链偶联 2 个毒素分子的偶联物；DAR3 代表包含轻链或重链偶联 3 个毒素分子的偶联物。

发明的有益效果

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

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

具有极高的偶联效率，在一些实施方案中，所述偶联效率能够达到或超过 90%；

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

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

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

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

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

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

类抗体偶联药物依然具有高抗肿瘤活性；

本公开提供的抗 Napi2b 抗体具有极高的人源化程度或者全人源抗体，从而可安全地施用给人受试者，而不引发免疫原性反应。

综上，本发明 ADC 具有重大的临床价值。

附图说明

- 图 1. 抗 Napi2b 人源化抗体流式亲和力评价
- 图 2. 抗 Napi2b 人源化抗体内吞活性检测
- 图 3A. 66C12D12-hz1 抗体在血清中的亲和力检测
- 图 3B. 16G5B3-hz2 抗体在血清中的亲和力检测
- 图 4. 抗人 Napi2b ADC 在 HT29-h.Napi2b CDX 模型中体内药效测试
- 图 5. 抗人 Napi2b ADC 在 HT29-h.Napi2b CDX 模型给药过程中小鼠体重变化
- 图 6. 抗人 Napi2b ADC 在 IGR-OV1 CDX 模型中体内药效测试
- 图 7. 抗人 Napi2b ADC 在 IGR-OV1 CDX 模型给药过程中小鼠体重变化

具体实施方式

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

本公开中的缩写具有以下含义：

OMs	甲磺酸酯基	FA	甲酸
OTs	对甲苯磺酸酯基	ACN	乙腈
OTf	三氟甲磺酸酯基	CCK8 试剂	2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐
TBS	叔丁基二甲基硅基	FBS	胎牛血清
MMT	对甲氧基苯基二苯甲基	DMSO	二甲基亚砷
PB/PBS	磷酸盐缓冲液	HBTU	O-苯并三氮唑-四甲基脒六氟磷酸盐
HOBT	1-羟基苯并三唑	HATU	2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐
NBS	N-溴代琥珀酰亚胺	TFA	三氟乙酸
PPTS	吡啶对甲苯磺酸盐	DCM	二氯甲烷
THF	四氢呋喃	DMF	N,N-二甲基甲酰胺

EDC	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐	IgG	免疫球蛋白 G
CDR	免疫球蛋白可变区中的互补决定区	HRP	辣根过氧化物酶
FR	抗体构架区：抗体可变区中除 CDR 残基以外的氨基酸残基	hFc	人 IgG 抗体 Fc 段
VH	抗体重链可变区	KD	平衡解离常数
VL	抗体轻链可变区	HCDR1	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区 1
AbM	AbM CDR 定义方式来源于 Martin 的相关研究（Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86:9268 - 9272），此定义方法整合了 Kabat 及 Chothia 两者的部分定义。	HCDR2	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区 2
Kabat	由 Elvin A. Kabat 提出的免疫球蛋白比对及编号系统（参见，例如 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）。	HCDR3	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区 3
Chothia	由 Chothia 等人提出的免疫球蛋白编号系统，其是基于结构环区的位置鉴定 CDR 区边界的经典规则（参见，例如 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883）。	LCDR1	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区 1
IMGT	基于由 Lefranc 等人发起的国际免疫遗传学信息系统（The	LCDR2	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区 2

	international ImMunoGeneTics information system ® (IMGT)) 的编号系统, 可参阅 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003。		
mAb	单克隆抗体	LCDR3	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区 3
EC50	产生 50%功效或结合的浓度	SEC-HPLC	分子排阻高效液相色谱
ELISA	酶联免疫吸附测定	HC	疫球蛋白重链
PCR	聚合酶链式反应	LC	疫球蛋白轻链

序列及其具体信息:

SEQ ID No.	名称	序列
1	66C12D12 VH	QIQLVQSGAELVRPGASVKMSCKTSGYFTTYNVHWVKQTPRQGLEWIGAISPGNGLTSY TQKFKAKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGFRLGSMDDYWGQGTSTVTVSS
2	66C12D12 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTSVAWYQQRPGQSPKELIYWASNRFTGVPD RFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQYSSPPLTFGAGTKLELK
3	66C12D12/66C12D12-hz1 Kabat HCDR1	TYNVH
4	66C12D12 Kabat HCDR2	AISPGNGLTSYTQKFKA
5	66C12D12 hz1 Kabat HCDR2	AISPGSGLTSYAQKFQG
6	66C12D12/66C12D12-hz1 Kabat HCDR3	GGFRLGSMDDY
7	66C12D12 Kabat LCDR1	KASQNVGTSVA
8	66C12D12 hz1 Kabat LCDR1	SASQNVGTSVA

9	66C12D12/66C12D12- hz1 Kabat LCDR2	WASNRFT
10	66C12D12/66C12D12- hz1 Kabat/ IMGT LCDR3	QQYSSPPLT
11	66C12D12/66C12D12- hz1 IMGT HCDR1	GYTFTTYN
12	66C12D12 IMGT HCDR2	ISPGNGLT
13	66C12D12 hz1 IMGT HCDR2	ISPGSGLT
14	66C12D12/66C12D12- hz1 IMGT HCDR3	ARGGFRLGSMDY
15	66C12D12/66C12D12- hz1 IMGT LCDR1	QNVGTS
/	66C12D12/66C12D12- hz1 IMGT LCDR2	WAS
16	60A12B3/60A12B3 hz1 IMGT LCDR3	QHYSKLPLT
17	66C12D12-hz1 VH	QVQLVESGAIEVKQPGESVKVSKTSGYTFTTYNVHWVRQAPGGLEWMGAISPGSGLTSY AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGFRLGSMDYWGQGTLLTVSS
18	66C12D12-hz1 VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCSASQNVGTSVAWYQQKPGQSPKELIYWASNRFTGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSPPLTFGQGTKVEIK
19	34F2A10 VH	QAYLQSGADLVRPGASVKMSSKASGSSFTTYIIHWIKQTPGGLEWIGAIYPNGYTSY NQKFKGKATLTVDKSYNTAYIQLSSLSEDSAVYFCARGNYGNYEGFTYWGQGTLLTVSA
20	34F2A10 VL	DIQMTQTTSSLVSLGDRITISCSASQAIYKYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSTLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIASYYCQQYNKFPFTFGSGTKLEIK
21	34F2A10/34F2A10-hz1 Kabat HCDR1	TYIIH

22	34F2A10 Kabat HCDR2	AIYPGNGYTSYNQKFKG
23	34F2A10-hz1 Kabat HCDR2	AIYPGSGYTSYAQKFQG
24	34F2A10/34F2A10-hz1 Kabat HCDR3	GNYGNYEGFTY
25	34F2A10/34F2A10-hz1 Kabat LCDR1	SASQAIYKYLN
26	34F2A10/34F2A10-hz1 Kabat LCDR2	YTSTLHS
27	34F2A10/34F2A10-hz1 Kabat/IMGT LCDR3	QQYNKFPFT
28	34F2A10/34F2A10-hz1 IMGT HCDR1	GSSFTTYI
29	34F2A10 IMGT HCDR2	IYPGNGYT
30	34F2A10-hz1 IMGT HCDR2	IYPGSGYT
31	34F2A10/34F2A10-hz1 IMGT HCDR3	ARGNYGNYEGFTY
32	34F2A10/34F2A10-hz1 IMGT LCDR1	QAIYKY
/	34F2A10/34F2A10-hz1 IMGT LCDR2	YTS
33	60A12B3-hz1 VH	QVQLVESGPGGLVQPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQPPGKLEWIGVIWSGGRTNYN PSLQSRVTISKDNSTNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKRDGIYGDYWGQGTLLTVSS
34	34F2A10-hz1 VH	QVQLVESGAEVKQPGESVKVSKASGSSFTTYIIHWIRQAPGGLEWGMGAIYPGSGYTSY AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARGNYGNYEGFTYWGQGTLLTVSS

35	34F2A10-hz1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQAIYKYLNWYQQKPGQAPKLLIYYTSTLHSGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYNKFPFTFGQGTKVEIK
36	22H9C4 VH	QVQLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSNNLHWVKLTPRQGLEWIGAVYPGNGDTSY TQKFKGKATLTVDKSSSIAYMQLSSPTSEDSAVYFCARGLPYLGAMDYWGQGTSTVTVSS
37	22H9C4 VL	DIVMTQSQRFMSTTVGDRVSITCKASQNVGIFVTWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSRPLSFGAGTKLELK
38	22H9C4/22H9C4-hz1 Kabat HCDR1	SNNLH
39	22H9C4 Kabat HCDR2	AVYPGNGDTSYTQKFKG
40	22H9C4-hz1 Kabat HCDR2	AVYPGSGDTSYSQKFKG
41	22H9C4/22H9C4-hz1 Kabat HCDR3	GLPYLGAMDY
42	22H9C4 Kabat LCDR1	KASQNVGIFVT
43	22H9C4-hz1 Kabat LCDR1	SASQNVGIFVT
44	22H9C4/22H9C4-hz1 Kabat LCDR2	SASSRYT
45	22H9C4/22H9C4-hz1 Kabat/IMGT LCDR3	QQYSRPLS
46	22H9C4/22H9C4-hz1 IMGT HCDR1	GYTFTSNN
47	22H9C4 IMGT HCDR2	VYPGNGDT
48	22H9C4-hz1 IMGT HCDR2	VYPGSGDT
49	22H9C4/22H9C4-hz1 IMGT HCDR3	ARGLPYLGAMDY

50	22H9C4/22H9C4-hz1 IMGT LCDR1	QNVGIF
/	22H9C4/22H9C4-hz1 IMGT LCDR2	SAS
51	60A12B3-hz1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDIGTYLNWYQQKPGQAPKLLIYHTRGLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYSKLPITFGQGTKVEIK
52	22H9C4-hz1 VH	QVQLVESGAEVKQPGESVKVSKASGYTFTSNNLHWVRQAPGGLEWMGAVYPGSGDTSY SQKFKGRVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCARGLPYLGAMDYWGQGTLLTVSS
53	22H9C4-hz1 VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCSASQNVGIFVTWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVP RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSRPLSFGQGTKVEIK
54	16G5B3 VH	QVQLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFASYNMHVWKKTPRQGLEWIGAIYPGNGNTSY NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCVRGGRGLTMDYWGQGTSTVTVSS
55	16G5B3 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGSSVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQHYRNIPLTFGAGTKLELK
56	16G5B3/16G5B3- hz1/16G5B3-hz2 Kabat HCDR1	SYNMH
57	16G5B3 Kabat HCDR2	AIYPGNGNTSYNQKFKG
58	16G5B3-hz1 Kabat HCDR2	AIYPGSGNTSYSQKFKG
59	16G5B3-hz2 Kabat HCDR2	AIYPGSGNTGYSQKFKG
60	16G5B3/16G5B3- hz1/16G5B3-hz2 Kabat HCDR3	GGRGLTMDY
61	16G5B3 Kabat LCDR1	KASQDVGSSVA
62	16G5B3-hz1/16G5B3- hz2 Kabat LCDR1	SASQDVGSSVA

63	16G5B3/16G5B3- hz1/16G5B3-hz2 Kabat LCDR2	WASTRHT
64	16G5B3/16G5B3- hz1/16G5B3-hz2 Kabat/IMGT LCDR3	QHRYNIPLT
65	16G5B3/16G5B3- hz1/16G5B3-hz2 IMGT HCDR1	GYTFASYN
66	16G5B3 IMGT HCDR2	IYPGNGNT
67	16G5B3-Hz1/ 16G5B3- Hz2 IMGT HCDR2	IYPGSGNT
68	16G5B3/16G5B3- hz1/16G5B3-hz2 IMGT HCDR3	VRGGRGLGTMDY
69	16G5B3/16G5B3 hz1/16G5B3 hz2 IMGT LCDR1	QDVGSS
/	16G5B3/16G5B3 hz1/16G5B3 hz2 IMGT LCDR2	WAS
70	IgG1 CH 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
71	16G5B3-hz1 VH	QVQLVESGAIEVKQPGESVKVSKASGYTFASYNMHVVRQAPGGGLEWMGAIYPGSGNTSY SQQKFQGRVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDYAVYFCVRGGRGLGTMDYWCQGTLLVTVSS

72	16G5B3-hz1/16G5B3-hz2 VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCSASQDVGSSVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVP RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQHYRNIPLTFGQGTKVEIK
73	16G5B3-hz2 VH	QVQLVESGAIEVKQPGESVKVSKASGYTFASYNMHVVRQAPGGGLEWMGAIYPGSGNTGY SQQKFQGRVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDYAVYFCVRGGRGLGTMIDYWGQGLTVTVSS
74	60A12B3 VH	QVQLKESGPVLVAPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHVRQPPGKGLWLGVIWSGGRTNYN SALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAMYYCAKRDGIYGDYWGQGSTVTSS
75	60A12B3 VL	DIQMTQTTSSLSASLGRVITISCRASQDIGTYLNWYQQKPDGTVTLIYHTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDFSLTITSSLEPEDIATYYCQHYSKLPLTFGAGTKLEIK
76	60A12B3/60A12B3 hz1 IMGT HCDR1	GFSLTNYG
77	60A12B3/60A12B3 hz1 IMGT HCDR2	IWSGGRT
78	60A12B3/60A12B3 hz1 IMGT HCDR3	AKRDGIYGDY
79	60A12B3/60A12B3 hz1 IMGT LCDR1	QDIGTY
/	60A12B3/60A12B3 hz1 IMGT LCDR2	HTS
80	Kappa CL 轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
81	16G5B3-hz2 HC 重链	QVQLVESGAIEVKQPGESVKVSKASGYTFASYNMHVVRQAPGGGLEWMGAIYPGSGNTGY SQQKFQGRVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDYAVYFCVRGGRGLGTMIDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	16G5B3-hz2 LC 轻链	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCSASQDVGSSVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVP

		RFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQIYRNIPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
83	66C12D12-hz1 HC 重 链	QVQLVESGAEVKQPGESVKVSKTSGYFTTNYVHWVRQAPGQGLEWMGAISPGLTSY AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGFRLGSMGYWGQGLTVVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTCPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	66C12D12-hz1 LC 轻 链	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCSASQNVGTSVAWYQQKPGQSPKELIYWASNRFTGVPS RFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQYSSPPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
85	hFc	PKSSDKHTCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	mFc	GGGGSPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA PIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

现参照下列意在举例说明本公开(而非限定本公开)的实施例来描述本公开。

除非特别指明，本公开中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法，基本上参照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F. M. Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley & Sons, Inc.，1995 中所述的方法进行。本领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本公开，且不意欲限制本公开所要求保护的范围。

制备方案

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

核磁共振 (^1H NMR) 的测定仪器使用 Bruker 400 MHz 核磁共振仪；测定溶剂为氘代甲醇 (CD_3OD)、氘代氯仿 (CDCl_3) 或六氘代二甲基亚砜 ($\text{DMSO}-d_6$)；内标物质为四甲基硅烷 (TMS)。

实施例中使用的核磁共振 (NMR) 图谱中的缩写示于以下。

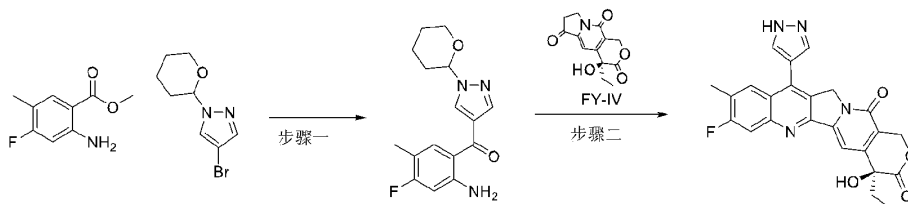
s: 单峰 (singlet)、d: 二重峰 (doublet)、t: 三重峰 (triplet)、q: 四重峰 (quartet)、dd: 双二重峰 (double doublet)、qd: 四二重峰 (quartet doublet)、ddd: 双双二重峰 (double double doublet)、ddt: 双双三重峰 (double double triplet)、dddd: 双双双二重峰 (double double double doublet)、m: 多重峰 (multiplet)、br: 宽峰 (broad)、J: 偶合常数、Hz: 赫兹、 $\text{DMSO}-d_6$: 氘化二甲基亚砜。 δ 值用 ppm 值表示。

质谱 (MS) 的测定仪器使用 Agilent (ESI) 质谱仪, 型号为 Agilent 6120B。

一、生物活性分子和合成“药物-连接体化合物”过程使用的中间体的合成

A、生物活性分子的合成

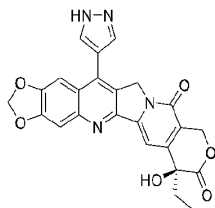
实施例 A1.1: (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.1) 的合成



步骤一: 4-溴-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑 (4.6g) 溶于无水四氢呋喃中 (50ml), 上述溶液在氮气保护下干冰-丙酮冷却到 -78°C , 然后滴加正丁基锂 (12ml, 2M), 反应液在 -78°C 搅拌 20 分钟, 然后加入 2-氨基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯 (1.83g), 加完后, 反应自然升至室温, 并连续搅拌反应 5 小时。反应甲甲醇 (3ml) 猝灭后加入乙酸乙酯 (200ml), 溶液用水洗 (100ml $\times$ 3), 有机相干燥后除去有机溶剂, 用硅胶柱色谱分离得到目标产物 (2-氨基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮, ESI-MS (m/z): 304 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

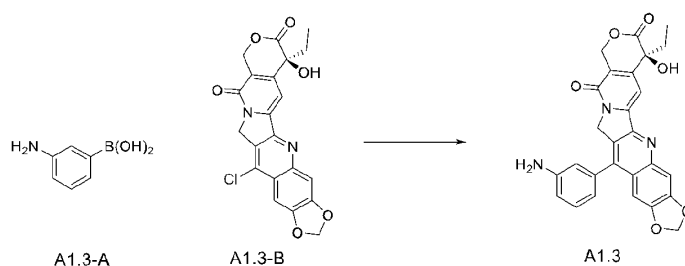
步骤二: (S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃[3,4-f]中氮茛并-3,6,10(4H)-三酮 (2.63g), (2-氨基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮 (3.03g), 对甲苯磺酸 (1.74g) 溶于二氯甲烷 (50ml) 中, 然后除去溶剂, 混合物在氮气保护下加热至 120°C 反应 4 小时。混合物溶于乙酸乙酯 (300ml), 有机相水洗 (100ml $\times$ 2), 干燥后除去有机溶剂, 残留物用硅胶柱层析分离得到目标产物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.1)。ESI-MS (m/z): 447 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 A1.2: (S)-7-乙基-7-羟基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.2) 的合成



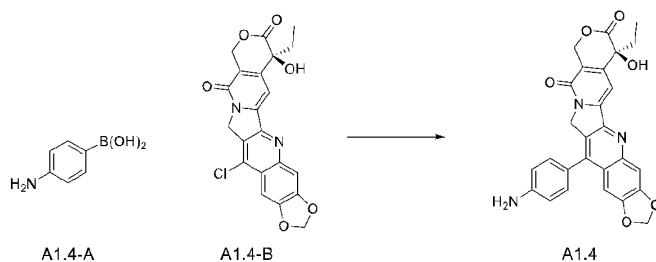
用实施例 A1.1 相同的方法和反应条件，用 6-氨基苯并[d][1,3]二氧环戊烷-5-羧酸甲酯代替 2-氨基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯，得到目标产物 (S)-7-乙基-7-羟基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.2)。ESI-MS (m/z): 459 [M+H]⁺。

实施例 A1.3: (S)-14-(3-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.3) 的合成



化合物 (A1.3-A) (1.4g)，化合物 (A1.3-B) (2.2g)，Pd₂(DBA)₃ (300 mg)，三环己基磷 (300 mg)，醋酸钾 (1.1g) 依次加入二氧六环 (30ml) 和水 (5ml) 的混合溶剂中，混合物在氮气保护下 100°C 加热搅拌反应 12 小时。冷却后加入乙酸乙酯 (200ml)，水洗 (100ml)，干燥后，硅胶柱层析分离得到目标产物 (S)-14-(3-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.3)。ESI-MS (m/z): 484 [M+H]⁺。

实施例 A1.4: (S)-14-(4-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.4) 的合成



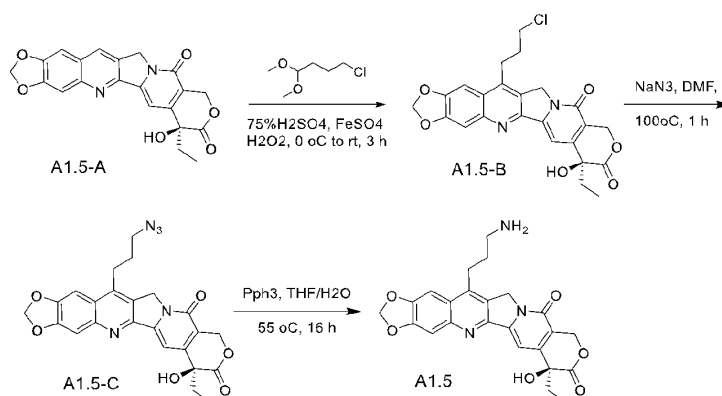
化合物 (A1.4-A) (1.4g)，化合物 (A1.4-B) (2.2g)，Pd₂(DBA)₃ (300mg)，三环己基磷 (300mg)，醋酸钾 (1.1g) 依次加入二氧六环 (30ml) 和水 (5ml) 的混合溶剂中，混合物在氮气保护下 100°C 加热搅拌反应 12 小时。冷却后加入乙酸乙酯 (200ml)，水洗 (100ml)，干燥后，硅胶柱层析分离得到目标产物 (S)-14-(4-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.4)。

[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-8, 11(7H)-二酮 (A1.4)。

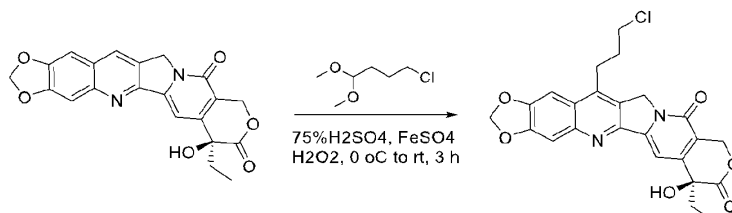
ESI-MS (m/z): 484 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.56 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.89 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.26 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 1.96 - 1.78 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

实施例 A1.5: (S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10, 13-二氢-11H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-8, 11(7H)-二酮 (A1.5) 的合成



步骤一: (S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羟基-10, 13-二氢-11H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-8, 11(7H)-二酮的合成

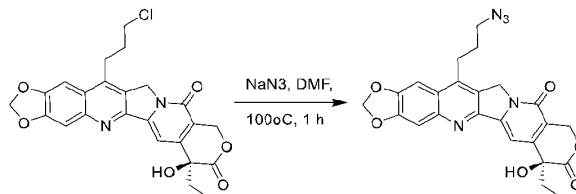


冰浴条件下, 向化合物 (S)-7-乙基-7-羟基-10, 13-二氢-11H-[1, 3]二氧杂环[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]茚并[1, 2-b]喹啉-8, 11(7H)-二酮 (A1.5-A, 500 mg) 的 75%硫酸溶液 (5 mL) 中加入七水合硫酸亚铁 (570 mg 七水合硫酸亚铁溶于 1mL 水中), 和 4, 4-二甲氧基氯丁烷 (3.89 g), 反应液搅拌三分钟后滴加双氧水 (29%, 2.5 mL)。反应液在 0 °C 下搅拌反应 5 分钟后升至室温, 并搅拌反应 3 小时。反应液加入水 (50 mL) 稀释, 乙酸乙酯 (80 mL×2) 萃取, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得到粗产品, 粗产品用 C18 柱 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液: 5%-60%) 进一步纯化得到目标化合物 (黄色固体, 400 mg, 收率: 67%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 468.9;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, J = 6.7 Hz, 4H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

步骤二：(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

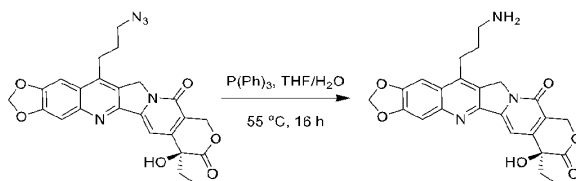


向化合物(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(200 mg)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(3 mL)中,加入叠氮化钠(284 mg),反应液在100 °C下搅拌反应1小时。向反应液中加入水(30 mL),乙酸乙酯(60 mL×2)萃取,有机相用经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到目标化合物(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(黄色固体,180 mg, 收率:88%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 476;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.53 - 3.49 (m, 2H), 3.16 - 3.12 (m, 2H), 1.93 - 1.80 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

步骤三：(S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成



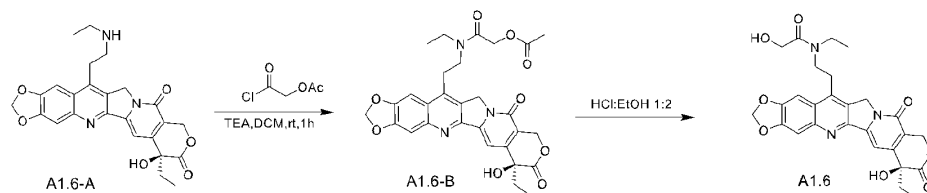
向化合物(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成(130 mg, 0.274 mmol)的四氢呋喃(3 mL)和水(1 mL)混合溶液中加入三苯基膦(108 mg, 0.411 mmol),在55 °C下反应16小时。LCMS显示反应完全。向反应液中加入水(5 mL),用2N盐酸(3 mL)调至酸性,用乙酸乙酯(10 mL)萃取。水相经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%甲酸的水溶液)得到目标化合物(S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成(A1.5, 黄色固体,15 mg, 收率:12%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 449.9;

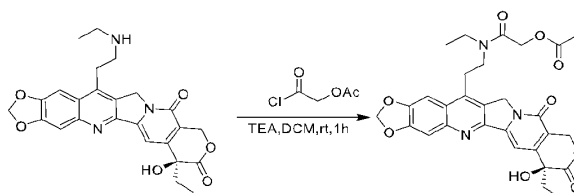
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.72 (s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 3.15 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 3.03 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.96 - 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

实施例 A1.6: (S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环

戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺 (A1.6) 的合成



步骤一: (S)-2-(乙基(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)氨基)-2-氧乙基乙酸酯 (A1.6-B) 的制备:



将化合物 (S)-7-乙基-14-(2-(乙胺基)乙基)-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.6-A, 50 mg), 乙酰氧基乙酰氯, (73 mg), 三乙胺 (50 mg) 依次加入二氯甲烷 (5 mL) 中, 室温搅拌反应 1 小时。反应液旋蒸除去溶剂, 得到粗品油状化合物 75mg。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 564.2。

步骤二: (S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺 (A1.6) 的合成



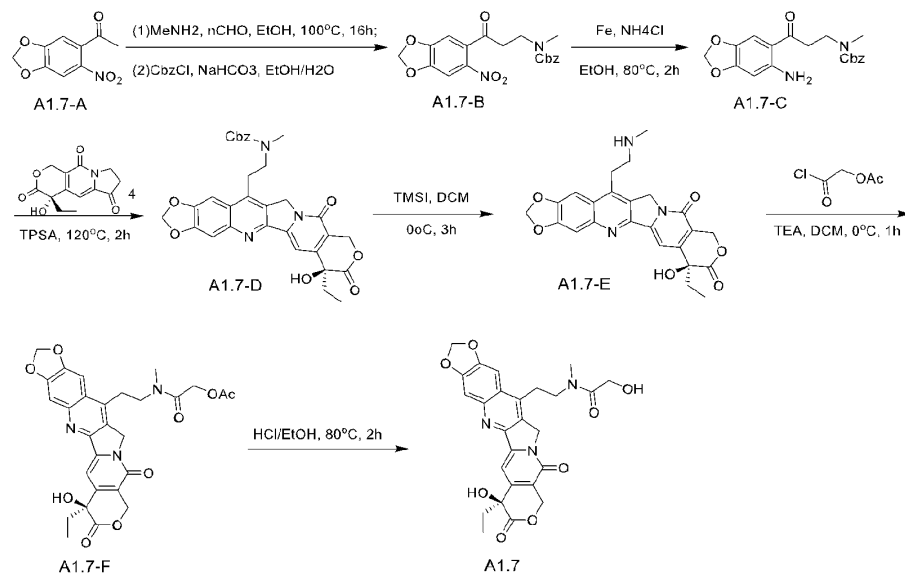
将粗品化合物 (S)-2-(乙基(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)氨基)-2-氧乙基乙酸酯 (75mg, 0.13 mmol) 溶于浓盐酸和无水乙醇混合溶液 (体积比为 1/2, 3 mL) 中, 然后反应液 85 °C 回流反应 1 小时。LCMS 显示反应完成。反应液浓缩, 粗产品经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸的水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 (S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺 (A1.6) (15 mg, 收率: 26%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 522.0;

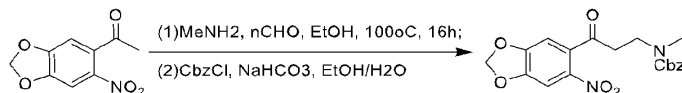
1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.92 (s, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.34 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.07 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.41 (m, 2H),

2.00 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.16 - 1.04 (m, 3H), 0.89 - 0.83 (m, 3H)。

实施例 A1.7: (S)-N-甲基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺 (A1.7) 的合成



步骤一: 化合物甲基苄基 (3-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环-5-基)-3-氧丙基) 氨基甲酸酯的制备

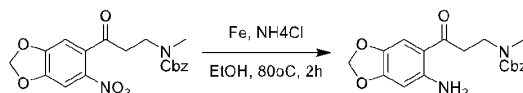


将化合物 1-(6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)乙烷-1-酮 (A1.7-A, 500 mg), 甲胺盐酸盐 (1.6 g) 和多聚甲醛 (714 mg) 溶于乙醇 (8 mL) 中, 100°C 下闷罐反应 16 小时。反应液降至室温并减压浓缩, 所得残渣用二氯甲烷 (80 mL) 溶解, 有机相经水 (50 mL $\times$ 3) 萃取。所得水相用碳酸氢钠调至 PH=9, 然后加入氯甲酸苄酯 (513 mg, 3.0 mmol), 在室温下反应 16 小时。反应液用乙酸乙酯 (30 mL $\times$ 3) 萃取, 有机相经饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 浓缩得到粗品, 粗产品经 C18 分离纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸=5~95%) 得到目标化合物 (A1.7-B, 180 mg, 收率 23%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 387.1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (s, 1H), 7.35 (m, 5H), 7.32 (m, 1H), 6.17 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.03 (m, 3H), 2.99 - 2.86 (m, 2H)。

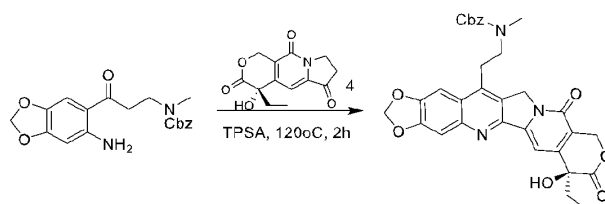
步骤二: 化合物苄基 (3-(6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)-3-氧丙基) (甲基) 氨基甲酸酯 (A1.7-C) 的制备



将化合物 A1.7-B 苄基 (3- (6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环-5-基) -3-氧丙基) 氨基甲酸酯 (180 mg, 0.47 mmol) 溶于饱和氯化铵水溶液 (8 mL) 和乙醇 (8 mL) 混合溶液中, 然后向反应液中加入铁粉 (130 mg), 反应在 80° C 下搅拌 2 小时。将反应液过滤, 滤液减压浓缩成固体, 粗产品经 TLC 分离纯化 (石油醚: 乙酸乙酯=2/1) 得到目标化合物 A1.7-C (76 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 357.0。

步骤三: 苄基 (S) - (2- (7-乙基-7-羟基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基) 乙基) (甲基) 氨基甲酸酯 (A1.7-D) 的制备



室温下, 将化合物 A1.7-C 苄基 (3- (6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基) -3-氧丙基) (甲基) 氨基甲酸酯 (38 mg), 化合物 (S) -4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]咪唑啉-3,6,10 (4H) -三酮 (29 mg) 和对甲苯磺酸 (23 mg) 溶于二氯甲烷 (5 mL) 溶液中, 溶液澄清混匀后减压浓缩, 用油泵抽至真空, 反应在 120° C 真空下反应 2 小时。将反应液降至室温, 加入水 (30 mL) 并用二氯甲烷 (30 mL × 3) 萃取。合并有机相依次经无水硫酸钠干燥、过滤, 滤液减压浓缩得到目标化合物 A1.7-D (50 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 584.0。

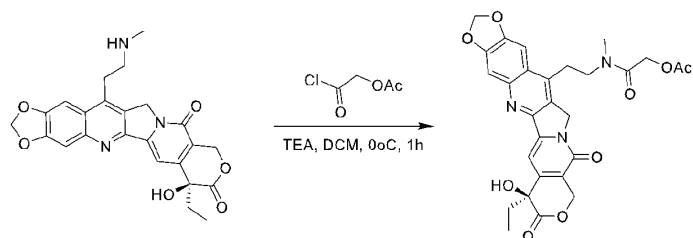
步骤四: (S) 7-乙基-7-羟基-14- (2- (甲胺基) 乙基) -10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉[1,2-b]喹啉-8,11 (7H) -二酮 (A1.7-E) 的制备



室温下, 将化合物 A1.7-D 苄基 (S) - (2- (7-乙基-7-羟基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉[1,2-b]喹啉-14-基) 乙基) (甲基) 氨基甲酸酯 (50 mg) 溶于二氯甲烷 (5 mL) 溶液中, 于 0° C 下加入三甲基碘硅烷 (51 mg, 0.26 mmol), 反应 3 小时。将反应液浓缩除去溶剂, 经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05%甲酸) 得到褐色固体化合物 A1.7-E (15 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 450.0。

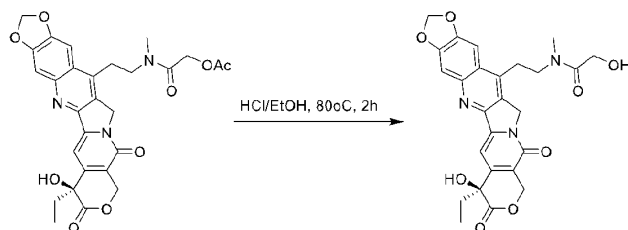
步骤五: 化合物 (S) -2- ((2- (7-乙基-7-羟基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉[1,2-b]喹啉-14-基) 乙基) (甲基) 氨基) -2-氧乙基乙酸酯 (A1.7-F) 的制备



将化合物 A1.7-E (S) 7-乙基-7-羟基-14-(2-(甲基氨基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (15 mg) 和三乙胺 (15 mg) 溶于二氯甲烷 (5 mL) 溶液中, 于 0°C 下加入乙酰氧基乙酰氯 (20 mg) 反应 1 小时。将反应液浓缩除去溶剂得到粗品, 所得固体直接用于下一步, 未做进一步纯化。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 550.1$ 。

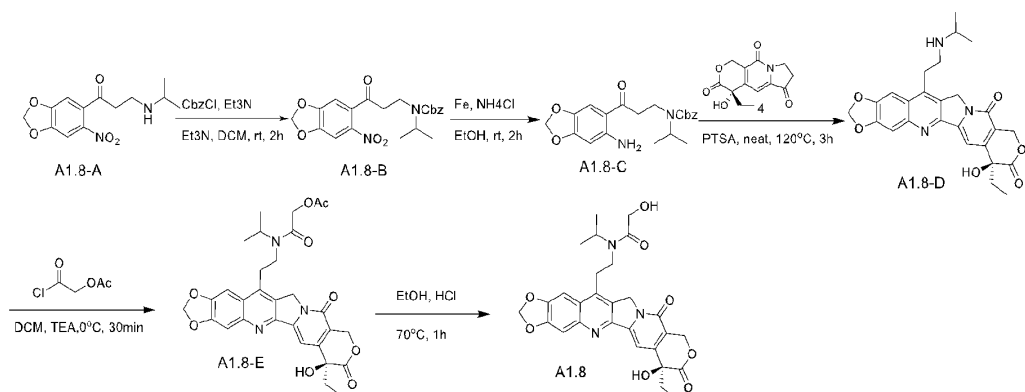
步骤六: 化合物 (S) -N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基-N-甲基乙酰胺 (A1.7) 的制备



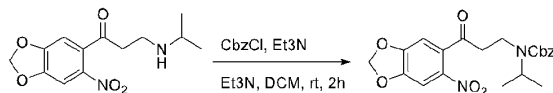
将化合物 A1.7-F (S) -2-((2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(甲基)氨基)-2-氧乙基乙酸酯 (15 mg) 溶于乙醇 (5 mL) 溶液中, 加入浓盐酸 (1.5 mL), 于 80°C 下反应 2 小时。将反应液浓缩除去溶剂, 经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到白色固体化合物 A1.7 (1.6 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ : 508.2$ 。

实施例 A1.8: (S)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺 (A1.8) 的合成



步骤一：化合物异丙基苄基（3-（6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）氨基甲酸酯（A1.8-B）的制备

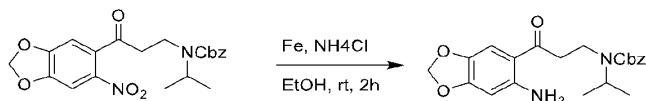


向化合物（A1.8-A）3-（异丙胺基）-1-（6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）丙-1-酮（900 mg）的二氯甲烷溶液（10 mL）中，依次加入三乙胺（1.8 g）和苄氧基碳酸氯（734 mg，4.3 mmol），在室温下反应 2 小时。反应液加水（50 mL）稀释，用二氯甲烷（50 mL×3）萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到粗品，粗产品经柱层析分离纯化（石油醚：乙酸乙酯=3/1）得到目标化合物（A1.8-B）（600 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 414.9;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.72 (s, 1H), 7.34 (br s, 6H), 6.31 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.14 - 4.10 (m, 1H), 3.48 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.03 (s, 2H), 1.13 - 1.11 (m, 6H)。

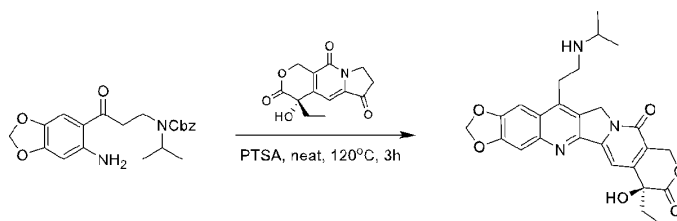
步骤二：化合物苄基（3-（6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）（异丙基）氨基甲酸酯（A1.8-C）的制备



将化合物（A1.8-B）异丙基苄基（3-（6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）氨基甲酸酯（200 mg，0.48 mmol）溶于饱和氯化铵（3 mL）和乙醇（3 mL）混合溶液中，然后向反应液中加入铁粉（135 mg），反应在室温下搅拌 2 小时。将反应液过滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品经柱层析分离纯化（石油醚：乙酸乙酯=3/1）得到目标化合物（A1.8-C）（65 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 395.2。

步骤三：（S）-7-乙基-7-羟基-14-（2-（异丙胺基）乙基）-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.8-D）的制备



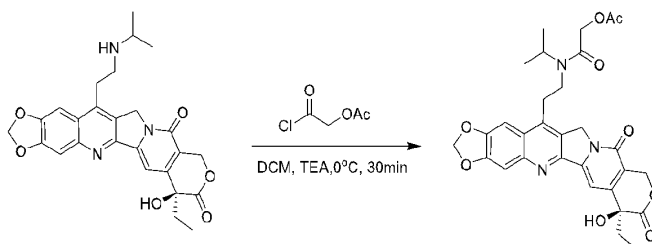
室温下，将化合物（A1.8-C）苄基（3-（6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）（异丙基）氨基甲酸酯（65 mg），化合物（S）-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶[1,2-b]喹啉-3,6,10（4H）-三酮（45 mg）和对甲苯磺酸（33 mg，0.17 mmol）溶于二氯甲烷（10 mL）溶液中，溶液澄清混匀后减压浓缩，用油泵抽至真空，反应在 120° C 真空下反应 2 小时。将反应液降至室温，加入水（50 mL），用二氯甲烷（30 mL×3）萃取，合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩，粗产品经柱层

析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇=10/1) 得到目标化合物 (A1.8-D) (40 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 478.0;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.46 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.33 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 3.41 (br s, 2H), 3.23 (br s, 3H), 1.94 - 1.78 (m, 2H), 1.25 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

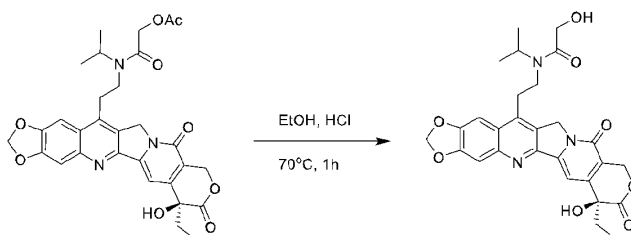
步骤四: 化合物 ((S)-2-((2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(异丙基)氨基)-2-氧代乙酸乙酯 (A1.8-E) 的制备



冰浴下, 向化合物 (S)-7-乙基-7-羟基-14-(2-(异丙胺基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.8-D) (40 mg) 的二氯甲烷溶液 (2 mL) 中加入三乙胺 (35 mg), 2-氯-2-氧乙基乙酸酯 (57 mg), 在零度下反应 30 分钟。将反应液减压浓缩得到化合物 A1.8-E, 直接应用于下一步。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 578.0。

步骤五: 化合物 (S)-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基-N-异丙基乙酰胺 (A1.8) 的制备



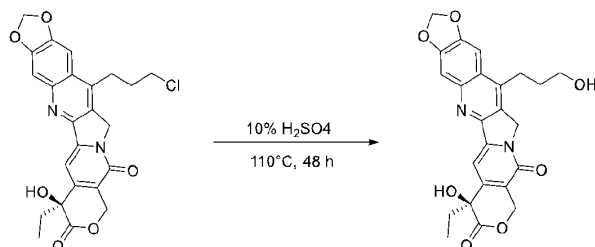
向化合物 (S)-2-((2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(异丙基)氨基)-2-氧代乙酸乙酯 (A1.8-E, 50 mg) 的乙醇溶液 (3 mL) 中, 加入浓盐酸 (0.5 mL), 在 70°C 下反应 1 小时。将反应液浓缩得到粗产品。再经高效液相制备纯化 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液) 得到目标化合物 (A1.8, 3 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 464.0;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.99 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.99 - 3.94 (m, 1H), 3.44 (dd, J = 16.7, 7.8 Hz, 2H), 3.33 - 3.21 (m, 2H), 1.95 - 1.79 (m, 2H), 1.19 (dd, J = 16.4, 5.8 Hz, 6H), 0.88 (t,

$J = 7.2 \text{ Hz}, 3\text{H}$ 。

实施例 A1.9: (S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.9) 的合成

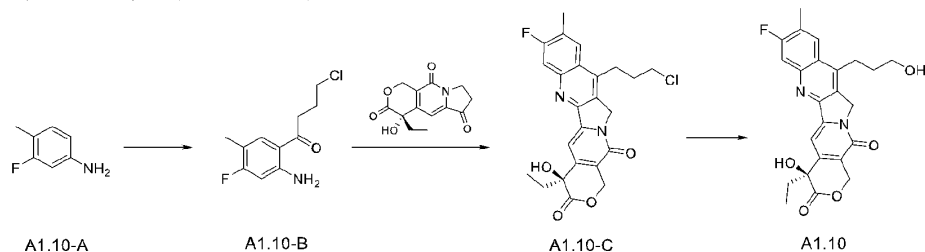


将化合物(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-氯丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(100 mg, 0.213 mmol)溶于10%硫酸(5 mL)溶液中,反应在110°C下反应48小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠(30 mL)溶液,用二氯甲烷(10 mL X 5)萃取,无水硫酸钠干燥,抽滤,减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%甲酸)得到(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.9, 1.78 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 451.0;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.63 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.47 - 5.37 (m, 2H), 5.32 - 5.19 (m, 2H), 3.51 - 3.46 (m, 2H), 3.17 - 3.13 (m, 2H), 1.92 - 1.76 (m, 4H), 0.90 - 0.84 (m, 3H)。

实施例 A1.10: (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.10) 的合成



步骤一:

0°C下,向化合物A1.10-A(10 g)的1,2-二氯乙烷(200 mL)溶液,滴加1mol/L三氯化硼(96 mL),4-氯丁腈(9.9 g)。80°C下搅拌反应2小时。反应液降至室温,加入2 mol/L盐酸(90 mL)并在80°C下回流搅拌0.5小时。反应液降至室温,加入少量水稀释,用二氯甲烷(200 mL X 3)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,抽滤,浓缩得到粗品,粗产品经柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=10/1)得到目标化合物A1.10-B(4 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 230.0。

步骤二:

向化合物A1.10-B(50 mg)中加入(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-

3,6,10-(4H)-三酮 (35 mg), 一水合对甲苯磺酸 (41.4 mg), 溶于二氯甲烷 (30 mL) 溶液中, 溶液澄清混匀后减压浓缩, 用油泵抽至真空, 反应在 120 °C 真空下反应 3 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液降至室温, 加入水 (20 mL), 用二氯甲烷 (20 mL X 3) 萃取。合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤, 滤液减压浓缩得到粗产品。粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷比甲醇=20 比 1) 得到目标化合物 A1.10-C (80 mg) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 457.0。

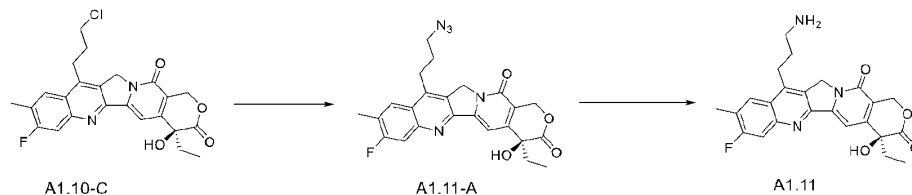
步骤三:

将化合物 A1.10-C (75 mg) 溶于六甲基磷酰三胺, 加入纯水 (0.8 mL) 反应液在 100 °C 下搅拌 72 小时。LCMS 检测反应完成。经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 (10 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 439.2;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.67 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.55 - 3.47 (m, 2H), 3.28 - 3.20 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.93 - 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

实施例 A1.11: (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.11) 的合成



步骤一:

向 A1.10-C (395 mg) 的 N' N-二甲基甲酰胺 (10 mL) 溶液中加入叠氮化钠 (432 mg), 反应液 80 °C 反应 16 小时, 然后冷却至室温, 加入水 (50 mL) 稀释, 用乙酸乙酯 (80 mL*3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤浓缩得到目标产物 A1.11-A (290 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 464.0。

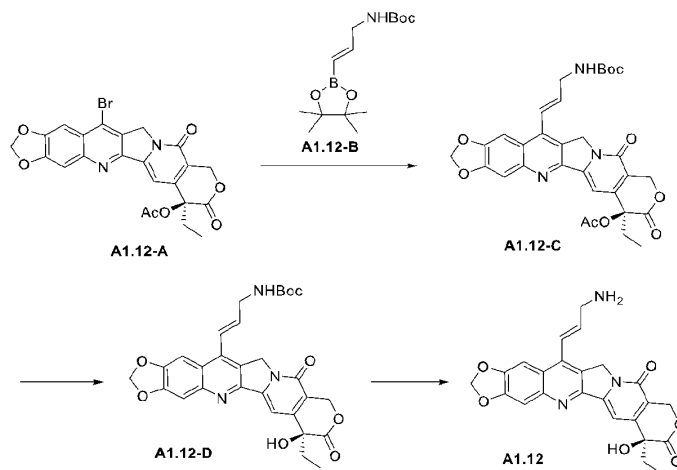
步骤二:

将化合物 A1.11-A (93 mg) 溶于四氢呋喃 (5 mL) 中, 加入三苯基膦 (78 mg), 室温反应 4 小时。然后向反应液中加入盐酸 (4M, 1mL), 反应液升至 55 °C 反应 16 小时, LCMS 监测反应完全。反应液直接浓缩, 粗品经过反相柱 (流动相 A 为 0.05% 甲酸水溶液, B 为乙腈) 提纯得到目标产物 A1.11 (28 mg, 收率: 36%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 438.4;

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.52 (s, 1H), 8.16 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 5.49 (ABq, J = 78.9, 16.3 Hz, 2H), 5.31 (br s, 2H), 3.35 - 3.32 (m, 2H), 3.22 - 3.10 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.13 - 2.11 (m, 2H), 1.96 - 1.94 (m, 2H), 1.01 (t, J = 7.4 Hz, 3H)。

实施例 A1.12: (S,E)-14-(3-氨基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.12) 的合成



步骤一:

将化合物 A1.12-A (200 mg, 0.39 mmol), 化合物 A1.12-B (112 mg, 0.39 mmol), 氟化铯 (152 mg, 0.975 mmol) 和四三苯基磷钾 (45 mg, 0.039 mmol) 加入 1,4-二氧六环溶液 (8 mL)。在氮气气氛下 120°C 微波反应 0.5 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液加入二氯甲烷 (20 mL) 和甲醇 (10 mL) 混合溶液稀释, 过滤。滤液浓缩, 粗品通过制备 TLC 纯化 (二氯甲烷: 甲醇=30:1) 得到目标化合物 (S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-7-基 乙酸酯 (A1.12-C, 60 mg, 收率: 26%) 为棕色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 590.3$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.63 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.09 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.45 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.34 - 5.24 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 2.21 (br s, 3H), 2.03 - 1.96 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.91 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H).

步骤二:

向化合物 (S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-7-基 乙酸酯 (A1.12-C, 50 mg, 0.085 mmol) 的甲醇溶液 (15 mL) 和加入甲醇钠 (9.2 mg, 0.17 mmol), 在 50°C 下搅拌反应 2 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液浓缩得到目标化合物 (S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.12-D, 50 mg) 粗品为棕色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 548$;

步骤三:

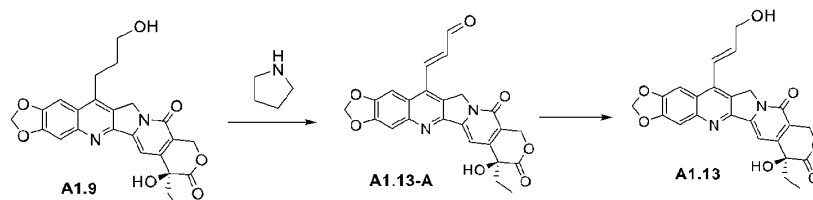
向化合物 (S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.12-D, 50 mg,

0.091 mmol)的二氯甲烷溶液(2 mL)中,加入三氟乙酸(1 mL),在室温下搅拌反应30分钟。LCMS显示反应完全。将反应液浓缩,粗品经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%甲酸的水溶液)得到目标化合物(S,E)-14-(3-氨基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.12)(8.1 mg,收率21%)为棕色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 448.3$;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.20 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 - 6.46 (m, 2H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 3.86 (br s, 2H), 1.90 - 1.83 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

实施例 A1.13: (S,E)-14-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.13)的合成



步骤一:

将化合物 A1.9 (200 mg, 0.444 mmol) 溶在二甲亚砜(2 mL)中,加入 IBX (311 mg, 1.11 mmol),室温下搅拌2小时,然后补加入 IBX (186 mg, 0.666mmol)于反应液中,再向反应液中加入四氢吡咯(6.3 mg, 0.089 mmol)和乙腈(3 mL),反应液在室温下搅拌过夜。LCMS 检测反应完成,用乙酸乙酯萃取(20 mL x 3),有机相经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,旋干,得到粗产品,粗产品通过硅胶柱纯化(DCM : MeOH = 50 : 1 to 10 : 1)得到目标化合物(S,E)-14-(3-氧代-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.13-A, 100 mg, 纯度 50.0 %, 收率 25.0%)为黄色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 447.1$ 。

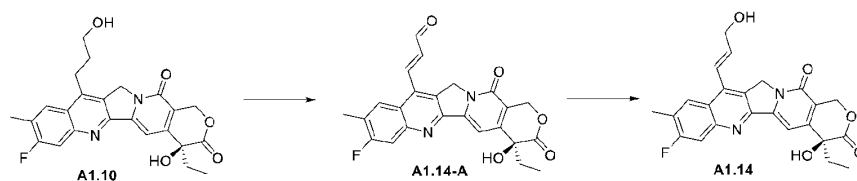
步骤二:

将化合物 A1.13-A (40 mg, 0.09 mmol) 溶在四氢呋喃(1 mL)中,然后向反应液中加入氰基硼氢化钠(28 mg, 0.448mmol),在室温下搅拌过夜。LCMS 显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品,粗产品纯化通过 prep-HPLC (HCl in water/MeCN) 得目标化合物(3.56 mg, 纯度 93.6 %, 收率 9.0 %)为淡黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 449.2$;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.61 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 6.69 - 6.59 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 5.16 (br s, 1H), 4.34 (br s, 2H), 1.93 - 1.81 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

实施例 A1.14: (S,E)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.14)的合成



步骤一:

向 25 mL 的单口瓶中加入化合物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.10, 100 mg, 0.228 mmol), DMSO (0.5 mL) 和乙腈 (0.75 mL), 依次加入 IBX (160 mg, 0.571 mmol) 和 (*R*)-二苯基(吡咯烷-2-基)甲醇 (12 mg, 0.047 mmol), 室温下继续搅拌反应 16 小时, 然后向反应液中加入甲醇和二氯甲烷混合溶剂 (200 mL) (DCM:MeOH=10:1), 饱和食盐水 (300 mL) 萃取, 合并有机相, 水洗、干燥、过滤, 滤液减压蒸干溶剂得粗品, 粗品用快速 Flash 纯化 (DCM:MeOH=10:1) 得到目标化合物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-氧代丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.14-A, 40 mg, 收率 40%)。

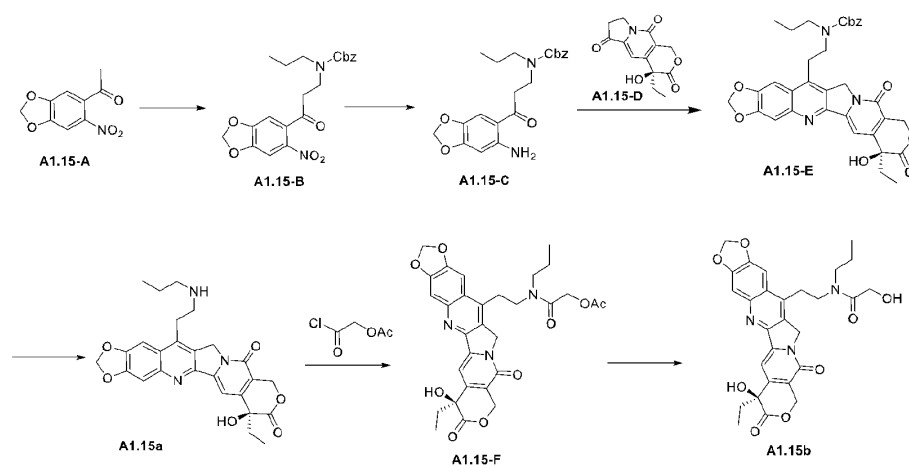
LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 435.1$.

