

抗 CD33 抗体和抗 CD33 抗体-药物偶联物及其用途

技术领域

本发明涉及生物制药领域，涉及抗 CD33 抗体和抗 CD33 抗体-药物偶联物及其用途，具体涉及一种抗人 CD33 抗体与具有细胞杀伤效果的药物形成抗体-药物偶联物，以及该抗体-药物偶联物的制备方法和应用。

背景技术

CD33 是一种髓系细胞分化抗原，由 364 个氨基酸组成，是一种分子量为 67KD 的 I 型跨膜糖蛋白，在分化起始阶段主要在髓系血细胞中分布。CD33 属于免疫球蛋白超家族成员，包含 IgV 和 IgC2 两个免疫球蛋白样胞外结构域，以及两个酪氨酸依赖的信号传导基序 ITIMs 胞内结构，可作为抑制受体，调控抑制性信号转导过程。如在免疫应答反应中，CD33 作为一种抑制性受体招募细胞质磷酸酶，促使细胞质磷酸酶脱磷酸化，从而阻碍信号分子的转导。同时，CD33 也是唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素蛋白（sialic acid-binding Ig-related lectin, SIGLEC）家族的成员，通过与唾液酸结合识别细胞表面的聚糖，从而参与细胞间相互作用以及介导白细胞与内皮细胞的粘附等。CD33 已被鉴定出三种选择性剪切类型，分别是具有较小二硫键连接 V 与 C 结构域的同种型 CD33m、具有较高分子量的变体 CD33M，以及缺失 IgV 结构域的 CD33M。

CD33 被发现在 90%以上的急性髓性白血病(AML)患者原始粒细胞中表达，在髓系细胞中是特异性白血病抗原。急性髓性白血病是一种存在于血液系统中的恶性肿瘤，具有难治性、易复发性和治疗致死性等特点。这种致命疾病会导致骨髓产生异常的成髓细胞，造成红细胞、血小板和白细胞数量急剧下降。有研究表明，在靶向清除 CD33 阳性细胞后，经过培养，其造血功能可恢复。并且 CD33 在造血干细胞、成熟粒细胞以及其他组织中未发现表达，因此在临床上 CD33 是特异性免疫治疗急性髓性白血病的优良靶点。

2000 年以 CD33 为靶点的 ADC 药物吉妥珠单抗（Gentuzumab ozogamicin）（Mylotarg，GO）经美国食品和药物管理局（FDA）批准上市，Mylotarg 通过抗

CD33 人源化 IgG4 单抗与卡其霉素偶联而成，主要用于难控制或复发的急性粒细胞白血病患者治疗，当 Mylotarg 与 CD33 抗原结合后在癌细胞内释放卡其霉素，诱导肿瘤细胞凋亡。但由于临床疗效不佳，出现了严重的致命性肝损伤等副作用，该药物于 2010 年主动撤市。在撤市并调整给药方案后，Mylotarg 在 2017 年重新获得 FDA 批准，用于一线治疗急性髓细胞性白血病。

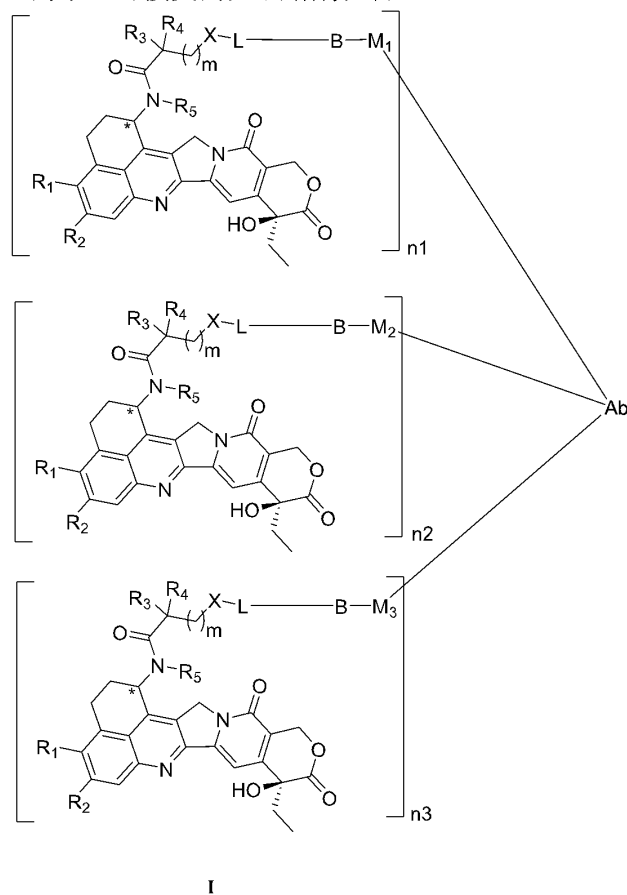
在靶向 CD33 的治疗药剂中，人源化 IgG1 单克隆抗体林妥珠单抗（Lintuzumab）在临床试验中，与阿糖胞苷的联合使用并未表现出比单独的阿糖胞苷好，因此在 2010 年终止了 Lintuzumab 的研发。Seattle Genetics 制药公司研发的一种靶向 CD33 的 ADC 临床候选药物 SGN-CD33A，在三期试验中出现了致命的感染等副作用，观察到较高的患者死亡率，因此在 2017 年宣布终止该项试验。由抗 CD33 IgG1 单抗与 DM-4 偶联而成的 ADC 药物 AVE9633，由于临床活性效果不佳，已于 2009 年终止了 AVE9633 的临床研究。也有研究将从长春花中提取到的生物碱长春新碱，通过碳化二亚胺化的方式，与 CD33 抗体多肽偶联，用于促进长春新碱的肿瘤靶向性，提升药物疗效。CD33 是一种通过研究验证的 AML 靶点，有足够的平均抗原密度，除 ADC 外，也是其他新型疗法的抗原选择。目前针对 CD33 的免疫疗法，包括单抗，双抗，三抗，ADC 均有企业布局，正处于临床评估或处于临床前开发阶段。

抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)是一类由靶向特异性抗原的单克隆抗体(mAb)以及具有强效细胞毒性的小分子药物(payload)通过生物活性的连接子(linker)偶联而成的新型生物药。ADC 药物通过抗体特异性识别，引导小分子药物到达癌细胞靶点，内吞进入癌细胞并释放出细胞毒性药物，从而特异性杀死癌细胞。ADC 从提出至今一直在不断地创新优化，在肿瘤治疗方面取得了成功。临床研究证明，ADC 药物药效高，并且能够有效降低小分子细胞毒性药物对健康组织的毒害，是目前抗肿瘤药物研发的热点，也成为了癌症治疗领域的重要手段之一。CD33 作为特异性免疫治疗 AML 的优良靶点，已有 ADC 药物被获批准上市，CD33 更是一个具有潜力的 ADC 药物开发靶点。

发明内容

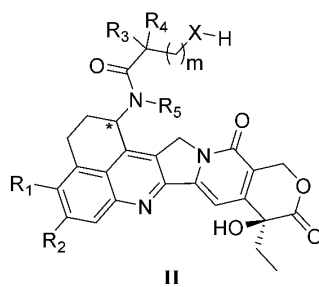
本公开提供了一种抗人 CD33 抗体-药物偶联物,是一款人源化抗人 CD33 抗体与具有细胞杀伤效果药物偶联得到的抗体-药物偶联物,与现有的同类型药物相比,具有良好的分子稳定性和良好的临床前药效,预期有优秀的临床治疗效果。

为此,本公开的第一方面,提供了一种如通式 I 所示的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物,

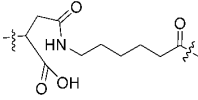


其中:

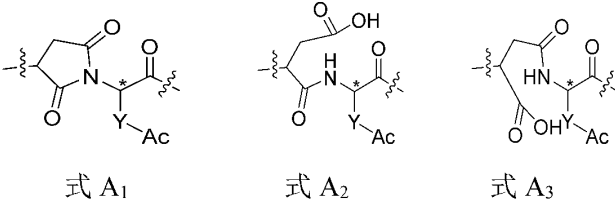
所述抗体-药物偶联物中的药物为如下式 II 所示的喜树碱类抗肿瘤药物或其立体异构体,



Ab 选自抗 CD33 抗体或其抗原结合片段；

M₁、M₂、M₃ 各自独立地选自  , 且 M₁、M₂、M₃ 互不相同；或者，M₁、M₂、M₃ 各自独立地选自式 A₁、式 A₂、式 A₃ 所示结构，且 M₁、M₂、M₃ 互不相同；

5



其中 Y 为支架，选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基；优选 Y 为 C1-C6 烷基；Ac 为亲水结构单元；左侧波浪线所示位置与 Ab 相连，右侧波浪线所示位置与 B 相连或 L 相连；

- 10 B 存在或不存在，当 B 存在时选自修饰单元；
 L 选自连接单元，优选为含肽连接单元；
 X 选自-NH-、-O-或-S-，优选为-O-；

 R₁ 和 R₂ 相同或者不同，且各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

 R₃ 和 R₄ 相同或者不同，各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、C6-C10 芳基 C1-C6 烷基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；优选 R₃、R₄ 各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

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

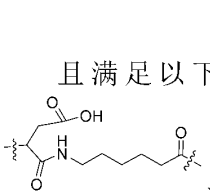
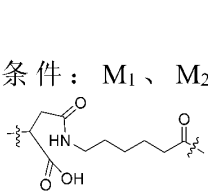
25 R₅ 选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6

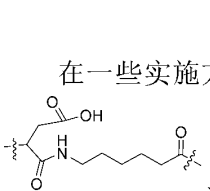
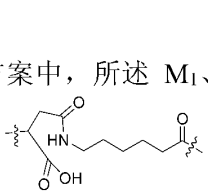
烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基，R₅ 优选选自氢、C1-C6 烷基；

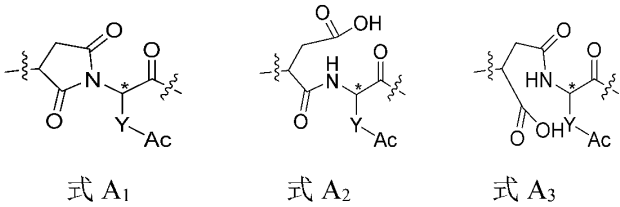
m 选自 0-5 的整数；

n₁、n₂、n₃ 各自独立地选自 0-10 的任意整数或任意小数，n₁、n₂、n₃ 不同时为 0，且 $1 \leq n_1 + n_2 + n_3 \leq 10$ （例如 n₁+n₂+n₃ 为 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 或 10；或者例如 n₁+n₂+n₃ 为 8.01、8.32、8.56、8.63、8.66 或 9.40；或者例如 n₁+n₂+n₃ 选自 7-7.5、7.5-8、8-8.5、8.5-9、9-9.5 或 9.5-10 的任意整数或任意小数；优选例如 n₁+n₂+n₃ 选自 7-10 的任意整数或任意小数即 $7 \leq n_1 + n_2 + n_3 \leq 10$ ，更优选例如 n₁+n₂+n₃ 选自 8-10 的任意整数或任意小数即 $8 \leq n_1 + n_2 + n_3 \leq 10$ ）；

*位置所示手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型；

且满足以下条件：M₁、M₂、M₃ 各自独立地选自 、，且 M₁、M₂、M₃ 互不相同，B 存在，选自 15 修饰单元。

在一些实施方案中，所述 M₁、M₂、M₃ 各自独立地选自 、，且 M₁、M₂、M₃ 互不相同；或者，M₁、M₂、M₃ 各自独立地选自式 A₁、式 A₂、式 A₃ 所示结构，且 M₁、M₂、M₃ 互不相同；
优选地，M₁、M₂、M₃ 各自独立地选自式 A₁、式 A₂、式 A₃ 所示结构，且 M₁、M₂、M₃ 互不相同；



其中 Y 为支架，选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基；优选

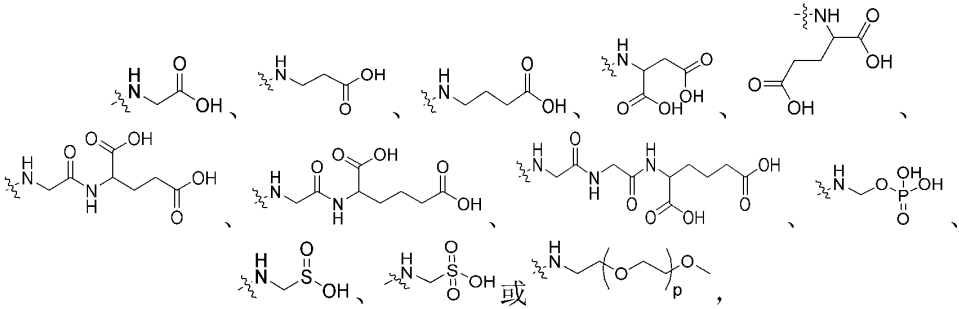
Y 为 C1-C6 烷基，更优选为 C1-C3 烷基，最优选为亚甲基；

*所示位置具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性；

左侧波浪线所示位置与 Ab 相连，右侧波浪线所示位置与 B 相连或 L 相连；

亲水结构单元 Ac 非限制性地选自天然或非天然氨基酸、1-20 聚乙二醇、磷

5 酸基、羧酸基、磺酸基、亚磺酸基或以下结构，



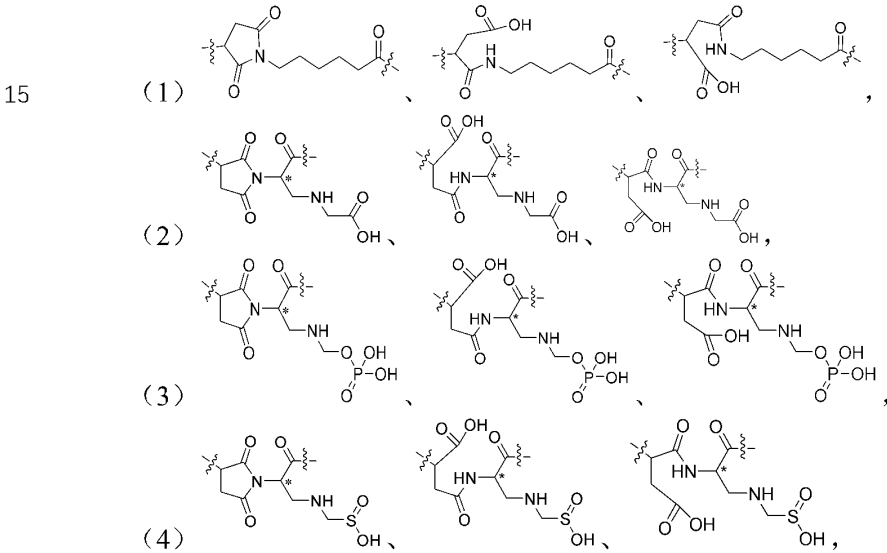
其中，p 选自 0-10 的整数；波浪线所示位置与支架 Y 相连；

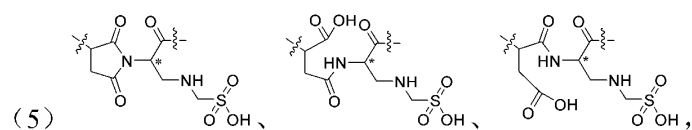
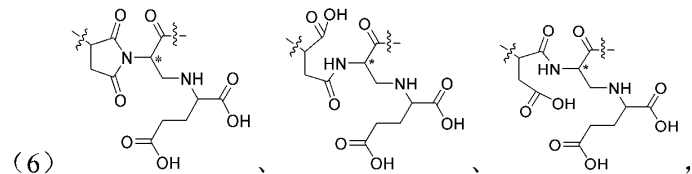
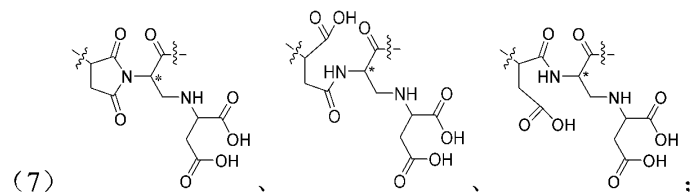
10 优选地，亲水结构单元 Ac 选自 ，波浪线所示位置与支架 Y 相连；

更优选地，亲水结构单元 Ac 为 ，波浪线所示位置与支架 Y 相连。

在一些实施方案中，M₁、M₂、M₃ 选自以下 (1) - (7) 中的任意一个组合，

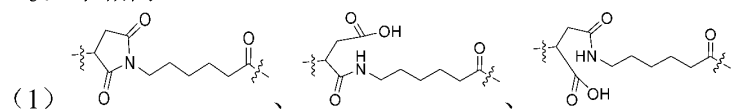
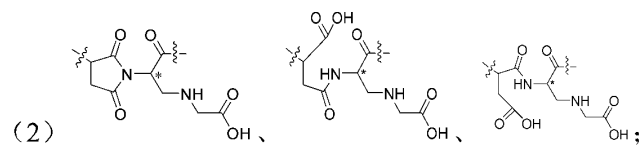
且 M₁、M₂、M₃ 互不相同，



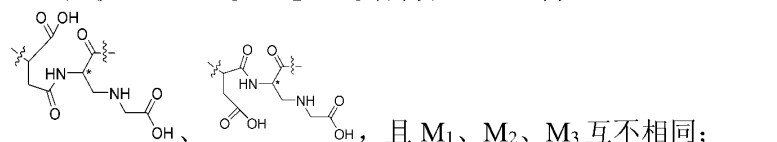


优选地， M_1 、 M_2 、 M_3 选自以下 (1) - (2) 中的任意一个组合，且 M_1 、

5 M_2 、 M_3 互不相同，



更优选地， M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自



10 其中：

*位置具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种构型；

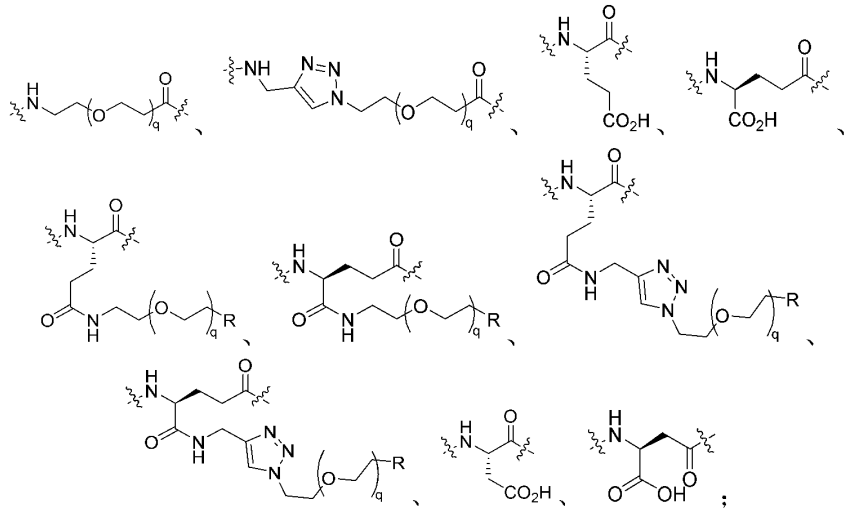
左侧波浪线所示位置与 Ab 相连；右侧波浪线所示位置与修饰单元 B 或连接单元 L 相连。

在一些实施方案中，修饰单元 B 存在或不存在，当所述修饰单元 B 存在时，

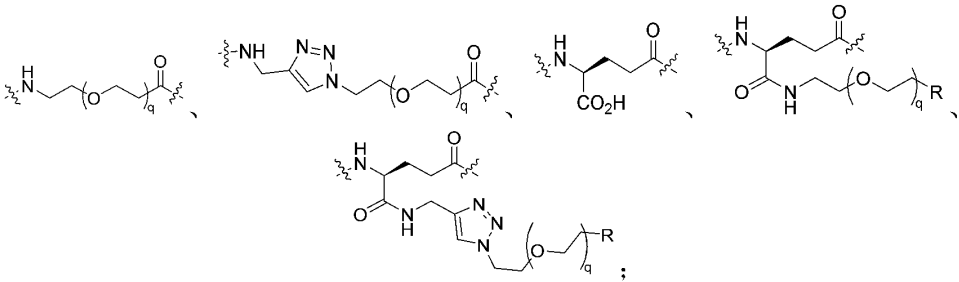
15 非限制性地选自可增强亲水性的结构或其立体异构体。

在一些实施方案中，修饰单元 B 存在或不存在，当所述修饰单元 B 存在时，所述修饰单元 B 非限制性地选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异

构体，



5 优选地，修饰单元 B 存在或不存在，当所述修饰单元 B 存在时，所述修饰单元 B 非限制性地选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体，



其中：

10 R 非限制性地选自羟基、氨基、聚乙二醇、羧酸基、磺酸基、亚磺酸基、磷酸基、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、天然或非天然氨基酸残基、糖或其衍生物中的一种或几种的组合；

优选地，R 选自 C1-C6 烷氧基、羧酸基、氨基；

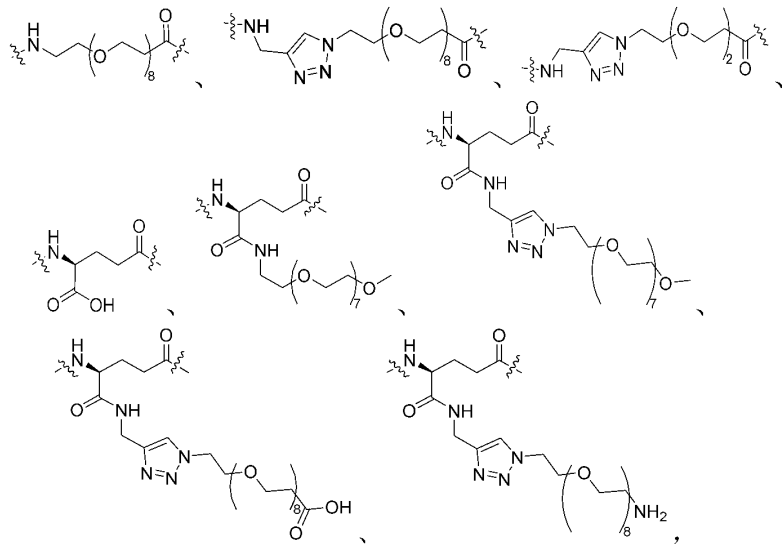
更优选地，R 选自甲氧基、羧酸基、氨基；

15 左侧波浪线所示位置与 M₁、M₂、M₃ 相连；

右侧波浪线所示位置与连接单元 L 相连；

q 选自 1-10 的整数（优选选自 2-8 的整数），优选选自 2、7、8；

最优选地，所述修饰单元 B 选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体：



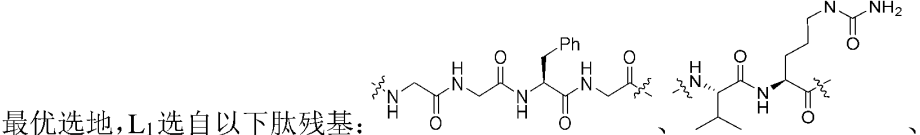
左侧波浪线所示位置与 M₁、M₂、M₃ 相连，右侧波浪线所示位置与连接单元 L 相连。

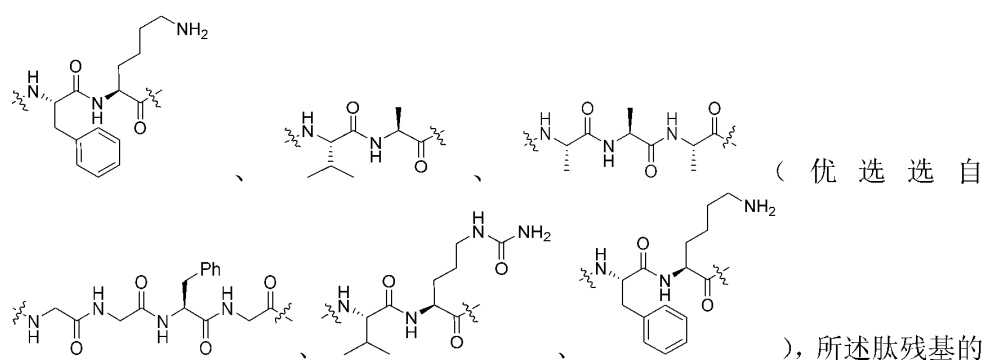
在一些实施方案中，所述连接单元 L 为 L₁-L₂，

L₁ 为由 2-10 个氨基酸残基组成的肽残基，所述肽残基的氨基端与修饰单元 B 相连或与 M₁、M₂、M₃ 相连，羧基端与 L₂ 相连；

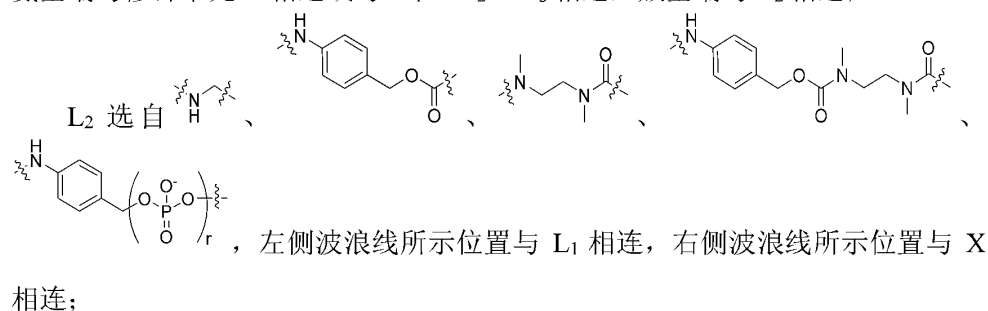
优选地，L₁ 为由 2-4 个氨基酸残基组成的肽残基，所述肽残基的氨基端与修饰单元 B 相连或与 M₁、M₂、M₃ 相连，羧基端与 L₂ 相连；优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸；更优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸；最优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸；

更优选地，L₁ 选自以下肽残基：甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-丙氨酸、丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸（优选选自甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸），所述肽残基的氨基端与修饰单元 B 相连或与 M₁、M₂、M₃ 相连，羧基端与 L₂ 相连；





氨基端与修饰单元 B 相连或与 M_1 、 M_2 、 M_3 相连, 羧基端与 L_2 相连;



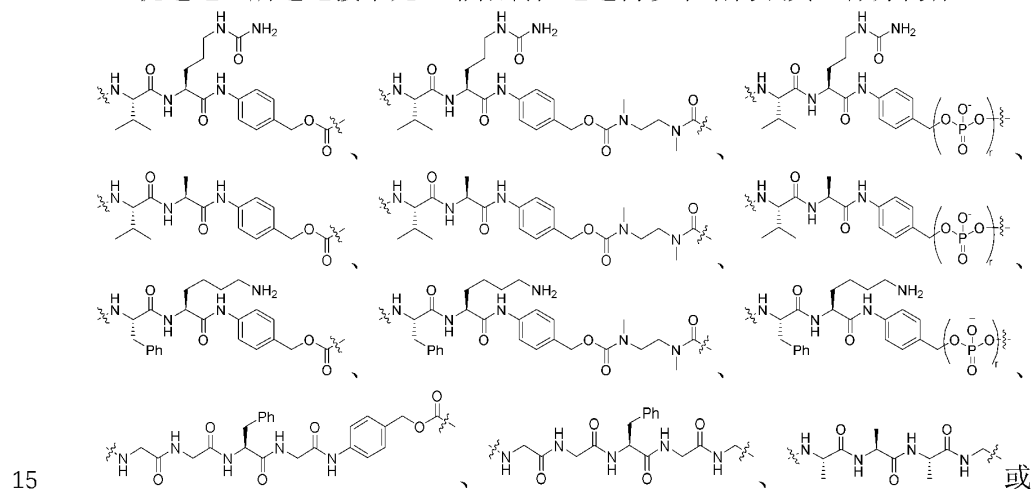
优选地, L_2 选自

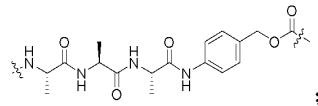
左侧波浪线所示位置与 L_1 相连, 右侧波浪线所示位置与 X 相连;

更优选地, L_2 选自

10 L_1 相连, 右侧波浪线所示位置与 X 相连;

优选地, 所述连接单元 L 非限制性地选自以下结构或其立体异构体,

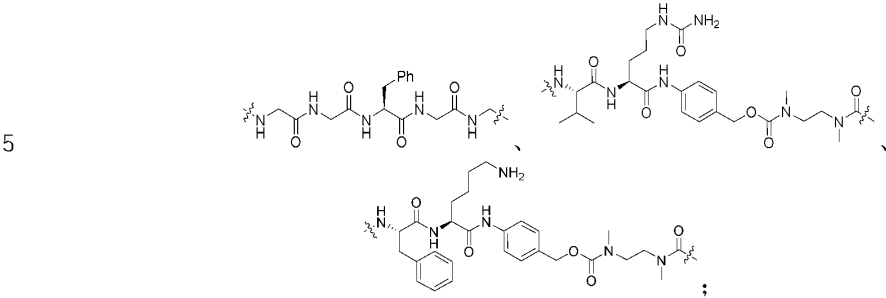




其中：

r 选自 1-10 的整数；

更优选地，所述连接单元 L 选自以下结构或其立体异构体：



所述连接单元 L 左侧波浪线所示位置与修饰单元 B 相连或与 M_1 、 M_2 、 M_3 相连；

所述连接单元 L 右侧波浪线所示位置与 X 相连。

10 在一些实施方案中， R_1 和 R_2 相同或者不同，且各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地， R_1 和 R_2 相同或者不同，且各自独立地选自卤素、C1-C6 烷基；

15 更优选地， R_1 选自 C1-C6 烷基， R_2 选自卤素；

最优选地， R_1 为甲基， R_2 为氟；

R_3 和 R_4 相同或者不同，各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、C6-C10 芳基 C1-C6 烷基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地， R_3 、 R_4 相同或者不同，各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

进一步优选地， R_3 、 R_4 相同或者不同，各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C6 环烷基、C3-C6 环烷基 C1-C6 烷基或苯基 C1-C6 烷基；

更优选地, R_3 、 R_4 相同或者不同, 各自独立地选自氢、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基、环丙甲基、苄基;

最优选地, R_3 、 R_4 中, 任意一个选自氢、甲基, 另一个选自氢、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基、环丙甲基、苄基;

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

优选地, R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基;

更优选地, R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成 C3-C6 环烷基;

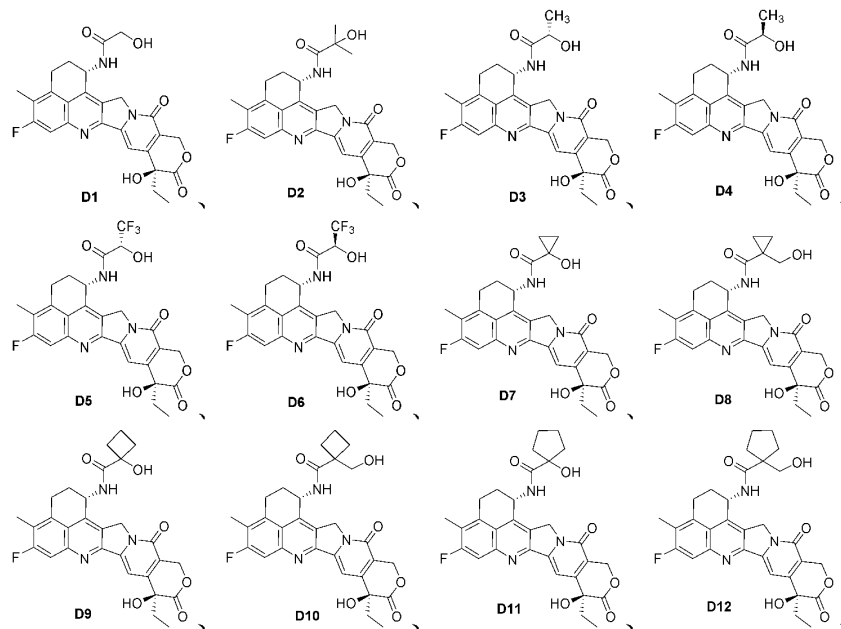
最优选地, R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成环丙基、环丁基或环戊基;

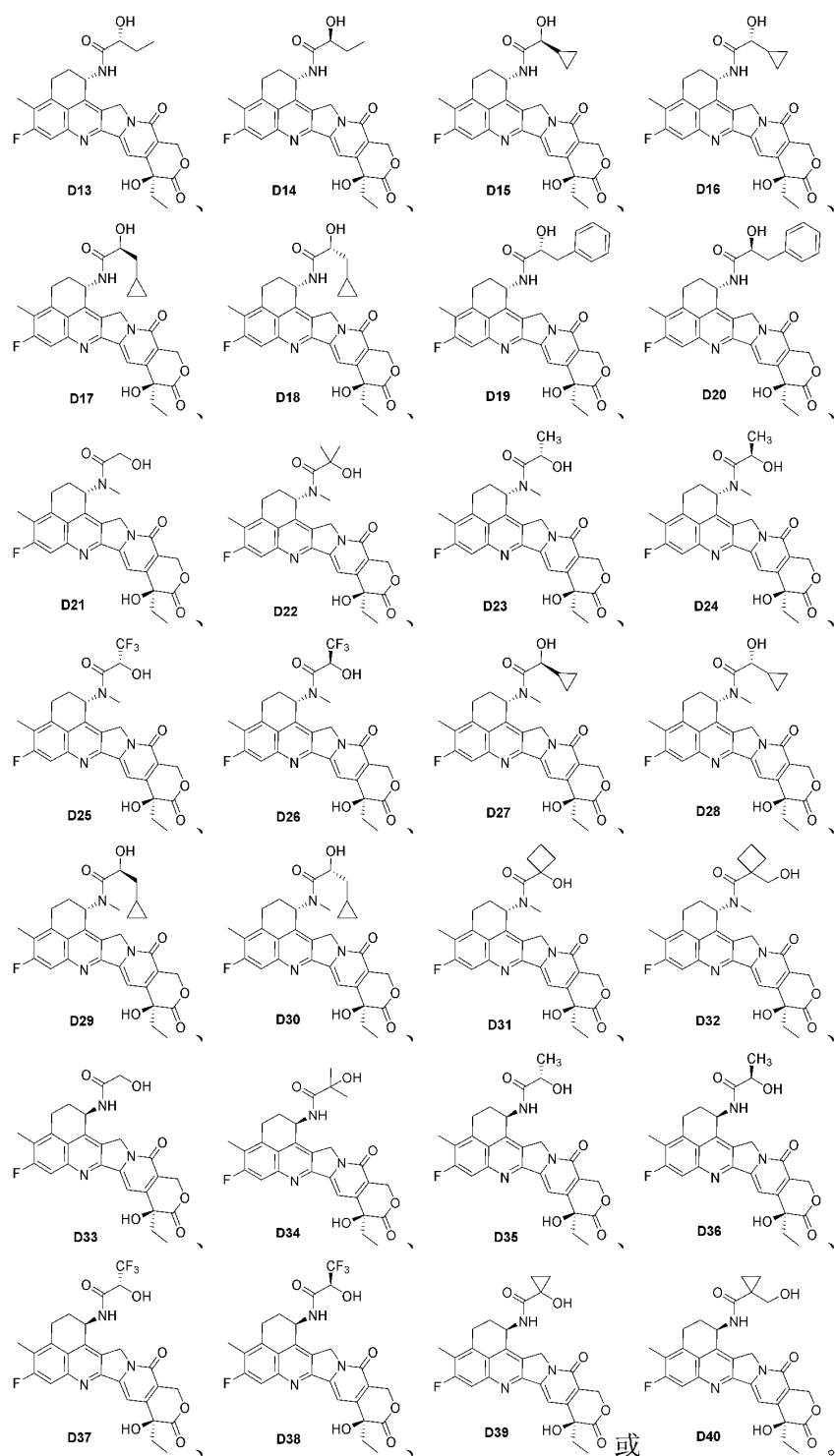
10 R_5 选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基, R_5 优选选自氢、C1-C6 烷基, R_5 更优选选自氢、甲基;

X 选自 -NH-、-O- 或 -S-, 优选为 -O-;

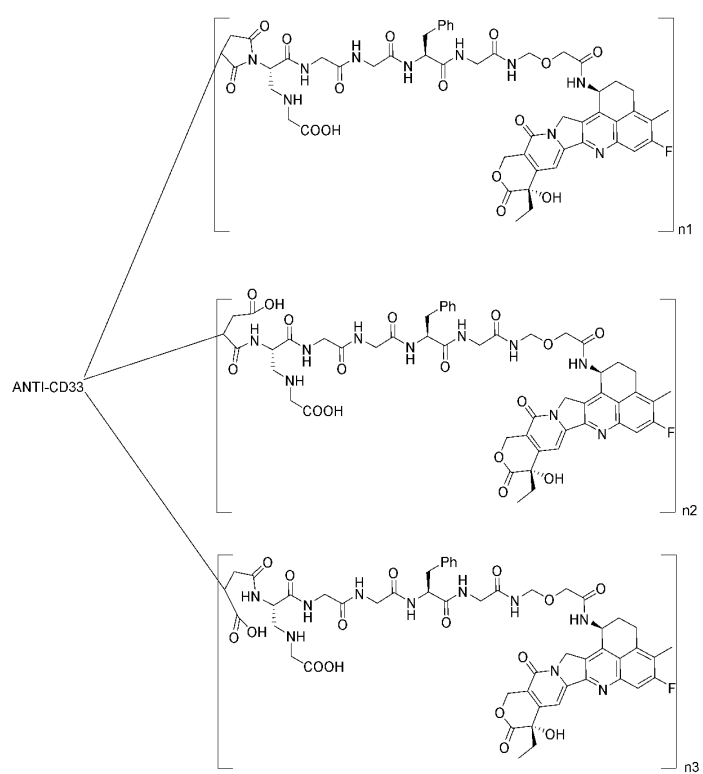
m 选自 0-5 的整数, 优选选自 0、1。

15 在一些实施方案中, 所述喜树碱类抗肿瘤药物非限制性地选自以下化合物或其立体异构体,

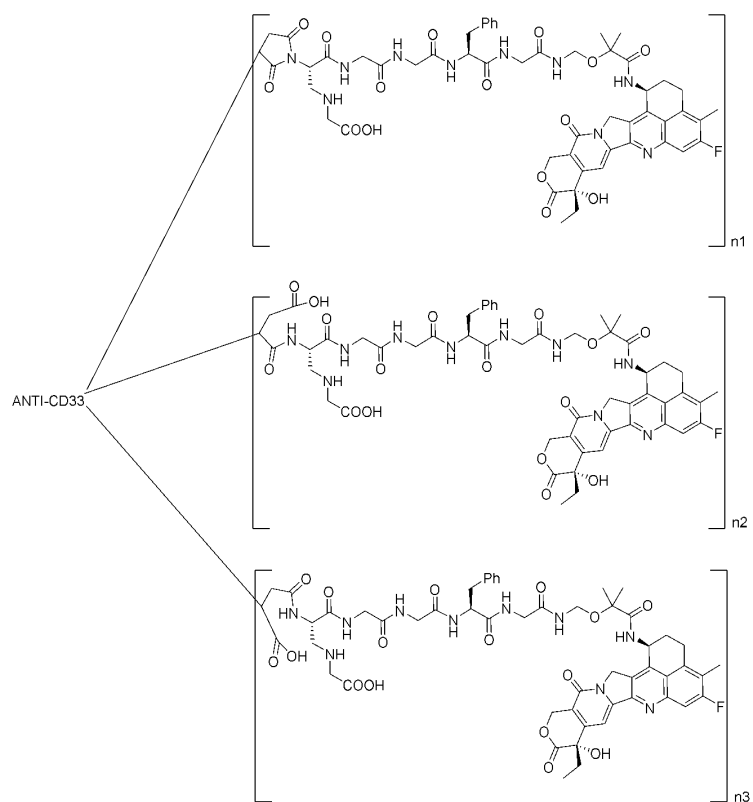
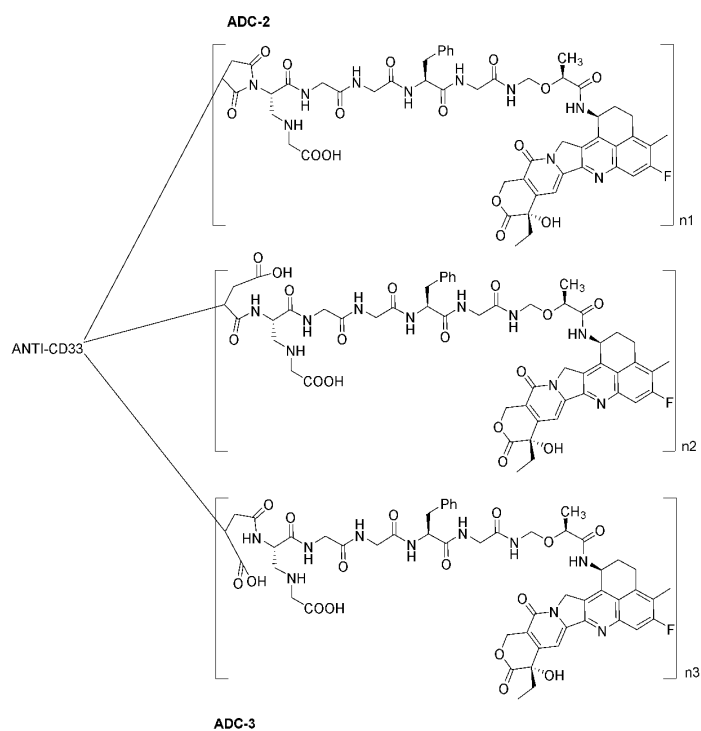


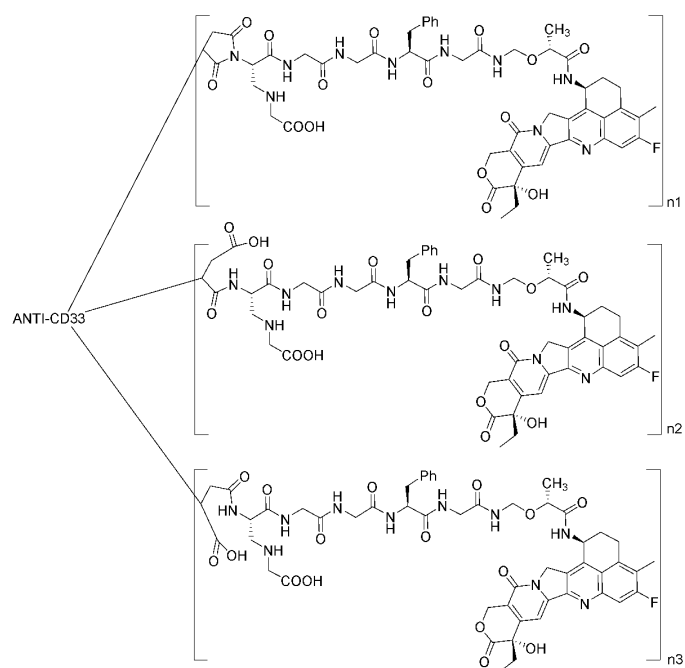
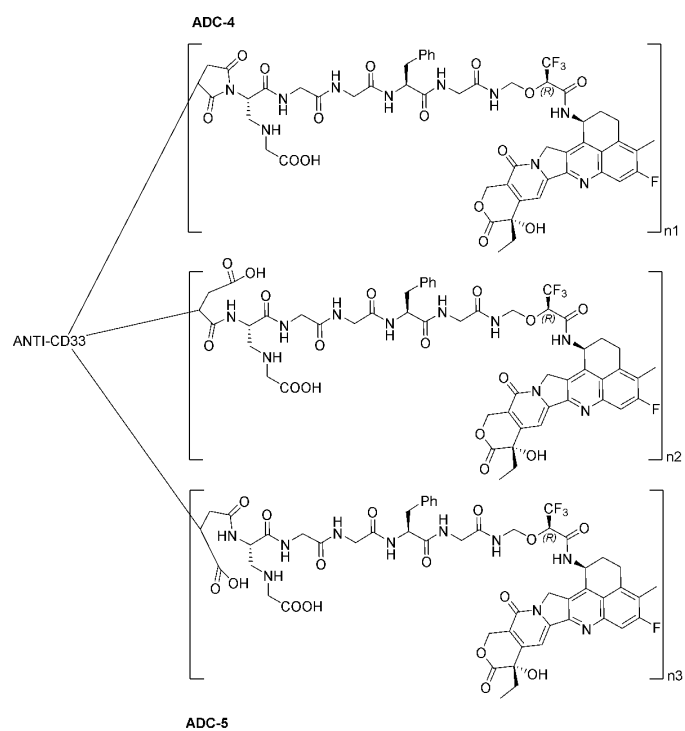


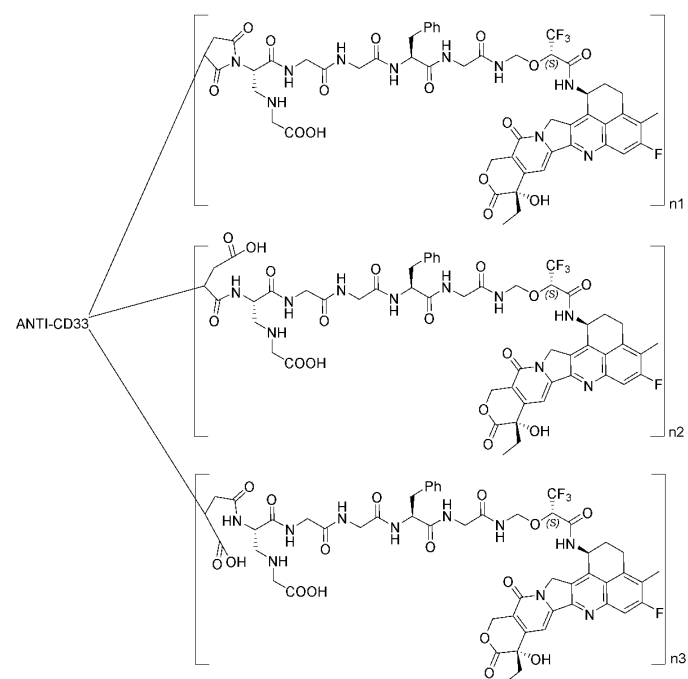
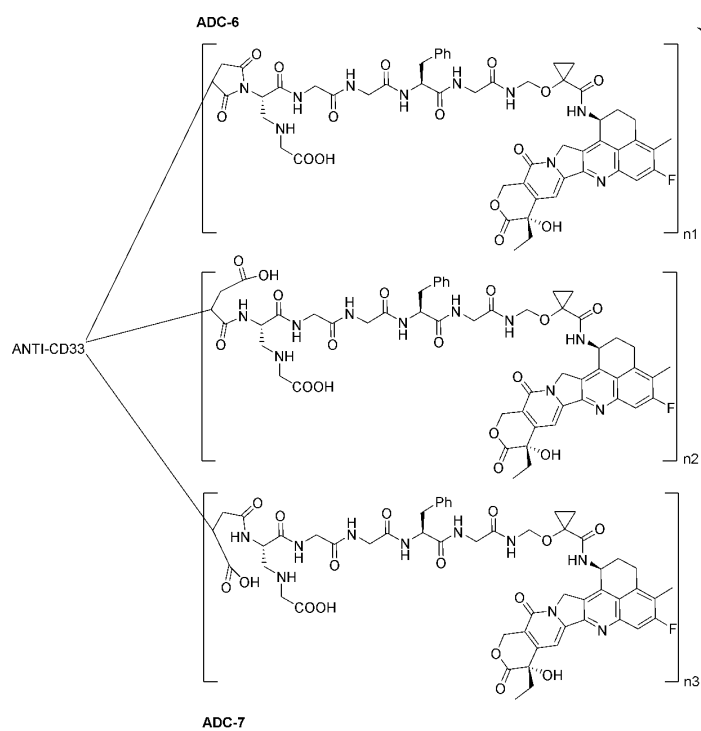
在一些实施方案中，所述的抗体-药物偶联物非限制性地选自以下结构，

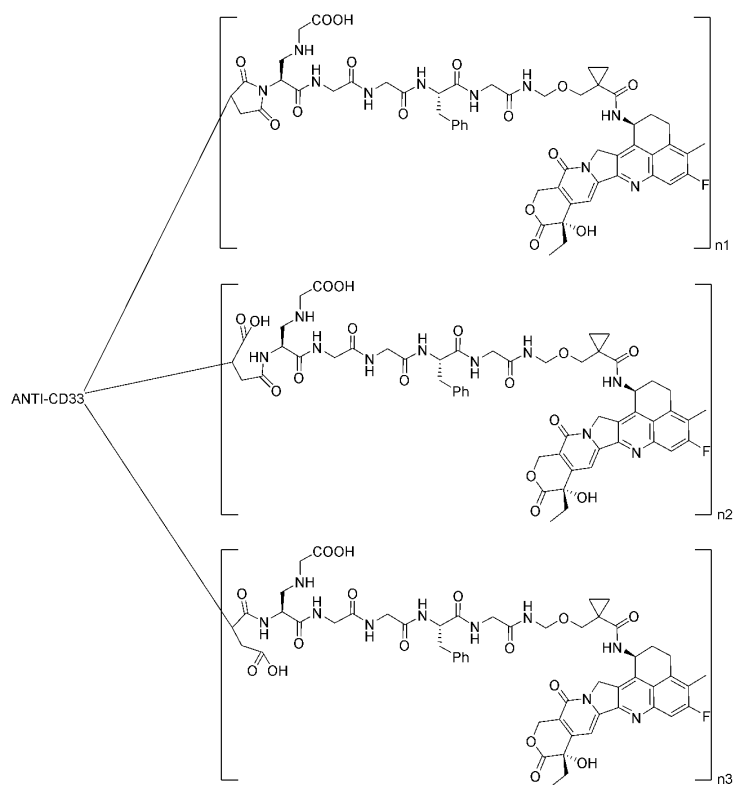


ADC-1

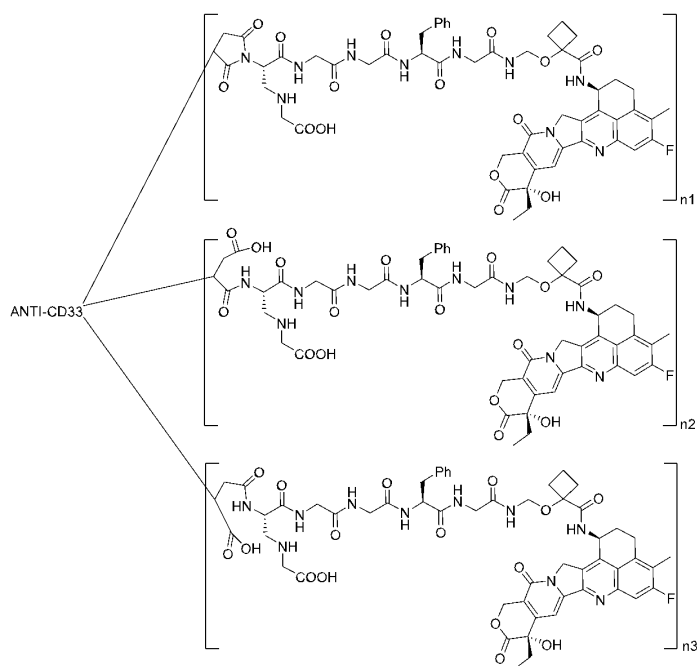




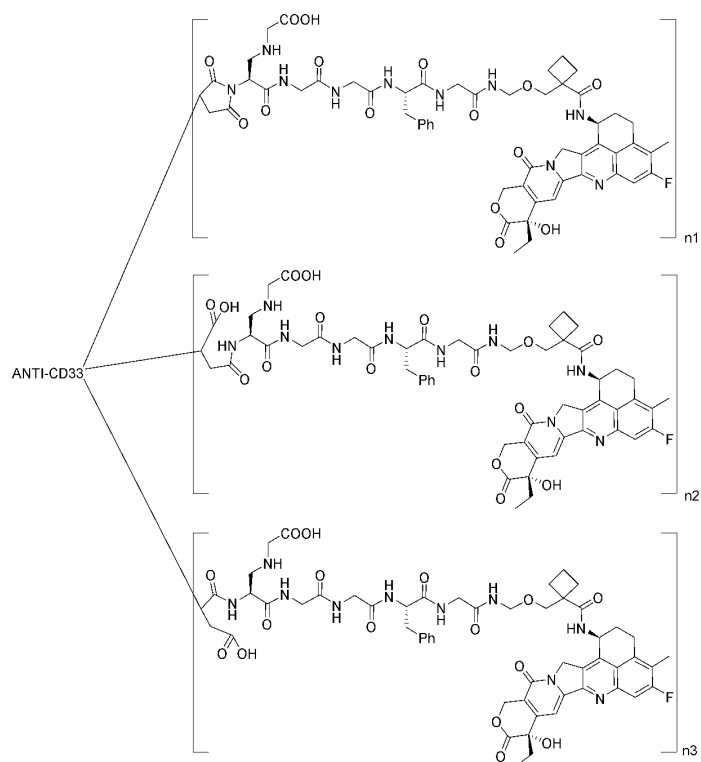




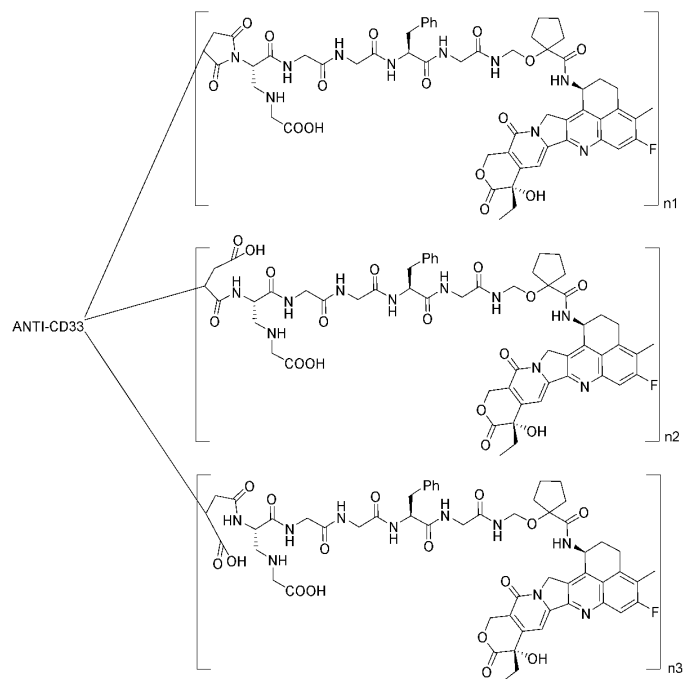
ADC-8



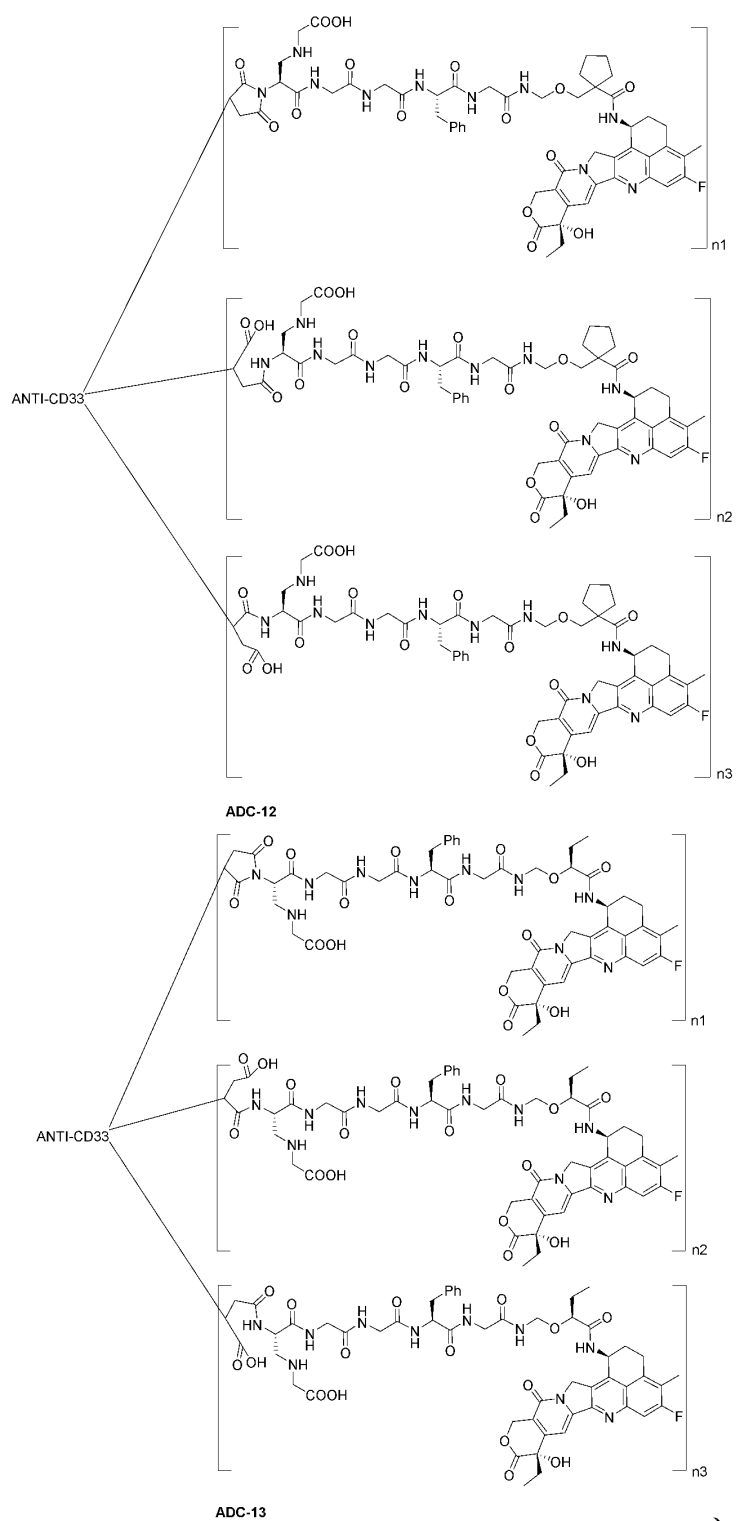
ADC-9

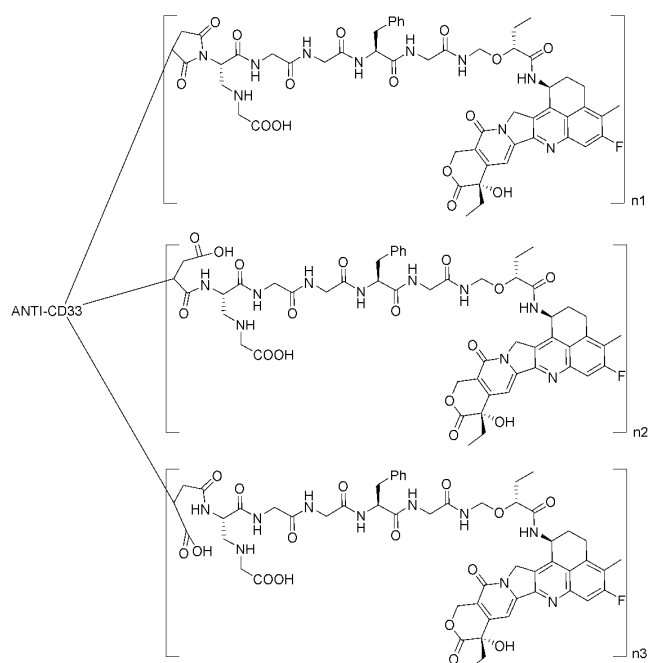


ADC-10

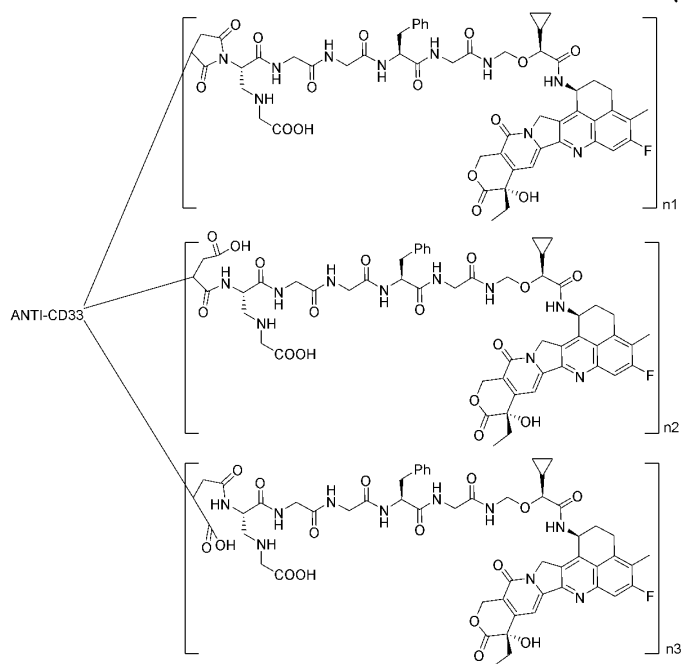


ADC-11

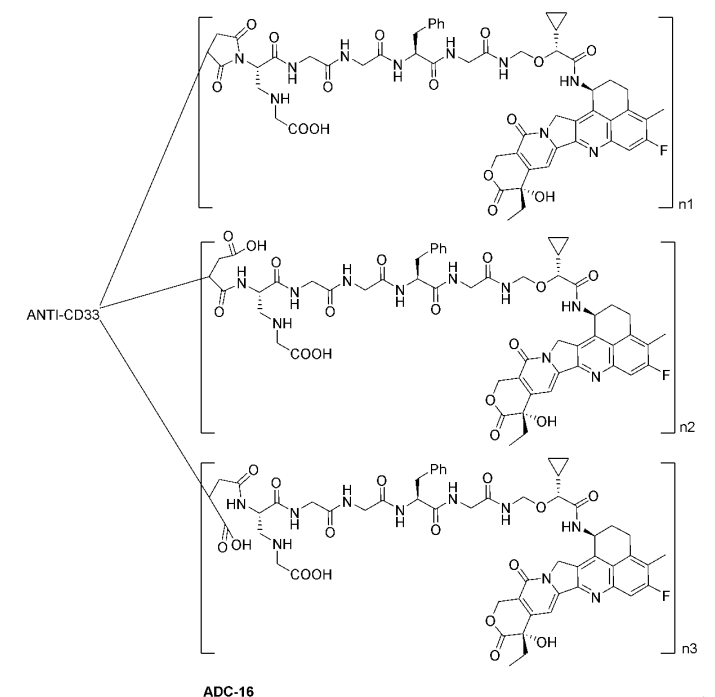
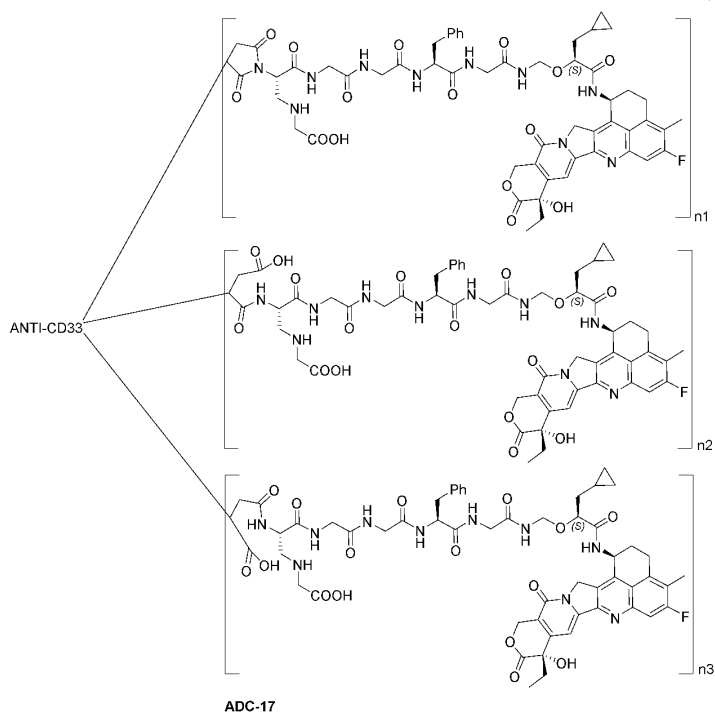


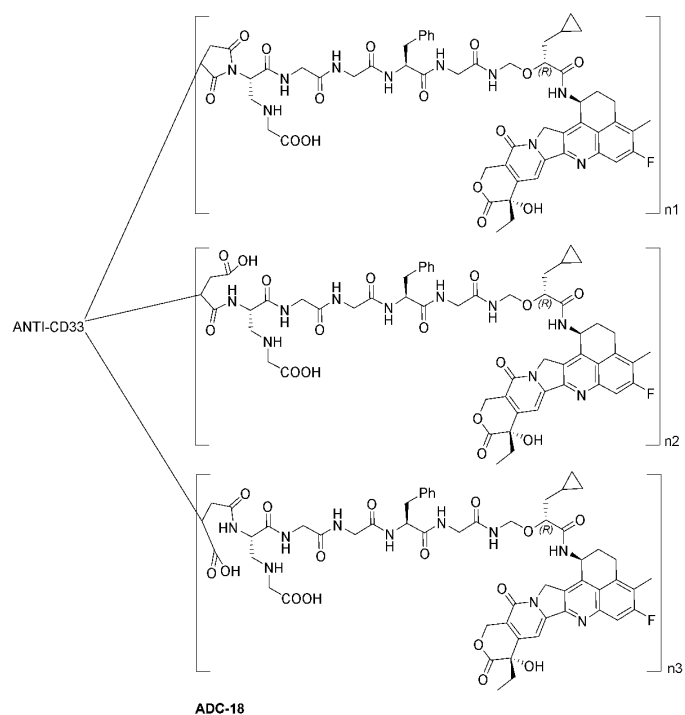
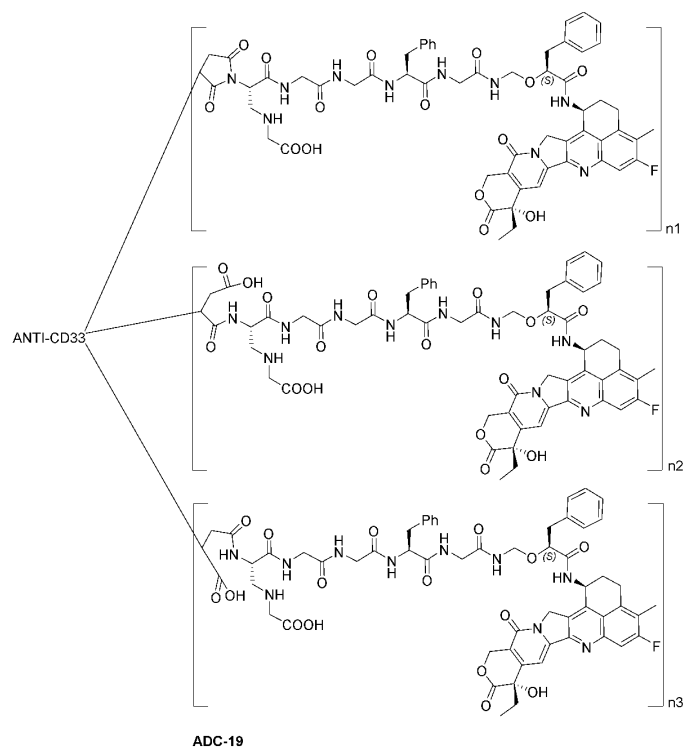


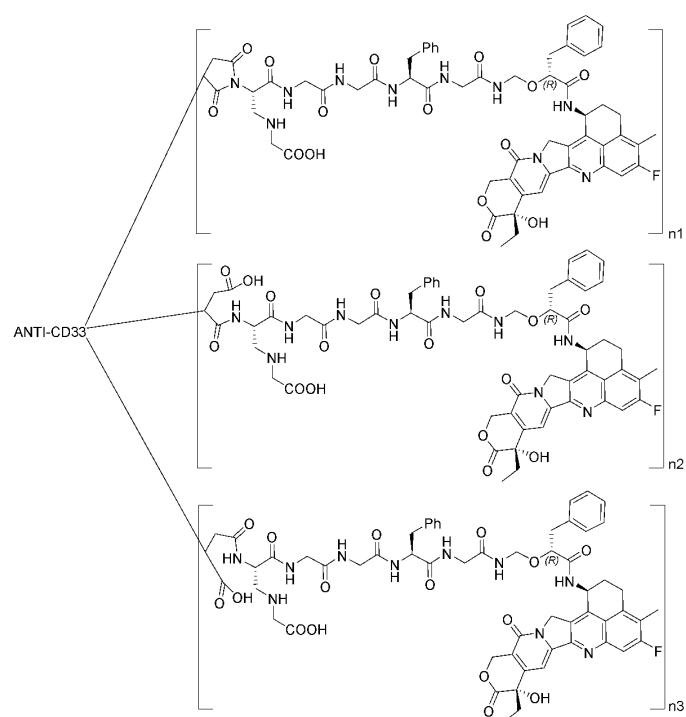
ADC-14



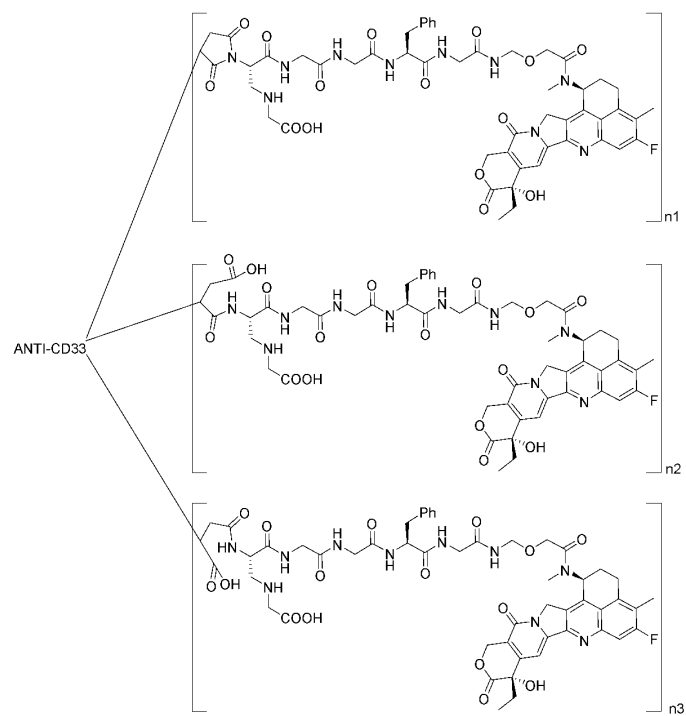
ADC-15



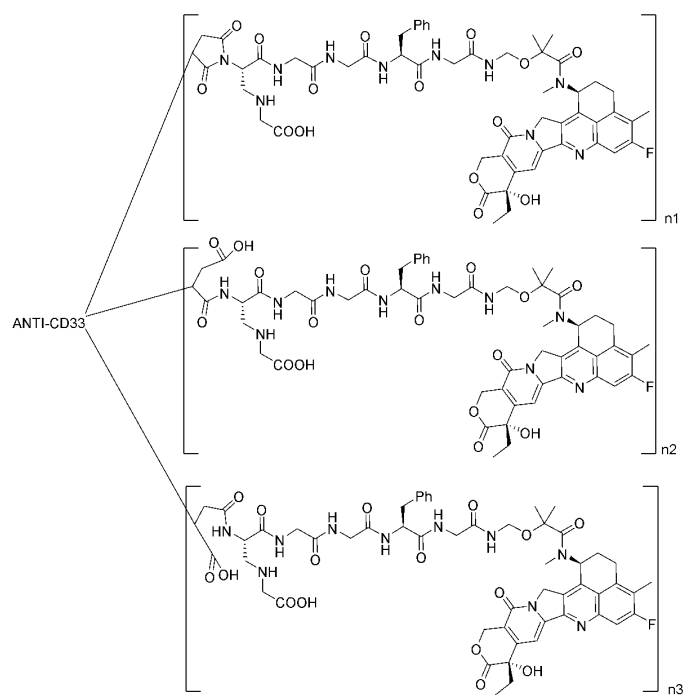




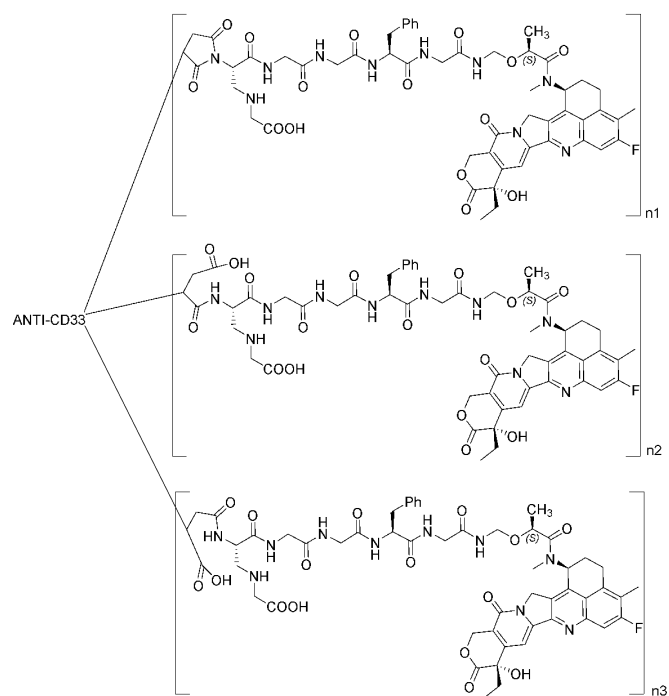
ADC-20



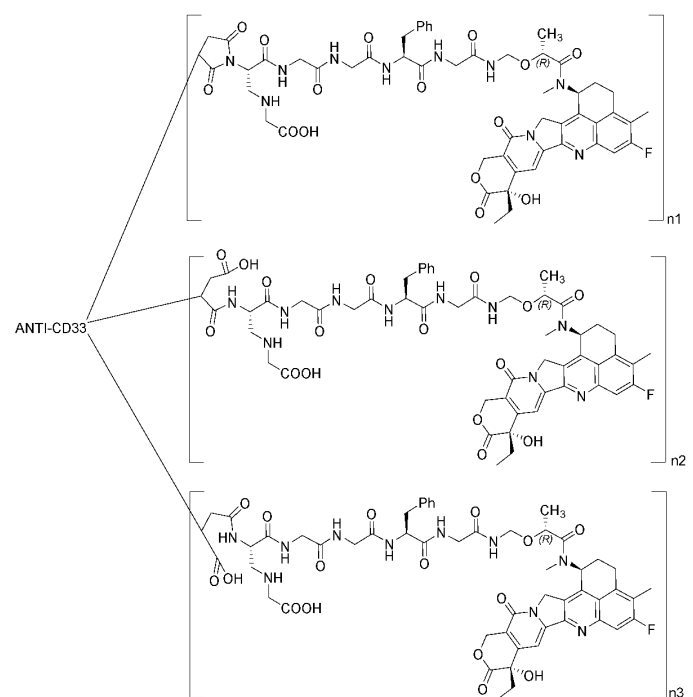
ADC-21



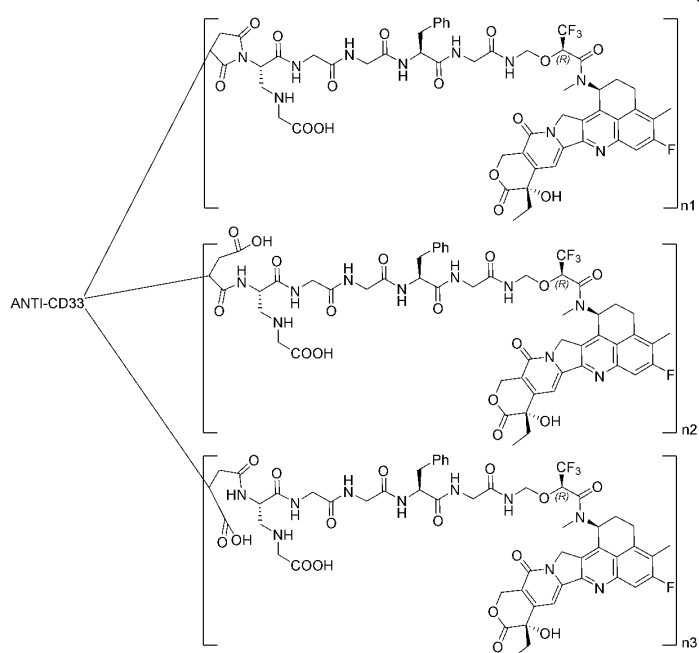
ADC-22



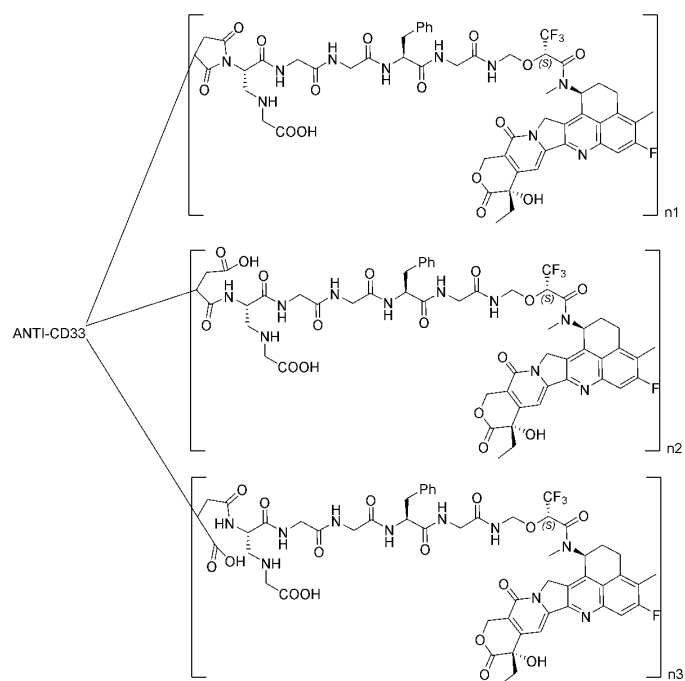
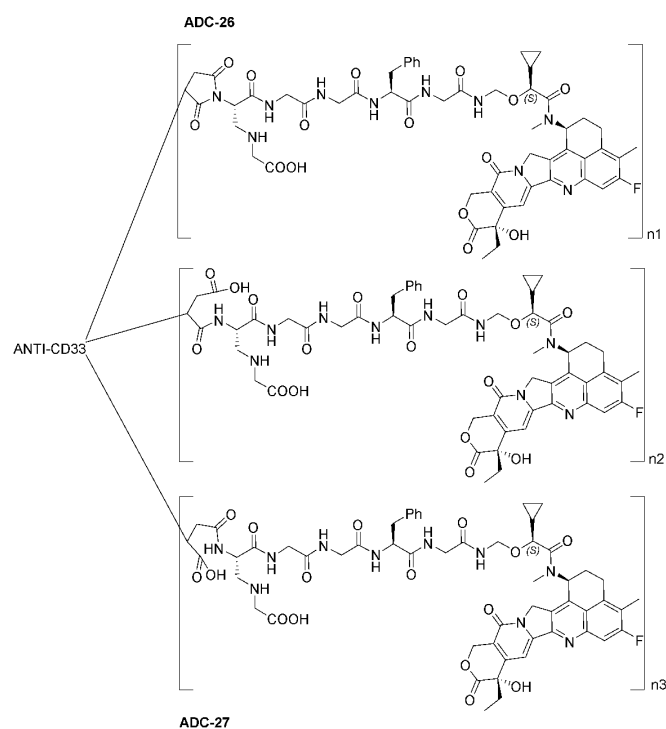
ADC-23

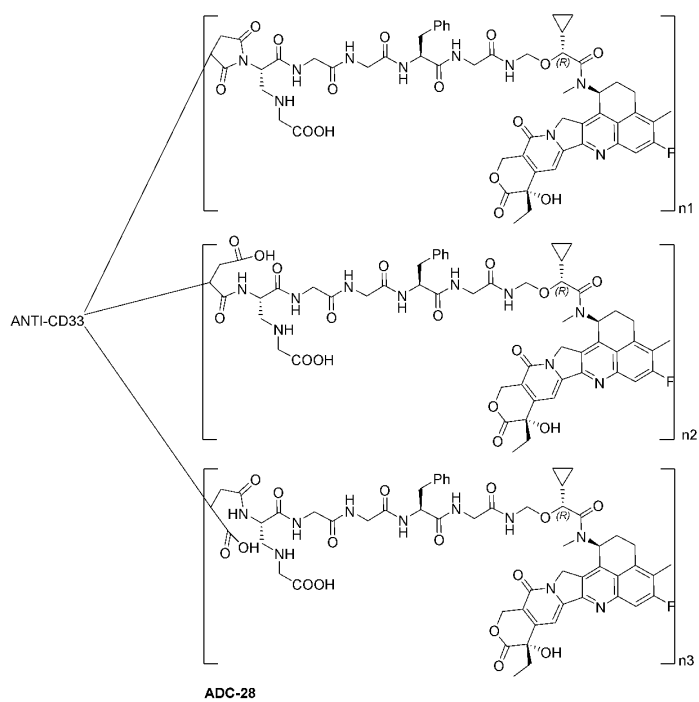
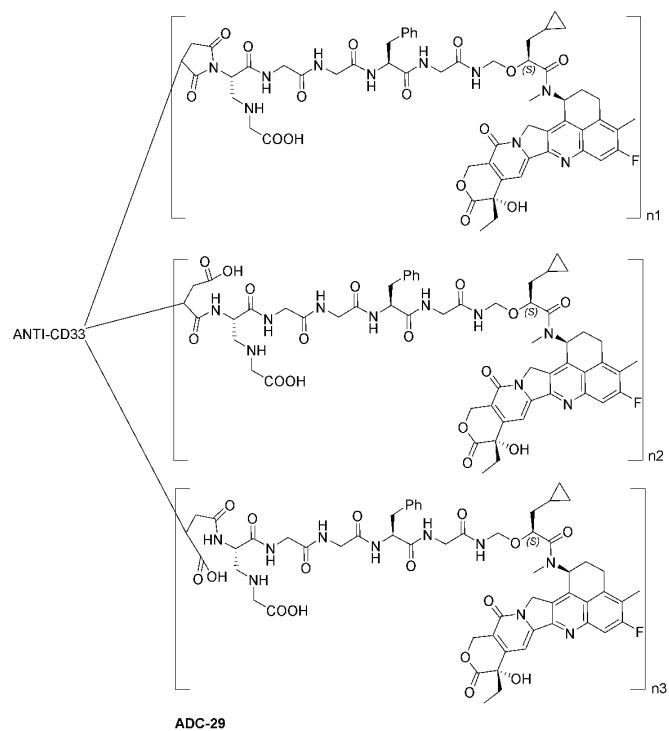


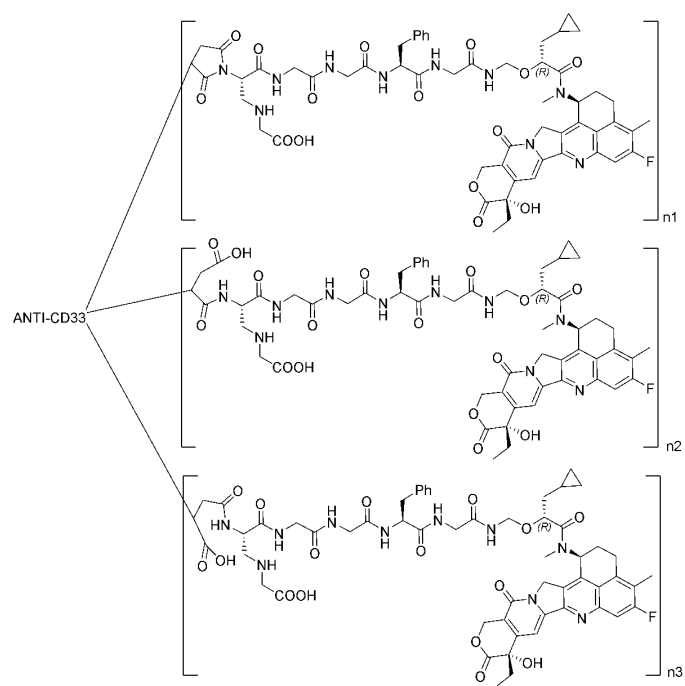
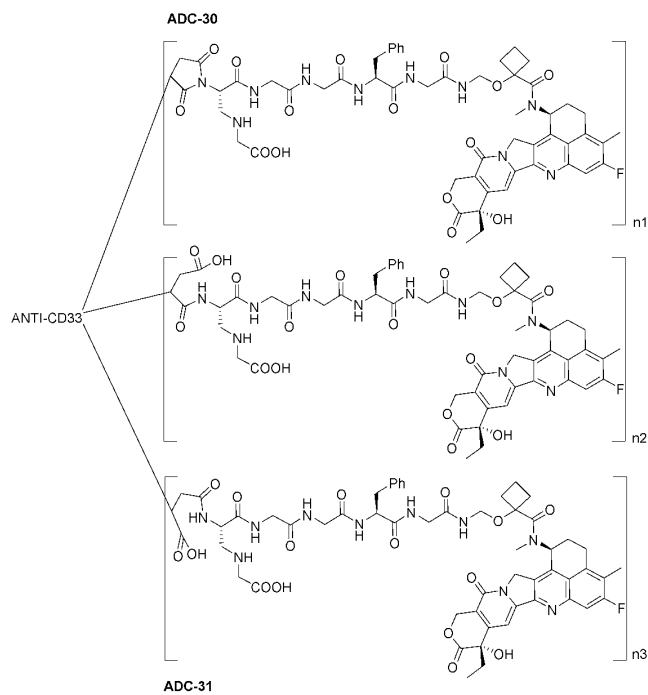
ADC-24

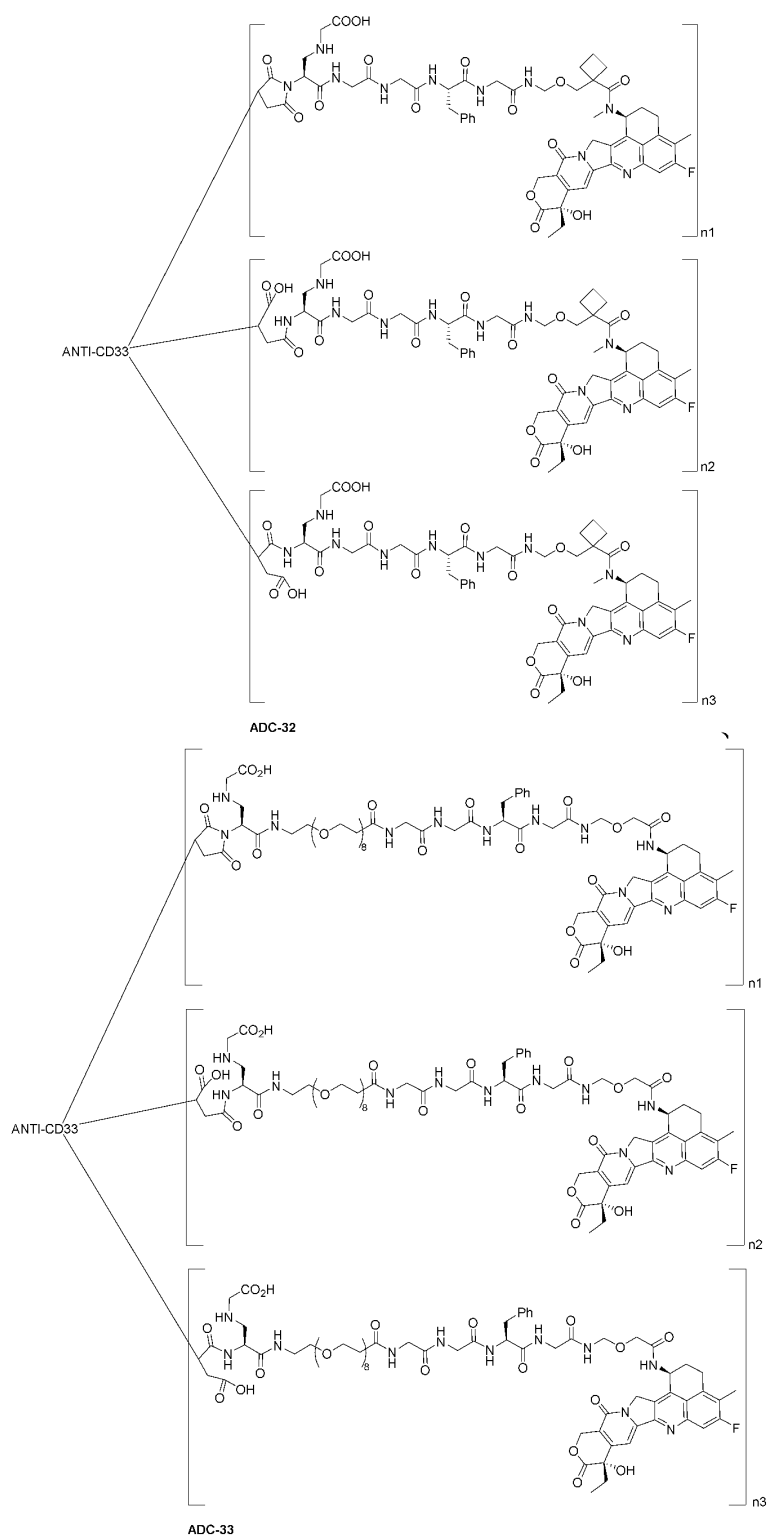


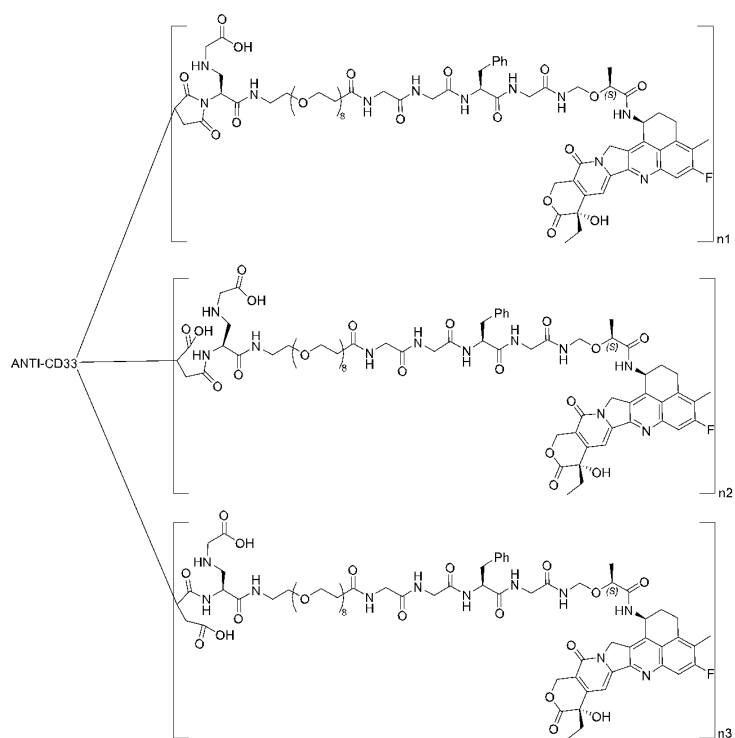
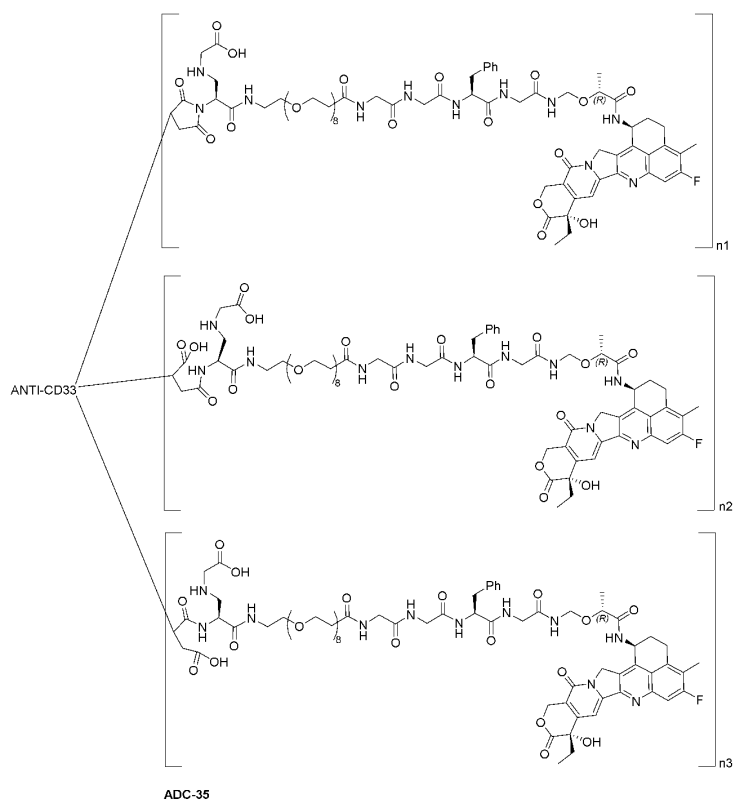
ADC-25

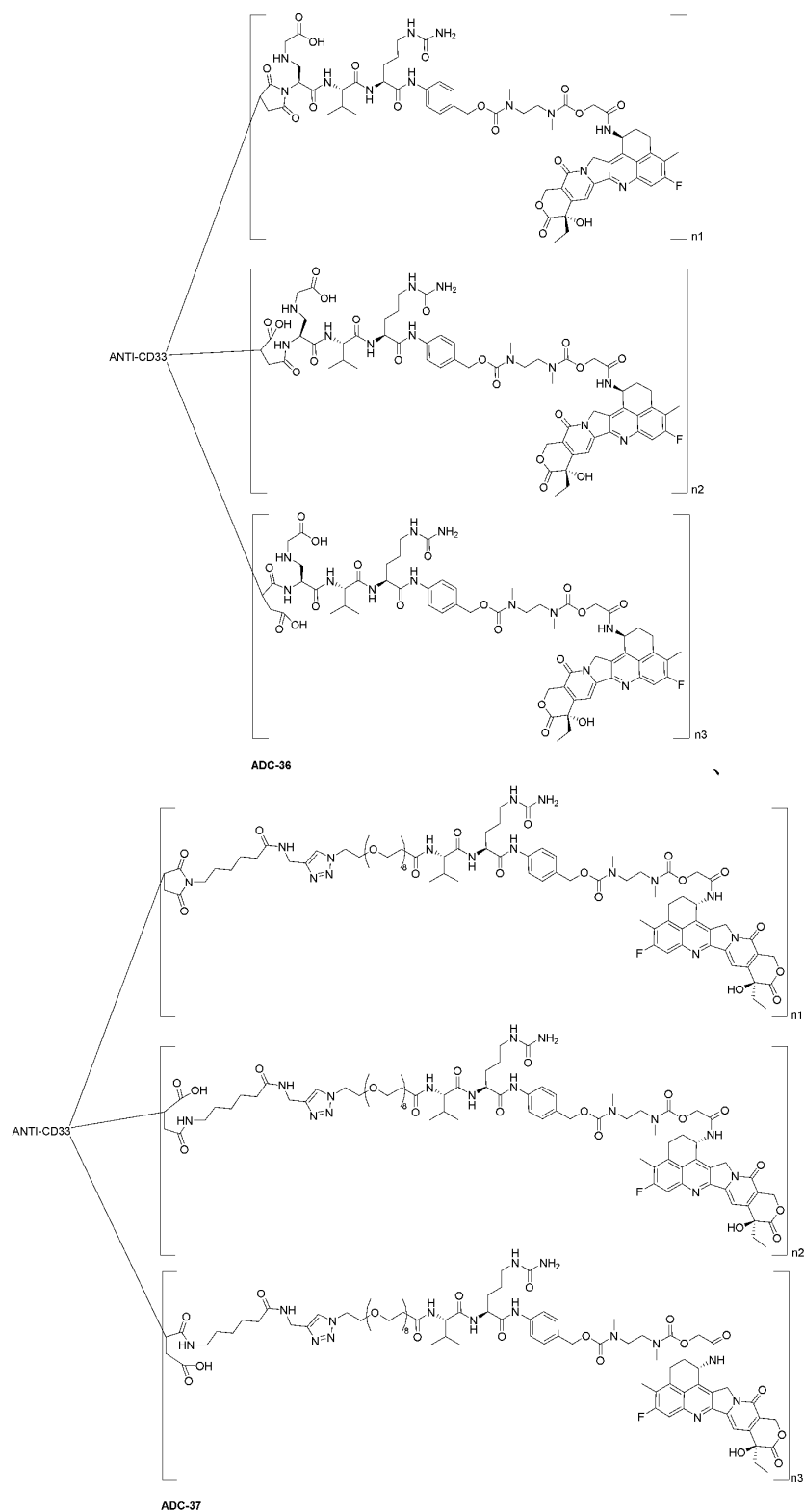


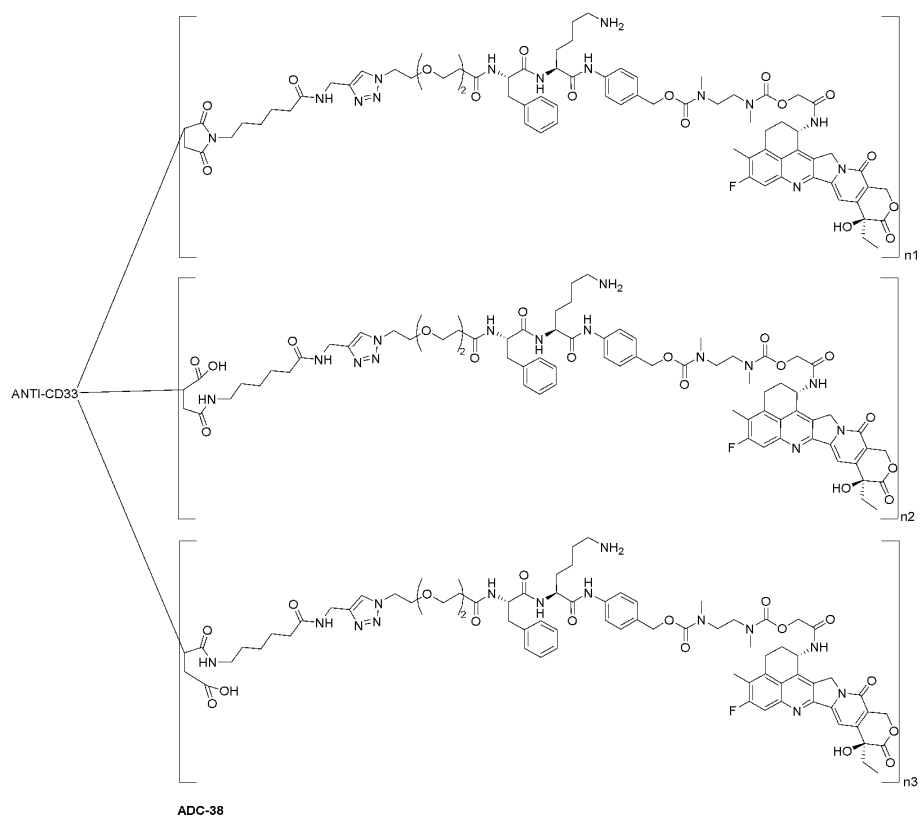
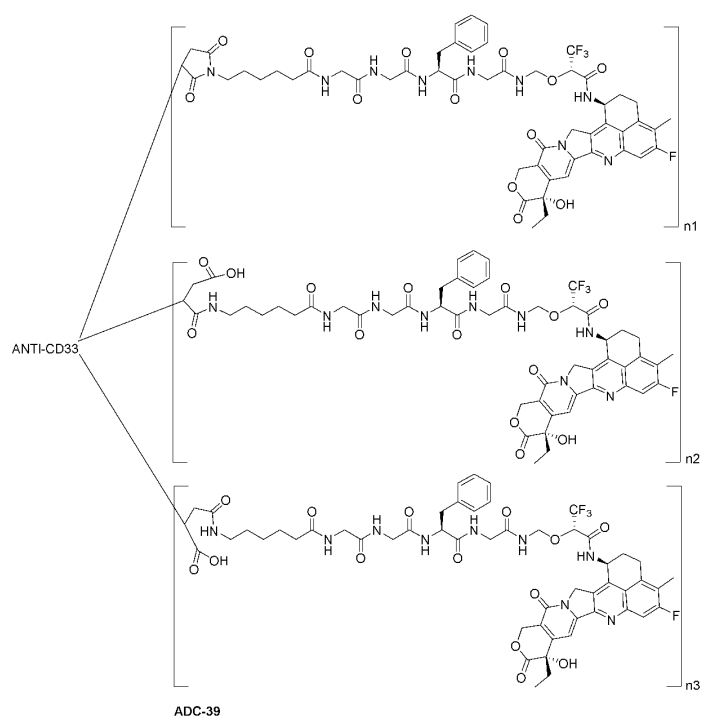


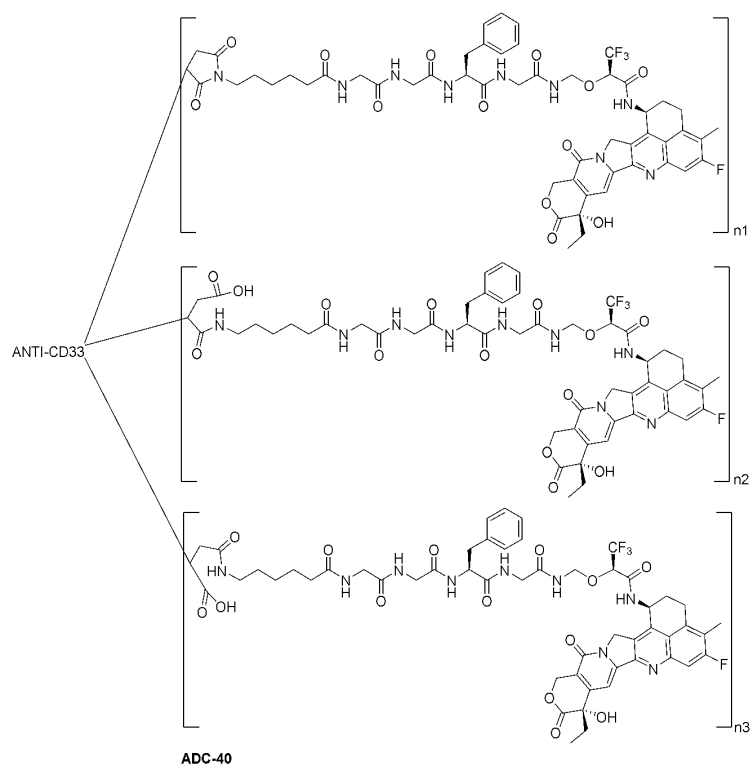
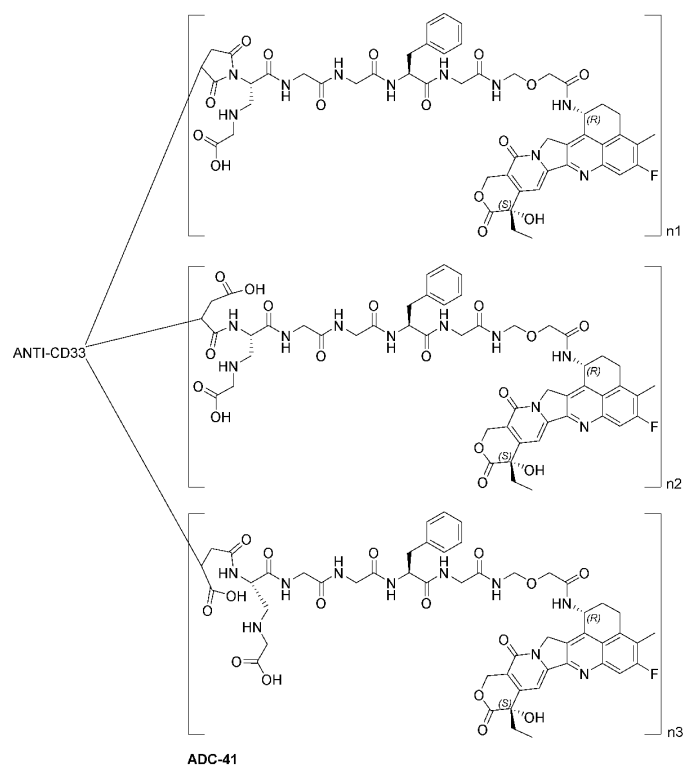