步骤二:

向 50 mL 的三口瓶中加入化合物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-氧代丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.14-A, 40 mg, 0.228 mmol), 无水 THF (5 mL), N_2 保护下降温至 $-78^\circ C$, 缓慢滴加三仲丁基硼氢化锂的 THF 溶液 (0.11 mL, 1N), 保持 $-78^\circ C$ 继续搅拌 1 小时。反应完成后加入饱和氯化铵水溶液淬灭反应, 升至室温, 用饱和食盐水稀释 (50 mL), 用乙酸乙酯萃取 (20 mL X 3), 合并有机相水洗、干燥、过滤, 减压蒸干溶剂得到 (S,E)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.14, 28 mg) 为类白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 437.1$ 。

实施例 A1.15: (S)-7-乙基-7-羟基-14-(2-(正丙基氨基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.15a) 和 (S)-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基-N-正丙基乙酰胺 (A1.15b) 的合成



步骤一:

将化合物 A1.15-A (5.0 g, 23.9 mmol), 丙基胺盐酸盐 (22.8 g, 239 mmol) 和多聚甲醛 (7.18 g, 239 mmol) 溶于乙醇 (100 mL) 中, 110 ° C 下闷罐反应 12 小时。LCMS 检测反应完全。反应液降至室温并减压浓缩, 向反应固体中加入二氯甲烷 (100 mL), 用水 (80 mL X 3) 洗涤, 水相用碳酸氢钠调至 pH = 9。向水溶液中加入苄氧基碳酸氯 (3.7 g, 21.8 mmol), 在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。用二氯甲烷 (100 mL X 3) 萃取, 有机相经饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 浓缩得到粗品, 粗产品经柱层析分离纯化 (石油醚: 乙酸乙酯=10/1) 得到目标化合物 A1.15-B (1.5 g, 收率 20.1%) 为黄色油状液体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 415.1$;

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H), 7.35 (m, 6H), 6.18 (s, 2H), 5.17 - 5.12 (m, 2H), 3.69 - 3.67 (m, 2H), 3.32 - 3.30 (m, 2H), 3.09 - 2.90 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 0.90 (m, 3H)。

步骤二:

将化合物 A1.15-B (1.5 g, 3.63 mmol) 溶于饱和氯化铵 (20 mL) 和乙醇 (20 mL) 混合溶液中, 然后向反应液中加入铁粉 (1.02 g, 18.1 mmol), 反应在 80 ° C 下搅拌 1 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤, 滤液减压浓缩成固体, 粗产品用 C18 柱反相分离纯化 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 55%) 得到目标化合物 A1.15-C (600 mg, 收率 43.0%) 为黄色固体

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 385.2$, $t_R = 1.329$ min.

步骤三:

室温下, 将化合物 A1.15-C (350 mg, 0.91 mmol), 化合物 (S) -4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H)-三酮 (A1.15-D, 218 mg, 0.83 mmol) 和对甲苯磺酸 (170 mg, 0.87 mmol) 溶于二氯甲烷 (5 mL) 溶液中, 溶液澄清混匀后减压浓缩, 用油泵抽至真空, 反应在 120 ° C 真空下反应 2 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液降至室温, 加入水 (50 mL), 用二氯甲烷 (30 mL X 3) 萃取, 合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 A1.15-E (390 mg, 收率 76%) 为褐色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 612.0$ 。

步骤四：

室温下，将化合物 A1.15-E (390 mg, 0.638 mmol) 溶于二氯甲烷 (5 mL) 溶液中，0° C 氮气保护下滴加三甲基碘硅烷 (510 mg, 2.55 mmol)，反应体系室温搅拌 2 小时。向反应液中加入乙醚 (2 mL) 和浓盐酸 (4 mL)，搅拌 30 分钟，用饱和碳酸氢钠将反应体系调至 H = 9，用二氯甲烷 (50 mL X 5) 萃取，合并有机相经无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到化合物 A1.15a (200 mg, 收率 66.1%) 为米白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 478.2$;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.30 (s, 1H, HCO₂H), 7.67 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.62 - 6.41 (m, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.27 - 3.25 (m, 2H), 2.91 - 2.79 (m, 2H), 2.58 - 2.56 (m, 2H), 1.91 - 1.79 (m, 2H), 1.44 - 1.42 (m, 2H), 0.90 - 0.84 (m, 6H)。

步骤五：

室温下，将化合物 A1.15a (120 mg, 0.251 mmol) 溶于二氯甲烷 (5 mL) 中，0° C 下滴加化合物乙酰氧基乙酰氯 (167 mg, 1.25 mmol) 和三乙胺 (133 mg, 1.25 mmol)，反应在 0° C 下搅拌反应 30 分钟。LCMS 检测反应完全。将反应液减压浓缩得到粗品化合物 A1.15-F (120 mg, 收率 82.8%) 为黄色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 578.3$ 。

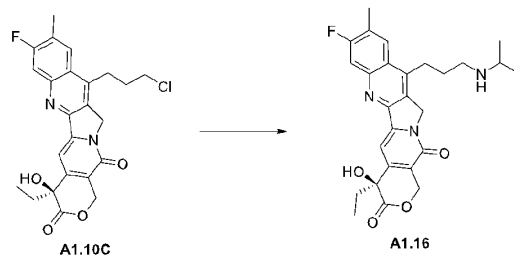
步骤六：

室温下，将化合物 A1.15-F (120 mg, 0.207 mmol) 溶于乙醇 (4 mL) 中，然后向反应液中加入浓盐酸 (2 mL)，反应在 70° C 下搅拌反应 1 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液加入水 (20 mL)，用二氯甲烷 (30 mL X 5) 萃取，合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到化合物 A1.15b (20 mg, 收率 18.1%) 为米白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 536.2$;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.93 (s, 0.7H), 7.69 (s, 0.3H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.35 (s, 1.5H), 5.29 (s, 0.5H), 4.65 - 4.62 (m, 1H), 4.13 - 3.97 (m, 2H), 3.51 - 3.49 (m, 2H), 3.33 - 3.30 (m, 2H), 3.24 - 3.20 (m, 2H), 1.86 - 1.84 (m, 2H), 1.60 - 1.52 (m, 2H), 0.89 - 0.86 (m, 6H)。

实施例 A1.16: (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-异丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.16) 的合成

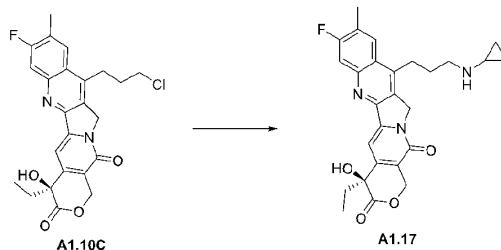


向 A1.10-C (200 mg, 0.439 mmol) 和异丙基胺 (50 mg, 0.877 mmol) 的 DMF 溶液 (10 mL) 中加入二异丙基乙胺 (170 mg, 1.32 mmol) 和碘化钠 (99 mg, 0.659 mmol), 反应在 50° C 封管下反应 2 小时。向反应液中加入乙酸乙酯, 有机相经饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩得到粗品。粗品经 pre-TLC 分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=10:1) 后得到黄色固体, 化合物继续经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到目标化合物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-异丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.16, 2.03 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 480.2$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.27 (s, 1H, HCO₂H), 7.92 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 3.30 - 3.22 (m, 3H), 3.18 - 3.10 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.06 - 1.94 (m, 2H), 1.93 - 1.80 (m, 2H), 1.26 - 1.20 (m, 6H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)。

实施例 A1.17: (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-环丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.17) 的合成

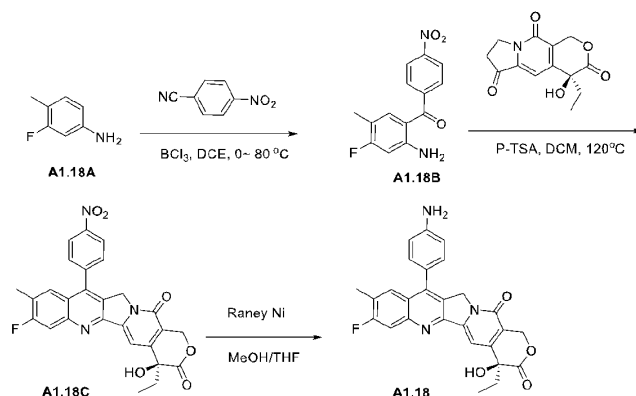


向 A1.10C (200 mg, 0.439 mmol) 和环丙基胺 (52 mg, 0.881 mmol) 的 DMF 溶液 (10 mL) 中加入二异丙基乙胺 (165 mg, 1.28 mmol) 和碘化钠 (96 mg, 0.640 mmol), 反应在 50° C 封管下反应 2 小时。LCMS 监测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯, 有机相经饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩得到粗品。粗品经 TLC 分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=10:1) 后继续经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到目标化合物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-环丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.17, 5.12 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 478.2$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.22 (br s, 2H, one is HCO₂H), 7.86 (br s, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.24 - 3.19 (m, 2H), 2.75 - 2.68 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.16 - 2.09 (m, 1H), 1.95 - 1.76 (m, 4H), 0.91 - 0.83 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.43 - 0.33 (m, 2H), 0.31 - 0.21 (m, 2H)。

实施例 A1.18: (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(4-氨基苯基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.18) 的合成



步骤一:

氮气保护下, 将 3-氟-4-甲基苯胺 (A1.18A, 2.0 g, 16.3 mmol) 溶在 1,2-二氯乙烷 (40 mL) 中, 在 0 °C 下向其中滴加三氯化硼 (19.2 mL, 19.2 mmol) 后, 再缓慢加入对硝基苯腈 (2.8 g, 19.2 mmol), 加入完毕将反应液升至 80 °C 搅拌过夜。将反应液冷却至室温向其中加入盐酸 (40 mL, 2M), 后升温至 80 °C 继续搅拌 30 分钟, 经 LCMS 检测反应完全后, 向反应液中加入水 (80 mL), 用二氯甲烷萃取 (100 mL $\times$ 3), 合并有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 粗产品经硅胶柱色谱 (PE:EA=10:1) 纯化得目标化合物 (A1.18B, 2.0 g, 收率 46.5%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 275.1$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.39 (s, 2H), 7.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 2.00 (s, 3H)。

步骤二:

将化合物 A1.18B (620 mg, 2.28 mmol), (S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]中氮茚-3,6,10(4H)-三酮 (600 mg, 2.28 mmol), 对甲苯磺酸 (560 mg, 2.96 mmol) 加入到反应瓶中, 用二氯甲烷将其溶解均匀, 将二氯甲烷旋干, 抽真空, 在真空状态下将其加热到 120 °C, 在此温度下保持六个小时, 经 LCMS 检测反应完成后, 向体系中加入甲醇 (10 mL), 再加入水 (80 mL) 有大量沉淀析出, 沉淀过滤后干燥得到目标化合物 (A1.18C, 800 mg, 收率 80.0%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 502.2$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.52 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.13 - 7.89 (m, 3H), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.06 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.94 - 1.84 (m, 2H), 0.87 (m, 3H)。

步骤三:

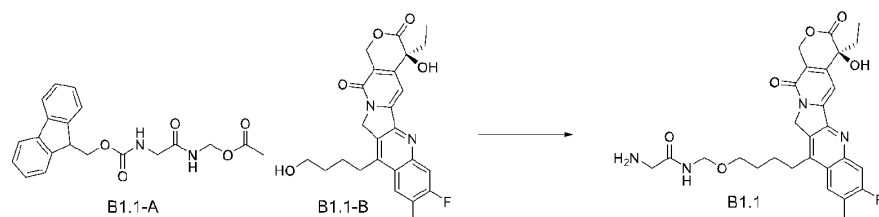
将雷尼镍 (609 mg, 10.5 mmol) 加入到化合物 A1.18C (1.0 g, 2.1 mmol) 的甲醇 (25 mL) 和四氢呋喃 (50 mL) 混合溶液中, 反应液在室温氢气氛围下搅拌 5 小时。LCMS 检测反应完全, 将反应液过滤, 滤液旋干得到目标化合物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(4-氨基苯基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (A1.18, 650 mg, 收率 67%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 472.3$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.93 - 7.81 (m, 2H), 7.40 - 7.25 (m, 3H), 6.81 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.93 - 1.80 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

B、含生物活性分子片段中间体的合成

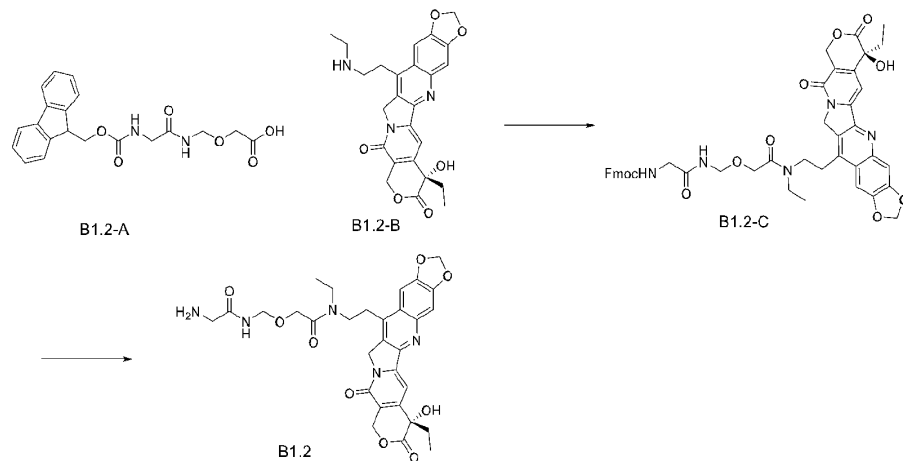
实施例 B1.1: (S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙酰胺 (B1.1) 的合成



化合物 (B1.1-A) (368mg), 化合物 (B1.1-B) (452mg) 和对甲苯磺酸吡啶盐 (PPTS) (25mg) 在二氯甲烷 (20ml) 中回流 20 小时, 然后用碳酸氢钠水溶液和盐酸水溶液分别洗涤, 减压除去有机溶剂, 残留物溶于 DMF (5ml), 加入哌啶 (1ml), 化合物搅拌 20 分钟, 溶于减压除去大部分低沸点组分, 残留物制备 HPLC 分离得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙酰胺 (B1.1)。

ESI-MS (m/z): 539 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 B1.2: (S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺 (B1.2) 的合成



步骤一:

依次将化合物 B1.2-A (274 mg), 二异丙基乙胺 (334 mg) 和 HBTU (369 mg) 加入 N,N-二甲基甲酰胺 (10 mL) 中, 随后加入化合物 B1.2-B (300 mg)。反应液在室温下搅拌 2 小时。向反应液中加入乙酸乙酯 (50 mL), 用饱和食盐水 (30 mL X 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压浓缩成固体, 粗产

品经柱层析分离纯化（二氯甲烷：甲醇=10/1）得到目标化合物 B1.2-C（300 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 830.2;

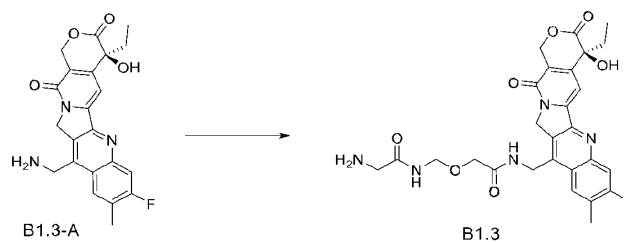
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.74 (s, 1H), 7.91 - 7.84 (m, 2H), 7.80 - 7.67 (m, 2H), 7.65 - 7.54 (m, 2H), 7.53 - 7.46 (m, 1H), 7.45 - 7.37 (m, 2H), 7.36 - 7.27 (m, 2H), 7.25 - 7.23 (m, 1H), 6.57 - 6.44 (m, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.50 - 5.19 (m, 4H), 4.71 - 4.57 (m, 2H), 4.32 - 3.97 (m, 7H), 3.80 - 3.53 (m, 4H), 3.20 - 3.14 (m, 2H), 1.92 - 1.80 (m, 2H), 1.28 - 1.22 (m, 3H), 0.87 - 0.82 (m, 3H).

步骤二:

向化合物 B1.2-C（300 mg）的 N,N-二甲基甲酰胺（4 mL）溶液加入哌啶（1 mL），反应液在室温下搅拌 20 分钟。反应液除去低沸点组分后得到目标产物，直接用于下步合成。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 608.0。

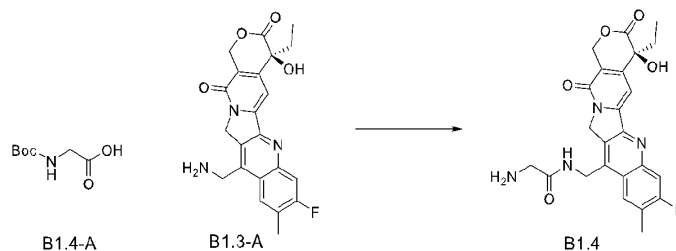
实施例 B1.3: (S)-2-氨基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺 (B1.3) 的合成



用实施例 B1.1 相同的方法和反应条件，用化合物 (B1.3-A) 代替 (B1.2-B)，得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺 (B1.3)。

ESI-MS (m/z): 554 $[M+H]^+$ 。

实施例 B1.4: (S)-2-氨基-N-((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙酰胺 (B1.4) 的合成

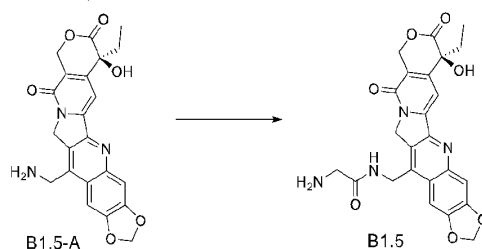


向化合物 (B1.4-A)（175mg），化合物 (B1.3-A)（409mg）的 DMF（5ml）溶液中加入 DIPEA（200ul），HBTU（420mg）。化合物室温小搅拌反应 20 小时，混合物加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），减压除去有机溶剂，然后向残留物中加入 1:1 DCM/TFA（10ml），室温放置 20 分钟。减压除去低沸点组分，残留物用制备 HPLC 分离得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲

基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙酰胺 (B1.4)。

ESI-MS (m/z): 467 $[M+H]^+$ 。

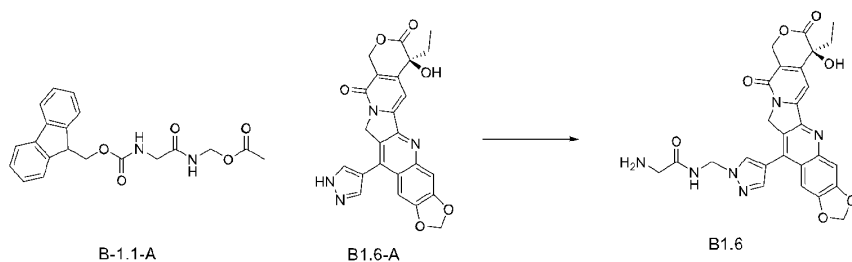
实施例 B1.5: (S)-2-氨基-N-((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙酰胺 (B1.4) 的合成



将 B1.5-A (200 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL) 中, 依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (154.80 mg), 2,5-二氧吡咯烷-1-基(叔丁氧羰基)甘氨酸(157mg)于反应液中, 反应液在 25 °C 下搅拌 60 分钟。向反应液中加入水 (30 mL), 抽滤, 干燥滤饼得到白色固体产物 (ESI-MS (m/z): 579.4 $[M+H]^+$)。将上述白色固体产物溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为 1:3; 4 mL)中, 反应液室温下搅拌 1 小时。然后将反应液浓缩得粗产品, 粗产品用 C18 柱反相分离纯化(乙腈/0.05%甲酸水溶液: 5%到 50%)得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙酰胺 (B1.5, 110mg)。

ESI-MS (m/z): 479.3 $[M+H]^+$ 。

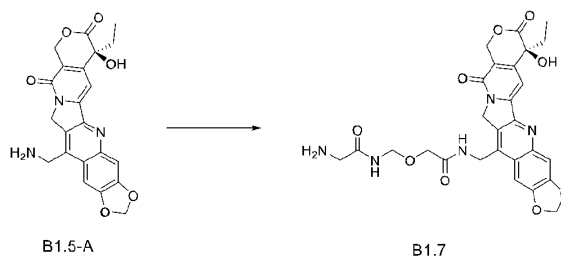
实施例 B1.6: (S)-2-氨基-N-((4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡啶-1-基)甲基)乙酰胺 (B1.6) 的合成



用实施例 B1.1 相同的方法和反应条件, 用化合物 (B1.6-A) 代替化合物 (B1.1-B), 得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡啶-1-基)甲基)乙酰胺 (B1.6)。

ESI-MS (m/z): 545 $[M+H]^+$ 。

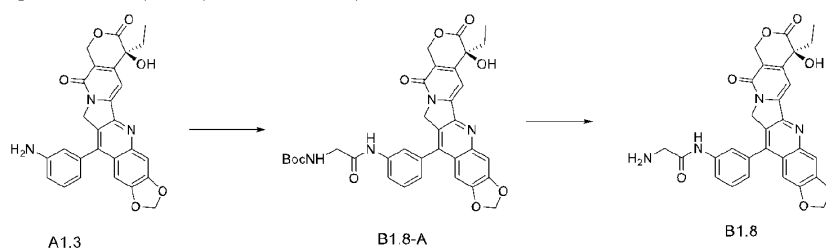
实施例 B1.7: (S)-2-氨基-N-((2-(((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺 (B1.7) 的合成



用实施例 B1.2 相同的方法和反应条件, 用化合物 (B1.5-A) 代替化合物 (B1.2-B), 得到含目标产物 (S)-2-氨基-N-((2-((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)甲基)乙酰胺 (B1.7) 的混合物, 上述混合物直接用于下面合成反应。

ESI-MS (m/z): 566 $[M+H]^+$ 。

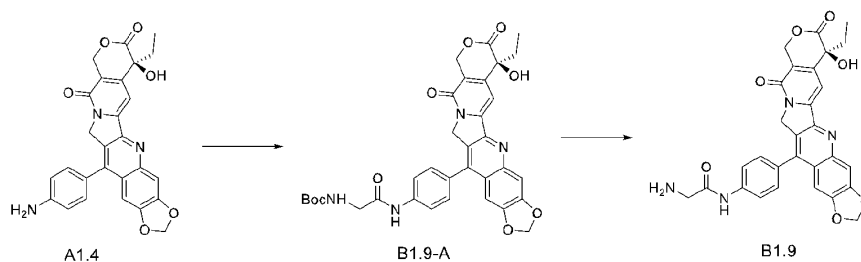
实施例 B1.8: (S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺 (B1.8) 的合成



用实施例 B1.4 相同的方法和反应条件, 用化合物 (A1.3) 代替化合物 (B1.3-A), 得到目标产物 (S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺 (B1.8)。

ESI-MS (m/z): 541 $[M+H]^+$ 。

实施例 B1.9: (S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺 (B1.9) 的合成



用实施例 B1.4 相同的方法和反应条件, 用化合物 (A1.4) 代替化合物 (B1.3-A), 得到目标产物 (S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺 (B1.9)。或者采用下列反应条件得到目标产

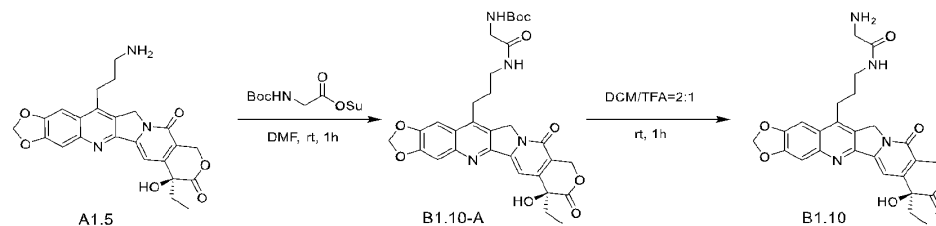
物。

将化合物 A1.4 (60 mg, 0.12 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (3 mL), 依次加入 (叔丁氧羰基) 甘氨酸 (26 mg, 0.15 mmol)、HATU (56 mg, 0.15 mmol), N,N-二异丙基乙胺 (48 mg, 0.37 mmol), 室温下搅拌 1 小时, TLC 检测反应完成。然后直接向上述反应液中加入 TFA (1.0 mL)。在室温下继续搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成, 将反应液浓缩除去三氟乙酸得粗产物, 粗产物经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标产物 (S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺 (B1.9) (26.3 mg, 收率 38%) 为黄色固体。

ESI-MS (m/z): 541 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.71 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 7.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.67-7.58 (m, 3H), 7.29 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)。

实施例 B1.10: (S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙酰胺 (B1.10) 的合成



步骤一:

室温下, 向化合物 A1.5 (200 mg) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (5 mL) 中加入三乙胺 (67 mg) 和 2,5-二氧吡咯烷-1-基 (叔丁氧羰基) 甘氨酸 (182 mg), 在室温下反应 1 小时。反应液加入水 (30 mL) 稀释, 乙酸乙酯 (30 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得到粗产品, 粗产品用 C18 柱 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液: 5%-60%) 进一步纯化得到目标化合物 (B1.10-A, 100 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 607。

步骤二:

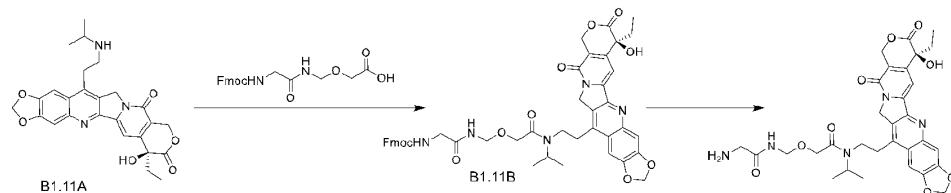
向化合物 B1.10-A (100 mg) 的二氯甲烷溶液 (4 mL) 中, 加入三氟乙酸 (2 mL), 在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液浓缩, 粗品加入 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (3 mL), 用 C18 柱 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液: 5%-60%) 进一步纯化得到目标化合物 (S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙酰胺 (B1.10, 80 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 507;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.26 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.30 - 3.27 (m, 2H),

3.13 - 3.07 (m, 2H), 2.04 - 1.76 (m, 4H), 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)。

实施例 B1.11: (S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺 (B1.11) 的合成



步骤一:

将化合物 1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧-2,9-二氧-4,7-二氮杂环-11-甲酸 (242 mg), 二异丙基乙胺 (330 mg) 和 N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (359 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (10 mL) 溶液中。随后加入化合物 (S)-7-乙基-7-羟基-14-(2-(异丙胺基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (300 mg), 反应在室温下反应 2 小时。向反应液中加入乙酸乙酯 (50 mL), 用饱和食盐水 (30 mL X 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压浓缩成固体, 粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=10/1) 得到目标化合物化合物 B1.11B (220 mg)。

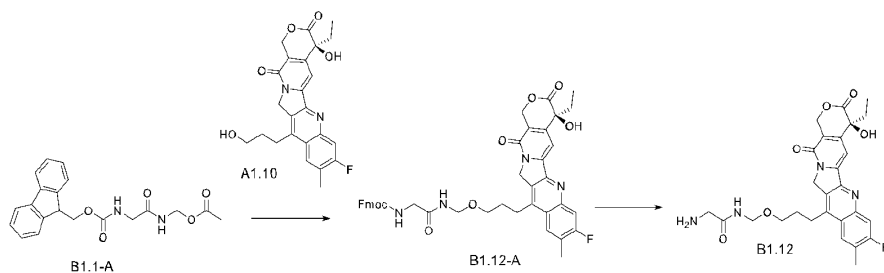
LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 844.0。

步骤二: (S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺的制备

向化合物 B1.11B (220 mg, 0.261 mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (4 mL) 溶液中加入哌啶 (1 mL), 反应在室温下搅拌 20 分钟。LCMS 检测反应反应完全。反应液减压浓缩得到目标化合物 (220 mg) 为褐色固体, 上述产物未经纯化直接用于下步合成。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 622.1。

实施例 B1.12: (S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙酰胺 (B1.12) 的合成



步骤一:

将化合物 A1.10 (160 mg, 0.365 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (3 mL) 中, 加入 (2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰胺基)甲基乙酸酯 (B1.1-A, 672 mg, 1.83 mmol), 然后加入盐酸乙酸

乙酯 (0.073mL, 3M) 于反应液中, 反应液在室温下搅拌过夜。LCMS 检测反应完成。该反应液直接经反相色谱 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 纯化后得目标化合物 (80 mg, 收率 29.0%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 747.4$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.74 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.28 - 8.17 (m, 1H), 7.99 - 7.88 (m, 3H), 7.73 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.63 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 6.58 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.66 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.32 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.26 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.29 - 3.20 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.00 - 1.86 (m, 4H), 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

步骤二: B1.12-A (240mg) 溶于 DMF (5ml), 加入哌啶 (1ml), 化合物搅拌 20 分钟, 溶于减压除去低沸点组分, 残留物直接用于下步合成。

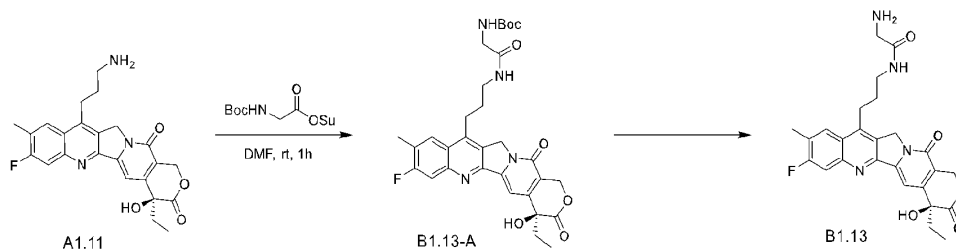
ESI-MS (m/z): 525.2 $[M+H]^+$ 。

少量粗产物经反相色谱 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 纯化后得目标化合物。

ESI-MS (m/z): 525.1 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.13 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.02 (brs, 2H), 7.89 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.66 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.53 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.25-3.18 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.98-1.84 (m, 4H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)。

实施例 B1.13: (S)-2-氨基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙酰胺 (B1.13) 的合成



步骤一:

室温下, 向化合物 A1.11 (200 mg) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (5 mL) 中加入三乙胺 (67 mg) 和 2,5-二氧吡咯烷-1-基 (叔丁氧羰基) 甘氨酸 (182 mg), 在室温下反应 1 小时。反应液加入水 (30 mL) 稀释, 乙酸乙酯 (30 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得到粗产品, 粗产品用 C18 柱 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液: 5%-60%) 进一步纯化得到目标化合物 (B1.13-A, 104 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ : 595$ 。

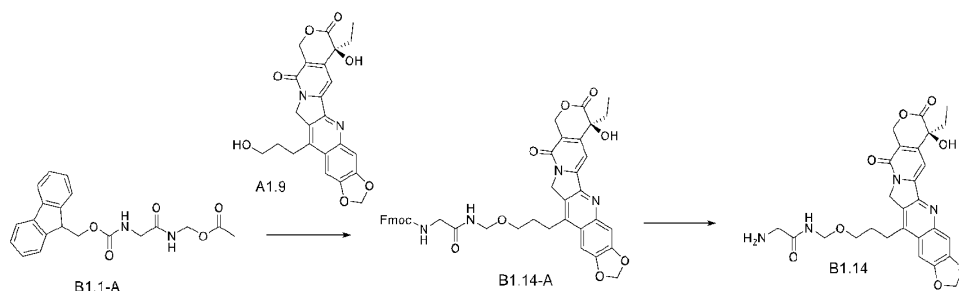
步骤二:

向化合物 B1.13-A (100 mg) 的二氯甲烷溶液 (4 mL) 中, 加入三氟乙酸 (2 mL), 在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液浓缩, 粗品加入 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (3mL), 用 C18 柱 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液

液：5%-60%) 进一步纯化得到目标化合物(S)-2-氨基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙酰胺 (B1.13, 88 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 495。

实施例 B1.14: (S)-2-氨基-N-((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)丙氧基)甲基)乙酰胺 (B1.14) 的合成



步骤一：化合物 (B1.1-A) (368mg)，化合物 (A1.9) (440mg) 和对甲苯磺酸吡啶盐 (PPTS) (25mg) 在二氯甲烷 (20ml) 中回流 20 小时，然后用碳酸氢钠水溶液和盐酸水溶液分别洗涤，减压除去有机溶剂，得到粗产物，粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷：甲醇=10/1) 得到目标化合物化合物 B1.14A (240 mg)。

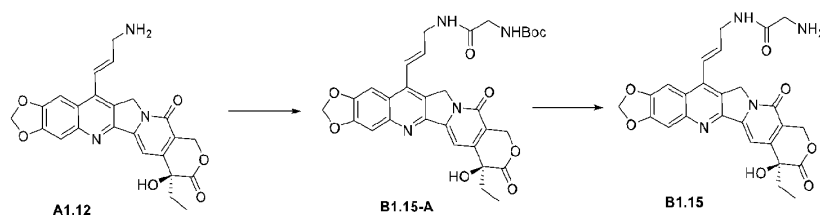
LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 759.5。

步骤二：B1.14-A (240mg) 溶于 DMF (5ml)，加入哌啶 (1ml)，化合物搅拌 20 分钟，溶于减压除去低沸点组分，残留物直接用于下步合成。少量粗产物经反相色谱 (乙腈/0.05%FA 的水溶液：5%到 50%) 纯化后得目标化合物。

ESI-MS (m/z): 537.4 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.13 (t, 1H), 8.04 (br, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.65 (d, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.87 (m, 4H), 0.88 (t, 3H)。

实施例 B1.15: (S,E)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)乙酰胺



步骤一：

室温下，向化合物 A1.12 (200 mg, 0.447 mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (5 mL) 中加入三乙胺 (135 mg, 1.341 mmol) 和 N-羟基-2,5-二氧吡咯烷 叔丁氧羰基甘氨酸酯 (183 mg, 0.671 mmol)，在室温下反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入水 (20 mL)，用乙酸乙酯 (20 mL×3) 萃取，有

机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到目标化合物 B1.15A (130 mg，收率：48%) 为棕色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 605.6$ 。

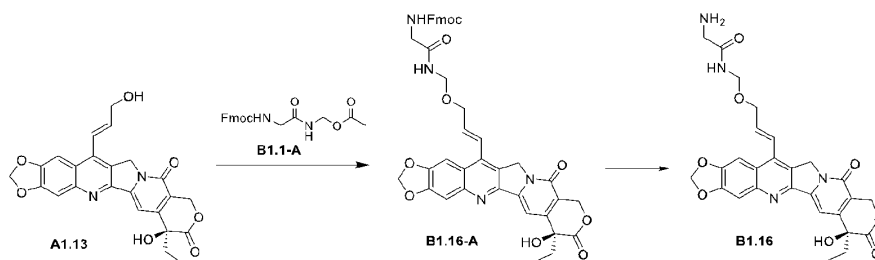
步骤二：

室温下，将化合物 B1.15-A (130 mg, 0.215 mmol) 用盐酸 1,4-二氧六环溶液 (5 mL) 溶解，在室温下反应 30 分钟。LCMS 显示反应完全。反应液通过反向纯化得到目标化合物 (60 mg，收率：52%) 为棕色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 505.2$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.85 (s, 1H), 8.15 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.21 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 1.86 - 1.82 (m, 4H), 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)。

实施例 B1.16: (S,E)-2-氨基-N-(((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺



步骤一：

在氮气保护下，将原料 A1.13 (150 mg, 0.335 mmol) 溶于甲苯 (3 mL) 中，加入 (2-(((9H-茛-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰胺基)甲基乙酸酯 (B1.1-A, 308 mg, 0.84 mmol)，然后将醋酸锌 (123 mg, 0.67 mmol) 加入到反应液中，反应液在 100°C 下搅拌过夜。LCMS 检测反应完成。该反应液直接经反相色谱 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%到 50%) 纯化后得目标化合物 (9H-茛-9-基) 甲基 (S,E)-((2-(((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯 (B1.16-A, 80 mg, 收率 31%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 757.4$ 。

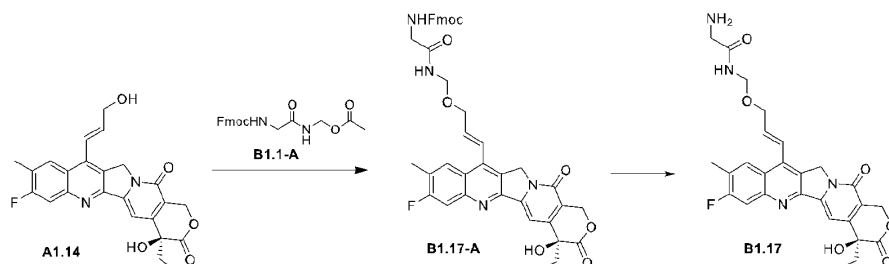
步骤二：

将化合物 B1.16-A (80 mg, 0.11 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL) 中，然后向反应液中加入哌啶 (0.05 mL)，在室温下搅拌 1 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品，粗产品用 C18 柱反相分离纯化 (乙腈/0.05%氨水的水溶液：5%到 50%) 得到目标化合物 (35 mg，收率 62%) 为棕色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 535.2$, $t_R = 1.070$ min.

实施例 B1.17: (S,E)-2-氨基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-

1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺



步骤一:

将化合物 A1.14 (80 mg, 0.183 mmol) 和化合物 (2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰胺基)甲基乙酸酯 (B1.1-A, 135 mg, 0.367 mmol) 溶于甲苯 (4 mL), 加入醋酸锌 (190 mg, 1.03 mmol), 反应液在 100 摄氏度下搅拌 48 小时。冷却至室温, 向其中加入水 (10 mL), 用乙酸乙酯 (10 mL×3) 萃取。合并有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产物, 粗产物经反相色谱 (0.05% FA 的水溶液/乙腈: 5%到 100%) 纯化后得到目标化合物 (S,E)-2-(Fmoc 氨基)-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺 (B1.17-A, 30mg) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 745.2$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.82 (m, 1H), 8.21 (m, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.84 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.61 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.33 - 7.28 (m, 4H), 6.72 - 6.55 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.75 (m, 2H), 4.34 (m, 2H), 4.28 - 4.24 (m, 2H), 4.20 (m, 1H), 3.70 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.90 - 1.82 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)。

步骤二:

将化合物 4 (25 mg, 0.034 mmol), 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL) 中, 然后加入二乙胺 (0.2 mL), 加毕, 反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液直接减压蒸干溶剂得到粗产品目标化合物 (S,E)-2-氨基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺为黄色粘稠状产品。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 523.2$;

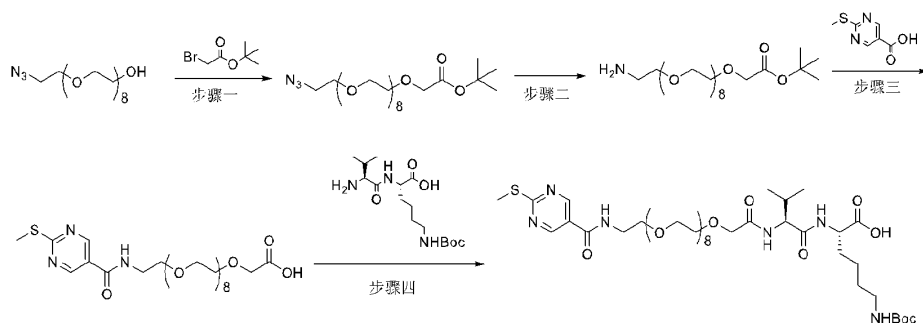
LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 523.1$, $t_R = 0.446$ min, 1.311 min.

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.26 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.06 (s, 2H), 7.91 (m, 1H), 7.40 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.70 - 6.60 (m, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 4.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.38 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H), 3.68 (d, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.90 - 1.84 (m, 2H), 0.88 (m, 3H)。

C、含偶联连接段分子片段中间体的合成

实施例 C1.1: N^6 -(叔丁氧基羰基)- N^2 -((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-

5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (化合物 Cl. 1)



步骤一：29-叠氮基-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

向 26-叠氮基-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-八氧杂-26-烷-1-醇 (4.39g) 的 DMF (40ml) 溶液中加入 NaH (0.6g, 60%)。上述混合物搅拌 30 分钟后, 加入溴乙酸叔丁酯 (2.4g)。混合物在干燥条件下搅拌 20 小时。然后向混合物中加入乙酸乙酯 (200ml) 和水 (200ml, 开始时慢慢加入), 有机相水洗 (100ml x 3), 无水硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 残留物经过硅胶柱色谱分离得到目标产物, 29-叠氮基-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯。

ESI-MS (m/z): 554 $[M + H]^+$ 。

步骤二：29-氨基-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

向 29-叠氮基-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯 (1.16g) 的乙酸乙酯 (20ml) 溶液中加入钯碳催化剂 (Pd/C, 10%, 100mg)。上述溶液在氢气气氛下搅拌 5 小时, 然后滤去钯碳后, 减压除去溶剂得到目标产物。

ESI-MS (m/z): 528 $[M + H]^+$ 。

步骤三：1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸

29-氨基-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯 (527mg) 和 2-甲硫基-嘧啶-5-羧酸 (170mg) 加入干燥 DMF (10ml), 然后在冰浴冷却下向上述溶液中依次加入 DIPEA (0.2ml), HBTU (420mg)。上述混合物室温小搅拌 20 小时。然后用乙酸乙酯 (100ml) 稀释, 水洗 (100ml x 4), 有机相无水硫酸钠干燥后, 减压除去有机溶剂, 残留物溶于 DCM (10ml), 然后加入 TFA (10ml), 混合物室温下搅拌 1 小时, 然后减压除去低沸点组分, 残留物经过制备 HPLC 分离得到 1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸。

ESI-MS (m/z): 624 $[M + H]^+$ 。

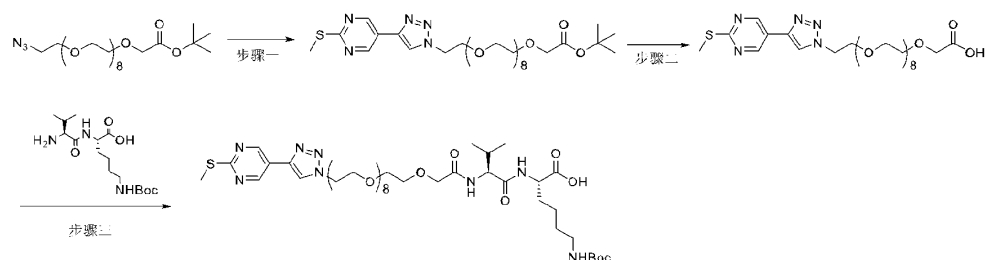
步骤四：N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸 (623mg) 溶于 DMF (10ml), 0°C 下加入 DIPEA (300ul), HBTU (420mg)。混合物搅拌 30 分钟, 然后加入缬氨酸-(Boc) 赖氨酸二肽化合物 (345mg)。反应搅拌 20 小时, 然后加入乙酸乙酯 (100ml), 稀盐酸 (20ml x 3) 洗, 有机相干燥后减压除去有机溶剂, 粗产物通过制备 HPLC 分离得到目标化合物 N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸。

基)-N²-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (化合物 C1.1)。

ESI-MS (m/z): 951 [M + H]⁺。

实施例 C1.2: N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (化合物 C1.2)



步骤一: 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

29-叠氮基-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯 (1.7g), 2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶 (450mg) 溶于 DMSO-水 (20ml, 4:1) 中, 向混合物中加入溴化亚铜 (50mg)。反应液室温下搅拌 2 小时, 然后加入乙酸乙酯 (100ml), 水洗 (100ml x 3), 干燥后减压除去有机溶剂, 粗产物用硅胶柱层析分离得到目标产物 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯。

MS (m/z): 704 [M + H]⁺。

步骤二: 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸

29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯 (1g) 溶于二氯甲烷 (10ml), 然后加入 TFA (5ml)。混合物室温静置 1 小时, 然后减压除去低沸点组分得到目标产物 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸。

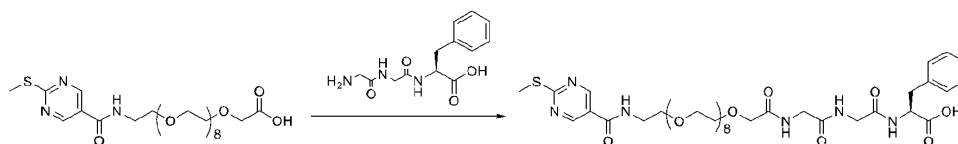
MS (m/z): 648 [M + H]⁺。

步骤三: N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酸 (647mg) 溶于 DMF (10ml), 0°C 下加入 DIPEA (300ul), HBTU (420mg)。混合物搅拌 30 分钟, 然后加入缬氨酸-赖氨酸二肽化合物 (345mg)。反应搅拌 20 小时, 然后加入乙酸乙酯 (100ml), 稀盐酸 (20ml x 3) 洗, 有机相干燥后减压除去有机溶剂, 粗产物通过制备 HPLC 分离得到目标化合物 N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (化合物 C1.2)。

ESI-MS (m/z): 975 $[M + H]^+$ 。

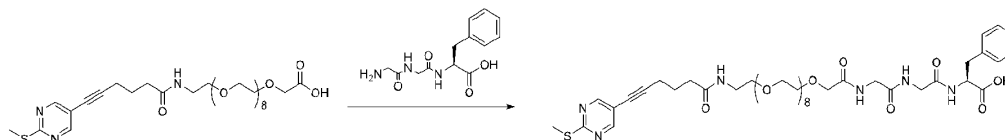
实施例 C1.3: (1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-甘氨酸-甘氨酸-L-苯丙氨酸 (化合物 C1.3)



用实施例 C1.1 步骤四相同的方法和反应条件,用相应的原料,得到目标产物 (1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-甘氨酸-甘氨酸-L-苯丙氨酸 (化合物 C1.3)。

ESI-MS (m/z): 885 $[M+H]^+$ 。

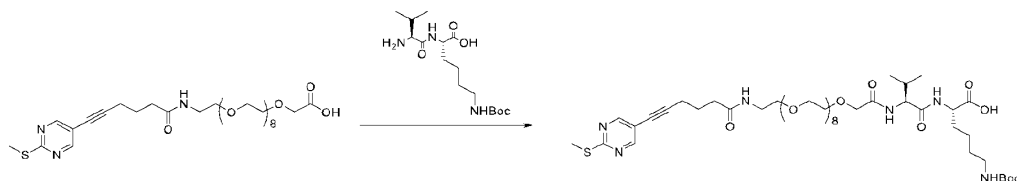
实施例 C1.4: (36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸苯丙氨酸 (化合物 C1.4)



用实施例 C1.1 步骤四相同的方法和反应条件,用反应式所示的原料,得到目标产物 (36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸苯丙氨酸 (化合物 C1.4)。

ESI-MS (m/z): 951 $[M+H]^+$ 。

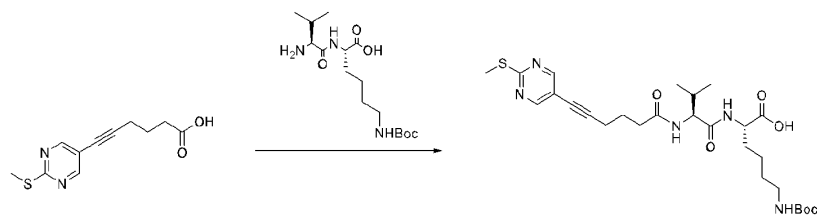
实施例 C1.5: N^6 -(叔丁氧基羰基)- N^2 -((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1.5)



用实施例 C1.1 步骤四相同的方法和反应条件,用反应式所示的化合物作为原料,得到目标产物 N^6 -(叔丁氧基羰基)- N^2 -((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (化合物 C1.5)。

ESI-MS (m/z): 1017 $[M+H]^+$ 。

实施例 C1.6: N^6 -(叔丁氧基羰基)- N^2 -((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (化合物 C1.6)

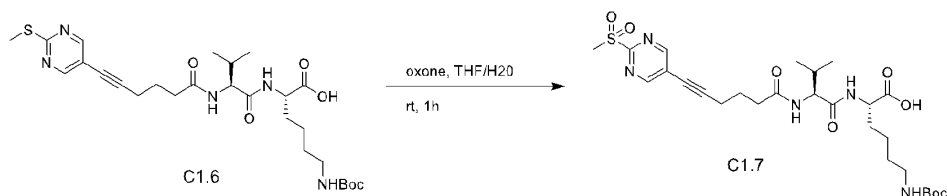


将 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (920mg) 和 N-羟基丁二酰亚胺 (537 mg) 溶于二氯甲烷 (50mL) 中, 然后加入二环己基碳二亚胺 (963 mg)。反应液室温搅拌 1 小时, 然后减压除去二氯甲烷, 残留物溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (50mL), 然后加入 N⁶-L-缬氨酸-N⁶-(Boc)-L-赖氨酸 (1.5g), 反应液室温下搅拌反应 16 小时, 将反应液倒入 200mL 水中, 用饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 至 11, 上述水溶液用乙酸乙酯萃取两次, 弃掉有机相, 将水相用柠檬酸调节 pH 到 4-5, 用乙酸乙酯 (100 mL x 3) 萃取三次, 有机相用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋蒸, 得到粗产品 2.8g, 粗产品用快速色谱法分离纯化 (DCM : MeOH = 30 : 1) 得到目标化合物 N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (1.0g) (化合物 C1.6)。

ESI-MS (m/z): 564.3 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.45 (s, 1H), 8.68 (s, 2H), 8.12 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.27 - 4.19 (m, 1H), 4.11 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 2.88 (d, J = 7.9 Hz, 3H), 2.73 (s, 1H), 2.59 (s, 1H), 2.52 (s, 4H), 2.40 - 2.24 (m, 3H), 2.03 - 1.88 (m, 2H), 1.77 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 1.68 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 1.60 - 1.49 (m, 1H), 1.36 (s, 15H), 0.85 (dd, J = 14.8, 6.7 Hz, 7H)。

实施例 C1.7: N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (化合物 C1.7)



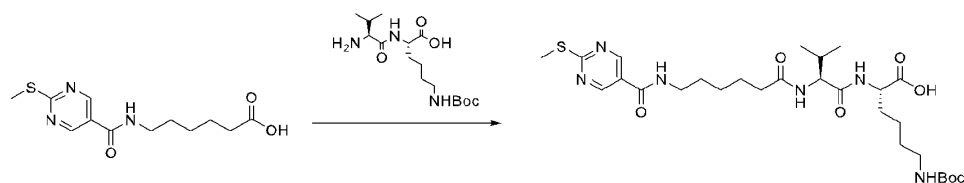
向化合物 C1.6 (260 mg) 的四氢呋喃 (3 mL) 和水 (3 mL) 混合溶液中加入过氧单磺酸钾 (1.414 g), 在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液过滤, 滤液用 C18 柱 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液: 5%-60%) 纯化得到目标化合物 N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (化合物 C1.7) (120 mg)。

LCMS (ESI) [M+H]⁺: 596;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.48 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.14 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.24 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 4.12 (br s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.89 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.43 - 2.29 (m, 2H), 2.03 - 1.93 (m, 2H), 1.82 (br s, 2H), 1.63 - 1.60 (m, 4H), 1.37 (s, 12H), 0.88 - 0.83 (m, 6H)。

实施例 C1.8: N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲酰胺基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

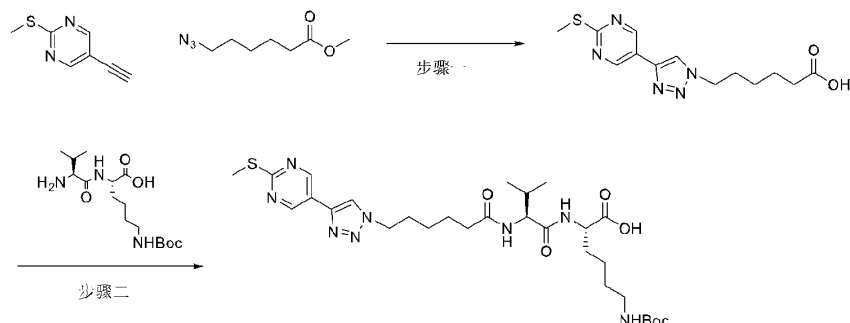
氨酸（化合物 C1.8）



用实施例 C1.6 相同的方法和反应条件，用反应式所示的已知化合物作为原料，得到目标产物 N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲酰胺基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.8）。

ESI-MS (m/z): 611 [M+H]⁺。

实施例 C1.9: N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.9）



步骤一：6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸

室温下，将 2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶（1.5g）、6-叠氮基己酸甲酯（1.71g）溶于叔丁醇与水的混合溶剂（20 mL/25 mL）中，加入维生素 C 钠（5.7 g），溴化亚铜（2.9g）搅拌反应 10 h。反应加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml x 5），干燥后除去有机溶剂，硅胶柱层析得到 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸甲酯（2.8g），ESI-MS (m/z): 321.9[M+H]⁺。上述产物溶于四氢呋喃（100ml），加入氢氧化锂（1M, 20ml），混合物搅拌 3 小时，然后加入盐酸至反应液 pH 2，然后加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml x 3），干燥，除去有机溶剂得到目标产物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸。ESI-MS (m/z): 308.4 [M+H]⁺。

步骤二：N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

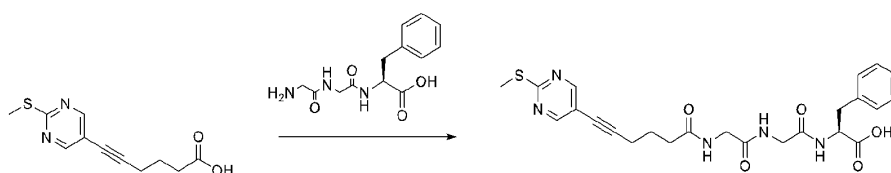
将化合物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（370 mg,）和 N-羟基丁二酰亚胺（152 mg）溶在二氯甲烷（5 mL）中搅拌，再加入二环乙基碳二亚胺（273 mg），然后反应液在室温下搅拌 1 小时。向反应液中加入 10 mL 水，用乙酸乙酯萃取（20 mL x 2），有机相用饱和食盐水洗，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到粗品。将此粗品溶解在 N,N-二甲基甲酰胺（10 mL）搅拌，加入化合物 N²-L-缬氨酸-N⁶-(Boc)-L-赖氨酸，反应液在室温下反应 16 小时，向反应液中缓慢加入柠檬酸将 pH 调至 5 左右，加入水，再用乙酸乙酯萃取（3 x 10 mL），有机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到目标产物 N⁶-(叔丁氧基羰基)-N²-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)

己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物 C1.9, 400 mg)。

ESI-MS (m/z): 635.3 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.46 (s, 1H), 9.06 (s, 2H), 9.06 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.76 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.41 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.19 (dd, $J = 8.9, 7.0$ Hz, 1H), 4.14 - 4.05 (m, 1H), 2.92 - 2.85 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.24 - 2.10 (m, 2H), 1.97 - 1.81 (m, 3H), 1.71 - 1.64 (m, 1H), 1.61 - 1.50 (m, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.28 - 1.22 (m, 6H), 0.88 - 0.76 (m, 6H)。

实施例 C1.10: (6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-(5-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物 C1.10)。

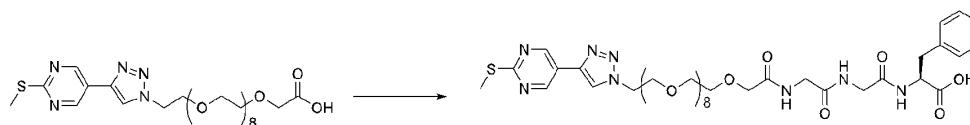


用实施例 C1.6 相同的方法和反应条件, 上述反应式所示的已知原料, 得到目标产物 (6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物 C1.10)。ESI-MS (m/z): 498 $[M+H]^+$ 。

用实施例 C1.6 相同的方法和反应条件, 利用不同的反应原料, 得到下表中目标产物。

化合物	化学结构	化学名称	ESI-MS (m/z): $[M + H]^+$
C1.11		(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸	545
C1.12		(6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸	569

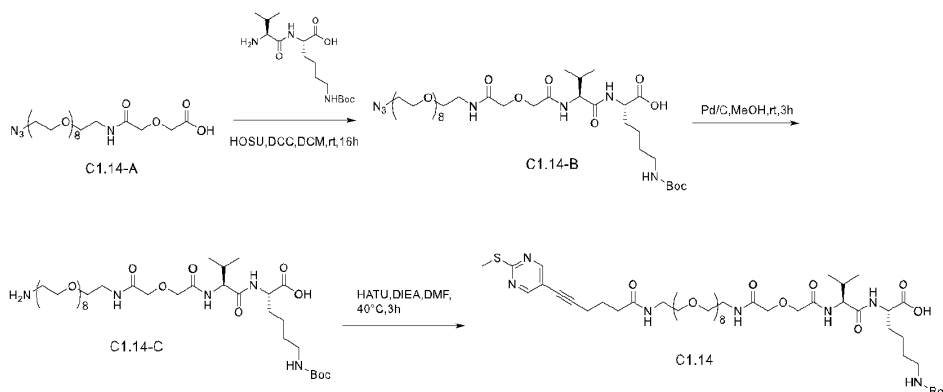
实施例 C1.13: (29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂 29 烷酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物 C1.13)。



用实施例 C1.1 步骤四相同的方法和反应条件, 利用已知原料, 得到目标产物 (29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂 29 烷酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物 C1.13)。

ESI-MS (m/z): 909 $[M+H]^+$ 。

实施例 C1.14: N^6 -(叔丁氧基羰基)- N^2 -((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6,33-二氮杂三十九烷-38-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1.14)



步骤一:

将化合物 C1.14-A (336mg) 溶于二氯甲烷 (5 mL) 中, 加入 N-羟基丁二酰亚胺 (98 mg, 0.85 mmol), 二环己基碳二亚胺 (175 mg, 0.85 mmol) 室温搅拌反应 1 小时, 然后将化合物 N^2 -L-缬氨酸- N^6 -(Boc)-L-赖氨酸 (230 mg) 加入反应液, 室温搅拌反应过夜。浓缩除去溶剂得到粗产品, 粗产品用 C18 柱反相分离纯化 (乙腈/0.01%FA 的水溶液: 5%-50%) 得到无色油状目标化合物 (C1.14B, 290 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 882.3$ 。

步骤二:

将化合物 C1.14-B (300 mg) 溶于无水甲醇 (5 mL) 中, 加入 Pd/C (10%, 60 mg), 氢气置换三次, 室温搅拌反应过夜, 抽滤, 浓缩得到目标化合物 C1.14-C (293 mg) 为无色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 856.1$ 。

步骤三:

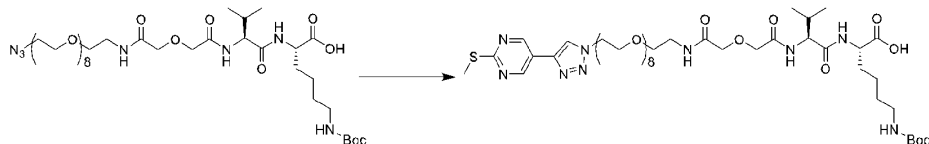
将 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (84 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (3 mL) 中, 然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (61 mg), HATU (108 mg)。反应液室温搅拌 20 分钟, 然后加入化合物 C1.14-C (196 mg), 40°C 搅拌反应 3 小时, 粗产品用 C18 柱反相分离纯化 (乙腈/0.01%FA 的水溶液: 5%-65%) 得到目标化合物 N^6 -(叔丁氧基羰基)- N^2 -((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6,33-二氮杂三十九烷-38-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1.14) (170 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1074.0$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.68 (s, 2H), 8.23 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.99 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.09 (dd, $J = 8.8$, 6.5 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.98 (d, $J = 2.9$ Hz, 2H), 3.74 - 3.70 (m, 1H), 3.50 (s, 30H), 3.45 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.39 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.26 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.20 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.12 - 2.06

(m, 1H), 1.79 - 1.74 (m, 2H), 1.67 - 1.59 (m, 1H), 1.50 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.24 (s, 2H), 1.20 - 1.09 (m, 2H), 0.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 6H)。

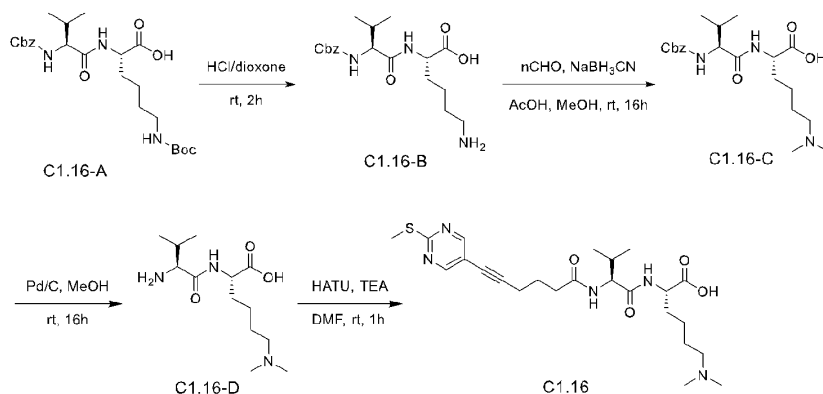
实施例 C1.15: N^6 -(叔丁氧基羰基)- N^2 -((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十二烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1.15)



将化合物 C1.14-B (130 mg), 5-乙炔基-2-甲硫基嘧啶 (44 mg), 维生素 C 钠 (3 mg) 和硫酸铜 (5 mg) 加入到叔丁醇 (2 mL) 和水 (2 mL) 的混合溶液中, 反应在室温氮气下反应 3 小时。向反应液中加入水 (10 mL), 用二氯甲烷 (30 mL $\times$ 3) 萃取, 有机相经饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 浓缩得到粗品, 粗产品 TLC 分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=10 比 1) 得到目标化合物 N^6 -(叔丁氧基羰基)- N^2 -((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十二烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1.15) (90 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1032.3$ 。

实施例 C1.16: N^6, N^6 -二甲基- N^2 -((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一:

向化合物 C1.16-A (10.0 g) 加入氯化氢-二氧六环 (100 mL) 溶液, 在室温下反应 2 小时。反应液减压浓缩得到白色固体目标化合物 C1.16-B (8.0 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ : 380.1$ 。

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.18 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.40 - 7.30 (m, 5H), 7.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.08 - 4.99 (m, 2H), 4.23 - 4.11 (m, 1H), 3.94 - 3.88 (m, 1H), 2.78 - 2.73 (m, 2H), 2.03 - 1.94 (m, 1H), 1.77 - 1.51 (m, 4H), 1.44 - 1.31 (m, 2H), 0.87 (dd, $J = 17.3, 6.6$ Hz, 6H)。

步骤二:

将化合物 C1.16-B (3.0 g) 和醋酸钠 (1.90 g) 溶于甲醇 (100 mL) 溶液中, 室温下反应 10 分钟,

向反应液中加入多聚甲醛 (2.8 g), 室温下搅拌反应 30 分钟, 再向反应液中加入氰基硼氢化钠 (1.0 g), 反应在室温下搅拌反应 16 小时。反应液过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 C1.16-C (1.70 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 408.1;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.86 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.40 - 7.26 (m, 6H), 5.03 (s, 2H), 4.08 - 4.06 (m, 1H), 3.90 - 3.85 (m, 1H), 2.50 - 2.45 (m, 2H), 2.35 (s, 6H), 2.05 - 1.93 (m, 1H), 1.73 - 1.55 (m, 2H), 1.51 - 1.40 (m, 2H), 1.33 - 1.22 (m, 2H), 0.85 (dd, J = 16.5, 6.8 Hz, 6H)。

步骤三:

室温下, 将化合物 C1.16-C (1.6 g) 溶于甲醇 (80 mL) 中, 然后向反应液中加入 Pd/C (10%, 0.16 g), 氢气下室温搅拌反应 12 小时。将反应液过滤, 滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.16-D (680 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 274.2。

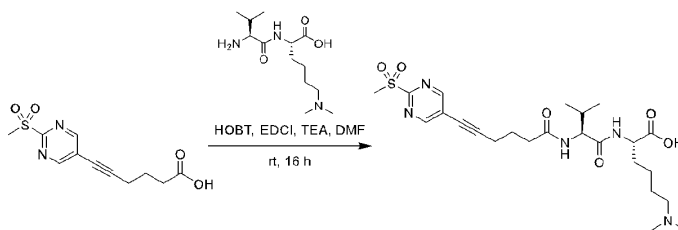
步骤四:

将 6-(2-(甲磺基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (944 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (30 mL) 中, 然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (1.3 g), 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU, 1.8 g)。反应液室温搅拌 20 分钟, 然后加入化合物 C1.16-D (1.1 g), 40 °C 搅拌反应 3 小时, 粗产品用 C18 柱反相分离纯化 (乙腈/0.01%甲酸的水溶液: 5%-65%) 得到白色固体目标化合物 N⁶,N⁶-二甲基-N²-((6-(2-(甲磺基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 C1.16 (1.2 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 492.1;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.68 (s, 2H), 8.00 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.20 (t, 1H), 4.08 (dd, J = 12.7, 7.7 Hz, 1H), 2.47 - 2.40 (m, 4H), 2.37 - 2.31 (m, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.01 - 1.92 (m, 1H), 1.82 - 1.73 (m, 2H), 1.71 - 1.56 (m, 2H), 1.49 - 1.37 (m, 2H), 1.33 - 1.23 (m, 2H), 0.88 - 0.82 (m, 6H)。

实施例 C1.17: N⁶,N⁶-二甲基-N²-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 C1.17



将 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg), 化合物 C1.16-D (328 mg), 三乙胺 (322 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL)。然后再加入 1-羟基苯并三唑 (HOBt, 162 mg) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI, 229 mg),

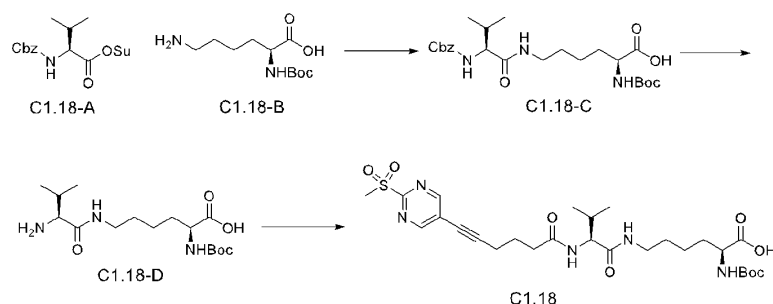
反应液室温搅拌 16 小时, 反应液直接经过 C18 柱反相 (乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系) 提纯得到

目标化合物 N^6, N^6 -二甲基- N^2 -((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1.17, 白色固体, 327 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 524.4。

1H NMR (400 MHz,) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 4.21 (dd, J = 8.8, 6.9 Hz, 1H), 4.08 - 4.03 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.55 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.42 - 2.32 (m, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.98 (dd, J = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.86 - 1.77 (m, 2H), 1.74 - 1.55 (m, 2H), 1.47 - 1.37 (m, 2H), 1.31 - 1.23 (m, 2H), 0.85 (dd, J = 12.8, 6.8 Hz, 6H)。

实施例 C1.18: N^2 -(叔丁氧基羰基)- N^6 -((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一:

化合物 C1.18-B (3 g) 溶于二氯甲烷 (30 ml), 加入 DIPEA (4 ml), 然后加入化合物 C1.18-A (3.48 g), 混合物室温下搅拌反应 20 小时。向反应液中加入乙酸乙酯 (200 ml), 混合物依次用盐酸 (0.1M, 30 ml x 3)、水 (30ml x 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后得到目标混合物 C1.18-C (4.7 g)。

步骤二:

室温下, 将化合物 C1.18-C (4.7 g) 溶于甲醇 (80 mL) 中, 然后向反应液中加入 Pd/C (10%, 0.6 g), 在氢气下室温下搅拌反应 12 小时。将反应液过滤, 滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.18-D (3.4 g)。

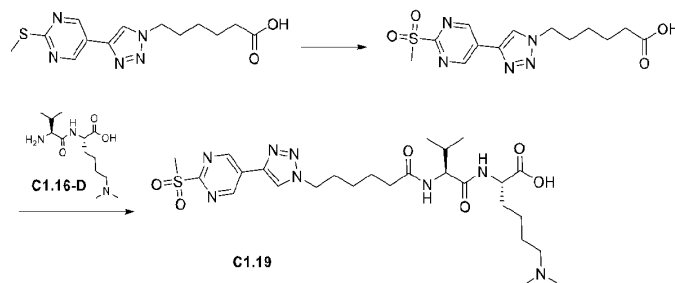
LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 346.2。

步骤三:

将 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (2.68 g), 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (50 mL), 然后再加入三乙胺 (3 ml), HBTU (3.8 g), 混合物室温下搅拌 10 分钟, 然后加入乙酸乙酯 (200 ml), 混合物用饱和碳酸氢钠 (20 ml x 2), 盐酸 (0.1M, 50 ml x 2), 水 (50 ml x 2) 洗, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到粗产物中间体, 上述粗产物溶于 DMF (30 ml), 加入 DIPEA (1.6 ml), 然后加入 C1.18-D (3.4 g), 反应液室温搅拌 3 小时, 然后加入乙酸乙酯 (200 ml), 用盐酸 (0.1M, 50 ml x 2), 水 (50 ml x 2) 洗, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到粗产物, 经硅胶柱色谱分离提纯得到目标化合物 N^2 -(叔丁氧基羰基)- N^6 -((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1.18, 白色固体, 3.8 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 596.4。

实施例 C1.19: N⁶,N⁶-二甲基-N²-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一:

将化合物 6-(4-(2-(甲磺基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (1.0 g, 3.3mmol) 溶在四氢呋喃和水 (40mL, 3:1) 混合溶液中, 加入过氧单磺酸钾 (10.0 g, 16.3mmol)。室温搅拌反应 3 小时, LCMS 检测反应完成。反应液过滤, 滤饼用 DMSO 洗涤, 合并滤液。经反相纯化 (C18, 乙腈: 0.1%甲酸 =5%-55%) 纯化, 得到 6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (750mg, 收率 67.9%) 白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 340.1$;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.48 (s, 2H), 8.95 (s, 1H), 4.49 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.22 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.95 - 1.84 (m, 2H), 1.61 - 1.50 (m, 2H), 1.36 - 1.26 (m, 2H)。

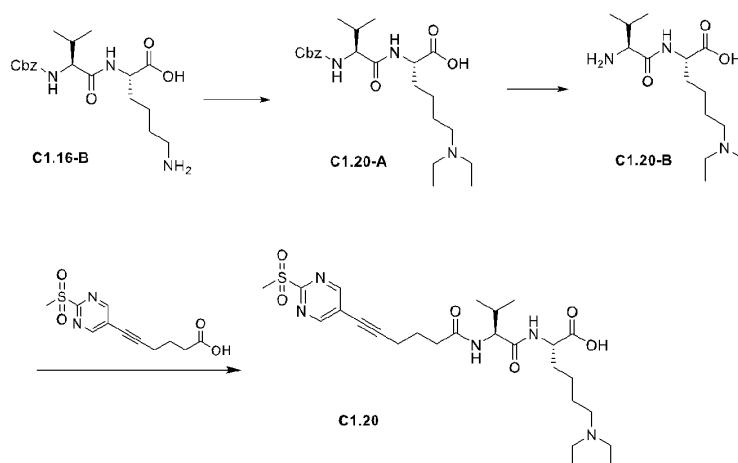
步骤二:

将化合物 6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (300 mg, 0.88mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (6mL), 加入 HATU (337 mg, 0.88mmol), DIPEA (286 mg, 2.21mmol), 室温搅拌反应 30 分钟, 然后加入二肽 C1.16-D (243 mg, 0.88 mmol), 室温搅拌反应 2 小时。LCMS 检测反应完成, 反应液通过 C18 柱分离纯化 (乙腈/0.01%FA 的水溶液: 5%-50%) 得到目标化合物 N⁶,N⁶-二甲基-N²-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (300 mg, 收率 57%) 白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 595.5$, $t_R = 2.024$ min。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.49 (s, 2H), 9.01 (s, 1H), 7.85 (br s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.48 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.17 - 4.15 (m, 1H), 4.02 (br s, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.42 (br s, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.18 - 2.14 (m, 2H), 1.99 - 1.96 (m, 1H), 1.88 (dd, $J = 14.6, 7.1$ Hz, 2H), 1.67 (br s, 1H), 1.59 - 1.53 (m, 2H), 1.43 (br s, 2H), 1.28 - 1.26 (m, 5H), 0.83 - 0.89 (m, 6H)。

实施例 C1.20: N⁶,N⁶-二乙基-N²-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一:

将化合物 C1.16-B (5.0 g, 12.05 mmol) 溶于二氯甲烷 (100 mL) 中, 向反应液中加入乙醛 (3.2 g, 72.3 mmol), 室温下搅拌反应 10 分钟, 再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠 (12.8 g, 60.25 mmol), 反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时, 旋干, 过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化 (乙腈比 0.05% 的甲酸水溶液: 5% 到 55%) 得到目标化合物 C1.20-A (4.57 g, 收率 82.0%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 436.4$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.70 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.38 - 7.26 (m, 5H), 5.08 - 4.99 (m, 2H), 4.00 (dd, $J = 12.6, 6.5$ Hz, 1H), 3.86 (dd, $J = 8.6, 6.8$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J = 14.0, 6.9$ Hz, 4H), 2.64 - 2.54 (m, 2H), 2.05 - 1.94 (m, 1H), 1.72 - 1.52 (m, 2H), 1.52 - 1.38 (m, 2H), 1.38 - 1.18 (m, 2H), 1.04 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.87 - 0.81 (m, 6H)。

步骤二:

室温下, 将化合物 C1.20-A (1.6 g, 3.68 mmol) 溶于甲醇 (80 mL) 中, 然后向反应液中加入 Pd/C (0.16 g), 氢气下室温下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤, 滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.20-B (900 mg, 收率 82%) 为米白色固体。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.04 (br s, 1H), 4.02 - 3.99 (m, 1H), 3.10 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 2.65 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.55 - 2.51 (m, 2H), 2.06 - 1.93 (m, 1H), 1.73 - 1.54 (m, 2H), 1.47 - 1.38 (m, 2H), 1.30 - 1.21 (m, 2H), 1.01 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.89 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.79 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

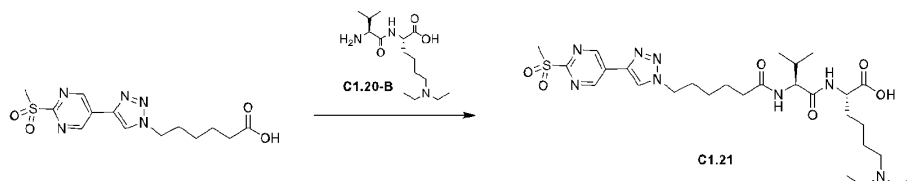
步骤三:

将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg, 1 mmol) 溶于 DMF (8 mL) 中, 依次加入 HATU (380 mg, 1 mmol) 和三乙胺 (322 mg, 2.5 mmol), 室温搅拌 20 分钟后加入化合物 C1.20-B (301 mg, 1 mmol), 室温继续搅拌 30 分钟。LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经过 C18 柱反相 (乙腈和 0.05% 的甲酸水溶液体系) 提纯得到目标化合物 (280 mg, 收率 51%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 552.3$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.18 (dd, $J = 8.8, 6.8$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J = 12.8, 7.2$ Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.74 - 2.69 (m, 4H), 2.62 - 2.52 (m, 4H), 2.44 - 2.29 (m, 2H), 2.04 - 1.94 (m, 1H), 1.86 - 1.77 (m, 2H), 1.72 - 1.54 (m, 2H), 1.51 - 1.39 (m, 2H), 1.33 - 1.23 (m, 2H), 1.02 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.87 - 0.82 (m, 6H)。

实施例 C1.21: N^6, N^6 -二乙基- N^2 -((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

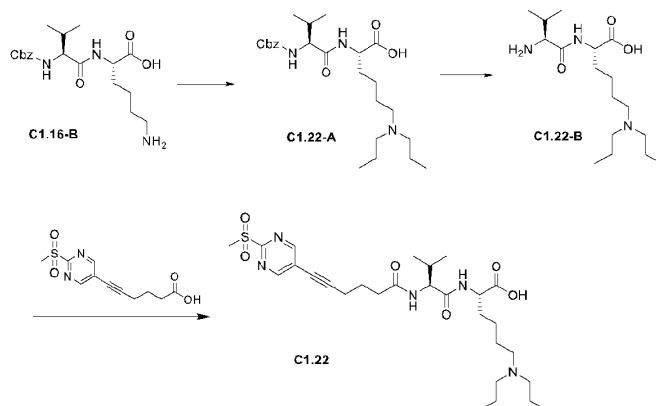


将化合物 6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (500 mg, 1.475 mmol), 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (10 mL), 然后加入 HATU (560 mg, 1.475 mmol), N, N-二异丙基乙胺 (476 mg, 3.688 mmol), 搅拌 30 分钟, 然后加入化合物 C1.20-B (444 mg, 1.475 mmol), 反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经过 C18 柱反相 (乙腈和 0.05% 的甲酸水溶液体系) 提纯得到目标化合物 N^6, N^6 -二乙基- N^2 -((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (330 mg, 收率 34%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 623.4$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 9.04 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.47 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.14 (dd, $J = 8.8, 6.6$ Hz, 1H), 4.06 - 3.95 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.67 - 2.64 (m, 4H), 2.55 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.21 - 2.10 (m, 2H), 2.02 - 1.94 (m, 1H), 1.92 - 1.84 (m, 2H), 1.72 - 1.63 (m, 1H), 1.72 - 1.63 (m, 3H), 1.59 - 1.54 (m, 2H), 1.32 - 1.21 (m, 4H), 1.01 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.81 (dd, $J = 9.6, 6.8$ Hz, 6H)。

实施例 C1.22: N^6, N^6 -二丙基- N^2 -((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一:

将化合物 C1.16-B (5.0 g, 12 mmol) 溶在二氯甲烷 (100 mL) 中, 向反应液中加入正丙醛 (4.2 g, 72.3 mmol), 室温下搅拌反应 10 分钟, 再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠 (12.8 g, 60.25 mmol), 反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时, 旋干, 过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化 (乙腈比 0.05% 的甲酸水溶液: 5% 到 55%) 得到目标化合物 C1.22-A (4.57 g, 收率 82.0%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 464.0$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.81 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.38 - 7.28 (m, 5H), 5.04 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 4.12 - 4.02 (m, 1H), 3.94 - 3.82 (m, 1H), 2.65 - 2.52 (m, 6H), 2.06 - 1.94 (m, 1H), 1.76 - 1.64 (m, 1H), 1.64 - 1.53 (m, 1H), 1.52 - 1.40 (m, 6H), 1.34 - 1.18 (m, 2H), 0.92 - 0.80 (m, 12H)。

步骤二:

室温下, 将化合物 C1.22-A (2.0 g, 4.32 mmol) 溶于甲醇 (80 mL) 中, 然后向反应液中加入 Pd/C (0.16 g), 氢气下室温下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤, 滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.22-B (1.2 g, 收率 85.5%) 为白色固体。

步骤三:

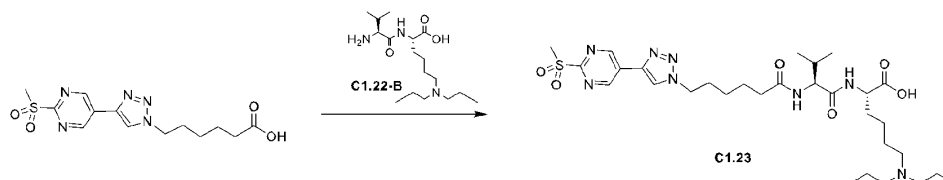
将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (100 mg, 0.373 mmol), 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (1 mL), 然后加入 HATU (142 mg, 0.373 mmol), N, N-二异丙基乙胺 (120 mg, 0.93 mmol), 该体系搅拌 30 分钟, 然后加入化合物 C1.22-B (122 mg, 0.371 mmol), 反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经过 C18 柱反相 (乙腈和 0.05% 的甲酸水溶液体系) 提纯得到目标化合物 N⁶, N⁶-二丙基-N²-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (50 mg, 收率 28%) 为淡黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 580.0$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.24 (s, 2H), 7.98 - 7.93 (m, 2H), 4.24 - 4.16 (m, 1H), 4.10 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79 - 2.64 (m, 6H), 2.55 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.45 - 2.26 (m, 2H), 2.06 - 1.91 (m, 1H), 1.89 - 1.78 (m, 2H), 1.76 - 1.66 (m, 1H),

1.64 - 1.57 (m, 1H), 1.57 - 1.42 (m, 6H), 1.37 - 1.24 (m, 2H), 0.93 - 0.78 (m, 12H)。

实施例 C1.23: N⁶, N⁶-二丙基-N²-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

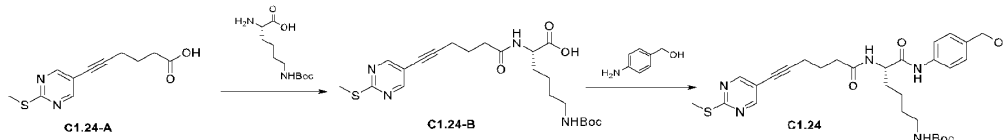


将化合物 6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (500 mg, 1.475 mmol), 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (10 mL), 然后加入 HATU (560 mg, 1.475 mmol), N, N-二异丙基乙胺 (476 mg, 3.688 mmol), 该体系搅拌 30 分钟, 然后加入化合物 C1.22-B (485 mg, 1.475 mmol), 反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经过 C18 柱反相 (乙腈和 0.05% 的甲酸水溶液体系) 提纯得到目标化合物 N⁶, N⁶-二丙基-N²-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (320 mg, 收率 33%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 651.5$;

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 9.00 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.47 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.21 - 4.11 (m, 1H), 4.09 - 4.01 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.45 - 2.35 (m, 6H), 2.23 - 2.09 (m, 2H), 1.97 - 1.86 (m, 3H), 1.72 - 1.64 (m, 1H), 1.61 - 1.50 (m, 3H), 1.43 - 1.34 (m, 6H), 1.32 - 1.22 (m, 4H), 0.86 - 0.77 (m, 12H)。

实施例 C1.24: (S)-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲磺基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯



步骤一:

将化合物 C1.24-A (3.70 g, 15.7 mmol), 二异丙基乙胺 (11.0 mL, 62.8 mmol) 和 HBTU (8.90 g, 23.6 mmol) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (30 mL) 中, 反应在室温下反应 30 分钟。随后加入化合物 Boc 保护的赖氨酸 (3.86 g, 15.7 mmol), 反应在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入柠檬酸水溶液 (30 mL) 调至 PH = 5, 用二氯甲烷 (50 mL X 3) 萃取水溶液, 合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩得到目标化合物 C1.24-B (7.0 g, 粗品) 为黄色油状物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 465.1$, $t_R = 1.751$ min.

步骤二:

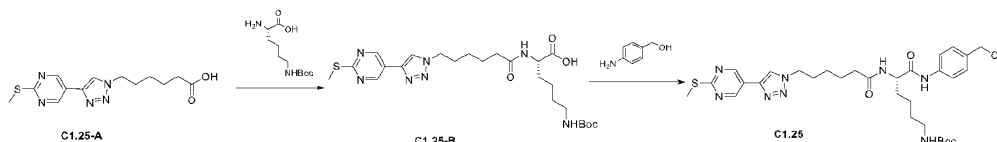
将化合物 C1.24-B (7.00 g, 5.60 mmol), 二异丙基乙胺 (10.7 mL, 60.4 mmol) 和 HBTU (8.60 g,

22.7 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (100 mL) 中, 随后加入对氨基苄醇 (3.71 g, 30.2 mmol), 反应在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯 (300 mL), 用饱和食盐水 (100 mL X 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压浓缩成固体, 粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=10/1) 得到目标化合物 (S)-(6-((4-(羟甲基) 苯基) 氨基)-5-(6-(2-(甲硫基) 嘧啶-5-基) 己-5-炔酰胺基)-6-氧代己基) 氨基甲酸叔丁酯 (6.00 g, 收率: 69.9%) 为黄色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 570.1$;

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.24 (s, 1H), 8.46 (s, 2H), 7.51 - 7.47 (m, 2H), 7.31 - 7.23 (m, 3H), 7.02 - 6.95 (m, 1H), 4.83 (br s, 1H), 4.63 - 4.60 (m, 2H), 3.19 - 2.96 (m, 4H), 2.57 (s, 3H), 2.52 - 2.48 (m, 2H), 2.47 - 2.41 (m, 2H), 1.99 - 1.92 (m, 2H), 1.87 - 1.77 (m, 2H), 1.76 - 1.63 (m, 2H), 1.43 (s, 9H)。

实施例 C1.25: (S)-(6-((4-(羟甲基) 苯基) 氨基)-5-(6-(2-(甲硫基) 嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基) 己酰胺基)-6-氧代己基) 氨基甲酸叔丁酯



步骤一:

将化合物 C1.25-A (1.60 g, 5.21 mmol), 二异丙基乙胺 (2.68 mL, 20.8 mmol) 和 HBTU (2.97 g, 7.82 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (30 mL), 反应在室温下反应 30 分钟。随后加入 Boc 保护的赖氨酸 (1.28 g, 5.21 mmol), 反应在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入柠檬酸水溶液 (30 mL) 调至 $\text{pH} = 5$, 用二氯甲烷 (50 mL X 3) 萃取水溶液, 合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩得到目标化合物 C1.25-B (3.0 g, 粗品) 为黄色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 536.0$;

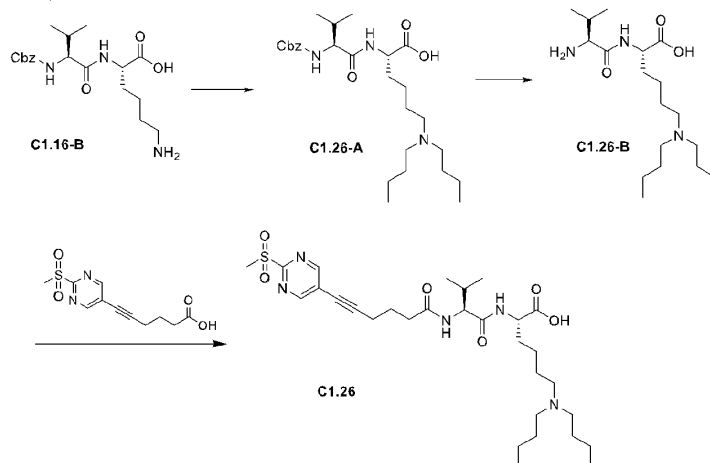
步骤二:

将化合物 C1.25-B (3.00 g, 5.60 mmol), 二异丙基乙胺 (2.89 g, 22.4 mmol) 和 HBTU (3.19 g, 8.40 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (30 mL)。随后加入对氨基苄醇 (1.38 g, 11.2 mmol), 反应在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯 (200 mL), 用饱和食盐水 (80 mL X 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压浓缩成固体, 粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=10/1) 得到目标化合物 (S)-(6-((4-(羟甲基) 苯基) 氨基)-5-(6-(2-(甲硫基) 嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基) 己酰胺基)-6-氧代己基) 氨基甲酸叔丁酯 (2.90 g) 为黄色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 641.1$;

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.13 (s, 1H), 8.95 (s, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.47 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.83 - 6.77 (m, 1H), 4.93 - 4.80 (m, 1H), 4.64 - 4.58 (m, 2H), 4.40 - 4.29 (m, 2H), 3.12 - 2.97 (m, 4H), 2.60 (s, 3H), 2.31 - 2.23 (m, 2H), 1.96 - 1.83 (m, 4H), 1.76 - 1.61 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 1.37 - 1.29 (m, 4H)。

实施例 C1.26: N^6, N^6 -二丁基- N^2 -((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一:

将化合物 C1.16-B (10.0 g) 溶于二氯甲烷 (200 mL) 溶液中, 向反应液中加入正丁醛 (10.4 g), 室温下搅拌反应 10 分钟, 再向反应液中分批次加入三乙酰氧基硼氢化钠 (25.6 g), 反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时, 旋干, 过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05% 的甲酸水溶液: 5% 到 55%) 得到目标化合物 C1.26-A (4.9 g) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 492.7$;

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35 - 7.30 (m, 5H), 5.14 - 5.08 (m, 2H), 4.33 - 4.30 (m, 1H), 4.14 - 4.12 (m, 1H), 2.94 - 2.80 (m, 6H), 2.13 - 2.11 (m, 1H), 1.85 - 1.82 (m, 2H), 1.58 - 1.55 (m, 4H), 1.40 - 1.22 (m, 8H), 0.98 - 0.87 (m, 12H)。

步骤二:

室温下, 将化合物 C1.26-A (5.0 g) 溶于甲醇 (100 mL) 溶液中, 然后向反应液中加入 Pd/C (10%, 1 g), 氢气下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤, 滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.26-B (3.68 g) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 358.3$ 。

步骤三:

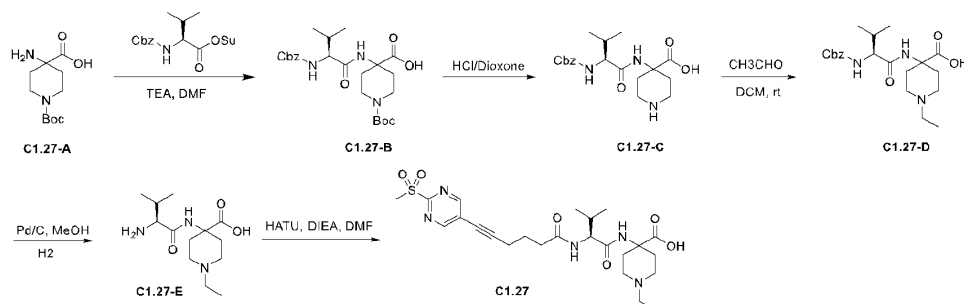
将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (1.0 g) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (15 mL), 然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (1.2 g), HATU (1.4 g), 反应搅拌 30 分钟, 然后加入化合物 C1.26-B (1.3 g), 反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 反应液, 反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 N^6, N^6 -二丁基- N^2 -((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1.26, 500 mg) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 608.7$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.37 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.19 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.25 - 4.20 (m, 1H), 4.20 - 4.13 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.06 - 2.99 (m,

6H), 2.57 - 2.53 (m, 2H), 2.41 - 2.30 (m, 2H), 1.99 - 1.95 (m, 2H), 1.87 - 1.79 (m, 2H), 1.78 - 1.71 (m, 1H), 1.62 - 1.56 (m, 4H), 1.34 - 1.32 (m, 8H), 0.94 - 0.85 (m, 12H)。

实施例 C1.27: (S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-羧酸



步骤一:

将化合物 C1.27-A (5.0 g, 20.49 mmol) 溶于 DMF (100 mL) 中, 向反应液中加入 N-((苄氧基)羰基)-L-缬氨酸 2,5-二氧吡咯烷-N-羧基酯 (7.13 g, 20.49 mmol), 100°C 下搅拌反应 48 小时。LCMS 显示反应完全。反应液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05% 的甲酸水溶液: 5% 到 55%) 得到目标化合物 C1.27-B (1.3 g, 收率 13.3%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M-boc]^+ = 378.2$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.38 - 7.33 (m, 5H), 7.32 - 7.27 (m, 1H), 7.20 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.14 - 5.02 (m, 2H), 3.97 - 3.87 (m, 1H), 3.70 - 3.59 (m, 2H), 3.08 - 2.95 (m, 2H), 2.04 - 1.97 (m, 1H), 1.95 - 1.87 (m, 2H), 1.76 - 1.69 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 0.91 - 0.84 (m, 6H)。

步骤二:

室温下, 将化合物 C1.27-B (1.3 g, 2.71 mmol) 溶于乙酸乙酯中 (10 mL) 溶液中, 然后向反应液中加入二氧六环-HCl (3N, 10 mL), 室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液减压浓缩得到目标化合物 C1.27-C (1.06 g, 收率 94.4%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 378.4$ 。

步骤三:

将化合物 C1.27-C (1.06 g, 2.81 mmol) 溶于二氯甲烷 (10 mL) 中, 向反应液中加入乙醛 (0.75 g, 16.87 mmol), 室温下搅拌反应 10 分钟, 再向反应液中分批加入三乙酰氧基硼氢化钠 (3g, 14.05 mmol), 反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时, 减压蒸馏除去二氯甲烷, 剩余水相经反相分离 (乙腈比 0.05% 的甲酸水溶液: 5% 到 55%) 得到目标化合物 C1.27-D (1.13 g, 收率 99.23%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 406.1$;

1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.42 - 7.25 (m, 5H), 5.22 - 5.06 (m, 2H), 3.91 (d, $J = 7.0$

Hz, 1H), 3.52 - 3.36 (m, 2H), 3.25 - 2.93 (m, 4H), 2.66 - 2.54 (m, 1H), 2.47 - 2.36 (m, 1H), 2.27 - 2.14 (m, 2H), 2.13 - 2.06 (m, 1H), 1.35 - 1.29 (m, 4H), 0.98 - 0.90 (m, 6H)。

步骤四:

室温下, 将化合物 C1.27-D (1.13 g, 2.78 mmol) 溶于甲醇 (20 mL) 溶液中, 然后向反应液中加入 Pd/C (0.5 g), 氢气下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤, 滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.27-E (0.58 g, 收率 76.18%) 为白色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 272.4$ 。

步骤五:

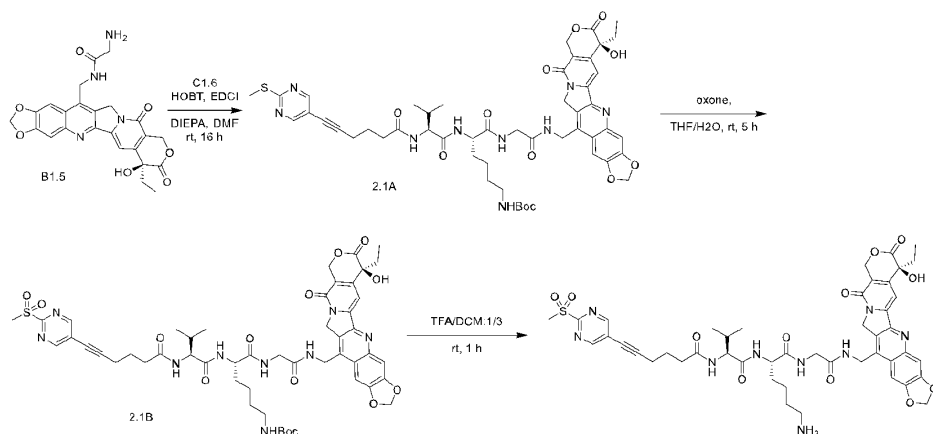
将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (1 g, 3.73 mmol), 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL), 然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (1.2 g, 9.32 mmol), HATU (1.42 g, 3.73 mmol), 反应液搅拌 30 分钟, 然后加入化合物 C1.27-E (1.01 g, 3.73 mmol), 反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 (S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-羧酸 (C1.27, 500 mg, 收率 28.7%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 522.5$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.12 (s, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.28 - 4.25 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.89 - 2.78 (m, 2H), 2.57 - 2.52 (m, 4H), 2.45 - 2.30 (m, 4H), 2.07 - 2.01 (m, 2H), 1.99 - 1.96 (m, 1H), 1.95 - 1.88 (m, 2H), 1.85 - 1.79 (m, 2H), 1.04 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.88 - 0.83 (m, 6H)。

二、药物-连接体化合物合成

实施例 2.1: N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-(((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-001)



步骤一:

将化合物 C1.6 (50 mg, 0.10 mol), 化合物 B1.5 (71 mg, 0.12 mol), N,N-二异丙基乙胺 (39

mg, 0.30 mol) 溶于 DMF (5 mL)。然后依次加入 1-羟基苯并三唑(16 mg, 0.12 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23 mg, 0.12 mmol), 上述反应液室温搅拌 16 小时, 加入 50mL 乙酸乙酯稀释, 有机相用水洗涤三次 (25mL x 3), 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去乙酸乙酯得到粗品, 粗产品用快速硅胶柱层析分离纯化(DCM : MeOH = 100 : 0 到 90 : 10)得到目标化合物 2.1A, (62 mg, 黄色固体, 收率 58%)。

LCMS (ESI) [M+H]⁺: 1024.8。

步骤二:

将化合物 2.1A (40 mg, 0.04 mmol)溶于四氢呋喃和水的混合溶液 (体积比为 1/1; 4 mL) 中, 加入过氧单磺酸钾(246 mg, 0.4 mmol), 反应液在室温下搅拌 5 小时, 加入 30mL 乙酸乙酯稀释, 有机相用水洗涤三次 (25mL x 3), 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物 2.1B (30 mg, 黄色固体, 收率 74%)。

LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1055.9。

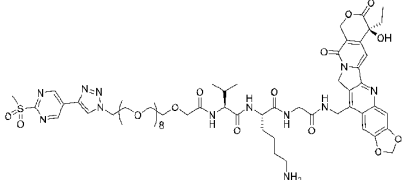
步骤三:

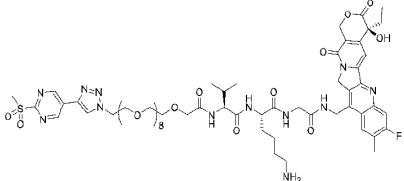
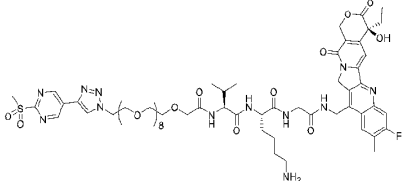
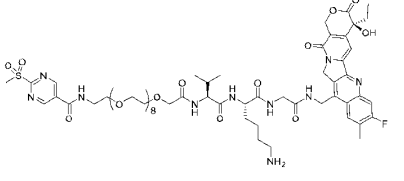
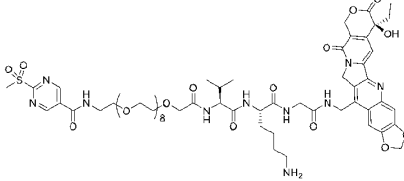
将化合物 2.1B (30 mg, 0.03 mmol) 溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为 1: 3; 4 mL)中, 反应液在室温下搅拌 1 小时。然后减压浓缩得粗产品, 粗产品经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-(((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]咪唑啉并[1, 2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (9 mg, 白色固体, 收率 33%)。

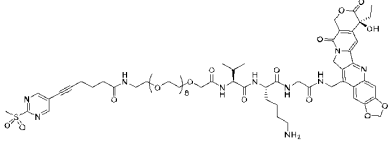
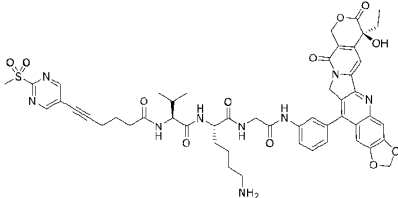
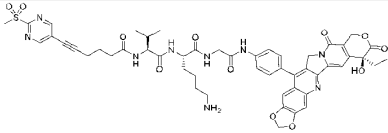
LCMS (ESI) [M+H]⁺: 955.8;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.09 (s, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.15 (m, 2H), 7.84 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.64 (br s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.30 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 5.59 - 5.46 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.87 - 4.78 (m, 1H), 4.70 - 4.60 (m, 1H), 4.17 - 4.03 (m, 2H), 3.82 - 3.58 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.80 - 2.70 (m, 2H), 2.40 - 2.22 (m, 2H), 1.93 - 1.68 (m, 6H), 1.65 - 1.57 (m, 1H), 1.56 - 1.45 (m, 3H), 1.36 - 1.22 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H)。

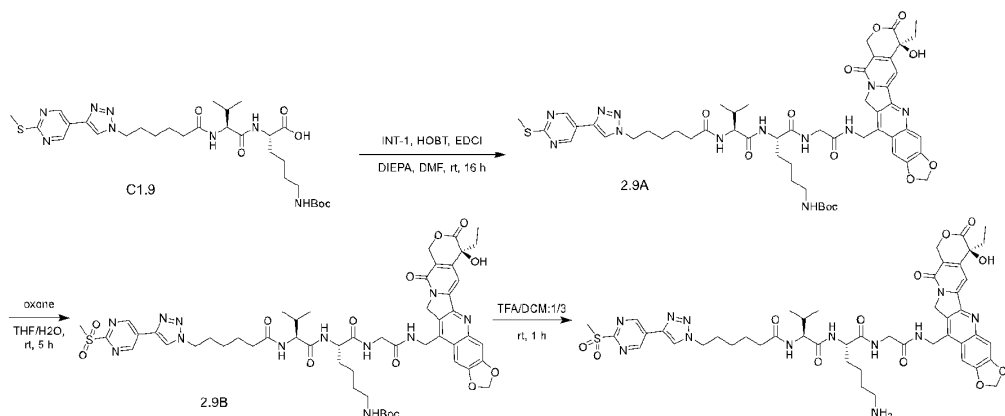
用实施例 2.1 相同的方法和反应条件, 用所示的不同起始原料, 得到下表中实施例 2.2 到实施例 2.8 所示的目标产物。

实施 例	化合物	名称	(m/z): [M+H] ⁺
实施 例 2.2		N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-(((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]	1366.9

	DL-002 原料：C1. 2， B1. 5		吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基) 氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代-己 -2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代-丁-2- 基)-29-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5- 基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)- 3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂二 十九烷酰胺	
实施 例 2.3	DL-003 原料：C1. 2， B1. 4		N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2- (((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基 -3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H- 吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b] 喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙 基)氨基)-1-氧代己-2-己)氨基)-3- 甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(4-(2-(甲 磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑- 1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九 氧杂二十九烷酰胺	1354.9
实施 例 2.4	DL-004 原料：C1. 1， B1. 4		N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1- ((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基- 3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡 喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹 啉-11-基)-10-异丙基-3,6,9,12-四 氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38- 九氧杂-2,5,8,11-四氮杂四十烷-40- 基)-2-(甲磺酰基)嘧啶-5-甲酰胺	1330.9
实施 例 2.5	DL-005 原料：C1. 1， B1. 5		N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1- ((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代- 7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂 环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7] 吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)-10- 异丙基-3,6,9,12-四氧代- 14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧 杂-2,5,8,11-四氮杂四十烷-40-基)- 2-(甲磺酰基)嘧啶-5-甲酰胺	1342.8

实施 例 2.6	 DL-006 原料：C1.5，B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-(2-(((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂二十九烷酰胺	1408.5
实施 例 2.7	 DL-007 原料：C1.7，B1.8	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-(2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺	1017.9
实施 例 2.8	 DL-008 原料：C1.7，B1.9	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-(2-((4-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺	1017.8

实施例 2.9：(S)-6-氨基-N-(2-(((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-009)



步骤一:

将化合物 B1.5 (30 mg), 化合物 C1.9 (48 mg), N,N-二异丙基乙胺 (23 mg) 溶于 DMF (5 mL)。向上述溶液中加入 1-羟基苯并三唑 (9 mg) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (13 mg), 反应室温搅拌 16 小时, 加入 50mL 乙酸乙酯稀释, 有机相用水洗涤三次 (25mL x 3), 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去乙酸乙酯得到粗品, 粗产品用快速色谱法分离纯化 (DCM : MeOH = 100 : 0 to 90 : 10) 得到目标化合物 2.9A (35 mg, 淡黄色固体, 收率 43%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1095.8

步骤二:

将化合物 2.9A (35 mg) 溶于四氢呋喃和水的混合溶液 (体积比为 1/1; 4 mL) 中, 加入过氧单磺酸钾 (184 mg), 反应液室温下搅拌 5 小时, 加入 30mL 乙酸乙酯稀释, 有机相用水洗涤三次 (25mL x 3), 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物 2.9B (25 mg, 淡黄色固体, 收率 71%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1126.9。

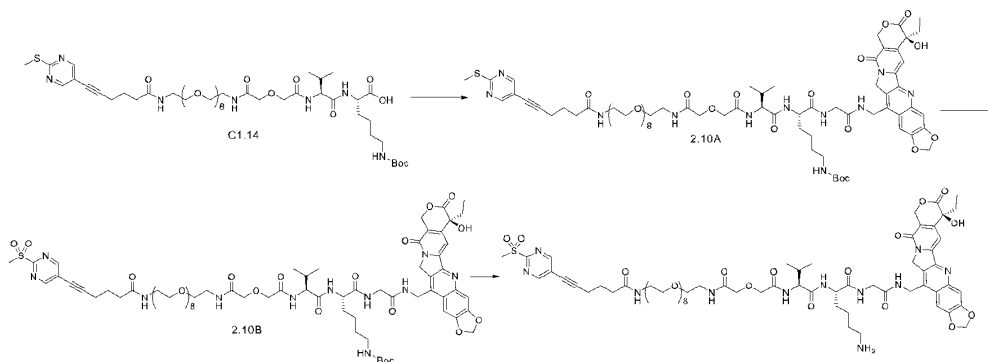
步骤三:

将化合物 2.9B (25 mg) 溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液 (体积比为 1: 3; 4 mL) 中, 反应液在室温下搅拌 1 小时。液浓缩得粗产品, 经 prep-HPLC (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 (S)-6-氨基-N-(2-(((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧化代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 三氟乙酸盐 (5.1 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1026.9;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.11 - 8.10 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73 - 7.72 (m, 1H), 7.63 (s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.29 (m, 2H), 5.61 - 5.46 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.85 - 4.83 (m, 1H), 4.63 - 4.60 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.06 - 4.03 (m, 3H), 2.75 (s, 2H), 2.12 - 2.10 (m, 2H), 1.89 - 1.85 (m, 6H), 1.56 - 1.53 (m, 8H), 1.24 (br s, 4H), 0.87 - 0.84 (m, 3H), 0.77 (d, J = 6.1 Hz, 6H)。

实施例 2.10: N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)-10-异丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧杂-2,5,8,11,17-五氮杂四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-010)



步骤一:

将化合物 C1.14 (112 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL) 中, 依次加入三乙胺 (32 mg, 0.31 mmol), 1-羟基苯并三唑 (17 mg, 0.13 mmol), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (24 mg, 0.13 mmol), 搅拌 20 分钟, 然后将化合物 B1.5 (50 mg) 加入于反应液中, 反应液在 40°C 下搅拌过夜。向反应液中加入 10 mL 水, 二氯甲烷萃取, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干得到粗品。粗产品用 C18 柱反相分离纯化 (乙腈/0.01%FA 的水溶液: 0%-55%) 得到白色固体目标化合物 2.10A (75 mg, 收率 46%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1534.0。

步骤二:

将化合物 2.10A (75 mg) 溶于四氢呋喃和水 (8mL, 1:1) 溶液中, 加入过氧单磺酸钾 (211 mg) 室温搅拌反应 10 小时。向反应液中加入 10 mL 二氯甲烷, 萃取, 分液, 无水硫酸钠干燥, 抽滤旋干得到目标产物 2.10B (50 mg, 收率 65%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1566.2。

步骤三:

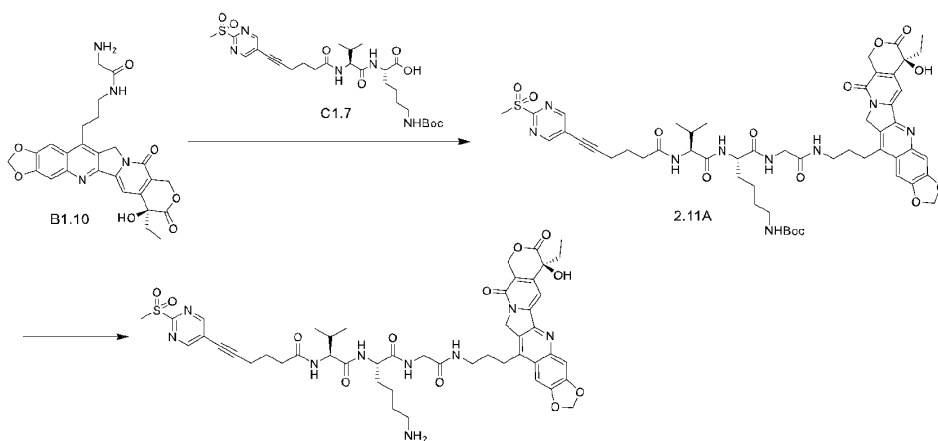
将化合物 2.10B (50 mg) 溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液 (体积比为 1:2; 4 mL) 中, 然后反应液在室温下搅拌 1 小时。将反应液浓缩得粗产品, 粗产品经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 得到目标化合物 N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)-10-异丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧杂-2,5,8,11,17-五氮杂四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (10.5 mg, 收率 21%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1466.9;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.12 (s, 2H), 8.62 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.26 - 8.11 (m, 2H), 8.03 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.93 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.79 (d,