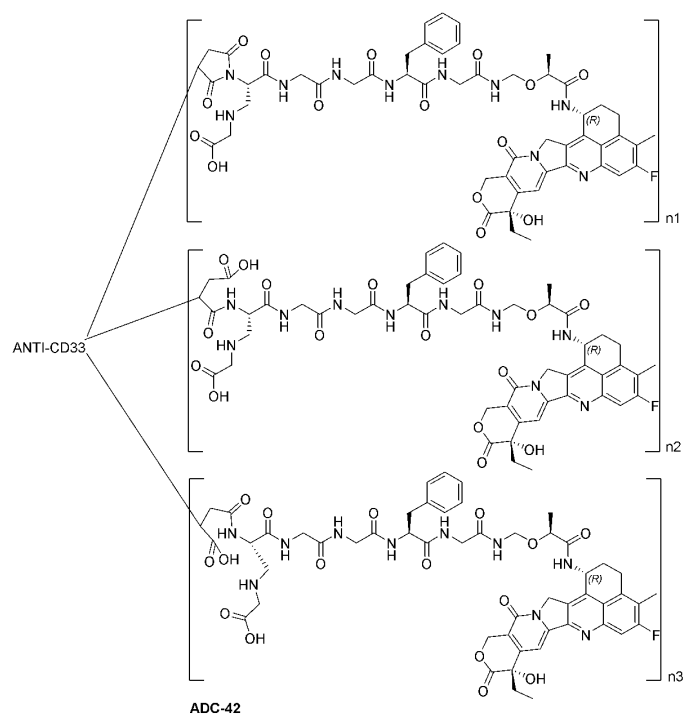
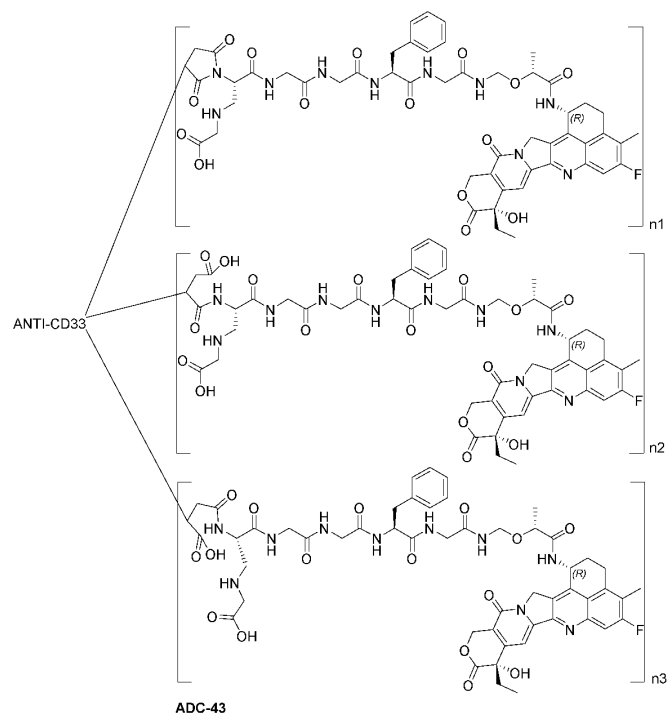


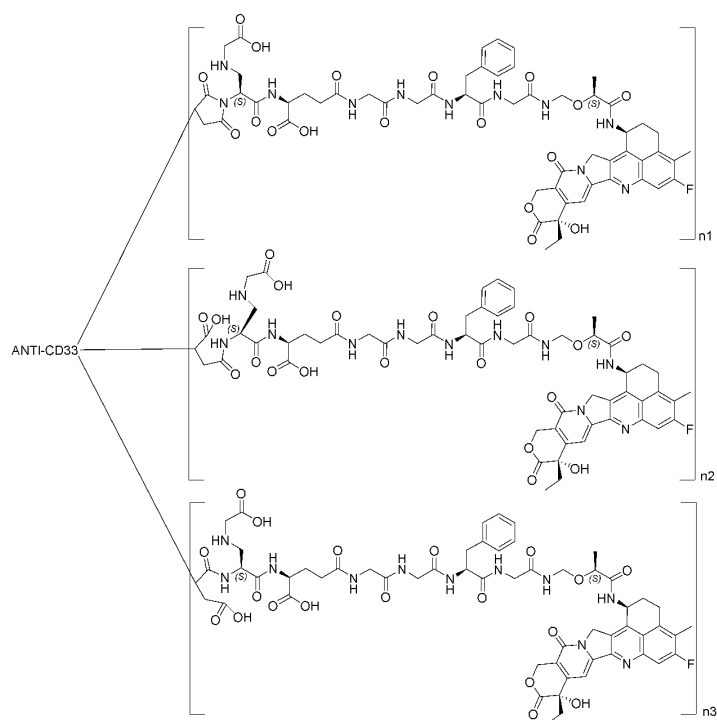
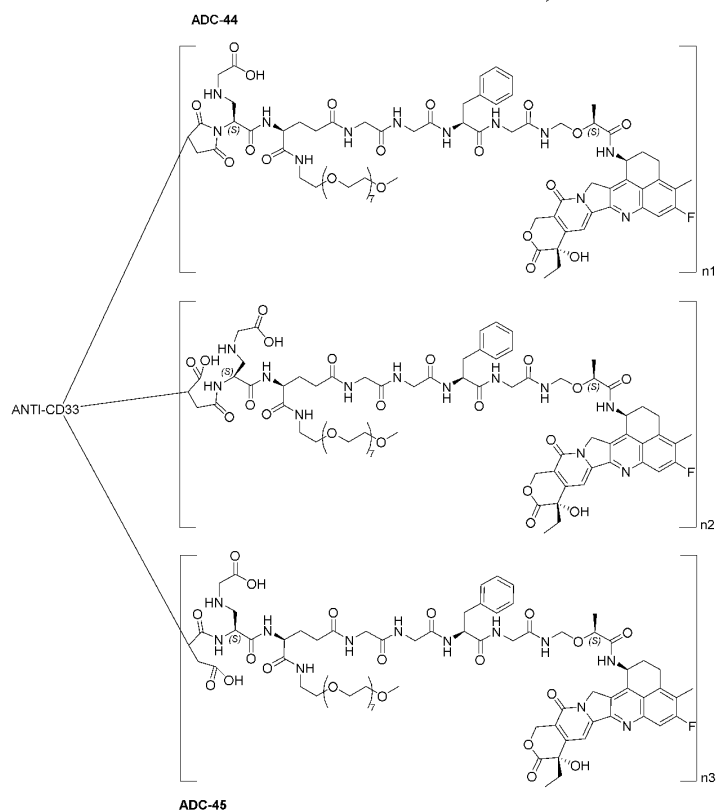


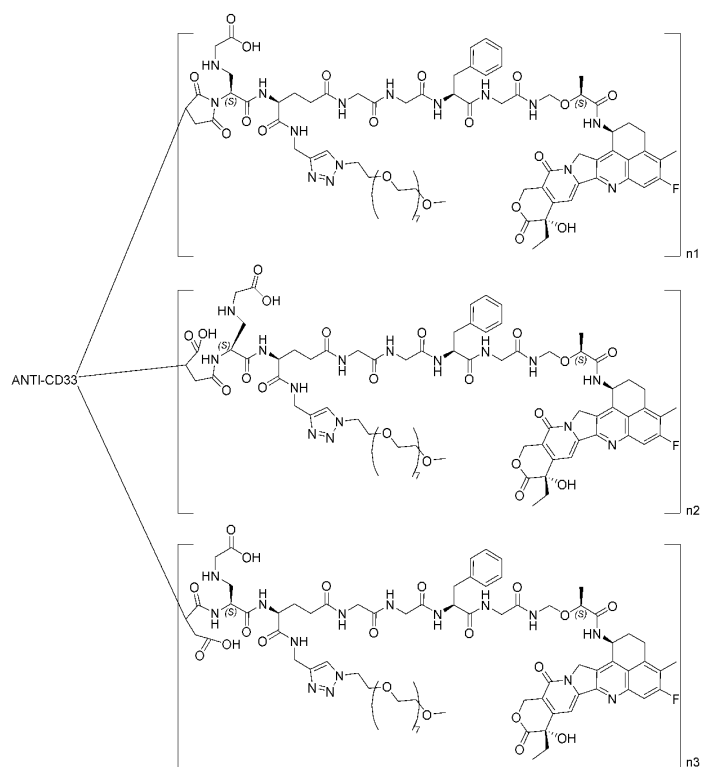
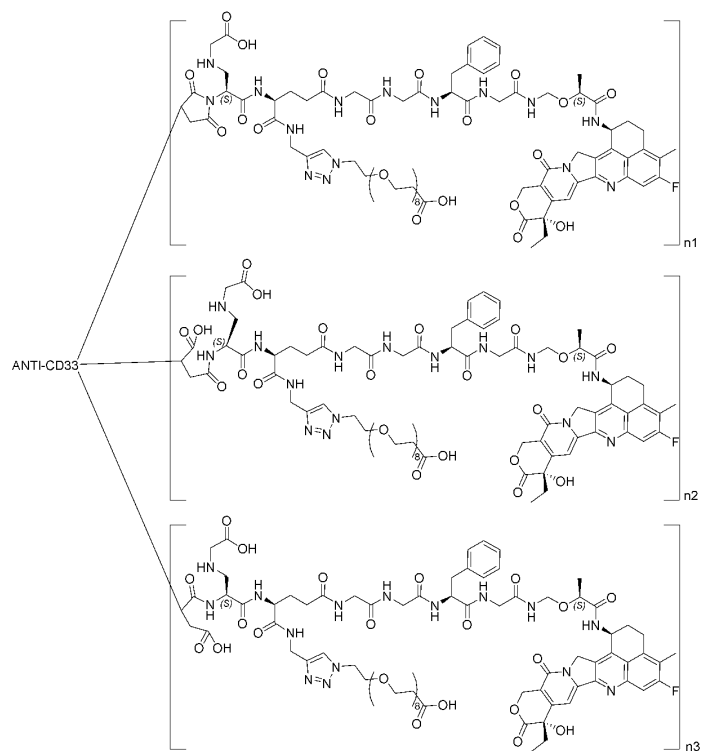




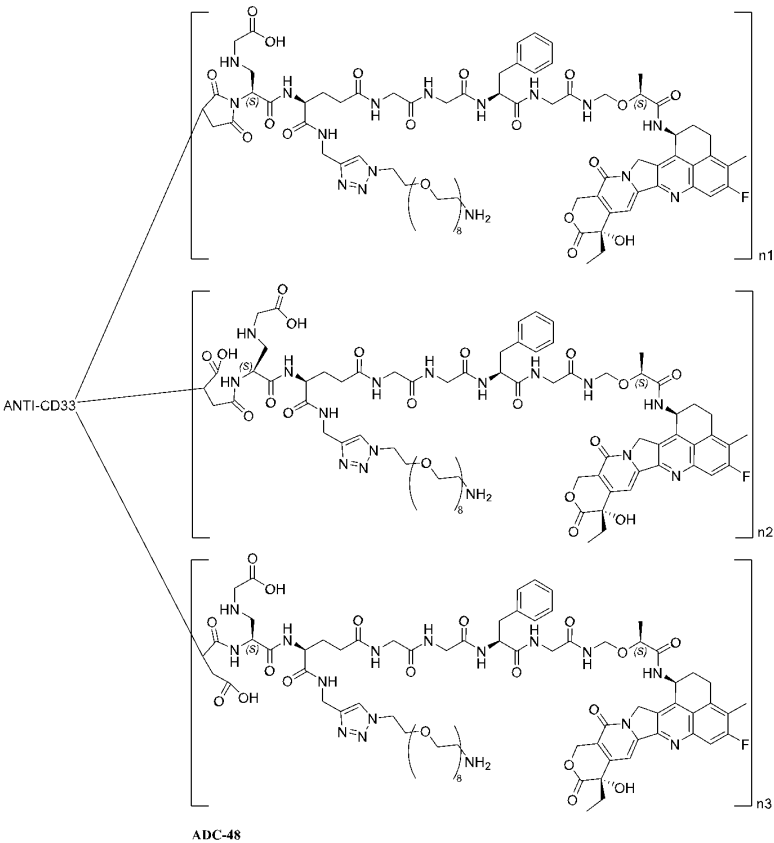








或



其中：

ANTI-CD33 为抗 CD33 抗体或其抗原结合片段；

n1、n2、n3 各自独立地选自 0-10 的任意整数或任意小数，n1、n2、n3 不同
 5 时为 0，且 $1 \leq n1+n2+n3 \leq 10$ （例如 n1+n2+n3 为 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、
 4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、
 8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、
 9.8、9.9 或 10；或者例如 n1+n2+n3 为 8.01、8.32、8.56、8.63、8.66 或 9.40；或
 10 或者例如 n1+n2+n3 选自 7-7.5、7.5-8、8-8.5、8.5-9、9-9.5 或 9.5-10 的任意整数或
 任意小数；优选例如 n1+n2+n3 选自 7-10 的任意整数或任意小数即 $7 \leq n1+n2+n3$
 ≤ 10 ），优选选自 8-10 的任意整数或任意小数即 $8 \leq n1+n2+n3 \leq 10$ 。

在一些实施方案中，Ab 的抗体包含两条轻链以及两条重链，其中所述轻链
 和重链形成对 CD33 具有结合特异性的 IgG。

在一些实施方案中，所述抗 CD33 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区包含

如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 所示的 CDR1、CDR2、CDR3，重链可变区包含如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 所示的 CDR1、CDR2、CDR3。

5 在一些实施方案中，所述抗 CD33 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区如 SEQ ID NO: 7 所示，重链可变区如 SEQ ID NO: 1 所示。

在一些实施方案中，所述抗 CD33 抗体包含来源于人免疫球蛋白的恒定区；

优选地，所述抗 CD33 抗体的轻链包含来源于人免疫球蛋白（例如 kappa 或 lambda）的轻链恒定区；所述抗体的重链包含来源于人免疫球蛋白（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）的重链恒定区，

10 优选地，所述抗 CD33 抗体的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 11，重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5；

优选地，所述抗 CD33 抗体的轻链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 23，重链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 17。

在一些实施方案中，所述抗 CD33 抗体进一步包含半胱氨酸定点插入；

15 优选地，所述半胱氨酸的插入位点在轻链恒定区；

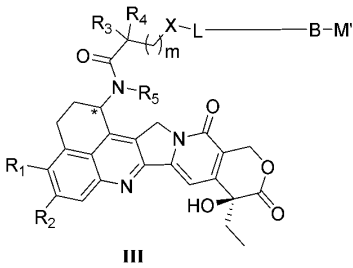
优选地，所述半胱氨酸的插入位点为 kappa 轻链恒定区第 206 位（Kabat 编号）；

优选地，所述抗 CD33 抗体的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 25，重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5；

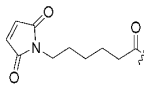
20 优选地，所述抗 CD33 抗体的轻链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 27，重链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 17。

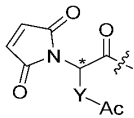
25 在一些实施方案中，所述药学上可接受的盐包括与结构式中酸性官能团形成的钠盐、钾盐、钙盐或镁盐以及与所述结构中碱性官能团形成的醋酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、硝酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、乳酸盐、油酸盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。

本公开的第二方面，提供了一种如式 III 所示的连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，



其中：

M'选自  或如下式 A'所示的接头单元；



式 A'

5

其中 Y 为支架，选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基；优选 Y 为 C1-C6 烷基；Ac 为亲水结构单元；右侧波浪线所示位置与 B 相连或 L 相连；

B 存在或不存在，当 B 存在时选自修饰单元；

10 L 选自连接单元，优选为含肽连接单元；

X 选自-NH-、-O-或-S-，优选为-O-；

R₁ 和 R₂ 相同或者不同，且各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-
15 10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地，R₁ 和 R₂ 相同或者不同，且各自独立地选自卤素、C1-C6 烷基；

更优选地，R₁ 选自 C1-C6 烷基，R₂ 选自卤素；

最优选地，R₁ 为甲基，R₂ 为氟；

R₃ 和 R₄ 相同或者不同，各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代
20 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、C6-C10 芳基 C1-C6 烷基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地，R₃、R₄ 相同或者不同，各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、取代 C1-

C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

进一步优选地，R₃、R₄ 相同或者不同，各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C6 环烷基、C3-C6 环烷基 C1-C6 烷基或苯基 C1-C6 烷基；

更优选地，R₃、R₄ 相同或者不同，各自独立地选自氢、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基、环丙甲基、苄基；

最优选地，R₃、R₄ 中，任意一个选自氢、甲基，另一个选自氢、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基、环丙甲基、苄基；

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

10 优选地，R₃、R₄ 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基；

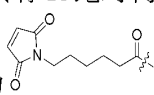
更优选地，R₃、R₄ 及其所连接碳原子构成 C3-C6 环烷基；

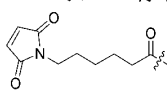
最优选地，R₃、R₄ 及其所连接碳原子构成环丙基、环丁基或环戊基；

R₅ 选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基，R₅ 优选选自氢、C1-C6 烷基，R₅ 更优选选自氢、甲基；

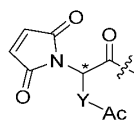
m 选自 0-5 的整数，优选选自 0、1；

*位置所示手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型；

且满足以下条件：M' 为  时，B 存在，选自修饰单元。

在一些实施方案中，所述 M' 选自  或如下式 A' 所示的接头单元，

20 优选选自如下式 A' 所示的接头单元；



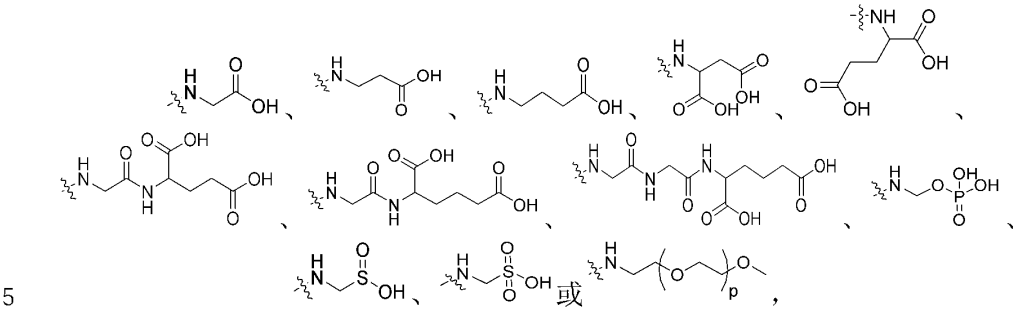
式 A'

其中 Y 为支架，选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基；优选 Y 为 C1-C6 烷基，更优选为 C1-C3 烷基，最优选为亚甲基；

25 *所示位置具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性；

右侧波浪线所示位置与 B 相连或 L 相连；

亲水结构单元 Ac 非限制性地选自天然或非天然氨基酸、1-20 聚乙二醇、磷酸基、羧酸基、磺酸基、亚磺酸基或以下结构，

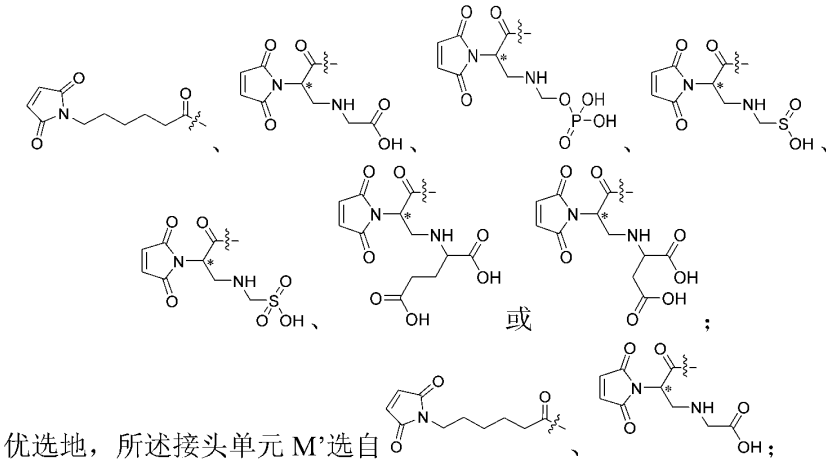


其中，p 选自 0-10 的整数；波浪线所示位置与支架 Y 相连；

优选地，亲水结构单元 Ac 选自 ，波浪线所示位置与支架 Y 相连；

更优选地，亲水结构单元 Ac 为 ，波浪线所示位置与支架 Y 相连。

10 在一些实施方案中，所述接头单元 M' 非限制性地选自如下式所示的结构，



优选地，所述接头单元 M' 选自 ；

更优选地，所述接头单元 M' 为 ；

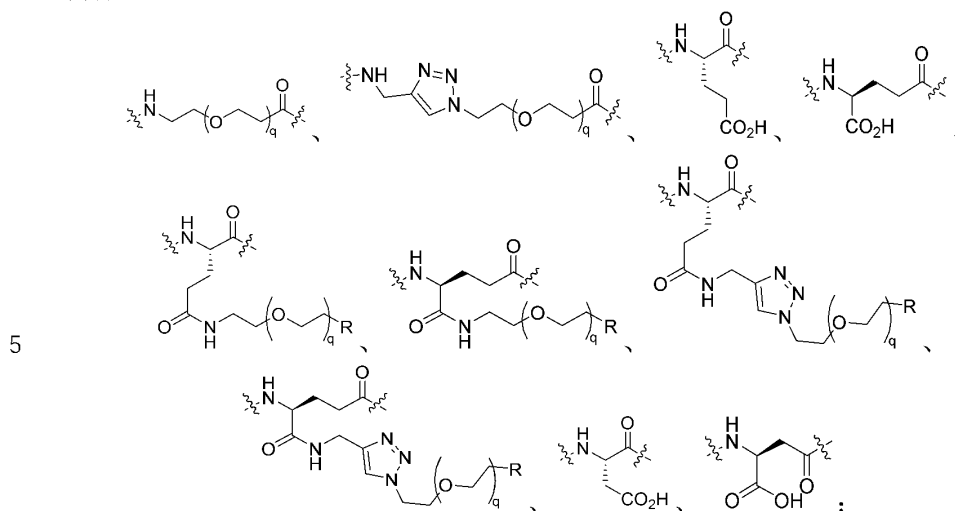
15 其中：

*位置具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种构型；

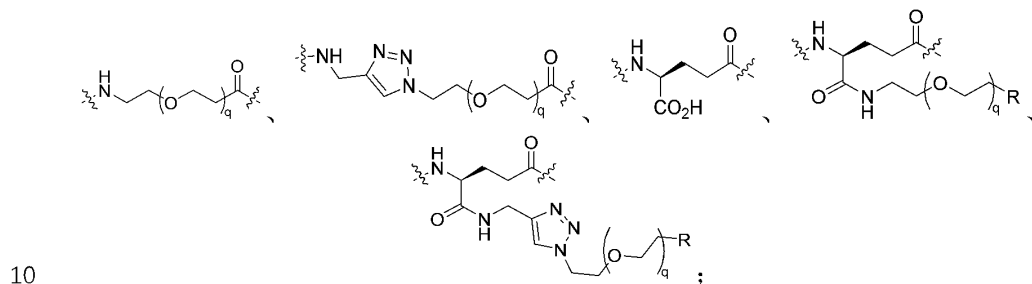
右侧波浪线所示位置与修饰单元 B 或连接单元 L 相连。

在一些实施方案中，修饰单元 B 存在或不存在，当所述修饰单元 B 存在时，非限制性地选自可增强亲水性的结构或其立体异构体。

在一些实施方案中，修饰单元 B 存在或不存在，当所述修饰单元 B 存在时，所述修饰单元 B 非限制性地选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体，



优选地，修饰单元 B 存在或不存在，当所述修饰单元 B 存在时，所述修饰单元 B 非限制性地选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体，



其中:

R 非限制性地选自羟基、氨基、聚乙二醇、羧酸基、磺酸基、亚磺酸基、磷酸基、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、天然或非天然氨基酸残基、糖或其衍生物中的一种或几种的组合；

15 优选地，R 选自 C1-C6 烷氧基、羧酸基、氨基；

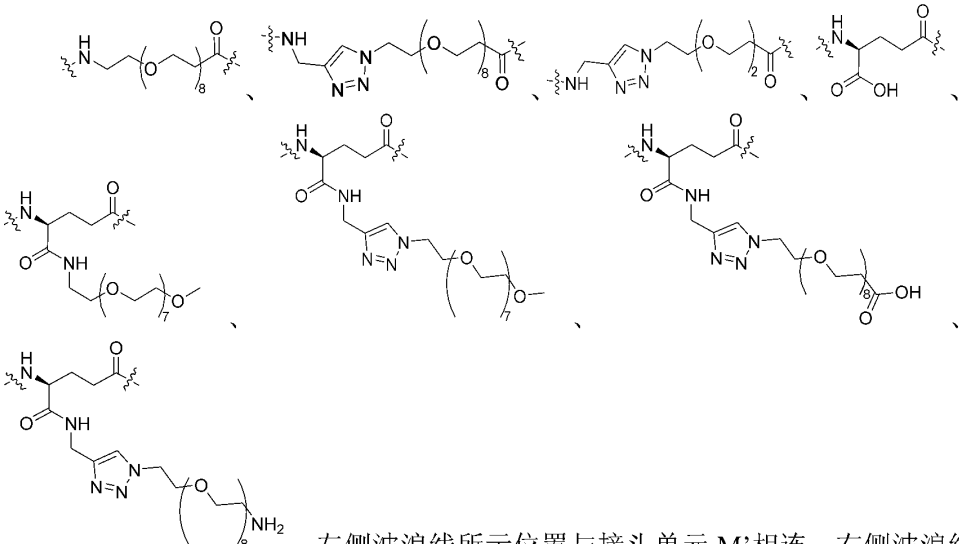
更优选地，R选自甲氧基、羧酸基、氨基；

左侧波浪线所示位置与接头单元 M' 相连;

右侧波浪线所示位置与连接单元 L 相连;

q 选自 1-10 的整数 (优选选自 2-8 的整数), 优选选自 2、7、8;

最优选地，所述修饰单元 B 选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体：



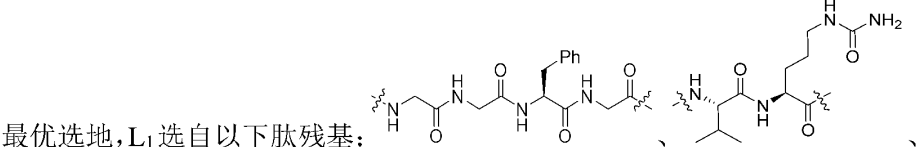
，左侧波浪线所示位置与接头单元 M' 相连，右侧波浪线所示位置与连接单元 L 相连。

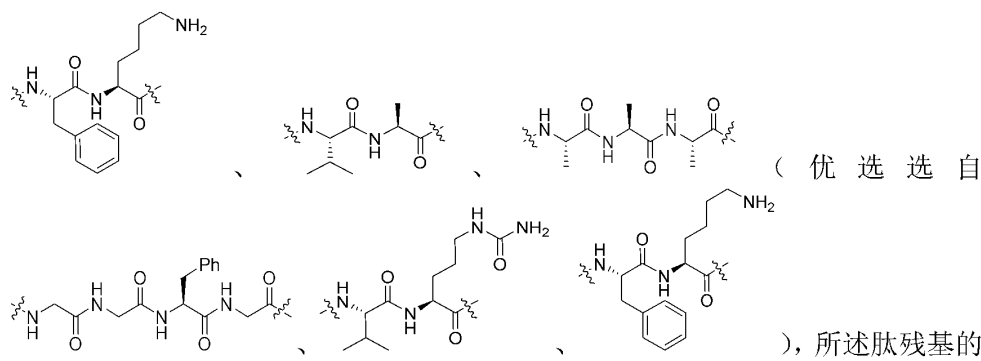
在一些实施方案中，所述连接单元 L 为 L₁-L₂，

L₁ 为由 2-10 个氨基酸残基组成的肽残基，所述肽残基的氨基端与接头单元 M' 或修饰单元 B 相连，羧基端与 L₂ 相连；

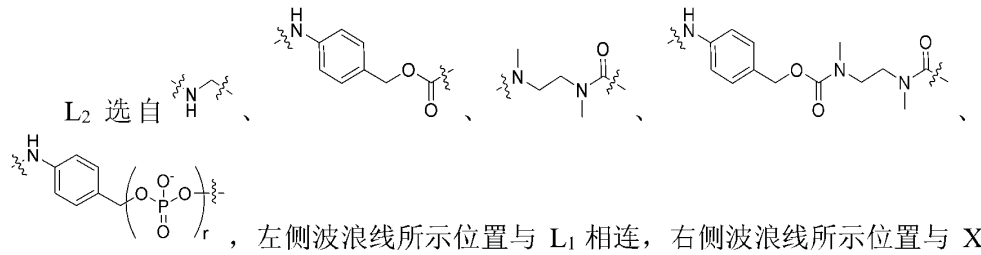
10 优选地，L₁ 为由 2-4 个氨基酸残基组成的肽残基，所述肽残基的氨基端与接头单元 M' 或修饰单元 B 相连，羧基端与 L₂ 相连；优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸；更优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸；最优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸；

15 更优选地，L₁ 选自以下肽残基：甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-丙氨酸、丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸（优选选自甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸），所述肽残基的氨基端与接头单元 M' 或修饰单元 B 相连，羧基端与 L₂ 相连；

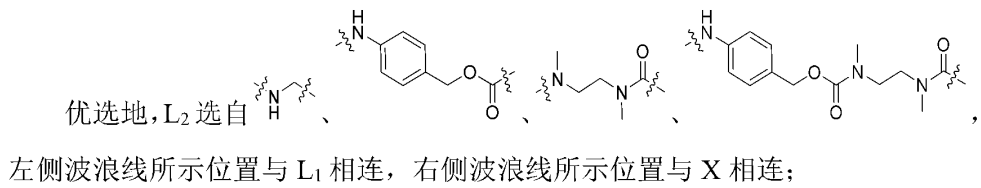
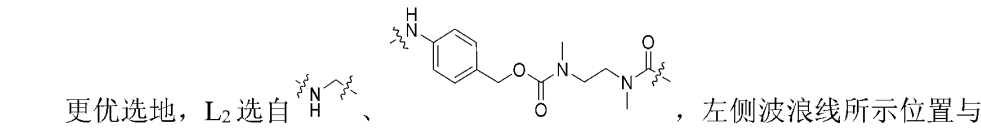




氨基端与接头单元 M'或修饰单元 B 相连，羧基端与 L₂ 相连；

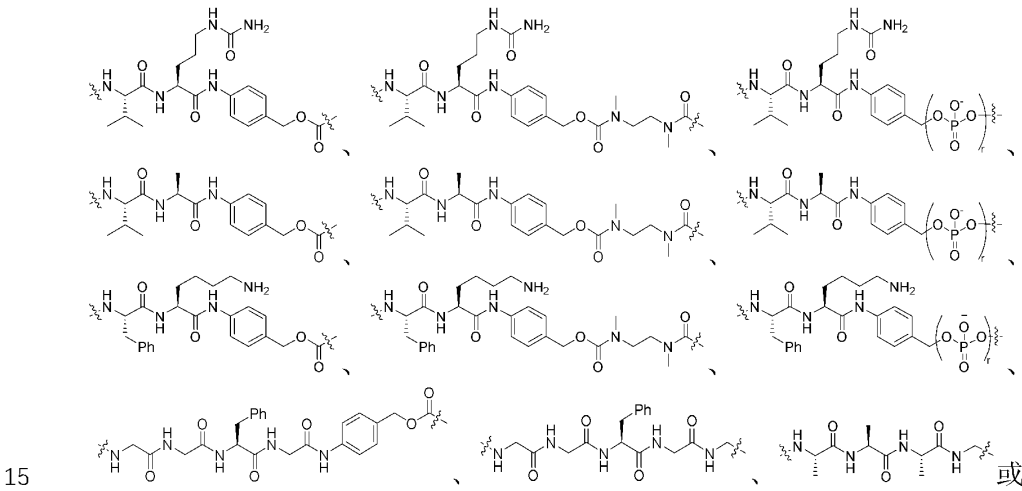


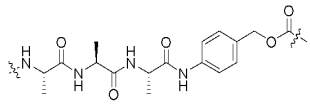
相连；



10 L₁ 相连, 右侧波浪线所示位置与 X 相连；

优选地, 所述连接单元 L 非限制性地选自以下结构或其立体异构体,

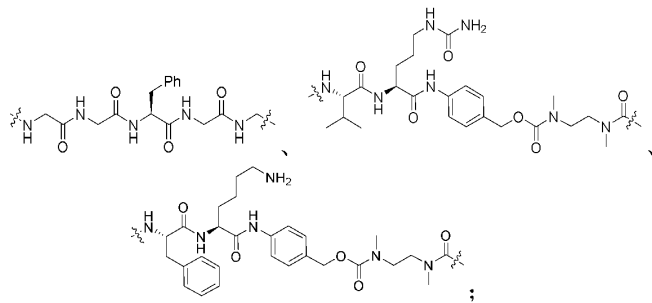




其中：

r 选自 1-10 的整数；

更优选地，所述连接单元 L 选自以下结构或其立体异构体：

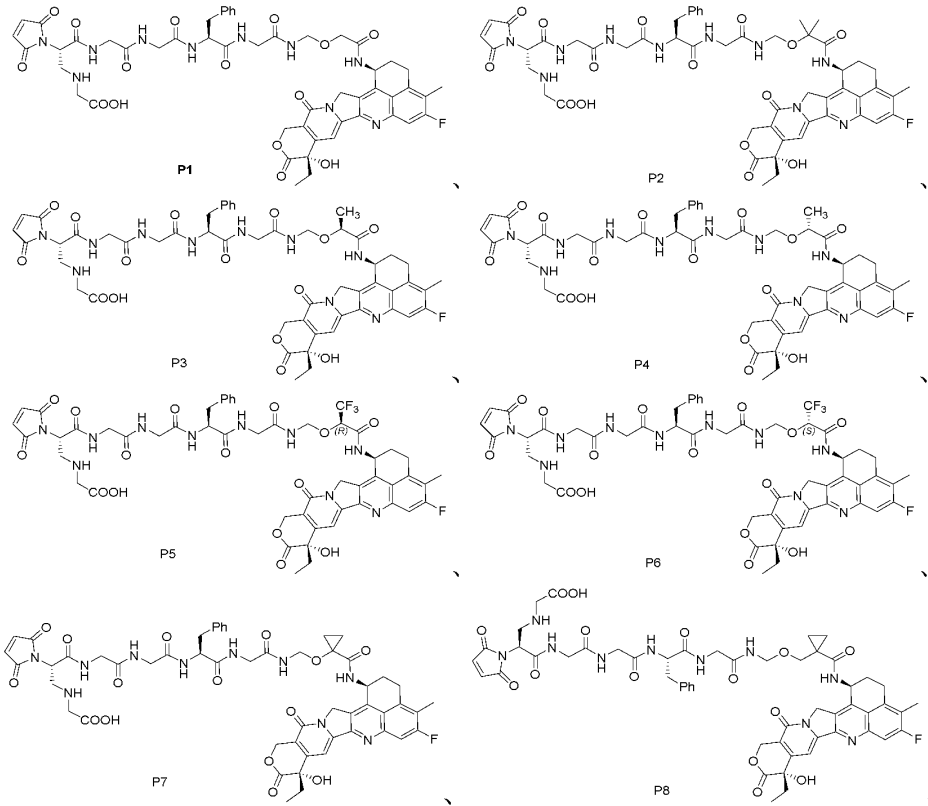


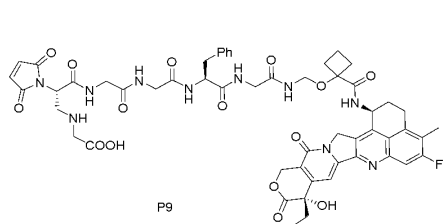
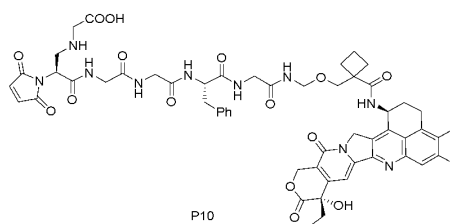
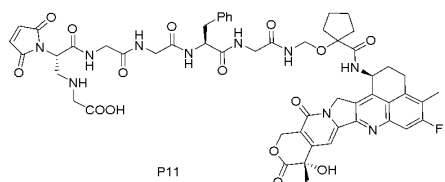
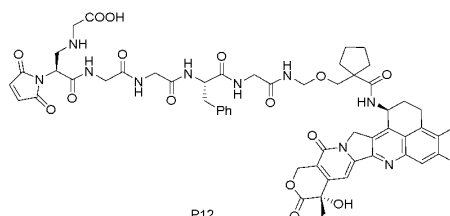
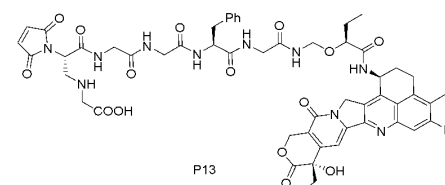
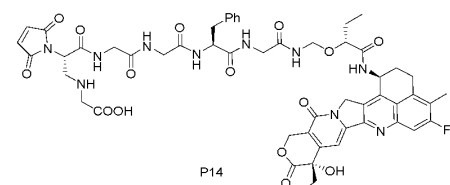
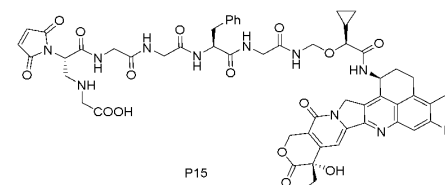
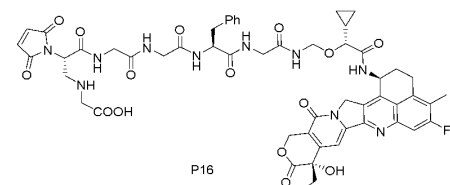
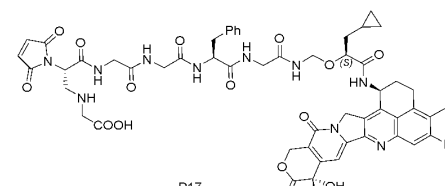
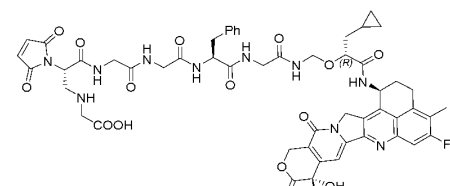
所述连接单元 L 左侧波浪线所示位置与接头单元 M'或修饰单元 B 相连；

所述连接单元 L 右侧波浪线所示位置与 X 相连。

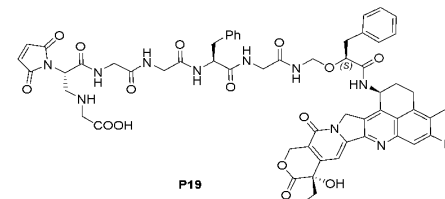
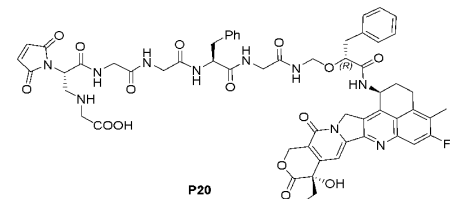
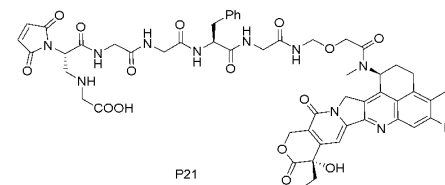
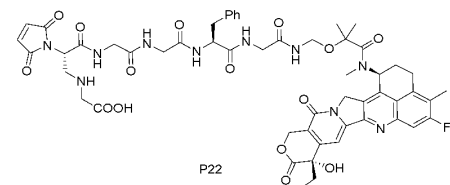
在一些实施方案中，所述连接子药物非限制性的选自以下结构或其立体异构

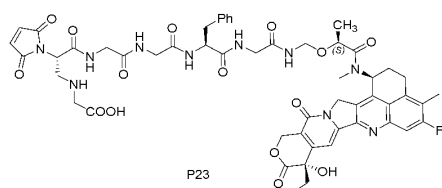
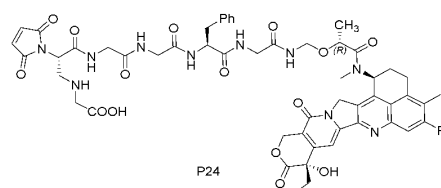
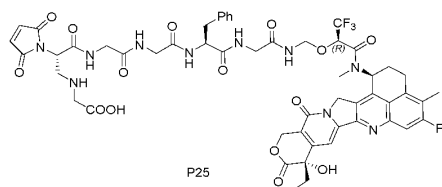
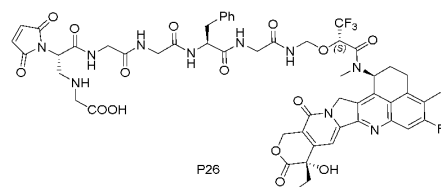
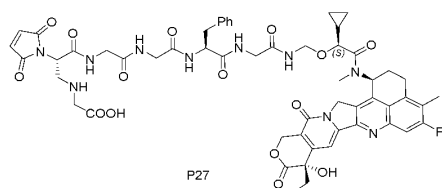
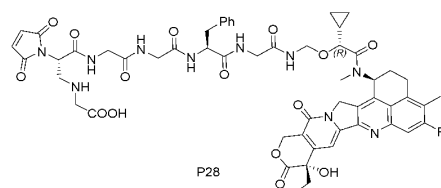
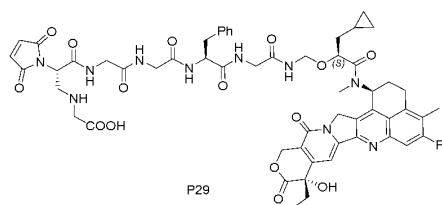
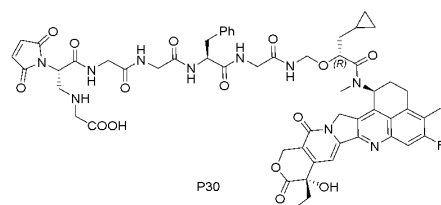
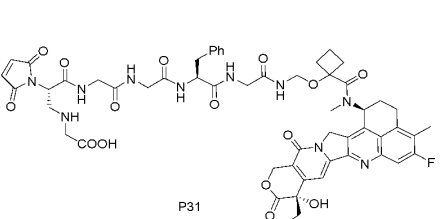
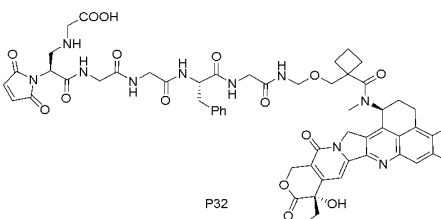
10 体，



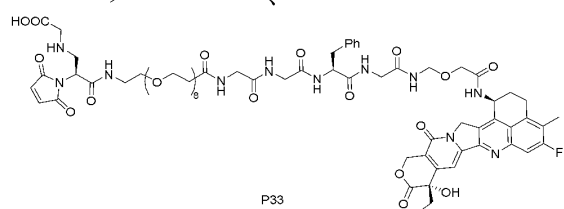
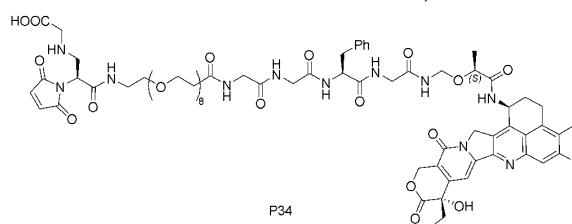


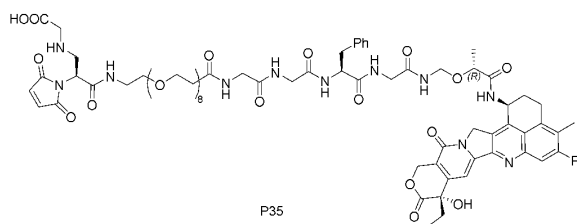
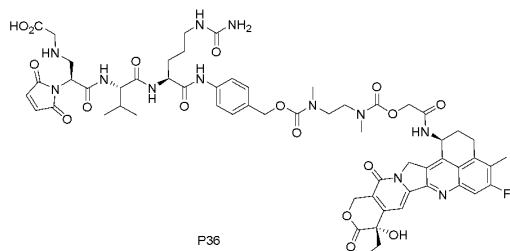
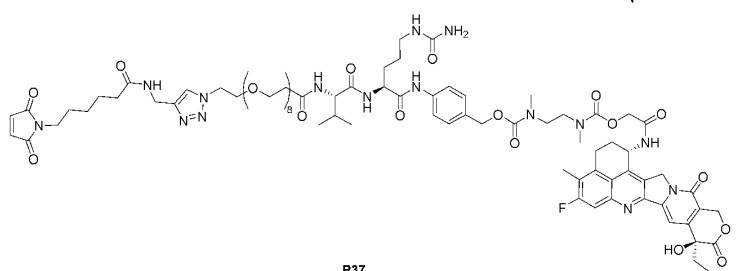
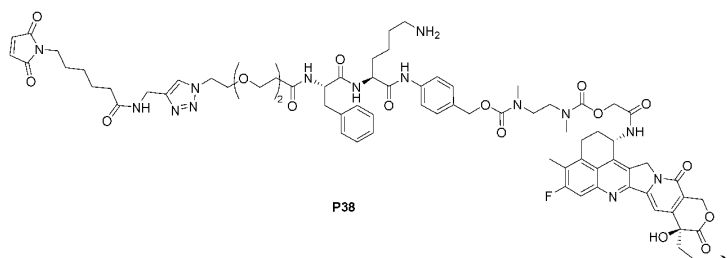
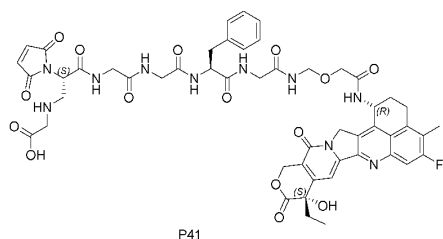
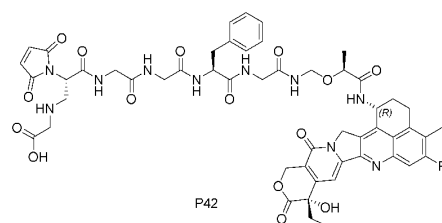
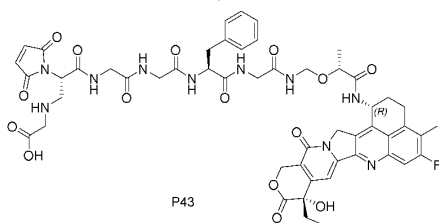
5

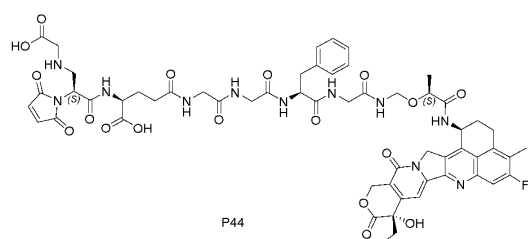
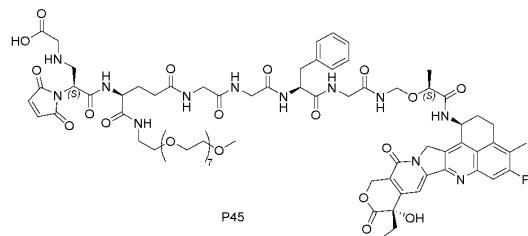
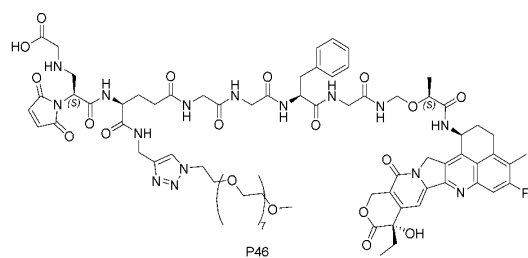
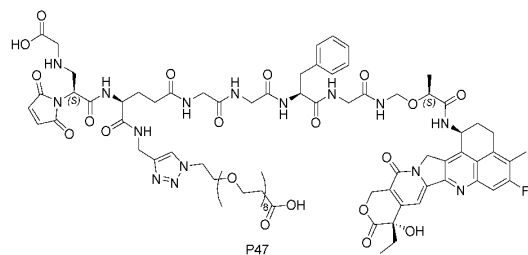
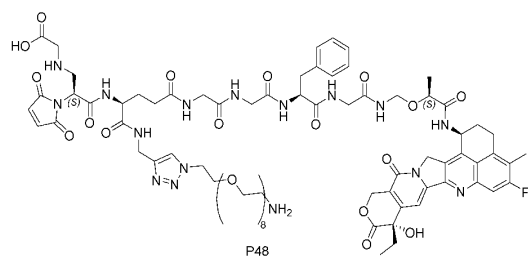




5



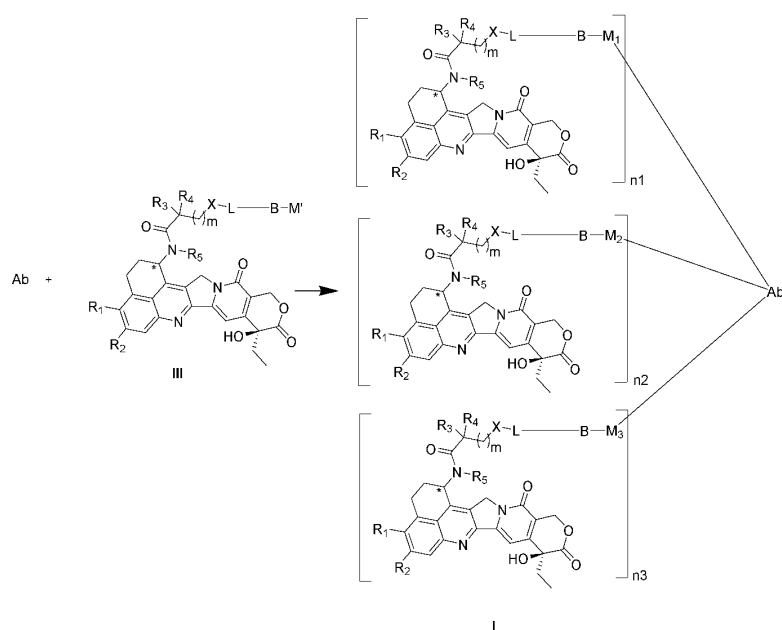




或

5

本公开的第三方面，提供了一种制备前述第一方面的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物的方法，该方法包括：



Ab 与通式III所示的连接子药物进行偶联，制备得到如前述第一方面的通式 I 所示的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物；

其中：

5 Ab 选自抗 CD33 抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述抗 CD33 抗体如前述第一方面所限定；

M₁、M₂、M₃、B、L、X、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、m、n₁、n₂、n₃ 如前述第一方面所限定，M'如前述第二方面所限定；

*所示位置手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性。

10 本公开的第四方面，提供了一种药物组合物，其包含前述第一方面所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或前述第二方面所述连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，以及任选的药学上可接受的载体。

本公开的第五方面，提供了一种药物制剂，其包含前述第一方面所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或前述第二方面所述连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物。

本公开的第六方面，提供了前述第一方面所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或前述第二方面所述连接子药物或其立体异

构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，或前述第四方面所述的药物组合物和/或前述第五方面所述的药物制剂，在制备用于治疗或预防癌症或者肿瘤的药物中的用途。

在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤表达有 CD33。

- 5 在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌（如非小细胞肺癌）、结肠癌、乳腺癌（如三阴乳腺癌）、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌（如表皮癌）、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤、骨髓瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

- 10 在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、三阴乳腺癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

本公开的第七方面，提供了前述第一方面所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或前述第二方面所述连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，或前述第四方面所述的药物组合物和/或前述第五方面所述的药物制剂，其用于治疗或预防癌症或者肿瘤。

- 20 在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤表达有 CD33。

- 25 在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌（如非小细胞肺癌）、结肠癌、乳腺癌（如三阴乳腺癌）、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌（如表皮癌）、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤、骨髓瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道

癌、肺癌、结肠癌、三阴乳腺癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

5 本公开的第八方面，提供了治疗或预防癌症或者肿瘤的方法，其包括给予有需要的受试者有效量的前述第一方面所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或前述第二方面所述连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，或前述第四方面所述的药物组合物和/或前述第五方面所述的药物制剂。