$J = 5.6$ Hz, 1H), 7.61 (s, 3H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.31 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 5.46 (d, $J = 17.2$ Hz, 4H), 4.76 (dt, $J = 14.8, 8.7$ Hz, 2H), 4.20 - 4.15 (m, 4H), 4.00 (s, 3H), 3.95 (d, $J = 5.5$ Hz, 3H), 3.72 - 3.67 (m, 2H), 3.50 (d, $J = 3.9$ Hz, 30H), 3.41 (s, 3H), 3.25 - 3.19 (m, 4H), 2.76 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.56 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 2.27 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.90 (dd, $J = 16.1, 7.4$ Hz, 2H), 1.84 - 1.78 (m, 2H), 1.63 (s, 1H), 1.53 - 1.48 (m, 2H), 1.30 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 0.87 - 0.84 (m, 4H), 0.78 - 0.75 (m, 6H)。

实施例 2.11: N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-011)



步骤一:

向化合物 B1.10 (75 mg) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (3 mL) 中依次加入化合物 C1.7 (107 mg), 三乙胺 (45 mg), HOBT (25 mg) 和 EDCI (35 mg), 在 35 °C 下反应 4 小时。向反应液中加入水 (30 mL), 乙酸乙酯 (30 mL × 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到目标化合物 2.11A (60 mg, 收率: 37%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1084;

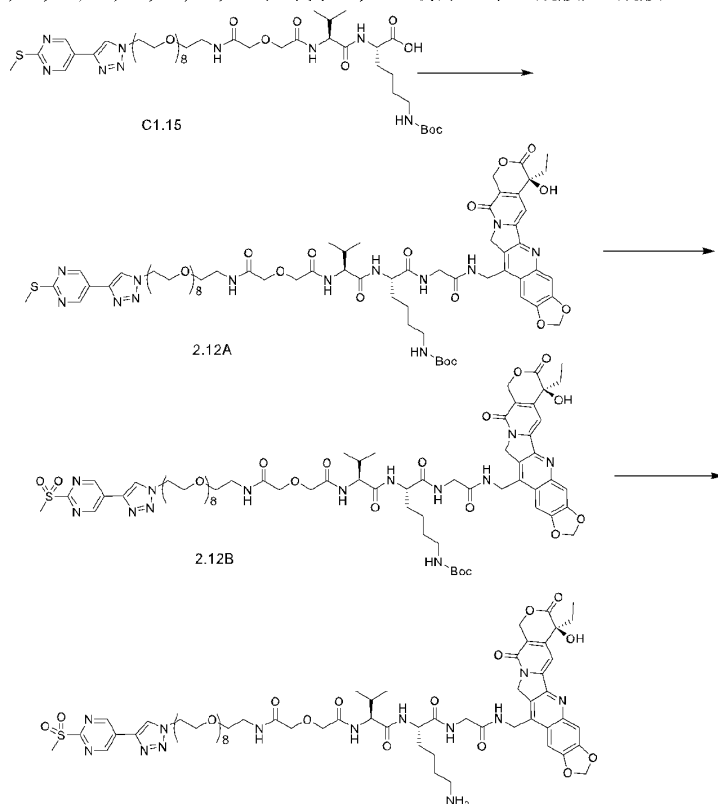
步骤二:

向化合物 2.11A (60 mg) 的二氯甲烷溶液 (4 mL) 中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液 (体积比为 1: 2; 4 mL), 在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液浓缩, 粗品经高效液相制备纯化 (乙腈/ 0.05% 甲酸的水溶液) 得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (9 mg, 收率 18%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 983.9;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.08 (s, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.19 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.49 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.25 - 4.07 (m, 2H), 3.74 - 3.70 (m, 3H), 3.25 (d, J = 12.4 Hz, 3H), 3.08 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.73 (s, 2H), 2.40 - 2.19 (m, 3H), 2.01 - 1.64 (m, 10H), 1.52 (br s, 4H), 1.34 (br s, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.83 - 0.75 (m, 6H)。

实施例 2.12: (S)-6-氨基-N-(2-(((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五酰胺)己酰胺 (DL-012)



步骤一:

将化合物 C1.15 (80 mg), 化合物 B1.5 (37 mg), 三乙胺 (23 mg, 0.231 mo,) 溶于 DMF (5 mL)。然后再加入 1-羟基苯并三唑 (12 mg) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (17 mg), 反应液室温搅拌 16 小时, 加入 50mL 乙酸乙酯稀释, 有机相用水洗涤三次 (25mL x 3), 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去乙酸乙酯得到粗品, 粗产品用快速色谱法分离纯化 (DCM : MeOH = 100 : 0 到 90 : 10) 得到目标化合物 2.12A (75 mg, 收率 65%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1492.0。

步骤二:

将化合物 2.12A (50 mg)溶于四氢呋喃和水的混合溶液(体积比为 1/1; 4 mL)中,加入过氧单磺酸钾(202 mg),反应液在室温下搅拌 5 小时,加入 30mL 乙酸乙酯稀释,有机相用水洗涤三次(25mL x 3),无水硫酸钠干燥,浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物 2.12B (40 mg, 收率 80%)。

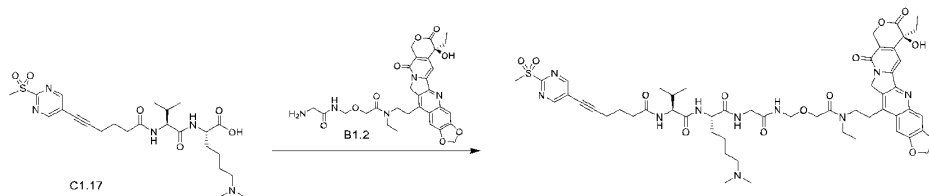
LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1524.1。

步骤三:

将化合物 2.12B (30 mg)溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为 1 比 3; 4 mL)中,然后反应液在室温下搅拌 1 小时。将反应液浓缩得粗产品,粗产品经 prep-HPLC(水含 0.01% 三氟乙酸, 乙腈)纯化得到目标化合物(S)-6-氨基-N-(2-(((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五酰胺)己酰胺 (9 mg, 收率 30%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1423.9。

实施例 2.13: N-((13S,16S)-13-(4-(二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-013)



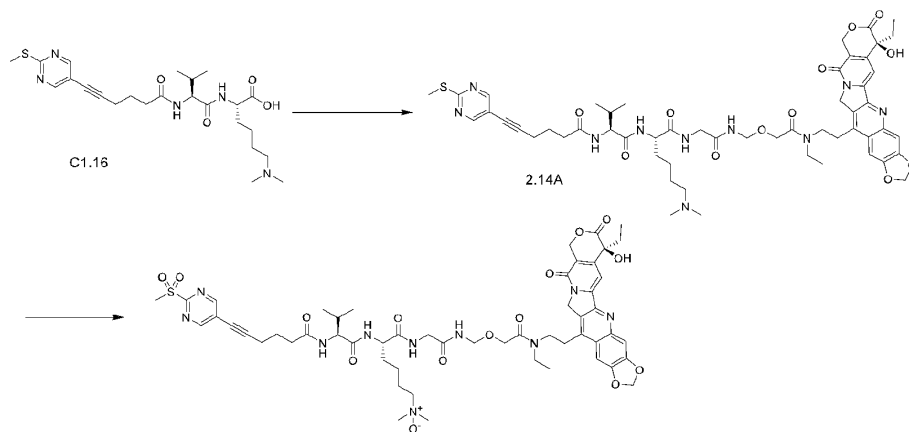
将化合物 C1.17 (50 mg), 化合物 B1.2 (58 mg), 三乙胺 (24 mg) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (2 mL)。然后依次加入 1-羟基苯并三唑(16 mg)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(22 mg), 反应液室温搅拌 16 小时。反应液直接经制备色谱(0.01% 甲酸水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物 (21 mg, 收率 10%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1113.0;

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.93 (s, 2H), 8.40 - 8.33 (m, 1H), 8.30 - 8.25 (m, 1H), 8.25 - 8.21 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.22 (s, 2H), 5.47 (dd, J = 78.6, 16.4 Hz, 2H), 5.28 - 5.13 (m, 2H), 4.73 - 4.59 (m, 2H), 4.30 - 4.05 (m, 4H), 3.94 - 3.82 (m, 2H), 3.70 - 3.57 (m, 2H), 3.54 - 3.44 (m, 1H), 3.34 (s, 6H), 3.16 - 3.08 (m, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.58 - 2.40 (m, 4H), 2.04 - 1.83 (m, 6H), 1.80 - 1.68 (m, 3H), 1.54 - 1.36 (m, 2H), 1.24 - 1.15 (m, 3H), 1.03 - 0.86 (m, 9H)。

实施例 2.14: N-((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]

喹啉-14-基)-17-甲基-4, 9, 12, 15-四氧代-6-氧杂-3, 8, 11, 14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-014)



步骤一:

将化合物 C1.16 (49 mg), 化合物 B1.2 (71 mg), N,N-二异丙基乙胺 (39 mg) 溶于 DMF (5 mL)。然后依次加入 1-羟基苯并三唑 (16 mg) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (23 mg), 加完后反应液室温搅拌 16 小时, 加入 50mL 乙酸乙酯稀释, 有机相用水洗涤三次 (25mL x 3), 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去乙酸乙酯得到粗品, 粗产品用硅胶柱层析分离纯化 (DCM : MeOH = 100 : 0 到 90 : 10) 得到目标化合物 2.14A (61 mg, 收率 60%)。

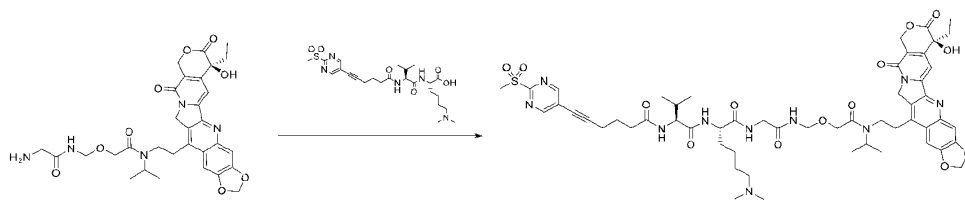
LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1081.6;

步骤二:

将化合物 2.14A (40 mg) 溶于四氢呋喃和水的混合溶液 (体积比为 1/1; 4 mL) 中, 加入过氧单磺酸钾 (227 mg, 0.37 mmol), 反应液在室温下搅拌 5 小时, LCMS 显示反应完毕, 加入 30mL 乙酸乙酯稀释, 有机相用水洗涤三次 (25mL x 3), 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去乙酸乙酯得到粗品化合物, 粗产品经制备色谱 (0.01% 甲酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 N-((13S, 16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]咪唑啉并[1, 2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4, 9, 12, 15-四氧代-6-氧杂-3, 8, 11, 14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰胺 (9 mg, 收率 33%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1129.0。

实施例 2.15: N-((13S, 16S)-13-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-3-异丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]咪唑啉并[1, 2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4, 9, 12, 15-四氧代-6-氧杂-3, 8, 11, 14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-015)

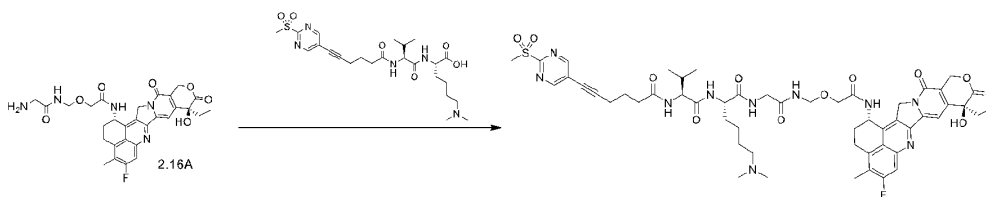


向化合物 N⁶, N⁶-二甲基-N²-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (42 mg, C1.17) 和化合物(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺 (50 mg, B1.11), 的 N,N-二甲基甲酰胺 (10 mL) 溶液中, 依次加入 HBTU (31 mg) 和二异丙基乙胺 (21 mg)。反应在室温下搅拌 2 小时。反应液过滤后经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05%三氟乙酸) 得到目标化合物 N-((13S, 16S)-13-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-3-异丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4, 9, 12, 15-四氧代-6-氧杂-3, 8, 11, 14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (15.2 mg)。

LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1127.6;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.10 (s, 2H), 8.73 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 8.23 - 8.17 (m, 1H), 8.10 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.97 - 7.93 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.66 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 4.33 - 4.21 (m, 4H), 4.20 - 4.13 (m, 2H), 3.76 - 3.74 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.40 - 3.38 (m, 1H), 3.30 - 3.21 (m, 2H), 3.04 - 2.95 (m, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.39 - 2.31 (m, 2H), 2.00 - 1.74 (m, 6H), 1.68 - 1.49 (m, 4H), 1.37 - 1.27 (m, 2H), 1.23 - 1.16 (m, 6H), 0.89 - 0.82 (m, 9H)。

实施例 2.16: N-((10S, 13S)-10-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-1-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10, 13-二氧代-2, 3, 9, 10, 13, 15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-1-基)氨基)-14-甲基-1, 6, 9, 12-四氧代-3-氧杂-5, 8, 11-三氮杂十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-016)



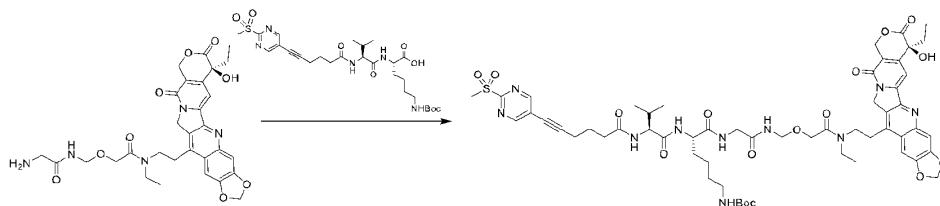
将化合物 N⁶, N⁶-二甲基-N²-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)十六烷基-5-炔酰基)-L-丙酰基)-L-赖氨酸 (C1.17, 52.3 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL), 然后再依次加入 HBTU (38 mg, 0.10 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (26 mg, 0.20 mmol), 加完后反应液室温搅拌 30 分钟, 然后加入化合物 2-氨基-N-((2-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10, 13-二氧代-2, 3, 9, 10, 13, 15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺

(2.16A, 根据 CN104755494A 中第 147-148 页报道的相同方法制备的, 63 mg), LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 N-((10S, 13S)-10-(4-(N, N-二甲基氨基)丁基)-1-((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10, 13-二氧代-2, 3, 9, 10, 13, 15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-1-基)氨基)-14-甲基-1, 6, 9, 12-四氧代-3-氧杂-5, 8, 11-三氮杂十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (8.1 mg, 收率 7%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1085.5$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.31 (s, 1H), 9.11 (s, 2H), 8.72 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 8.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.19 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.63 - 5.54 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.68 - 4.58 (m, 2H), 4.26 - 4.12 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.73 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.20 - 3.10 (m, 2H), 3.05 - 2.95 (m, 2H), 2.76 (d, $J = 4.7$ Hz, 6H), 2.55 - 2.53 (m, 2H), 2.42 - 2.28 (m, 6H), 2.21 - 2.13 (m, 2H), 2.02 - 1.77 (m, 6H), 1.76 - 1.62 (m, 2H), 1.62 - 1.51 (m, 3H), 1.37 - 1.21 (m, 2H), 0.90 - 0.80 (m, 9H)。

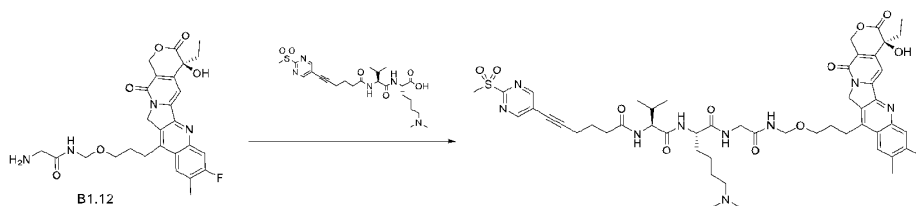
实施例 2.17: 叔丁基 ((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)-4, 9, 12-三氧代-6-氧杂-3, 8, 11-三氮杂十七烷-17-基)氨基甲酸酯 (DL-017)



将化合物 C1.7 (90.0 mg), 二异丙基乙胺 (68.0 mg) 和 HATU (100 mg) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (5 mL) 中。随后加入化合物 B1.2 (80 mg), 室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯 (50 mL), 用饱和食盐水 (30 mL X 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压浓缩成固体, 粗产品经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到黄色固体化合物叔丁基 ((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)-4, 9, 12-三氧代-6-氧杂-3, 8, 11-三氮杂十七烷-17-基)氨基甲酸酯 (2.06 mg, 收率 10.6%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1184.9$ 。

实施例 2.18: N-((11S, 14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-018)

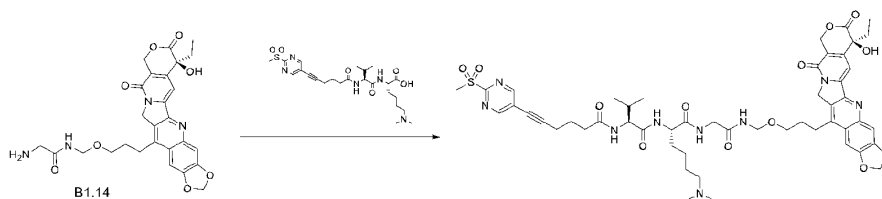


将化合物 N^6, N^6 -二甲基- N^2 -((6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (126 mg) (C1.17), B1.12 (150 mg), 1-羟基苯并三唑 (49 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (69 mg) 和二异丙基乙胺 (156 mg, 1.21 mmol) 溶于 N, N -二甲基甲酰胺 (10 mL) 溶液中, 反应在 40°C 下搅拌 12 小时。LCMS 显示反应完成。反应液过滤经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到黄色固体化合物 N -((11S, 14S)-11-(4-(二甲氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-018) (12 mg, 收率 6.0%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1030.6$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.10 (s, 2H), 8.62 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.23 - 8.13 (m, 2H), 8.07 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.95 - 7.83 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.64 - 4.53 (m, 2H), 4.28 - 4.20 (m, 1H), 4.19 - 4.11 (m, 1H), 3.76 - 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.23 - 3.19 (m, 2H), 2.67 - 2.62 (m, 2H), 2.57 - 2.54 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.42 - 2.26 (m, 3H), 2.02 - 1.77 (m, 6H), 1.68 - 1.66 (m, 1H), 1.58 - 1.45 (m, 3H), 1.36 - 1.25 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.82 (t, $J = 6.3$ Hz, 6H)。

实施例 2.19: N -((11S, 14S)-11-(4-(二甲氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-019)



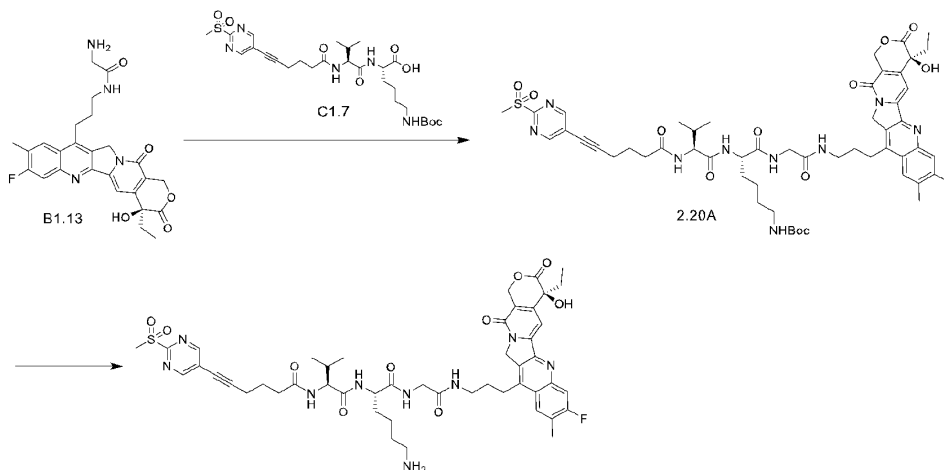
将化合物 B1.14 (100 mg, 0.186 mmol), 化合物 N^6, N^6 -二甲基- N^2 -((6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (100 mg, 0.191 mmol) 溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 1-羟基苯并三唑 (38 mg, 0.280 mmol) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (53 mg, 0.280 mmol), 然后再加入三乙胺 (56 mg, 0.559 mmol) 加完后反应液室温搅拌 16 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 N -((11S, 14S)-11-(4-(二甲氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并

[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (20 mg, 收率 10%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1042.5$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.28 (s, 1H, TFA), 9.10 (s, 2H), 8.64 (br s, 1H), 8.19 (br s, 1H), 8.09 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.67 - 4.52 (m, 2H), 4.30 - 4.10 (m, 2H), 3.74 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.17 - 3.07 (m, 2H), 3.04 - 2.91 (m, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.46 - 2.24 (m, 3H), 2.04 - 1.66 (m, 9H), 1.63 - 1.46 (m, 3H), 1.32 - 1.29 (m, 2H), 0.87 - 0.82 (m, 9H)。

实施例 2.20: N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-020)



步骤一:

向化合物 B1.13 (75 mg) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (3 mL) 中依次加入化合物 C1.7 (107 mg), 三乙胺 (45 mg), HOBT (25 mg) 和 EDCI (35 mg), 在 35 °C 下反应 4 小时。向反应液中加入水 (30 mL), 乙酸乙酯 (30 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到目标化合物 2.20A (76 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ : 1072.5$;

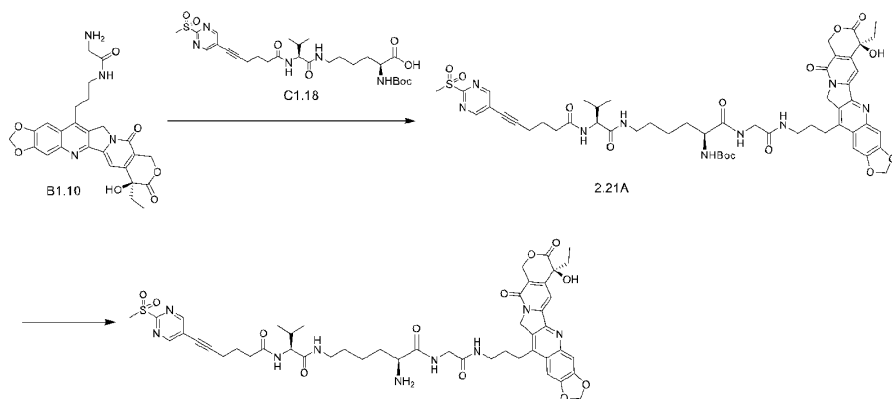
步骤二:

向化合物 2.20A (60 mg, 0.06 mmol) 的二氯甲烷溶液 (2 mL) 中, 加入三氟乙酸 (1 mL), 在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液浓缩, 经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (43 mg, 收率 80%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 972.9;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.09 (s, 2H), 8.24 - 8.17 (m, 2H), 8.12 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.99 - 7.93 (m, 1H), 7.88 - 7.84 (m, 2H), 7.64 (s, 3H, NH₂-TFA), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.25 - 4.18 (m, 1H), 4.15 - 4.11 (m, 1H), 3.76 - 3.71 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.32 - 3.26 (m, 2H), 3.21 - 3.17 (m, 1H), 2.79 - 2.70 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.40 - 2.24 (m, 3H), 1.94 - 1.82 (m, 7H), 1.80 - 1.73 (m, 2H), 1.58 - 1.49 (m, 3H), 1.36 - 1.31 (m, 1H), 1.18 - 1.14 (m, 1H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.80 - 0.76 (m, 6H)。

实施例 2.21: N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰胺



步骤一:

将化合物 C1.18 (430 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL) 中, 然后加入 EDCI (160 mg), HOBT (115 mg) 和三乙胺 (214 mg)。加完毕后反应液室温搅拌 20 分钟, 然后加入化合物 B1.10 (314 mg), 室温搅拌反应 3 小时, LCMS 检测反应完全, 加水稀释, 乙酸乙酯萃取, 有机相浓缩的粗品 2.21A (350 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1084.3;

步骤二:

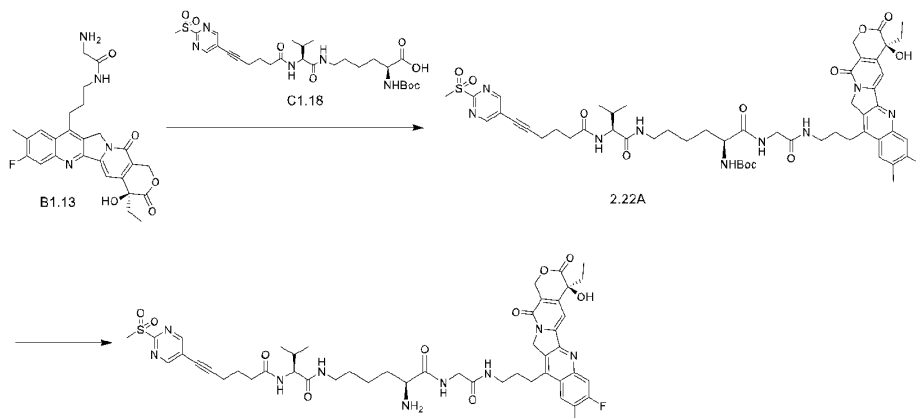
向化合物 2.21A (350 mg) 的二氯甲烷溶液 (4 mL) 中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液 (体积比为 1:2; 4 mL), 在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液浓缩, 粗品经高效液相制备纯化 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液) 得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酰胺 (100 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 984.4;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 2H), 8.69 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 8.14 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 8.08 (s, 3H, NH₂-TFA), 7.95 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.66 (s,

1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.09 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.83 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.33 - 3.27 (m, 2H), 3.15 - 3.06 (m, 3H), 2.97 - 2.94 (m, 1H), 2.57 - 2.53 (m, 2H), 2.43 - 2.28 (m, 3H), 1.95 - 1.68 (m, 9H), 1.46 - 1.28 (m, 4H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H)。

实施例 2.22: N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 DL-022)



步骤一:

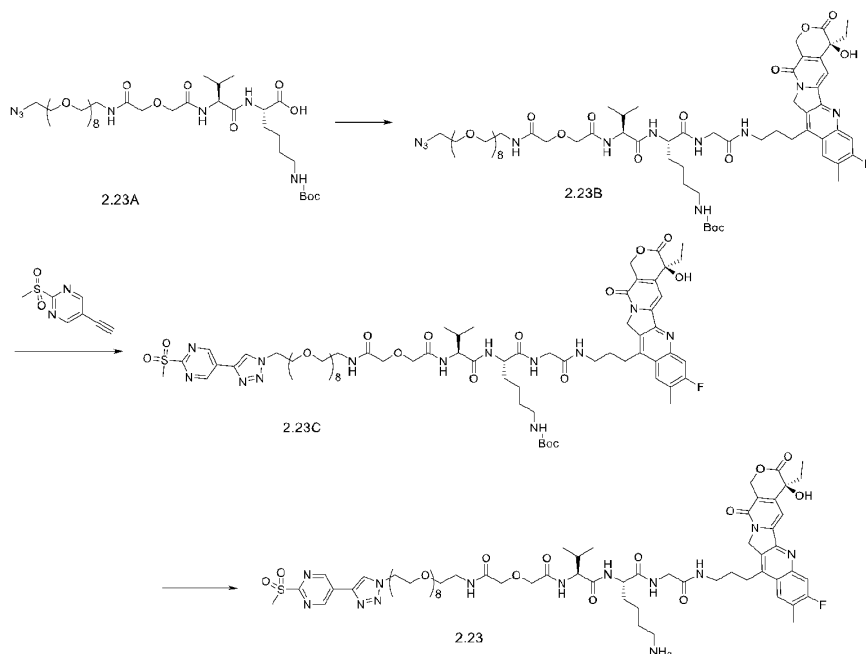
将化合物 C1.18 (136 mg, 0.23 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL) 中, 然后加入 EDCI (48 mg, 0.25 mmol), HOBT (34 mg, 0.25 mmol) 和三乙胺 (64 mg, 0.63 mmol)。加完毕后反应液室温搅拌 20 分钟, 然后加入化合物 B1.13 (3105 mg, 0.19 mmol), 室温搅拌反应 3 小时, LCMS 检测反应完全, 加水稀释, 乙酸乙酯萃取, 有机相浓缩的粗品。所得化合物溶于二氯甲烷 (4 mL) 中, 然后加入三氟乙酸 (2 mL), 反应 1 小时后, 浓缩, 粗品经制备提纯得目标化合物 N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-022) (88 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 972.9$;

1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.10 (s, 2H), 8.72 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.17 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.11 (s, 3H, NH₂-TFA), 7.97 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.93 - 7.86 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.14 - 4.02 (m, 2H), 3.85 - 3.83 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.32 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.24 - 3.16 (m, 2H), 3.11 - 2.94 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.35 - 2.30 (m, 3H), 1.92 - 1.69 (m, 10H), 1.43 - 1.29 (m, 4H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H)。

实施例 2.23: (S)-6-氨基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-

35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)己酰胺 (DL-023)



步骤一:

向化合物 B1.13 (46 mg) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (3 mL) 中依次加入化合物 2.23A (100 mg), 三乙胺 (50 μ l), HOBT (16 mg) 和 EDCI (23 mg), 在 35 $^{\circ}$ C 下反应 4 小时。向反应液中加入水 (30 mL), 乙酸乙酯 (30 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到目标化合物 2.23B (105 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 1358.4;

步骤二:

化合物 2.23B (105 mg), 2-甲磺酰基-5-乙炔基嘧啶 (45 mg) 溶于 DMSO-水 (2 mL, 4:1) 中, 向混合物中加入溴化亚铜 (50mg)。反应液室温下搅拌 2 小时, 然后加入乙酸乙酯 (100mL), 水洗 (100mL $\times$ 3), 干燥后减压除去有机溶剂, 粗产物用硅胶柱层析分离得到目标产物 2.23C (84mg), MS (m/z): 1540.8 $[M+H]^+$;

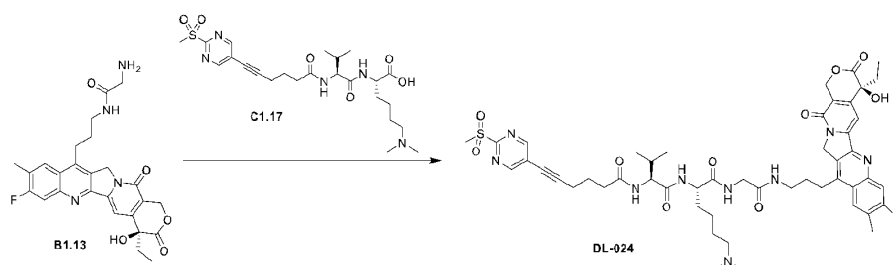
步骤三:

将化合物 2.23C 溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液 (体积比为 1:2; 4 mL) 中, 然后反应液在室温下搅拌 30 分钟。LCMS 显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品, 粗产品经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 得到目标化合物 (S)-6-氨基-N-(2-(((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)己酰胺 (DL-023, 8 mg, 三氟乙酸盐, 收率 5%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1440.8$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.49 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.24 - 8.18 (m, 3H), 8.01 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.96 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.90 - 7.84 (m, 2H), 7.63 (s, 3H, TFA salt), 7.32 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.66 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.21 (dd, $J = 15.2, 7.9$ Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.75 - 3.72 (m, 2H), 3.56 - 3.54 (m, 2H), 3.54 - 3.38 (m, 30H), 3.33 - 3.13 (m, 5H), 2.75 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.02 - 1.94 (m, 1H), 1.91 - 1.81 (m, 3H), 1.71 - 1.65 (m, 1H), 1.58 - 1.46 (m, 3H), 1.38 - 1.29 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.81 - 0.75 (m, 6H)。

实施例 2.24: N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-024)



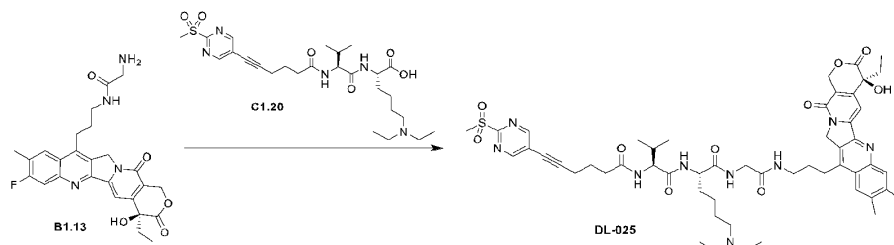
向化合物 B1.13 (40 mg, 0.081 mmol) 和化合物 C1.17 (42 mg, 0.081 mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (2 mL) 溶解中依次加入 PyBOP (41 mg, 0.081), DIPEA (20 mg, 0.16 mmol), 反应液在室温下搅拌 2 小时。LCMS 显示反应完全。反应液经高效液相制备纯化 (乙腈/ 0.05% 三氟乙酸的水溶液) 得到化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (11.54 mg, 收率 14%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1000.6$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.42 (s, 1H), 9.08 (s, 2H), 8.27 - 8.18 (m, 2H), 8.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.96 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.91 - 7.77 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.15 - 4.12 (m, 1H), 3.81 - 3.65 (m, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.33 - 3.25 (m, 2H), 3.22 - 3.15 (m, 2H), 3.03 - 2.95 (m, 2H), 2.77 - 2.71 (m, 6H), 2.38 - 2.23 (m, 3H), 1.92 - 1.81 (m, 7H), 1.78 - 1.73 (m, 2H), 1.62 - 1.56 (m, 3H), 1.38 - 1.29 (m, 2H), 0.92 - 0.84 (m, 3H), 0.84 - 0.72 (m, 6H)。

实施例 2.25: N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代

乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-025)

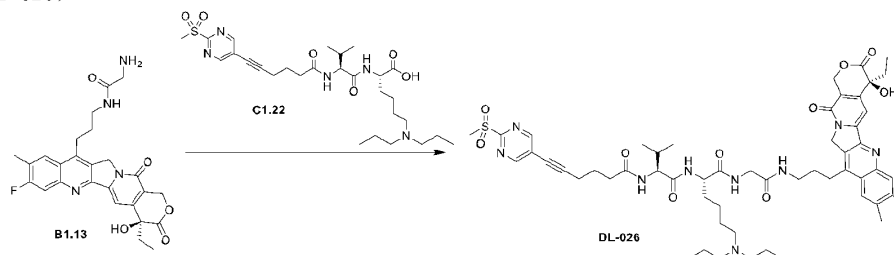


将化合物 C1.20 (30 mg, 0.054 mmol), 化合物 B1.13 (27 mg, 0.054 mmol) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (2 mL)。然后再依次加入 HBTU (22 mg, 0.054 mmol) 以及 N,N-二异丙基乙胺 (17 mg, 0.135 mmol), 加完后反应液室温搅拌 30 分钟。LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (23 mg, 收率 42%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1028.5$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.08 (s, 2H), 9.02 (s, 1H), 8.21 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 8.13 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.97 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 10.6$ Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.28 - 4.18 (m, 1H), 4.14 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.80 - 3.65 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.31 - 3.24 (m, 2H), 3.22 - 3.15 (m, 2H), 3.12 - 3.06 (m, 4H), 3.02 - 2.91 (m, 2H), 2.36 - 2.23 (m, 2H), 1.95 - 1.68 (m, 9H), 1.68 - 1.49 (m, 4H), 1.38 - 1.28 (m, 2H), 1.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.79 - 0.76 (m, 6H)。

实施例 2.26: N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-026)



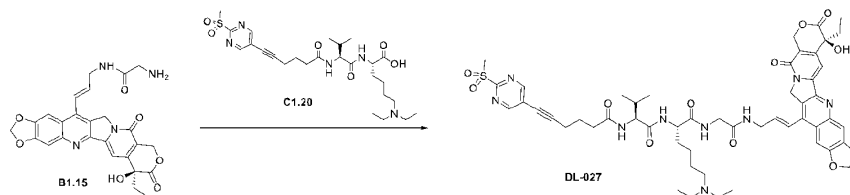
将化合物 C1.22 (31 mg, 0.054 mmol), 化合物 B1.13 (27 mg, 0.054 mmol) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (2 mL)。然后再依次加入 HBTU (22 mg, 0.054 mmol) 以及 N,N-二异丙基乙胺 (17 mg, 0.135 mmol), 反应液室温搅拌 30 分钟。LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)

纯化得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (25 mg, 收率 45%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1056.6$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.09 (s, 2H), 8.27 - 8.19 (m, 2H), 8.13 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.97 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 7.91 - 7.84 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.24 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.13 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.73 (dd, $J = 14.7$, 5.9 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.28 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.19 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.99 (br, 6H), 2.33 - 2.27 (m, 2H), 1.95 - 1.70 (m, 9H), 1.62 - 1.57 (m, 8H), 1.33 - 1.30 (m, 2H), 0.96 - 0.82 (m, 9H), 0.82 - 0.73 (m, 6H)。

实施例 2.27: N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺

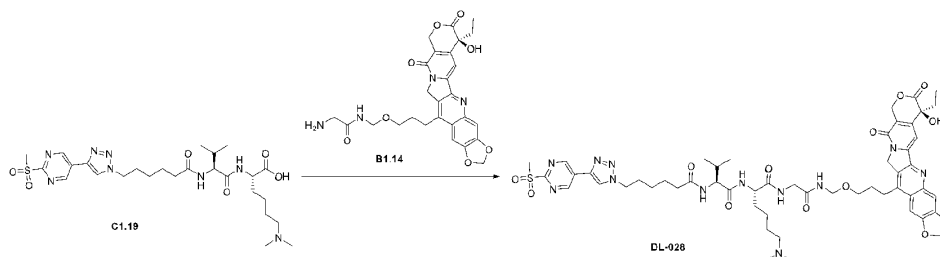


向化合物 B1.15 (40 mg, 0.074 mmol) 和化合物 C1.20 (40 mg, 0.072 mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (4 mL) 溶解中依次加入 HBTU (30 mg, 0.079 mmol)、DIPEA (26 mg, 0.2 mmol)。反应液室温下反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。反应液经高效液相制备纯化 (乙腈/ 0.05% 三氟乙酸水溶液) 得到化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (11.1 mg, 收率 14%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1038.6$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 2H), 9.02 (s, 1H, TFA), 8.33 - 8.25 (m, 2H), 8.12 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.15 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.52 - 6.50 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.28 - 5.24 (m, 2H), 4.27 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 4.12 (br s, 2H), 3.81 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.11 - 3.07 (m, 6H), 2.97 (br s, 2H), 2.53 - 2.50 (m, 1H), 2.39 - 2.24 (m, 4H), 1.85 - 1.79 (m, 8H), 1.16 (t, $J = 6.4$ Hz, 6H), 0.88 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.78 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H)。

实施例 2.28: (S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋啉并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

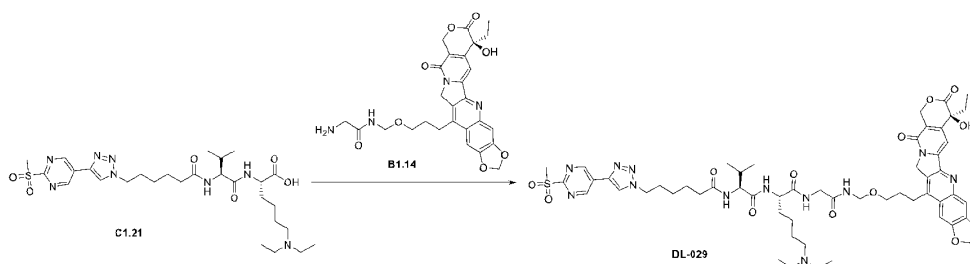


将化合物 C1.19 (40mg, 0.06mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (1.5 mL), 依次加入 HBTU (26 mg, 0.06 mmol)、B1.14 (36 mg, 0.06mmol) 和 DIPEA (66 mg, 0.17 mmol), 室温搅拌反应 1 小时。LCMS 检测反应完成, 反应液通过制备 (乙腈/ 0.05%三氟乙酸水溶液) 分离纯化得到目标化合物 (S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋啉并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (13.88 mg, TFA salt 收率 16%) 为米黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1113.7$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.46 (s, 2H), 9.29 (s, 1H, TFA salt), 8.92 (s, 1H), 8.63 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.18 (br s, 1H), 8.03 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 - 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.28 - 4.20 (m, 1H), 4.15 - 4.09 (m, 1H), 3.76 - 3.71 (m, 4H), 3.53 - 3.48 (m, 4H), 3.44 (s, 3H), 3.10 - 3.08 (m, 2H), 2.97 - 2.95 (m, 2H), 2.75 (d, $J = 4.9$ Hz, 6H), 2.20 - 2.09 (m, 2H), 1.92 - 1.83 (m, 5H), 1.68 - 1.65 (m, 1H), 1.63 - 1.50 (m, 5H), 0.90 - 0.74 (m, 9H)。

实施例 2.29: (S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋啉并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

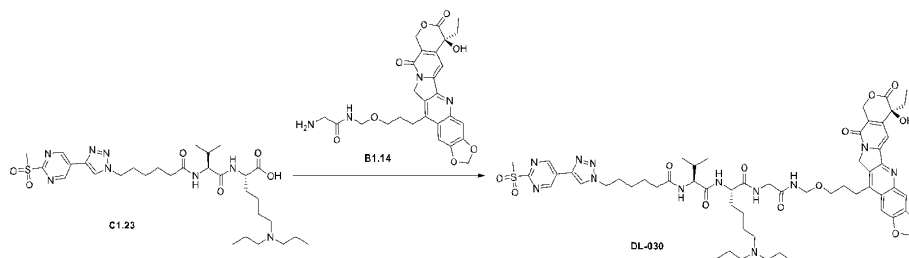


将化合物 C1.21 (58 mg, 0.09 mmol), 化合物 B1.14 (50 mg, 0.09 mmol) 溶于 DMF (1 mL), 然后再加入 HBTU (35 mg, 0.09 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (30 mg, 0.23 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 (S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (14 mg, 收率 13%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1141.7$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.98 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.62 - 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.27 - 4.23 (m, 1H), 4.11 - 4.09 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.49 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.13 - 3.06 (m, 6H), 3.01 - 2.93 (m, 2H), 2.22 - 2.07 (m, 2H), 1.91 - 1.83 (m, 6H), 1.70 - 1.51 (m, 5H), 1.33 - 1.21 (m, 6H), 1.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.82 - 0.76 (m, 6H)。

实施例 2.30: (S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺



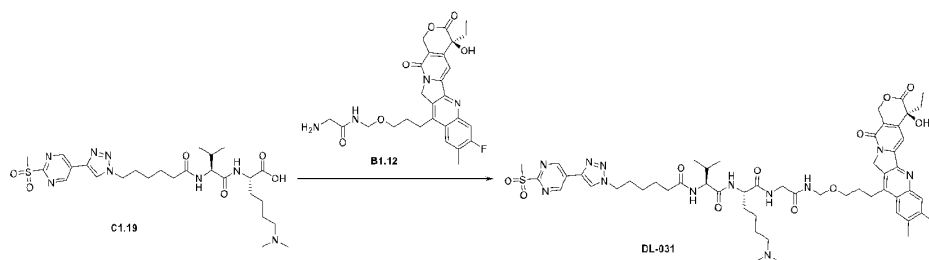
将化合物 C1.23 (61 mg, 0.09 mmol), 化合物 B1.14 (50 mg, 0.09 mmol) 溶于 DMF (1 mL), 然后再加入 HBTU (35 mg, 0.09 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (30 mg, 0.23 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小

时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液浓缩得粗产品, 粗产品经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋啉并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(21 mg, 收率 19%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1169.8$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 9.01 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.19 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.60 - 4.58 (m, 2H), 4.46 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.24 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.13 - 4.09 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.49 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.10 (br s, 2H), 3.02 - 2.95 (m, 6H), 2.19 - 2.15 (m, 2H), 1.88 - 1.86 (m, 6H), 1.71 - 1.69 (m, 1H), 1.61 - 1.56 (m, 8H), 1.28 - 1.26 (m, 6H), 0.88 - 0.83 (m, 9H), 0.81 - 0.78 (m, 6H)。

实施例 2.31: (S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]呋啉并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺



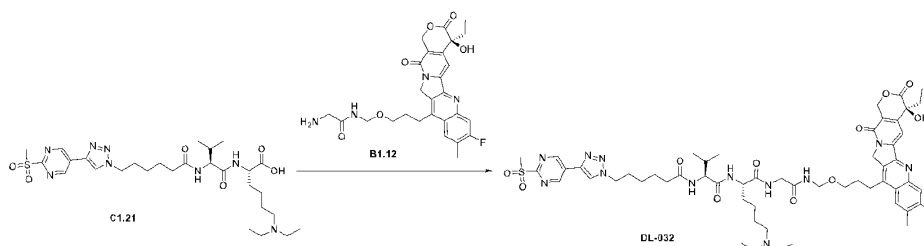
将化合物 C1.19 (113 mg, 0.19 mmol), 化合物 B1.12 (100 mg, 0.19 mmol)溶于 DMF (1 mL), 然后加入 HBTU (72 mg, 0.19 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺(61 mg, 0.48 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱(0.01% TFA 的水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]呋啉并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)噻啉-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(16 mg, 收率 8%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1101.6$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.63 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 8.20 - 8.28 (m, 2H), 8.04 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 - 4.54 (m, 2H), 4.46 (t, $J =$

7.0 Hz, 2H), 4.29 - 4.19 (m, 1H), 4.15 - 4.08 (m, 1H), 3.73 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.50 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.24 - 3.14 (m, 2H), 3.01 - 2.91 (m, 2H), 2.72 (s, 6H), 2.53 (s, 3H), 2.23 - 2.07 (m, 2H), 1.93 - 1.84 (m, 6H), 1.72 - 1.64 (m, 1H), 1.61 - 1.45 (m, 6H), 1.34 - 1.22 (m, 4H), 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.82 - 0.76 (m, 6H)。

实施例 2.32: (S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

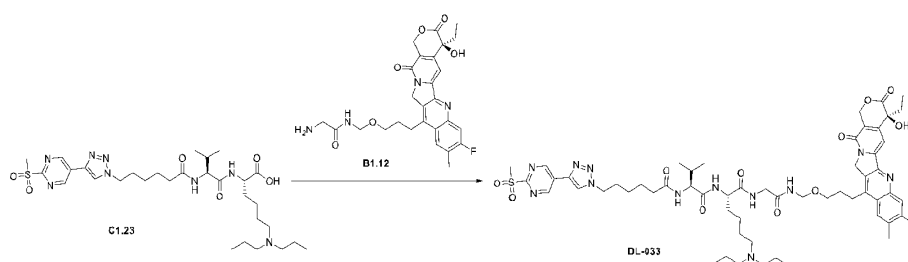


将化合物 C1.21 (59 mg, 0.10 mmol), 化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol), 溶于 DMF (1 mL), 然后再加入 HBTU (36 mg, 0.10 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (31 mg, 0.24 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% 甲酸溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 (S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (33.8 mg, 收率 32%) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1129.7$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.24 - 8.15 (m, 2H), 8.00 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.63 - 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.23 - 4.18 (m, 1H), 4.11 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.77 - 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.17 - 3.15 (m, 3H), 2.61 (q, $J = 6.7$ Hz, 4H), 2.22 - 2.10 (m, 2H), 1.92 - 1.84 (m, 6H), 1.68 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 1.57 - 1.48 (m, 3H), 1.39 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 1.30 - 1.22 (m, 4H), 0.97 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.82 - 0.77 (m, 6H)。

实施例 2.33: (S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

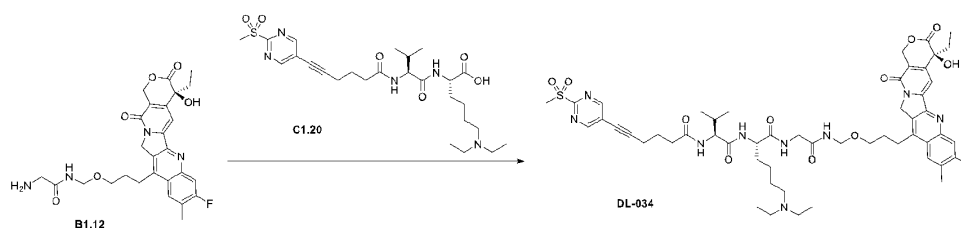


将化合物 C1.23 (62 mg, 0.10 mmol), 化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol) 溶于 DMF (1 mL), 然后加入 HBTU (36 mg, 0.10 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (31 mg, 0.24 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 (S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡咯并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (35.2 mg, 收率 32%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1157.8$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.62 - 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.24 (m, 1H), 4.13 - 4.07 (m, 1H), 3.74 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.23 - 3.16 (m, 2H), 3.01 - 2.95 (m, 6H), 2.50 (s, 3H), 2.22 - 2.09 (m, 2H), 1.95 - 1.84 (m, 8H), 1.67 - 1.56 (m, 9H), 1.33 - 1.23 (m, 6H), 0.91 - 0.86 (m, 9H), 0.82 - 0.77 (m, 6H)。

实施例 2.34: N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡咯并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-034)



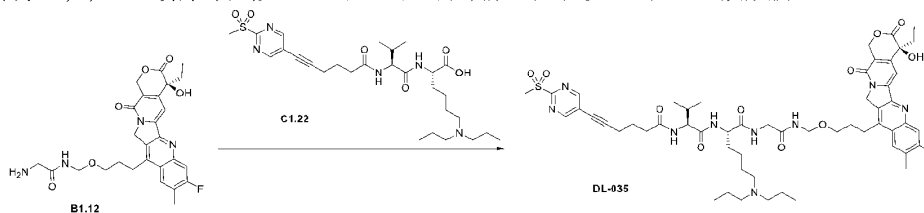
将化合物 (S)-2-氨基-N-((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡咯并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙酰胺 (B1.12, 30 mg, 0.057 mmol), N6,N6-二乙基-N2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)十六烷基-5-炔酰基)-L-丙酰基)-L-赖氨酸 (C1.20, 31 mg, 0.057 mmol) 溶于 DMF (1 mL) 中。然后依次加入 HBTU (22 mg, 0.057 mmol) 以及 N,N-二异丙基乙胺 (18 mg, 0.143 mmol), 加完后反应液室温搅拌一小时。LCMS 检测反应完成后, 将

反应液经制备色谱(0.01% 的三氟乙酸水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物三氟乙酸盐 N-((11S, 14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (3.18 mg, 收率 5%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1058.7$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 2H), 8.65 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.21 - 8.19 (m, 2H), 8.09 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.64 - 4.56 (m, 2H), 4.29 - 4.22 (m, 1H), 4.15 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.51 - 3.49 (m, 2H), 3.24 - 3.18 (m, 2H), 3.13 - 3.07 (m, 4H), 3.01 - 2.95 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.40 - 2.31 (m, 3H), 1.99 - 1.74 (m, 8H), 1.65 - 1.49 (m, 4H), 1.38 - 1.25 (m, 2H), 1.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.89 - 0.79 (m, 9H)。

实施例 2.35: N-((11S, 14S)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-035)



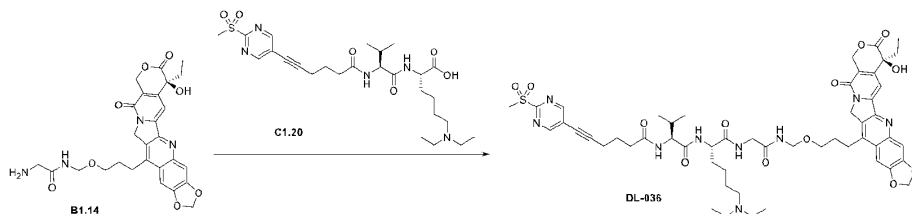
将化合物 (S) -2-氨基-N-((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙酰胺 (B1.12, 30 mg, 0.057 mmol), N2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-丙酰基)-N6, N6-二丙基-L-赖氨酸 (C1.22, 33 mg, 0.057 mmol) 溶于 DMF (1 mL) 中。然后再依次加入 HBTU (22 mg, 0.057 mmol) 以及 N,N-二异丙基乙胺 (18 mg, 0.143 mmol), 加完后反应液室温搅拌一小时。LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱(0.01% 的三氟乙酸水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物 N-((11S, 14S)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-035) (10.65 mg, 收率 16%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1086.7$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 2H), 8.65 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.28 - 8.16 (m, 2H), 8.08 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 - 4.52 (m, 2H), 4.31 - 4.19 (m, 1H), 4.19 - 4.08 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.50 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.24 - 3.18 (m, 2H), 3.03 - 2.94 (m, 6H), 2.55 (s, 3H), 2.46 - 2.24 (m, 3H), 2.05 -

1.67 (m, 8H), 1.66 - 1.51 (m, 8H), 1.36 - 1.22 (m, 4H), 0.91 - 0.80 (m, 15H)。

实施例 2.36: N-((11S, 14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-036)

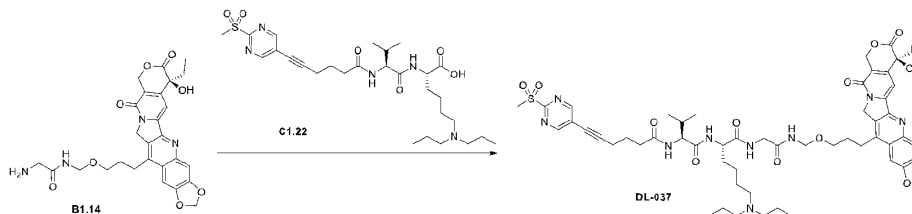


将化合物 C1.20 (40 mg, 0.075 mmol), 化合物 B1.14 (41 mg, 0.075 mmol) 溶于 DMF (1 mL), 然后再加入 HOBT (15.2 mg, 0.113 mmol) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (21.5 mg, 0.113 mmol), 然后再加入三乙胺 (23 mg, 0.225 mmol) 加完后反应液室温搅拌 16 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液浓缩得粗产品, 粗产品经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 N-((11S, 14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (16 mg, 收率 20%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1070.6$;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.13 - 9.08 (m, 2H), 9.01 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.20 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.65 - 4.53 (m, 2H), 4.26 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.20 - 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.50 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.14 - 3.07 (m, 6H), 2.98 (s, 2H), 2.55 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.41 - 2.29 (m, 2H), 2.03 - 1.89 (m, 2H), 1.89 - 1.77 (m, 7H), 1.61 - 1.56 (m, 2H), 1.32 (s, 2H), 1.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.91 - 0.78 (m, 9H)。

实施例 2.37: N-((11S, 14S)-11-(4-(二正丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-037)



将化合物 C1.22 (43 mg, 0.074 mmol), 化合物 B1.14 (40 mg, 0.075 mmol), 溶于 N, N-二甲基甲

酰胺 (1 mL), 然后依次加入 HBTU (28 mg, 0.075 mmol), N,N-二异丙基乙胺 (24 mg, 0.187 mmol), 反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物的三氟乙酸盐 (8.5 mg, 收率 10%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1098.6$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.19 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66 - 4.52 (m, 2H), 4.31 - 4.21 (m, 1H), 4.19 - 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.49 - 3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.15 - 3.06 (m, 2H), 3.02 - 2.95 (m, 6H), 2.59 - 2.52 (m, 3H), 2.41 - 2.29 (m, 2H), 2.05 - 1.90 (m, 2H), 1.91 - 1.77 (m, 6H), 1.63 - 1.57 (m, 6H), 1.31 - 1.29 (m, 2H), 0.92 - 0.80 (m, 15H).

采用本实施例中同样的操作, 反应液直接经制备色谱 (0.1% 甲酸水溶液, 乙腈) 纯化, 冻干, 得到目标化合物的甲酸盐 (32.6 mg, 收率 39%), 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1098.6$;

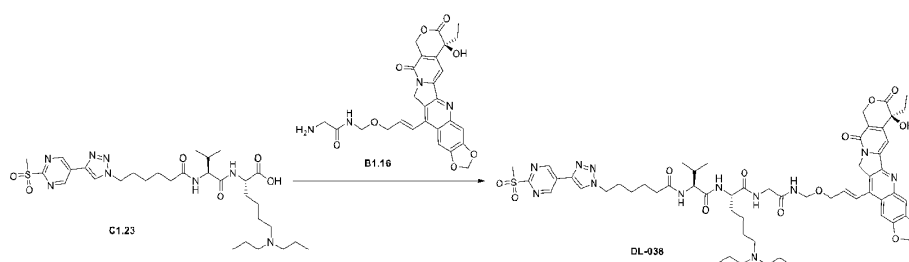
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.09 (s, 2H), 8.56 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.14 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.48 - 5.35 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 - 4.54 (m, 2H), 4.23 - 4.07 (m, 2H), 3.79 - 3.66 (m, 2H), 3.50 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.14 - 3.08 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 2.59 - 2.52 (m, 2H), 2.36 - 2.27 (m, 8H), 2.00 - 1.76 (m, 7H), 1.72 - 1.62 (m, 1H), 1.58 - 1.48 (m, 1H), 1.40 - 1.20 (m, 8H), 0.88 - 0.77 (m, 15H).

取 DL-037 甲酸盐 (16mg), 通过制备 HPLC 纯化 (0.1% 碳酸氢铵水, 乙腈), 冻干, 得游离态的目标化合物 (DL-037, 10mg, 收率 65%), 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1098.6$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.10 (s, 2H), 8.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.21 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.26 (s, 2H), 5.48 - 5.35 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.63 - 4.51 (m, 2H), 4.25 - 4.10 (m, 2H), 3.82 - 3.63 (m, 2H), 3.49 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.06 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.56 - 2.51 (m, 2H), 2.41 - 2.23 (m, 8H), 1.96 - 1.76 (m, 7H), 1.71 - 1.57 (m, 1H), 1.57 - 1.48 (m, 1H), 1.37 - 1.21 (m, 8H), 0.88 - 0.78 (m, 15H).

实施例 2.38: (S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

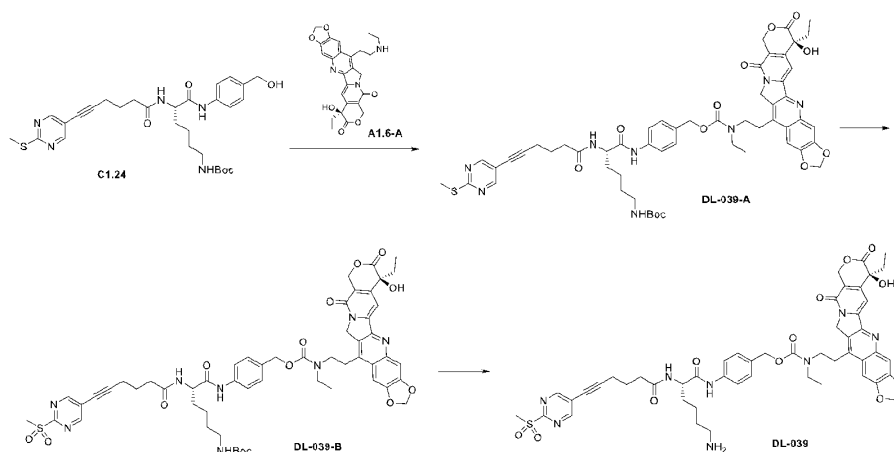


将化合物 B1.16 (30 mg, 0.06 mmol), 化合物 C1.23 (37 mg, 0.06 mmol) 溶于 DMF (1 mL)。然后再加入 HBTU (21 mg, 0.06 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (16 mg, 0.12 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 (S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (4 mg, 收率 6%) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1167.6$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (s, 2H), 8.98 (s, 1H, TFA), 8.92 (s, 1H), 8.74 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 8.25 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.58 - 6.52 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.74 - 4.67 (m, 2H), 4.46 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.01 - 2.95 (m, 8H), 2.23 - 2.18 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.00 (m, 2H), 1.90 - 1.84 (m, 6H), 1.63 - 1.57 (m, 9H), 0.88 (m, 9H), 0.81 - 0.78 (m, 6H)。

实施例 2.39: 4-((S)-6-氨基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺)己酰胺基)苄基 N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯



步骤一:

在 0° C 冰浴条件下, 向 C1.24 (150 mg, 0.264 mmol) 和三乙胺 (89 mg, 0.88 mmol) 的二氯甲烷 (10 mL) 溶液中加入 N, N-琥珀酰亚胺基碳酸酯 (DSC, 90 mg, 0.352 mmol), 反应在 0° C 氮气下反应 30 分钟, 随后滴加化合物 A1.6-A (82 mg, 0.176 mmol), 反应在室温下反应 12 小时。LCMS 监测反应完全。反应液减压浓缩成粗产品, 经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到黄色油状化合物 DL-039-A (27 mg, 收率: 14.4%) 为黄色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1059.2$;

步骤二:

向化合物 DL-039-A (60 mg, 0.057 mmol) 的四氢呋喃 (5 mL) 和水 (1 mL) 的混合溶液中加入过氧单磺酸钾 (Oxone, 349 mg, 0.567 mmol), 反应在室温下搅拌 12 小时。TLC 检测反应完全。向反应液中加入水 (10 mL), 用二氯甲烷 (10 mL X 3) 萃取, 有机相经饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩得到目标化合物 DL-039-B (60 mg, 粗品) 为黄色固体。

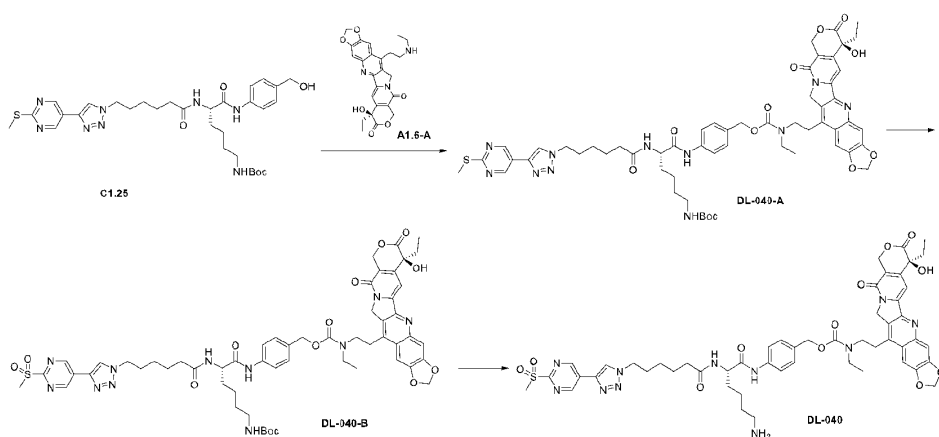
LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1091.0$;

步骤三:

将化合物 DL-039-B (60 mg, 0.055 mmol) 溶在二氯甲烷 (1 mL) 溶液中, 0° C 下向反应液中加入二氯乙酸 (1 mL), 反应在室温下搅拌 3 小时。LCMS 显示反应完成。滤液减压浓缩成粗产品, 经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 三氟乙酸) 得到黄色固体化合物 4-((S)-6-氨基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺)己酰胺基)苄基 N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]呋喃并[1, 2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯 (2.44 mg, 收率 3.69%)。

LCMS (ESI) $[1/2M+H]^+ = 496.3$, $t_R = 2.252$ min。

实施例 2.40: 4-((S)-6-氨基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)己酰胺基)苄基 N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]呋喃并[1, 2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯 (DL-040)



步骤一:

在 0° C 冰浴条件下, 向 C1.25 (300 mg, 0.469 mmol) 和三乙胺 (126 mg, 1.25 mmol) 的二氯甲烷 (10 mL) 中加入 N, N-琥珀酰亚胺基碳酸酯 (DSC, 160 mg, 0.626 mmol), 反应在 0° C 反应 30 分钟, 随后滴加化合物 A1.6-A (145 mg, 0.313 mmol), 然后反应在室温下反应 12 小时。LCMS 监测反应完全。反应液减压浓缩成粗产品, 经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 甲酸) 得到黄色油状化合物 DL-040-A (70 mg, 收率: 19.8%) 为黄色油状物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1130.1$ 。

步骤二:

向化合物 DL-040-A (70 mg, 0.062 mmol) 的四氢呋喃 (5 mL) 和水 (1 mL) 的混合溶液中加入过氧单磺酸钾 (Oxone, 381 mg, 0.619 mmol), 反应在室温下搅拌 12 小时。TLC 检测反应反应完全。向反应液中加入水 (10 mL), 用二氯甲烷 (10 mL x 3) 萃取, 有机相经饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩得到目标化合物 DL-040-B (70 mg, 粗品) 为黄色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1162.6$, $t_R = 1.710$ min。

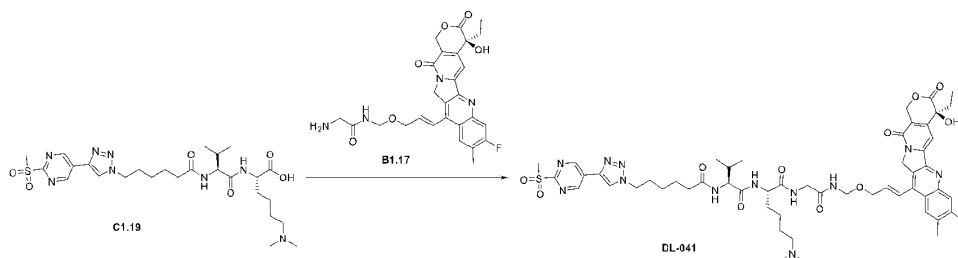
步骤三:

将化合物 DL-040-B (70 mg, 0.060 mmol) 溶在二氯甲烷 (1 mL) 溶液中, 0° C 下向反应液中加入二氯乙酸 (1 mL), 反应在室温下搅拌 3 小时。LCMS 显示反应完成。滤液减压浓缩成粗产品, 经高效液相制备纯化 (乙腈/水含 0.05% 三氟乙酸) 得到黄色固体化合物 4-((S)-6-氨基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)己酰胺基)苄基 N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)氨基甲酸酯 (5.54 mg, 收率 8.66%)。

LCMS (ESI) $[1/2M+H]^+ = 1062.5$, $t_R = 4.052$ min;

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.22 (br s, 1H), 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.22 - 8.03 (m, 1H), 7.85 (br s, 3H, NH₂-TFA), 7.61 - 7.45 (m, 3H), 7.32 - 7.26 (m, 1H), 7.26 - 7.17 (m, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.35 (s, 2H), 5.91 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.37 - 5.30 (m, 1H), 5.27 - 5.20 (m, 1H), 5.10 - 5.00 (m, 1H), 4.97 - 4.78 (m, 1H), 4.52 - 4.26 (m, 3H), 3.56 - 3.46 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 2.83 - 2.71 (m, 2H), 2.21 - 2.11 (m, 2H), 1.98 - 1.78 (m, 4H), 1.67 - 1.48 (m, 6H), 1.37 - 1.22 (m, 4H), 1.09 - 0.96 (m, 3H), 0.93 - 0.78 (m, 3H)。

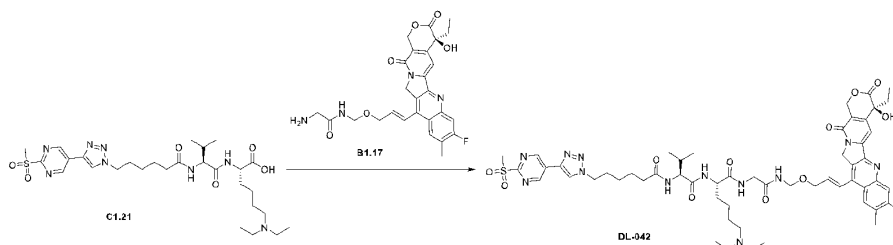
实施例 2.41: (S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-041)



将化合物 B1.17 (30 mg), 化合物 C1.19 (37 mg) 溶于 DMF (1 mL)。然后再加入 HBTU (21 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (16 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 (S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡咯并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (11 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1099.5$ 。

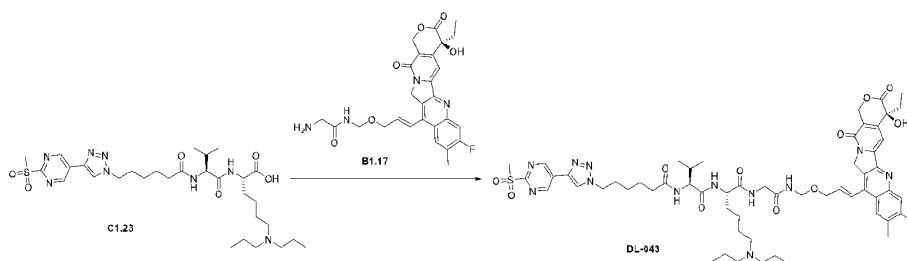
实施例 2.42: (S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡咯并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-042)



将化合物 B1.17 (30 mg), 化合物 C1.21 (37 mg) 溶于 DMF (1 mL)。然后再加入 HBTU (21 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (16 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 (S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡咯并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (7 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1127.5$ 。

实施例 2.43: (S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡咯并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-043)

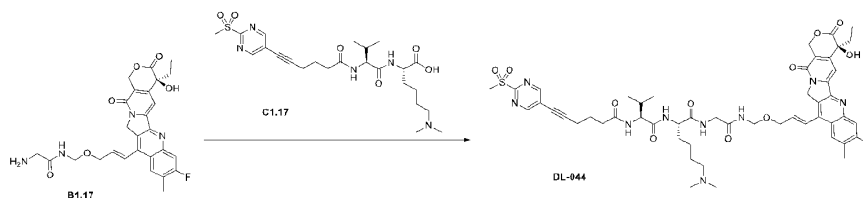


将化合物 B1.17 (17.5 mg, 0.033 mmol) 和化合物 C1.23 (22 mg, 0.034 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲

酰胺 (2 mL) 中, 然后依次加入 HOBt (7 mg, 0.051mmol), EDCI (10 mg, 0.051mmol), DIPEA (9 mg, 0.068 mmol), 加毕, 反应液室温搅拌 1 小时, 反应液直接经制备高效液相色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化, 制备液冷冻干燥得到目标化合物 (S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (7 mg, 收率 18%) 为淡黄色固体产品。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1155.5$.

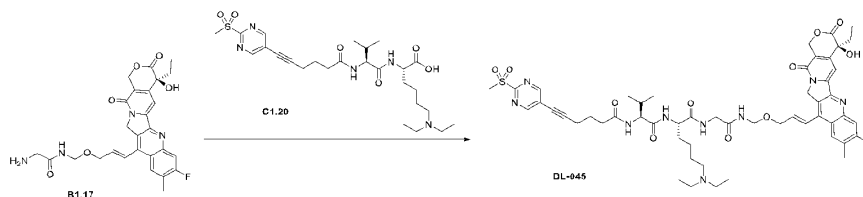
实施例 2.44: N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-044)



将化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.17 (80 mg) 溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 HBTU (45 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (35 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (21 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1028.5$ 。

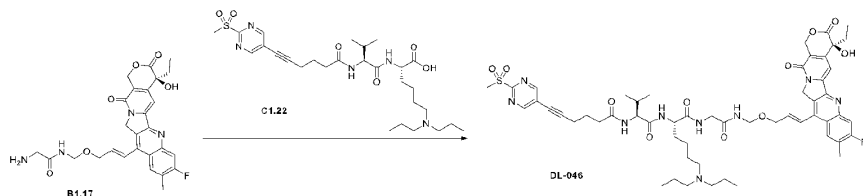
实施例 2.45: N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-045)



将化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.20 (80 mg) 溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 HBTU (45 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (35 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]咪唑啉并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (29 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1056.5$ 。

实施例 2.46: N-((11S, 14S, E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]呋喃并[1, 2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-046)

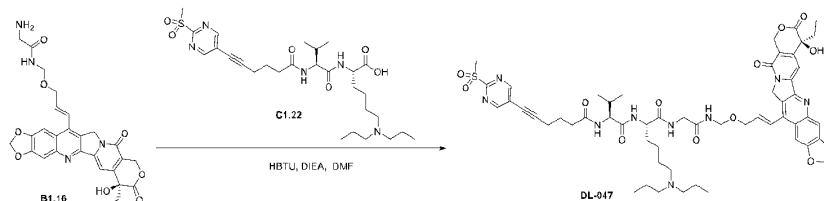


将化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.22 (80 mg)溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 HBTU (45 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺(35 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物 N-((11S, 14S, E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3, 14-二氧代-3, 4, 12, 14-四氢-1H-吡喃并[3', 4':6, 7]呋喃并[1, 2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7, 10, 13-三氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (30 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1084.2$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.09 (s, 2H), 8.73 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 8.30 - 8.24 (m, 2H), 8.05 (m, 1H), 7.94 - 7.88 (m, 2H), 7.38 - 7.33 (m, 2H), 6.67 - 6.60 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.37 (s, 2H), 4.73 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 4.34 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 4.26 - 4.20 (m, 1H), 4.17 - 4.13 (m, 1H), 3.86 - 3.69 (m, 4H), 3.40 (s, 3H), 2.41 - 2.30 (m, 8H), 2.02 - 1.94 (m, 2H), 1.89 - 1.85 (m, 2H), 1.82 - 1.77 (m, 2H), 1.74 - 1.63 (m, 2H), 1.60 - 1.50 (m, 2H), 1.47 - 1.39 (m, 8H), 0.90 - 0.86 (m, 6H), 0.85 - 0.80 (m, 9H)。

实施例 2.47: N-((11S, 14S, E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]呋喃并[1, 2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7, 10, 13-氧代-4-氧杂-6, 9, 12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-047)



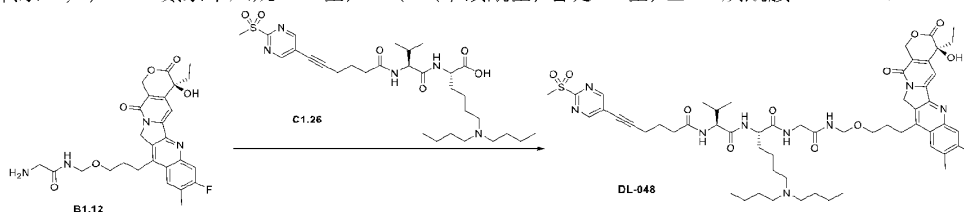
将化合物 B1.16 (45 mg, 0.08 mmol), 化合物 C1.22 (49 mg, 0.08 mmol), 溶于 DMF (1 mL)。然后再加入 HBTU (32 mg, 0.08 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (27 mg, 0.2 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱(0.01% 三氟乙酸的水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物 N-((11S, 14S, E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8, 11-二氧代-7, 8, 11, 13-四氢-10H-[1, 3]二氧杂环戊烷并[4, 5-g]吡喃并[3', 4':6, 7]呋喃并[1, 2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7, 10, 13-

氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-047, 10 mg) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1096.6$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.10 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.75 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.26 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 - 7.24 (m, 2H), 6.65 - 6.43 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.74 - 4.69 (m, 1H), 4.31 - 4.29 (m, 2H), 4.26 - 4.24 (m, 1H), 4.19 - 4.12 (m, 1H), 3.79 - 2.76 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.02 - 2.95 (m, 8H), 2.55 (m, 2H), 2.39 - 2.32 (m, 2H), 2.01 - 1.93 (m, 2H), 1.92 - 1.77 (m, 5H), 1.62 - 1.58 (m, 6H), 1.36 - 1.30 (m, 2H), 0.91 - 0.83 (m, 15H)。

实施例 2.48: N-((11S,14S)-11-(4-(二丁基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-048)

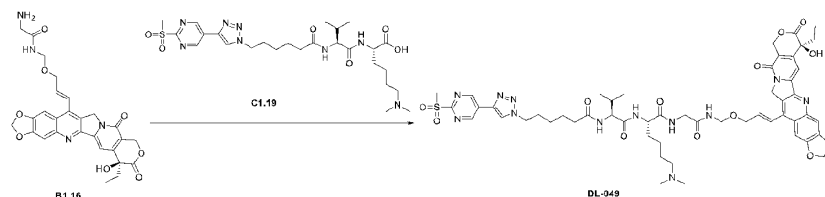


将化合物 C1.26 (50mg, 0.08mmol), 化合物 B1.12 (43mg, 0.08mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (1.5mL), 然后依次加入 DIPEA (26mg, 0.21mmol), HBTU (31mg, 0.08mmol), 室温搅拌反应 1 小时。LCMS 检测反应完成, 反应液直接通过高效制备 (0.01% 三氟乙酸的水溶液, 乙腈) 分离纯化得到目标化合物 (13.57mg) 为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1114.6$;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.09 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.64 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.23 - 8.16 (m, 2H), 8.07 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.93 - 7.85 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.61 - 4.59 (m, 2H), 4.24 - 4.22 (m, 1H), 4.19 - 4.10 (m, 1H), 3.73 - 3.70 (m, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.21 - 3.18 (m, 6H), 3.00 - 2.98 (m, 8H), 2.54 (s, 3H), 1.97 - 1.78 (m, 7H), 1.56 - 1.52 (m, 8H), 1.36 - 1.25 (m, 6H), 0.93 - 0.78 (m, 15H)。

实施例 2.49: (S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-049)

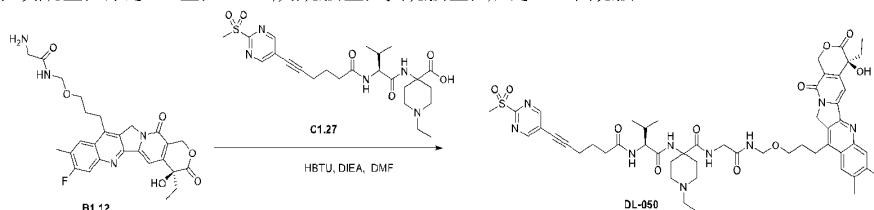


将化合物 B1.16 (45 mg, 0.08 mmol), 化合物 C1.19 (50 mg, 0.08 mmol), 溶于 DMF (1 mL)。然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (27 mg, 0.2 mmol), HBTU (32 mg, 0.08 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液直接经制备色谱 (0.01% 的甲酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 (S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-049, 3 mg) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1111.1$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (s, 2H), 8.92 (s, 1H), 8.69 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.25 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.19 (s, 1H, FA), 7.99 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27 (m, 2H), 6.59 - 6.48 (m, 2H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.74 - 4.67 (m, 2H), 4.44 (m, 2H), 4.30 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.83 - 3.70 (m, 4H), 3.43 (s, 3H), 2.25 (m, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.04 - 1.97 (m, 2H), 1.90 - 1.85 (m, 4H), 1.55 - 1.51 (m, 3H), 1.39 - 1.34 (m, 6H), 0.90 - 0.83 (m, 3H), 0.80 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H)。

实施例 2.50: 1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-甲酰胺 (DL-050)



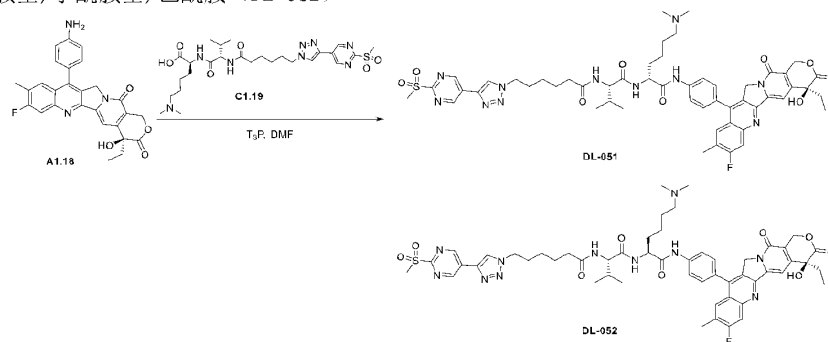
将化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol), 化合物 C1.27 (50 mg, 0.10 mmol), 溶于 DMF (1 mL)。然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (30 mg, 0.24 mmol) 和 HBTU (36 mg, 0.10 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时, LCMS 检测反应完成后, 将反应液经制备色谱 (0.01% FA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-甲酰胺 (DL-050, 10 mg) 为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1028.6$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.08 (s, 2H), 8.42 (s, 1H, FA), 8.18 - 8.15 (m, 4H), 7.98 (t,

$J = 5.6$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.72 - 4.63 (m, 1H), 4.53 - 4.45 (m, 1H), 4.07 - 4.06 (m, 1H), 3.79 - 3.69 (m, 1H), 3.58 - 3.55 (m, 2H), 3.55 - 3.48 (m, 5H), 3.21 - 3.16 (m, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.66 - 2.64 (m, 2H), 2.40 - 2.26 (m, 5H), 1.99 - 1.71 (m, 12H), 0.96 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.93 - 0.85 (m, 9H)。

实施例 2.51: (R)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-051) 和 (S)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-052)



将化合物 A1.18 (40 mg, 0.08 mmol) 和 C1.19 (71 mg, 0.12 mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (3 mL)。再加入 T3P (254 mg, 0.40 mmol, 50%w/w 乙酸乙酯的混合物), 将反应液于室温下搅拌 1 小时。LCMS 检测反应完成后, 反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标化合物 (R)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-051, 8.1 mg) 和 (S)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (DL-052, 8.8 mg) 均为白色固体。

DL-051:

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1048.2$, $t_R = 1.258$ min;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.12 (s, 1H), 9.40 (s, 2H), 8.84 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.99 - 7.89 (m, 3H), 7.73 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.36 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.40 (m, 3H), 4.22 - 4.10 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.30 - 2.25 (m, 2H), 2.24 - 2.20 (m, 2H), 2.19 - 2.15 (m, 6H), 2.03 - 1.93 (m, 2H), 1.92 - 1.78 (m, 6H), 1.72 - 1.66 (m, 1H), 1.61 -

1.54 (m, 2H), 1.48 - 1.42 (m, 2H), 1.30 - 1.26 (m, 2H), 0.91 - 0.86 (m, 9H)。

DL-052;

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1048.2, t_R = 1.283 min;

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.34 (s, 1H), 9.45 (s, 2H), 8.94 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.99 - 7.85 (m, 4H), 7.75 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.52 - 4.42 (m, 3H), 4.25 - 4.17 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.30 - 2.13 (m, 8H), 2.05 - 1.97 (m, 2H), 1.95 - 1.81 (m, 7H), 1.60 - 1.55 (m, 2H), 1.50 - 1.44 (m, 2H), 1.33 - 1.28 (m, 4H), 0.95 - 0.83 (m, 9H)。

三、抗体制备与鉴定

实施例 3、抗 Napi2b 抗体制备

3.1 抗原的制备

1) 抗原制备: 人 Napi2b (h.Napi2b) 的氨基酸序列参考 UniProt 蛋白数据库中的 095436, 其第二个胞外环为 234 aa-362 aa; 人 Napi2a 的氨基酸序列参考 UniProt 蛋白数据库中的 Q06495; 人 Napi2c 的氨基酸序列参考 UniProt 蛋白数据库中的 Q8N130。食蟹猴 Napi2b (c.Napi2b) 的氨基酸序列参考 UniProt 蛋白数据库中的 A0A2K5UHY1, 其第二个胞外环为 234 aa-362 aa。大鼠 Napi2b (r.Napi2b) 的氨基酸序列参考 UniProt 蛋白数据库中的 Q9JJ09, 其第二个胞外环为 235 aa -363 aa。以上氨基酸序列经由密码子优化, 全长序列合成于慢病毒载体 pLVX 上或者 pCDNA3.4 载体上, 第二个胞外环序列合成于 pTT5-hFc(hFc:SEQ ID No: 85)及 pTT5-mFc(mFc:SEQ ID No: 86)上。

将包含第二个胞外环的 pTT5-hFc 或 pTT5-mFc 质粒通过 PEI_{max} (Polysciences, 24765-1)瞬时转染 HEK293-EBNA 细胞, 表达 7 天后通过 ProA 填料 (GE, Mabselect XL) 纯化获得人 (h.) Napi2b-mFc/Napi2b-hFc、食蟹猴 (c.) Napi2b-mFc/Napi2b-hFc 及大鼠 (r.) Napi2b-mFc/Napi2b-hFc 抗原。

2) 细胞系构建: 通过慢病毒包装系统制备病毒, 获得病毒后感染 CHO 细胞、HT29 细胞或 HEK293T 细胞, 通过嘌呤霉素筛选, 获得分别过表达人 Napi2a/b/c 的稳定细胞系, 分别为 CHO-h.Napi2b 细胞、HT29-h.Napi2b 细胞、HEK293T-h.Napi2a 细胞、HEK293T-h.Napi2c 细胞。

3.2 小鼠免疫及免疫效价检测

选用 CD1 (维通利华)、KM (维通利华)、Balb/c (集萃药康) 品系各 4 只小鼠, 均为雌性, 6 周龄左右入组。采用 CHO-h.Napi2b 细胞及 pCDNA3.4-h.Napi2b 质粒进行一次初始免疫和两次加强免疫, 结束后对小鼠眼眶静脉采血。

2 次加强免疫过后, 通过 ELISA 检测血清效价。检测方法如下: 实验前一晚用 CBS 包被液包被人 Napi2b-hFc 抗原, 包被浓度 1 μ g/mL, 体积 100 μ L, 4℃包被过夜; 第二天去除包被液, 每孔用 300 μ L PBS 洗一次, 每孔加入 100 μ L 2% BSA (Biotopped, A6020) (in PBS), 37℃封闭 2 小时; 用 2% BSA (in PBS) 稀释血清, 500 倍起始, 3 倍稀释, 11 个浓度点, 稀释后取 100 μ L 加入板中, 37℃孵育 2 小时; 去除上清, 每孔用 300 μ L PBST 洗三次, 每孔加入 100 μ L 抗小鼠 HRP 二抗 (Jackson, 115-035-003) (in 2% BSA), 37℃孵育 1 小时; 去除二抗, 每孔用 300 μ L PBST 洗五次, 随后每孔加入 100 μ L TMB 底

物（湖州英创，TMB-S-004），显色 5-20 分钟；每孔加入 50 uL 2N HCl 终止反应，酶标仪（厂家：MD，型号：SpectraMax）读取 OD450nm 读数，导入到 GraphPad 软件进行拟合，根据检测结果对 CD1、KM、Balb/c 各选取一只小鼠进行杂交瘤融合。

3.3 杂交瘤融合筛选

杂交瘤融合：取小鼠脾脏、淋巴结制备细胞悬液，与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞 1：1 比例进行混合，采用细胞电融合缓冲液进行重悬，使用 BTX-ECM2001 进行电融合反应。完全融合培养基（RPMI160+15%FBS +1×HAT）重悬，2 万-2.5 万每孔分至 96 孔细胞培养板中，37℃、5% CO2 培养 7 天后进行筛选。共进行 2 轮融合，第一轮融合 85 板，第二轮融合 40 板。

母克隆筛选：通过人 Napi2b-hFc 蛋白进行 ELISA 初筛，实验方法如上所述，初筛后挑选出阳性杂交瘤克隆。通过包被人、食蟹猴、大鼠 Napi2b-hFc 进行 ELISA 复筛，并采用 Napi2b 阳性肿瘤细胞 OVCAR3 进行细胞 ELISA 复筛。最后选出阳性克隆用于亚克隆。通过上述方法，第一轮融合选出 22 个母克隆进行亚克隆，第二轮融合选出 16 个母克隆进行亚克隆。

亚克隆筛选：先后通过包被人、食蟹猴、大鼠 Napi2b-hFc 进行 ELISA 筛选及通过进行细胞 ELISA 筛选，实验方法如上文所述。每板选取 1-3 个共 43 个阳性克隆用无血清培养基放大培养。

3.4 鼠源抗体评价和序列钩取

采用无血清培养基培养杂交瘤细胞，收集的单克隆上清，通过 ProA 填料进行纯化，获得鼠源抗体。先后通过包被 Napi2b-hFc、食蟹猴 Napi2b-hFc、大鼠 Napi2b-hFc 及 OVCAR3 进行 ELISA 和细胞 ELISA 评价，实验方法如上文所述，鼠源抗体按照 10 ug/mL 起始，3 倍稀释，11 个浓度点，共评价 39 个鼠源抗体。部分高亲和力的单克隆鼠源抗体进行 Elisa 和细胞亲和力测定结果如表 1 所示。

表 1. 部分鼠源抗体的亲和力测定

克隆号	h. Napi2b-hFc EC50 (ng/mL)	c. Napi2b-hFc EC50 (ng/mL)	r. Napi2b-hFc EC50 (ng/mL)	OVCAR3 细胞 ELISA EC50 (ng/mL)
16G5B3	11.69	5.14	8.63	13.46
60A12B3	5.89	3.12	5.44	14.23
22H9C4	4.28	4.09	7.72	10.48
66C12D12	3.01	1.70	2.71	6.80
34F2A10	7.11	6.35	7.02	15.80

对选取亲和力高的单克隆钩取序列，方法为：候选杂交瘤细胞收集约 1×10⁵ 个，通过 Trizol 提取 RNA，然后使用 PrimeScript RT reagent 试剂盒通过 PolyA 进行反转录获得 cDNA；分别于重链、轻链上游设计上游引物，重链 CH1 区域、轻链 CL 区域设计下游引物。通过 PCR 扩增产物，通过琼脂糖胶回收试剂盒进行片段回收；送样北京擎科生物技术有限公司进行测序。其中 5 克隆号为 16G5B3、60A12B3、22H9C4、66C12D12 和 34F2A10，对它们的鼠源抗体 16G5B3、60A12B3、22H9C4、66C12D12 和 34F2A10 分别测序，鼠源抗体可变区及 CDR 具体序列见序列信息表。

3.5 抗体人源化

采用 CDR grafting 的方法，首先将通过常规 BLAST 方法，找到同原始鼠源序列同源性最高的人 germline 序列，作为模板；将鼠源抗体的 CDR 移植到人源模板上，构建成嵌合体；根据结构分析鼠源抗体中能保留其原始构象的 FR 氨基酸，将嵌合体中相应的氨基酸回复突变为鼠源氨基酸以保持原有亲和力；将构建的人源化抗体进行计算及免疫原性分析，找到高免疫原性片段，进行低免疫原性片段的替换。对鼠源抗体 16G5B3 进行人源化获得人源化可变区 16G5B3-hz1 和 16G5B3-hz2。对鼠源抗体 60A12B3、22H9C4、66C12D12 和 34F2A10 分别进行人源化获得人源化可变区 60A12B3-hz1、22H9C4-hz1、66C12D12-hz1 和 34F2A10-hz1。各人源化抗体可变区及 CDR 具体序列见序列信息表，其中 CDR 按 IMGT 和 Kabat 定义方式提供。

3.6 抗 Napi2b 人源化抗体表达

将各人源化抗体的重链可变区分别与重链 IgG1 恒定区 (SEQ NO:70) 连接，各人源化抗体的轻链可变区分别与 Kappa 恒定区 (SEQ NO: 80) 连接，抗体 C1 (简称 C1，重、轻可变区序列来自于 IMGT，ID: 478) 的重轻链可变区分别与 IgG1 恒定区 (SEQ NO:70)、Kappa 恒定区 (SEQ NO: 80) 连接)，连接获得的氨基酸序列提交给通用生物进行基因合成，进行密码子优化后，构建到 PTT5 载体上，质粒合成好后，通过 PEI_{max} 转染 HEK293E 细胞，表达 7 天左右，离心收集上清。上清采用 ProA 填料进行纯化。纯化好的抗体全部超滤到 PBS 缓冲液，测定浓度，-20 度保存。

人源化可变区 16G5B3-hz1、16G5B3-hz2，60A12B3-hz1、22H9C4-hz1、66C12D12-hz1 和 34F2A10-hz1 连接后表达获得的抗体分别命名为 16G5B3-hz1 抗体、16G5B3-hz2 抗体，60A12B3-hz1 抗体、22H9C4-hz1 抗体、66C12D12-hz1 抗体和 34F2A10-hz1 抗体。各人源化抗体恒定区及重轻链序列见序列信息表。

实施例 4、抗 Napi2b 抗体的鉴定

4.1 人源化抗体 ELISA 亲和力评价

1) ELISA 法：按 1 ug/ml 用 CBS 包被抗原蛋白 h.Napi2b-mFc、r.Napi2b-mFc 及 c.Napi2b-mFc，2% BSA (in PBS) 37° C 封闭 2 小时，加入梯度稀释的抗体 (10 ug/mL 起始，3 倍稀释，11 个浓度点)，37° C 孵育 2 小时，加入 HRP 标记的抗人二抗 (Jackson，109-035-088)，37° C 孵育 1 小时，加入 TMB 底物显色，用 2M HCl 终止后上机读取 450nm 吸光值。

2) 细胞 ELISA 法：胰酶消化离心收集 OVCAR3 细胞，培养基重悬细胞，每孔 5[×]10⁴ 个细胞铺至 96 孔板中过夜，4%多聚甲醛固定细胞，2% BSA (in PBS) 37° C 封闭 2 小时，加入梯度稀释的抗体 (10 ug/mL 起始，3 倍稀释，11 个浓度点)，37° C 孵育 2 小时，加入 HRP 标记的抗人二抗 (Jackson，货号 109-035-088)，37° C 孵育 1 小时，加入 TMB 底物显色，用 2M HCl 终止后上机读取 450nm 吸光值。

实验结果如表 2 所示，16G5B3-hz2 抗体、22H9C4-hz1 抗体、66C12D12-hz1 抗体与人、大鼠、食蟹猴 Napi2b 蛋白及内源性表达 Napi2b 的 OVCAR3 细胞均具有较高亲和力。

表 2. 人源化抗体 ELISA 亲和力评价

抗体	h. Napi2b EC50 (ng/mL)	c.Napi2b EC50 (ng/mL)	r.Napi2b EC50 (ng/mL)	OVCAR3 细胞 ELISA EC50 (ng/mL)
----	---------------------------	-----------------------------	-----------------------------	------------------------------------

60A12B3-hz1	结合弱	/	/	/
16G5B3-hz1	结合弱	2748	3685	结合弱
16G5B3-hz2	53.99	57.63	27.07	49.89
22H9C4-hz1	44.76	40.96	22.74	30.86
34F2A10-hz1	90.24	结合弱	1575	65.56
66C12D12-hz1	64.7	109.5	47.3	20.83
C1	54.23	291.8	结合弱	240.7

*/代表未检测

4.2 人源化抗体流式亲和力评价

胰酶消化离心收集 OVCAR3 细胞，预冷 PBS 洗三次，1%BSA（in PBS）重悬细胞，每孔 1×10^5 个细胞铺至 96 孔尖底板中，加入梯度稀释抗体（20 ug/mL 起始，4 倍稀释，8 个浓度点），4℃ 孵育 1 小时，预冷 PBS 洗三次后每孔加入 1 uL 抗人 APC 荧光二抗（BioLegend，货号 410712），4℃ 孵育 0.5 小时，预冷 PBS 洗三次后重悬细胞流式细胞仪（Sony，LE-SA3800GA）检测。

实验结果如图 1 所示，16G5B3-hz2 抗体、66C12D12-hz1 抗体与 OVCAR3 细胞均具有较高亲和力，EC50 分别为 560.9ng/mL 和 957.9ng/mL，且均优于 C1 抗体。

4.3 人源化抗体动态亲和力评价

通过 ForteBio 测定人源化抗体的动态亲和力。实验步骤如下：1. 传感器准备：取出 ProA 传感器，用 PBST 稀释液（PH7.4）将传感器预湿 10min；2. 样品稀释：将需要固化的抗体用生物素标记后稀释至 5 ug/mL，抗原 h.Napi2b-mFc 和 c. Napi2b-mFc 从 500 nM 起始，2 倍稀释，5 个浓度点，设置 0 浓度点；3. 设置程序，放入传感器板和样品板，开始程序，传感器用 20mM 甘氨酸溶液（pH 1.7）再生；4. 使用 Octet 分析软件分析数据，实验结果如表 3 所示，16G5B3-hz2 抗体、66C12D12-hz1 抗体与人、猴 Napi2b 均有较高亲和力。

表 3. 人源化抗体动态亲和力检测

抗体	h. Napi2b-mFc			c. Napi2b-mFc		
	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
16G5B3-hz2	1.44E-11	2.46E+04	3.56E-07	4.11E-09	5.35E+04	2.20E-04
66C12D12-hz1	8.54E-10	2.66E+04	2.27E-05	1.59E-08	3.09E+04	4.91E-04
C1	8.54E-10	2.66E+04	2.27E-05	6.55E-08	1.99E+04	1.30E-03

4.4 人源化抗体非特异性评价

胰酶消化离心收集 HEK293T-h.Napi2a、HEK293T-h.Napi2c 细胞，预冷 PBS 洗三次，1%BSA（in PBS）重悬细胞，每孔 3×10^5 个细胞铺至 96 孔尖底板中，加入 50 ug/mL 待检测抗体 4℃ 孵育 1 小时，预冷 PBS 洗三次后每孔加入 1 uL 抗人 APC 荧光二抗，4℃ 孵育 0.5 小时，预冷 PBS 洗三次后重悬细胞，流式细胞

仪上机检测。

实验结果如表 4 所示，16G5B3-hz2 抗体、22H9C4-hz1 抗体及 66C12D12-hz1 抗体均不会非特异识别人 Napi2a、Napi2c。

表 4. 人源化抗体非特异性结合检测

抗体	HEK293T-h. Napi2a			HEK293T-h. Napi2c		
	阳性率	APC-Mean	APC-Median	阳性率	APC-Mean	APC-Median
空白对照	0.10%	955.9	765.7	0.39%	812.3	715.1
16G5B3-hz2	0.19%	1144.6	916.2	0.54%	927.9	822.2
22H9C4-hz1	0.19%	1634.1	1382.6	0.46%	1045.9	951.3
66C12D12-hz1	0.30%	1405.1	1186.4	1.17%	1262.5	1148.2
C1	0.59%	1443.3	1117.5	0.14%	1071.6	972.1

4.5 人源化抗体内吞活性评价

胰酶消化离心收集 HCC4006 细胞（南京科佰），用浓度为 10 ug/mL 的待检测抗体 4℃ 孵育 1 小时，PBS 洗 3 次，用 RPMI 1640+10% FBS 重悬细胞，分成 3 份分别在 37℃ 孵育 0、2、4 小时，PBS 洗三次后加入 1 uL 抗人 APC 荧光二抗，4℃ 孵育 0.5 小时，PBS 洗三次后重悬细胞上机。按照以下公式计算内吞率：内吞率（%）=【1-（该时间点检测样品平均荧光值-该时间点阴性对照样品平均荧光值）/（0 小时检测样品平均荧光值-0 小时阴性对照样品平均荧光值）】*100。

实验结果如表 5 和图 2 所示，16G5B3-hz2 抗体、66C12D12-hz1 抗体有很强的内吞活性，并且随着时间延长，内吞率也增加。

表 5. 人源化抗体内吞率检测

抗体 时 间	0h	2h	4h
16G5B3-hz2	0	90.4%	94.8%
66C12D12-hz1	0	92.3%	94.6%

4.6 人源化抗体血清稳定性评价

1) 样品处理：用人血清将人源化候选抗体 16G5B3-hz2、66C12D12-hz1 稀释至 20 ug/mL，0.22um 滤器过滤除菌，每个候选设置 3 个时间点分别为第 1 天、8 天、15 天，每管 500uL，封口膜封口后置于 37℃ 培养箱，分别于第 1 天、8 天、15 天收样至-80℃ 冰箱保存。

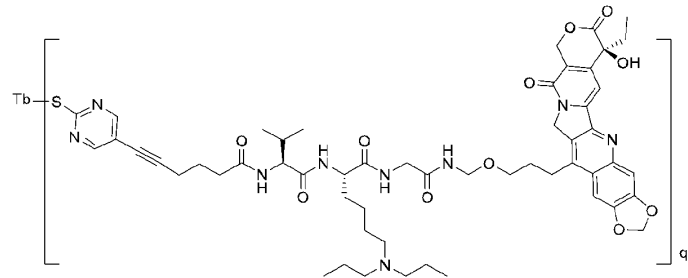
2) ELISA 法：按 1ug/ml 用 CBS 包被抗原蛋白 h.Napi2b-mFc，2% BSA（in PBS）37° C 封闭 2 小时，加入梯度稀释的抗体，37° C 孵育 2 小时，加入 HRP 标记的抗人二抗，37° C 孵育 1 小时，加入 TMB 底物显色，用 2M HCl 终止后上机读取 450nm 吸光值。

实验结果如图 3A 和 3B 所示，16G5B3-hz2 抗体与 66C12D12-hz1 在血浆中第 1 天、8 天、15 天亲和力和无明显变化，具有良好的血清稳定性。

四、包含细胞生物活性分子和连接体的化合物与抗体的偶联

实施例 5: Napi2b-ADC 的制备

实施例 5.1 Napi2b-ADC-07 的制备



其中 Tb 为 Napi2b 抗体（包括下述的 66C12D2-hz1, 16G5B3-hz2, C1 等），q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

5.1.1. Napi2b -ADC-07（DAR8）样品制备

将抗 Napi2b 抗体 66C12D2-hz1 30 mg，用稀释液（20 mM PB, pH 7.5）稀释，加入终浓度为 1mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入抗体 5.75 倍当量的 TCEP 溶液，混匀，室温放置 90 分钟；向上述溶液体系加入抗体 12 倍当量的溶解于二甲基亚砜中的 DL-037，混匀，室温静置 2 小时，得到偶联后样品，反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 6.0 的 20mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 Napi2b 抗体 66C12D2-hz1 ADC 组合物的溶液 66C12D2-hz1- ADC07(DAR8)。利用质谱法测定 DAR 值，

色谱条件：色谱柱：PLRP-S，2.1*50mm, 5 μm；流动相 A：0.1%FA /H₂O；流动相 B：0.1%FA/ACN ；柱温：30℃ 样品室温度：8℃ 流速：0.6 ml/min 进样量：2 μl

表 6. 流动相梯度

时间 (min)	1	5	5.1	7	10
流动相 A	90	40	10	90	90
流动相 B	10	60	90	10	10

样品处理：分别取样品 50 μg，加入 1M DTT 2 μl，加超纯水至 50 μl 稀释至约 1.0 mg/ml 浓度，混匀，室温还原 30min。

LC/MS 型号：Agilent 1290-6545XT Q-TOF

质谱条件：Gas temp: 320℃, Drying Gas: Nebulizer : 35 psi; Sheath Gas Temp : 350℃; sheath Gas Flow : 11 l/min; m/z 500~3000。

结果如下所示：

表 7 66C12D2-hz1- ADC07(DAR8) 理论分子量及实测分子量

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23379.91	24397.31	NA	NA

	实测值	未检出	24394	未检出	未检出
HC	理论值	50280.5	51297.9	52315.3	53332.7
	实测值	未检出	51297	52312	35328

表中，mAb 表示未偶联的单克隆抗体；LC 代表抗体轻链；HC 代表抗体重链；DAR1 代表包含轻链或重链偶联 1 个毒素分子的偶联物；DAR2 代表包含轻链或重链偶联 2 个毒素分子的偶联物；DAR3 代表包含轻链或重链偶联 3 个毒素分子的偶联物；其中，单抗理论分子量以 G0F 糖型计算。下文中 mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3 如上说明。

66C12D2-hz1-ADC07(DAR8)样品轻链偶联 0~1 个毒素分子（LC，DAR1 比例分别为 0%，100%）、重链偶联 0~3 个毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分别为 0%，1%，1%，98%），由此计算 66C12D2-hz1-ADC07(DAR8)样品偶联比（DAR 值）为 8.0。根据重链偶联不同个数毒素分子的情况可推知，q 可为 4, 5, 6, 7, 8。

利用上述相同的方法，将 66C12D2-hz1 替换为 16G5B3-hz2，获得含有抗 Napi2b 抗体 16G5B3-hz2 ADC 组合物的溶液 16G5B3-hz2-ADC07(DAR8)。

5.1.2 Napi2b -ADC-07 (DAR6) 样品制备

将抗 Napi2b 抗体 16G5B3-hz2 30 mg，用稀释液（20 mM PB，pH 7.5）稀释，加入终浓度为 1mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入抗体 5.75 倍当量的 TCEP 溶液，混匀，室温放置 90 分钟；向上述溶液体系加入抗体 7.0 倍当量的溶解于二甲基亚砷中的 DL-037，混匀，室温静置 2 小时，得到偶联后样品，反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 6.0 的 20mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 Napi2b 抗体 16G5B3-hz2 ADC 组合物的溶液 16G5B3-hz2-ADC07(DAR6)。采用 7.1.1 中相同质谱法测定结果如下

表 8. 16G5B3-hz2-ADC07(DAR6)理论分子量及实测分子量

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23449.1	24466.5	NA	NA
	实测值	23445	24463	未检出	未检出
HC	理论值	50207.4	51224.8	52242.2	53259.6
	实测值	未检出	51218	52237	53255

16G5B3-hz2-ADC07(DAR6)样品轻链偶联 0~1 个毒素分子（LC，DAR1 比例分别为 18%，82%）、重链偶联 0~3 个毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分别为 0%，11%，28%，60%），由此计算 16G5B3-hz2-ADC07(DAR6)样品 DAR 值为 6.6。根据重链偶联不同个数毒素分子的情况可推知，q 可为 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8。

利用上述相同的方法，将 16G5B3-hz2 替换为 66C12D2-hz1，获得含有抗 Napi2b 抗体 66C12D2-hz1 ADC 组合物的溶液 66C12D2-hz1-ADC07(DAR6)。

5.1.3 Napi2b -ADC-07 (DAR1) 样品制备

将抗 Napi2b 抗体 16G5B3-hz2 30 mg，用稀释液（20 mM PB，pH 7.5）稀释，加入终浓度为 1mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入抗体 5.75 倍当量的 TCEP 溶液，混匀，室温放置 90 分钟；向上述溶液体系加入

抗体 1.5 倍当量的溶解于二甲基亚砜中的 DL-037，混匀，室温静置 2 小时，得到偶联后样品，反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 6.0 的 20mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 Napi2b 抗体 16G5B3-hz2 ADC 组合物的溶液 16G5B3-hz2- ADC07 (DAR1)。采用 7.1.1 中相同质谱法测定结果如下：

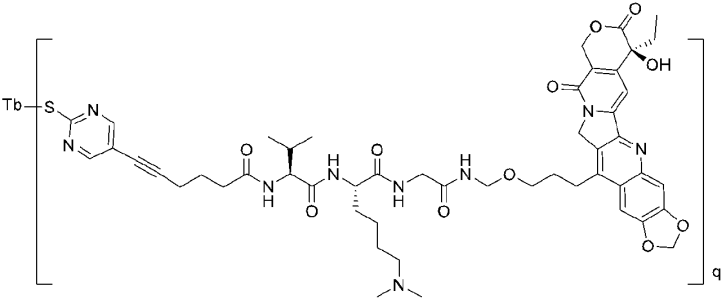
表 9 16G5B3-hz2- ADC07 (DAR1) 理论分子量及实测分子量

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23449.1	24466.5	NA	NA
	实测值	23445	未检出	未检出	未检出
HC	理论值	50207.4	51224.8	52242.2	53259.6
	实测值	50200	51218	52237	未检出

16G5B3-hz2- ADC07 (DAR1) 样品轻链偶联 0~1 个毒素分子 (LC, DAR1 比例分别为 0%, 100%)、重链偶联 0~3 个毒素分子 (mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分别为 56%, 32%, 12%, 0%)，由此计算 16G5B3-hz2- ADC07 (DAR1) 样品偶联比 (DAR 值) 为 1.1。根据重轻链偶联不同个数毒素分子的情况可推知，q 可为 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8。

利用上述相同的方法，将 16G5B3-hz2 替换为 66C12D2-hz1，获得含有抗 Napi2b 抗体 66C12D2-hz1 ADC 组合物的溶液 66C12D2-hz1- ADC07 (DAR1)。

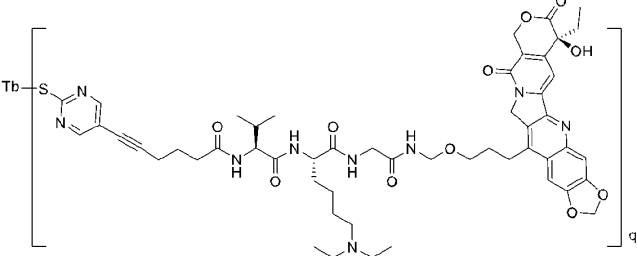
实施例 5.2: Napi2b-ADC-04 的制备



其中 Tb 为 Napi2b 抗体，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

利用 5.1.1 相同的方法，将 DL-037 替换为 DL-019，制备有抗 Napi2b 抗体-ADC 组合物的溶液。

实施例 5.3: Napi2b-ADC-06 的制备



其中 Tb 为 Napi2b 抗体，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

利用 5.1.1 相同的方法，将 DL-037 替换为 DL-036，制备有抗 Napi2b 抗体-ADC 组合物的溶液。

五、生物活性分子体外生物活性测定

实施例 6.1：生物活性分子对体外细胞活性的抑制活性检测一

首先培养肿瘤细胞；将本公开的生物活性分子与肿瘤细胞进行共培养，然后添加 CCK8 试剂（东仁化学科技有限公司，Cat:CK04，Lot:JJ744），用酶标仪（厂家：Molecular Devices，型号：SpectraMax M2）读数（检测波长为 450nm），检测线粒体内的脱氢酶的活性，以评价生物活性分子对细胞增殖的抑制作用。肿瘤细胞来源见表 10。

表 10.