在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤表达有 CD33。

10 在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌（如非小细胞肺癌）、结肠癌、乳腺癌（如三阴乳腺癌）、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌（如表皮癌）、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤、骨髓瘤和白血病等实体瘤或
15 血液瘤。

在一些实施方案中，所述癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、三阴乳腺癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋
20 巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

附图说明

图 1A 显示了 SEC-HPLC 检测 **ADC-46** 的聚集情况。

图 1B 显示了 SEC-HPLC 检测 **ADC-47** 的聚集情况。

25 图 1C 显示了 SEC-HPLC 检测 **ADC-48** 的聚集情况。

图 1D 显示了 SEC-HPLC 检测 **ADC-50** 的聚集情况。

图 1E 显示了 SEC-HPLC 检测 **ADC-3** 的聚集情况。

图 1F 显示了 SEC-HPLC 检测 **ADC-34** 的聚集情况。

图 1G 显示了 SEC-HPLC 检测 **ADC-44** 的聚集情况。

图 1H 显示了 SEC-HPLC 检测 **ADC-49** 的聚集情况。

图 2A 显示了 RP-HPLC 检测 **ADC-46** 药物-抗体偶联比 (DAR)。

图 2B 显示了 RP-HPLC 检测 **ADC-47** 药物-抗体偶联比 (DAR)。

5 图 2C 显示了 RP-HPLC 检测 **ADC-48** 药物-抗体偶联比 (DAR)。

图 2D 显示了 RP-HPLC 检测 **ADC-50** 药物-抗体偶联比 (DAR)。

图 2E 显示了 RP-HPLC 检测 **ADC-3** 药物-抗体偶联比 (DAR)。

图 2F 显示了 RP-HPLC 检测 **ADC-34** 药物-抗体偶联比 (DAR)。

图 2G 显示了 RP-HPLC 检测 **ADC-44** 药物-抗体偶联比 (DAR)。

10 图 2H 显示了 RP-HPLC 检测 **ADC-49** 药物-抗体偶联比 (DAR)。

图 3 显示了 **ADC-3** 实测分子量结果。

图 4A 显示了本发明 **ADC-3** 保持了与裸抗针对 **CD33** 抗原相同的亲和力。

图 4B 显示了本发明 **ADC-48** 保持了与裸抗针对 **CD33** 抗原相同的亲和力。

15 图 4C 显示了本发明 **ADC-46** 与 **ADC-47** 保持了与裸抗针对 **CD33** 抗原相同的亲和力。

图 5A 显示了本发明 **anti-CD33**、**ADC-3**、**ADC-47**、**ADC-48** 作用于 **HL-60** 细胞杀伤曲线。

图 5B 显示了本发明 **anti-CD33**、**ADC-3**、**ADC-47**、**ADC-48** 作用于 **HEL92.1.7** 细胞的杀伤曲线。

20 图 5C 显示了本发明 **anti-CD33**、**ADC-3**、**ADC-47**、**ADC-48** 作用于 **TF-1** 细胞的杀伤曲线。

图 5D 显示了本发明 **anti-CD33**、**ADC-3**、**ADC-47**、**ADC-48** 作用于 **MV4-11** 细胞的杀伤曲线。

25 图 5E 显示了本发明 **anti-CD33**、**ADC-3**、**ADC-47**、**ADC-48** 作用于 **MOLM-13** 细胞的杀伤曲线。

图 5F 显示了本发明 **anti-CD33**、**ADC-3**、**ADC-47**、**ADC-48** 作用于 **U937** 细胞的杀伤曲线。

图 5G 显示了本发明 **anti-CD33**、**ADC-3**、**ADC-47**、**ADC-48** 作用于 **CMK**

细胞的杀伤曲线。

图 6A 显示了抗 CD33 抗体以及抗体-药物偶联物在 HEL92.1.7 细胞小鼠皮下移植瘤模型中抑制肿瘤效果。

图 6B 显示了抗 CD33 抗体以及抗体-药物偶联物在 MV4-11 细胞小鼠皮下移植瘤模型中抑制肿瘤效果。

图 7A 显示了本发明 anti-CD33、小分子药物 D3、ADC-3、ADC-34 作用于 HL-60 细胞的杀伤曲线。

图 7B 显示了本发明 anti-CD33、小分子药物 D3、ADC-3、ADC-34 作用于 JVM-3 细胞的杀伤曲线。

图 7C 显示了本发明 anti-CD33、小分子药物 D3、ADC-3、ADC-34 作用于 Raji 细胞的杀伤曲线。

具体实施方式

缩写和定义

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

除非有相反陈述，本文权利要求书和说明书中使用的术语具有下述含义。

术语“抗体”或“抗原结合片段”在其所属的范围内，包括抗体结构的任何部分。这一单元可以结合、反应性关联或者络合一个受体、抗原或者靶向细胞群体具有的其它受体单元。抗体可以是任何蛋白或蛋白类分子，它可以结合、络合或者与待治疗或生物改造的细胞群体的一部分发生反应。本发明中组成抗体-药物偶联物的抗体保持其原有野生状态时的抗原结合能力。因此，本发明中的抗体能够专一性地与抗原结合。涉及的抗原包括，例如，肿瘤相关抗原（TAA），细胞表面受体蛋白和其他细胞表面分子，细胞存活调节因子，细胞增殖调节因子，与组织生长与分化相关的分子（如已知或预知的具有功能性的），淋巴因子，细胞因子，参与细胞循环调节的分子，参与血管生成的分子，以及与血管生成有关的分子（如已知或预知的具有功能性的）。肿瘤相关因子可以是簇分化因子（如 CD 蛋白）。

应用在抗体-药物偶联物中的抗体包括，但不局限于，针对细胞表面受体和肿瘤相关抗原的抗体。这样的肿瘤相关抗原是业内所熟知的，可以通过业内熟知的抗体制备方法和信息来制备。为了开发可用于癌症诊断与治疗的有效的细胞水平目标物，研究人员力图找寻跨膜或其他肿瘤相关多肽。这些目标物能够特异性的表达在一种或多种癌细胞表面，而在一种或多种非癌细胞表面表达很少或不表达。通常，相对于非癌细胞表面而言，这样的肿瘤相关多肽在癌细胞表面更加过度表达。确认这样的肿瘤相关因子，可大大提高基于抗体治疗癌症的专一靶向特性。为方便起见，为业内所熟知的抗原相关信息标示如下，包括名称，其他名称，基因库登录号。与肿瘤相关抗原对应的核酸和蛋白序列可参见公开数据库，例如 Genbank。抗体靶向对应的肿瘤相关抗原包括所有的氨基酸序列变种和同种，与参考文献中确认的序列具有至少 70%，80%，85%，90%或者 95%的同源性，或者具备与引用文献中的肿瘤相关抗原序列具有完全一致的生物性质和特征。

本发明中“抗体”指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。本发明所述的抗体优选为针对靶细胞上细胞表面抗原的特异性抗体，具体为抗 CD33 抗体。

本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 *J.biol.chem.* **1968**. 243. 3558 中所述。

术语“药物”是指细胞毒性药物，药物表示 D，在细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。

术语“抗体-药物偶联物”指抗体通过接头单元、任选的修饰单元和连接单元与具有生物活性的药物相连。

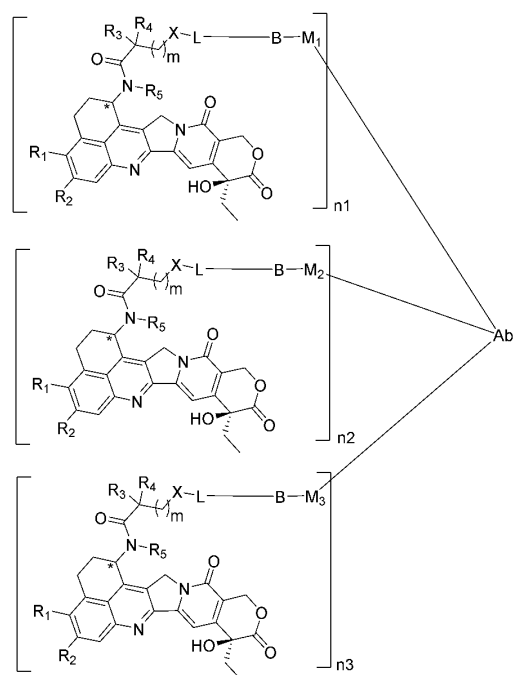
术语“接头单元”指一端与抗体或其抗原结合片段连接而另一端与修饰单元

或连接单元相连的化学结构片段或键，也可以连接其他接头后再与药物相连。

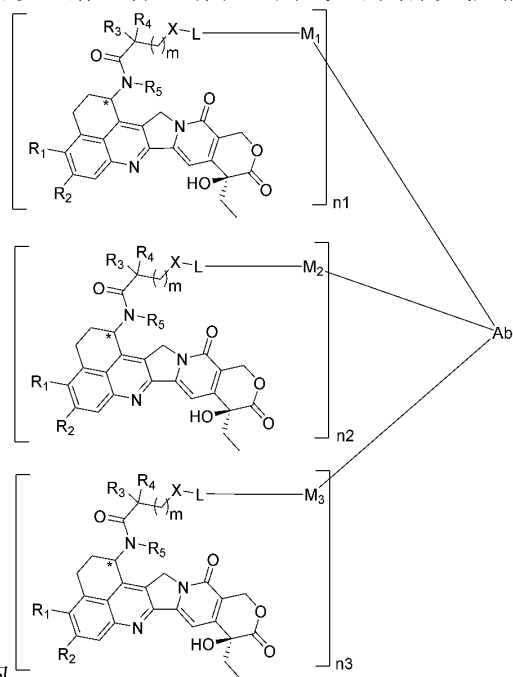
术语“连接单元”包括延伸物、间隔物或氨基酸单元，可以通过本领域已知方法合成，诸如 US2005-0238649A1 中所记载的。

按照在细胞内药物释放的机制，如本文所用，“连接单元”或“连接子”可被分为两类：不可断裂连接单元和可断裂连接单元。对于含有不可断裂连接单元的抗体-药物偶联物，其药物释放机制为：偶联物与抗原结合并被细胞内吞后，抗体在溶酶体中被酶解，释放出由小分子药物，连接单元和抗体氨基酸残基共同组成的活性分子。由此带来的药物分子结构改变并不减弱其细胞毒性，但由于活性分子是带电荷的（氨基酸残基），从而导致其不能渗入邻近细胞。因此，此类活性药物不能杀死邻近不表达靶向抗原（抗原阴性细胞）的肿瘤细胞（旁观者效应，bystander effect）（Ducry 等，2010，*Bioconjugate Chem.* 21: 5-13）。连接单元还可以是便于在细胞中释放药物的“可断裂连接单元”。例如，可使用酸不稳定连接单元（例如脲）、蛋白酶敏感（例如肽酶敏感）连接单元、光不稳定连接单元或含二硫化物连接单元（Chari 等 *Cancer Research* 52:127-131,1992）；美国专利 No.5, 208, 020。

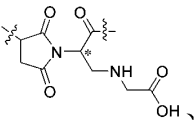
术语“修饰单元”指一端与接头单元相连，另一端与连接单元相连的化学键或延伸物、间隔物、具备分支结构的氨基酸单元、糖单元、聚乙二醇单元、羰基、酰胺、羧酸基、磷酸基、磺酸基、亚磺酸基、烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基的一种或几种的组合。修饰单元的作用在于增强抗体-药物偶联的亲水性或具备分支结构增加载药量。



本发明的式 **I** 中, **B** 存在或不存在, 则本领域技术人员可以理解, 若 **B** 存在, 则式 **I** 的结构式如前, 若 **B** 不存在,



则式 **I** 的结构式变为 **I'**。其余类似的定义可以参照前述内容进行理解。



相应地,本发明中,若接头单元 M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自

且右侧波浪线所示位置与修饰单元 B 或连接单元

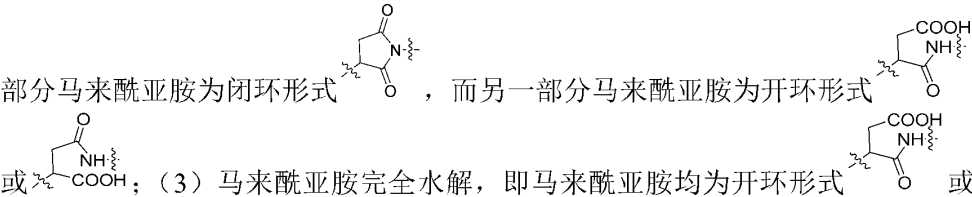
L 相连,本领域技术人员可以理解,其表示,若所述修饰单元 B 存在,则右侧波浪线所示位置与修饰单元 B 相连,但若所述修饰单元 B 不存在,则右侧波浪线所示位置将与连接单元 L 相连。其余类似的定义可以参照前述内容进行理解。

术语“载药量”或“药物抗体比(DAR)”是指式I中每个抗体上加载的细胞毒性药物平均数量(例如通式I中的 $n_1+n_2+n_3$),也可以表示为药物量和抗体量的比值,其可以为整数,也可以为小数。药物载量的范围(例如通式I中的 $n_1+n_2+n_3$)可以是每个抗体平均连接 1-10 个(即可以是选自 1-10 之间的包括端点 1 和 10 的任意整数,也可以是 1-10 之间的任意小数),优选 8-10 个(即可以是选自 8-10 之间的包括端点 8 和 10 的任意整数,也可以是 8-10 之间的任意小数)细胞毒性药物(D)。

本发明提供的抗体药物偶联物在制备时,通式III所示的连接子药物在与Ab进行偶联时,在易水解条件下可以发生水解,其水解部位在马来酰亚胺部分。当Ab偶联多个连接子药物时,随水解程度不同,可出现以下情形:(1)马来酰亚胺不水解,即马来酰亚胺均为闭环形式



; (2) 马来酰亚胺不完全水解,即



部分马来酰亚胺为闭环形式,而另一部分马来酰亚胺为开环形式或

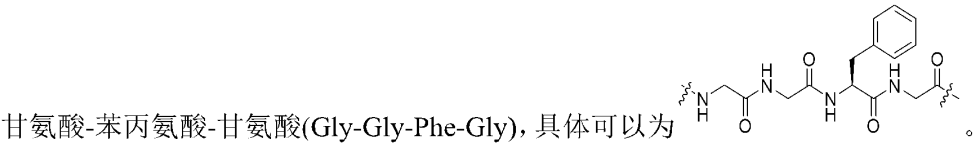
马来酰亚胺完全水解,即马来酰亚胺均为开环形式或

因此,通式I所示的抗体-药物偶联物中, n_1 、 n_2 、 n_3 各自独立地选自 0-10 的任意整数或任意小数, n_1 、 n_2 、 n_3 不同时为 0。同时,本领域技术人员可以理解,如前所述,每个Ab偶联的连接子药物的个数可以相同,也可以不同,因此,每个Ab偶联的连接子药物的平均数量可以是整数,也可以是小数,相应地,连接子药物在与Ab进行偶联时,马来酰亚胺部分在易水解条件下可以

发生水解，水解程度可以相同，也可以不同，因此，n1、n2、n3 可以是整数，也可以是小数。

术语“药学上可接受的盐”指本发明抗体-药物偶联物或连接子药物的盐，或本发明中所述的化合物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性。例如本发明抗体-药物偶联物或连接子药物中的羧酸基与碱形成盐，非限制性实例包括：钠盐、钾盐、钙盐或镁盐等。也可以是本发明抗体-药物偶联物或连接子药物中的氨基与酸形成盐，非限制性实例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。在一些实施方案中，本发明中“药学上可接受的盐”包括与结构式中酸性官能团形成的钠盐、钾盐、钙盐或镁盐以及与结构中碱性官能团形成的醋酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、硝酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、乳酸盐、油酸盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。

术语“氨基酸残基”指的是氨基酸的氨基失去一个氢、羧基失去一个羟基后，剩余的不完整的氨基酸结构，具有氨基端和羧基端。本发明中，L₁ 为由 2-10 个（优选 2-4 个）氨基酸残基组成的肽残基，其中，2-10 个（优选 2-4 个）氨基酸的种类相互之间可以相同，也可以不同。例如，若 L₁ 为由 4 个氨基酸残基组成的肽残基，且氨基酸选自甘氨酸、苯丙氨酸，则 L₁ 可以为以下肽残基：甘氨酸-



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

术语“绝对构型”指手性分子中各个基团在空间的真实排列关系，即绝对的空间关系。本发明中采用手性碳原子所连接的基团在空间不同方向上的排布为特征

的构型标记法，即 *R*、*S* 构型标记法。

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

术语“非天然氨基酸”指通过合成手段所获得的氨基酸。

- 5 术语“立体异构体”指在有相同分子式的化合物分子中，原子或取代基互相连接的次序相同，但在空间的排列方式不同，与构造异构同属有机化学范畴中的同分异构现象。

术语“羟基”指-OH。

术语“氨基”指-NH₂。

- 10 术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“聚乙二醇”指环氧乙烷的寡聚物或聚合物。

术语“羧酸基”指-COOH。

术语“磺酸基”指-S(O)₂OH。

术语“亚磺酸基”指-S(O)OH。

- 15 术语“磷酸基”指-OP(O)₂OH。

术语“糖”指多羟基(2 个或以上)的醛类或酮类化合物或在水解后能变成以上两者之一的有机化合物。

术语“衍生物”指一种化合物分子中的原子或基团被其他原子或基团所取代而生成的产物。

- 20 术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团(即“C1-C20 烷基”)，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基(即“C1-C12 烷基”)，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基(即“C1-C10 烷基”)，进一步优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基(即“C1-C6 烷基”)，更进一步优选含有 1 至 4 个碳原子的烷基(即“C1-C4 烷基”)，最优选含有 1 至 3 个碳原子的烷基(即“C1-C3 烷基”)。“C1-C6 烷基”的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基(例如正丙基、异丙基)、丁基(例如正丁基、异丁基、叔丁基)、戊基(例如正戊基、异戊基、新戊基)等。
- 25 “C1-C4 烷基”的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基(例如正丙基、异丙基)、丁基(例如正丁基、异丁基、叔丁基)等。“C1-C3 烷基”的实例包括甲基、乙基、

丙基（例如正丙基、异丙基）等。

术语“取代”指化合物中的氢被取代基团取代，除非文中另有说明，取代基可以是选自下组的多种基团：-卤素、-OR'、-NR'R''、-SR'、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、
 5 -NR''C(O)₂R'、-NH-C(NH₂)=NH、-NR'C(NH₂)=NH、-NH-C(NH₂)=NR'、-S(O)R'、
 -S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NR'S(O)₂R''、-CN 和 -NO₂，取代基数量为 1 至(2m'+1)，
 其中 m' 为该基团中碳原子的总数。R'、R'' 和 R''' 各自独立的指代氢、未取代的
 C1-C6 烷基、未取代的 C6-C12 芳基（或 C6-C10 芳基）、由 1-3 个卤素取代的 C6-
 C12 芳基（或 C6-C10 芳基）、未取代的 C1-C6 烷氧基或 C1-C6 硫代烷氧基、或
 10 未取代的 C6-C12 芳基（或 C6-C10 芳基）C1-C6 烷基。R' 和 R'' 连接于同一个氮
 原子时，它们可与该原子一起形成 3-，4-，5-，6-或 7-元环。

术语“卤代烷基”指的是任意上述烷基（例如 C1-C20 烷基、C1-C12 烷基、C1-
 C10 烷基、C1-C6 烷基、C1-C4 烷基、C1-C3 烷基等）中的一个或多个氢原子被
 卤素（优选氟）替代得到的基团，例如，“卤代 C1-C6 烷基”的实例包括单氟甲基、
 15 二氟甲基、二氟乙基、三氟甲基等。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含
 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 12 个碳原子，更优选包含 3 至 10 个碳原子，
 进一步优选包含 3 至 8 个碳原子，最优选包含 3 至 6 个碳原子。单环环烷基的非
 限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己
 20 二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的
 环烷基。“C3-C6 环烷基”的示例如环丙基、环丁基、环戊基或环己基等。

术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至 20
 个环原子（即“3-20 元杂环基”），其中一个或多个环原子为选自氮、氧或硫的杂
 原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至
 25 12 个环原子（即“3-12 元杂环基”），其中 1~4 个是杂原子；更优选杂环基环包含
 3 至 10 个环原子（即“3-10 元杂环基”）。单环杂环基（例如，3-7 元杂环基）的
 非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基
 等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

术语“C6-C10 芳基”指具有 6-10 个碳原子的碳环芳族体系的基团，例如苯和萘。

术语“环烷基烷基”指烷基被一个或多个环烷基取代，优选被一个环烷基取代，其中烷基如上所定义，其中环烷基如上所定义。例如，C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C3-C6 环烷基 C1-C6 烷基。类似地，术语“C6-C10 芳基 C1-C6 烷基”指 C1-C6 烷基被一个或多个 C6-C10 芳基取代，优选被一个 C6-C10 芳基取代，其中烷基如上所定义，其中 C6-C10 芳基如上所定义。具体示例如“苯基 C1-C6 烷基”表示 C1-C6 烷基被一个苯基取代，具体示例如苄基。其余类似的定义可以参照前述内容进行理解。

术语“烷氧基”指-O-(烷基)，其中烷基的定义如上所述。C1-C6 烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基。术语“环烷氧基”指-O-(环烷基)，其中环烷基的定义如上所述。C3-C6 环烷氧基的非限制性实例包括：环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基或环烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“杂芳基”指芳族的杂环，通常为具有 1 至 3 个选自 N、O 或 S 的杂原子的 5-、6-、7-、8-、9-、10-元的杂环；杂芳基环可以任选地进一步稠合或连接于芳族和非芳族的碳环和杂环。

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

可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量，包括：

- (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比，
- (2) 控制反应时间和温度，
- (3) 选择不同的反应试剂。

术语“药物组合物”指含有一种或多种本文所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学或药学上可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

常规的药物组合物的制备见中国药典。

术语“载体”指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的实例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等 这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

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。

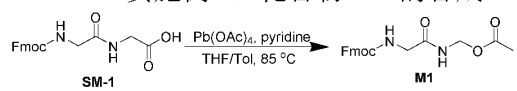
术语“受试者”包括人或非人动物。示例性人受试者包括患有疾病(例如本文所述的疾病)的人(称为患者)或正常个体。本发明中术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如非哺乳动物(例如鸟类、两栖动物、爬行动物)和哺乳动物，例如非人灵长类、家畜和/或驯化动物(例如绵羊、犬、猫、奶牛、猪等)。

术语“有效量”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药物的量。

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

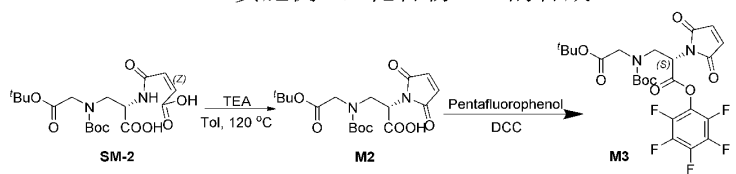
分数、比例、比率、或份数按重量计。

实施例 1: 化合物 **M1** 的合成



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

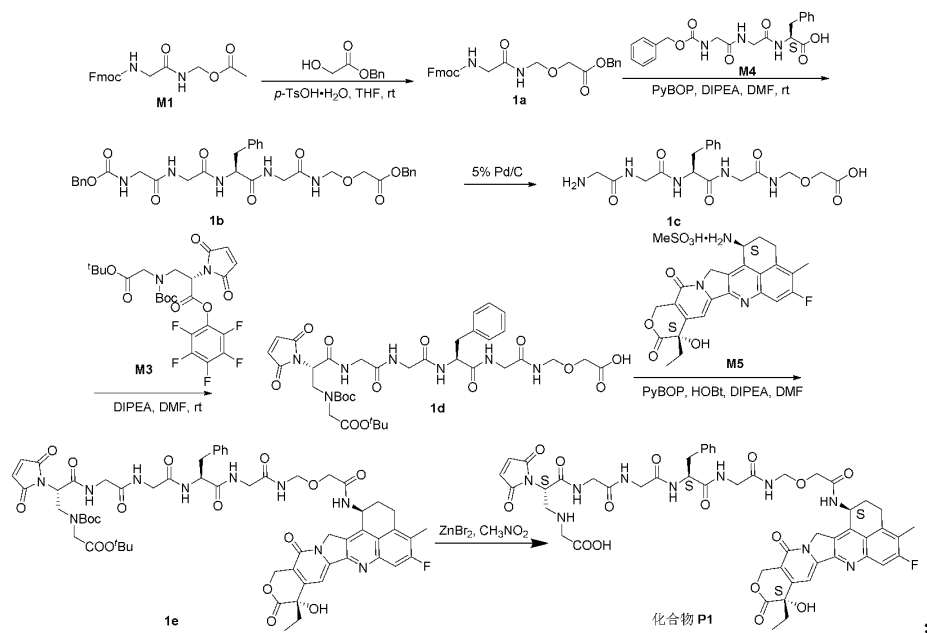
10 实施例 2: 化合物 **M3** 的合成



于 1000 mL 单口瓶中加入化合物 **SM-2**(按照专利 CN108452321A 公布的方法合成)(40 g, 96 mmol, 1.0 eq), 三乙胺(26.7 mL, 2.0 eq), 甲苯(400 mL), 升温至 120 °C 下回流反应 2h。TLC 监测基本完全反应, 降温至 50 °C 下减压旋除溶剂。
15 用乙酸乙酯(150 mL), 水(40 mL)溶解, 冰浴搅拌下用 1M HCl 调 pH 至 2-3, 分液。水层用乙酸乙酯再萃取一次, 合并有机层, 加入无水硫酸钠干燥。过滤后, 浓缩得到淡黄色油状粗品, 粗品经柱层析纯化(DCM:MeOH=40:1), 得到化合物 **M2**(26.6 g); LC-MS: $[M+H]^+=399.3$ 。

于 1000 mL 单口瓶, 加入化合物 **M2**(26.5 g, 60.5 mmol, 1.0eq)、五氟苯酚
20 (12.2 g, 66.5 mmol, 1.1 eq)、DCC(13.7 g, 66.5 mmol, 1.1 eq)及 THF(300 mL), 室温反应 30 min(采用 TLC 监测), 过滤滤去不溶物。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **M3**(31.5g), 收率 64%; LC-MS: $[M+H]^+=565.1$ 。

实施例 3: 化合物 **P1** 的合成



第一步：化合物 **1a**

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1** (6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加羟乙酸苄酯(5.4 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO₃ 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-1:1)得 **1a** (4 g)，收率 52%；LC-MS: [M+H]⁺=475.18。

第二步：化合物 1b

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

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

第三步：化合物 **1c**

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

5 第四步：化合物 **1d**

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

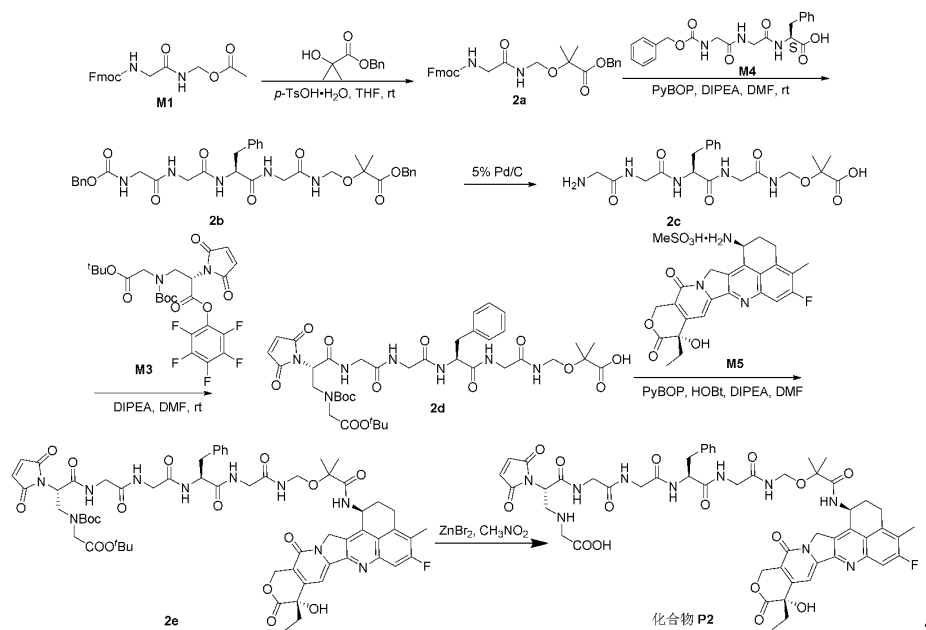
第五步：化合物 **1e**

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

15 第六步：化合物 **P1**

于 25 mL 单口瓶中加入 **1e** (100 mg, 0.081 mmol), 溴化锌(368 mg, 1.63 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P1**(60 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1065.3$ 。

20 实施例 4: 化合物 **P2** 的合成



第一步：化合物 **2a**

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

第二步：化合物 **2b**

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

另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4**(1.65 g, 4.0 mmol)，PyBOP(2.59 g, 5.0 mmol)，HOBt(675 mg, 5.0 mmol) 及 10 mL DMF，冰水浴下加入 DIPEA(823 uL, 5.04 mmol)，继续搅拌 30 min，将上述反应液加至反应瓶中，升至室温反应。HPLC 监测反应结束后，反应液经制备液相纯化，得到产品制备液，制备液经二氯甲烷萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到固体 **2b**(1.4 g)，收率 53%；LC-MS: [M+H]⁺=676.2。

第三步：化合物 **2c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **2b**(700 mg, 1.04 mmol), 10 mL DMF 溶清后, 加入 700 mg 5%Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

第四步: 化合物 **2d**

- 5 将粗产品 **2c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(210 uL, 1.25 mmol), 再加入化合物 **M3**(704 mg, 1.25 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **2d**(486 mg); LC-MS: $[M-H]^- = 830.5$ 。

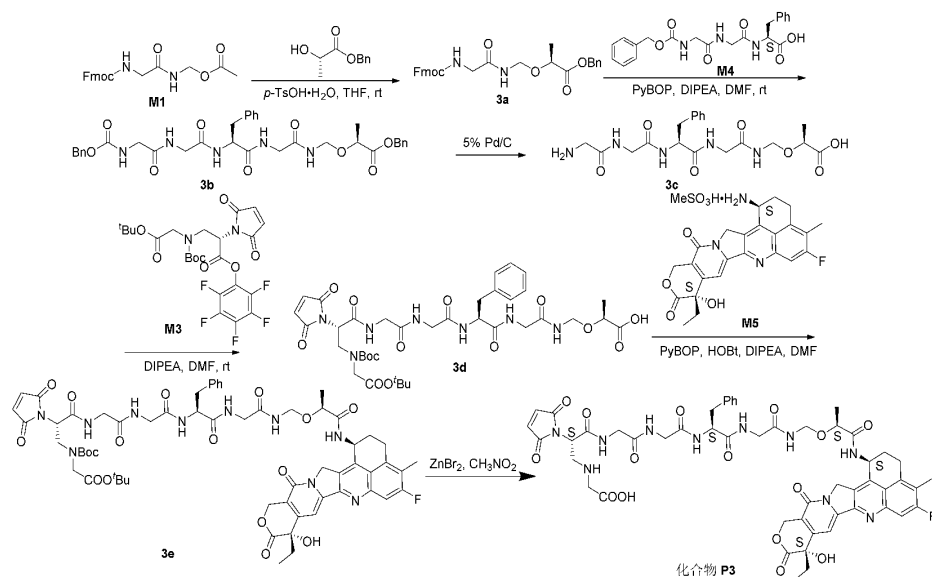
第五步: 化合物 **2e**

- 10 于 50 mL 单口瓶中加入 **2d** (300 mg, 0.36 mmol), **M5**(180 mg, 0.36 mmol), **PyBOP**(260 mg, 0.5 mmol), **HOBt**(67 mg, 0.5 mmol)及 10 mL DMF,冰水浴下加入 **DIPEA**(219.5 uL, 1.33 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **2e** 的制备液, 制备液冻干得到 **2e**(157 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1249.6$ 。

第六步: 化合物 **P2**

- 15 于 25 mL 单口瓶中加入 **2e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P2**(64 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1093.1$ 。

实施例 5: 化合物 **P3** 的合成



第一步：化合物 3a

于 25mL 单口瓶中加入 **M1**(500mg, 1.4mmol), 对甲苯磺酸一水合物(26mg, 0.1 mmol)及 10 mL THF, 搅拌均匀后, 降至 0 °C, 再缓慢加入 *L*-乳酸苄酯(1.2 g, 7.0 mmol), 加完后升至室温反应。TLC 监控, 反应结束后, 加入饱和 NaHCO₃ 溶液, 用乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经反相柱纯化得 **3a**(400mg); LC-MS: [M+NH₄]⁺=506.2。

¹H NMR(400 Mz, CDCl₃/CD₃OD):1.39 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.78 (2H, t, *J* = 4.0 Hz), 4.17-4.27 (2H, m), 4.42 (2H, d, *J* = 4.0 Hz), 4.72-4.85 (2H, m), 5.11-5.58 (2H, m), 5.43 (1H, s), 7.06 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.25-7.33 (6H, m), 7.38 (2H, t, *J*=8.0 Hz), 7.57 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.75 (2H, d, *J* = 8.0 Hz)。

第二步：化合物 3b

于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **3a**(400 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq)和 4 mL DMF, 搅拌均匀后, 降至 0 °C, 再缓慢加入 DBU(137 mg, 0.9 mmol, 1.1 eq), 加完后升至室温反应。TLC 监控, 反应结束, 记为反应液①;

另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4**(372 mg, 0.9 mmol, 1.1 eq), PyBOP(852 mg, 1.6 mmol, 2.0 eq)和 3 mL DMF, 室温搅拌 5 分钟, 加入反应液①, 室温反应, HPLC 监测。反应完毕, 反应液经高效液相纯化得化合物 **3b**(326mg); LC-MS: [M+NH₄]⁺=679.2。

第三步：化合物 **3c**

于 100mL 单口瓶中加入 **3b**(4.0 g, 6.05 mmol, 1.0 eq), DMF(60 mL)溶解, 再加入 5%Pd/C(4 g), 室温氢化反应 4 h(采用 HPLC 监测反应进程)。过滤 Pd/C, 滤液未经浓缩, 直接置于冰水浴(约 0 °C)中, 待用。

5 第四步：化合物 **3d**

将粗产品 **3c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(1.1 mL, 1.1 eq), 再加入化合物 **M3**(3.4 g, 6.05 mmol), 加毕升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **3d**(3.15g); LC-MS: $[M-H]^- = 816.3$ 。

第五步：化合物 **3e**

10 于 100 mL 单口瓶中加入 **3d**(2.07 g, 2.53 mmol, 1.0 eq), **M5**(1.35 g, 2.53 mmol, 1.0 eq), PyBOP(1.98 g, 3.79 mmol, 1.5 eq), HOBt(0.51 g, 3.79 mmol, 1.5 eq)及 DMF(40 mL), 冰水浴下加入 DIPEA(1.05 mL, 1.5 eq), 升至室温反应 2 h(采用 HPLC 监测)。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **3e**(1.92 g), 收率 61%; LC-MS: $[M+H]^+ = 1235.4$ 。

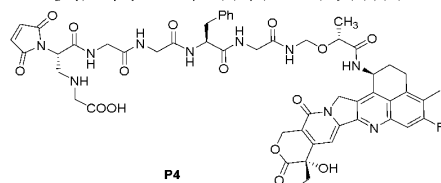
15 第六步：化合物 **P3**

于 100mL 单口瓶中加入化合物 **3e**(1.0 g, 0.8 mmol, 1.0 eq), 35 mL 硝基甲烷, 溶解后再加入溴化锌(3.64 g, 16 mmol, 20.0 eq), 油浴 40 °C(提前预热稳定)反应 30 min, 水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去硝基甲烷, 得黄色残余物固体(采用 HPLC 监测)。经酸法制备, 得到化合物 **5A** 的制备液, 制备液经水泵减压水浴 35 °C 浓缩
20 旋除乙腈, 冻干得到化合物 **P3**(786 mg)收率 90%。LC-MS: $[M+H]^+ = 1079.4$;
 ^1H NMR (400 MHz, $d_6\text{DMSO}$) δ 9.39- 9.02 (m, 1H), 8.70 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.64 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.34 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.01 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.28 – 7.15 (m, 4H), 7.14 (s, 2H), 5.53 (dd, $J = 14.5, 6.4$ Hz, 1H), 5.49 – 5.34 (m, 2H), 5.22 (d, $J = 18$
25 .8 Hz, 1H), 5.09 (d, $J = 18.7$ Hz, 1H), 5.03 (dd, $J = 9.6, 3.9$ Hz, 1H), 4.73 (dd, $J = 9.9, 6.9$ Hz, 1H), 4.59 (dd, $J = 10.1, 6.5$ Hz, 1H), 4.49 (ddd, $J = 13.2, 8.6, 4.4$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J = 13.3, 6.6$ Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.84 (dd, $J = 16.5, 6.3$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J = 16.9, 5.7$ Hz, 2H), 3.70 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.60 (dd, $J = 16.7, 5.4$ Hz, 1H), 3.52 (dd

, $J = 16.4, 5.1$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 12.8, 10.1$ Hz, 1H), 3.25 – 3.15 (m, 1H), 3.14 – 3.05 (m, 1H), 3.01 (dd, $J = 13.7, 4.1$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz, 1H), 2.54 – 2.47 (m, 1H), 2.33 (s, 2H), 2.17 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.33 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H)。

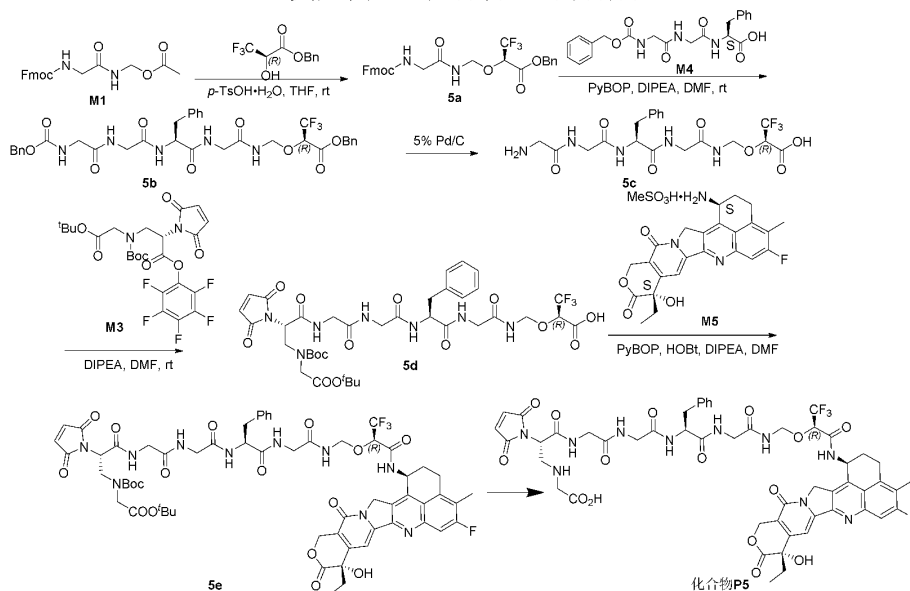
5

实施例 6: 化合物 **P4** 的合成



参考实施例 5 的合成路线, 制备化合物 **P4** (468 mg)。LC-MS: $[M+H]^+ = 1079.6$ 。

实施例 7: 化合物 **P5** 的合成



10 第一步: 化合物 **5a**

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

15

第二步: 化合物 **5b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **5a** (5 g, 9.2 mmol) 及 15 mL DMF, 溶清后, 冰水浴

下, 加入 DBU(1.68 g, 11 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

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

第三步: 化合物 **5d**

于 25 mL 单口瓶中加入 **5b**(900 mg, 1.26 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入
10 900 mg 5%Pd/C, 氢化反应 2h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(228 μ L, 1.38 mmol), 再加入 **M3**(712 mg, 1.26 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 525 mg, 收率 47.9%; LC-MS: $[M-H]^-=870.33$ 。

第四步: 化合物 **5e**

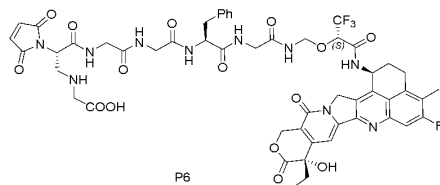
于 50 mL 单口瓶中加入 **5d**(500 mg, 0.57 mmol), **M5**(305 mg, 0.57 mmol),
15 PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBt(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **5e** 的制备液, 制备液冻干得到 150 mg 化合物 **5e**, LC-MS: $[M+H]^+=1289.46$ 。

20 第五步: 化合物 **P5**

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

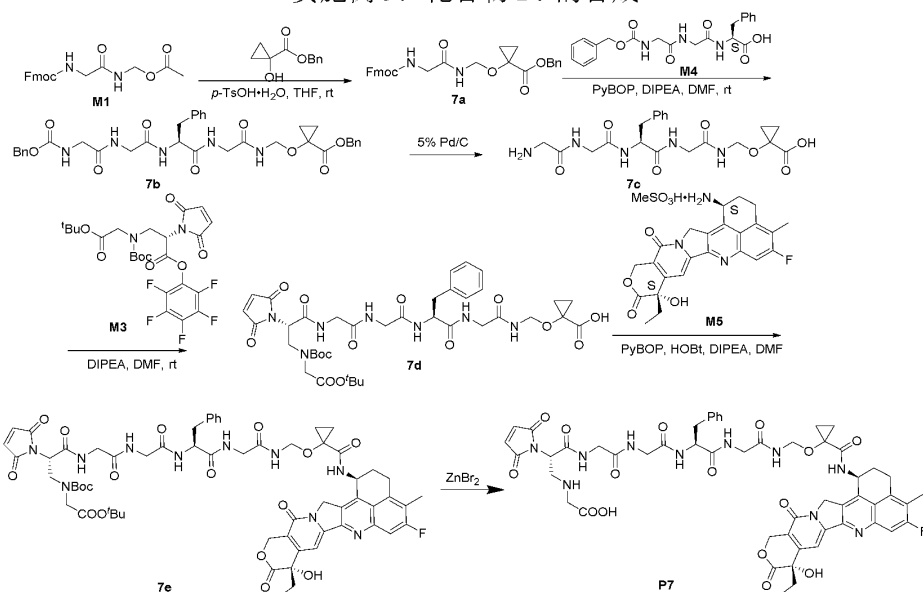
25

实施例 8: 化合物 **P6** 的合成



参考实施例 7 的合成路线, 制备化合物 **P6**(221 mg)。LC-MS: $[M+H]^+=1133.5$ 。

实施例 9: 化合物 **P7** 的合成



第一步: 化合物 **7a**

- 5 于 250 mL 单口瓶中, 加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol), 100 mL THF, 对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol), 搅拌冷却至 0 °C, 滴加 2-羟基-2-环丙基乙酸苄酯(参照专利 US20050020645 A1 公布的方法制备)(6.3 g, 32.6 mmol), 滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h), TLC 监控。反应结束, 加入饱和 NaHCO_3 溶液, 用乙酸乙酯萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **7a** (3.7 g), 收率 45%; LC-MS: $[M+H]^+=501.5$ 。
- 10 第二步: 化合物 **7b**

于 25 mL 单口瓶, 加入 **7a**(2 g, 4.0 mmol), 10 mL DMF, 0 °C 搅拌, 加入 DBU(760 mg, 5.0 mmol), 反应 1 h, TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后, 待用;

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

第三步：化合物 **7c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **7b**(900 mg, 1.3 mmol), 10 mL DMF 溶清后, 加入 900 mg 5%Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

5 第四步：化合物 **7d**

将粗产品 **7c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(223 uL, 1.3 mmol), 再加入化合物 **M3**(750 mg, 1.3 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **7d**(529 mg); LC-MS: $[M-H]^- = 828.4$ 。

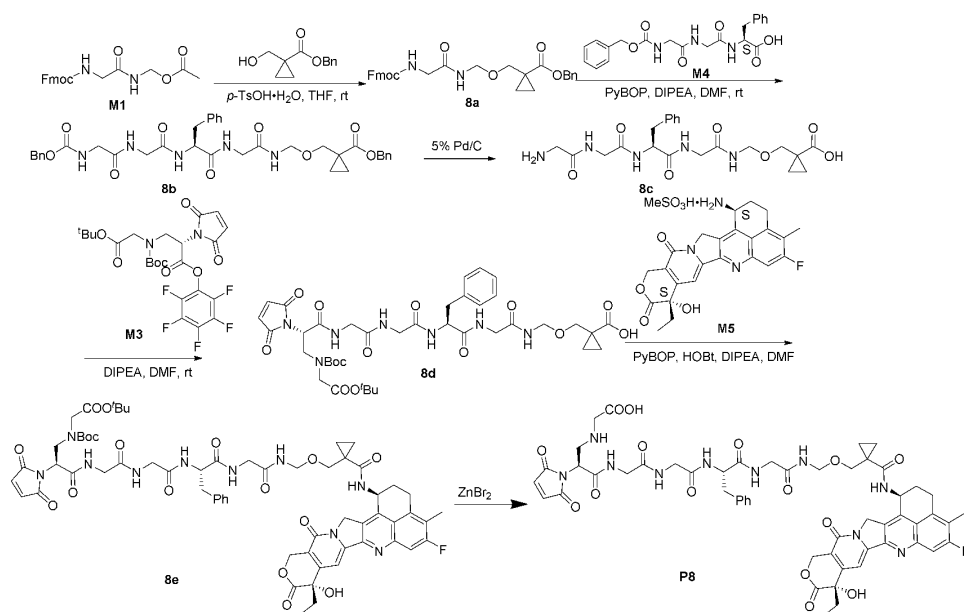
第五步：化合物 **7e**

10 于 50 mL 单口瓶中加入 **7d** (500 mg, 0.6 mmol), **M5**(300 mg, 0.6 mmol), PyBOP(416 mg, 0.8 mmol), HOBT(108 mg, 0.5 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(351 uL, 2.13 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **7e** 的制备液, 制备液冻干得到 **7e**(257 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1247.5$ 。

15 第六步：化合物 **P7**

于 25 mL 单口瓶中加入 **7e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P7**(55 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1091.3$ 。

20 实施例 10: 化合物 **P8** 的合成



第一步：化合物 **8a**

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加 3-羟基-2-环丙基丙酸苄酯 (参照专利 WO2013187496A1 公布的方法制备，6.7 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO₃ 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **8a** (4.9 g)，收率 58%；LC-MS: [M+H]⁺=515.4。

第二步：化合物 **8b**

于 25 mL 单口瓶，加入 **8a**(4 g, 7.8 mmol)，10 mL DMF，0 °C 搅拌，加入 DBU(1.2 g, 8.0 mmol)，反应 1 h，TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后，待用；

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

第三步：化合物 **8c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **8b**(1.0 g, 1.45 mmol)，15 mL DMF 溶清后，加入 1.0

g 5%Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

第四步: 化合物 **8d**

将粗产品 **8c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(258 uL, 1.5 mmol), 再加入化合物 **M3**(837 mg, 1.45 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **10d**(499 mg); LC-MS: $[M-H]^- = 842.4$ 。

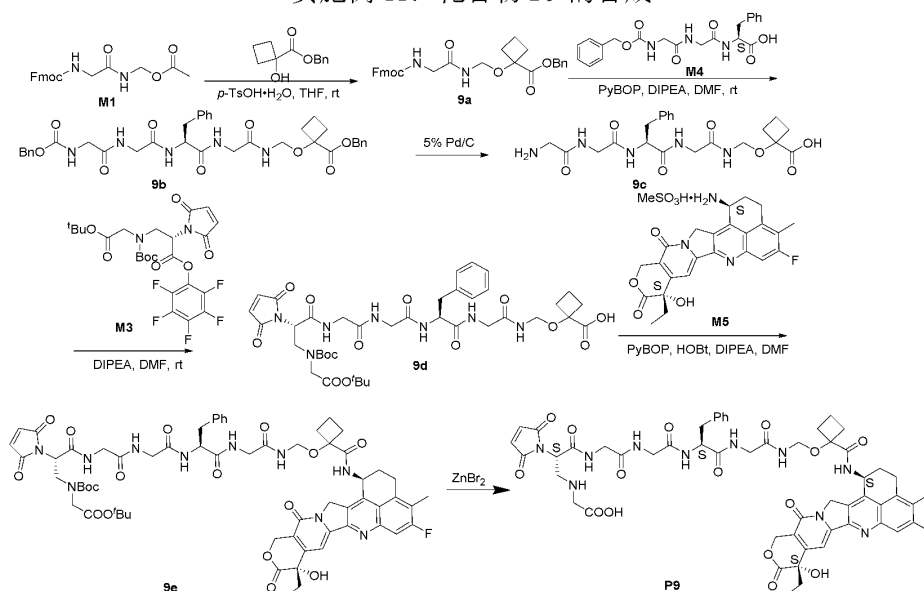
第五步: 化合物 **8e**

于 50 mL 单口瓶中加入 **8d** (400 mg, 0.48 mmol), **M5**(240 mg, 0.48 mmol), PyBOP(250 mg, 0.48 mmol), HOBt(104 mg, 0.48 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 uL, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **8e** 的制备液, 制备液冻干得到 **8e**(188 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1261.5$ 。

第六步: 化合物 **P8**

于 25 mL 单口瓶中加入 **8e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P8**(61 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1105.6$ 。

实施例 11: 化合物 **P9** 的合成



第一步：化合物 **9a**

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加 2-羟基-2-环丁基乙酸苄酯(参照文献 *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, 56(13), 5541-5552.公布的方法合成，6.7 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO₃ 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **9a**(5.1 g)，收率 62%；LC-MS: [M+H]⁺=515.7。

第二步：化合物 **9b**

于 25 mL 单口瓶，加入 **9a**(4 g, 7.8 mmol)，10 mL DMF，0 °C 搅拌，加入 DBU(1.2 g, 8.0 mmol)，反应 1 h，TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后，待用；

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

第三步：化合物 **9c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **9b**(2.0 g, 2.9 mmol)，25 mL DMF 溶清后，加入 2.0 g 5%Pd/C，氢化反应 3 h，反应完毕，过滤，得滤液，未经纯化直接用于下一步反应。

第四步：化合物 **9d**

将粗产品 **9c** 置于冰水浴中，加入 DIPEA(516 uL, 3.0 mmol)，再加入化合物 **M3**(1.7 g, 2.9 mmol)，加毕升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕，反应液经高效液相纯化，得到制备液，制备液冻干得到 **9d**(934 mg)；LC-MS: [M-H]⁻=842.4。

第五步：化合物 **9e**

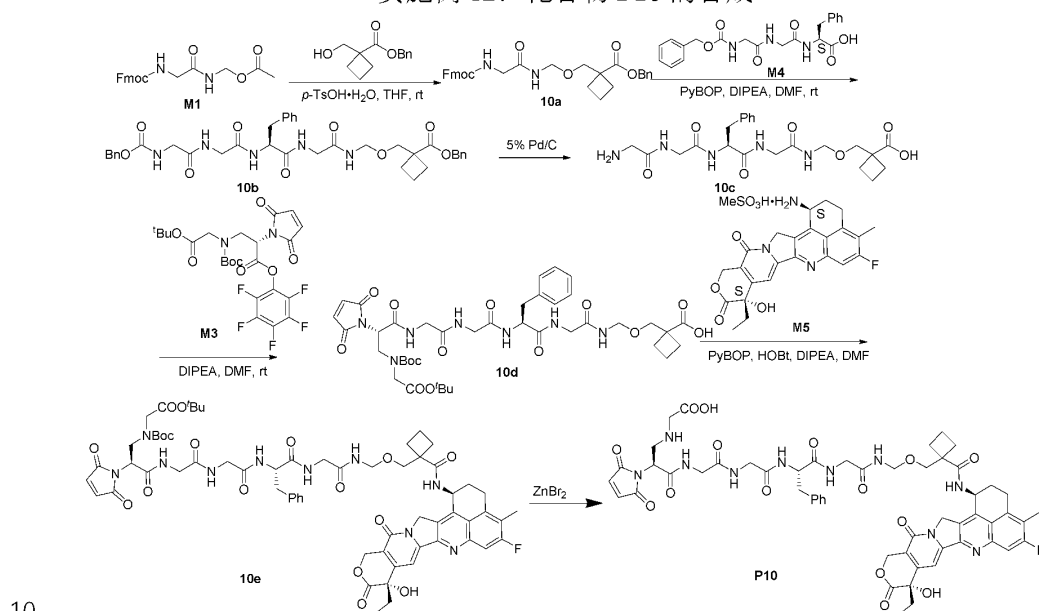
于 50 mL 单口瓶中加入 **9d** (800 mg, 0.96 mmol)，**M5**(480 mg, 0.96 mmol)，PyBOP(500 mg, 0.96 mmol)，HOBt(208 mg, 0.96 mmol)及 30 mL DMF，冰水浴下