细胞名称	肿瘤类型	来源
NCI-H358	人非小细胞肺癌	ATCC, CRL-5807
HT29	人结肠癌细胞	ATCC, HTB-38
LS174T	人结肠腺癌细胞	ATCC, CL-187
NCI-H322M	人非小细胞肺癌	ATCC
PANC-1	人胰腺癌肿瘤细胞	ATCC, CRL-1469
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物

体外细胞活性检测方法：用对应检测培养基（含 2% FBS）稀释生物活性分子（12 个浓度梯度）。使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬。将稀释的生物活性分子加入 96 孔板中，再加入细胞。然后每孔加入 CCK8 试剂 20 μL，反应至 4 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。实验结果如表 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5 和 11.6 所示。

参照 CN104755494B 制备获得 DXD，具体结构如下，

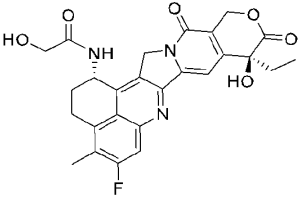


表 11.1 生物活性分子对 NCI-H358 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1.10	NCI-H358	8.11
DXD		39.02

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1.8D	NCI-H358	7.919
A1.15a		3.882

DXD		21.43
-----	--	-------

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1.4	NC1-H358	29.91
A1.8		296.4
A1.9		60.79
A1.11		202.9
A1.12		167.1
A1.13		49.19
A1.14		122.6
DXD		148.45±10.87 (n=4)

表 11.2 生物活性分子对 HT29 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1.10	HT29	5.965
DXD		49.47

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1.15a	HT29	3.574
A1.15b		47.52
DXD		64.84

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1.4	HT29	29.45
A1.8		367.1
A1.9		57.5
A1.11		284.5
A1.12		211.8
A1.13		96.85
A1.14		155.9
DXD		301.875±69.00 (n=4)

表 11.3 生物活性分子对 LS174T 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1. 15a	LS174T	19. 49
A1. 15b		44. 62
DXD		82. 05

表 11. 4 生物活性分子对 NCI-H322M 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1. 9	NCI-H322M	30. 45
DXD		76. 89

表 11. 5 生物活性分子对 PANC-1 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1. 9	PANC-1	94. 54
DXD		966

表 11. 6 生物活性分子对 HCC1806 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC ₅₀ (nM)
A1. 9	HCC1806	1. 9
Dxd	(7500 细胞/孔, 3 天)	37

测试结果表明，本公开的生物活性分子具有肿瘤细胞杀伤作用。

实施例 6. 2：生物活性分子对体外细胞活性的抑制活性检测二

首先培养肿瘤细胞 NUCG-4，PC-9，HT29，NCI-H358，KYSE520，A431 和 A549；将本公开的生物活性分子或片段与肿瘤细胞进行共培养，然后添加 CCK8 试剂（东仁化学科技有限公司，Cat:CK04，Lot:JJ744），用酶标仪（厂家：Molecular Devices，型号：SpectraMax M2）读数（检测波长为 450nm），检测线粒体内的脱氢酶的活性，以评价生物活性分子对细胞增殖的抑制作用。肿瘤细胞来源见表 12。

表 12. 肿瘤细胞来源

细胞名称	肿瘤类型	来源
NUCG-4	胃癌	南京科佰
PC-9	肺腺癌	ATCC
HT29	结肠癌	ATCC，HTB-38
NCI-H358	非小细胞肺癌	ATCC，CRL-5807
KYSE520	食管癌	ATCC
A431	人皮肤鳞状癌（人表皮癌）细胞	ATCC
A549	非小细胞肺癌	ATCC

体外细胞活性检测方法：使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬，将 5000-10000 细胞/孔加至 96 孔板。用 DMSO 稀释的生物活性分子，加入 100uL 至 96 孔板，浓度从 10 μM 开始，3 倍稀释（12 个浓度梯度），37℃ 5%CO₂ 培养 3-4 天，然后每孔加

入 CCK8 试剂 20 μL，反应至 2-6 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。生物活性分子及其检测结果如表 13 所示。

表 13 A1.9 和 B1.14 的活性测定

细胞	A1.9 EC ₅₀ nM	B1.14EC ₅₀ nM	DXD EC ₅₀ nM
NUCG-4	8.73	184.8	43.32
PC-9	2.06	34.32	16.69
HT29	20.32	367.9	210.5
NCI-H358	46.2	581.2	261.6
A431	5.71	67.97	25.08
A549	65.86	252.3	262.2

测试结果表明，生物活性分子 A1.9 和 B1.14 具有肿瘤细胞杀伤作用，其中 A1.9 在多个肿瘤细胞中均具有强于 Dxd 的肿瘤杀伤作用。A1.9 在 KYSE520 的体外细胞活性的抑制活性检测中，EC50 为 49.62 nM，具有杀伤 KYSE520 的作用。

实施例 7：抗 Napi2b 抗体药物偶联物体内活性测试

7.1 Napi2b 抗体药物偶联物对 HT29 人结肠癌移植瘤药效测试

为验证抗人 Napi2b ADC 药物的体内药效，评价受试药物在皮下异种移植雌性 Balb/c Nude 小鼠模型中的抗肿瘤作用，购买 5-6 周龄的雌性 Balb/c Nude 小鼠（维通利华），将生长至对数生长期的 HT29-h.Napi2b 细胞采用 EDTA 消化及 PBS 重悬，每只小鼠皮下接种 5*10⁶ 细胞，待肿瘤生长至 100-200mm³ 大小，采用静脉给药，每周一次，每次 1 mg/kg 或 3 mg/kg，具体方案如下表。本实验的主要观察指标为：1) TGI（%），计算公式为：TGI（%）=（1-T/C）× 100%（T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积）2) 试验终点肿瘤体积大小照片、肿瘤重量。

实验结果如表 14、图 4 所示，16G5B3-hz2-ADC07(DAR8)和 66C12-hz1-ADC07(DAR8)，在小鼠体内均有良好的抑瘤效果，3 mg/kg 剂量下 TGI 与 C1-ADC07(DAR8)相当，1 mg/kg 剂量下两者均优于 C1-ADC07(DAR8)，其中 66C12-hz1-ADC07(DAR8)在 1 mg/kg 下 TGI 达到了 97.83%，明显优于另外两者。小鼠体重变化情况如图 5 所示，表明整个给药过程中 2 个 ADC 对小鼠体重无影响。

表 14. 抗人 Napi2b ADC 体内药效-HT29-h.Napi2b CDX 模型

分组	小鼠数量	样品	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药频率	TGI (%)	P 值
1	5	生理盐水	/	i. v.	QW*3	/	/
2	5	IgG-ADC07 (DAR8)	3	i. v.	QW*3	21.71	0.735
3	5	C1-ADC07 (DAR8)	1	i. v.	QW*3	37.46	0.226
4	5	C1-ADC07 (DAR8)	3	i. v.	QW*3	96.91	<0.001
5	5	16G5B3-hz2-ADC07 (DAR8)	1	i. v.	QW*3	51.12	0.049

6	5	16G5B3-hz2- ADC07 (DAR8)	3	i. v.	QW*3	99.34	<0.001
7	5	66C12D12-hz1- ADC07 (DAR8)	1	i. v.	QW*3	97.83	<0.001
8	5	66C12D12-hz1- ADC07 (DAR8)	3	i. v.	QW*3	100.00	<0.001

7.2 Napi2b 抗体药物偶联物对 IGR-OV1 人源卵巢癌移植瘤药效测试

用相似的方法评价测试药物 66C12D2-hz1- ADC07 (DAR8) 在人源卵巢癌 IGR-OV1 细胞株皮下异种移植雌性 BALB/c 裸小鼠动物模型中的抗肿瘤作用。实验结果如表 15、图 6 所示， 66C12D2-hz1-ADC07 (DAR8) 在小鼠体内有良好的抑瘤效果，3 mg/kg 剂量下 TGI 与 C1- ADC07 (DAR8) 相当，1 mg/kg 剂量下均优于 C1- ADC07 (DAR8)。小鼠体重变化情况如图 7 所示，表明整个给药过程中 66C12D2-hz1-ADC07 (DAR8) 对小鼠体重无影响。

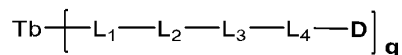
表 15. 抗人 Napi2b ADC 体内药效- IGR-OV1 CDX 模型

分组	小鼠数量	样品	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药频率	TGI (%)	P 值
1	5	生理盐水	/	i. v.	QW*3	/	/
2	5	C1- ADC07 (DAR8)	1	i. v.	QW*3	22.73	0.646
3	5	C1- ADC07 (DAR8)	3	i. v.	QW*3	63.76	<0.001
4	5	66C12D2-hz1- ADC07 (DAR8)	1	i. v.	QW*3	48.88	0.079
5	5	66C12D12-hz1- ADC07 (DAR8)	3	i. v.	QW*3	64.59	<0.001

从而本公开 ADC 有更宽的治疗指数和治疗效果。尽管本公开的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本公开的保护范围之内。本公开的保护范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权利要求

1. 式 XV 所示的抗体药物偶联物,



式 XV

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

Tb 为抗 NaPi2b 的抗体或其抗原结合片段;

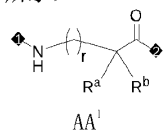
q 为药物抗体偶联比;

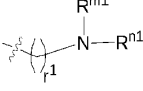
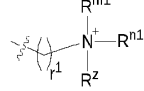
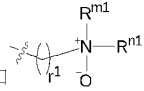
D 为生物活性分子片段;

L₁ 为延伸单元;

L₂ 不存在或为连接单元;

L₃ 选自 Val-AA¹-Gly、Val-AA¹、Ala-AA¹、Gly-AA¹、AA¹-Gly、Ala-AA¹-Gly、Gly-AA¹-Gly、AA¹-Ala-Asn、AA¹; 所述 AA¹ 所示氨基酸残基的结构如下所示,

AA¹

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

或者, R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起, 形成 4-10 元杂环, 所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R⁰ 所取代;

r、r¹ 各自独立地选自 0 到 20 的任意整数;

R^{m1}、Rⁿ¹ 各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基和 -COOR^{x1};

R^{x1} 选自 C1-6 烷基;

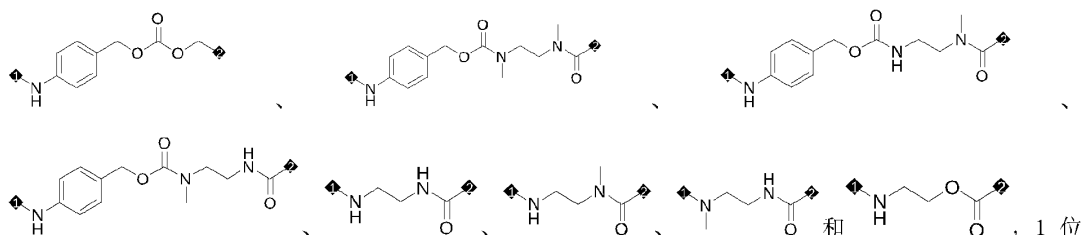
或者, Rⁿ¹ 与 Rⁿ¹ 和与它们共同相连的氮原子一起, 形成 4-10 元杂环, 所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R^{0'} 所取代;

R^z 选自 C1-6 烷基;

R⁰、R^{0'} 各自独立地选自 C1-6 烷基、C3-6 环烷基、-NR^{m2}Rⁿ² 和任选被 C1-6 烷基取代的 4-10 元杂环基;

R^{m2}、Rⁿ² 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基;





与 L_3 相连, 2 位与 D 相连。

2. 如权利要求 1 所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于, 其满足如下条件中的一个或多个:

(1) T_b 所述抗体或其抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、全人抗体、前抗、单克隆抗体、双特异性抗体或多特异性抗体;

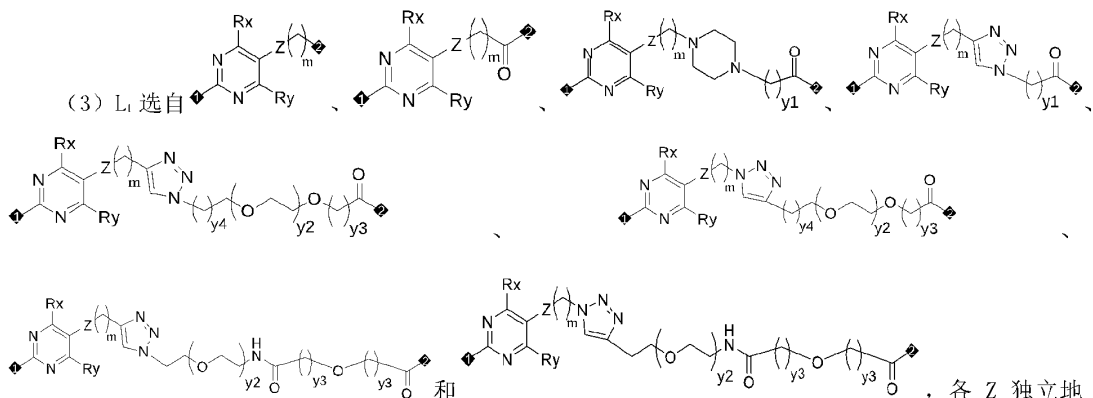
(2) q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值;

(3) D 为具有抗肿瘤生物活性分子片段。

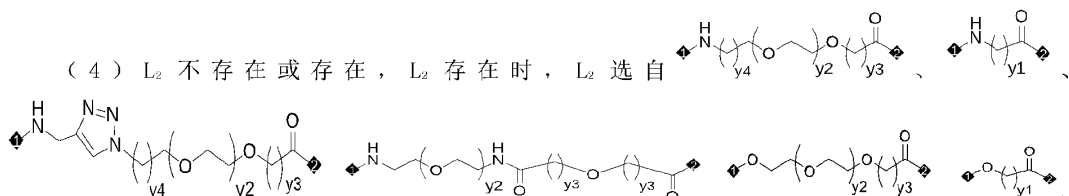
3. 如权利要求 2 所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于, 其满足如下条件中的一个或多个:

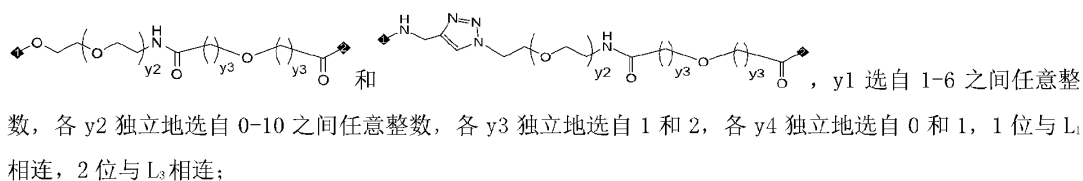
(1) q 选自 0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 和之间的任意数值;

(2) 所述的生物活性分子片段中, 所述的生物活性分子为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或微管蛋白抑制剂;

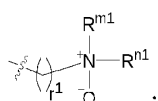


选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和酰胺基; R_x 、 R_y 各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基; 各 m 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6; y_1 选自 1-6 之间任意整数; 各 y_2 独立地选自 0-15 之间任意整数; 各 y_3 独立地选自 1、2 和 3; 各 y_4 独立地选自 0 和 1; 1 位通过 S 原子与 T_b 相连, 2 位与 L_2 或 L_3 相连;





(5) AA^1 的氨基酸残基中， R^a 、 R^b 中，任一个为 H，另一个选自



或者， AA^1 的氨基酸残基中， R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的 5-6 元杂环；

(6) AA^1 的氨基酸残基中， r 、 r^1 各自独立地选自 0、1、2、3、4 和 5；

(7) AA^1 的氨基酸残基中， R^{n1} 、 R^{n1} 各自独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、 $-COOCH_3$ 、 $-COOCH_2CH_3$ 、 $-COOCH_2CH_2CH_3$ 、 $-COOCH(CH_3)_2$ 、 $-COOC(CH_3)_3$ 和 $-COOCH_2CH_2CH_2CH_3$ ；或者， R^{n1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成被 R^0 取代的 5-6 元杂环；

(8) AA^1 的氨基酸残基中， R^x 为甲基；

(9) AA^1 的氨基酸残基中， R^0 、 R^0 各自独立地选自 C1-6 烷基、 $-NR^{n2}R^{n2}$ 和任选被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基。

4. 如权利要求 3 所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

(1) q 选自 0.1、1、2、3、4、5、6、7、8 和之间的任意数值；

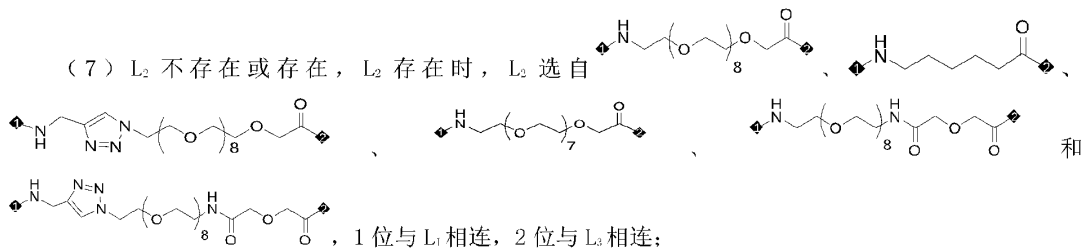
(2) 当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为 DNA 拓扑异构酶抑制剂时，所述的 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱类生物活性分子；

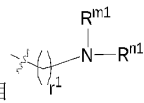
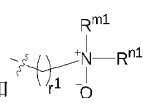
(3) 当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为微管蛋白抑制剂时，所述的微管蛋白抑制剂为 MMAF 类微管蛋白抑制剂，MMAE 类微管蛋白抑制剂；

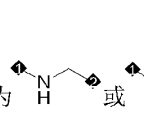
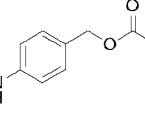
(4) L_1 中，各 Z 独立地选自直接键、碳碳三键和碳碳双键；

(5) L_1 中， y_1 为 4、5 或 6；

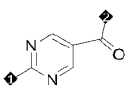
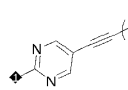
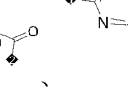
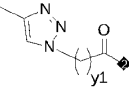
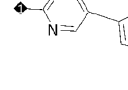
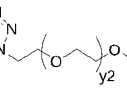
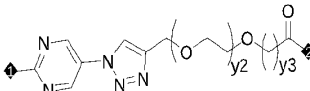
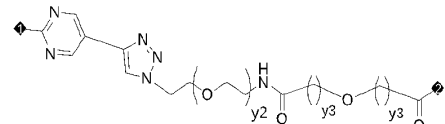
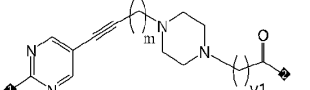
(6) L_1 中，各 y_2 独立地选自 6-10 之间任意整数；



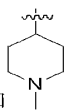
- (8) AA¹所示氨基酸残基中, R^a、R^b中, 任一个为 H, 另一个选自  和 ; 或, R^a与 R^b和与它们共同相连的碳原子一起, 形成被 R⁰取代的 5-6 元杂环为被 R⁰取代的哌啶环或哌嗪环;
- (9) AA¹的氨基酸残基中, r、r¹各自独立地选自 0 和 4;
- (10) AA¹的氨基酸残基中, R^{m1}、Rⁿ¹各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基和叔丁氧羰基; 或者, R^{m1}与 Rⁿ¹和与它们共同相连的氮原子一起, 形成被 R⁰取代的哌啶环或哌嗪环;
- (11) AA¹的氨基酸残基中, R⁰选自 C1-6 烷基和被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基, 所述 5-6 元杂环基选自哌啶基和哌嗪基;
- (12) AA¹的氨基酸残基中, R⁰选自 C1-6 烷基和-NR^{m2}Rⁿ²;
- (13) AA¹的氨基酸残基中, R^{m2}、Rⁿ²为甲基;

- (14) L₄不存在或存在, L₄存在时, L₄为  或 , 1 位与 L₃相连, 2 位与 D 相连。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于, 其满足如下条件中的一个或多个:

- (1) q 选自 2、3、4、5、6、7、8 和之间的任意数值;
- (2) L₁ 选自 , , , , , , , ,  和 , m 选自 2、3 和 4, y₁ 选自 1-6 之间任意整数, 各 y₂ 独立地选自 0-10 之间任意整数, 各 y₃ 独立地选自 1 或 2, 1 位通过 S 原子与 Tb 相连, 2 位与 L₂或 L₃相连;

- (3) L₃选自 AA¹、AA¹-Gly、Val-AA¹-Gly、AA¹-Ala-Asn;
- (4) AA¹所示氨基酸残基中, R^a与 R^b和与它们共同相连的碳原子一起, 形成被 R⁰取代的 5-6 元杂环为被 R⁰取代的哌啶环;
- (5) AA¹的氨基酸残基中, r、r¹中, 任一个为 0, 另一个为 4;
- (6) AA¹的氨基酸残基中, R^{m1}、Rⁿ¹各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基; 或, R^{m1}与 Rⁿ¹和与它们共同相连的氮原子一起, 形成被 R⁰取代的哌啶环;
- (7) AA¹的氨基酸残基中, R⁰选自甲基、乙基和被甲基取代的 5-6 元杂环基, 所述 5-6 元杂环基为哌



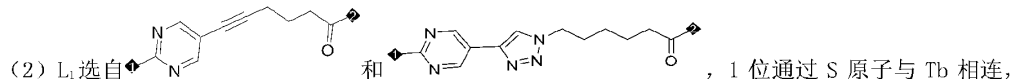
啶基；优选地， R^0 选自甲基、乙基和

(8) AA^1 的氨基酸残基中， $R^{0'}$ 选自甲基和 $-NR^{0''}R^{0''}$ ；

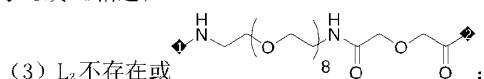
(9) 当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为 DNA 拓扑异构酶抑制剂、所述的 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱类生物活性分子时，所述的喜树碱类生物活性分子为喜树碱、DXD、取代基被修饰的喜树碱或取代基被修饰的 DXD。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

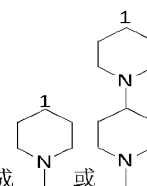
(1) q 选自 3、4、5、6、7、8 和之间的任意数值；优选地， q 选自 4、5、6、7、8 和之间的任意数值；优选地， q 选自 6、7、8 和之间的任意数值；

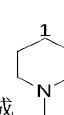
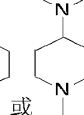


2 位与 L_2 或 L_3 相连；

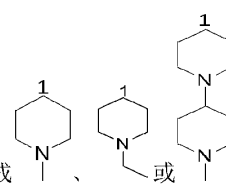


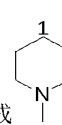
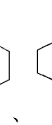
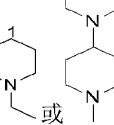
(4) L_3 选自 AA^1 、 $Val-AA^1-Gly$ ；优选地， L_3 选自 $Val-AA^1-Gly$ ；



(5) AA^1 所示氨基酸残基中， R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成  或 ，1 号碳原子为与 R^a 和 R^b 共同相连的碳原子；

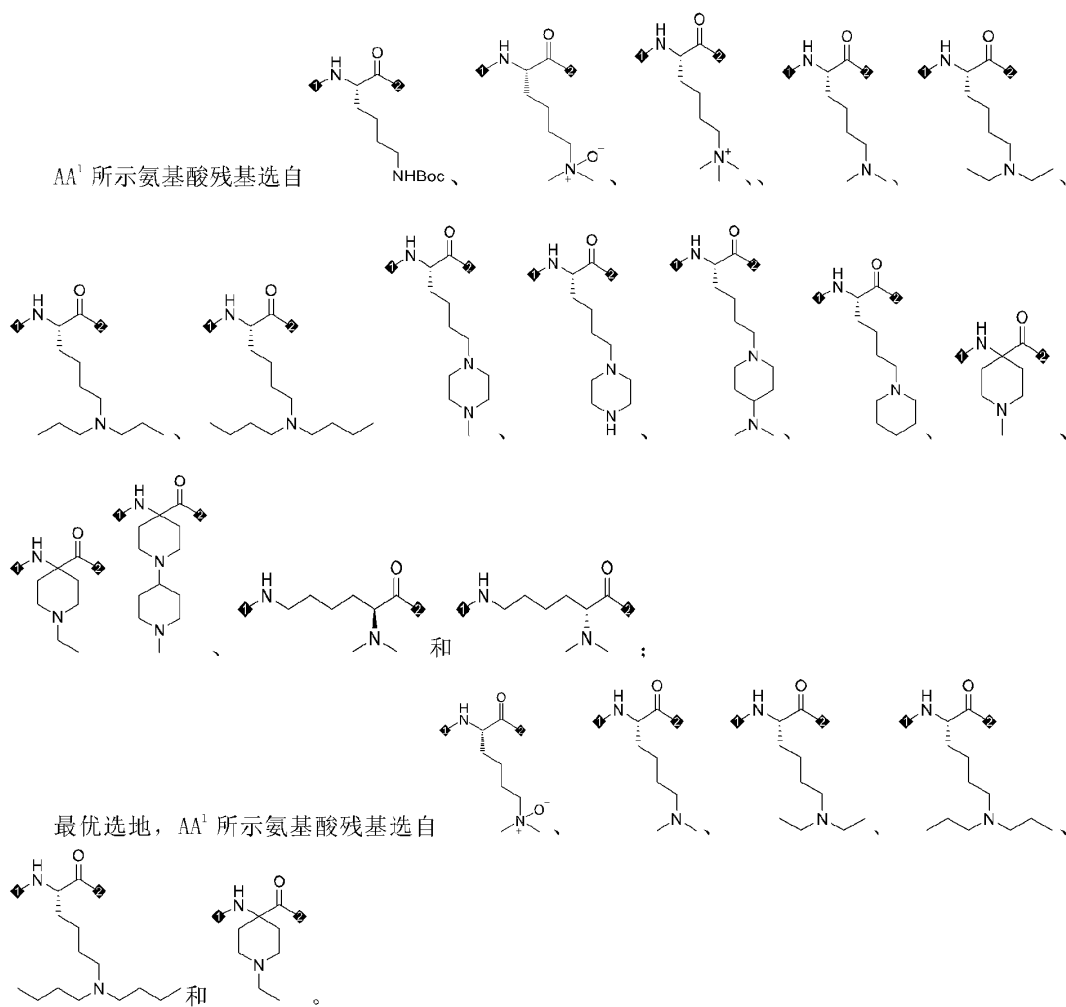
(6) r 、 r^1 中， r 为 4， r^1 为 0 时， R^{n1} 、 R^{n1} 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基； r 为 0， r^1 为 4 时， R^{n1} 、



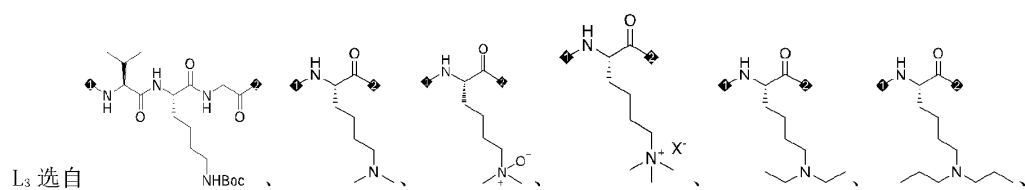
R^{n1} 各自独立地选自 C1-6 烷基，或， R^{n1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成 、 或 ，

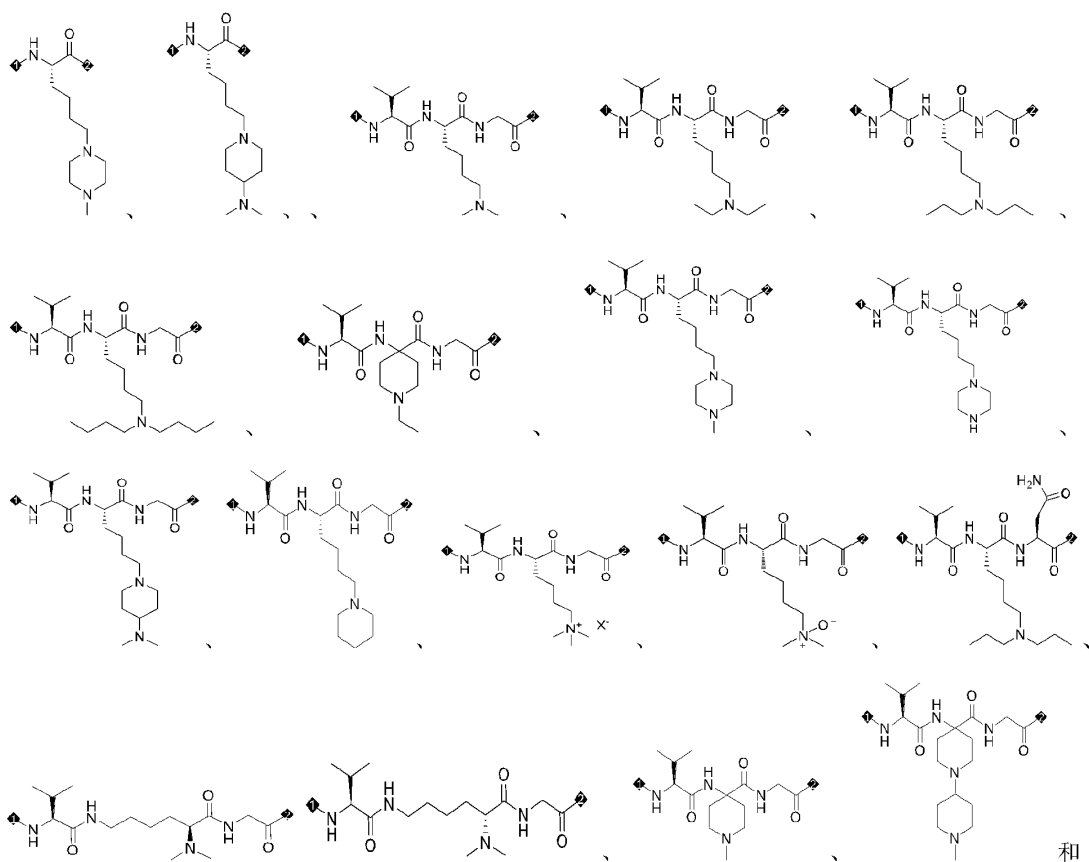
1 号碳原子为与 R^a 和 R^b 共同相连的碳原子。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

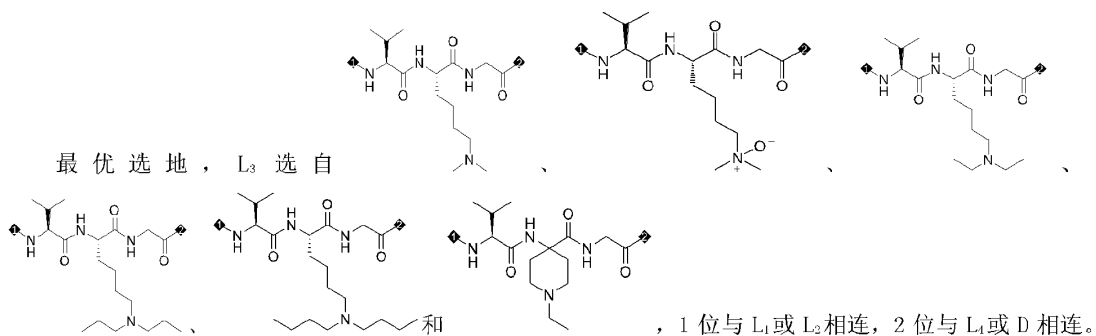


8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于,



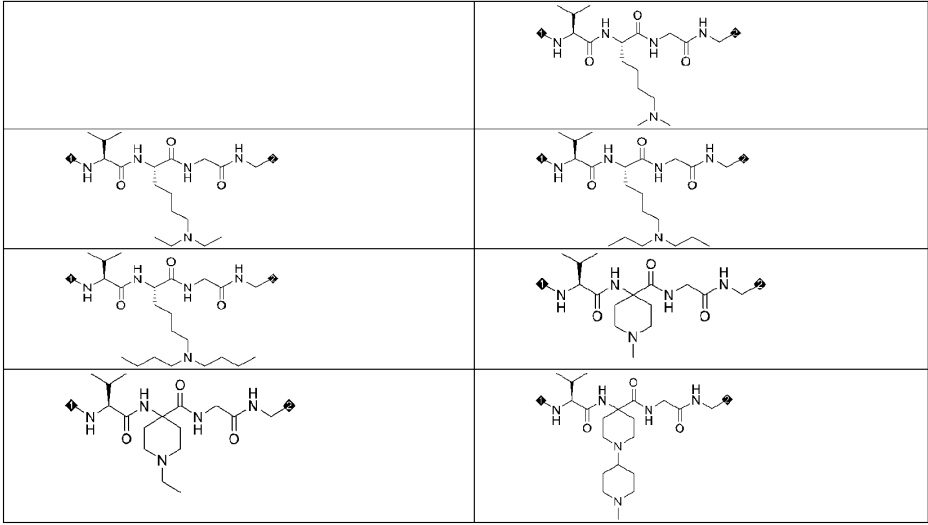


，X选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和 OH^- ，1位与 L_1 或 L_2 相连，2位与 L_4 或 D 相连；

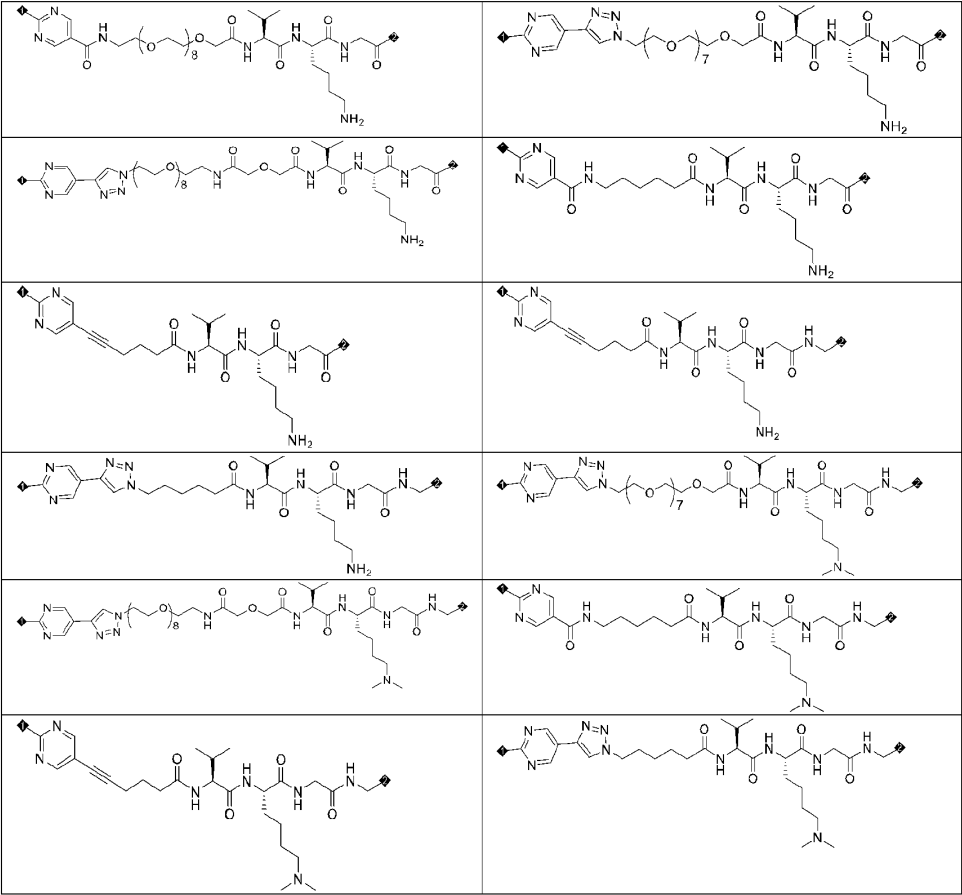


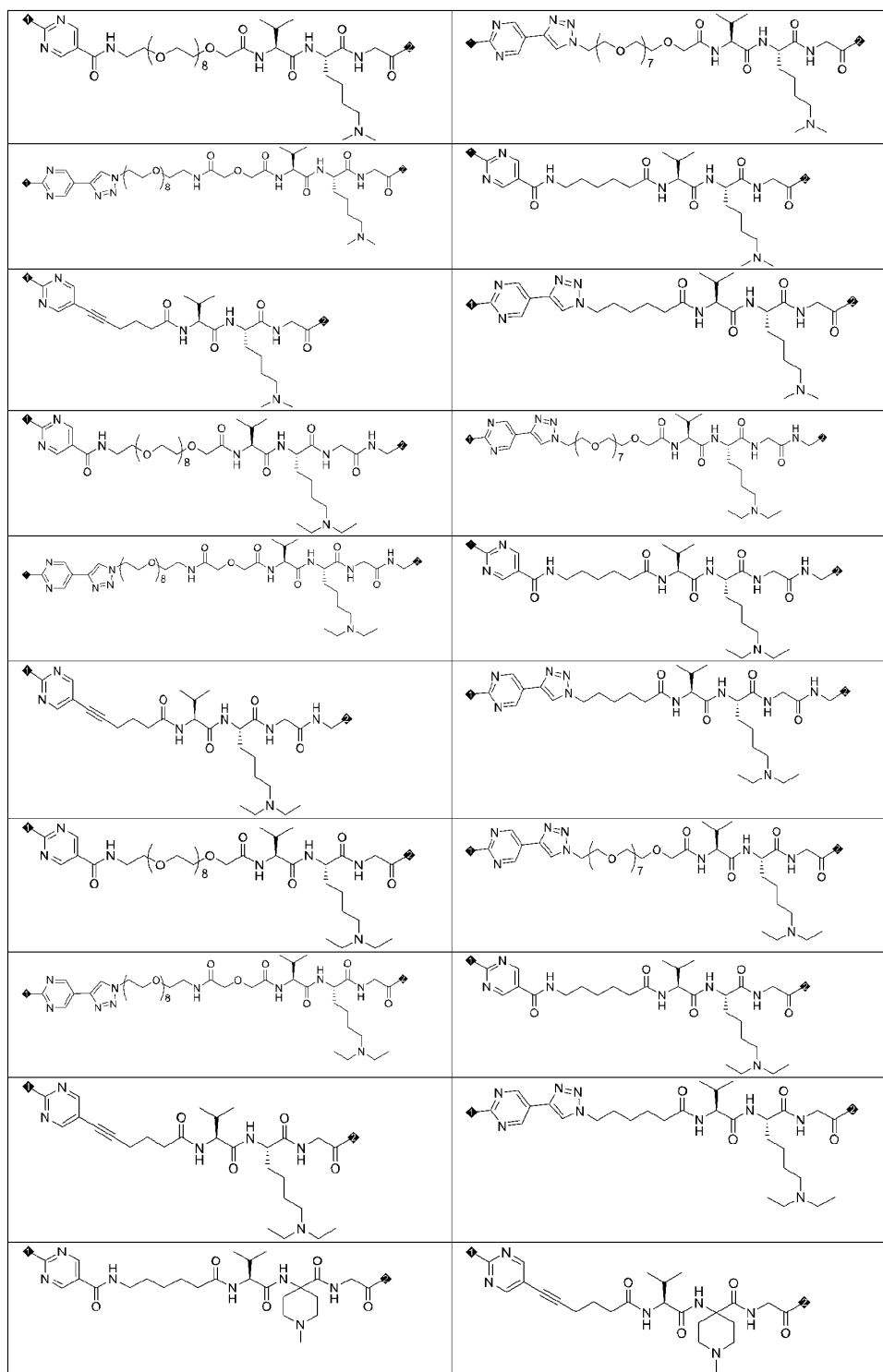
9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

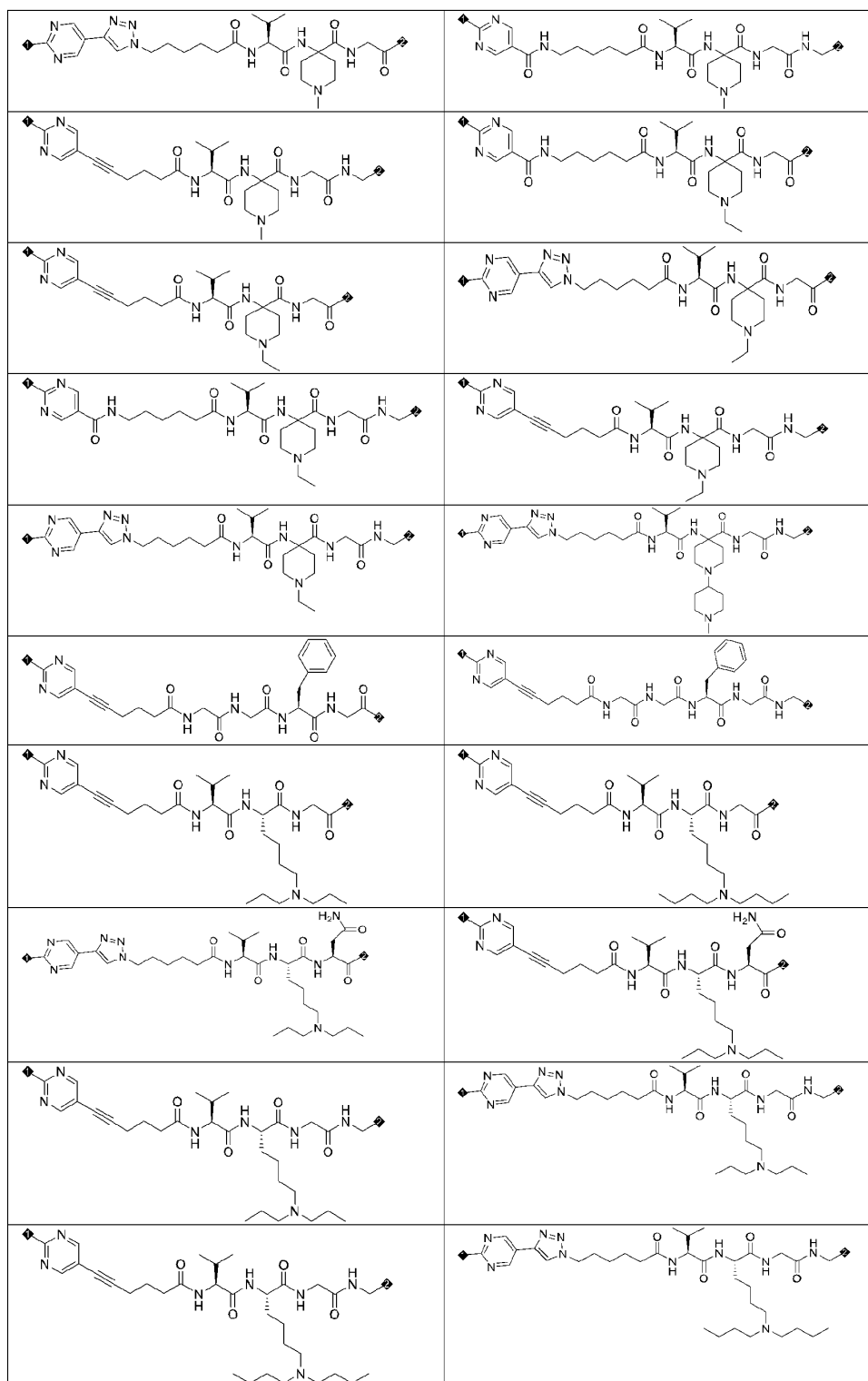
—L₃—L₄— 的结构选自以下结构片段:



优选地, —L₁—L₂—L₃—L₄— 的结构选自以下:



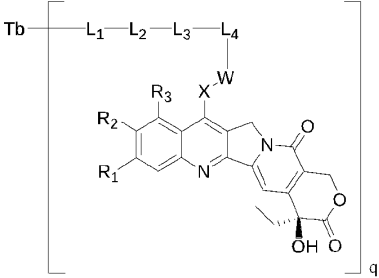




其中，1 位与 Tb 相连，2 位与 D 相连。

10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

其中，所述抗体药物偶联物具有式 I 所示结构：



式 I

其中：Tb、L1、L2、L3、L4 和 q 的定义如权利要求 1-9 中任一项所述；

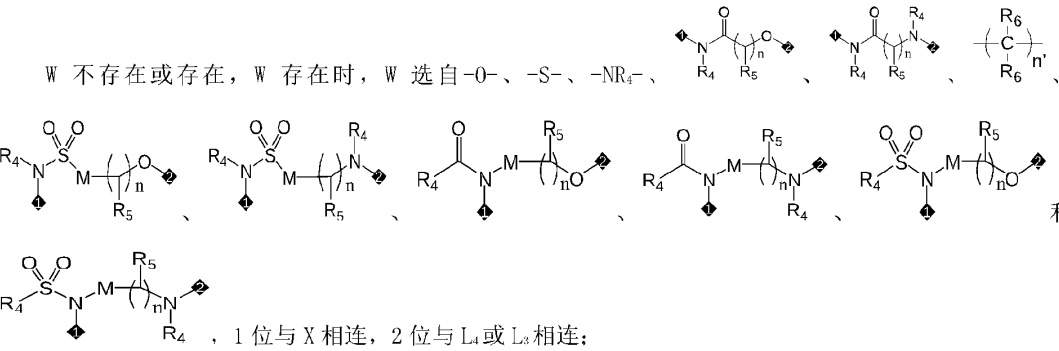
R₁、R₂ 各自独立地选自 H、卤素、-OH、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R₁ 和 R₂ 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砷基或砷基或其任意组合；

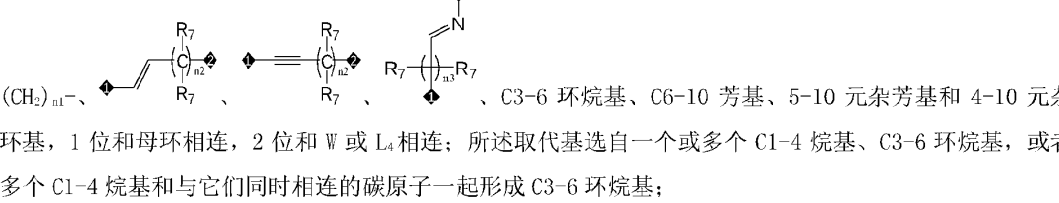
R₃ 选自 H、卤素、-OH、-NH₂、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R₃ 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砷基或砷基或其任意组合，或者，

R₃ 和 R₂ 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砷基或砷基或其任意组合；



X 选自直接键，任选取代的 -O-(CH₂)_{n3}-、-NR₄-(CH₂)_{n3}-、-S-(CH₂)_{n3}-、羰基-(CH₂)_{n3}-、-SO₂-(CH₂)_{n3}-、-



各 M 独立地选自直接键和 -CR^{5a}R^{5b}-；

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

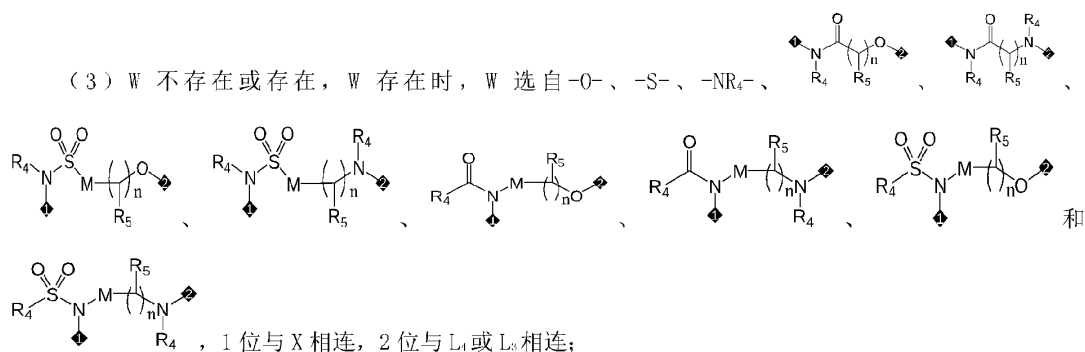
n 、 n' 、 n_1 、 n_2 、 n_3 各自独立地选自 0 到 6 之间的任意整数；

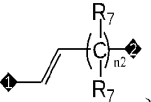
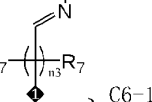
1 位与喜树碱母核相连，2 位与 W 或 L_4 相连。

11. 如权利要求 10 所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

(1) R_1 、 R_2 各自独立地选自 H、卤素、C1-4 烷基；或者， R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元杂环，所述杂环含有 1 个、2 个或 3 个 O、S 或 N 或其任意组合；

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



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

(5) R_4 、 R_5 各自独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基；

(6) R^{5a} 、 R^{5b} 各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基；

(7) 各 R_7 独立地选自 H 和 C1-4 烷基；

(8) n 选自 1、2 和 3；

(9) n_1 选自 1、2、3 和 4；

(10) n_2 为 1；

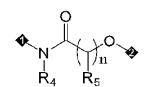
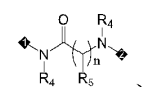
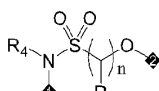
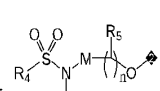
(10) n_3 为 0。

12. 如权利要求 10 或 11 所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

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

 或 ，虚线表示所述杂环与苯环耦合的位置；

(2) R_3 为 H；或， R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环耦合的位置；

(3) W 不存在或存在，W 存在时，W 选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_4-$ 、、、 和 ，1 位与 X 相连，2 位与 L_1 或 L_2 相连；

(4) 各 R_4 独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基， R_5 为 H；

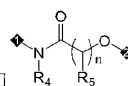
(5) R^{3a} 、 R^{3b} 各自独立地选自 H 和甲基；

(6) R_7 为 H；

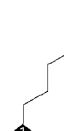
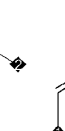
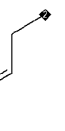
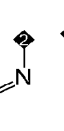
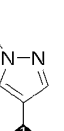
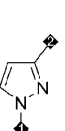
(7) n 为 1。

13. 如权利要求 10-12 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

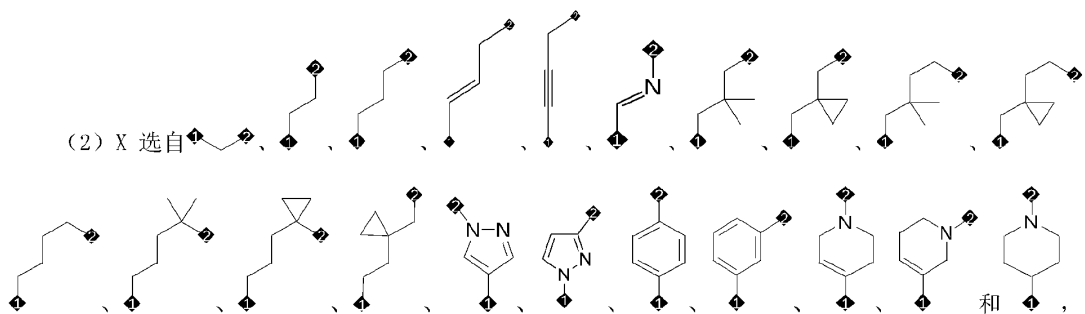
(1) R_1 为 H 或 F， R_2 为 H 或甲基；或， R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 ，虚线表示所述杂环与苯环耦合的位置；

(2) W 选自 $-O-$ 、 $-NR_4-$ 和 ，1 位 X 相连，2 位与 L_1 或 L_2 相连；

(3) 各 R_4 独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基和环丙基， R_5 为 H；

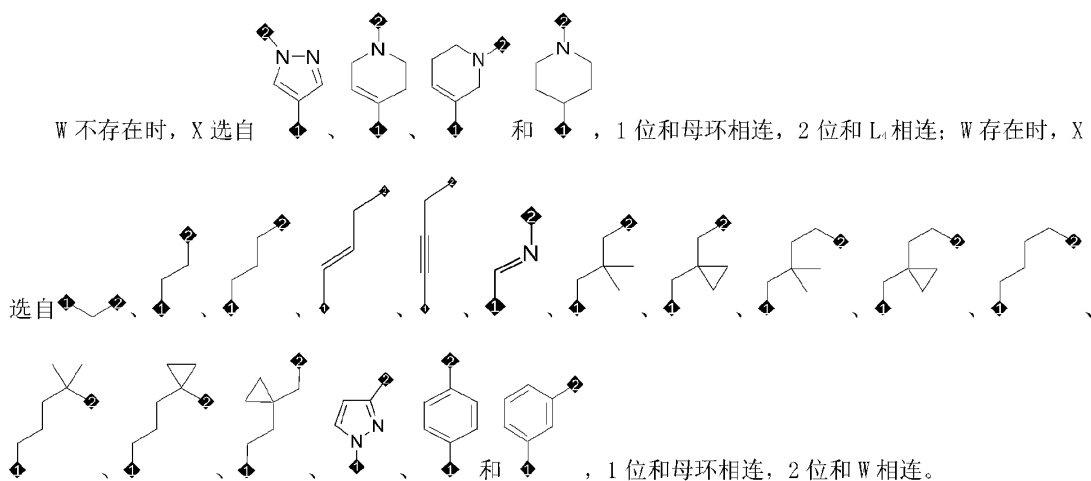
(4) X 选自任选取代的 、、、、、、、、、、、、、、

(1) W 选自 $-O-$ 和 $-NR_4-$;