加入 DIPEA(660 uL, 4.0 mmol), 升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **9e** 的制备液, 制备液冻干得到 **9e**(401 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1261.4$ 。

第六步: 化合物 **P9**

5 于 25 mL 单口瓶中加入 **9e** (150 mg, 0.12 mmol), 溴化锌(532 mg, 2.4 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P9**(86 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1105.5$ 。

实施例 12: 化合物 **P10** 的合成



第一步: 化合物 **10a**

于 250 mL 单口瓶中, 加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol), 100 mL THF, 对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol), 搅拌冷却至 0 °C, 滴加 3-羟基-2-环丁基丙酸苄酯(参照专利 WO2009011285A1 公布的方法制备, 7.2 g, 32.6 mmol), 滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h), TLC 监控。反应结束, 加入饱和 NaHCO_3 溶液, 用乙酸乙酯萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **10a** (4.5 g), 收率 52%; LC-MS: $[M+H]^+=529.4$ 。

第二步: 化合物 **10b**

于 25 mL 单口瓶, 加入 **10a**(4 g, 7.6 mmol), 10 mL DMF, 0 °C 搅拌, 加入

DBU(1.2 g, 8.0 mmol), 反应 1 h, TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后, 待用;

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

第三步: 化合物 **10c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **10b**(1.0 g, 1.43 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 1.0
10 g 5%Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步
反应。

第四步: 化合物 **10d**

将粗产品 **10c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(258 uL, 1.5 mmol), 再加入化合物
M3(825 mg, 1.43 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液
15 经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **10d**(522 mg); LC-MS: $[M-H]^-=856.4$ 。

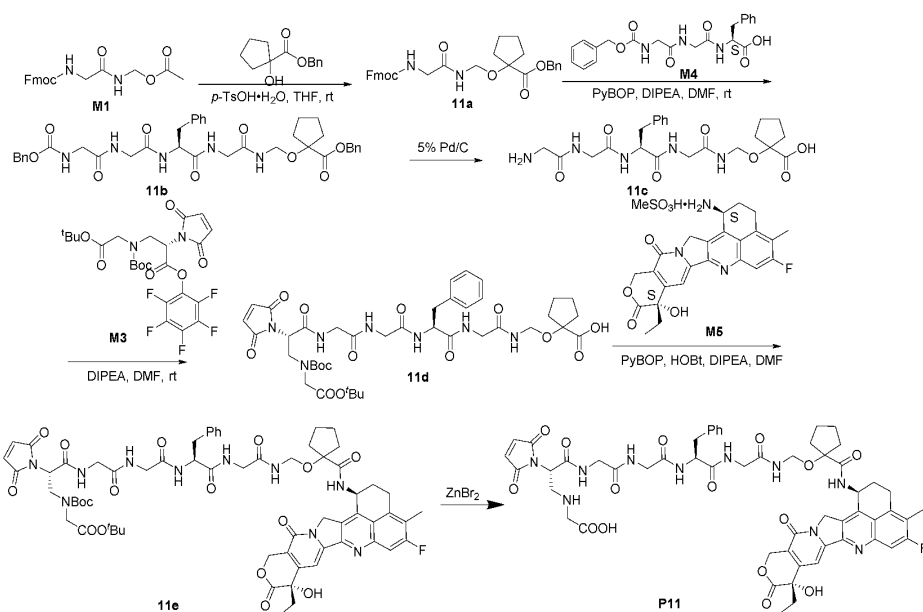
第五步: 化合物 **10e**

于 50 mL 单口瓶中加入 **10d** (400 mg, 0.47 mmol), **M5**(240 mg, 0.47 mmol),
PyBOP(250 mg, 0.47 mmol), HOBt(101 mg, 0.47 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下
加入 DIPEA(330 uL, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反
20 应液经高效液相纯化, 得化合物 **10e** 的制备液, 制备液冻干得到 **10e**(198 mg);
LC-MS: $[M+H]^+=1275.4$ 。

第六步: 化合物 **P10**

于 25 mL 单口瓶中加入 **10e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol)
及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶
25 剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合
物 **P10**(55 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.5$ 。

实施例 13: 化合物 **P11** 的合成



第一步：化合物 11a

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加 2-羟基-2-环戊基乙酸苄酯 (参照文献 *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56(13), 5541-5552. 公布的方法合成)(7.2 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO₃ 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **11a** (4.6 g)，收率 53%；LC-MS: [M+H]⁺=529.5。

第二步：化合物 11b

于 25 mL 单口瓶，加入 **11a**(4 g, 7.6 mmol)，10 mL DMF，0 °C 搅拌，加入 DBU(1.17 g, 7.8 mmol)，反应 1 h，TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后，待用；

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

第三步：化合物 11c

于 25 mL 单口瓶中加入 **11b**(1.5 g, 1.87 mmol), 25 mL DMF 溶清后, 加入 1.5 g 5%Pd/C, 氢化反应 3 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

第四步: 化合物 **11d**

- 5 将粗产品 **11c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(333 uL, 1.93 mmol), 再加入化合物 **M3**(1.1 g, 1.87 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得到制备液, 制备液冻干得到 **11d**(519 mg); LC-MS: $[M-H]^- = 856.6$ 。

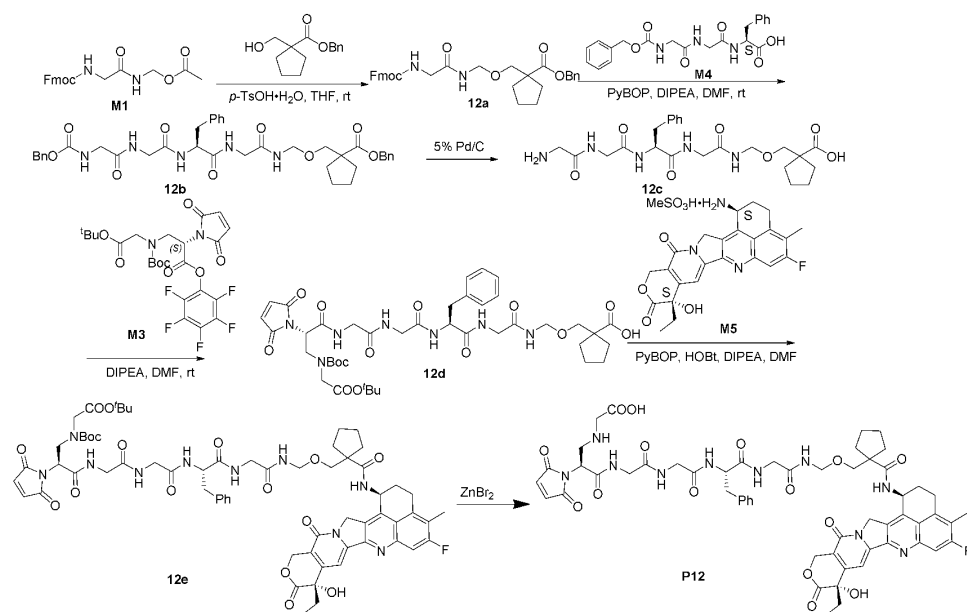
第五步: 化合物 **11e**

- 10 于 50 mL 单口瓶中加入 **11d** (400 mg, 0.47 mmol), **M5**(240 mg, 0.48 mmol), **PyBOP**(250 mg, 0.48 mmol), **HOBt**(103 mg, 48 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 uL, 2.0 mmol), 升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **11e** 的制备液, 制备液冻干得到 **11e**(187 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1275.5$ 。

- 15 第六步: 化合物 **P11**

于 25 mL 单口瓶中加入 **11e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(355 mg, 0.16 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P11**(60 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1119.7$ 。

- 20 实施例 14: 化合物 **P12** 的合成



第一步：化合物 **12a**

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加 3-羟基-2-环戊基丙酸苄酯(7.6 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO₃ 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **12a** (4.4 g)，收率 49%；LC-MS: [M+H]⁺=543.6。

第二步：化合物 **12b**

于 25 mL 单口瓶，加入 **12a**(4 g, 7.4 mmol)，10 mL DMF，0 °C 搅拌，加入 DBU(1.2 g, 8.0 mmol)，反应 1 h，TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后，待用；

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

第三步：化合物 **12c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **12b**(1.0 g, 1.4 mmol)，15 mL DMF 溶清后，加入 1.0

g 5%Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

第四步: 化合物 **12d**

将粗产品 **12c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(248 uL, 1.5 mmol), 再加入化合物 **M3**(808 mg, 1.4 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **12d**(500 mg); LC-MS: $[M-H]^- = 870.5$ 。

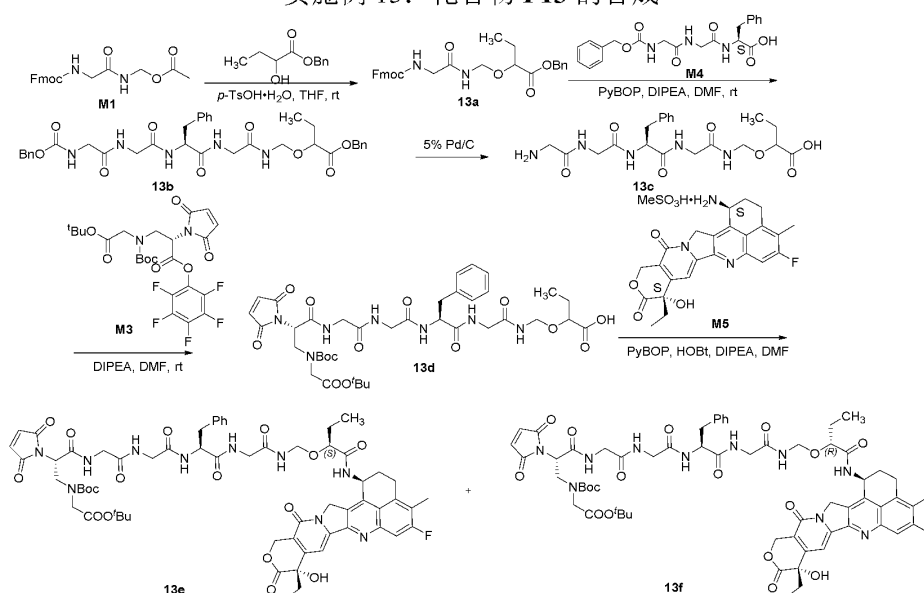
第五步: 化合物 **12e**

于 50 mL 单口瓶中加入 **12d** (400 mg, 0.46 mmol), **M5**(235 mg, 0.46 mmol), PyBOP(245 mg, 0.46 mmol), HOBt(99 mg, 0.46 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(331 uL, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **12e** 的制备液, 制备液冻干得到 **12e**(146 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1289.5$ 。

第六步: 化合物 **P12**

于 25 mL 单口瓶中加入 **12e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P12**(52 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1133.7$ 。

实施例 15: 化合物 **P13** 的合成



第一步：化合物 **13a**

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

第二步：化合物 **13b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **13a**(5 g, 9.95 mmol)及 15 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DBU(1.68 g, 11 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

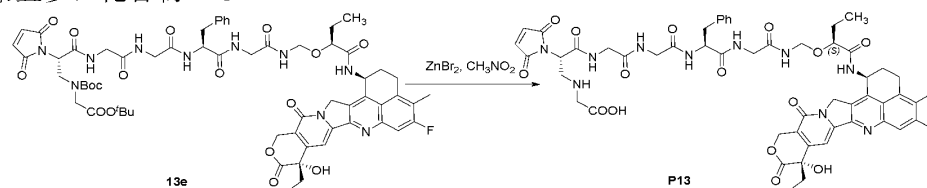
10 另取 50 mL 单口瓶, 加入 **M4**(4.1 g, 10.0 mmol), PyBOP(5.75 g, 11 mmol), HOBt(1.49 g, 11 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DIPEA(1.82 mL, 11 mmol), 继续反应 40 min, 加入反应液①, 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应进程, 反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液。制备液经二氯甲烷萃取、饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩得到固体 4.6 g, 收率 68%;
15 LC-MS: $[M+H]^+=676.7$ 。

第三步：化合物 **13d**

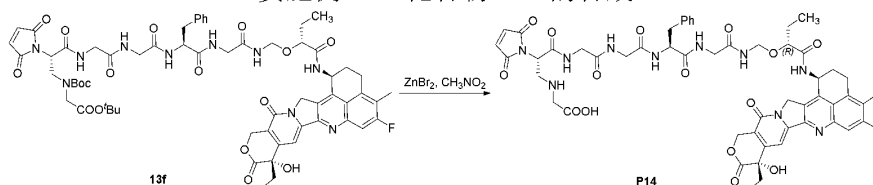
于 25 mL 单口瓶中加入 **13b**(2.0 g, 2.96 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 2.0 g 5%Pd/C, 氢化反应 2h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(496 uL, 3.0 mmol), 再加入 **M3**(1.7 g, 2.96 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监
20 测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 1120.0 mg, 收率 45%; LC-MS: $[M-H]^-=830.3$ 。

第四步：化合物 **13e** 和 **13f**

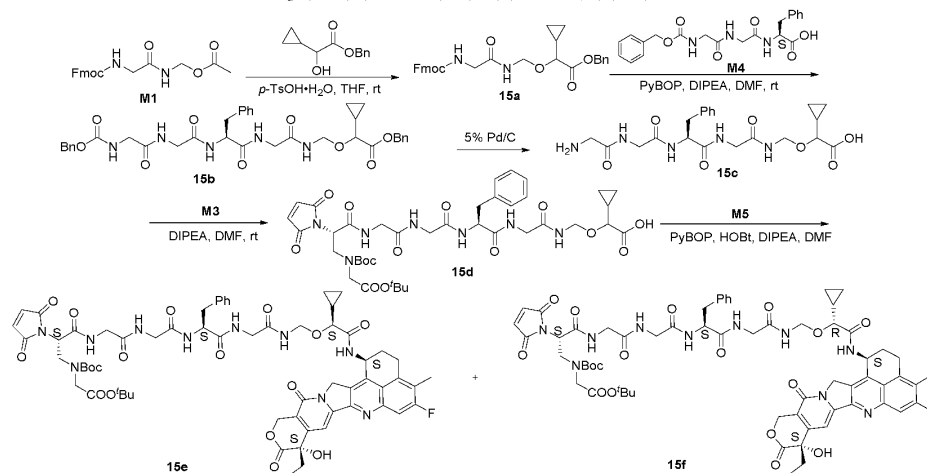
于 50 mL 单口瓶中加入 **13d**(500 mg, 0.60 mmol), **M5**(321 mg, 0.60 mmol), PyBOP(469 mg, 0.90 mmol), HOBt(121 mg, 0.90mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加
25 入 DIPEA(446 uL, 2.7 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **13e** 和化合物 **13f** 的制备液, 制备液分别冻干得到 138 mg 化合物 **13e**, LC-MS: $[M+H]^+=1249.5$; 140 mg 化合物 **13f**, LC-MS: $[M+H]^+=1249.5$ 。

第五步：化合物 **P13**

于 25 mL 单口瓶中加入 **13e**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 59 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1093.8$ 。

实施例 16: 化合物 **P14** 的合成

于 25 mL 单口瓶中加入 **13f**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 60 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1093.7$ 。

实施例 17: 化合物 **P15** 的合成第一步：化合物 **15a**

于 250 mL 单口瓶中加入 **M1**(10 g, 27.1 mmol), 2-环丙基-2-羟基乙酸苄酯(参照专利 WO2020244657A1 公布的方法制备)(11.2 g, 54.3 mmol), 醋酸锌(9.96 g,

54.3 mmol)及 100 mL 甲苯, 加热至 100 °C反应 4 h。反应完毕, 降至室温, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得到目标物 4.97 g, 收率 36%; LC-MS: $[M+H]^+=515.2$ 。

第二步: 化合物 **15b**

5 于 50 mL 单口瓶中加入 **15a**(4 g, 7.8 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DBU(1.42 g, 9.3 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

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

10

第三步: 化合物 **15d**

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

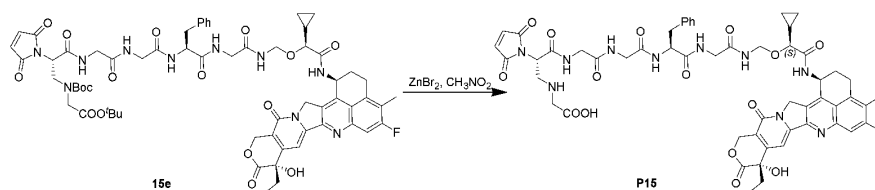
15

第四步: 化合物 **15e** 和 **15f**

20 于 50 mL 单口瓶中加入 **15d**(500 mg, 0.59 mmol), **M5**(317 mg, 0.59 mmol), PyBOP(339 mg, 0.65 mmol), HOBT(88 mg, 0.86 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(292 uL, 1.77 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **15e** 和化合物 **15f** 的制备液, 制备液分别冻干得到 112mg 化合物 **15e**, LC-MS: $[M+H]^+=1261.5$; 131 mg 化合物 **15f**, LC-MS: $[M+H]^+=1261.5$ 。

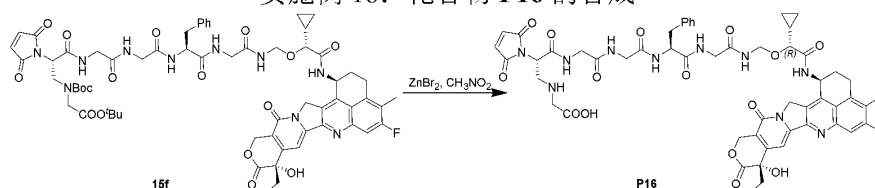
25

第五步: 化合物 **P15**



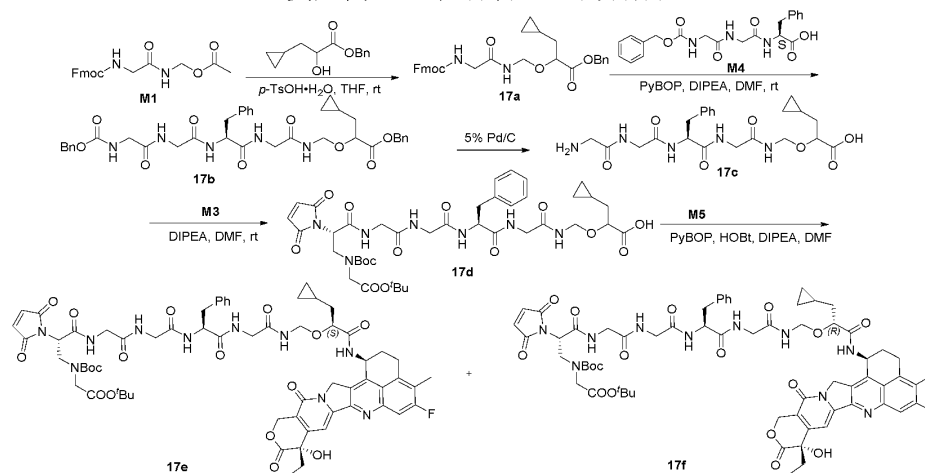
于 25 mL 单口瓶中加入 **15e**(100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 55 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1105.5$ 。

实施例 18: 化合物 **P16** 的合成



于 25 mL 单口瓶中加入 **15f**(100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 58 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1105.6$ 。

实施例 19: 化合物 **P17** 的合成



15 第一步: 化合物 **17a**

于 250 mL 单口瓶中加入 **M1**(10 g, 27.1 mmol), 2-羟基-环丙基丙酸苄酯(参照专利 WO2020063676A 公布的方法合成)(12.0 g, 54.3 mmol), 醋酸锌(9.96 g, 54.3

mmol)及 100 mL 甲苯, 加热至 100 °C 反应 4 h。反应完毕, 降至室温, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得到目标物 5.09 g; LC-MS: $[M+H]^+=529.2$ 。

第二步: 化合物 **17b**

5 于 50 mL 单口瓶中加入 **17a**(4 g, 7.6 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DBU(1.39 g, 9.1 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

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

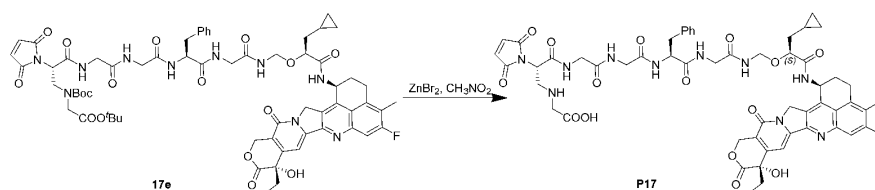
第三步: 化合物 **17d**

15 于 25 mL 单口瓶中加入 **17b**(1000 mg, 1.42 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 1000 mg 5%Pd/C, 氢化反应 2 h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(248 μ L, 1.5 mmol), 再加入 **M3**(708 mg, 1.42 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 443 mg, 收率 36%; LC-MS: $[M-H]^-=856.4$ 。

第四步: 化合物 **17e** 和 **17f**

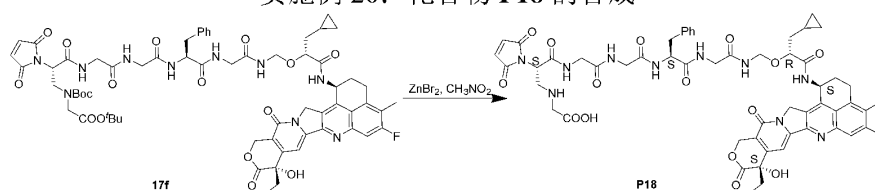
20 于 50 mL 单口瓶中加入 **17d**(400 mg, 0.47 mmol), **M5** 依喜替康甲磺酸盐 (250 mg, 0.47 mmol), PyBOP(223 mg, 0.56 mmol), HOBt(83 mg, 0.56 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(248 μ L, 1.5 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **17e** 和化合物 **17f** 的制备液, 制备液分别冻干得到 103mg 化合物 **17e**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$; 103 mg 化合物 **17f**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$ 。

第五步: 化合物 **P17**



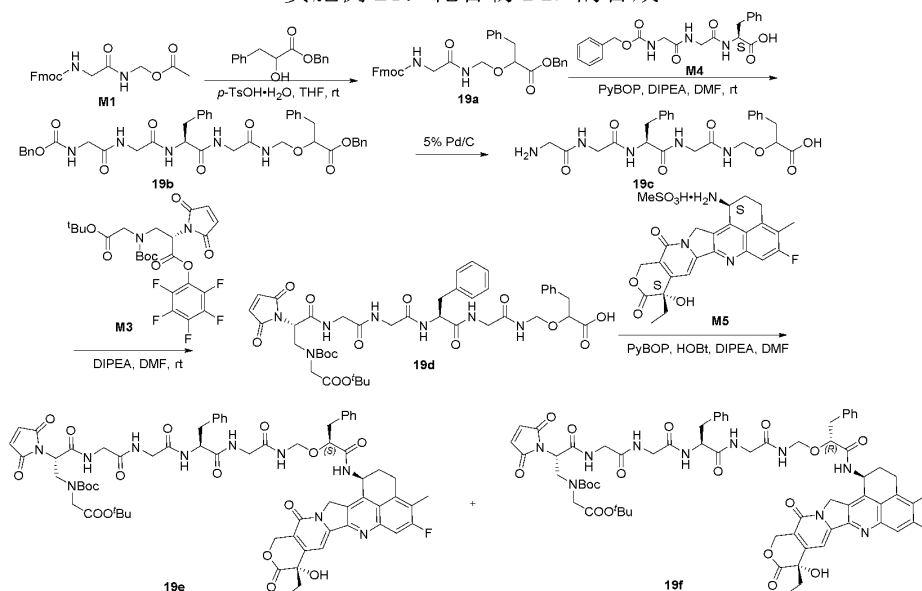
于 25 mL 单口瓶中加入 **17e**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.57 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 51 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.7$ 。

实施例 20: 化合物 **P18** 的合成



于 25 mL 单口瓶中加入 **17f**(100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 47 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.6$ 。

实施例 21: 化合物 **P19** 的合成



第一步: 化合物 **19a**

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

第二步: 化合物 **19b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **19a**(5 g, 8.86 mmol)及 15 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DBU(1.53 g, 10 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

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

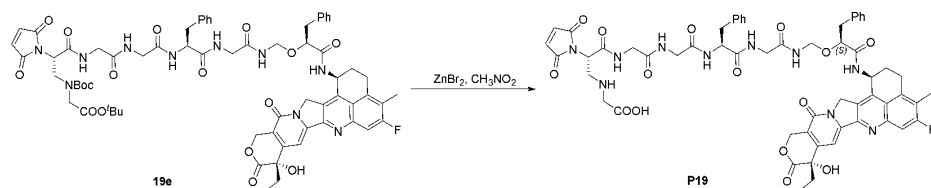
第三步: 化合物 **19d**

于 25 mL 单口瓶中加入 **19b**(3.0 g, 4.07 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 3.0 g 5%Pd/C, 氢化反应 2h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(744 uL, 4.5 mmol), 再加入 **M3**(2.34 g, 4.07 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 1.2 g, 收率 33%; LC-MS: $[M-H]^-=892.4$ 。

第四步: 化合物 **19e** 和 **19f**

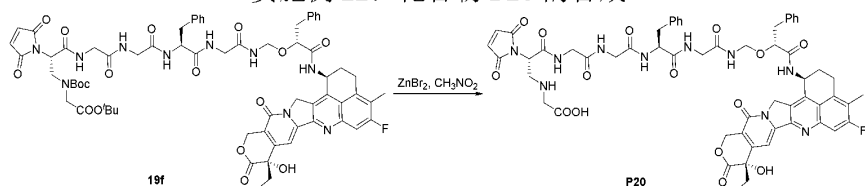
于 50 mL 单口瓶中加入 **19d**(500 mg, 0.56 mmol), **M5**(300 mg, 0.56 mmol), PyBOP(438 mg, 0.84 mmol), HOBt(113 mg, 0.84 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 uL, 2.0 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **19e** 和化合物 **19f** 的制备液, 制备液分别冻干得到 156 mg 化合物 **19e**, LC-MS: $[M+H]^+=1311.6$; 150 mg 化合物 **19f**, LC-MS: $[M+H]^+=1311.7$ 。

第五步: 化合物 **P19**



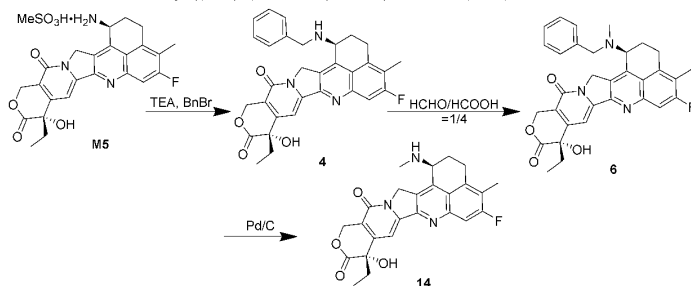
于 25 mL 单口瓶中加入 **19e**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 43 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1155.7$ 。

实施例 22: 化合物 **P20** 的合成



于 25 mL 单口瓶中加入 **19f**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 40 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1155.8$ 。

实施例 23: 化合物 **14** 的合成



第一步: 化合物 **4** 的合成

向伊喜替康甲磺酸盐 **M5** (15 g, 28 mol, 采用专利申请“EP0737683A1”所公开的方法制备) 中加入 400 mL DMF, 冰水浴冷却至 0°C, 滴加三乙胺, 调节 pH 至 7-8, 冰水浴下滴加溴化苄 (9.6 g, 56 mmol), 升温至室温 (25°C) 下反应 1 小时, TLC 监测反应完全, 反应液减压浓缩, 所得粗产品经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **4** 约 11 g, 黄色固体, 收率约 74%, MS m/z : $[M+H]^+=526.3$ 。

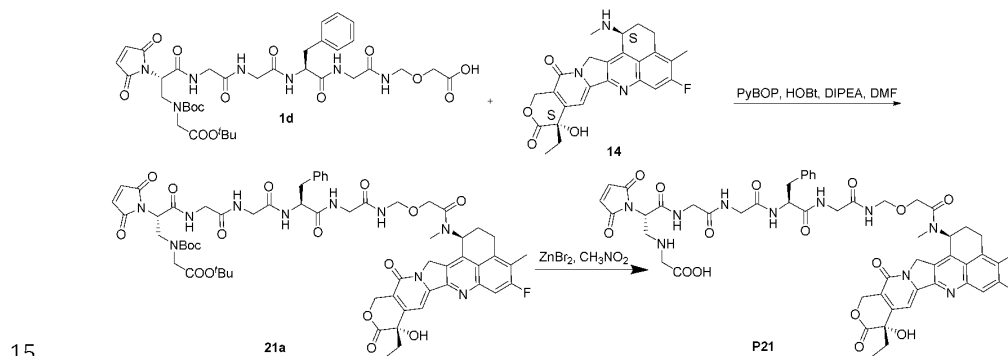
第二步：化合物 **6** 的合成

室温下，于 250 mL 单口瓶中依次加入化合物 **4** (11 g, 21 mol), 120 mL 甲酸溶解，向所得亮黄色溶液中加入 30 mL 甲醛 (40%水溶液)，升温至 50°C 下反应 1 小时后，TLC 监测反应完全，冷却至室温，反应液经制备级高效液相色谱法
5 纯化 (乙腈/纯水体系)，收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **6** 约 4.5 g，黄色粉末状固体，收率约 40%，MS m/z : $[M+H]^+$ 540.6。

第三步：化合物 **14** 的合成：

室温下，于 250 mL 单口瓶中加入化合物 **6** (2.3 g, 4.3 mol)，加入 100 mL DMF 溶解，向所得亮黄色溶液中加入 2.3 g 5% Pd/C，氢气气球置换体系内气氛，
10 维持室温下反应 1.5 小时后，HPLC 监测反应完全，过滤除去 Pd/C，所得反应液浓缩后，经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系)，收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **14** 约 1.0 g，黄色粉末状固体，收率约 52%，MS m/z : $[M+H]^+$ 450.5。

实施例 24：化合物 **P21** 的合成



第一步：化合物 **21a**

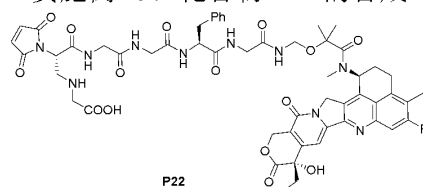
于 50 mL 单口瓶中加入 **1d** (500 mg, 0.62 mmol)，**14** (279 mg, 0.62 mmol)，PyBOP (448 mg, 0.86 mmol)，HOBT (116 mg, 0.86 mmol) 及 15 mL DMF，冰水浴下加入 DIPEA (378 μ L, 2.29 mmol)，升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后，反
20 应液经高效液相纯化，得制备液，制备液冻干得到 **21a** (166 mg)；LC-MS: $[M+H]^+$ = 1235.6。

第二步：化合物 **P21**

于 25 mL 单口瓶中加入 **21a** (100 mg, 0.081 mmol)，溴化锌 (368 mg, 1.63 mmol)

及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P21**(43 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1079.5$ 。

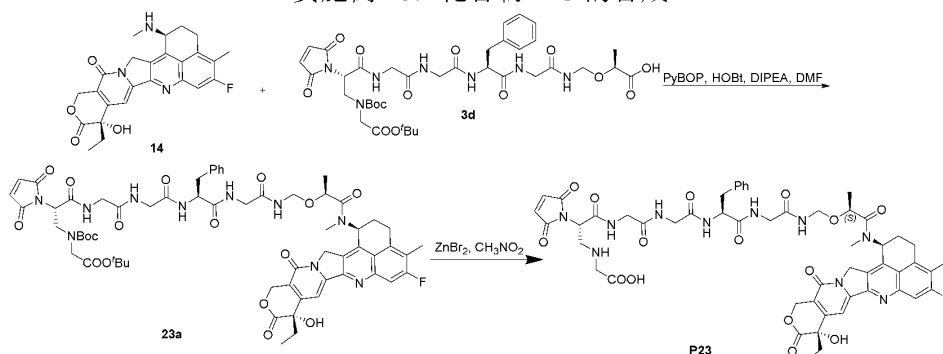
实施例 25: 化合物 **P22** 的合成



5

化合物 **2d** 与化合物 **14** 参照实施例 24 的路线, 制备 73 mg 化合物 **P22**; LC-MS: $[M+H]^+=1107.6$ 。

实施例 26: 化合物 **P23** 的合成



10 第一步: 化合物 **23a**

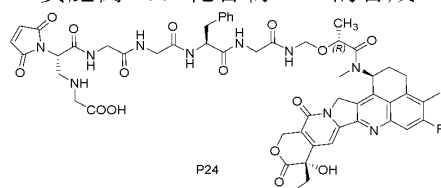
于 100 mL 单口瓶中加入 **3d**(1.66 g, 2.02 mmol, 1.0 eq), **14**(0.91 g, 2.02 mmol, 1.0 eq), PyBOP(1.58 g, 3.03 mmol, 1.5 eq), HOBT(0.41 g, 3.03 mmol, 1.5 eq)及 DMF(40 mL), 冰水浴下加入 DIPEA(0.84 mL, 1.5 eq), 升至室温反应 2 h(采用 HPLC 监测)。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **23a**(1.21 g); LC-MS: $[M+H]^+=1249.4$ 。

15

第二步: 化合物 **P23**

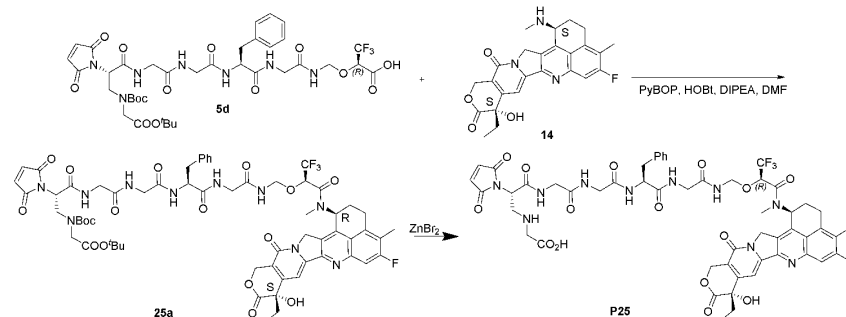
于 100mL 单口瓶中加入化合物 **23a**(1.0 g, 0.8 mmol, 1.0 eq), 35 mL 硝基甲烷, 溶解后再加入溴化锌(3.64 g, 16 mmol, 20.0 eq), 油浴 40 °C(提前预热稳定)反应 30 min, 水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去硝基甲烷, 得黄色残余物固体(采用 HPLC 监测)。经酸法制备, 得到制备液, 制备液经水泵减压水浴 35 °C 浓缩旋除乙腈, 冻干得到化合物 **P23**(786 mg), LC-MS: $[M+H]^+=1093.6$ 。

20

实施例 27: 化合物 **P24** 的合成

化合物 **14** 参照实施例 26 的路线, 制备 677 mg 化合物 **P24**; LC-MS: $[M+H]^+=1093.7$ 。

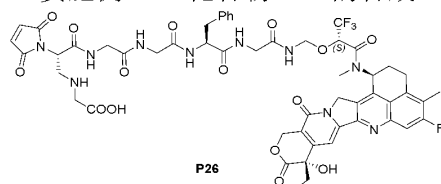
5

实施例 28: 化合物 **P25** 的合成第一步: 化合物 **25a**

于 50 mL 单口瓶中加入 **5d**(500 mg, 0.57 mmol), **14**(256.8 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBT(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **25a** 的制备液, 制备液冻干得到 313 mg 化合物 **25a**, LC-MS: $[M+H]^+=1303.6$ 。

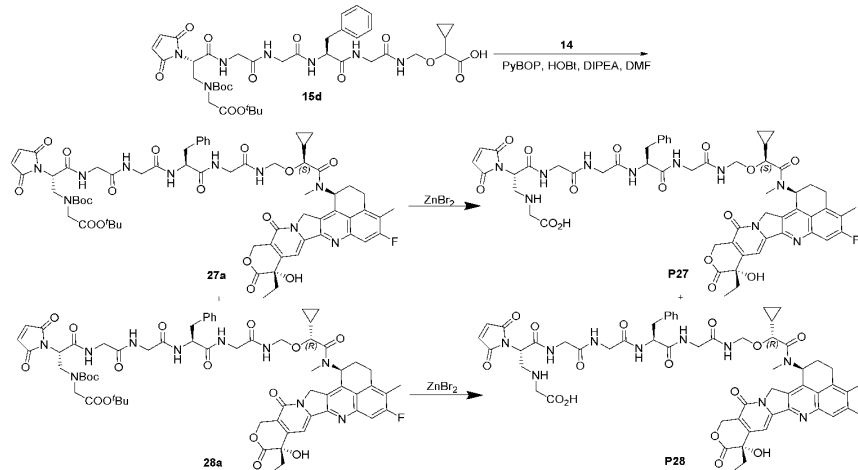
第二步: 化合物 **P25**

于 25 mL 单口瓶中加入 **25a**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到制备液, 制备液冻干得到 49 mg 固体化合物 **P25**; LC-MS: $[M+H]^+=1147.6$ 。

实施例 29: 化合物 **P26** 的合成

化合物 **14** 参照实施例 28 的路线, 制备 89 mg 化合物 **P26**; LC-MS: $[M+H]^+=1147.7$ 。

实施例 30: 化合物 **P27** 和 **P28** 的合成



5 第一步: 化合物 **27a** 和 **28a**

于 50 mL 单口瓶中加入 **15d**(500 mg, 0.59 mmol), **14**(266 mg, 0.59 mmol), PyBOP(339 mg, 0.65 mmol), HOBT(88 mg, 0.86 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(292 μ L, 1.77 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **27a** 和 **28a** 的制备液, 制备液分别冻干得到 109mg 化合物 **27a**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$; 111 mg 化合物 **28**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.7$ 。

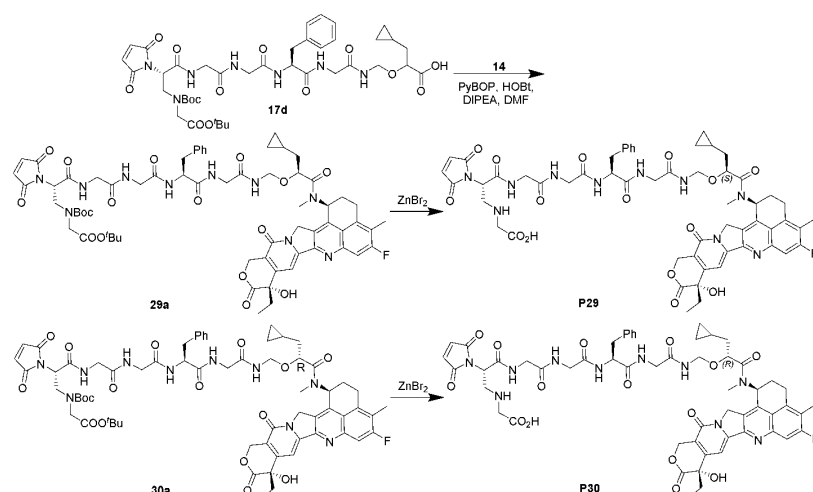
第二步: 化合物 **P27**

于 25 mL 单口瓶中加入 **27a** (100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.56 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 53 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.5$ 。

第三步: 化合物 **P28**

于 25 mL 单口瓶中加入 **28a**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.56 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 54 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

实施例 31: 化合物 **P29** 和 **P30** 的合成



第一步：化合物 **29a** 和 **30a**

于 50 mL 单口瓶中加入 **17d**(400 mg, 0.47 mmol), **14** (211.7 mg, 0.47 mmol), PyBOP(223 mg, 0.56 mmol), HOBT(83 mg, 0.56 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(248 μ L, 1.5 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **29a** 和 **30a** 的制备液, 制备液分别冻干得到 106mg 化合物 **29a**, LC-MS: $[M+H]^+=1289.5$; 101 mg 化合物 **30a**, LC-MS: $[M+H]^+=1289.4$ 。

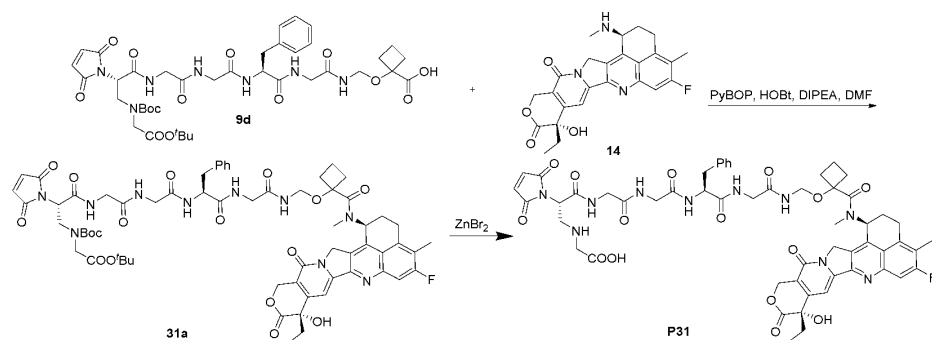
第二步：化合物 **P29**

于 25 mL 单口瓶中加入 **29a**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.57 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 39 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1133.4$ 。

第三步：化合物 **P30**

于 25 mL 单口瓶中加入 **30a**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.57 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 35 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1133.6$ 。

实施例 32：化合物 **P31** 的合成



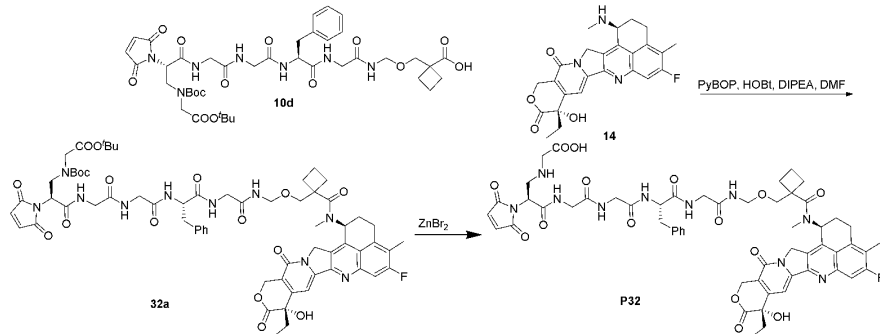
第一步：化合物 **31a**

于 50 mL 单口瓶中加入 **9d** (800 mg, 0.96 mmol), **14** (432.5 mg, 0.96 mmol), PyBOP (500 mg, 0.96 mmol), HOBt (208 mg, 0.96 mmol) 及 30 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (660 μ L, 4.0 mmol), 升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **67a** 的制备液, 制备液冻干得到 **31a** (402 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1275.4$ 。

第二步：化合物 **P31**

于 25 mL 单口瓶中加入 **31a** (100 mg, 0.78 mmol), 溴化锌 (356 mg, 1.57 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P31** (47 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.6$ 。

实施例 33：化合物 **P32** 的合成



第一步：化合物 **32a**

于 50 mL 单口瓶中加入 **10d** (400 mg, 0.47 mmol), **14** (211.7 mg, 0.47 mmol), PyBOP (250 mg, 0.47 mmol), HOBt (101 mg, 0.47 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (330 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反

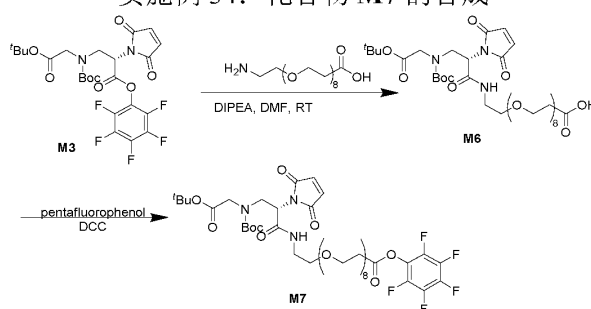
应液经高效液相纯化，得化合物 **32a** 的制备液，制备液冻干得到 **32a** (177 mg)；

LC-MS: $[M+H]^+=1289.4$ 。

第二步：化合物 **P32**

于 25 mL 单口瓶中加入 **32a** (100 mg, 0.08 mmol)，溴化锌(360 mg, 1.6 mmol)及 5 mL 硝基甲烷，40 °C下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后，减压浓缩除去溶剂，得粗品。粗品经高效液相纯化，得到产品制备液，制备液冻干得到固体化合物 **P32**(45 mg)；LC-MS: $[M+H]^+=1133.5$ 。

实施例 34：化合物 **M7** 的合成



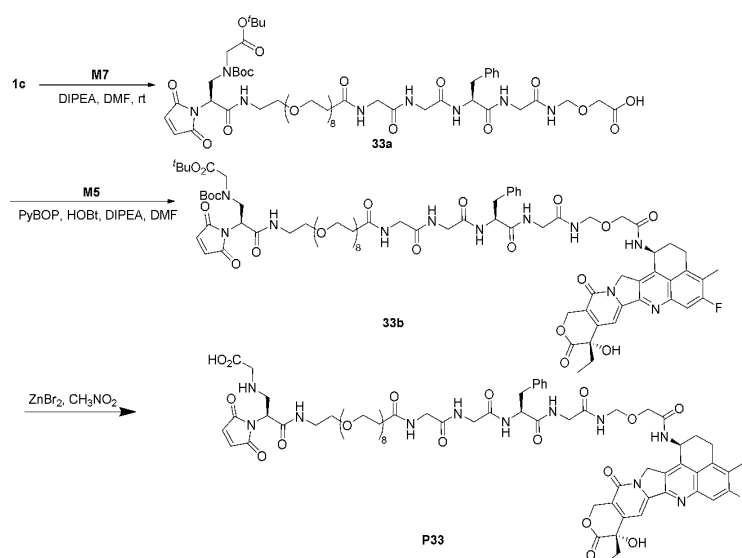
第一步：化合物 **M6**：

于 100 mL 单口瓶，加入化合物 **M3**(11.0 g, 19.5 mmol, 1.0eq)、DIPEA(2.8 g, 21.4 mmol, 1.1 eq)、27-氨基-4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25-八氧杂二十七烷酸 (9.7 g, 20.5 mmol, 1.05 eq)及 DMF(60 mL)，室温反应 20 min(采用 TLC 监测)。反应液直接经制备纯化，制备液水泵减压水浴 35 °C浓缩除去乙腈，冻干得到化合物 **M6**(13.2 g)，收率 78%；LC-MS: $[M-H]^-=820.5$ 。

第二步：化合物 **M7**

于 100 mL 单口瓶，加入化合物 **M6**(13.0 g, 15 mmol, 1.0eq)、五氟苯酚(3 g, 16.5 mmol, 1.1 eq)、DCC(3.4 g, 16.5 mmol, 1.1 eq)及 THF(30 mL)，室温反应 30 min(采用 TLC 监测)，过滤滤去不溶物。反应液直接经制备纯化，制备液水泵减压水浴 35 °C浓缩除去乙腈，冻干得到化合物 **M7**(14.2g)，收率 92%；LC-MS: $[M+H]^+=986.9$ 。

实施例 35：化合物 **P33** 的合成



第一步：化合物 **33a** 的合成

向 **M7** (1 g, 0.79 mol) 中加入 10 mL DMF, 冰水浴冷却至 0°C, 加入化合物 **1c** (334 mg, 0.79 mol), DIPEA (154 mg, 1.19 mol), 维持该条件下反应 1 h, TLC 监测反应完全, 反应液经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **33a** 约 1.2 g, MS m/z : $[M-H]^- = 1225.8$ 。

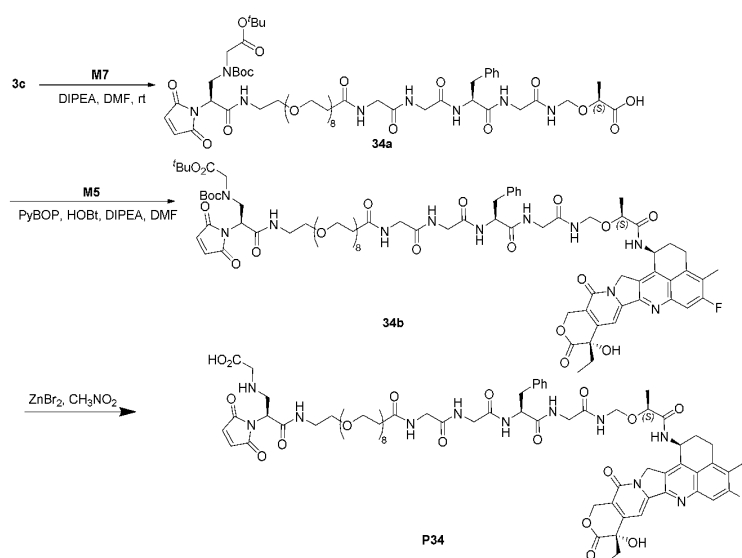
第二步：化合物 **33b** 的合成

于 25 mL 单口瓶中加入 **33a** (1.2 g, 0.94 mmol), **M5** (500 mg, 0.94 mmol), PyBOP (625 mg, 1.2 mmol), HOBt (162 mg, 1.2 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (310 mg, 2.4 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **33b** (709 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1644.9$ 。

第三步：化合物 **P33** 的合成：

于 25 mL 单口瓶中加入 **33b** (200 mg, 0.116 mmol), 溴化锌 (523 mg, 2.32 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P33** (88 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1488.9$ 。

实施例 36：化合物 **P34** 的合成



第一步：化合物 **34a** 的合成

向 **M7** (1 g, 0.79 mol) 中加入 10 mL DMF, 冰水浴冷却至 0°C, 加入化合物 **3c** (345 mg, 0.79 mol), DIPEA (154 mg, 1.19 mol), 维持该条件下反应 1 h, TLC 监测反应完全, 反应液经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到 0.9 g 化合物 **34a**; MS m/z : $[M-H]^- = 1239.8$ 。

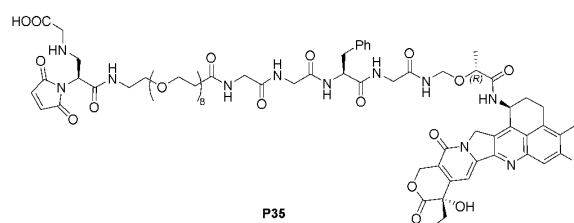
第二步：化合物 **34b** 的合成

于 25 mL 单口瓶中加入 **34a** (700 mg, 0.54 mmol), **M5** (289 mg, 0.54 mmol), PyBOP (313 mg, 0.6 mmol), HOBt (81 mg, 0.6 mmol) 及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (155 mg, 1.2 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **34b** (304 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1658.9$ 。

第三步：化合物 **P34** 的合成：

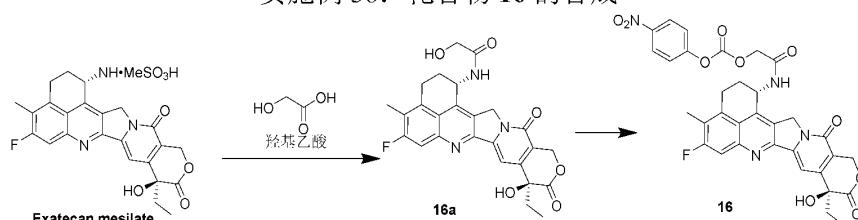
于 25 mL 单口瓶中加入 **34b** (200 mg, 0.116 mmol), 溴化锌 (523 mg, 2.32 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P34** (96 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1502.8$ 。

实施例 37：化合物 **P35** 合成



参照实施例 36 的合成路线, 制备 80 mg 化合物 **P35**; LC-MS: $[M+H]^+ = 1502.7$ 。

实施例 38: 化合物 **16** 的合成



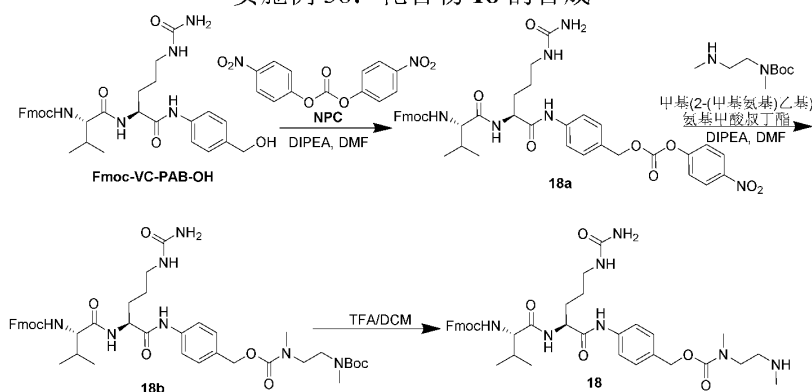
5 第一步: 化合物 **16a** 的制备

化合物 **16a** 参照专利“EP2907824A1”说明书中第 147 页的 Example 76 公开的方法制备而得。

第二步: 化合物 **16** 的制备

于 100 mL 单口瓶中, 加入化合物 **16a** (3 g, 6.08 mmol), 50 mL DCM 溶解, 冰水浴冷却至 0 °C, 维持该温度下依次加入 DIPEA (2.03 mL, 12.16 mmol), NPC (3.78 g, 12.16 mmol), 缓慢升温至室温反应 5 h, TLC 监测反应终点。反应结束后, 水泵减压 45 °C 浓缩除去溶剂, 得残余物。残余物经过硅胶柱层析 (DCM/MeOH=100/1-50:1-10:1) 纯化, 得到化合物 **16** (3.4 g), LC-MS: $[M+H]^+ = 659.4$ 。

实施例 38: 化合物 **18** 的合成



15

第一步: 化合物 **18a** 的合成

于 5000 mL 单口瓶中, 加入 **Fmoc-VC-PAB-OH** (30 g, 49.92 mmol), 再加入

DMF(2 L)搅拌溶解，之后加入 NPC(22.76 g, 74.87 mmol)，并滴入 DIPEA (9.68 g, 74.87 mmol)，室温搅拌反应 1.5 h，TLC 检测原料反应完全，停止反应。剧烈搅拌下向反应瓶中加入异丙醚 1.5 L，搅拌 2 h 倾去上层液体，残余物中加入 800 mL 异丙醚 继续剧烈搅拌 1 h，抽滤，滤饼再置于 600 mL 异丙醚中搅拌过夜，
5 抽滤，得土黄色粉末状固体 31.2 g，收率 82 %，LC-MS : $[M+H]^+ = 767.6$ 。

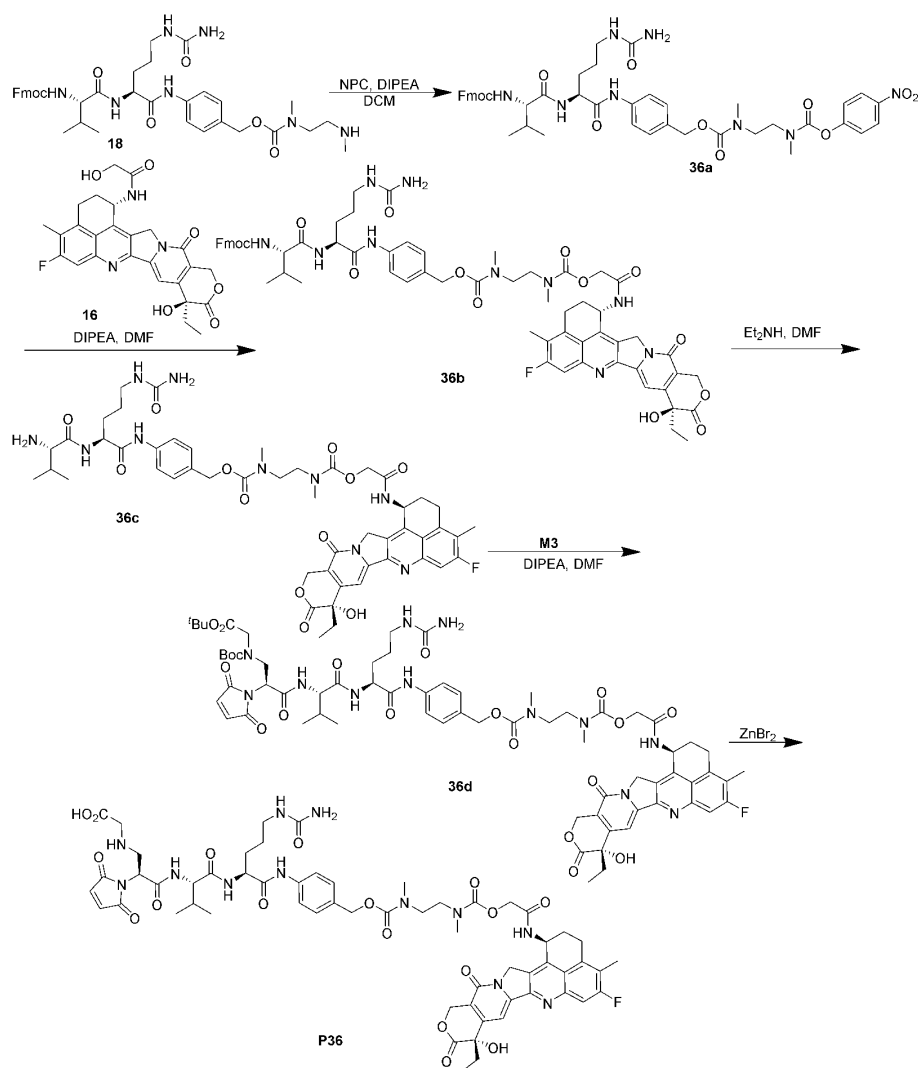
第二步：化合物 18b 的合成

于 5000 mL 单口瓶中，加入化合物 18a (31.2 g, 40.73 mmol)，DMF(800 mL) 搅拌溶解，加入用 50 mL 的 DMF 溶解的甲基(2-(甲基氨基)乙基)氨基甲酸叔丁酯 (8.1 g, 36.66 mmol)，室温搅拌反应 3.5 h，TLC 检测反应完全，停止反应。反应
10 液中加入 2 L 异丙醚搅拌，瓶壁析出粘稠油状物，倾去上清液，再加入 1 L 异丙醚，剧烈搅拌，再次倾去上清液，再加入 500 mL 异丙醚搅拌过夜，抽滤，得 27.2 g 土黄色粉末状固体，收率 81.9%。LC-MS: $[M+H]^+ = 816.7$ 。

第三步：化合物 18 的合成

于 1000 mL 单口瓶中，加入化合物 18b(27.2 g)，DCM(200 mL)搅拌溶解，加
15 入用 400 mL 的 TFA，室温搅拌反应 1.5 h，水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去 TFA 及 DCM，得黄色残余物液体。无需纯化直接用于下一步反应。

实施例 39：化合物 P36 的合成



第一步：化合物 36a 的制备

于 50 mL 单口瓶中，加入化合物 **18** (2 g, 2.8 mmol)，30 mL DCM 溶解，冰水浴冷却至 0 °C，维持该温度下依次加入 DIPEA (2.32 mL, 14 mmol)，NPC (4.32 g, 14 mmol)，缓慢升温至室温反应 5 h，TLC 监测反应终点。反应结束后，水泵减压 45 °C 浓缩除去溶剂，得残余物。残余物经过硅胶柱层析 (DCM/MeOH = 100/1-50:1-10:1) 纯化，得到化合物 **36a** (1.98 g)，LC-MS: [M+H]⁺ = 881.6。

第二步：化合物 36b 的制备

于 50 mL 单口瓶中，加入化合物 **36a** (1.98 g, 2.24 mmol) 及化合物 **16** (1.11 g, 2.24 mmol)，25 mL DMF 溶解，冰水浴冷却至 0 °C，加入 DIPEA (0.745 mL, 4.48 mmol)，缓慢升温至室温反应 1 h，HPLC 监测反应终点。反应结束后，油泵减压

水浴 45°C 浓缩除去溶剂, 得残余物。残余物经过制备级高效液相色谱纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **36b**(2.13 g)。LC-MS:[M+H]⁺=1135.7。

第三步: 化合物 **36c** 的制备

于 50 mL 单口瓶中, 加入化合物 **36b**(2.1 g, 1.85 mmol), 20 mL DMF 溶解, 冰水浴冷却至 0 °C, 加入二乙胺(5 mL), 缓慢升温至室温反应 4 h, HPLC 监测反应终点。反应结束后, 油泵减压水浴 45°C 浓缩除去溶剂, 得残余物直接用于下一步反应。

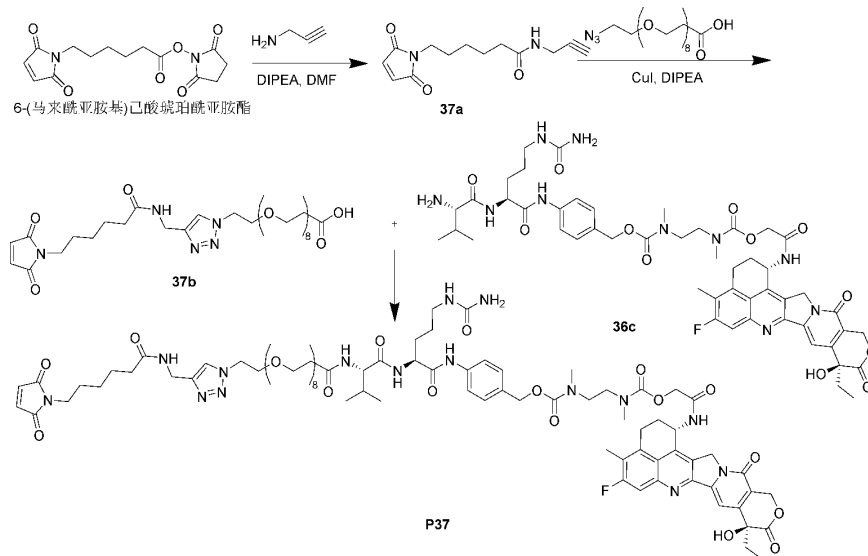
第四步: 化合物 **36d** 的制备

于 50 mL 单口瓶中, 加入粗品化合物 **36c**(1.85 mmol, 按照 **36b** 摩尔数投料) 及化合物 **M3**(1.05 g, 1.85 mmol), 20 mL DMF 溶解, 冰水浴冷却至 0 °C, 加入 DIPEA(615 uL, 3.7 mmol), 缓慢升温至室温反应 2 h, HPLC 监测反应终点。反应结束后, 油泵减压水浴 45°C 浓缩除去溶剂, 得残余物。残余物经过高效液相色谱纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **36d**(2.3 g)。LC-MS:[M+H]⁺=1393.9。

第四步: 化合物 **P36** 的制备

于 10 mL 单口瓶中加入化合物 **36d**(200 mg, 0.144 mmol), 15 mL 硝基甲烷, 溶解后再加入溴化锌(652 mg, 2.87 mmol), 维持室温下反应 30 min, 水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去硝基甲烷, 得黄色残余物固体。经制备级高效液相色谱制备纯化, 制备液冻干得到化合物 **P36**(172 mg)。LC-MS:[M+H]⁺=1237.8。

实施例 40: 化合物 **P37** 的合成



第一步：化合物 **37a** 的制备

于 100 mL 单口瓶中，加入化合物 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(2 g, 6.8 mmol)，50 mL DMF 溶解，冰水浴冷却至 0 °C，维持该温度下依次加入炔丙胺(0.44 mL, 6.8 mmol)及 DIPEA(2.27 mL, 13.6 mmol)缓慢升温至室温反应过夜，
5 TLC 监测反应终点。反应结束后，水泵减压 45°C 浓缩除去溶剂，得残余物。残余物经过硅胶柱层析(PE/EA=50/1-20:1-5:1)纯化，得到化合物 **37a**(1.3 g)，LC-MS: $[M+H]^+ = 249.3$ 。

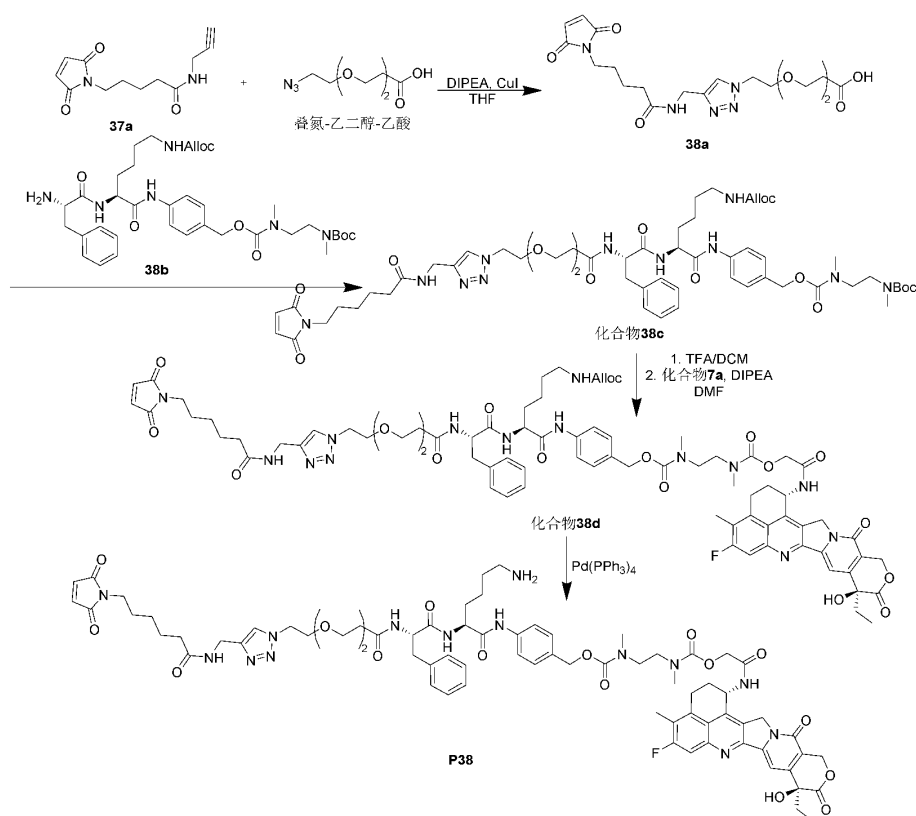
第二步：化合物 **37b** 的制备

于 100 mL 单口瓶中，加入化合物 **37a**(1.3 g, 5.3 mmol)，50 mL 超干无氧 THF
10 溶解，氮气置换体系内气氛三次，室温下依次加入 N₃-PEG₈-CH₂CH₂COOH (2.6 g, 5.3 mmol)、DIPEA(0.914 mL, 5.5 mmol)及 CuI(110 mg, 0.55 mmol)，缓慢升温至室温反应 4 h，HPLC 监测反应终点。反应液直接经过制备级高效液相色谱纯化(酸法)，收集制备液，制备液冻干得到化合物 **37b** (2.7 g)，LC-MS: $[M-H]^- = 714.3$ 。

第三步：化合物 **P37** 的制备

15 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **37b**(200 mg, 0.285 mmol)、化合物 **36c** (289 mg, 0.285 mmol)、PyBOP(301 mg, 0.57 mmol)、HOBt(78 mg, 0.57 mmol)及 DMF(6 mL)，冰水浴降至 0 °C，加入 DIPEA(95 uL, 0.57 mmol)，加毕，升至室温反应 2 h，HPLC 监测反应结束。反应液直接制备级高效液相色谱制备纯化，收集产品制备液，冻干得到化合物 **P37**(288 mg)。TOF-MS: $[M+H]^+ = 1710.8014$ 。

20 实施例 41：化合物 **P38** 的合成



第一步：化合物 **38a** 的制备

于 100 mL 单口瓶中，加入化合物 **37a** (1 g, 4.1 mmol)，50 mL 超干无氧 THF 溶解，氮气置换体系内气氛三次，室温下依次加入叠氮-乙二醇-乙酸 (872 mg, 4.1 mmol)、DIPEA (0.75 mL, 4.5 mmol) 及 CuI (82 mg, 0.41 mmol)，缓慢升温至室温反应 4 h，HPLC 监测反应终点。反应液直接经过制备级高效液相色谱纯化（酸法），收集制备液，制备液冻干得到化合物 **38a** (1.1 g)，LC-MS: $[\text{M}-\text{H}]^- = 436.3$ 。

第二步：化合物 **38c** 的制备

于 100 mL 单口瓶中，加入化合物 **38b** (0.44 g, 1 mmol，参照文献 *Chemistry - A European Journal*. **2015**. 21, 6921-6929 中化合物 **12b** 的合成路线制备的化合物)、**38a** (0.7 g, 1 mmol)、PyBOP (1.06 g, 2 mmol)、HOBt (273 mg, 2 mmol) 及 DMF (30 mL)，冰水浴降至 0 °C，加入 DIPEA (225 uL, 2 mmol)，加毕，升至室温反应 2 h，HPLC 监测反应结束。反应液直接制备级高效液相色谱制备纯化，收集产品制备液，冻干得到化合物 **38c** (521 mg)。LC-MS: $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+ = 1016.6$ 。

第三步：化合物 **38d** 的合成

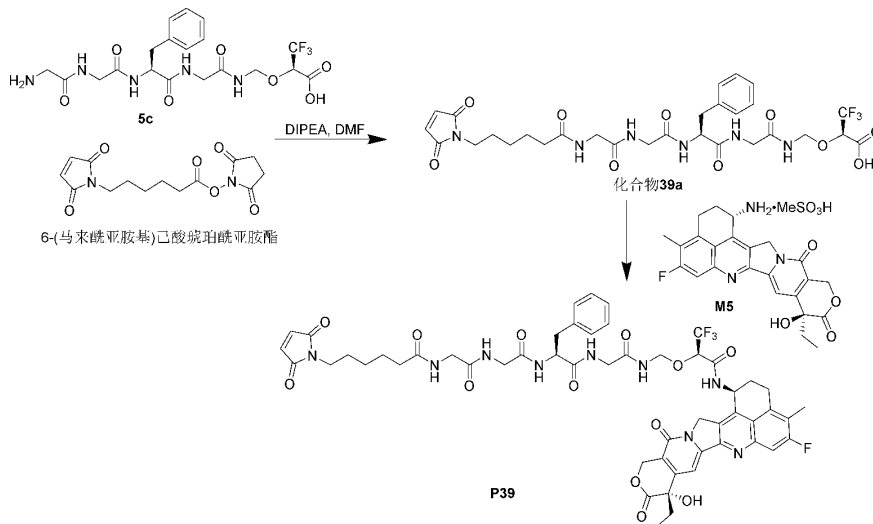
于 25 mL 单口瓶中, 加入化合物 **38c**(500 mg, 0.5 mmol), 5 mL DCM 溶解, 冰水浴冷却下滴加 TFA(10 mL), 滴加完成后维持 0 °C 反应 2 h, HPLC 监测反应终点。反应液直接经过水泵 45 °C 水浴浓缩, 所得黄色油状物直接用于下一步反应。

5 于 25 mL 单口瓶中, 加入上述粗品化合物(0.5 mmol, 按照化合物 **38c** 投料量), 化合物 **7a** (324 mg, 0.5 mmol) 及 DMF(6 mL), 冰水浴降至 0 °C, 加入 DIPEA(225 uL, 2 mmol), 加毕, 升至室温反应 2 h, HPLC 监测反应结束。反应液直接制备级高效液相色谱制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **38d**(446 mg)。LC-MS: $[M+H]^+=1549.6$ 。

10 第四步：化合物 **P38** 的合成

氮气保护下，于 25 mL 单口瓶中，加入化合物 **38d**(50 mg, 0.033 mmol)，超干级 DMF(6 mL)及 AcOH(0.2 mL)，室温下依次加入四三苯基膦钯(37 mg, 0.033 mmol)，Bu₃SnH(19 mg, 0.066 mmol)，加毕，升至室温反应过夜，HPLC 监测反应结束。反应液直接制备级高效液相色谱制备纯化，收集产品制备液，冻干得到化合物 **P38**(39 mg)。LC-MS: [M+Na]⁺=1487.8。

实施例 42: 化合物 P39 的合成



第一步：化合物 39a 的制备

于 100 mL 单口瓶中，加入化合物 **5c**(1 g, 3.2 mmol)，30 mL DMF 溶解，室
20 温下依次加入化合物 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(1.6 g, 3.2 mmol)、

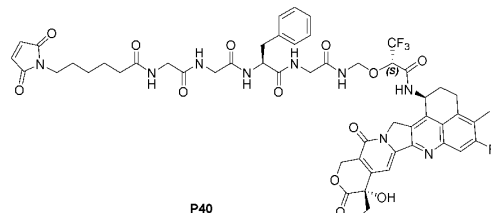
DIPEA(1.06 mL, 6.4 mmol), 维持室温反应 4 h, HPLC 监测反应终点。反应液直接经过制备级高效液相色谱纯化(酸法), 收集制备液, 制备液冻干得到化合物 **39a**(1.9 g), LC-MS:[M-H]⁻=683.2。

第二步: 化合物 **P39** 的合成

- 5 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **39a** (200 mg, 0.29 mmol)、M5 依喜替康甲磺酸盐 (155 mg, 0.29 mmol)、PyBOP(187 mg, 0.36 mmol)、HOBt(48 mg, 0.36 mmol) 及 DMF(6 mL), 冰水浴降至 0 °C, 加入 DIPEA(62 mg, 0.48 mmol), 加毕, 升至 20 °C 反应 2 h, HPLC 监测反应结束。反应液直接 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **P39**(156 mg); LC-MS: [M+H]⁺=1102.7。

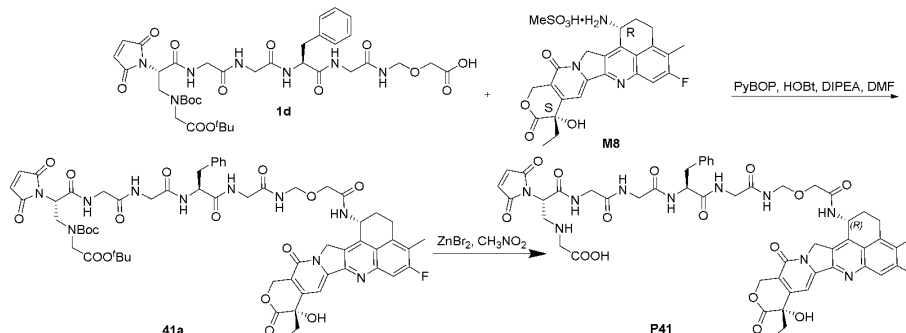
10

实施例 43: 化合物 **P40** 的合成



参照实施例 42 的合成路线, 制备 134 mg 化合物 **P40**; LC-MS: [M+H]⁺=1102.3。

实施例 44: 化合物 **P41** 的合成



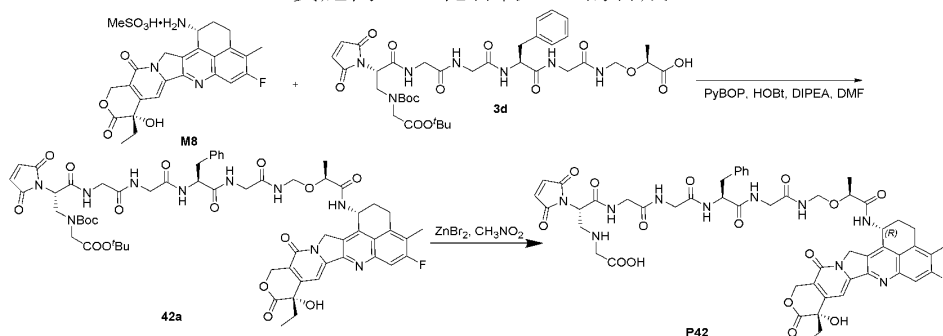
- 15 第一步: 化合物 **41a**

- 于 50 mL 单口瓶中加入 **1d** (500 mg, 0.62 mmol), **M8**(310 mg, 0.62 mmol) (参照专利 CN111065621A 提供的方法制备式 31 所示化合物, 后续制备方法与该专利实施例 7-2 一致), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBt(116 mg, 0.86 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(378 uL, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC
- 20 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **41a**(210 mg); LC-MS: [M+H]⁺=1221.6。

第二步：化合物 **P41**

于 25 mL 单口瓶中加入 **41a** (200 mg, 0.162 mmol), 溴化锌(736 mg, 3.26 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P41**(120 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1065.3$ 。

实施例 45: 化合物 **P42** 的合成



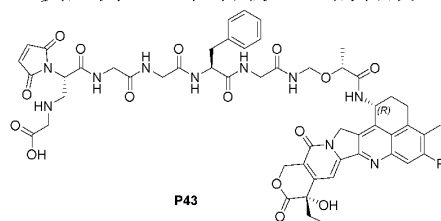
第一步：化合物 **42a**

于 100 mL 单口瓶中加入 **3d**(1.66 g, 2.02 mmol, 1.0 eq), **M8**(1.08 g, 2.02 mmol, 1.0 eq), PyBOP(1.58 g, 3.03 mmol, 1.5 eq), HOBt(0.41 g, 3.03 mmol, 1.5 eq)及 DMF(40 mL), 冰水浴下加入 DIPEA(0.84 mL, 1.5 eq), 升至室温反应 2 h(采用 HPLC 监测)。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **42a**(1.54 g), 收率 61%; LC-MS: $[M+H]^+=1235.4$ 。

第六步：化合物 **P42**

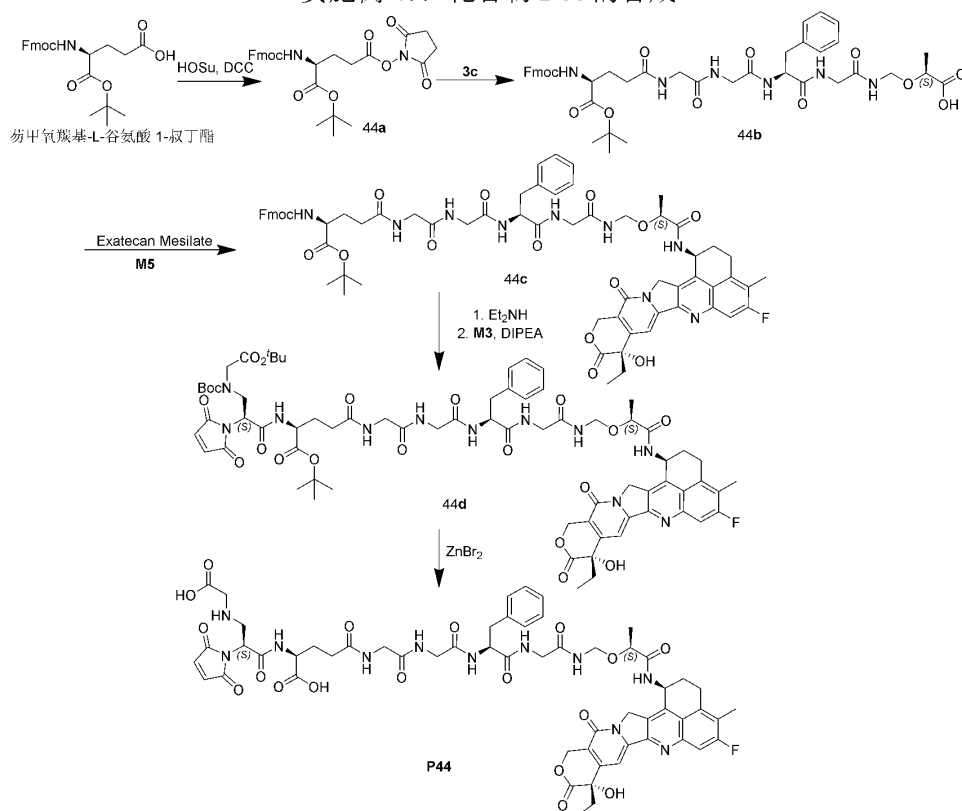
于 100mL 单口瓶中加入化合物 **42a**(1.0 g, 0.8 mmol, 1.0 eq), 35 mL 硝基甲烷, 溶解后再加入溴化锌(3.64 g, 16 mmol, 20.0 eq), 油浴 40 °C(提前预热稳定)反应 30 min, 水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去硝基甲烷, 得黄色残余物固体(采用 HPLC 监测)。经酸法制备, 得到制备液, 制备液经水泵减压水浴 35 °C 浓缩旋除乙腈, 冻干得到化合物 **P42**(786 mg), 收率 90%; LC-MS: $[M+H]^+=1079.8$ 。

实施例 46: 化合物 **P43** 的合成



参照实施例 45 的合成路线,制备 442 mg 化合物 **P43**; LC-MS: $[M+H]^+=1079.6$ 。

实施例 47: 化合物 **P44** 的合成



第一步: 化合物 **44a** 的制备

- 5 于 250 mL 单口瓶中加入化合物 苄甲氧羰基-L-谷氨酸 1-叔丁酯(4 g, 9.35 mmol), 室温下加入 100 mL DCM 溶解, 依次加入 HOSu(1.17 g, 10 mmol), DCC(2.92 g, 14 mmol)室温反应 2 h。TLC 监测反应完毕后, 过滤除去不溶白色固体, 滤饼用 DCM 洗涤, 所得有机相水泵 45 °C水浴旋干, 所得微黄色残余物经硅胶柱层析(PE/EA=50/1-20/1)纯化, 得到 4.1 g 化合物 **44a**。

10 第二步: 化合物 **44b** 的制备

于 100 mL 单口瓶中加入化合物 **44a**(2 g, 3.83 mmol) 及 40 mL DMF, 冰水浴下冷却下加入 DIPEA(1.28 mL, 7.66 mmol), 化合物 **3c**(1.7g, 3.83 mmol), 缓慢升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 制备液冻干得到 2.8 g 化合物 **44b**, LC-MS: $[M-H]^-=844.0$ 。

15 第三步: 化合物 **44c** 的制备

于 50 mL 单口瓶中加入化合物 **44b**(500 mg, 0.59 mmol) 及 25 mL DMF, 室温下依次加入 M5 依喜替康甲磺酸盐即 Exatecan Mesilate (319 mg, 0.59 mmol), PyBOP(625 mg, 1.2 mmol), HOBt(164 mg, 1.2 mmol), DIPEA(400 uL, 2.4 mmol), 升至室温反应 5 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 制备液分
5 别冻干得到化合物 **44c**(502 mg), LC-MS:[M+H]⁺=1262.5。

第四步: 化合物 **44d** 的制备

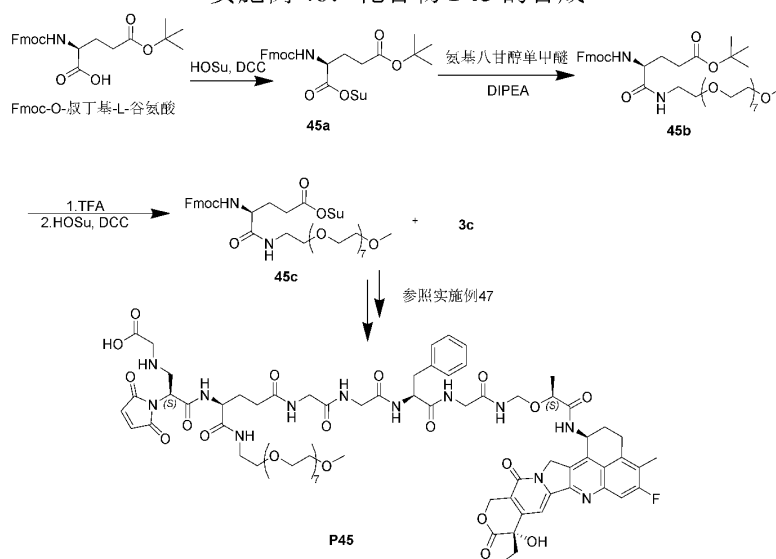
于 50 mL 单口瓶中加入化合物 **44c**(500 mg, 0.4 mmol) 及 20 mL DMF, 冰水浴下冷却下加入二乙胺(5 mL), 缓慢升至室温反应 5 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液油泵 45 °C 水浴旋干, 所得粗品直接用于下一步反应。

10 于 50 mL 单口瓶中加入上述粗品化合物(0.4 mmol) 及 20 mL DMF, 冰水浴下冷却下加入 DIPEA(145 uL, 0.8 mmol), **M3**(227 mg, 0.4 mmol), 升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 制备液冻干得到化合物 **44d**(358 mg), LC-MS: [M+H]⁺=1420.7。

第五步: 化合物 **P44** 的制备

15 于 25mL 单口瓶中加入化合物 **44d**(150 mg, 0.106 mmol), 溴化锌(476 mg, 2.11 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **P44**(98 mg); TOF:[M+H]⁺=1208.4281。

实施例 48: 化合物 **P45** 的合成



第一步：化合物 **45a** 的制备

于 250 mL 单口瓶中加入化合物 Fmoc-O-叔丁基-L-谷氨酸(4 g, 9.35 mmol)，
室温下加入 100 mL DCM 溶解，依次加入 HOSu(1.17 g, 10 mmol)，DCC(2.92 g,
14 mmol)室温反应 2 h。TLC 监测反应完毕后，过滤除去不溶白色固体，滤饼用
5 DCM 洗涤，所得有机相水泵 45 °C 水浴旋干，所得微黄色残余物经硅胶柱层析
(PE/EA=50/1-20/1)纯化，得到 4.12 g 化合物 **45a**。

第二步：化合物 **45b** 的制备

于 100 mL 单口瓶中加入化合物 **45a**(2 g, 7.66 mmol) 及 50 mL DMF，冰水浴
下冷却下加入 DIPEA(2.46 mL, 15.32 mmol)，化合物氨基八甘醇单甲醚 (3.1 g,
10 7.66 mmol)，缓慢升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后，反应液经高效液相
纯化，制备液冻干得到 3.7 g 化合物 **45b**， LC-MS:[M+H]⁺=791.9。

第三步：化合物 **45c** 的合成

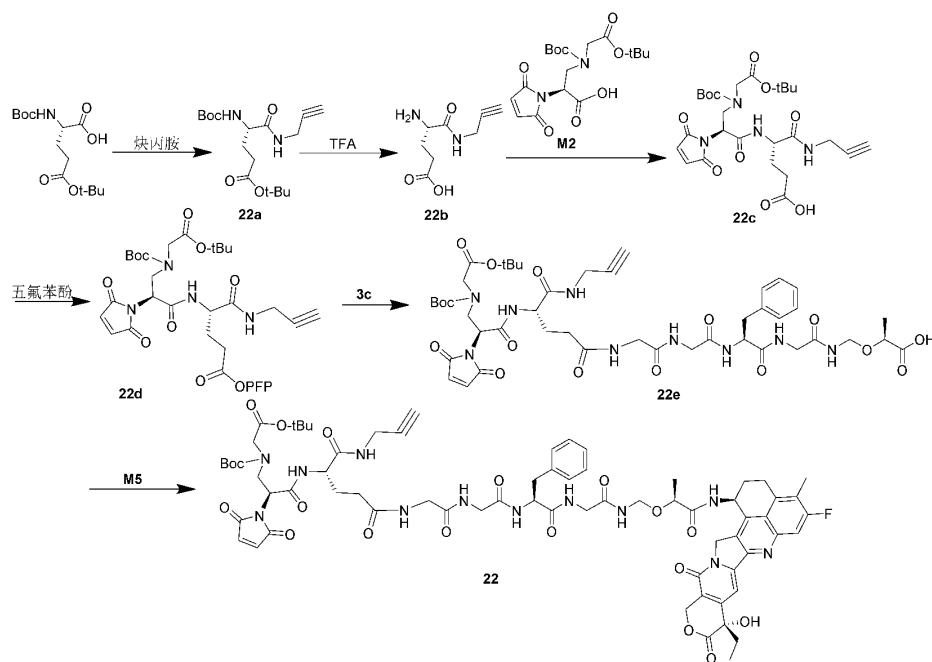
于 100 mL 单口瓶中加入化合物 **45b**(3.7 g) 及 30 mL DCM，冰水浴下冷却下
加入 TFA(30 mL)，维持该温度下反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后，反应液经水
15 泵减压 45 °C 水浴加热旋干溶剂，直接用于下一步。

室温下加入相上述粗产品中加入 50 mL DCM 溶解，依次加入 HOSu(2.4 g,
20 mmol)，DCC(4.6 g, 22 mmol)室温反应过夜。HPLC 监测反应完毕后，反应液
经高效液相纯化，制备液冻干得到 2.1 g 化合物 **45c**， LC-MS:[M+H]⁺=833.2。

第四步：化合物 **P45** 的合成

20 以化合物 **45c** 及化合物 **3c** 为原料，参照实施例 47 的路线，制备 102 mg 化
合物 **P45**； LC-MS:[M+H]⁺=1573.7。

实施例 49：化合物 **22** 的合成



第一步：化合物 **22a** 的制备

于 1 L 单口瓶中加入 Boc-L-谷氨酸 5-叔丁酯(50 g, 164.8 mmol, 1.0 eq), 250 mL THF 溶清, 冰水浴下依次加入炔丙胺(9.97 g, 181.3 mmol, 1.1 eq), HOBt(22.25 g, 164.8 mmol, 1.0 eq), DIPEA(54.3 mL, 329.6 mmol, 2.0 eq), EDCI(37.7 g, 197.7 mmol, 1.2 eq), 升至室温反应 2 h, TLC 监测反应终点。反应完毕后, 将反应液倒入 600 mL 冰水中, 加入乙酸乙酯萃取三次 (200 mL×3), 合并有机相, 经过饱和食盐水洗涤两次 (300 mL×2)、无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得到粗品。粗品经过石油醚/乙酸乙酯(2/1)精制, 得到 35.5 g 化合物 **22a**; LC-MS: $[M+H]^+=341.2$ 。

第二步：化合物 **22b** 的制备

于 1L 单口瓶中加入化合物 **22a** (20 g), 150 mL 二氯甲烷溶清, 加入 150 mL 三氟乙酸, 室温反应 1 h, TLC 监测反应终点。反应完毕后, 将反应液在水泵 45 °C 浓缩, 得到粗品油状物。粗品加入甲叔醚析晶过夜, 过滤, 滤饼经过鼓风 45 °C 干燥 4 h, 称重, 得产品 7.68 g; LC-MS: $[M+H]^+=184.2$ 。

第三步：化合物 **22c** 的制备

于 50mL 单口瓶中加入化合物 **22b**(5.0 g, 27.1 mmol)、化合物 **M2**(10.8 g, 27.1 mmol), 20 mL DMF 溶清, 冰水浴下加入 EEDQ(13.4 g, 54.2 mmol), 加毕, 升至室温反应 2 h, HPLC 监测反应终点。反应液经过高效液相制备纯化, 冻干, 得到

产品 **22c**(7.84 g); LC-MS m/z (M+H)⁺:465.2。

第四步：化合物 **22d** 的制备

于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **22c**(0.85 g, 1.51 mmol), 15 mL DMF 溶清, 冰水浴下加入 DCC(1.55 g, 7.56 mmol), 五氟苯酚(0.31 g, 1.66 mmol), 升至室温反应 2 h, TLC 监测反应终点。反应完毕, 过滤, 得滤液旋干直接用于下一步反应。

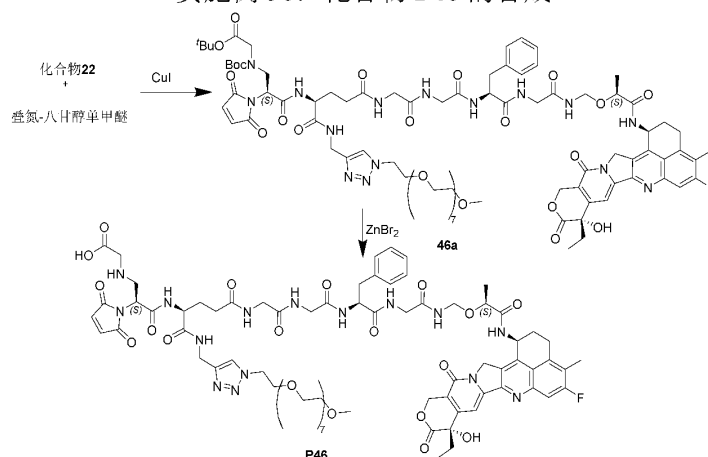
第五步：化合物 **22e** 的制备

在冰水浴下, 将化合物 **3c**(661 mg, 1.51 mmol)溶于 15 mL DMF 中, 滴加 DIPEA(0.37 mL, 2.26 mmol), 再入上述粗品化合物的 3 mL DMF 溶液, 升至室温反应 1 h, HPLC 监测反应终点。反应完毕, 反应液经过高效液相制备纯化, 得产品制备液, 制备液冻干, 得到 502 mg 白色固体化合物 **22e**; LC-MS: [M+H]⁺=985.2。

第六步：化合物 **22** 的制备

于 50 mL 单口瓶中加入化合物 **22e** (500 mg, 0.51 mmol), 10 mL DMF 溶清, 冰水浴下依次加入 PyBOP (396 mg, 0.76 mmol), HOBt (103 mg, 0.76 mmol), M5 依喜替康·甲磺酸盐(270 mg, 0.51 mmol), 再加入 DIEA(252 μ L, 1.52 mmol), 升至室温反应 2 h, HPLC 监测反应终点。反应完毕, 反应液经过高效液相制备纯化, 得制备液, 制备液冻干, 得到 500 mg 白色固体化合物 **22**; LC-MS: [M+H]⁺=1402.2。

实施例 50：化合物 **P46** 的合成



第一步：化合物 **46a** 的合成

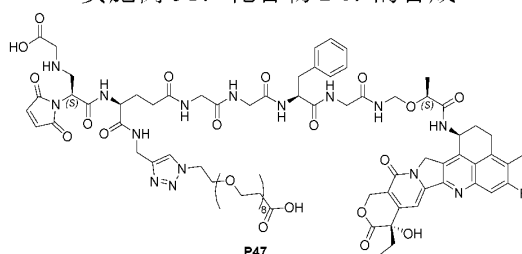
于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **22**(50 mg, 0.036 mmol)、叠氮八甘醇单甲醚 (156 mg, 0.036 mmol), 5 mL DMF 溶清, 再加入碘化亚铜(2 mg, 0.007 mmol), TEA(10

uL, 0.07 mmol), 升温至 50 °C 反应 10 h, HPLC 监测反应进程。反应结束后, 反应液经高效制备液相纯化, 得产品制备液, 制备液经冻干, 得到 59 mg 化合物 **46a**; TOF-MS: $[M+Na]^+ = 1833.9517$ 。

第二步: 化合物 **P46** 的合成

- 5 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **46a** (50 mg, 0.028 mmol), 5 mL 硝基甲烷溶清, 再加入溴化锌 (130 mg, 0.56 mmol), 室温反应 1h, HPLC 监测反应进程。反应结束后, 反应液经水泵 45 °C 减压浓缩, 得到粗品。粗品经高效制备液相纯化, 得制备液, 制备液经冻干, 称量, 得到 33 mg 化合物 **P46**; TOF-MS: $[M+H]^+ = 1654.9$ 。

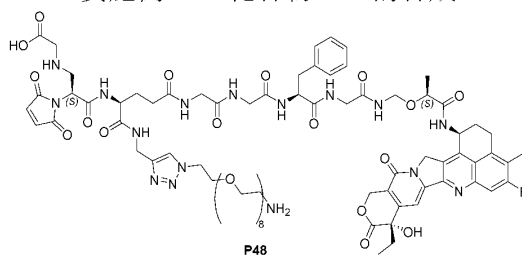
实施例 51: 化合物 **P47** 的合成



10

以化合物 N_3 -PEG₈-CH₂CH₂COOH 为原料, 参照实施例 50 的合成路线, 制备 42 mg 化合物 **P47**; TOF-MS: $[M+H]^+ = 1712.7061$ 。

实施例 52: 化合物 **P48** 的合成



15

以化合物 O-(2-氨基乙基)-O'-(2-叠氮乙基)七聚乙二醇为原料, 参照实施例 50 的合成路线, 制备 42 mg 化合物 **P48**; TOF-MS: $[M+H]^+ = 1683.7627$ 。

实施例 53: 抗体的表达与纯化

1) 瞬转表达

- 20 使用悬浮细胞 Expi293 (上海奥浦迈生物科技股份有限公司) 表达靶向 CD33 的抗体: 在转染前一天, 以 0.9×10^6 个/mL 的密度将细胞接种于含 300 mL OPM-293 CD05 Medium (81075-001, 上海奥浦迈生物科技股份有限公司) 的 1 L 摇瓶

中，放置在 37 °C、5% CO₂、120 rpm 细胞培养摇床过夜培养。次日，用 PEI-MAX 进行抗体表达质粒的转染，其中质粒:PEI-MAX 的质量比为 1:3。转染后第一天按 5%(v/v)加入 OPM-293 ProFeed 补料，转染后第三天再次按 5%(v/v)加入 OPM-293 ProFeed 补料，转染后第六天离心收集上清。

5 2) 纯化抗体

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

10 抗体 1:

SEQ ID No.1 (重链可变区)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYP
YNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLA
YWGOGTLTVSS

15

SEQ ID No.2 (重链 CDR1)

DSNIH

SEQ ID No.3 (重链 CDR2)

20 YIYPYNGGTDYNQKFKN

SEQ ID No.4 (重链 CDR3)

GNPWLAY

25 SEQ ID No.5 (重链)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYP
YNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLA
YWGGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
5 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID No.6 (重链恒定区)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
10 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
15 YTQKSLSLSPG

SEQ ID No.7 (轻链可变区)

DIQLTQSPSTLSASVGDRVITTCRAESLDNYGIRFLTWFAQKPGKAPKLLMYA
ASNQGSQVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTKVEPWSFGQGTK
20 VEVK

SEQ ID No.8 (轻链可变区 CDR1)

RASESLDNYGIRFLT

25 SEQ ID No.9 (轻链可变区 CDR2)

AASNQGS

SEQ ID No.10 (轻链可变区 CDR3)

QQTKEVPWS

SEQ ID No.11 (轻链)

DIQLTQSPSTLSASVGDRVITICRAESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPKLLMYA
5 ASNQGSQVPSRFSQSGSGTEFTLTISLQPDDEYTCQQTKEVPWSFGQGTK
VEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

10 SEQ ID No.12 (轻链恒定区)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

15 SEQ ID No.13 (重链可变区--核酸编码序列)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGCTCCT
CTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCATCACAGACAGCAAC
ATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCCAGGCCAGAGCCTGGAGTGGATTGGCTA
CATCTACCCCTACAATGGAGGCACAGACTACAACCAGAAGTTCAAGAACA
20 GAGCCACCCTGACTGTGGACAACCCACCAACACAGCCTACATGGAGCTG
AGCTCCCTGAGAAGTGAAGACACAGCCTTCTACTACTGTGTGAATGGGAA
CCCCTGGCTGGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACTGTGTCCTCT

SEQ ID No.14 (重链 CDR1--核酸编码序列)

25 GACAGCAACATCCAC

SEQ ID No.15 (重链 CDR2--核酸编码序列)

TACATCTACCCCTACAATGGAGGCACAGACTACAACCAGAAGTTCAAGAAC

SEQ ID No.16

(重链 CDR3--核酸编码序列)

GGGAACCCCTGGCTGGCCTAC

5 SEQ ID No.17

(重链--核酸编码序列)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGCTCCT
CTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCATCACAGACAGCAAC
ATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCCAGGCCAGAGCCTGGAGTGGATTGGCTA
CATCTACCCCTACAATGGAGGCACAGACTACAACCAGAAGTTCAAGAACA
10 GAGCCACCCTGACTGTGGACAACCCCAACACAGCCTACATGGAGCTG
AGCTCCCTGAGAAGTGAAGACACAGCCTTCTACTACTGTGTGAATGGGAA
CCCCTGGCTGGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACTGTGTCCTCTGC
TAGCACCAGAGGGCCCCTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCCTCCTCCAAGAGCAC
CTCTGGAGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCAG
15 AGCCTGTGACTGTGTCCTGGA ACTCTGGAGCCCTGACCTCTGGAGTGCAC
ACCTTCCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTGGCCTCTACAGCCTGTCCTCTGTG
GTGACTGTGCCCTCCTCCTCCCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTG
AACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGA
GCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCACCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTG
20 GGAGGACCCTCTGTGTTCCCTCTTTCCACCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCTCCAGAACCCCAAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCCATGAA
GACCCAGAAGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAA
TGCCAAGACCAAGCCCAGAGAAGAGCAGTACAACAGCACCTACAGAGTG
GTGTCTGTGCTGACTGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGAGTA
25 CAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCTCCCATTGAGAAGACCA
TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCA
CCATCCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGT
GAAAGGCTTCTACCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCC

AGCCAGAGAACAACCTACAAGACCACACCACCTGTGCTGGACTCTGATGGC
AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACTGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA
GGGCAATGTCTTCTCCTGCTCTGTGATGCATGAAGCTCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGGTGA

5

SEQ ID No.18 (重链恒定区--核酸编码序列)

GCTAGCACCAAGGGCCCCTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCCTCCTCCAAGAGC
ACCTCTGGAGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCC
AGAGCCTGTGACTGTGTCCTGGAACCTCTGGAGCCCTGACCTCTGGAGTGC
10 ACACCTTCCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTGGCCTCTACAGCCTGTCTCTG
TGGTGACTGTGCCCTCCTCCTCCCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATG
TGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA
GAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCACCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGC
TGGGAGGACCCTCTGTGTTCTCTTTCCACCCAAGCCCAAGGACACCCTGA
15 TGATCTCCAGAACCCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCCATG
AAGACCCAGAAGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGATGGAGTGGAAAGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGAGAAGAGCAGTACAACAGCACCTACAGAGT
GGTGTCTGTGCTGACTGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGAGT
ACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCTCCCATTGAGAAGACC
20 ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCC
ACCATCCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGG
TGAAAGGCTTCTACCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCC
AGCCAGAGAACAACCTACAAGACCACACCACCTGTGCTGGACTCTGATGGC
AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACTGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA
25 GGGCAATGTCTTCTCCTGCTCTGTGATGCATGAAGCTCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGGTGA

SEQ ID No.19 (轻链可变区--核酸编码序列)

GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGAC
AGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCTCTGAGAGCCTGGACAACTATGGCATC
AGATTCCTGACCTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAGCTGCT
GATGTATGCTGCCTCCAACCAGGGCAGTGGAGTGCCCTCCAGATTCTCTGG
5 CTCTGGCTCTGGCACAGAGTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCAGA
TGACTTTGCCACCTACTACTGCCAGCAGACCAAGGAGGTGCCCTGGAGCTT
TGGACAGGGCACCAAGGTGGAGGTGAAG

SEQ ID No.20 (轻链可变区 **CDR1**--核酸编码序列)

10 AGAGCCTCTGAGAGCCTGGACAACTATGGCATCAGATTCCTGACC

SEQ ID No.21 (轻链可变区 **CDR2**--核酸编码序列)

GCTGCCTCCAACCAGGGCAGT

15 SEQ ID No.22 (轻链可变区 **CDR3**--核酸编码序列)

CAGCAGACCAAGGAGGTGCCCTGGAGC

SEQ ID No.23 (轻链--核酸编码序列)

GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGAC
20 AGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCTCTGAGAGCCTGGACAACTATGGCATC
AGATTCCTGACCTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAGCTGCT
GATGTATGCTGCCTCCAACCAGGGCAGTGGAGTGCCCTCCAGATTCTCTGG
CTCTGGCTCTGGCACAGAGTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCAGA
TGACTTTGCCACCTACTACTGCCAGCAGACCAAGGAGGTGCCCTGGAGCTT
25 TGGACAGGGCACCAAGGTGGAGGTGAAGCGTACGGTGGCTGCTCCCTCTG
TGTTCACTTCCCACCCTCTGATGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTG
TGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGG
AAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGTGGGAACAGCCAGGAGAGTGTGACAG

AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACCCTGACCCTG
TCCAAAGCTGACTATGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAAGTGACCCA
CCAGGGCCTGTCCTCTCCTGTGACCAAGAGCTTCAACAGAGGAGAGTGCT
GA

5

SEQ ID No.24 (轻链恒定区--核酸编码序列)

CGTACGGTGGCTGCTCCCTCTGTGTTTCATCTTCCCACCCTCTGATGAGCAGC
TGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCA
GAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGTGGGAA
10 CAGCCAGGAGAGTGTGACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC
CTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAAGCTGACTATGAGAAGCACAAAGTG
TATGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCTCTCCTGTGACCAAGAGC
TTCAACAGAGGAGAGTGCTGA

15 抗体 2:

除轻链恒定区的氨基酸序列及其核酸编码序列、轻链的氨基酸序列及其核酸编码
序列之外，其余序列同抗体 1。

SEQ ID No.25 (轻链)