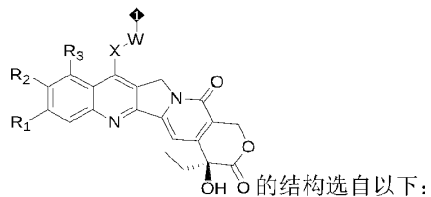


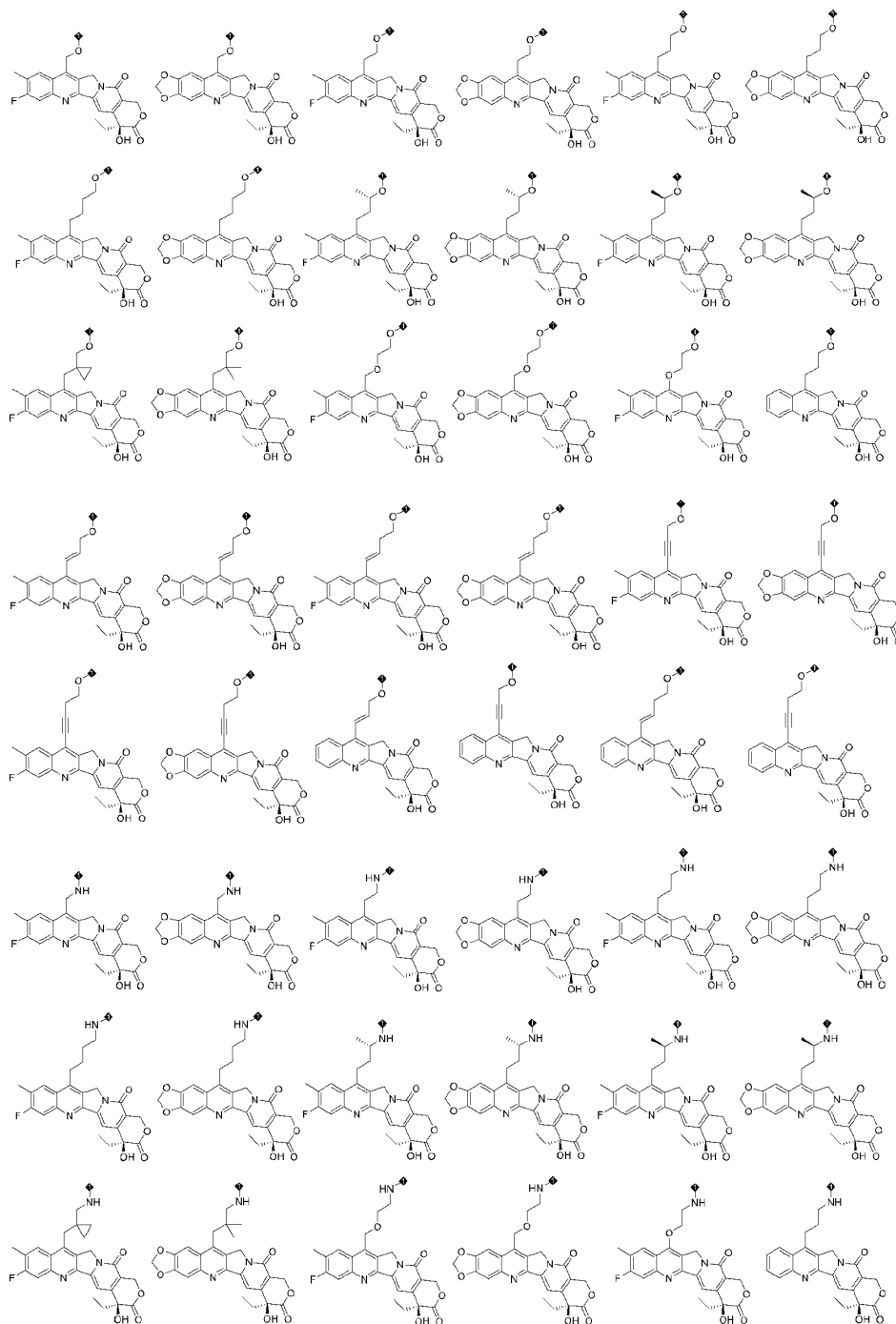
1 位和母环相连, 2 位和 W 或 L₄ 相连。

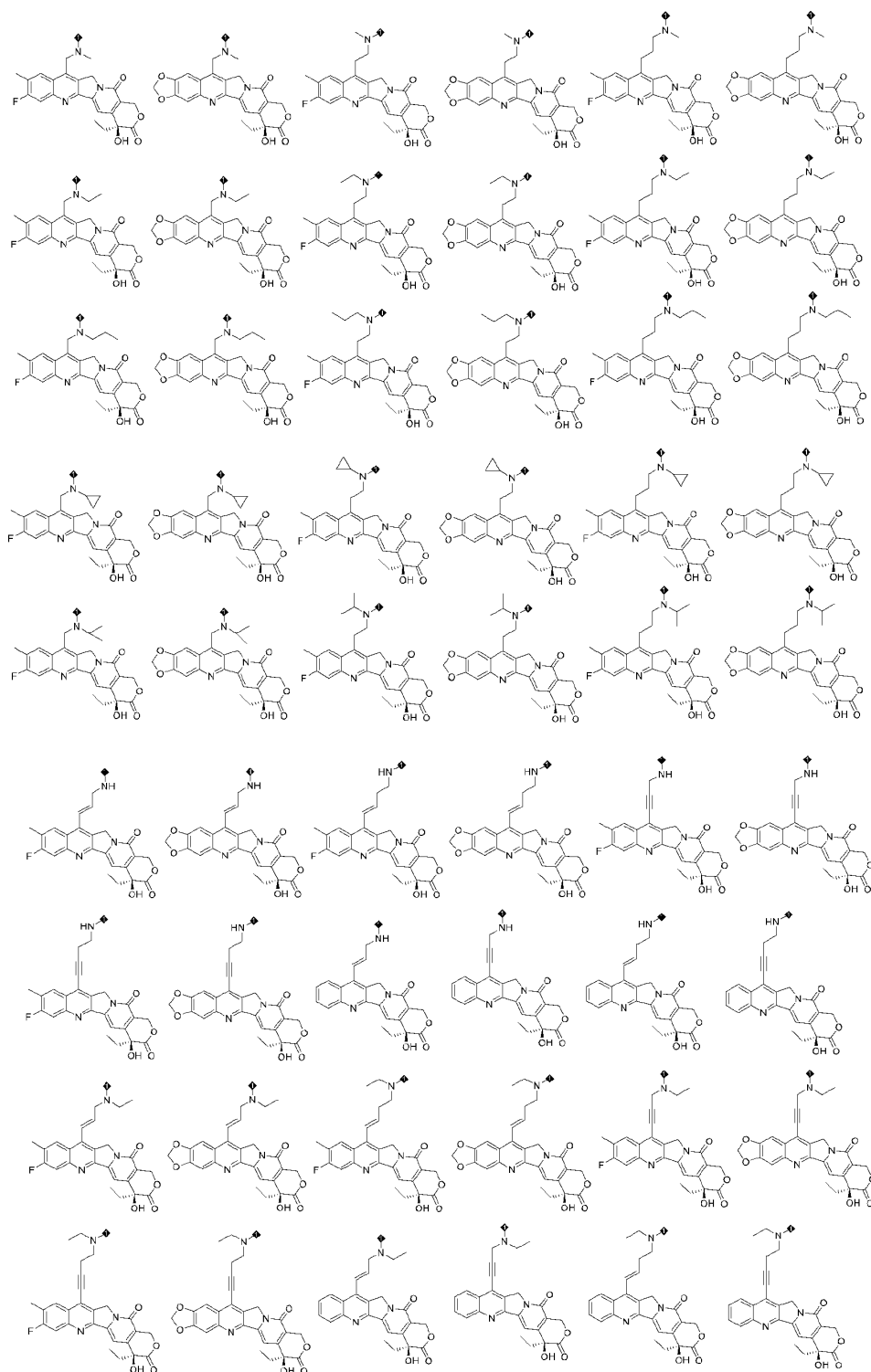
15. 如权利要求 10-14 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于,

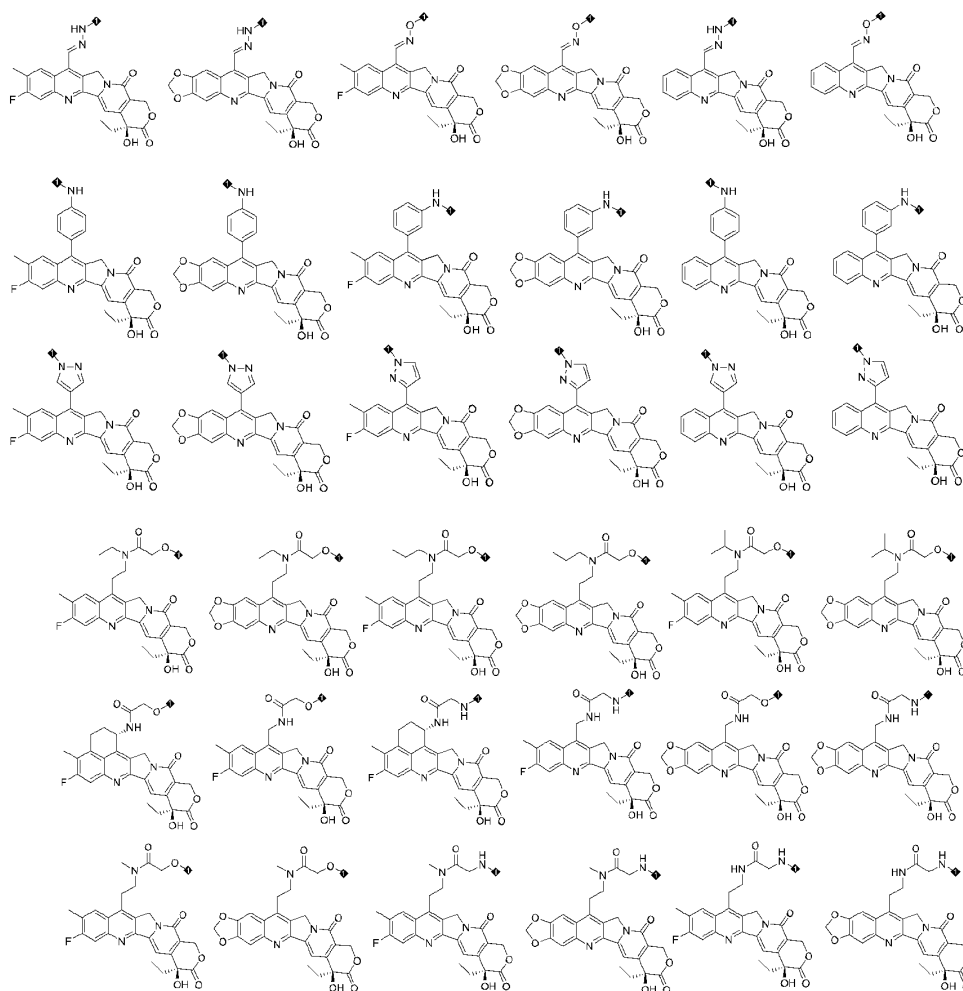


16. 如权利要求 10-15 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于,



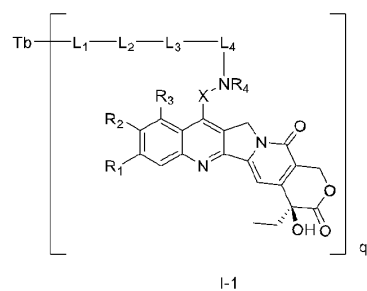




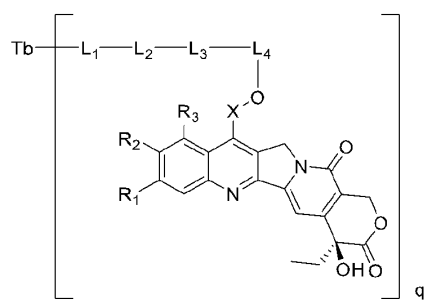


其中，1 位与 L_4 相连；当 L_4 不存在时，1 位与 L_3 相连。

17. 如权利要求 10-16 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，所述的抗体药物偶联物具有式 I-1、式 I-2 或式 I-3 所示结构：

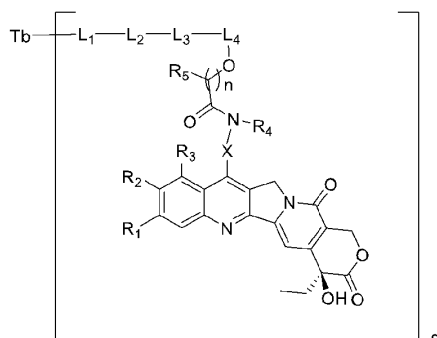


其中，Tb、 L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、X、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 q 如权利要求 1-16 中任一项所定义；



I-2

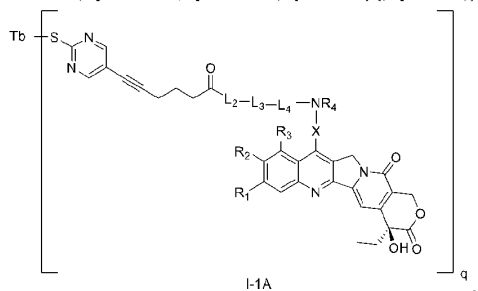
其中, Tb、L₁、L₂、L₃、L₄、X、R₁、R₂、R₃和q如权利要求1-16中任一项所定义;



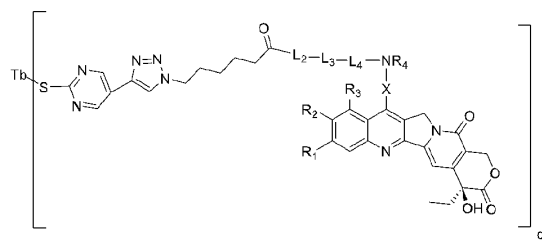
I-3

其中, Tb、L₁、L₂、L₃、L₄、X、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、n和q如权利要求1-16中任一项所定义。

18. 如权利要求10-17中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于, 所述抗体药物偶联物具有式I-1A、式I-1B、式I-2A、式I-2B、式I-3A或式I-3B所示结构:

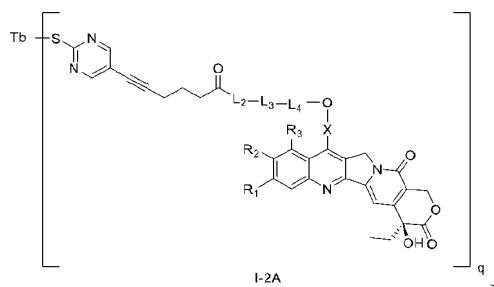


I-1A

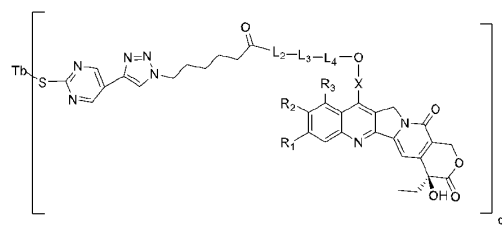


I-1B

其中, Tb、L₂、L₃、L₄、X、R₁、R₂、R₃、R₄和q如权利要求1-16中任一项所定义:

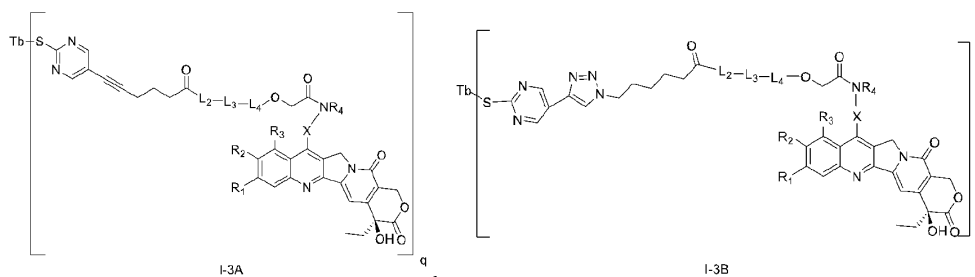


I-2A



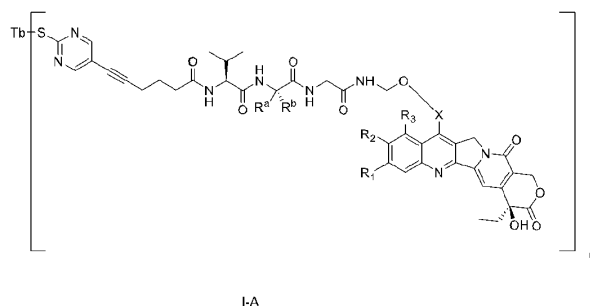
I-2B

其中， Tb、 L₂、 L₃、 L₄、 X、 R₁、 R₂、 R₃ 和 q 如权利要求 1-16 中任一项所定义；

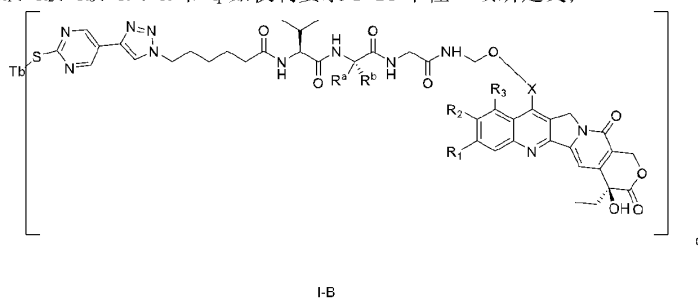


其中, Tb、L₂、L₃、L₄、X、R₁、R₂、R₃、R₄和q如权利要求1-16中任一项所定义。

19. 权利要求 10-18 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其中，所述的抗体药物偶联物具有式 I-A 或式 I-B 所式结构：

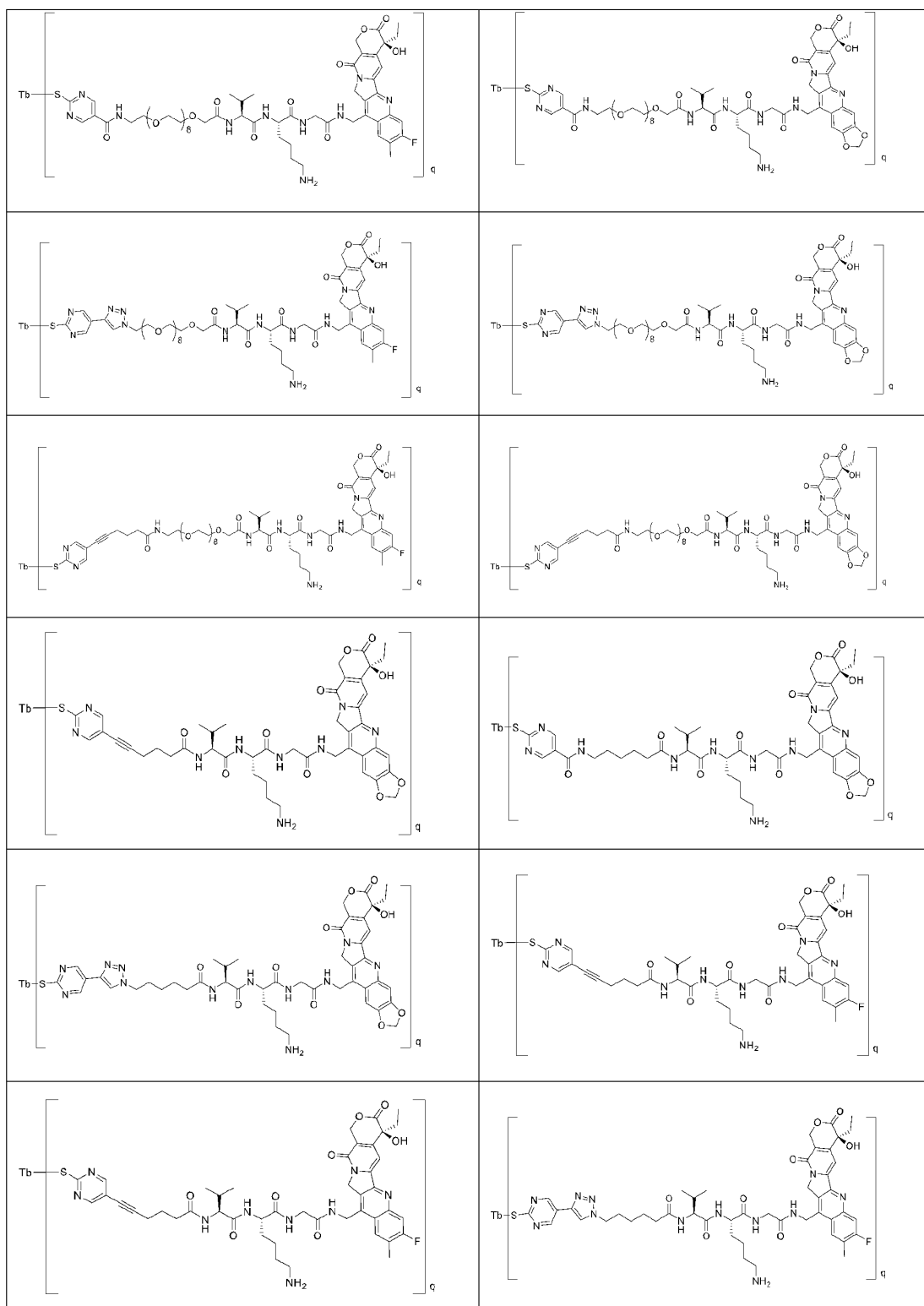


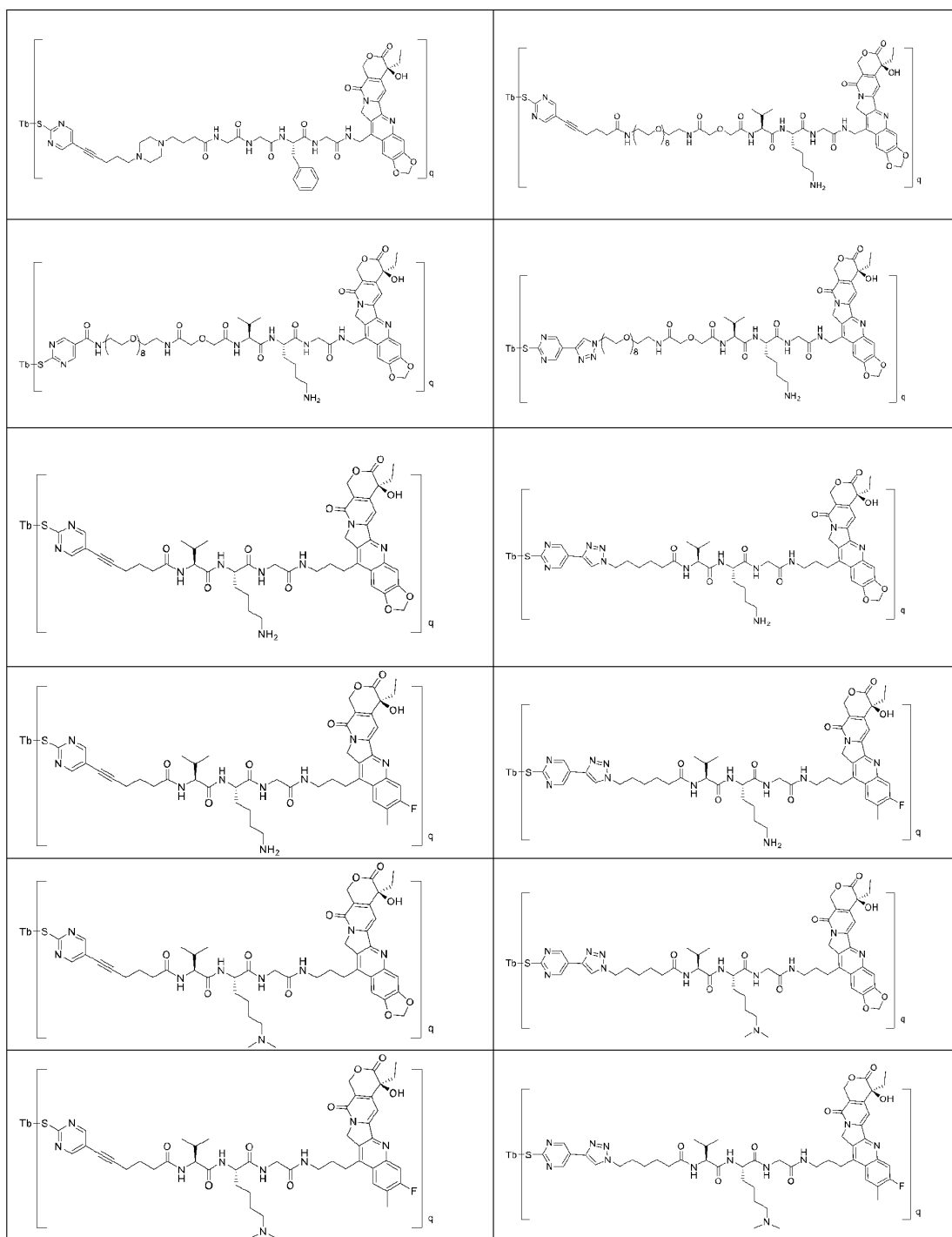
其中, Tb、X、R₁、R₂、R₃、R^a、R^b和q如权利要求1-16中任一项所定义;

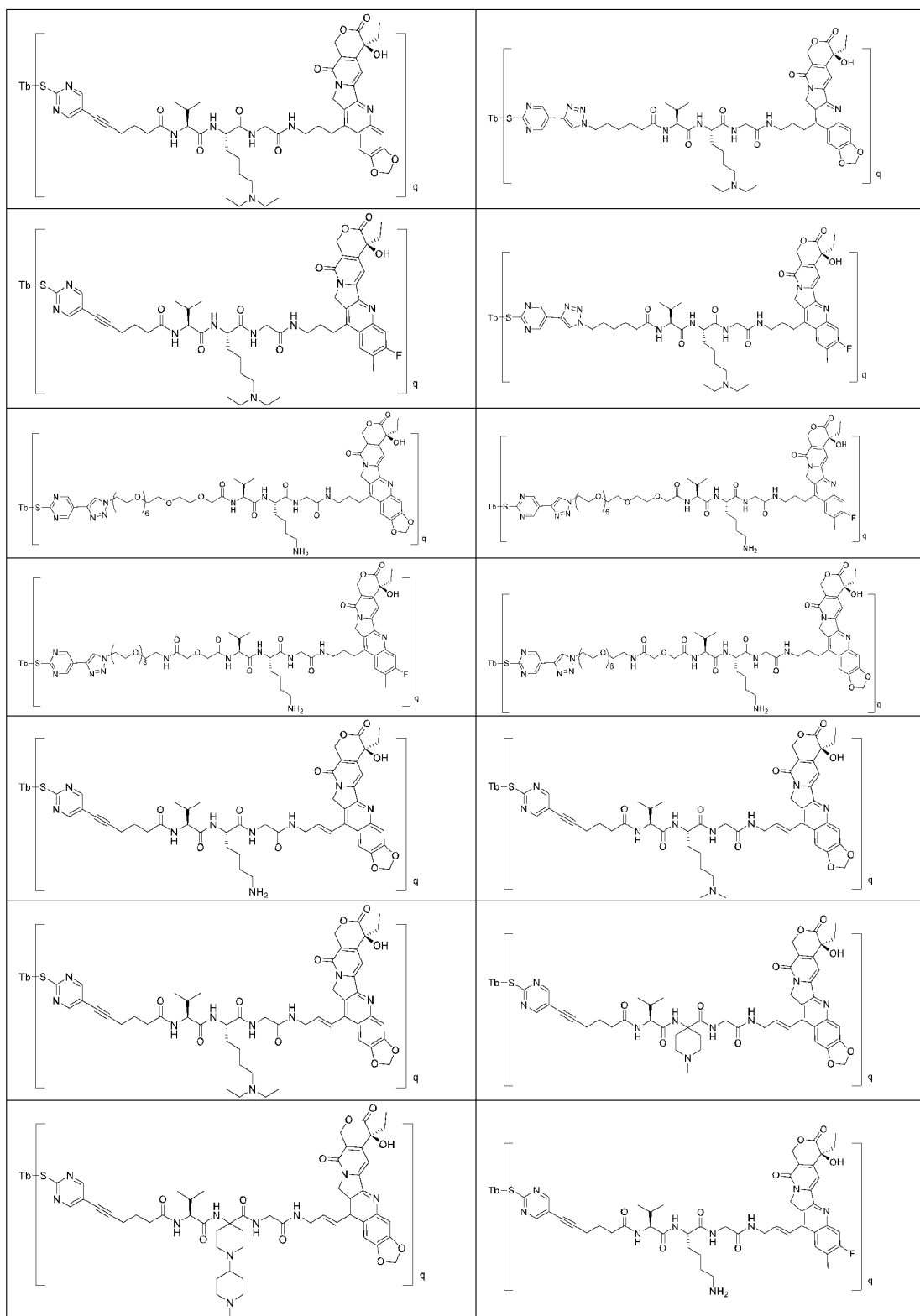


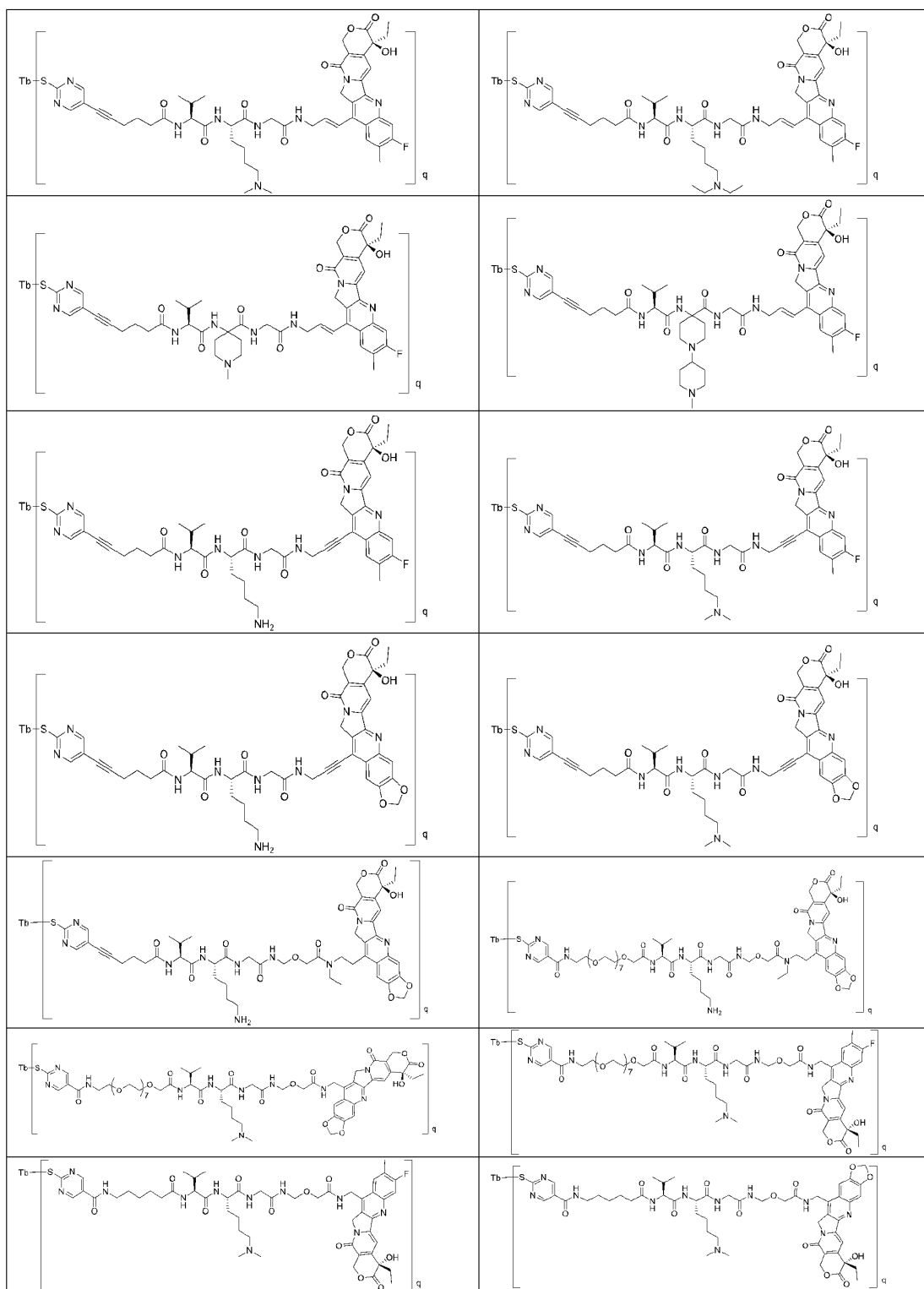
其中, Tb、X、R₁、R₂、R₃、R^a、R^b和q如权利要求1-16中任一项所定义。

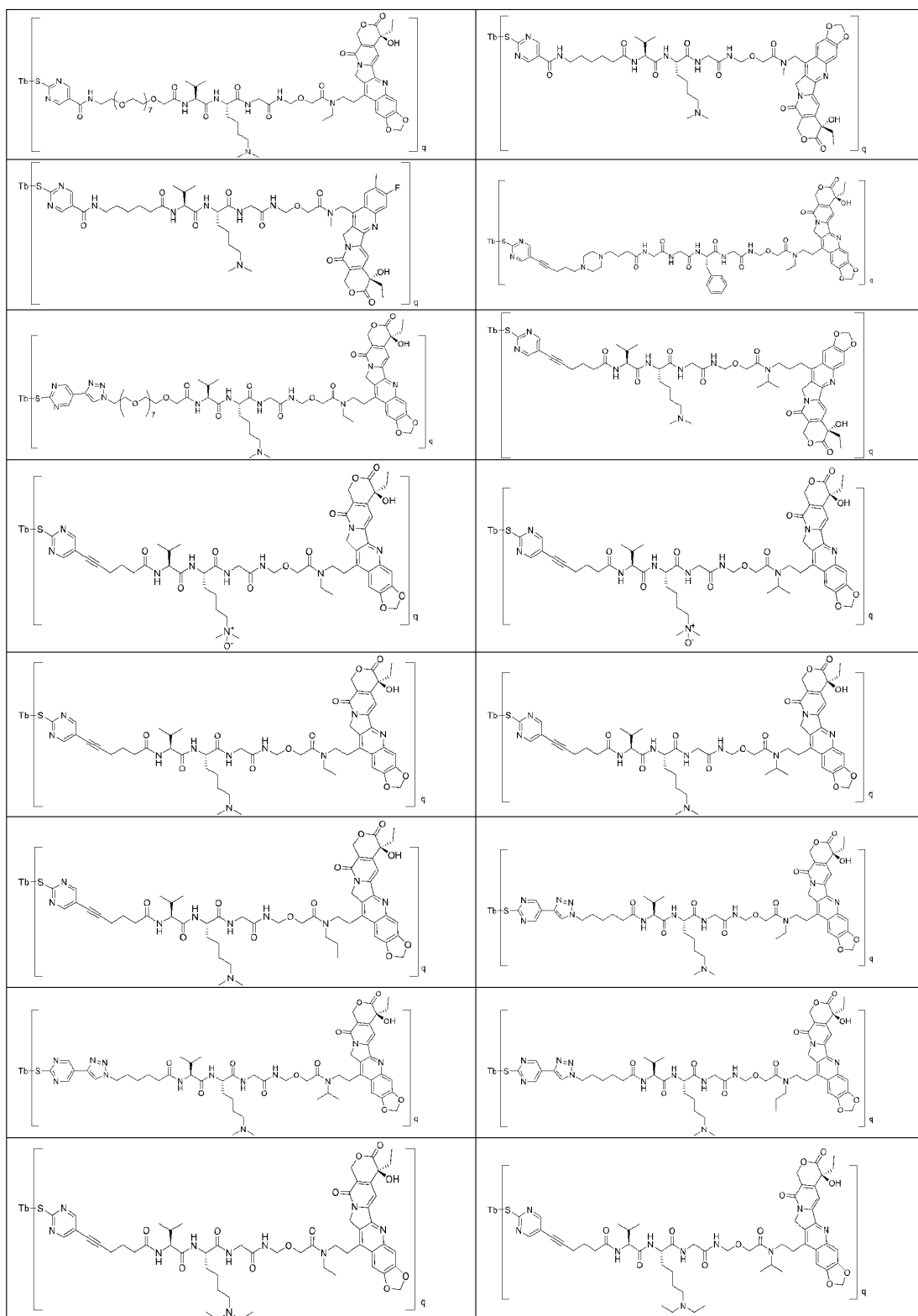
20. 权利要求 1-19 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其中，所述的抗体药物偶联物选自以下：

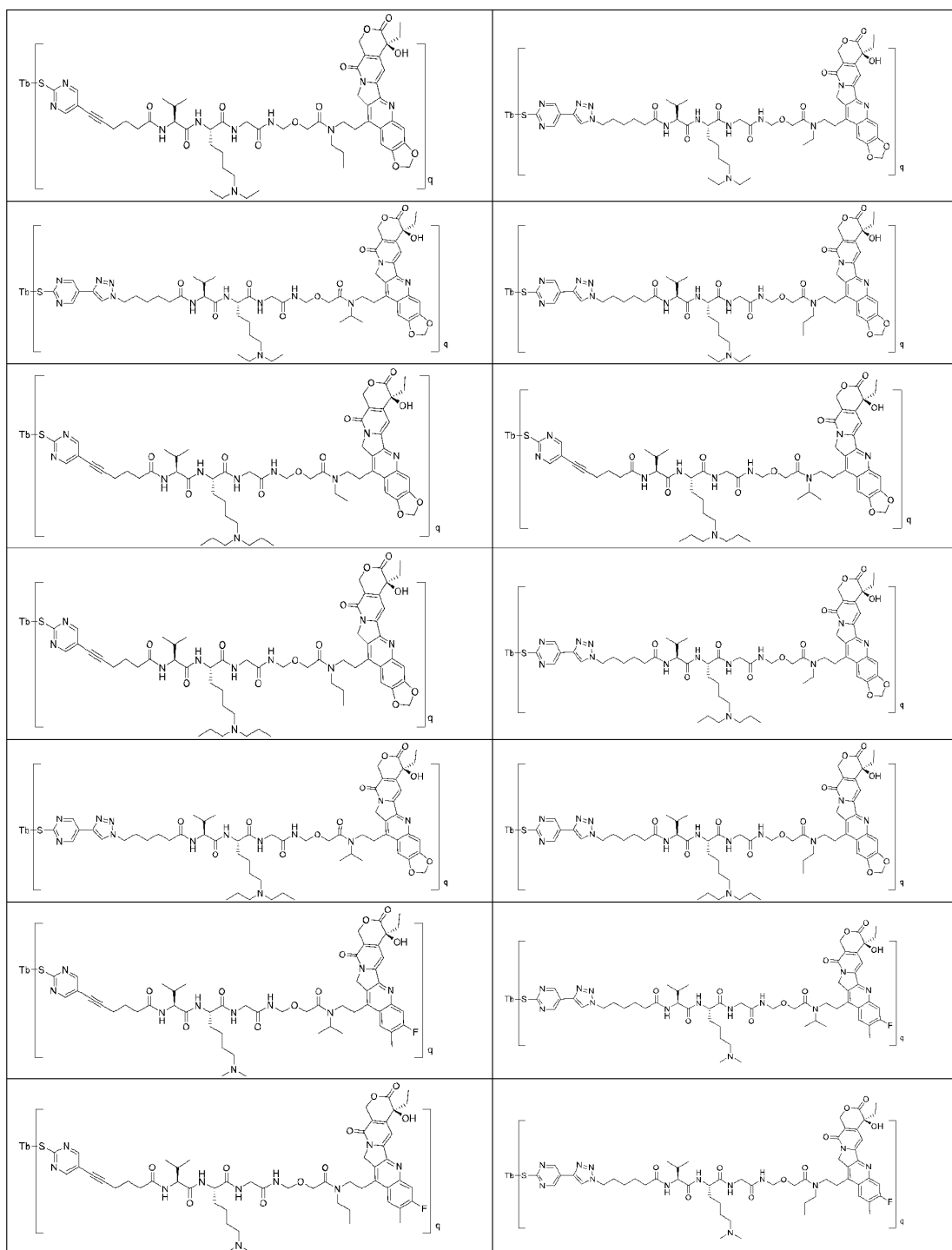


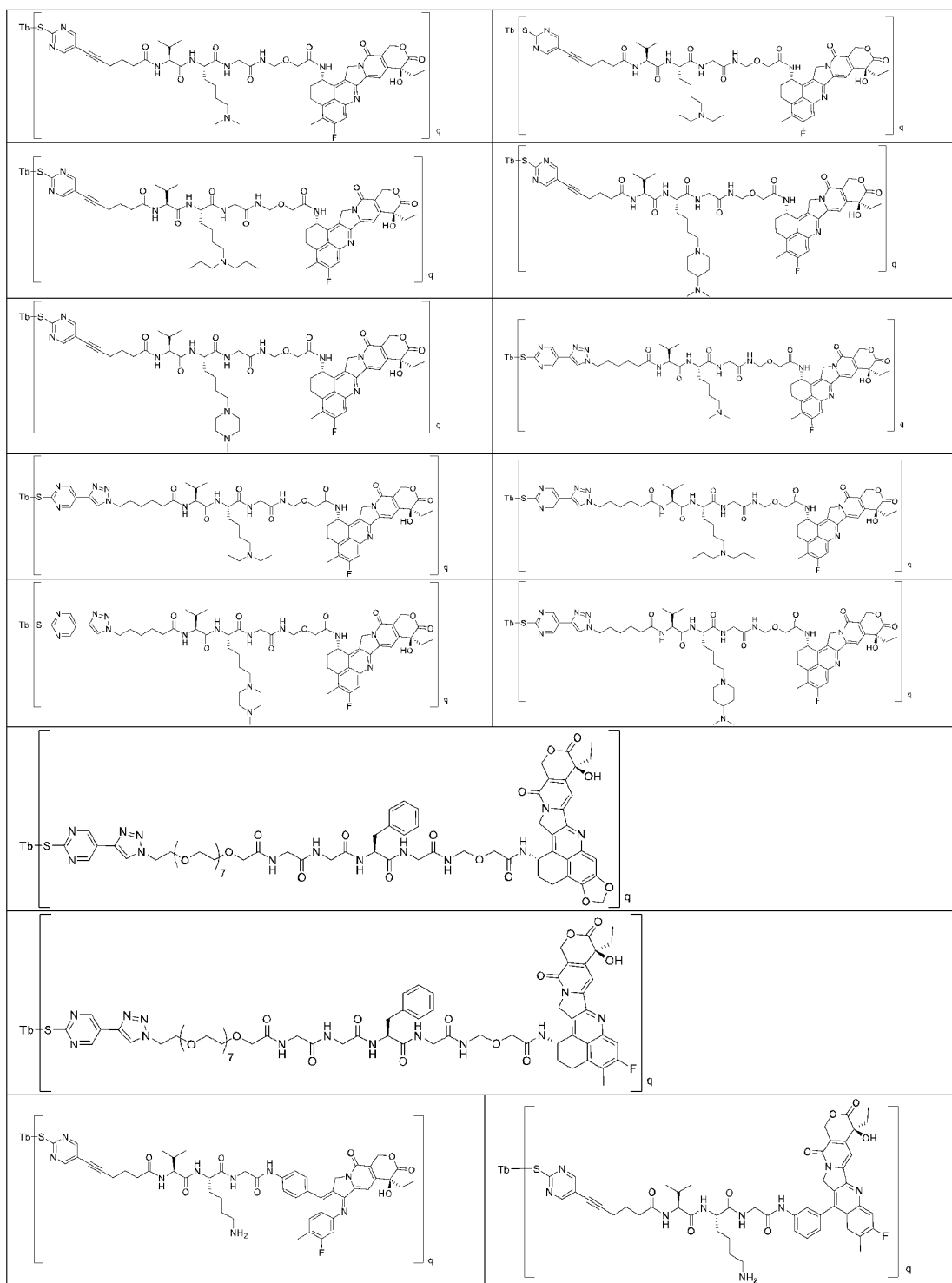


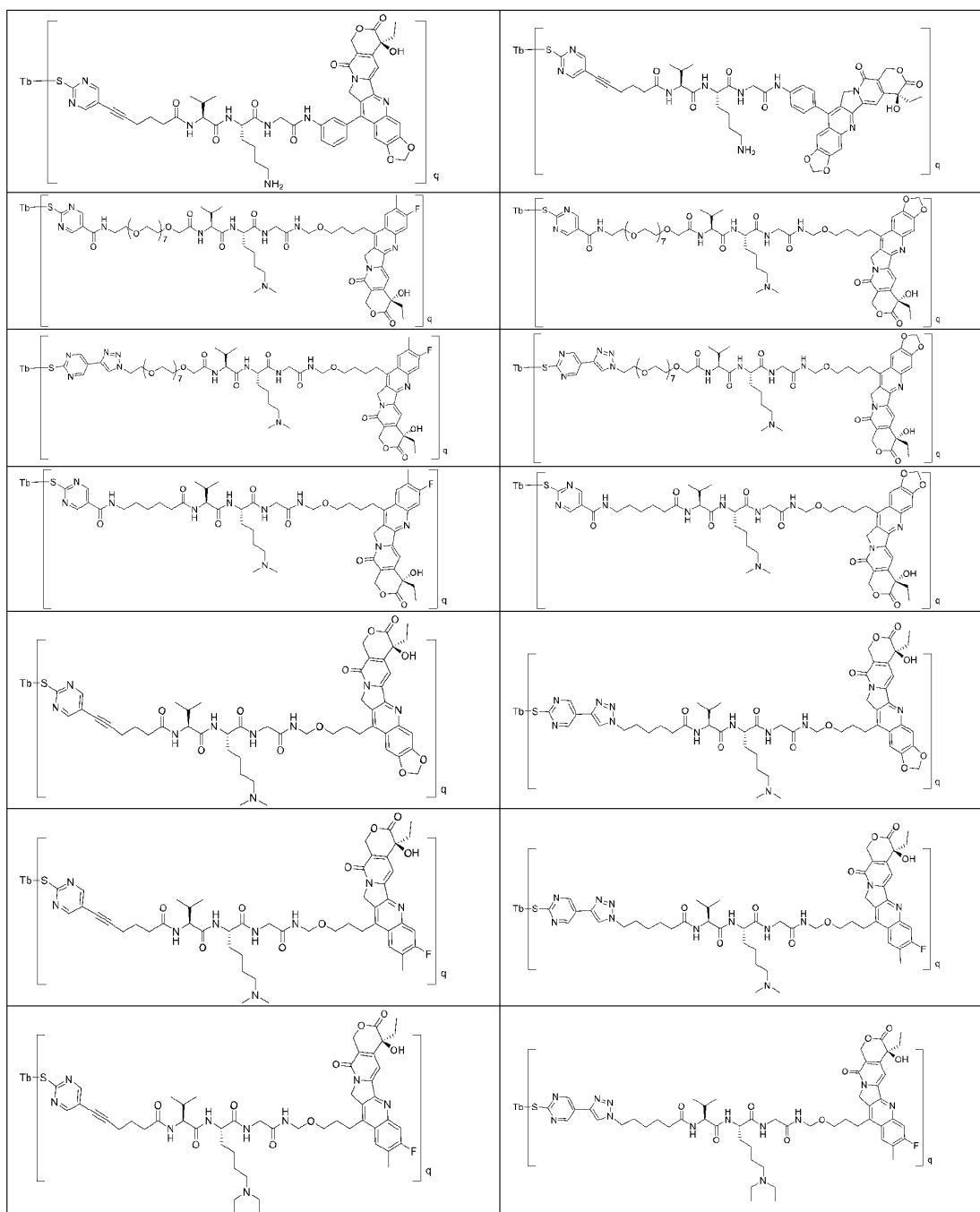


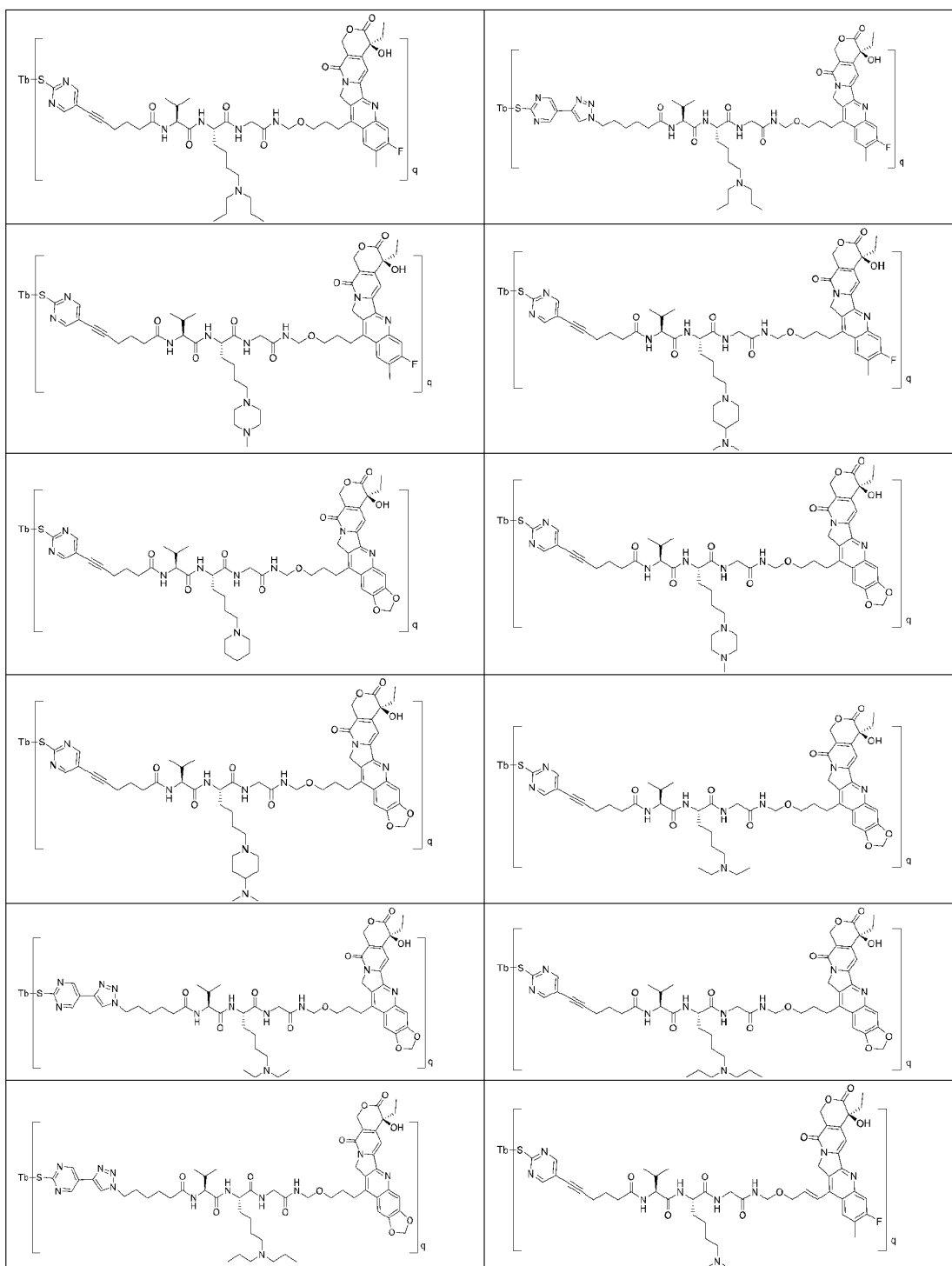


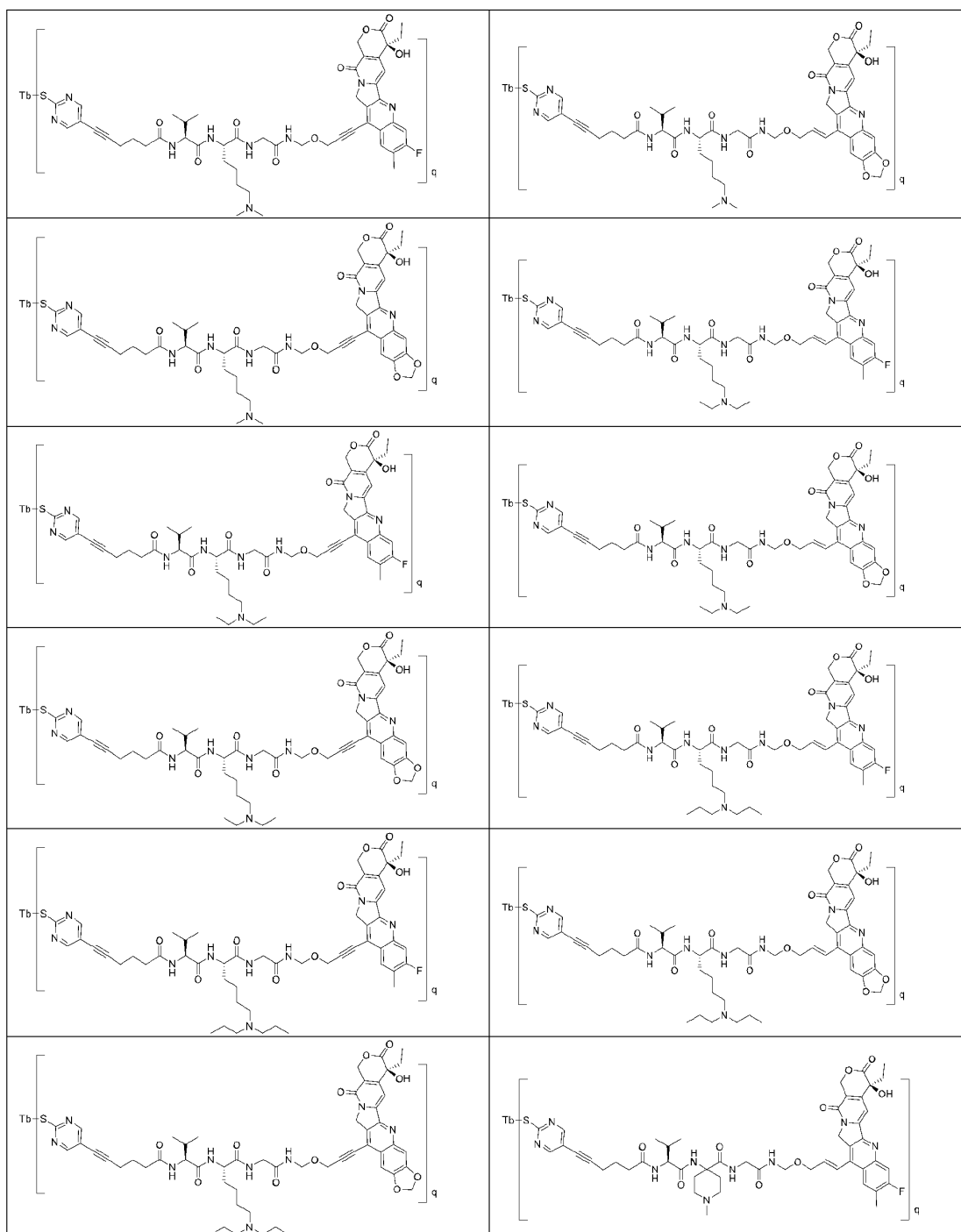


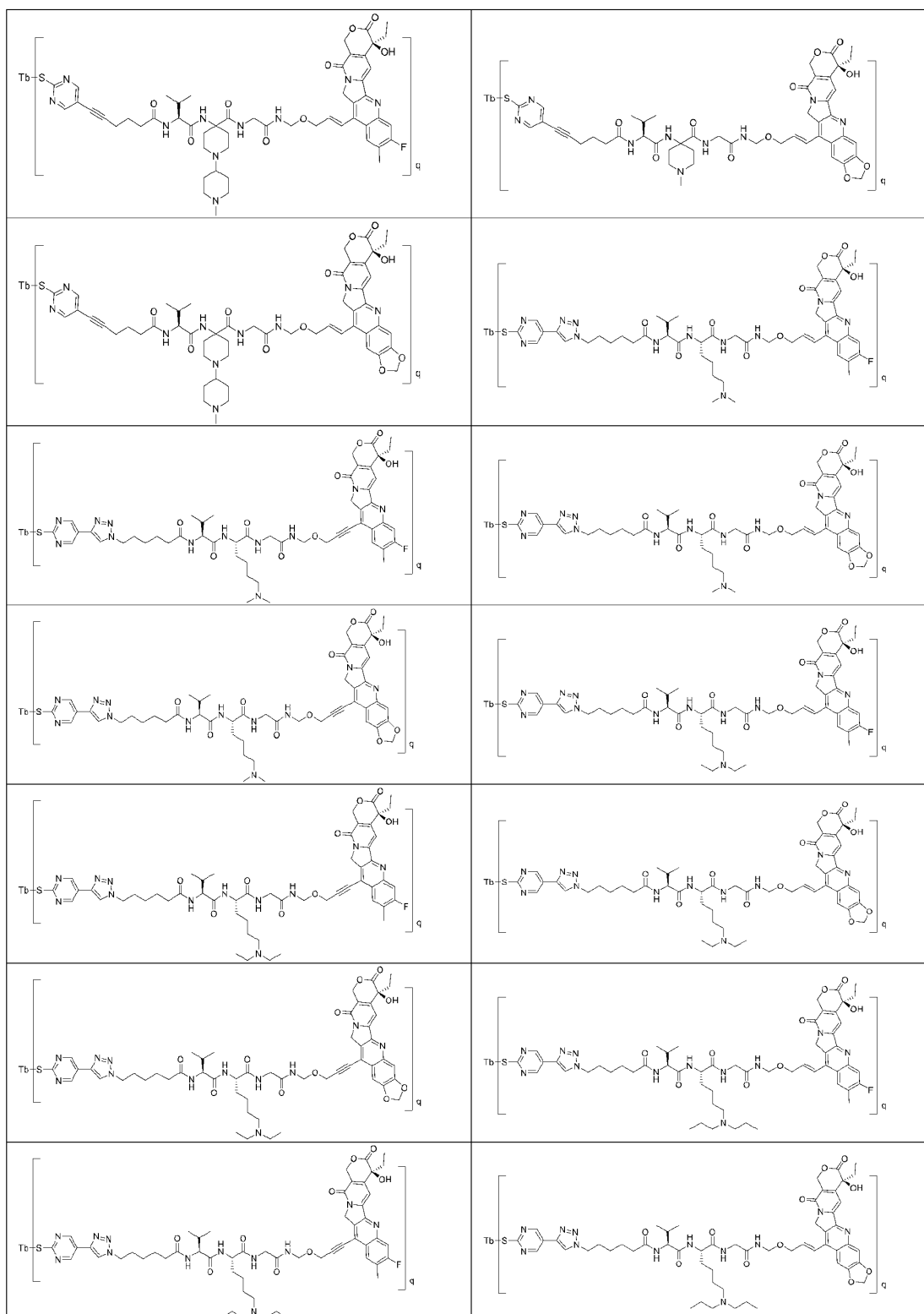


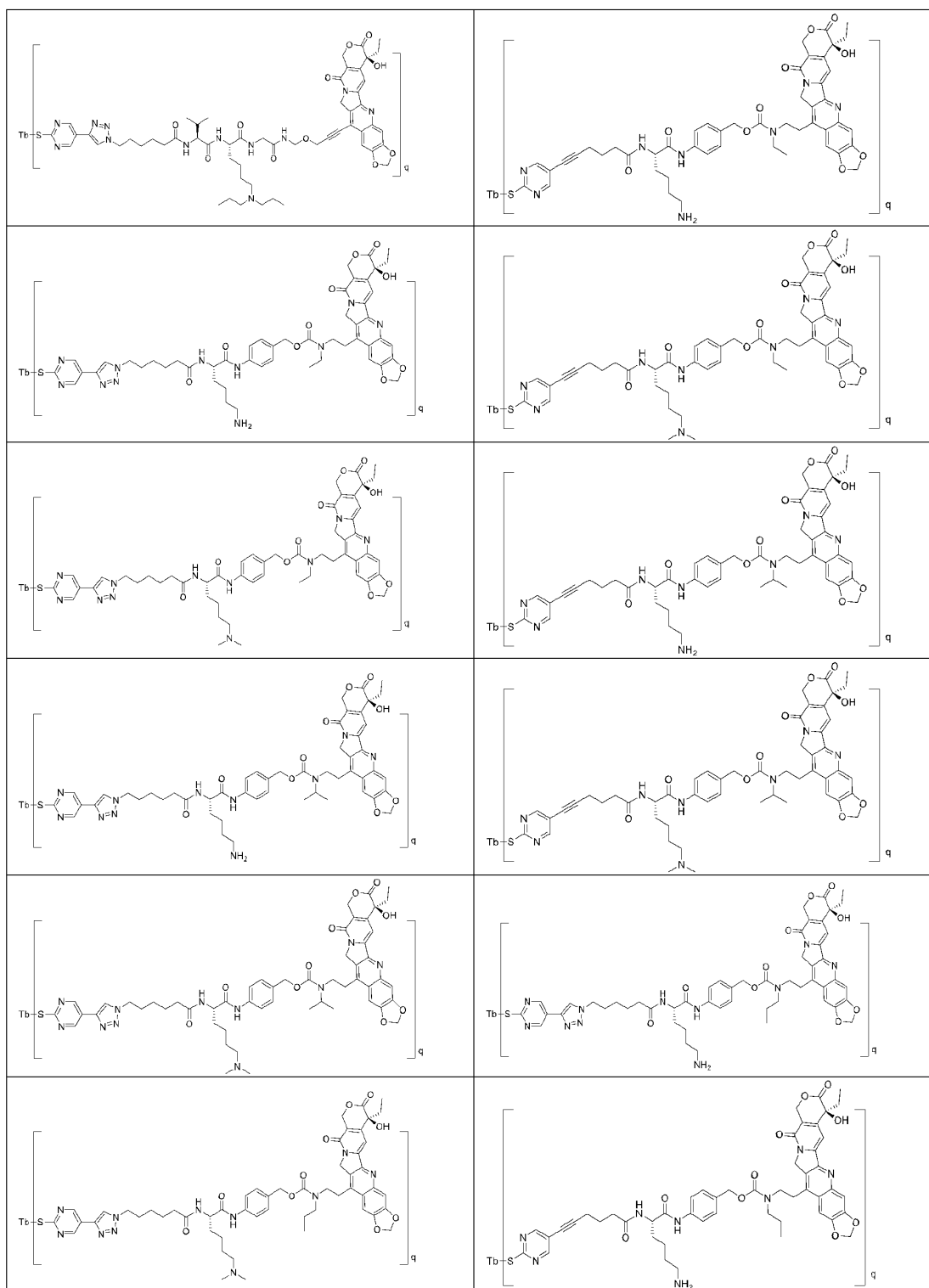


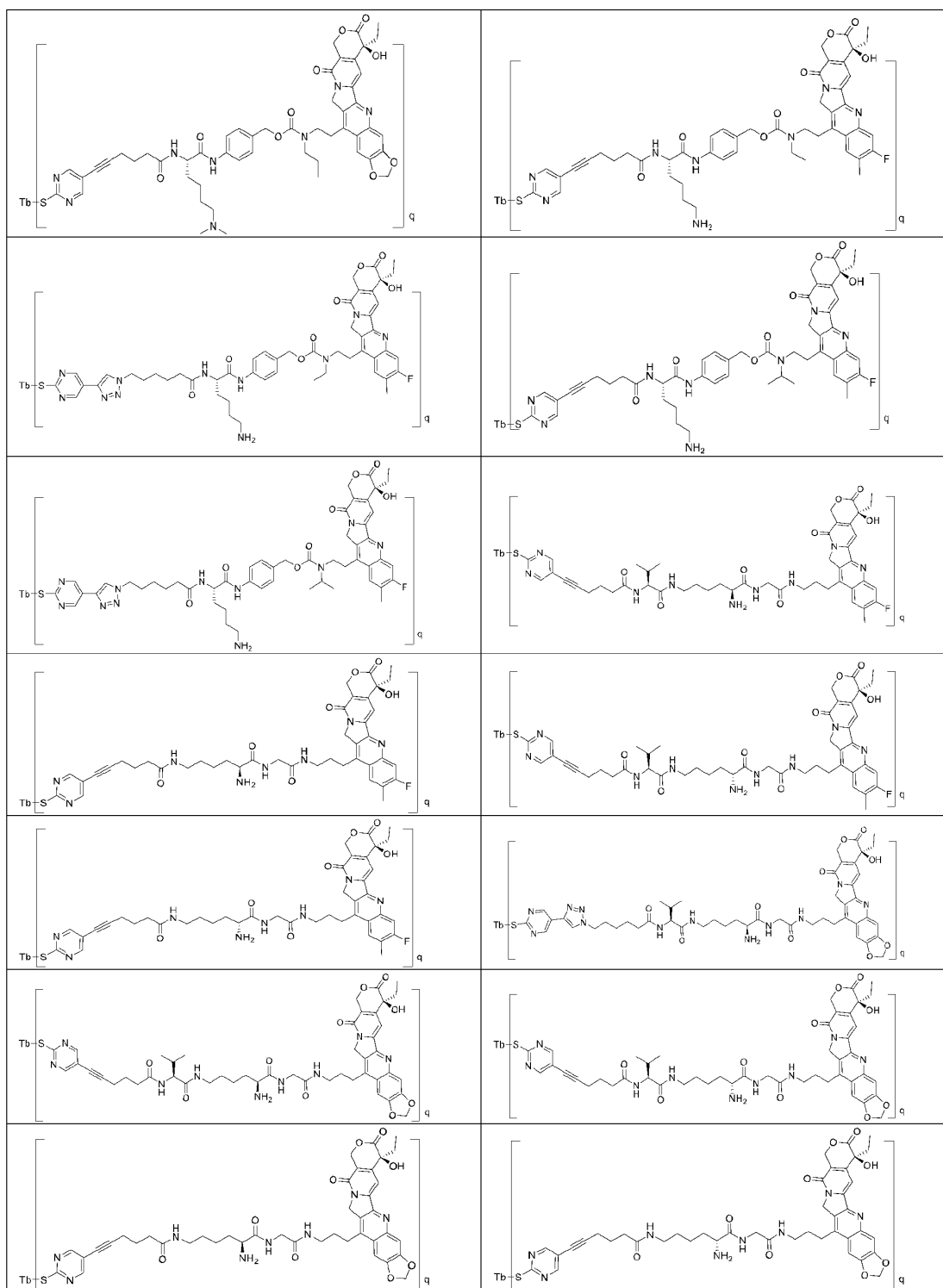


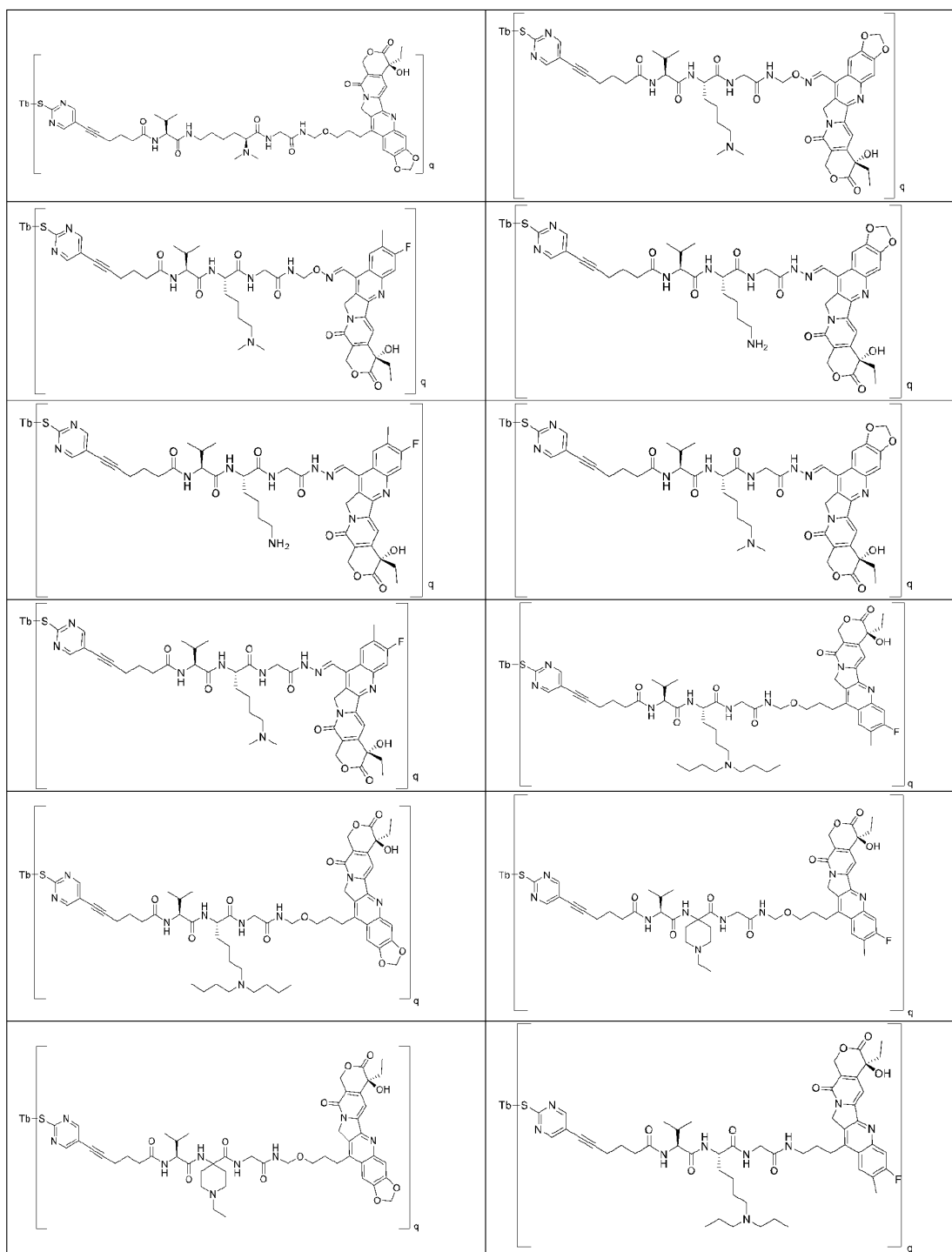


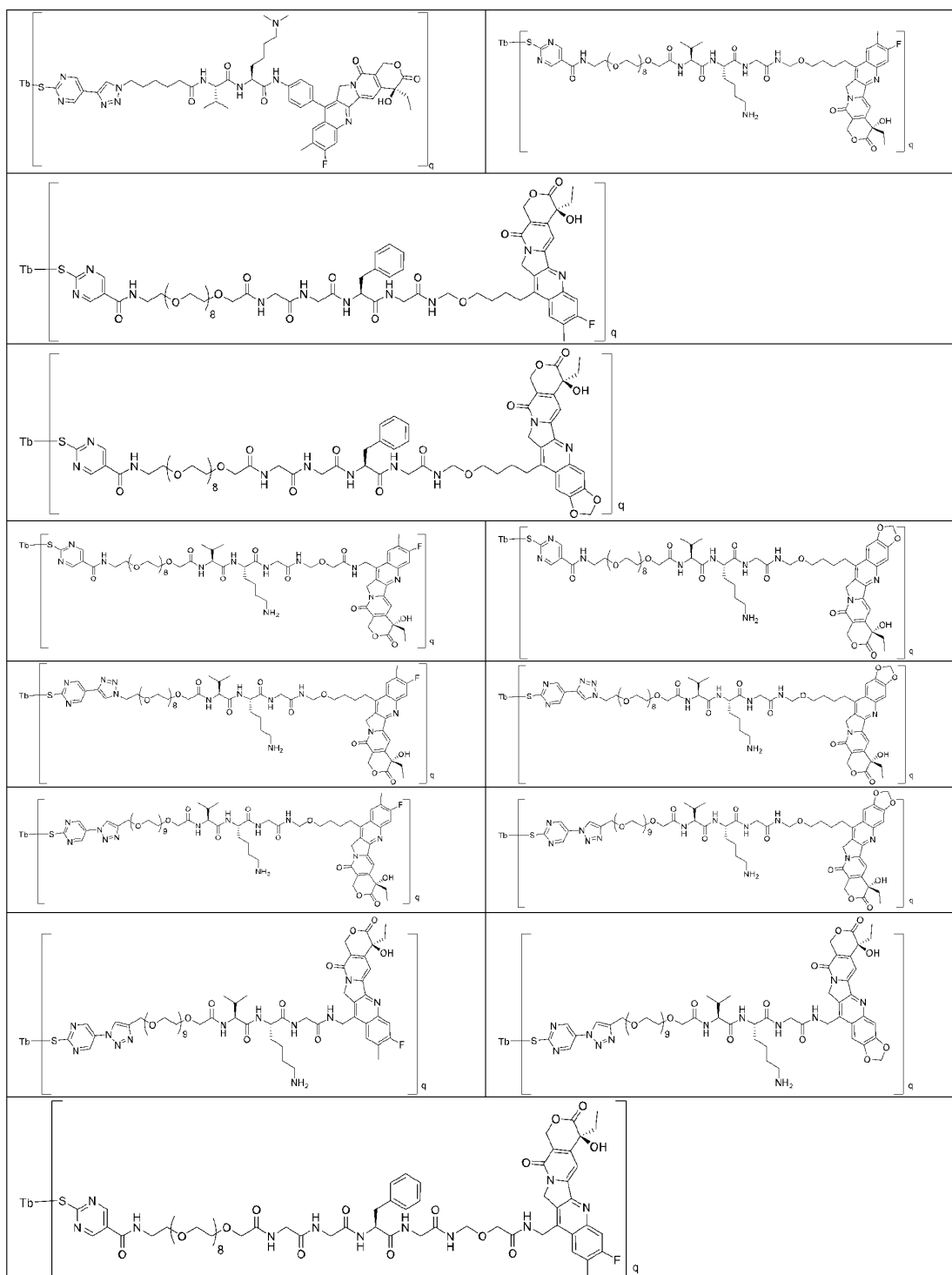


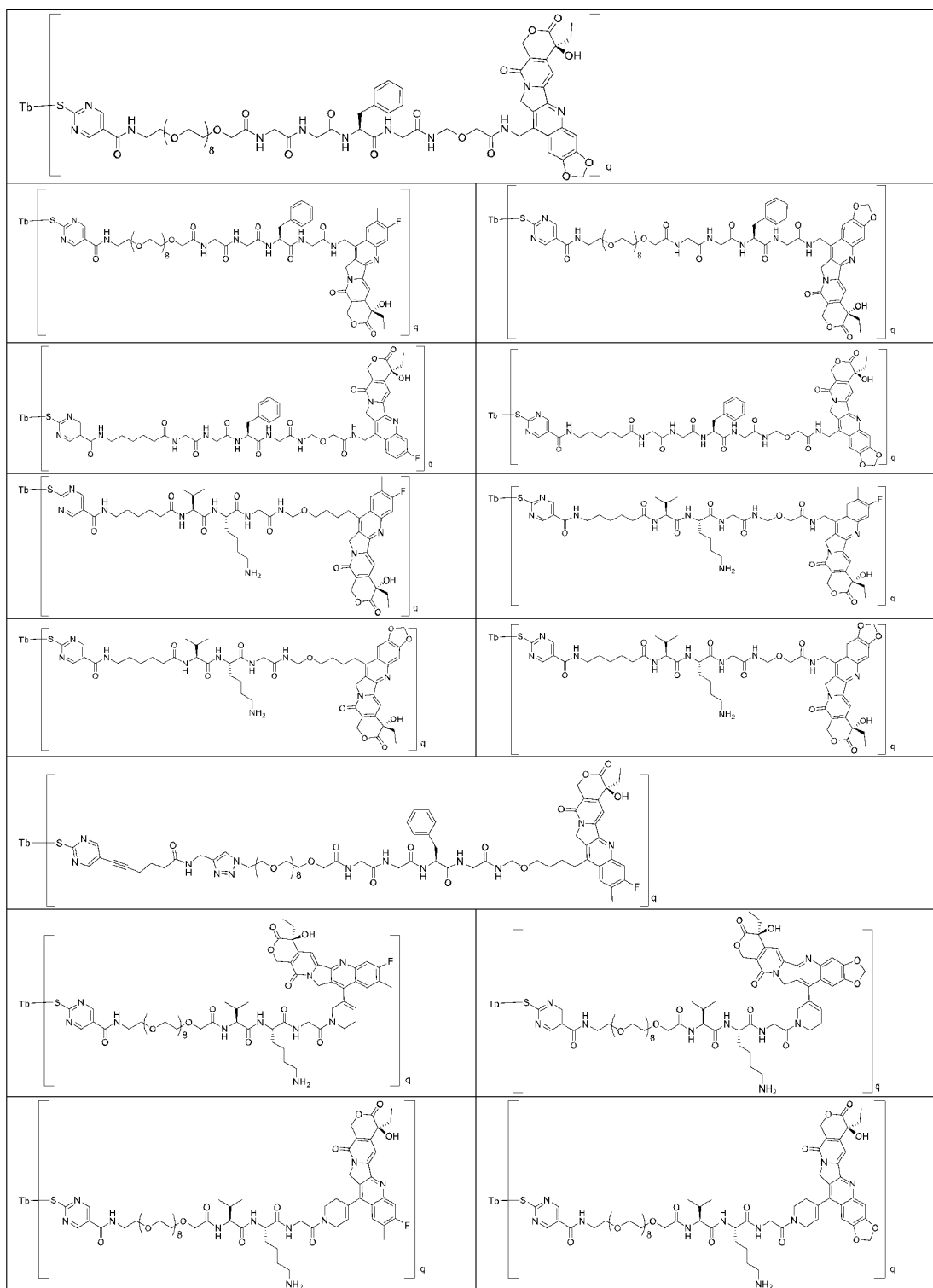


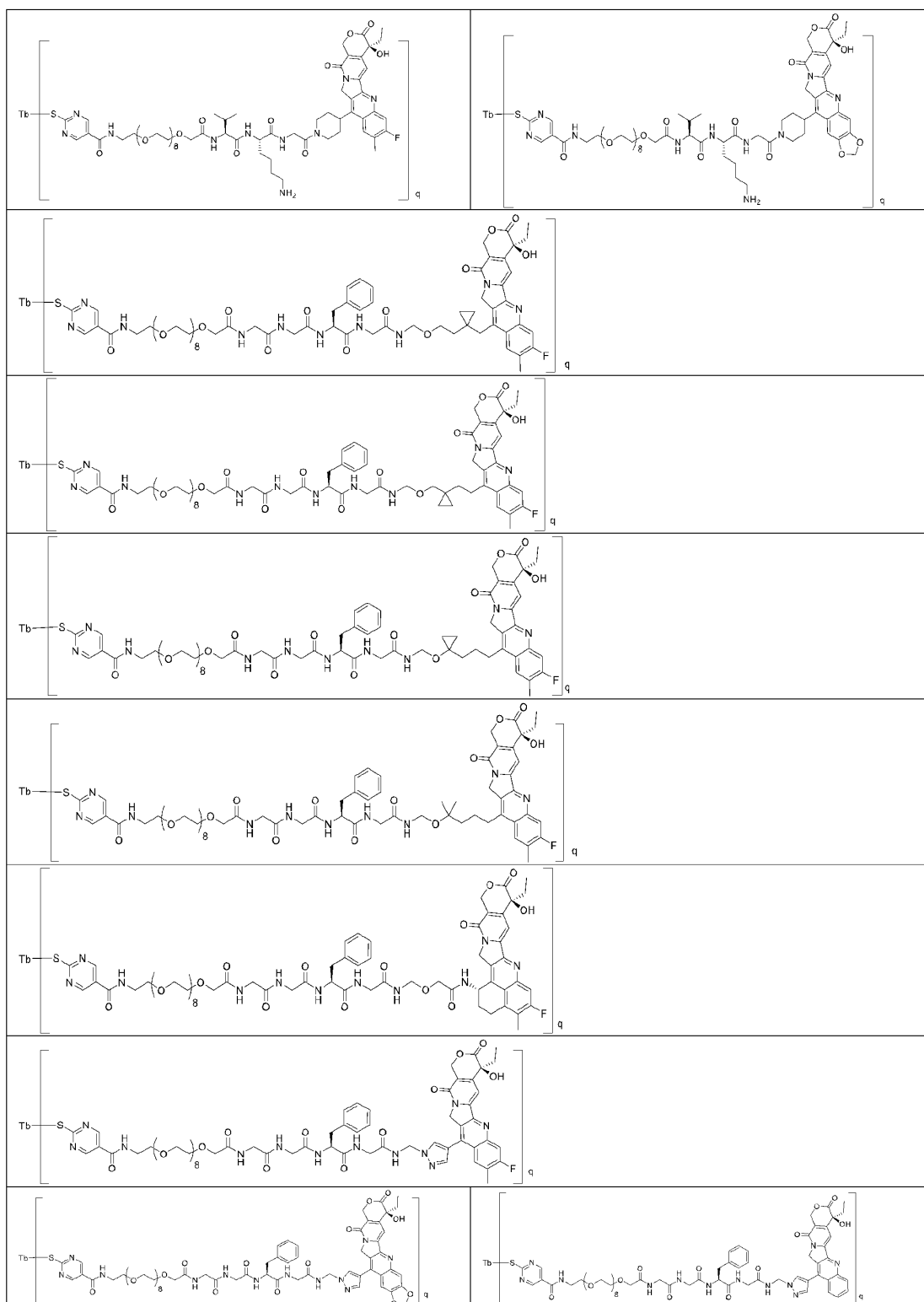


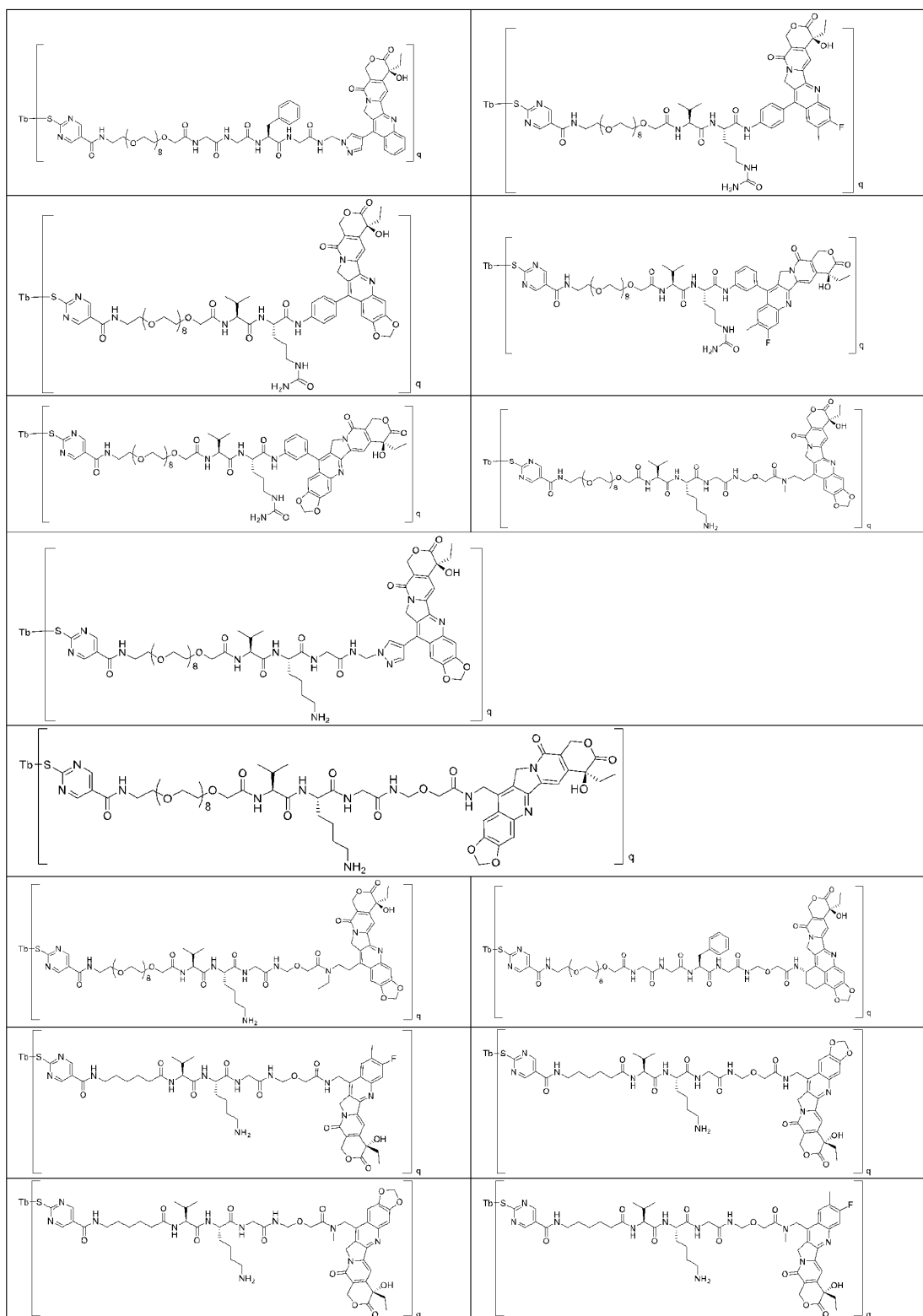


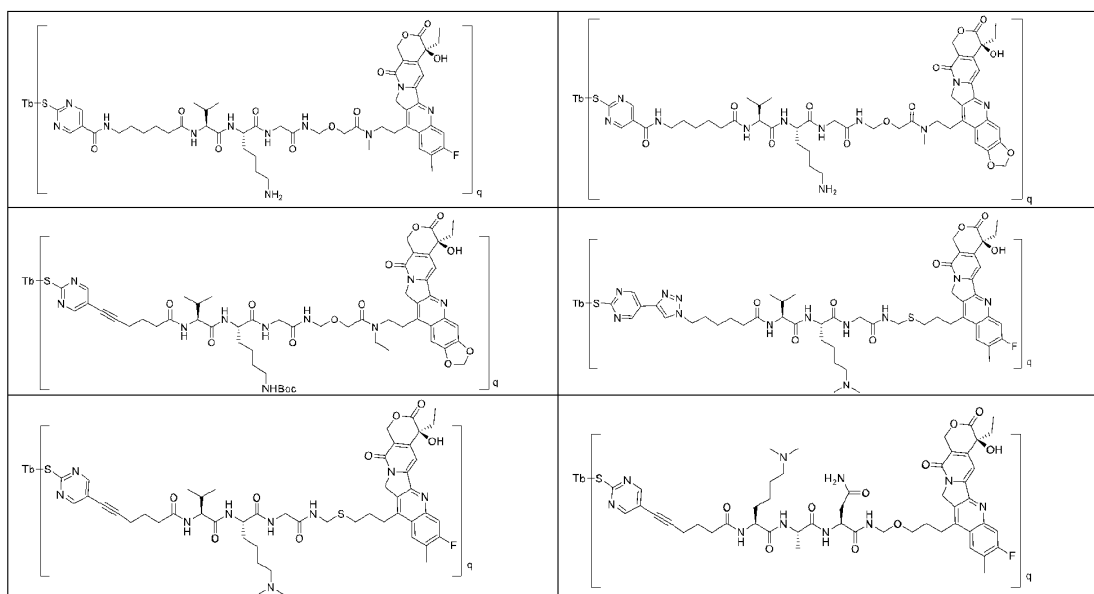












o

21. 如权利要求 1-20 任一所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

Tb 为抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段；优选地，所述的抗 Napi2b 的抗体为 lifastuzumab，upifitamab，60A12B3-hz1、22H9C4-hz1、66C12D12-hz1、34F2A10-hz1、C1，16G5B3-hz2 和 16G5B3-hz1 抗体或其抗原结合片段。

22. 一种抗 Napi2b 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区 CDR：

(a) SEQ ID NO: 1、17、19、34、36、52、54、71、73、74 或 33 所示的重链可变区 VH 中含有的 HCDR1、HCDR2、以及 HCDR3；和/或

(b) SEQ ID NO: 2、18、20、35、37、53、55、72、75 或 51 所示的轻链可变区 VL 中含有的 LCDR1、LCDR2、以及 LCDR3。

23. 权利要求 22 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) VH 和/或 VL，其中按 IMGT 编号系统定义：

(a) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 11 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 12 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 14 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 15 的 LCDR1，序列为 WAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 10 的 LCDR3；

(b) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 11 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 13 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 14 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 15 的 LCDR1，序列为 WAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 10 的 LCDR3；

(c) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 28 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 29 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 31 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 32 的 LCDR1，序列为 YTS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 27 的 LCDR3；

(d) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 28 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 30 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 31 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 32 的 LCDR1，序列为 YTS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 27 的 LCDR3；

(e) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 46 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 47 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 49 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 50 的 LCDR1，序列为 SAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 45 的 LCDR3；

(f) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 46 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 48 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 49 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 50 的 LCDR1，序列为 SAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 45 的 LCDR3；

(g) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 65 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 66 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 68 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 69 的 LCDR1，序列为 WAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3；

(h) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 65 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 67 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 68 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 69 的 LCDR1，序列为 WAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3；

或

(i) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 76 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 77 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 78 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 79 的 LCDR1，序列为 HTS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 16 的 LCDR3；

(2) VH 和/或 VL，其中按 kabat 编号系统定义：

(a) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 3 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 4 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO: 7 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO: 9 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO: 10 的 LCDR3；

(b) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO: 3 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO: 5 的 HCDR2，序列为 SEQ ID

NO: 6 的 HCDR3; 和/或,

所述 VL 包含: 序列为 SEQ ID NO: 8 的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 9 的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 10 的 LCDR3;

(c) 所述 VH 包含: 序列为 SEQ ID NO: 21 的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 22 的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 24 的 HCDR3; 和/或,

所述 VL 包含: 序列为 SEQ ID NO: 25 的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 26 的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 27 的 LCDR3;

(d) 所述 VH 包含: 序列为 SEQ ID NO: 21 的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 23 的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 24 的 HCDR3; 和/或,

所述 VL 包含: 序列为 SEQ ID NO: 25 的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 26 的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 27 的 LCDR3;

(e) 所述 VH 包含: 序列为 SEQ ID NO: 38 的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 39 的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 41 的 HCDR3; 和/或,

所述 VL 包含: 序列为 SEQ ID NO: 42 的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 44 的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 45 的 LCDR3;

(f) 所述 VH 包含: 序列为 SEQ ID NO: 38 的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 40 的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 41 的 HCDR3; 和/或,

所述 VL 包含: 序列为 SEQ ID NO: 43 的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 44 的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 45 的 LCDR3;

(g) 所述 VH 包含: 序列为 SEQ ID NO: 56 的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 57 的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 60 的 HCDR3; 和/或,

所述 VL 包含: 序列为 SEQ ID NO: 61 的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 63 的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3;

(h) 所述 VH 包含: 序列为 SEQ ID NO: 56 的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 58 的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 60 的 HCDR3; 和/或,

所述 VL 包含: 序列为 SEQ ID NO: 62 的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 63 的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3; 或

(i) 所述 VH 包含: 序列为 SEQ ID NO: 56 的 HCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 59 的 HCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 60 的 HCDR3; 和/或,

所述 VL 包含: 序列为 SEQ ID NO: 62 的 LCDR1, 序列为 SEQ ID NO: 63 的 LCDR2, 序列为 SEQ ID NO: 64 的 LCDR3;

优选地, 所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段结合人 Napi2b、猴 Napi2b 和/或大鼠 Napi2b。

24. 权利要求 22 或 23 所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含:

(a) SEQ ID NO: 1 或 17 所示的 VH, 和/或, SEQ ID NO: 2 或 18 所示的 VL;

- (b) SEQ ID NO: 19 或 34 所示的 VH, 和/或, SEQ ID NO: 20 或 35 所示的 VL;
- (c) SEQ ID NO: 36 或 52 所示的 VH, 和/或, SEQ ID NO: 37 或 53 所示的 VL;
- (d) SEQ ID NO: 54、71 或 73 所示的 VH, 和/或, SEQ ID NO: 55 或 72 所示的 VL;
- (e) SEQ ID NO: 74 或 33 所示的 VH, 和/或, SEQ ID NO: 75 或 51 所示的 VL;
- (f) 与 (a)–(e) 中的任一 VH 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性的 VH; 和/或, 与 (a) 中的任一 VL 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性的 VL; 或者
- (g) 与 (a)–(e) 中的任一 VH 相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的 VH; 和/或, 与 (a) 中的任一 VL 具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的 VL; 优选地, 所述的置换是保守置换。

25. 权利要求 22–24 任一项抗 Napi2b 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段包含:

- (a) SEQ ID NO: 1 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 2 所示序列的 VL;
- (b) SEQ ID NO: 17 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 18 所示序列的 VL;
- (c) SEQ ID NO: 19 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 20 所示序列的 VL;
- (d) SEQ ID NO: 34 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 35 所示序列的 VL;
- (e) SEQ ID NO: 36 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 37 所示序列的 VL;
- (f) SEQ ID NO: 52 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 53 所示序列的 VL;
- (g) SEQ ID NO: 54 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 55 所示序列的 VL;
- (h) SEQ ID NO: 71 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 72 所示序列的 VL;
- (i) SEQ ID NO: 73 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 72 所示序列的 VL;
- (j) SEQ ID NO: 74 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 75 所示序列的 VL;
- (k) SEQ ID NO: 33 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO: 51 所示序列的 VL;
- (l) VH 和 VL, 与 (a) 至 (k) 任一组中的 VH 和 VL 相比, 其 VH 具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性; 和/或, 其 VL 具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性; 或者
- (m) VH 和 VL, 与 (a) 至 (k) 任一组中的 VH 和 VL 相比, 其 VH 具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合; 和/或, 其 VL 具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合; 优选地, 所述的置换是保守置换。

26. 权利要求 22-25 任一项所述抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体;

可选地, 所述抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv)、双抗体(diabody)和多特异性抗体;

例如, 所述多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体或四特异性抗体。

27. 权利要求 22-26 任一项所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段进一步包含:

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区 CH 或其变体; 和/或

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区 CL 或其变体,

其中, 所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性; 或者, 所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合; 例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合; 优选地, 所述的置换是保守置换;

优选地, 所述重链恒定区是 IgG 重链恒定区, 例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区; 和/或, 所述轻链恒定区是 κ 或 λ 轻链恒定区;

更优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含人 IgG1 重链恒定区; 和/或所述抗体或其抗原结合片段包含人 κ 轻链恒定区。

28. 权利要求 27 所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段, 其中,

所述重链恒定区包括 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 或其变体, 所述变体与 SEQ ID NO: 70 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换, 例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的保守置换; 或者与 SEQ ID NO: 70 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性; 和/或

所述轻链恒定区包括 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 或其变体, 所述变体与 SEQ ID NO: 80 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换, 例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的保守置换, 或者与 SEQ ID NO: 80 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 70 所示的重链恒定区 CH 和 SEQ ID NO: 80 所示的轻链恒定区 CL。

29. 权利要求 22-28 任一项所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体包括:

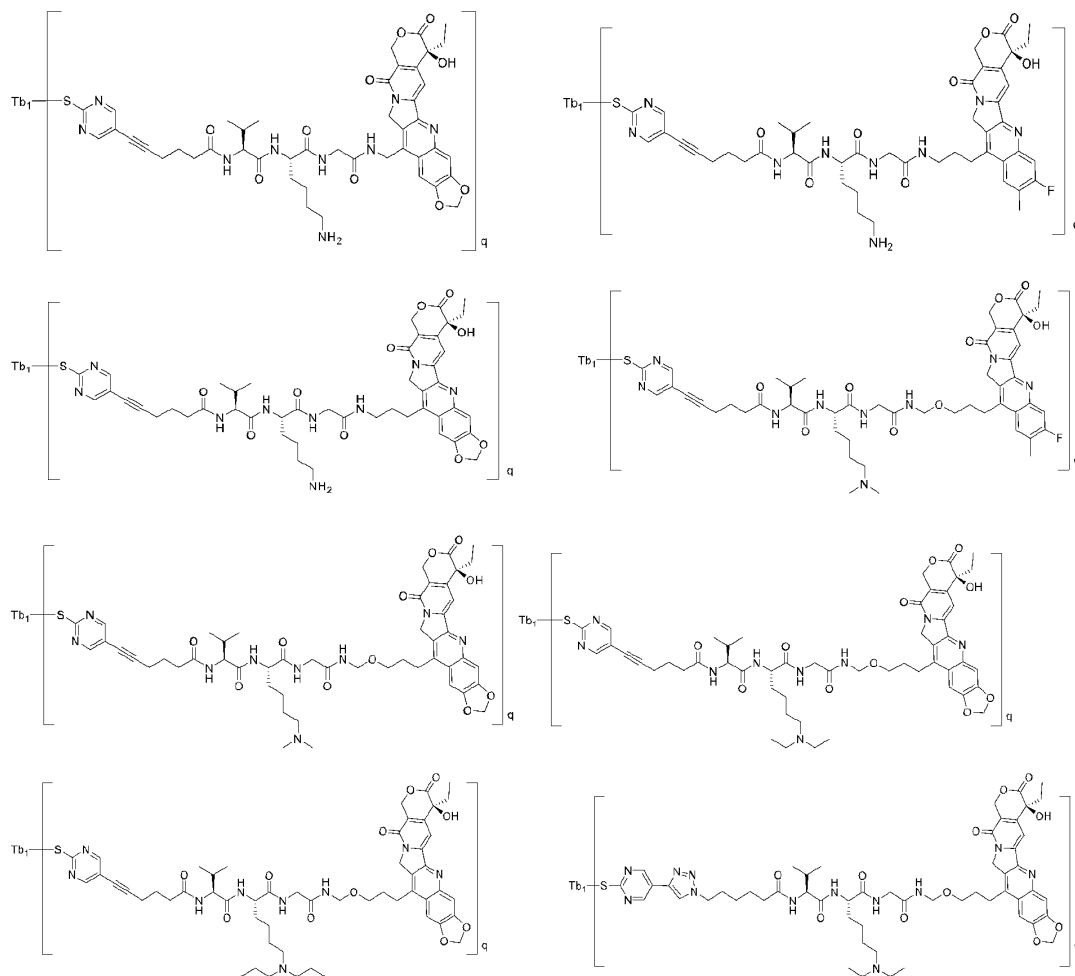
(a) 包括 SEQ ID NO: 71 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 的重链, 和, 包括 SEQ ID NO: 72 所示的 VL 和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 的轻链;

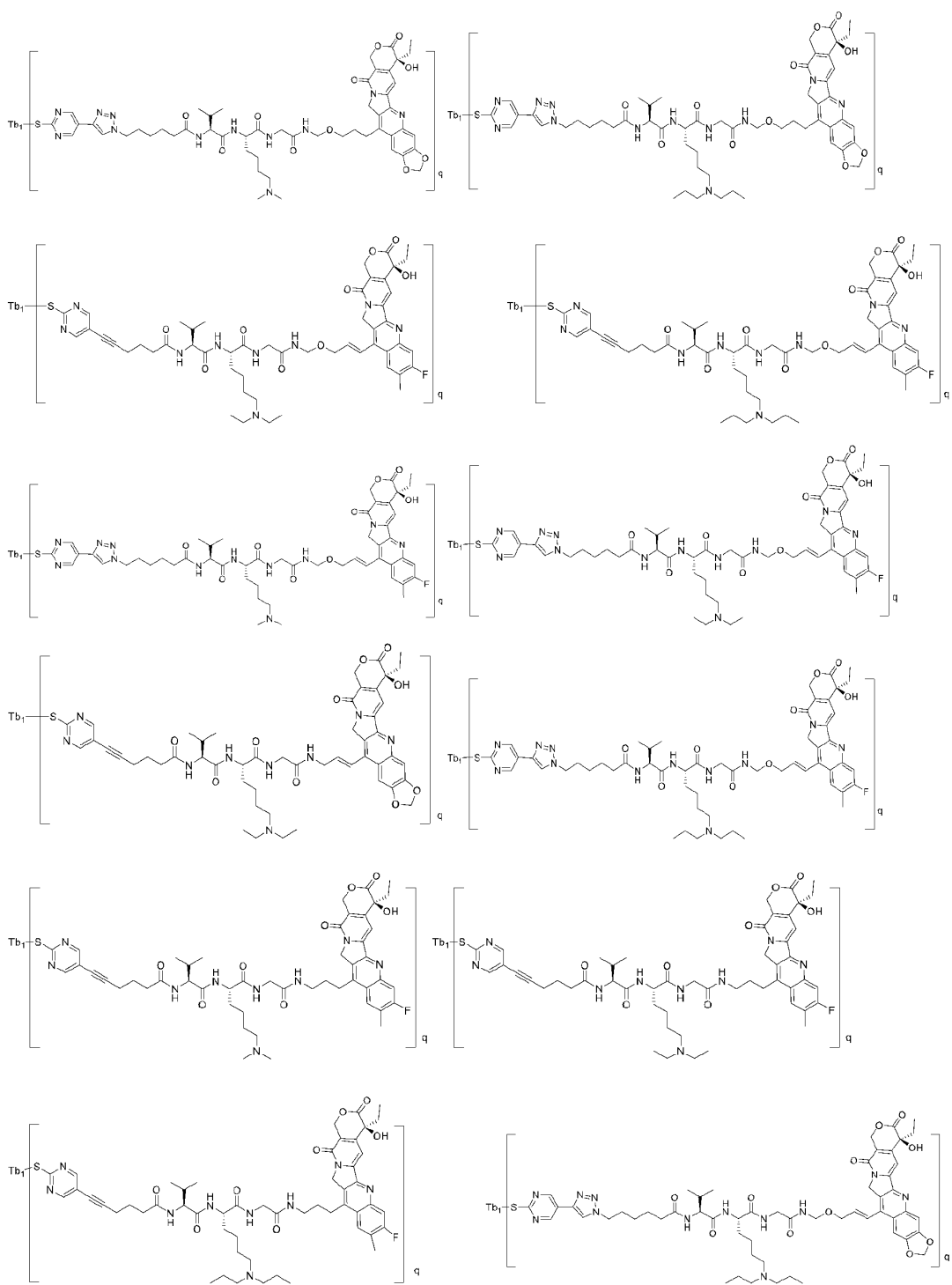
(b) 包括 SEQ ID NO: 73 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 的重链, 和, 包括 SEQ ID NO: 72 所示的 VL 和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 的轻链; 优选包括 SEQ ID NO: 81 所示的重链和 SEQ ID NO: 82 所示的轻链;

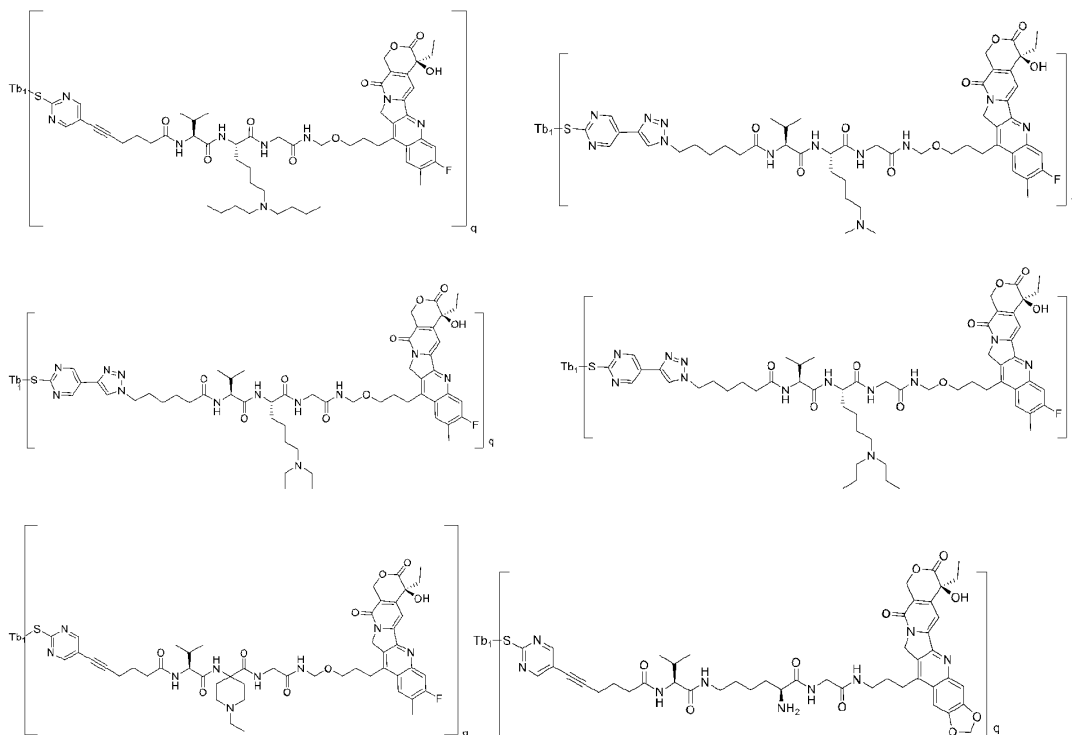
(c) 包括 SEQ ID NO: 17 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 70 所示的 CH 的重链, 和, 包括 SEQ ID NO: 18 所示的 VL 和 SEQ ID NO: 80 所示的 CL 的轻链; 优选包括 SEQ ID NO: 83 所示的重链和 SEQ ID NO: 84 所示的轻链。

30. 如权利要求 1-21 任一所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于, **Tb** 选自权利要求 22-29 任一所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段,

31. 权利要求 1-21, 30 中任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物, 其特征在于, 其中, 所述抗体药物偶联物选自:

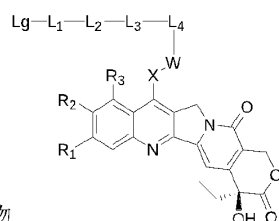






其中, Tb_i 为 lifastuzumab, upifitamab, 60A12B3-hz1、22H9C4-hz1、66C12D12-hz1、34F2A10-hz1、C1, 16G5B3-hz2 和 16G5B3-hz1 抗体; q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值, 优选 2-8 之间的任意数值, 更优选地, q 为 2、4、6 或 8。

32. 制备权利要求 1-21, 30, 31 中任一项所述的抗体药物偶联物的方法, 其包括:



将 Tb 与式 III 所示的药物连接体偶联物

反应;

其中:

L₁、L₂、L₃、L₄、Tb 如权利要求 1-21 中任一项所定义;

R₁、R₂、R₃、X、W 如权利要求 1-21 所定义;

Lg 为离去基团, Lg 选自卤素、磺基、三级胺盐基 (Me₃N⁺、Et₃N⁺)、重氮盐基、-OMs、MeSO₂⁻、CF₃SO₃⁻。

33. 权利要求 32 的方法, 其中, 所述方法包括将 Tb 与式 III 所示的药物连接体偶联物



优选地, 所述 Tb 与所述药物连接体偶联物的物质的量的比为 1: (1-20);

优选地, 所述偶联反应在水和/或有机溶剂中进行; 优选地, 所述有机溶剂选自 N, N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜、N-甲基吡咯烷酮、腈类(例如乙腈)、醇类(例如甲醇、乙醇)或其任意组合; 所述的腈类可为乙腈, 所述的醇类可为甲醇、乙醇;

优选地, 所述方法进一步包括将偶联产物进行纯化的步骤; 优选地, 通过层析方法对所述偶联产物进行纯化; 优选地, 所述层析方法包括离子交换层析、疏水层析、反相层析或亲和层析中的一种或多种。

34. 分离的核酸分子, 其编码权利要求 22-29 任一项所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段。

35. 载体, 其包含权利要求 34 所述的分离的核酸分子; 优选地, 所述载体为克隆载体或表达载体。

36. 宿主细胞, 其包含权利要求 34 所述的分离的核酸分子或权利要求 35 所述的载体。

37. 制备权利要求 22-29 任一项所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段的方法, 其包括, 在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下, 培养权利要求 36 所述的宿主细胞, 和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

38. 一种抗体-药物偶联物, 其中抗体为权利要求 22-29 任一项所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段, 其通过接头与偶联部分连接, 所述偶联部分选自: 可检测的标记、放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质、酶、聚乙二醇、核素、核酸、小分子毒素、具有结合活性多肽、蛋白、受体、配体, 以及其它抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡或坏死的活性物质。

39. 一种抗体药物偶联物的群, 其包含权利要求 1-21, 30, 31, 38 中任一项所述的抗体药物偶联物, 所述的抗体药物偶联物具有一种、两种或多种 q 值;

40. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-21, 30, 31, 38 中任一项所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物、或权利要求 22-29 任一项所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片, 或如权利要求 34 所述的核酸分子、或如权利要求 35 所述的载体、或如权利要求 36 所述的宿主细胞、或如权利要求 39 所述的抗体药物偶联物的群; 优选还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

41. 权利要求 39 所述的群或权利要求 40 所述的药物组合物, 其特征在于, 药物与抗体的比例 (DAR) 选自 1-10 中的整数或小数;

优选地, 所述群的药物与抗体的比例 (DAR) 选自 1.5-2.5、3.5-4.5、5.5-6.5 和 7.5-8.5;

优选地, 所述群的药物与抗体的比例 (DAR) 选自约 2.0、4.0、6.0 和 8.0;

优选地, 所述群的药物与抗体的比例 (DAR) 选自 2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.2、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.7、8.9 和 9。

42. 一种权利要求 1-21, 30, 31, 38 中任一项所述抗体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物、或权利要求 22-2, 9 任一项所述的抗 Napi2b 抗体或其抗原结合片段、或如权利要求 34 所述的核酸分子、或如权利要求 35 所述的载体、或如权利要求 36 所述的宿主细胞、或如权利要求 39 所述的抗体药物偶联物的群, 或者权利要求 40 所述的药物组合物在制备治疗和/或预防与细胞活动异常相关的疾病的药物中的用途;

可选地, 所述的与细胞活动异常相关的疾病可为癌症疾病;

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

优选地, 所述癌症疾病选自结肠癌, 结直肠癌, 结肠腺癌, 小细胞肺癌, 卵巢癌;

更优选地, 所述癌症疾病为与 Napi2b 相关的癌症疾病。