DIQLTQSPSTLSASVGDRVITICRASESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPKLLMYA
20 ASNQGSQVPSRFSQSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQTKVPWSFGQGTK
VEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVCTK
SFNRGEC

25 SEQ ID No.26 (轻链恒定区)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVCTKSFNRG
EC

SEQ ID No.27

(轻链--核酸编码序列)

GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGAC
AGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCTCTGAGAGCCTGGACAACTATGGCATC
5 AGATTCTGACCTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAGCTGCT
GATGTATGCTGCCTCCAACCAGGGCAGTGGAGTGCCCTCCAGATTCTCTGG
CTCTGGCTCTGGCACAGAGTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCAGA
TGACTTTGCCACCTACTACTGCCAGCAGACCAAGGAGGTGCCCTGGAGCTT
TGGACAGGGCACCAAGGTGGAGGTGAAGCGTACGGTGGCTGCTCCCTCTG
10 TGTTCATCTTCCCACCCTCTGATGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTG
TGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGG
AAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGTGGGAACAGCCAGGAGAGTGTGACAG
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACCCTGACCCTG
TCCAAAGCTGACTATGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAAGTGACCCA
15 CCAGGGCCTGTCCTCTCCTGTGTGCACCAAGAGCTTCAACAGAGGAGAGT
GCTGA

SEQ ID No.28

(轻链恒定区--核酸编码序列)

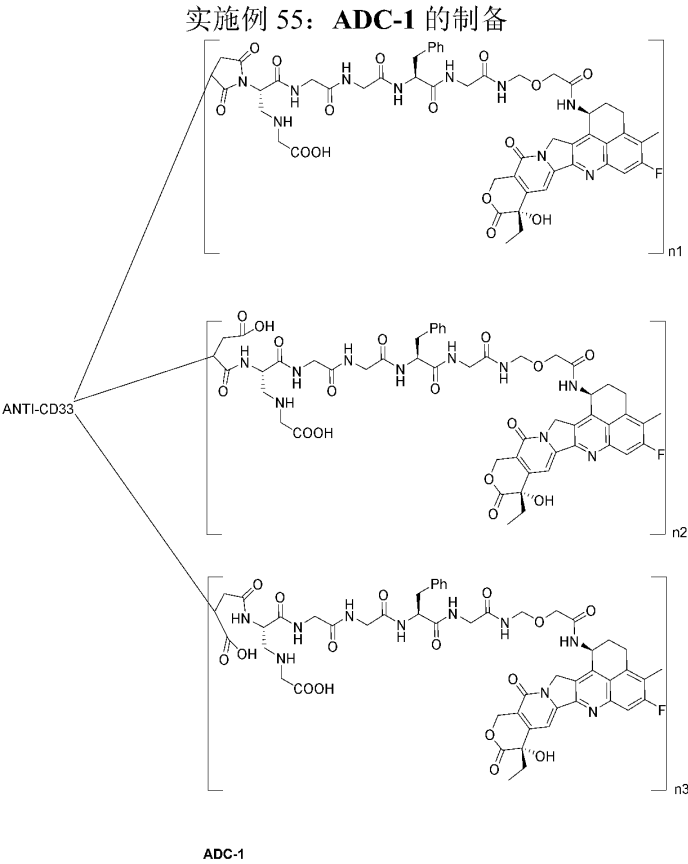
CGTACGGTGGCTGCTCCCTCTGTGTTTCATCTTCCCACCCTCTGATGAGCAGC
20 TGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCA
GAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGTGGGAA
CAGCCAGGAGAGTGTGACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC
CTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAAGCTGACTATGAGAAGCACAAAGTG
TATGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCTCTCCTGTGTGCACCAAG
25 AGCTTCAACAGAGGAGAGTGCTGA

实施例 54：通用抗体-药物偶联物的制备

抗体-药物偶联物的制备方法

在经过细胞表达并通过 Protein A 亲和层析与分子筛层析纯化之后，实施例 53 的抗体 2 被置换于 20 mM NaAc-HAc, pH6.0 的缓冲液中，浓缩或者稀释抗体 2 至蛋白浓度为 5 mg/mL。payload 为白色或浅黄色粉末，使用 N,N-二甲基乙酰胺（DMA）将其溶解至 10 mg/mL 备用。

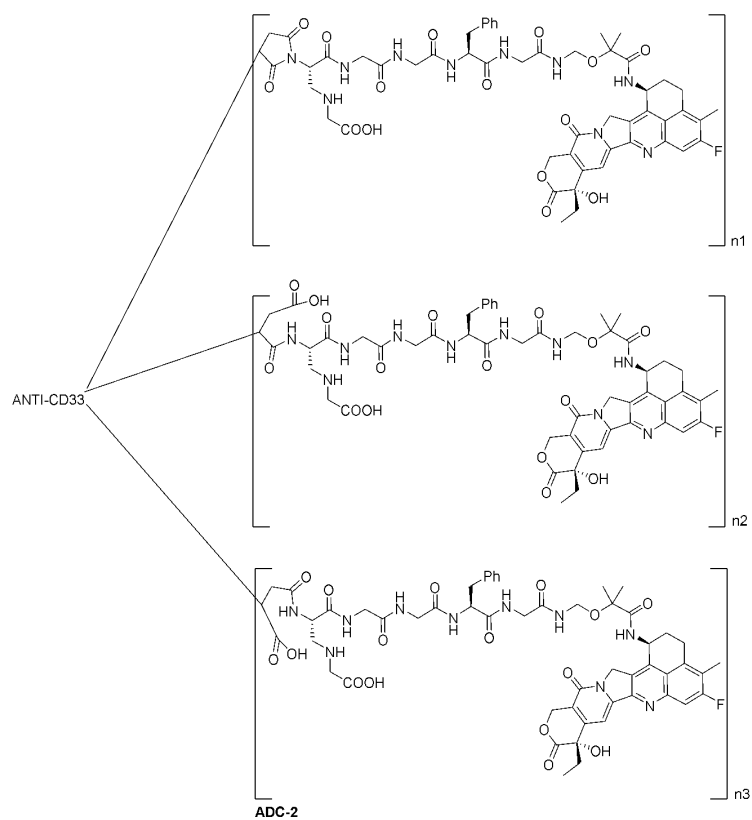
- 5 为了打开抗体 2 的链间二硫键，先按照分子比加入 20 倍的三（2-羧乙基）磷（TCEP），并在室温下反应 2 h。按照分子比加入 25 倍的 payload 溶液，在室温下反应 8h。反应结束后，使用 30 KDa 超滤浓缩管换液，将未偶联上的 payload 去除，即得到抗体 2-药物偶联物样品。



10

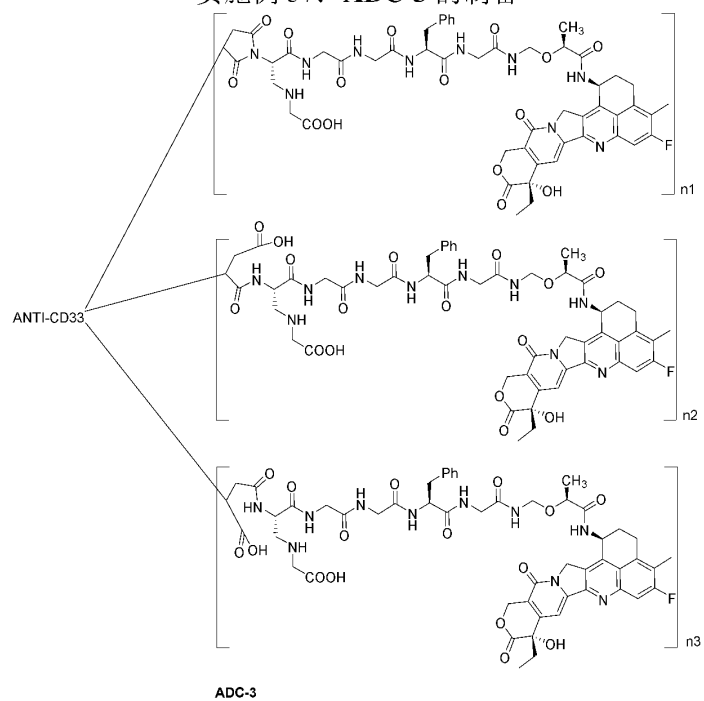
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-1。

实施例 56: ADC-2 的制备



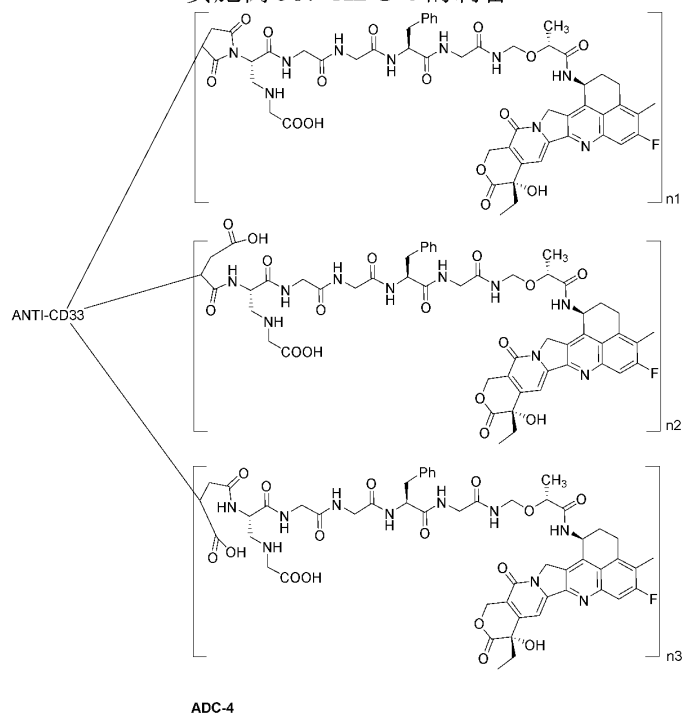
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-2**。

实施例 57: ADC-3 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-3**。

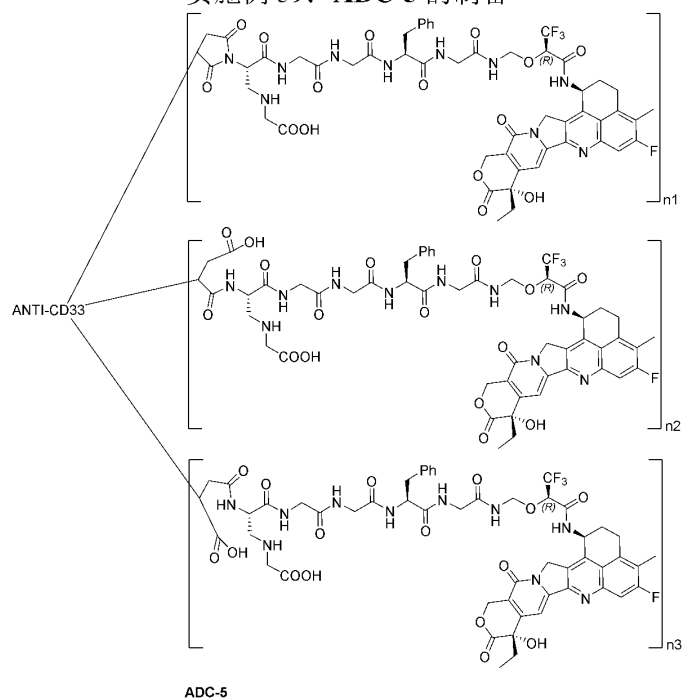
实施例 58: ADC-4 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-4**。

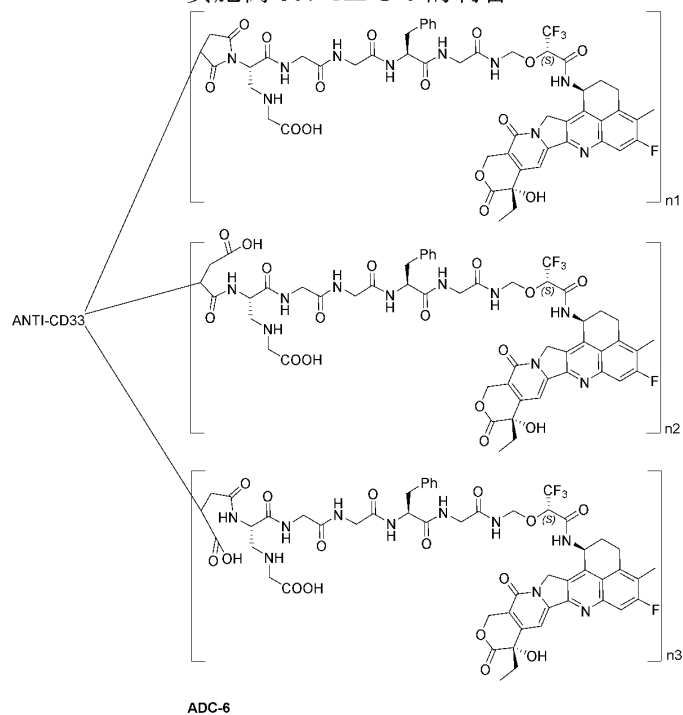
5

实施例 59: ADC-5 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-5**。

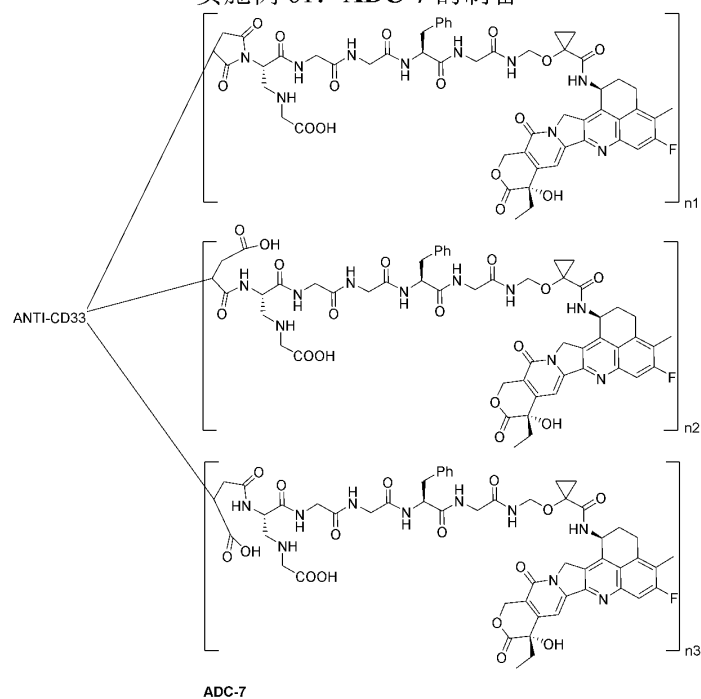
实施例 60: ADC-6 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-6**。

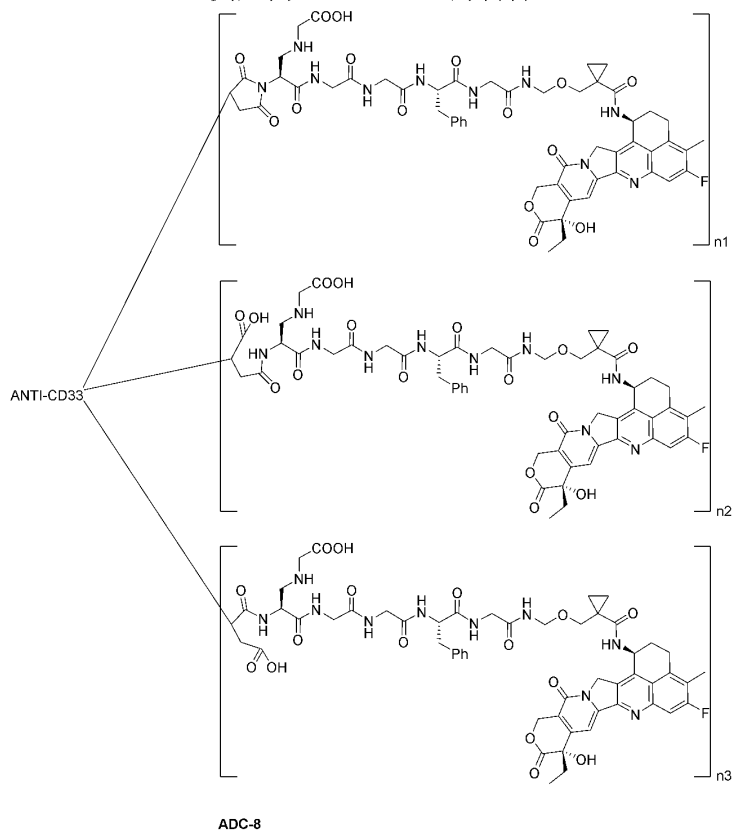
5

实施例 61: ADC-7 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-7**。

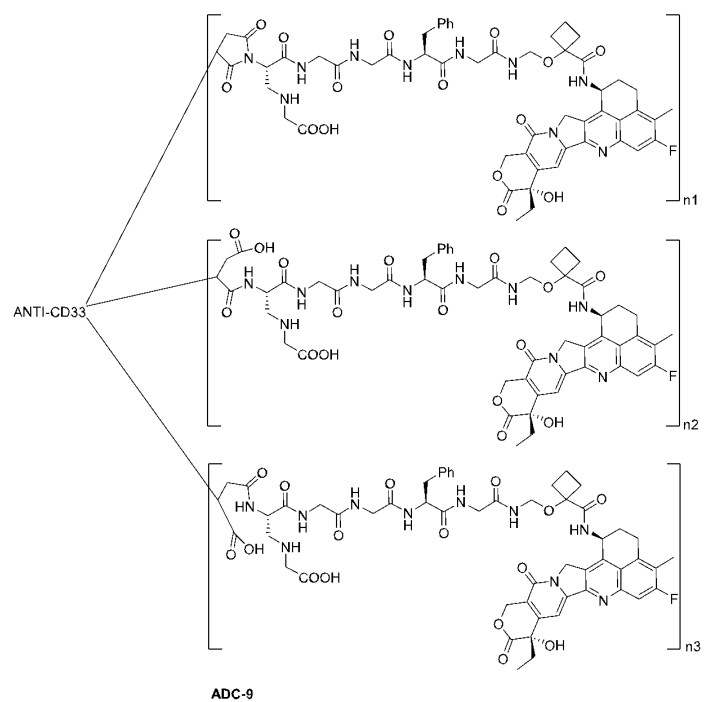
实施例 62: **ADC-8** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-8**。

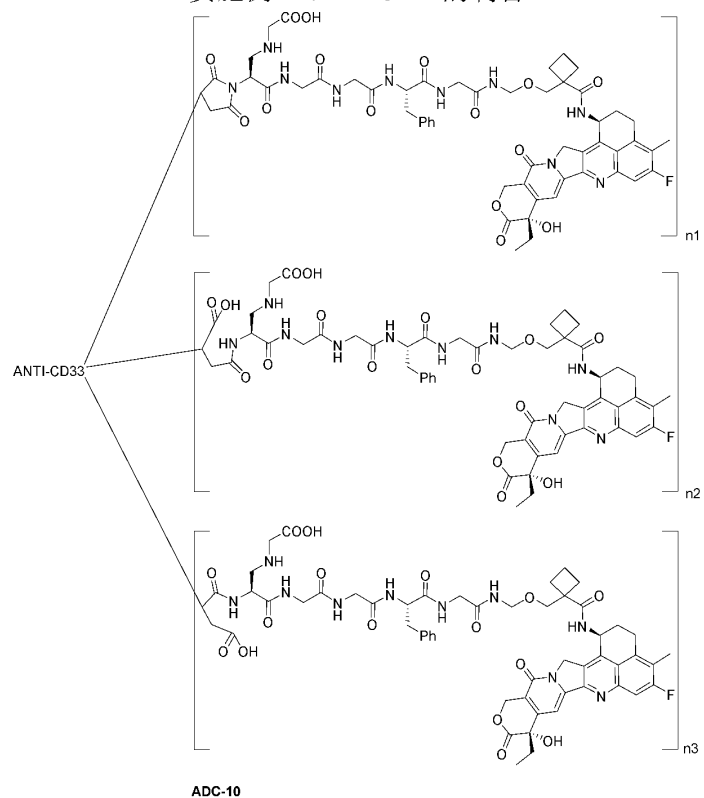
5

实施例 63: **ADC-9** 的制备



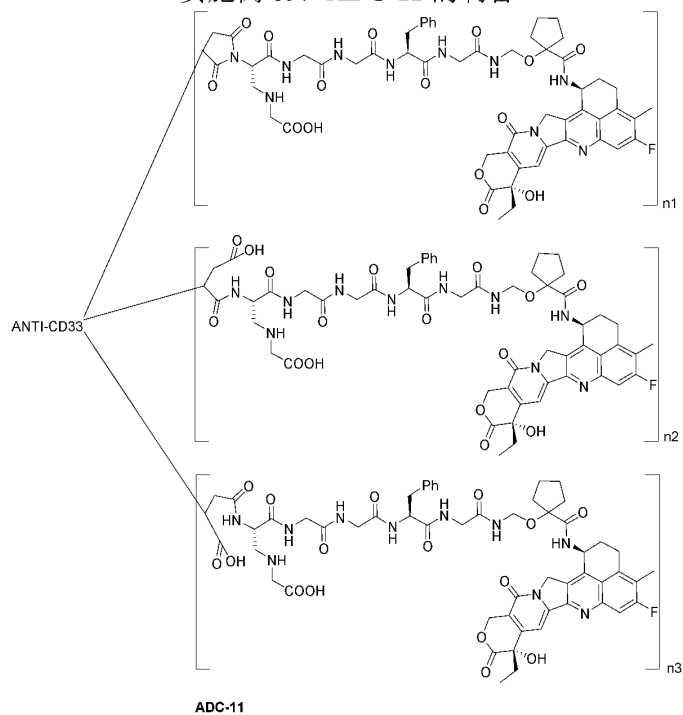
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-9**。

实施例 64: **ADC-10** 的制备



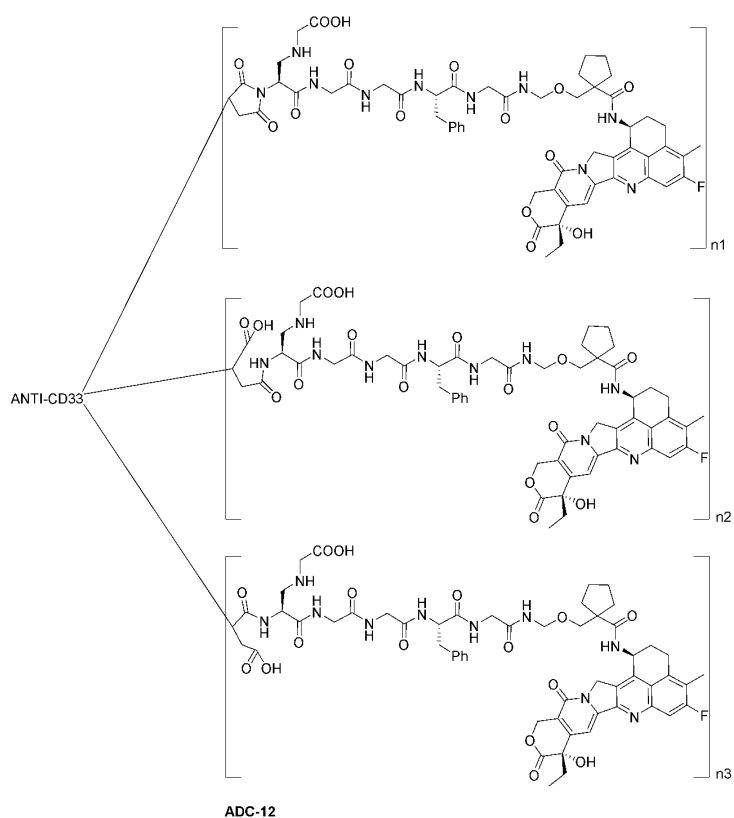
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-10**。

实施例 65: **ADC-11** 的制备



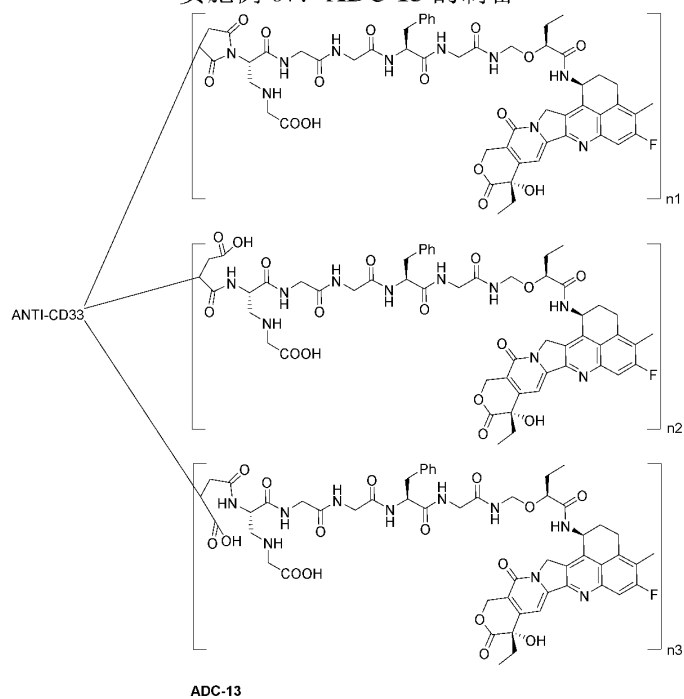
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-11**。

实施例 66: **ADC-12** 的制备



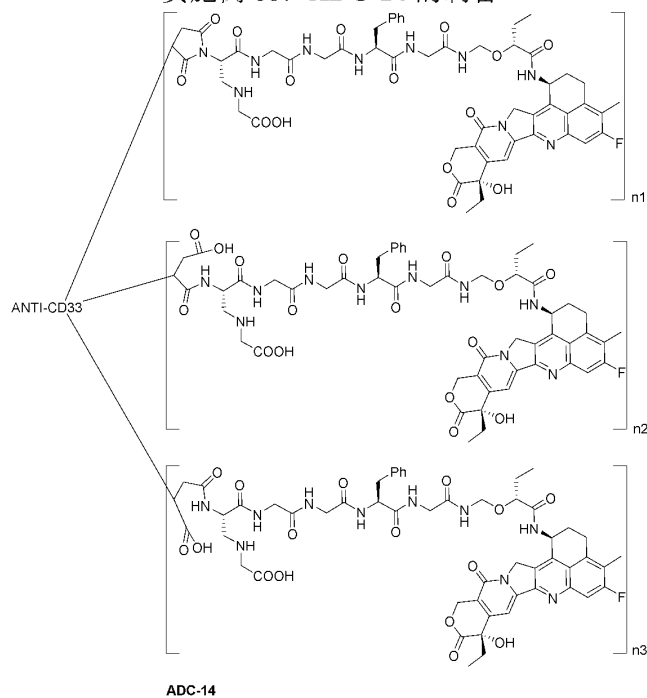
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-12**。

实施例 67: **ADC-13** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-13**。

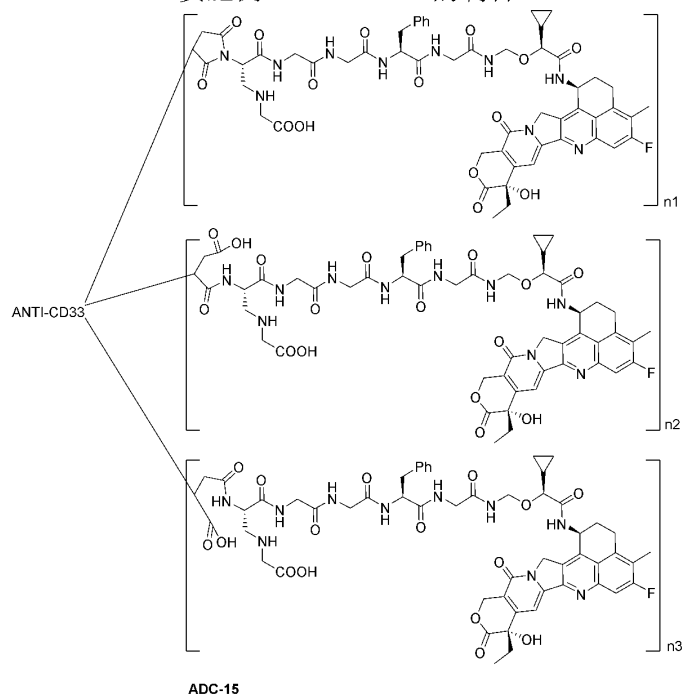
实施例 68: ADC-14 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-14**。

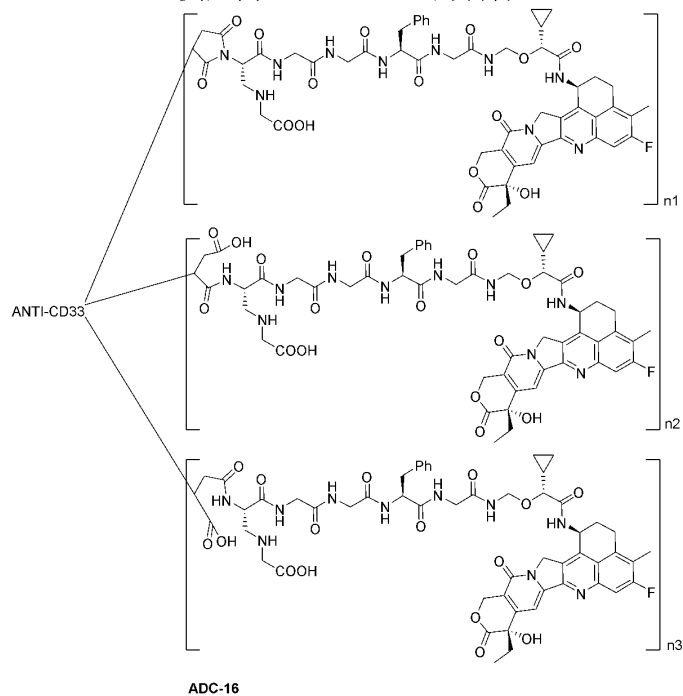
5

实施例 69: ADC-15 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-15**。

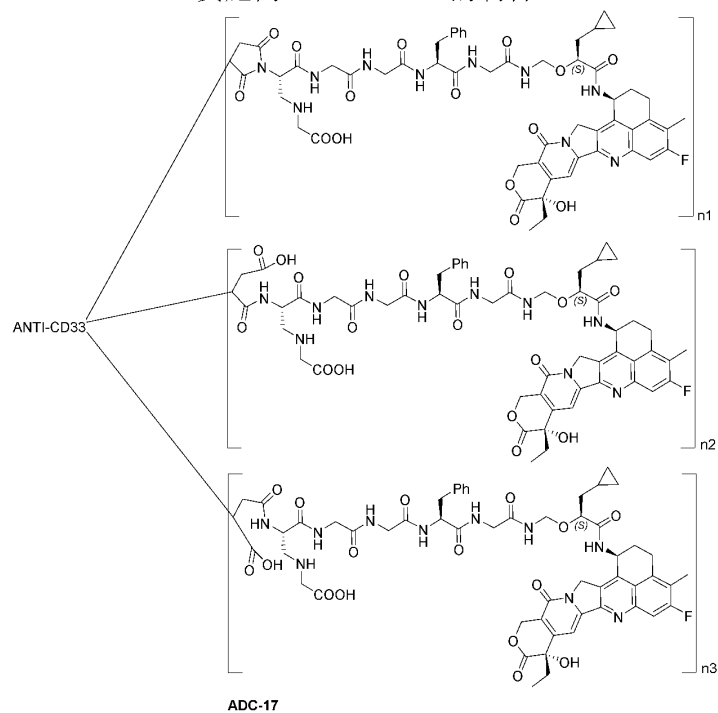
实施例 70: **ADC-16** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-16**。

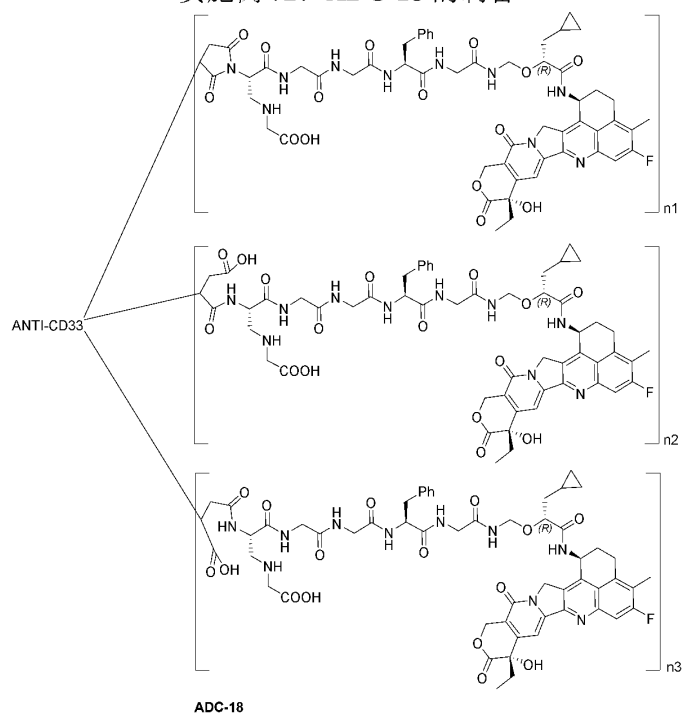
5

实施例 71: **ADC-17** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-17**。

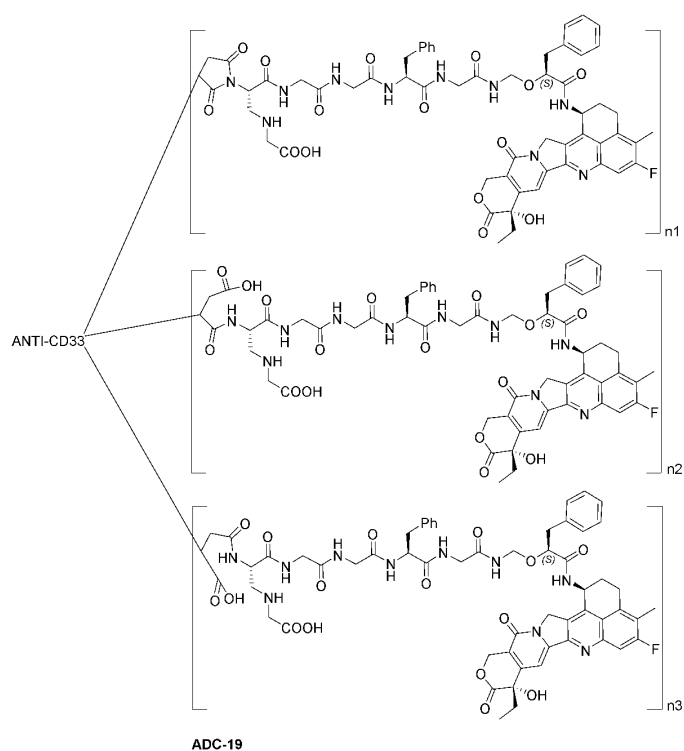
实施例 72: **ADC-18** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-18**。

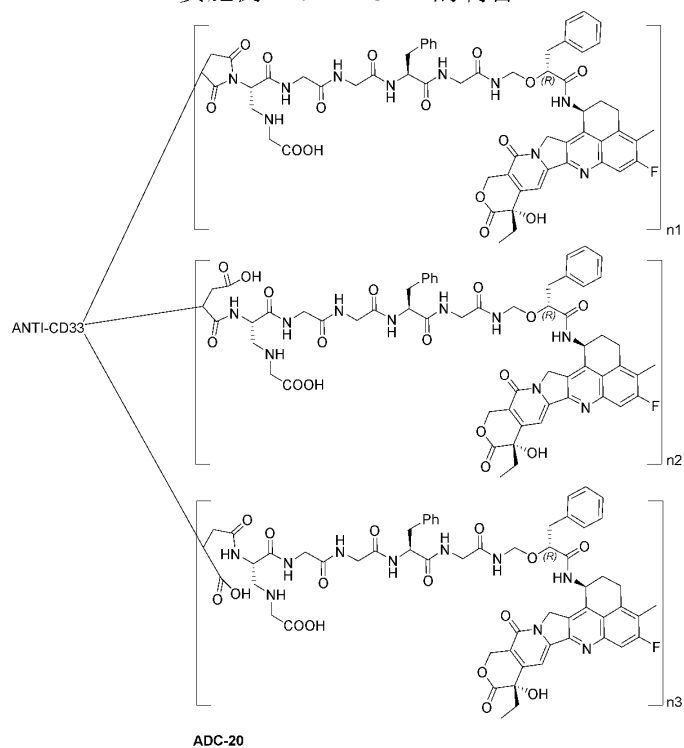
5

实施例 73: **ADC-19** 的制备



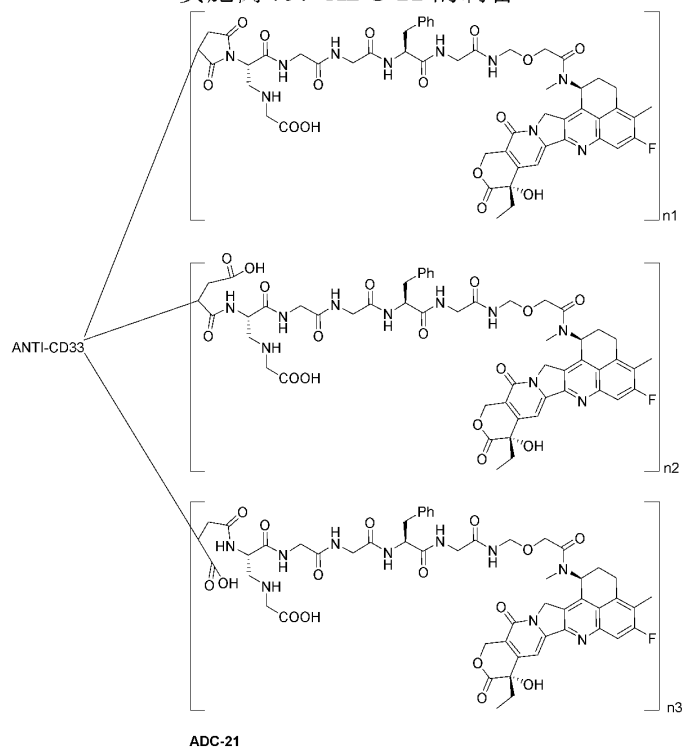
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-19**。

实施例 74: **ADC-20** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-20**。

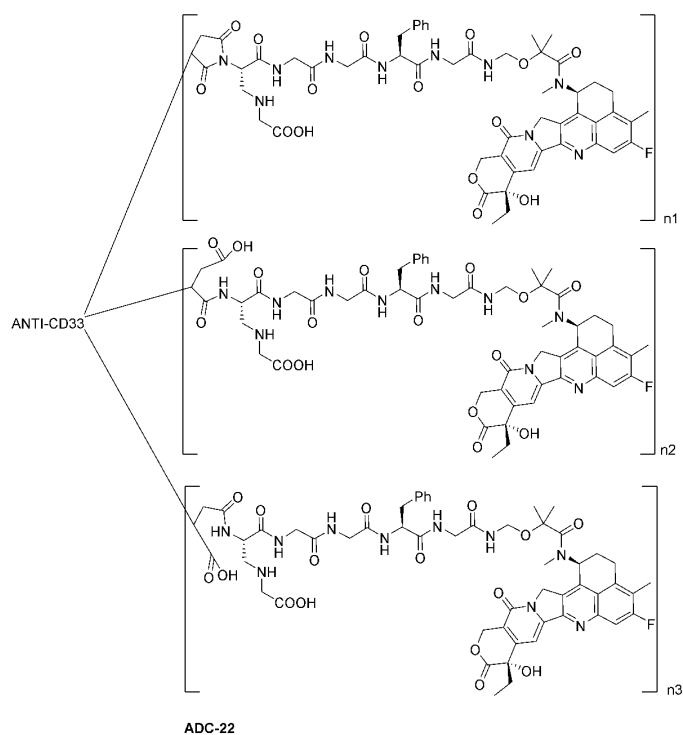
实施例 75: **ADC-21** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-21**。

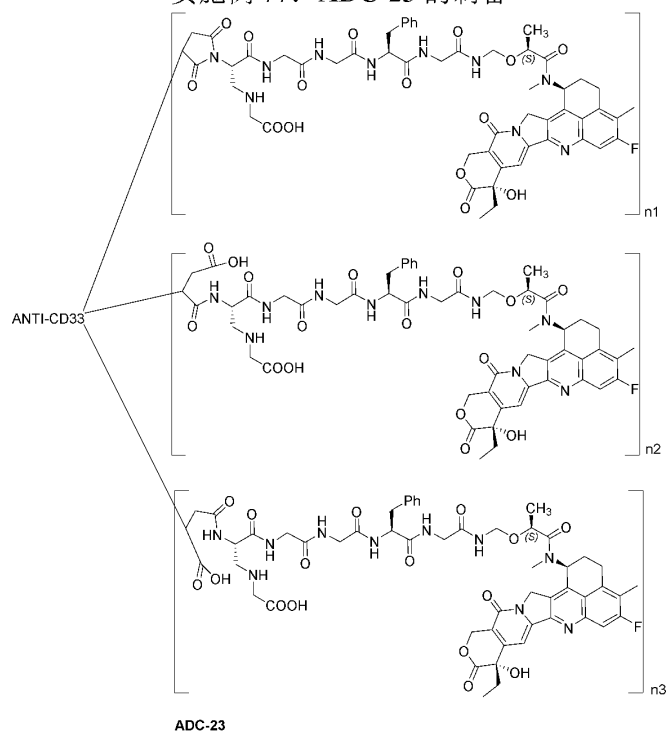
5

实施例 76: **ADC-22** 的制备



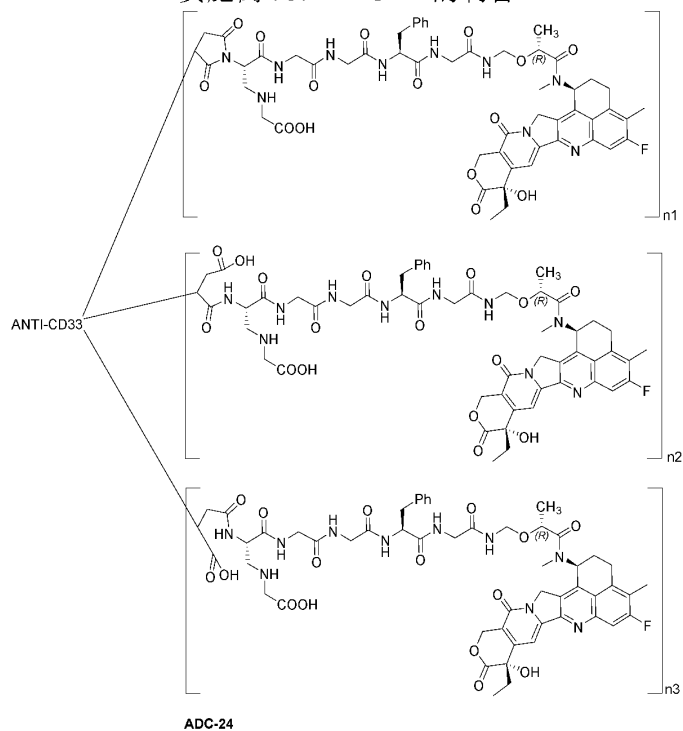
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-22**。

实施例 77: **ADC-23** 的制备



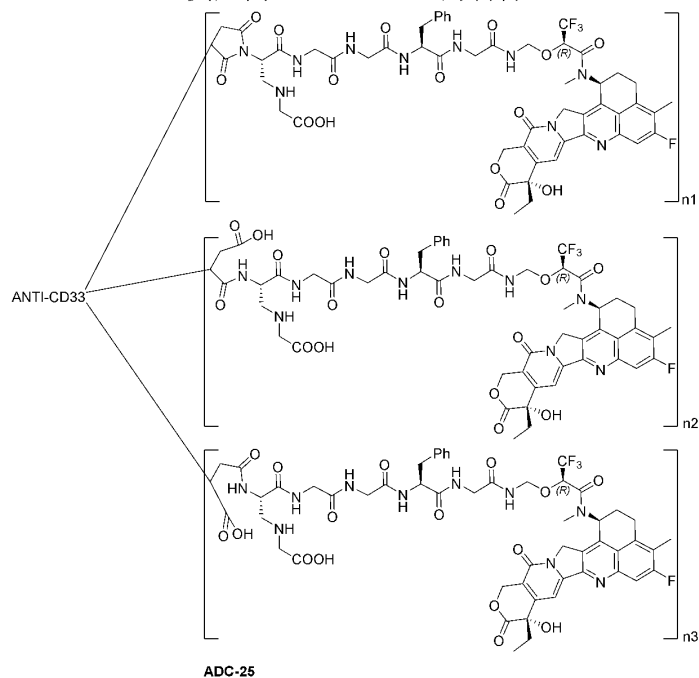
5 按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-23**。

实施例 78: ADC-24 的制备



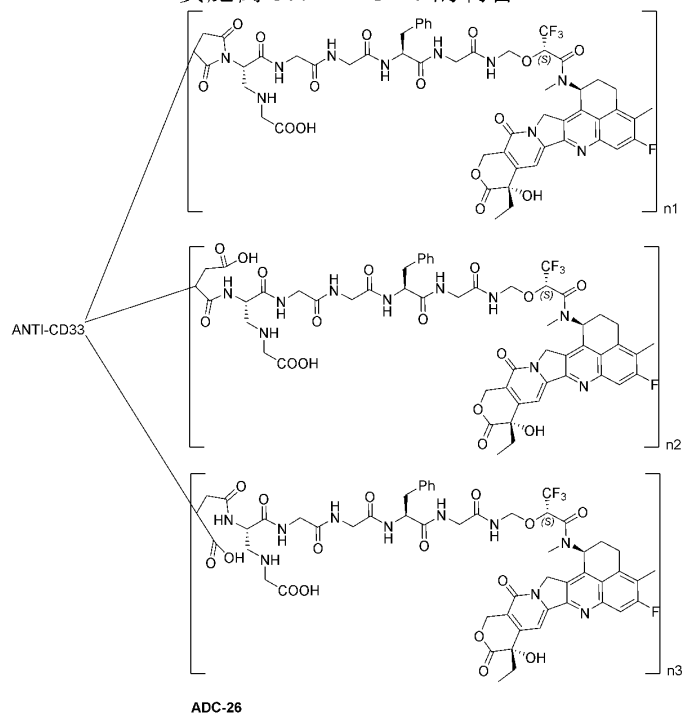
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-24。

实施例 79: ADC-25 的制备



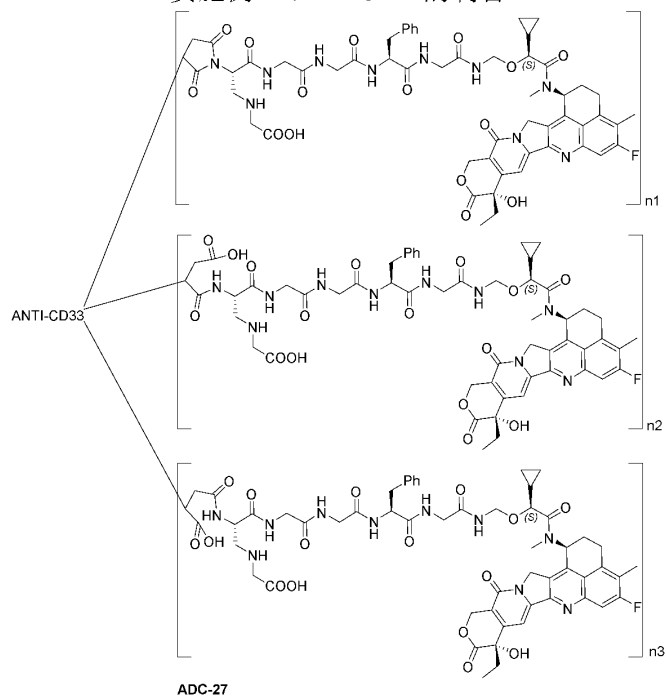
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-25。

实施例 80: ADC-26 的制备



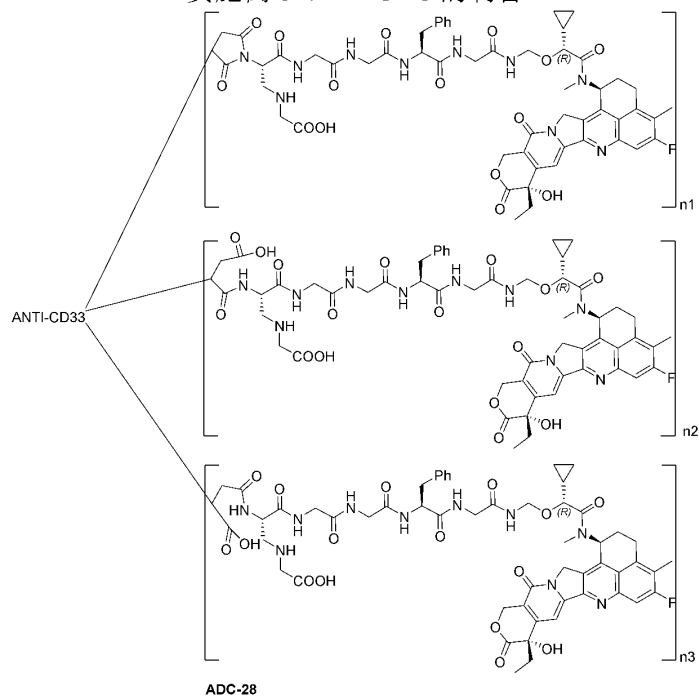
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-26。

实施例 81: ADC-27 的制备



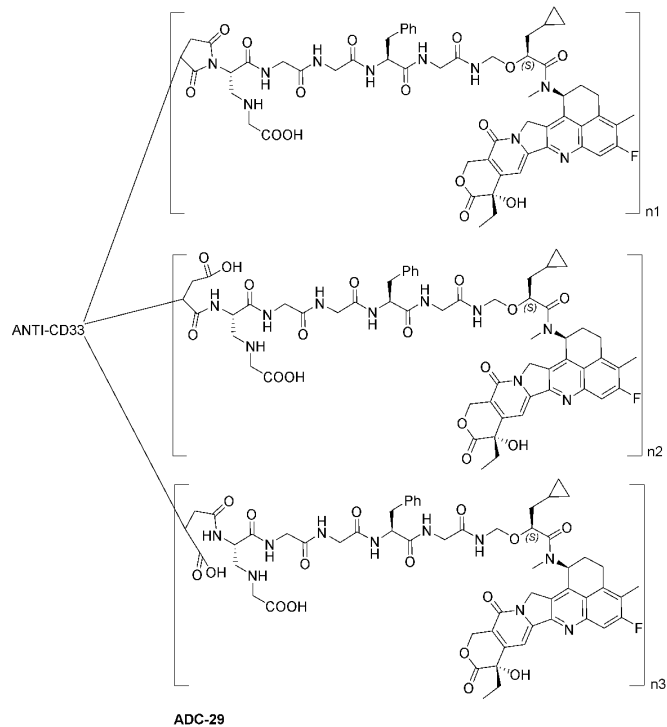
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-27。

实施例 82: ADC-28 的制备



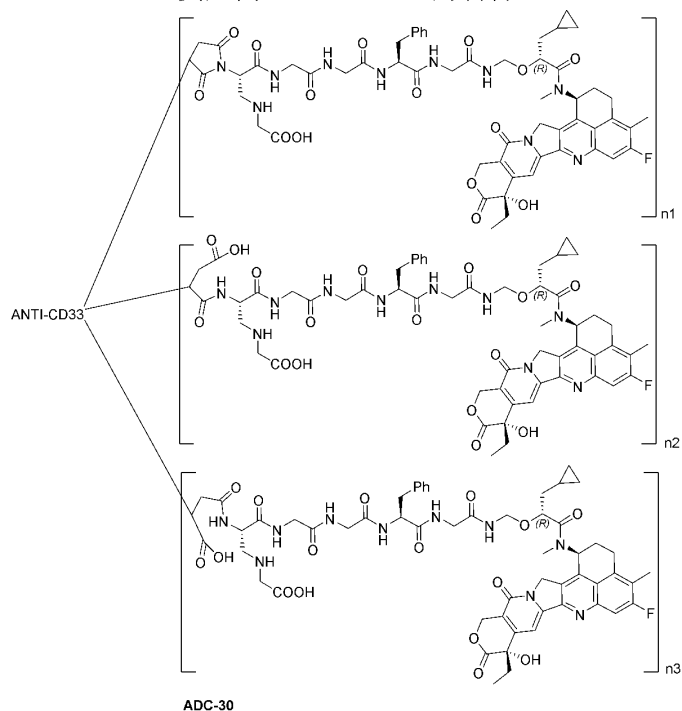
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-28。

实施例 83: ADC-29 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-29**。

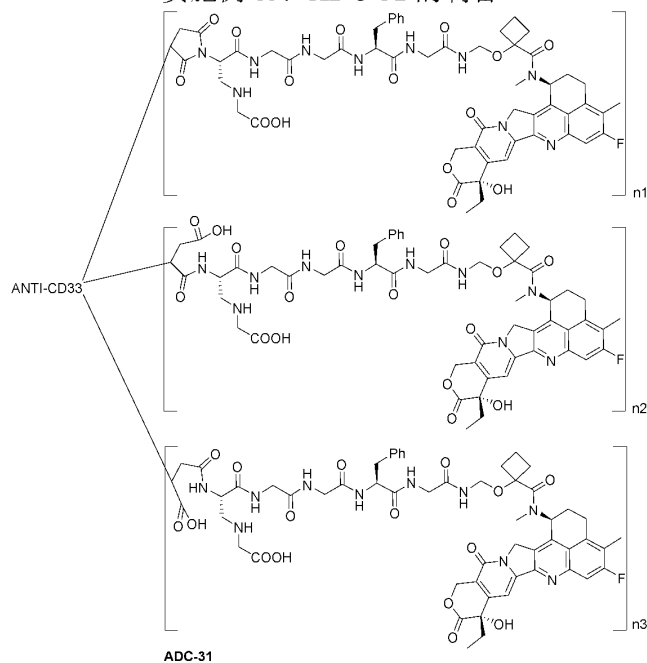
实施例 84: **ADC-30** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-30**。

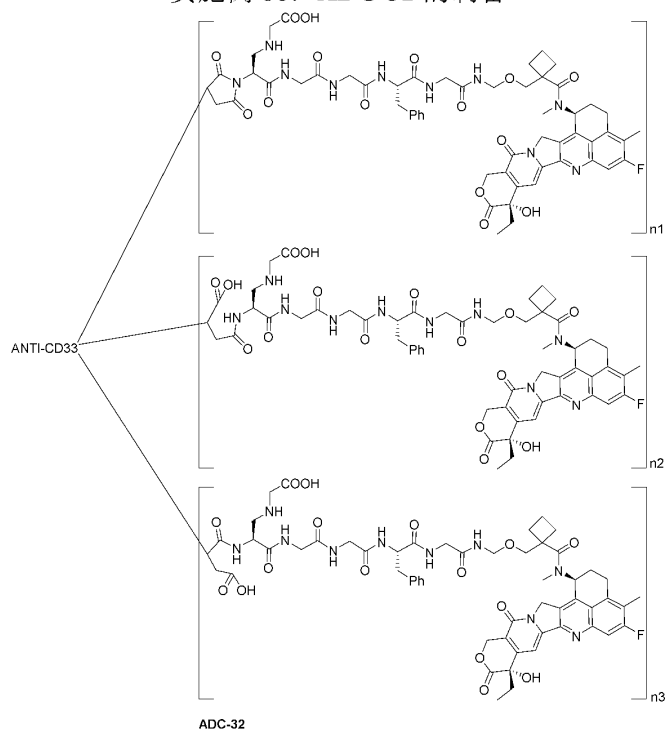
5

实施例 85: **ADC-31** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-31**。

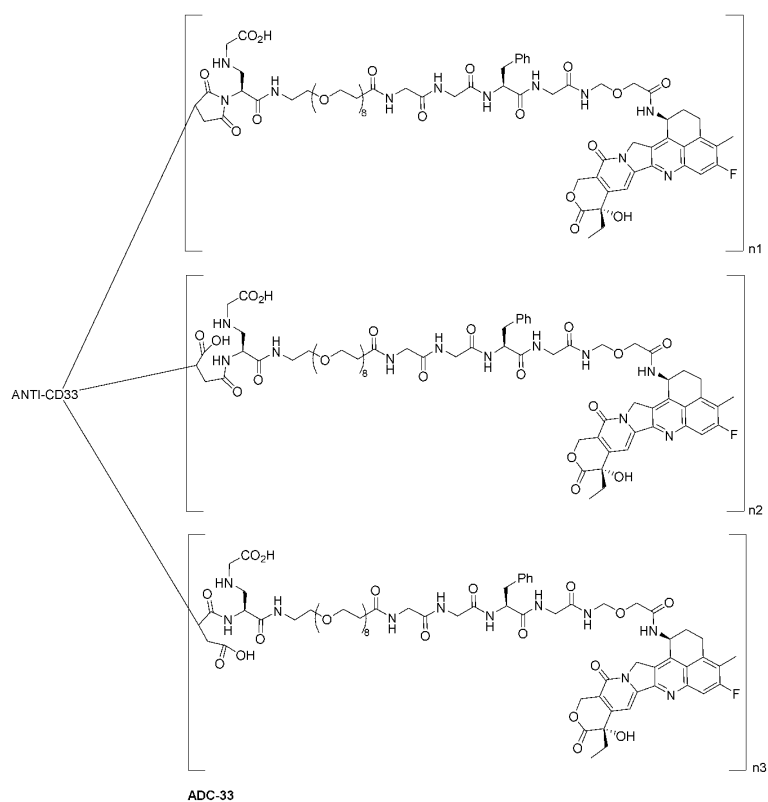
实施例 86: **ADC-32** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-32**。

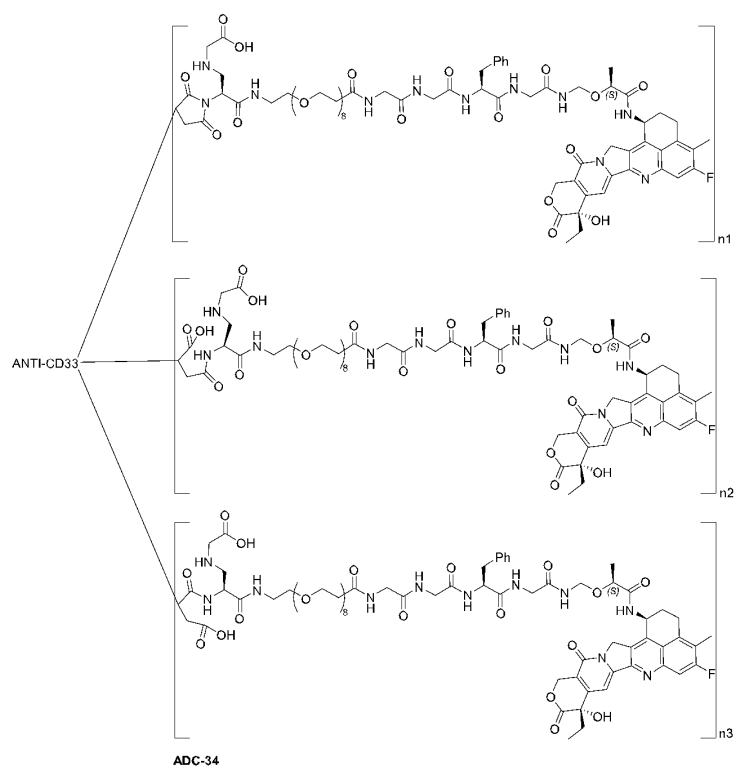
5

实施例 87: **ADC-33** 的制备



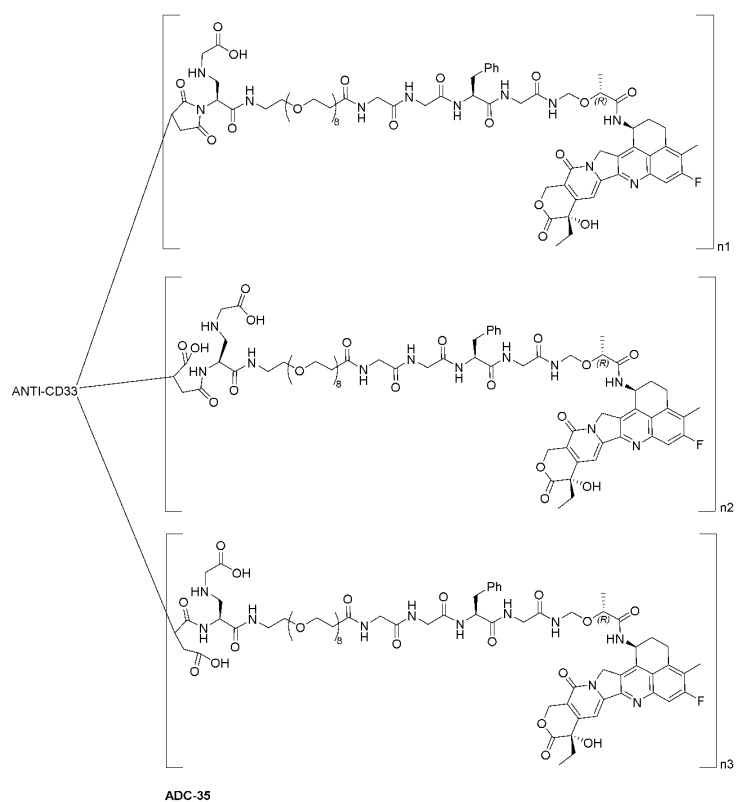
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-33**。

实施例 88: **ADC-34** 的制备



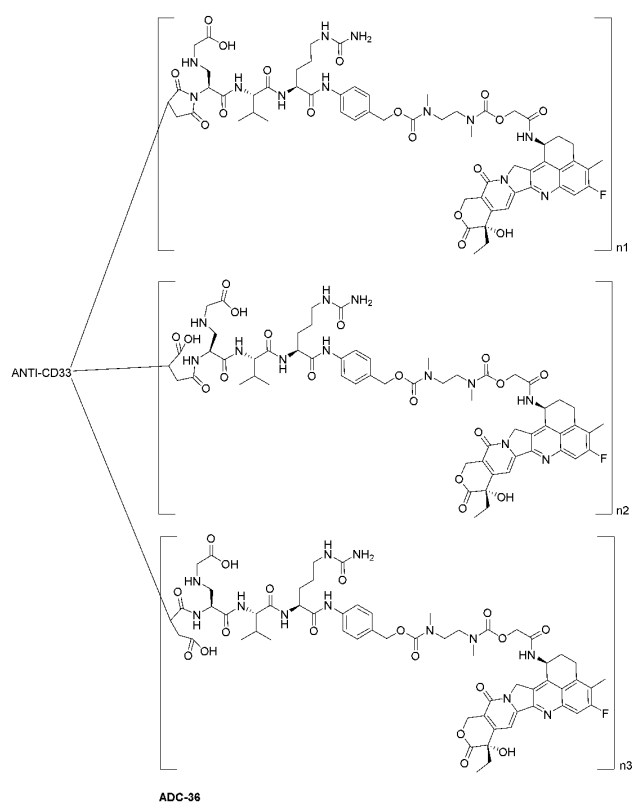
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-34**。

实施例 89: **ADC-35** 的制备



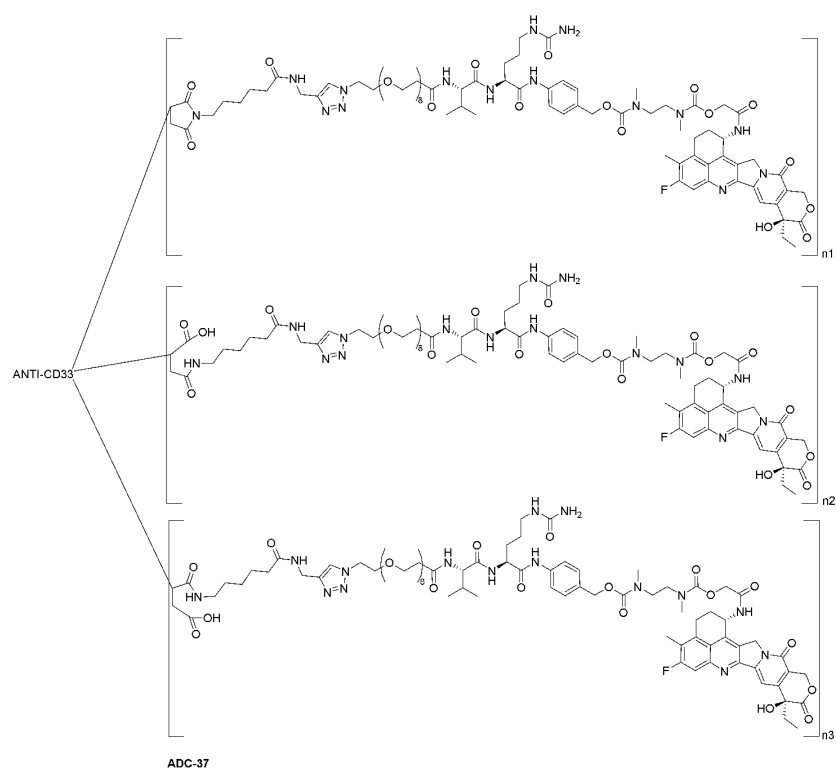
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-35**。

实施例 90: **ADC-36** 的制备



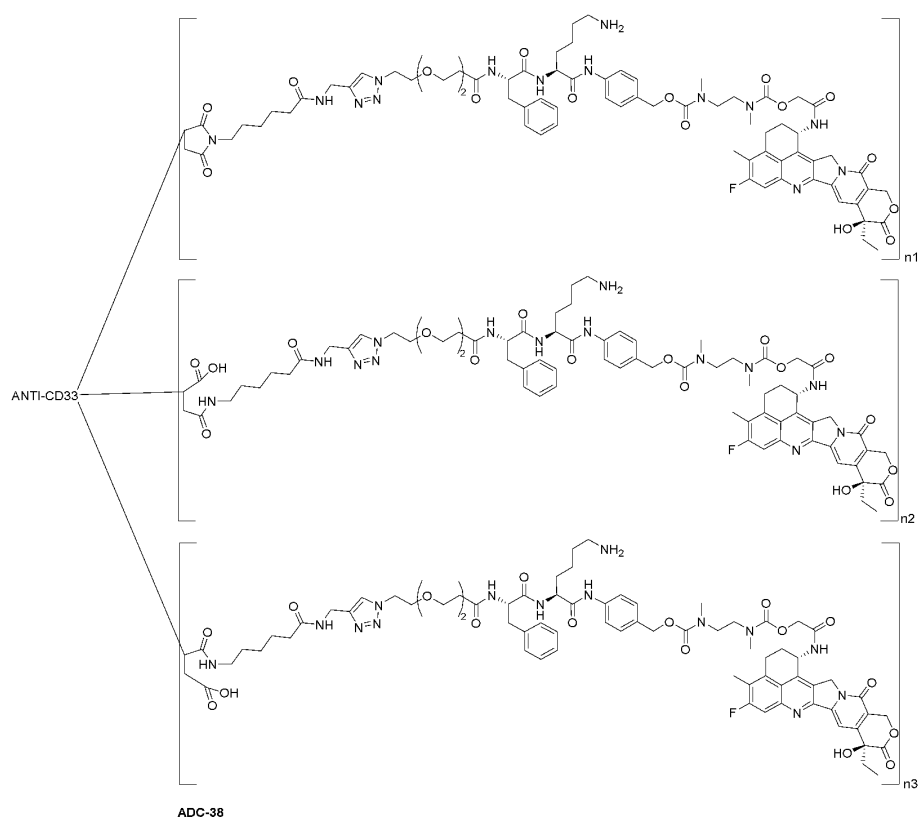
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-36**。

实施例 91: **ADC-37** 的制备



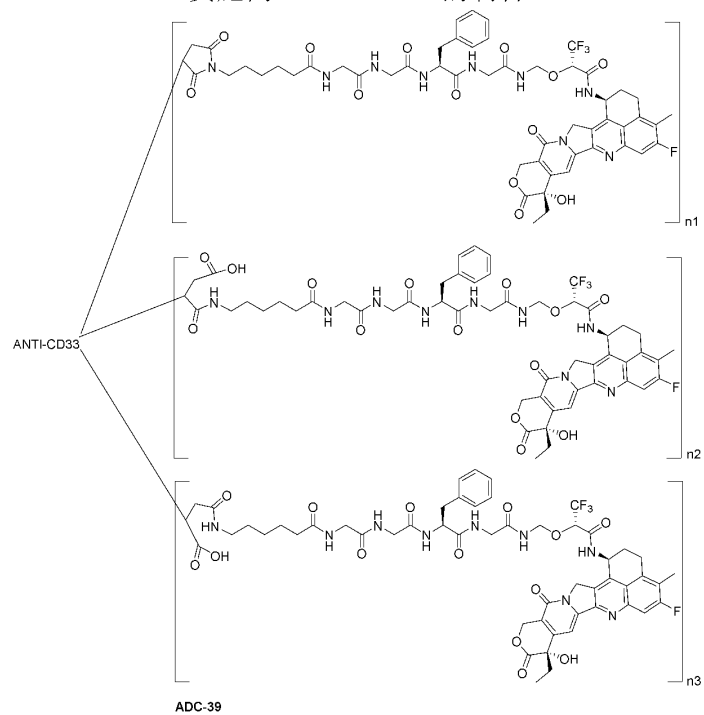
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-37**。

实施例 92: **ADC-38** 的制备



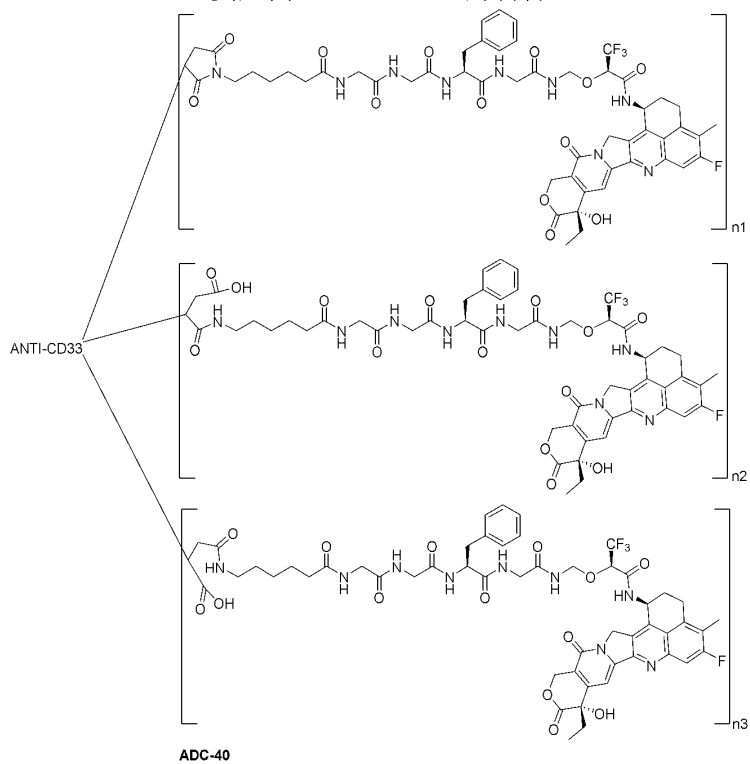
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-38**。

实施例 93: ADC-39 的制备



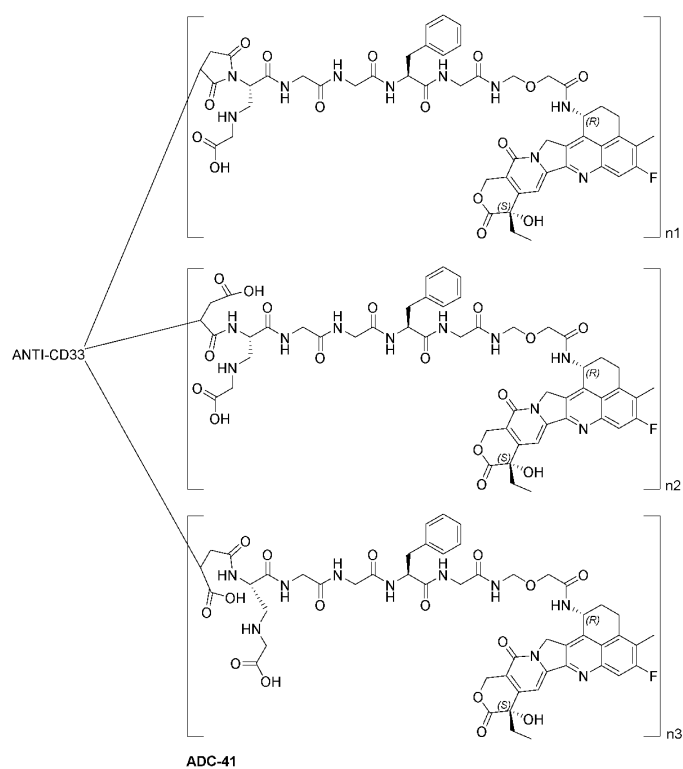
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-39**。

实施例 94: **ADC-40** 的制备



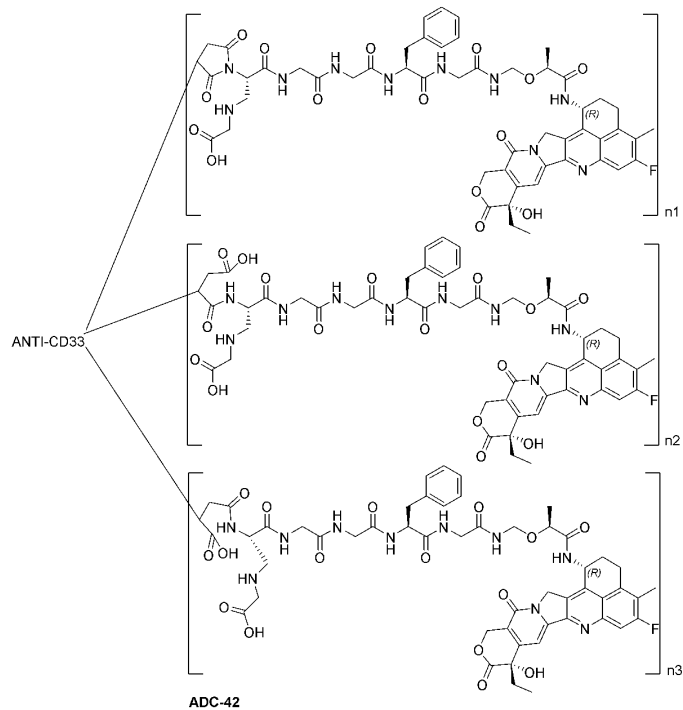
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-40**。

实施例 95: **ADC-41** 的制备



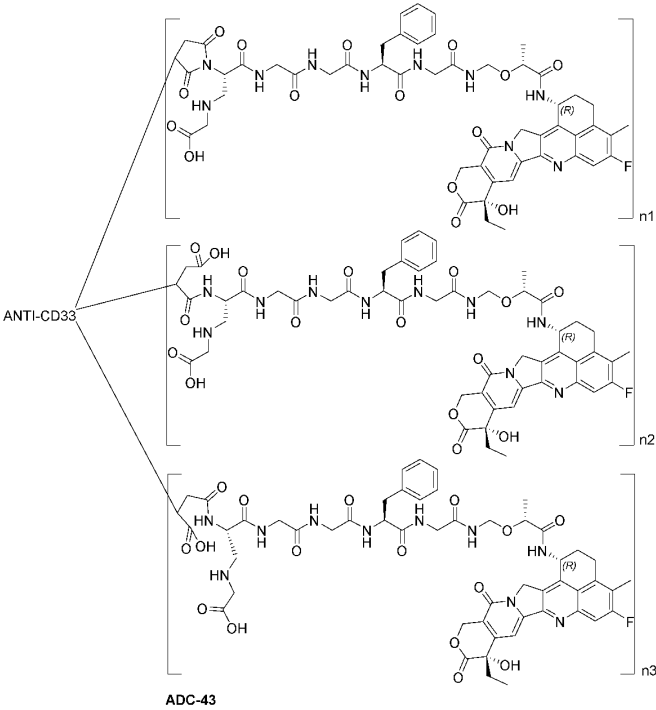
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-41**。

实施例 96: ADC-42 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-42**。

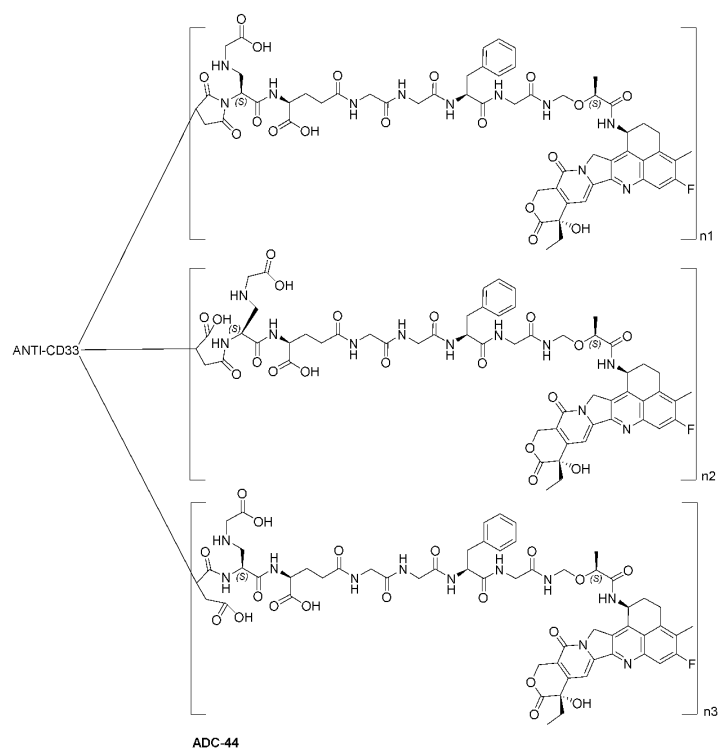
实施例 97: **ADC-43** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-43**。

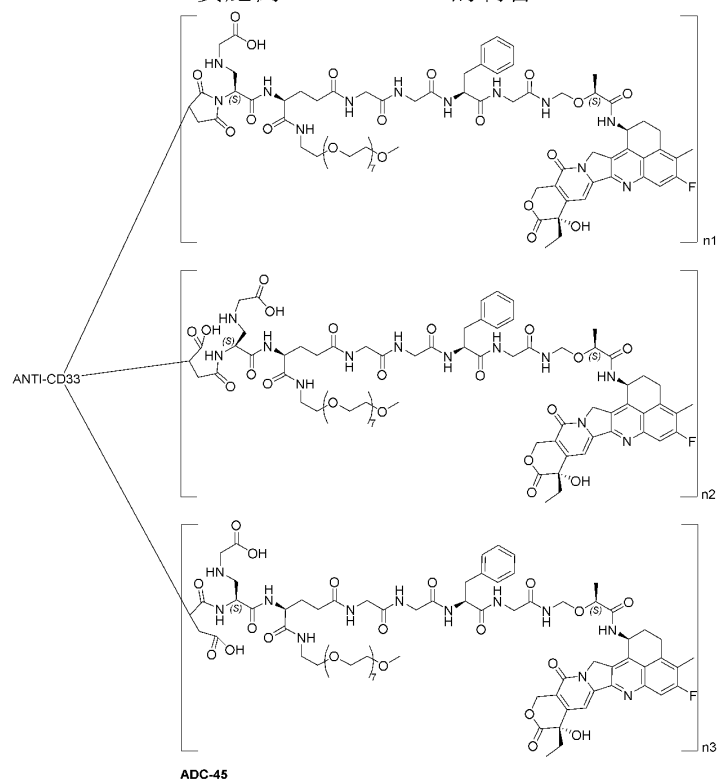
5

实施例 98: **ADC-44** 的制备



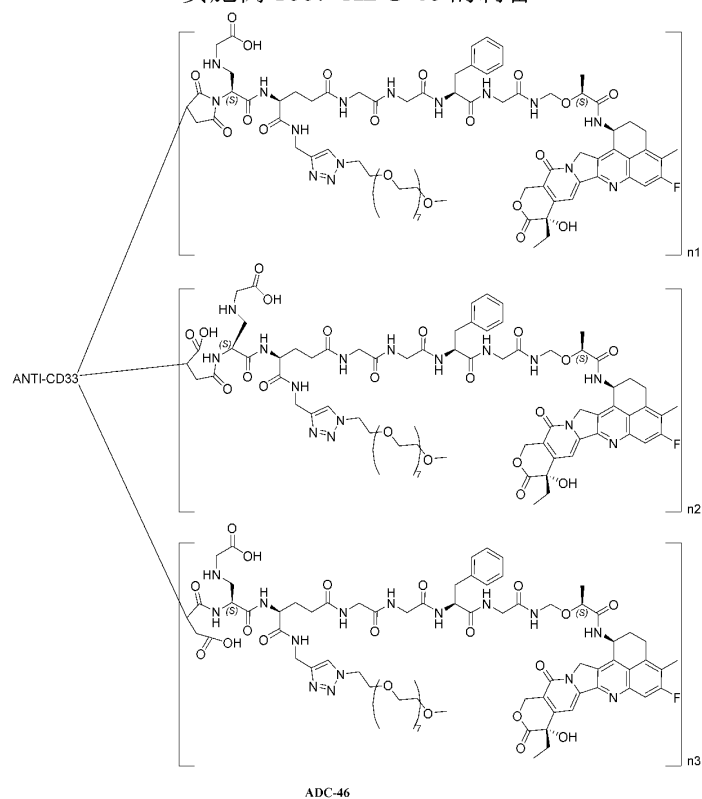
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-44**。

实施例 99: ADC-45 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-45**。

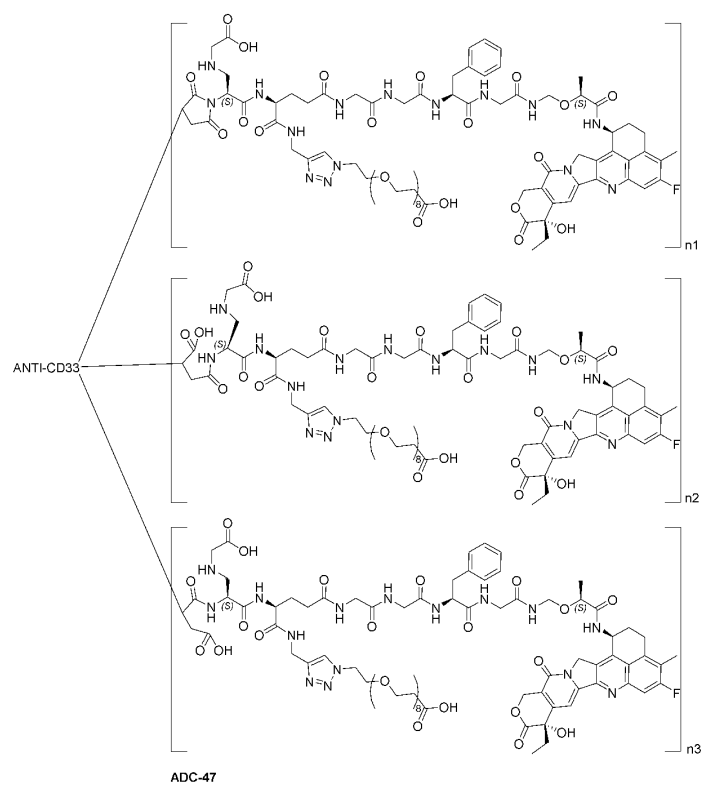
实施例 100: **ADC-46** 的制备



按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-46**。

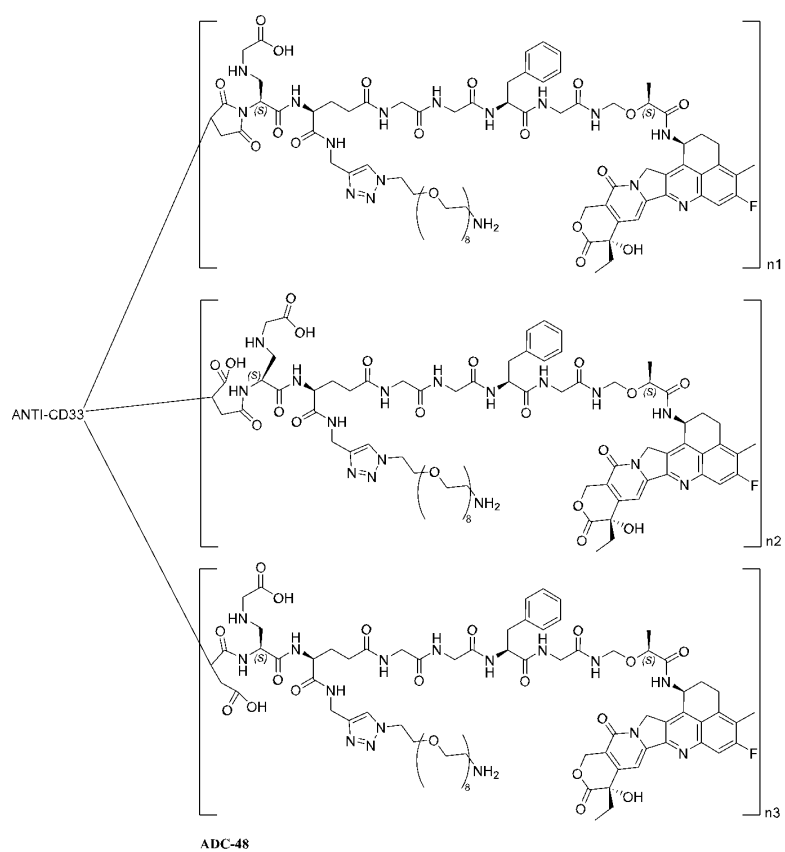
5

实施例 101: **ADC-47** 的制备



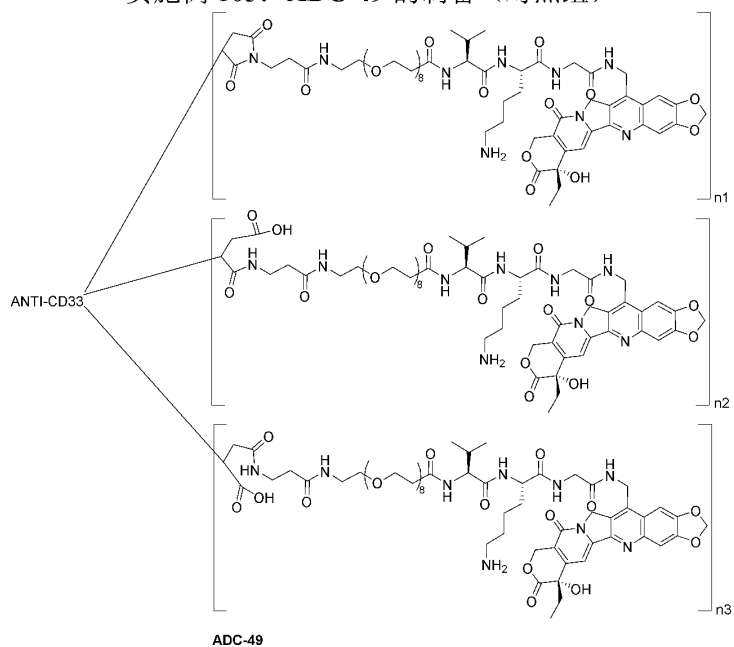
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-47**。

实施例 102: **ADC-48** 的制备



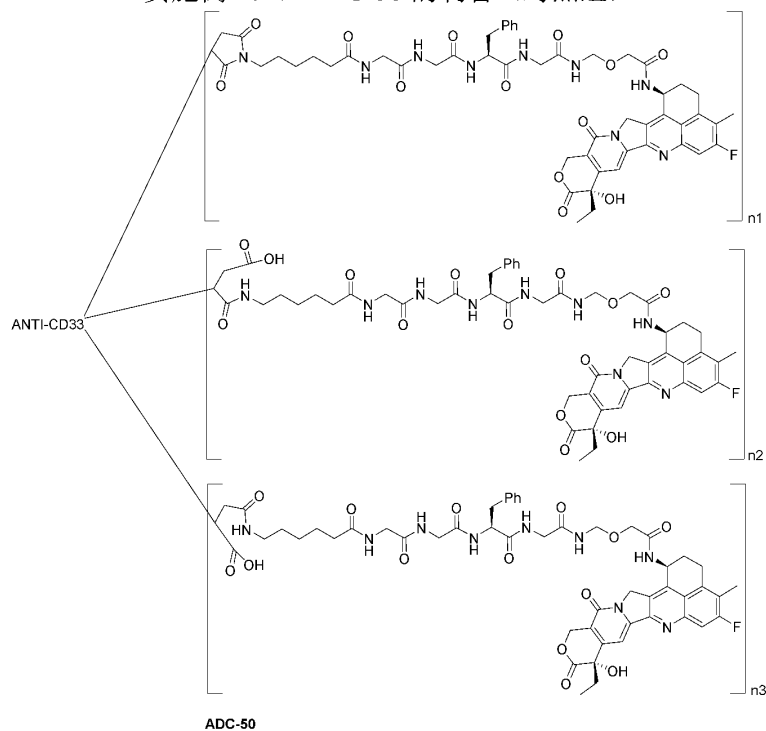
按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 **ADC-48**。

实施例 103: **ADC-49** 的制备 (对照组)



ADC-49 的 payload 参照专利“WO2019195665A1”第 148 页 Example 4-3 的合成路线制备, 按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-49。

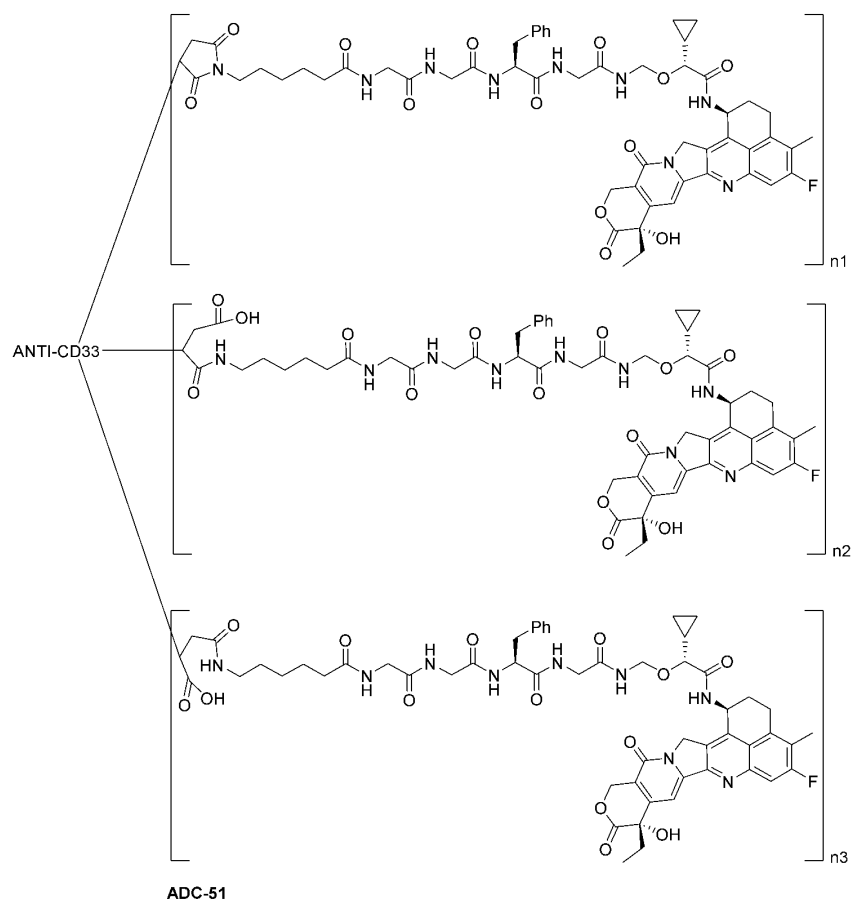
实施例 104: ADC-50 的制备 (对照组)



5

ADC-50 的 payload 参照专利“CN111065621A”第 47 页式(14)表示的化合物的合成路线制备, 按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-50。

实施例 105: ADC-51 的制备 (对照组)



ADC-51 的 payload 参照专利“WO2020063676A1”第 58 页实施例 9 中表示的化合物的合成路线制备, 按照实施例 54 中通用抗体-药物偶联物的偶联方法制备得到 ADC-51。

实施例 106: SEC-HPLC 方法测定单体率

使用 SEC-HPLC 方法测定单体率方法:

色谱柱: Biocore SEC-300 5 μm , 4.6 $\times$ 300 mm

厂家: NanoChrom, 货号: B213-050030-04630S

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

表 1: 方法参数

参数	设置
流速	0.3 mL/min

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

表 2. 本发明公开配体-药物偶联物(ADC)单体率数据

分子名称	降解%	聚集体%	单体率%
ADC-3	0.000	0.793	99.207
ADC-34	0.000	2.804	97.196
ADC-44	0.000	1.061	98.939
ADC-46	0.000	7.705	92.295
ADC-47	0.000	8.448	91.552
ADC-48	0.000	5.215	94.785

结果如上表 2 和图 1A~1H 所示。

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

5 实施例 107：药物-抗体比例（DAR）的测定

使用 RP-HPLC 方法测定药物抗体比例 DAR：

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

厂家：Sepax 货号：465950-4610

表 3：方法参数

参数	设置
流动相	A :0.1%TFA 水溶液； B: 0.1%TFA 乙腈溶液
流速	0.5 mL/min
波长	214 nm 和 280 nm
柱温	65 °C

样品盘温度	室温			
进样量	25 ug			
最大压力	100bar/10MPa/1450PSI			
梯度	时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0.0	0.5	75	25
	3	0.5	75	25
	28	0.5	50	50
	30	0.5	5	95
	32	0.5	5	95
	33	0.5	75	25
	40	0.5	75	25

表 4：发明公开配体-药物偶联物（ADC）偶联比（DAR）详细数据

样品名	RP-DAR
ADC-3	8.66
ADC-34	9.40
ADC-44	8.63
ADC-46	8.56
ADC-47	8.32
ADC-48	8.01

结果如上表 4 和图 2A~2H 所示。

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

实施例 108：抗体-药物偶联物的水解分析

本发明采用分子量分析对抗体-药物偶联物的水解情况进行表征。

1) 实验目的及原理：

本实验目的是通过对比 ADC 的 LC-MS 实测分子量和理论分子量，对其完

整分子量进行确证。完整蛋白的液-质联用（LC-MS）分析是用于比较抗体理论平均分子量和实测平均分子量的一种重要技术手段。分子量理论值和实测值之间的任何差异均提示抗体-药物偶联物结构上的改变。本发明 ADC 中的 payload 容易与水分子作用，发生开环反应，分子量增加 18Da，通过对比 ADC 的理论分子量与实测分子量可以确认 ADC 药物的水解开环程度。

2) 实验测试条件：

表 5-1 仪器设备清单

仪器设备	厂商	货号
Acquity UPLC H-Class	Waters	INS-Q-147 (设备编码)
Xevo G2-XS QTof with UNIFI	Waters	
ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column, 200Å,1.7µm, 4.6mm×150mm	Waters	186005225
Zeba™脱盐离心柱, 7K MWCO	Thermo Scientific	89882

表 5-2 试剂清单

试剂	厂商	货号
质谱级水	Fisher Chemical	W6-4
乙酸铵，质谱级	Sigma	73594-25G-F

A. 样品准备

使用 Zeba 脱盐离心柱脱盐换液，将样品换液至超纯水中，各取 10 µg 上样至 LC-MS 进行分析。

B. UPLC 分离方法设置

流动相：50 mM 乙酸铵水溶液

色谱柱：ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column，200 Å,1.7 µm，4.6 mm×150 mm；

流速：0.3 mL/min，柱温：30 °C，检测波长：280 nm

表 5-3 梯度参数

时间（min）	流速（mL/min）	流动相（%）
0	0.3	100
3.5	0.3	
3.6	0.065	
7.5	0.065	

7.8	0.3	
10.0	0.3	

C. 质谱参数设置

数据采集：正离子模式
毛细管电压：3 kV；锥孔电压：200 V；
离子源温度：150 °C；脱溶剂气温度：500 °C；
5 锥孔气流速：50 L/Hr；脱溶剂气流速：600 L/Hr；
扫描设置：3.6-7.8 min 进 MS 分析；
低质量端 (m/z)：500；高质量端 (m/z)：7500；
扫描时间：1.000 s；碰撞能量：6 eV；
质量锁定：亮氨酸脑啡肽 (m/z 556.2766)

10 D. 数据处理：UNIFI 软件设置

数据分析用 Waters 生物制药平台解决方案和 UNIFI 软件 (版本号：V.1.9.4) 完成。

- MaxEnt1
 - 输入质荷比范围：
 - 15 ■ 抗体：4800-6300 m/z；ADC：5100-6500 m/z
 - 输出质量范围：
 - 抗体：148000~149000 Da；ADC：158000~162000 Da
- MaxEnt1 参数
 - 输出分辨率：1.0 Da
 - 20 ○ 最小强度比 (左)：30%；最小强度比 (右)：30%
 - 自动降噪功能开启
 - 峰宽模式：手动
 - 起始 m/z 半峰宽：1.0 (抗体或 ADC)；
 - 结束 m/z 半峰宽：1.0 (抗体或 ADC)；
 - 25 ○ Iterations：20 (抗体)；15 (ADC)

数据处理时，理论序列的结构设置如下：

对于抗体：二硫键按照理论连接方式，全部成键；但是，轻链半胱氨酸定点

插入位点游离；

对于 ADC 样品：链内二硫键按照理论连接方式，全部成键；链间二硫键对应的 Cys 和轻链半胱氨酸定点插入位点游离连接 payload；

3) 实验结果：

5表 5：发明公开配体-药物偶联物（ADC）水解详细数据

名称	Observed RT min	Expected mass (Da)	Observed mass (Da)	偏差 (Da)	水解情况
裸抗	6.30	148600.1889	148610.174	+9.99	/
ADC-3	6.45	159434.778	159437.5384	+2.76	水解 20%
		159488.8239	159481.1591	-7.66	水解 50%
		159578.9003	159590.7599	+11.86	水解 100%

表 5 公开的数据表明，裸抗的理论分子量为 148600.1889 Da，实测分子量为 148610.174 Da，偏差为+9.99 Da，未超出仪器偏差范围（20 Da）。

当抗体偶联 10 个 payload 的情况下，其理论分子量为 159398.757 Da，如图 3 所示实测分子量包含 159437.5384 Da，159481.1591 Da，159590.7599 Da，当 ADC-3 中 payload 的丁二酰亚胺接头发生水解且水解 2 个、5 个、10 个丁二酰亚胺时，其理论分子量分别为 159434.778 Da，159488.8239 Da，159578.9003 Da（如表 5 所示），与实测值接近，分别偏差+2.76 Da，-7.66 Da，+11.86 Da，偏差处于仪器的误差范围内，因此，抗体-药物偶联物发生部分水解。

15实施例 109：血浆稳定性实验

配置 ADC 与去 IgG 的人血浆混合液，使 ADC 的终浓度为 0.6 mg/mL，放置于 37℃恒温箱中的水浴盒中孵育，孵育时间设置为 0 天，3 天，7 天，同时设置未孵育未提取对照和未孵育提取对照。孵育后的样品经纯化提取后测定药物抗体比例 DAR，用来反映 ADC 在人血浆中的稳定性。

20表 6. 本发明公开配体-药物偶联物(ADC)血浆稳定性 DAR 数据

样品名	未孵育未 提取	未孵育提 取	孵育 0 天 提取	孵育 3 天 提取	孵育 7 天 提取
-----	------------	-----------	--------------	--------------	--------------

ADC-3	8.66	8.81	8.66	8.54	8.42
ADC-34	9.40	9.00	9.10	8.91	8.55
ADC-44	8.63	8.72	8.75	8.48	8.22
ADC-46	8.56	8.46	8.49	8.46	8.32
ADC-47	8.32	8.17	8.24	8.16	8.2
ADC-48	8.01	7.91	7.88	7.65	7.29
ADC-50 (对照组)	9.25	8.99	8.71	8.25	7.32
ADC-51 (对照组)	8.91	9.03	8.82	7.88	7.37

备注：未孵育未提取是该 ADC 4℃ 0 天放置稳定性的 DAR 值；未孵育提取是该 ADC 未和血浆孵育但经纯化提取步骤后的 DAR 值，主要查看提取对 DAR 是否有影响；孵育 0 天，是指将 ADC 加入血浆后就开始纯化提取步骤后测的 DAR 值；孵育 3 天是指 ADC 加入血浆后在 37℃放置 3 天后开始纯化提取步骤后测的 DAR 值；孵育 7 天是指 ADC 加入血浆后在 37℃放置 7 天后开始纯化提取步骤后测的 DAR 值；

结论：本发明公开的 ADC 血浆稳定性较好，未出现 DAR 值的大变化，血浆稳定性优于对照 ADC-50 及 ADC-51。

- 10
- 15
- 实施例 110：ELISA 检测抗体-药物偶联物与重组人 CD33 蛋白的结合
- 抗体和抗原的结合能力可用 ELISA 来初步判断。本发明中将重组人 CD33 蛋白固定在酶条上，加入一系列浓度梯度的 CD33 抗体进行检测。
- 1.包被：用 1×PBS 稀释 CD33 至 0.5 μg/mL，每孔 100 μL，4℃包被过夜。
- 2.洗板：用洗板缓冲液（1×PBS+0.05%Tween20）洗板 3 次，每孔 200 μL，每次静置 1min。
- 3.封闭：第 3 次拍干洗板液后，加入封闭缓冲液（1×PBS+0.05%Tween20+1% BSA），每孔 200 μL，37℃封闭 1 小时。
- 4.洗板：洗板缓冲液洗板 3 次，每孔 200 μL，每次静置 1min。

- 5.一抗上样：用样品稀释液（1×PBS+0.05%Tween20+1% BSA）将抗体药物偶联物从 2 μg/mL 3 倍梯度稀释；用洗板缓冲液洗板 3 次，每孔 200μL，每次静置 1min。
6. 二抗上样：用分析缓冲液（1×PBS+0.05%Tween20+1% BSA）将 Solarbio 兔抗人 1:10000 稀释至每孔 100 μL，37°C静置 1 小时。
- 7.洗板：洗板缓冲液洗板 3 次，每孔 200 μL，每次静置 1min。
- 8.读数：加入 TMB 显色液（每孔 50 μL），显色 7 min 后加入的 2 M H₂SO₄ (每孔 50 μL)终止。酶标仪 450 nm 读板。
- 结论：如附图 4A、4B、4C 显示，偶联后的 ADC-3、ADC-46、ADC-47 及 ADC-48 分别保持了与裸抗相似的亲和力，EC₅₀ 值无显著差异。说明本发明裸抗偶联毒素后，不影响其与抗原的亲和力。

实施例 111 抗体-药物偶联物体外药效检测

本发明中利用多种人源肿瘤细胞株（HL-60, HEL92.1.7, TF-1, MV4-11, MOLM-13, U937 与 CMK）作为实验模型，以评价 ADC 偶联药物的体外药效。接种一定数目的肿瘤细胞系于 96 孔板中，向细胞中加入梯度稀释的受试抗体及对应的 ADC 药物，处理 5 天，利用 Alamar Blue 或 MTS 检测细胞活力，通过计算 IC₅₀ 评价受试抗体及 ADC 对肿瘤细胞系的抑制效果。抗体药物起始浓度为 500 nM，稀释倍数为 7 倍，共 8 个浓度点，处理 5 天。最终算法按照存活率=(实验组-空白)/(对照组-空白组)×100%，随后利用 Graph Pad Prism 拟合曲线，计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

表 7：受试物 anti-CD33 裸抗, ADC-3, ADC-47 与 ADC-48 在人源肿瘤细胞株 HL-60, HEL92.1.7, TF-1, MV4-11, MOLM-13, U937 与 CMK 中的体外药效结果：

Group	名称	IC50(nM)
HL-60	anti-CD33	> 500
	ADC-3	2.01
	ADC-47	2.76

	ADC-48	20.48
HEL92.1.7	anti-CD33	>500
	ADC-3	1.30
	ADC-47	1.31
	ADC-48	20.20
TF-1	anti-CD33	>500
	ADC-3	0.11
	ADC-47	0.13
	ADC-48	0.75
MV4-11	anti-CD33	>500
	ADC-3	0.25
	ADC-47	0.49
	ADC-48	0.84
MOLM-13	anti-CD33	>500
	ADC-3	0.03
	ADC-47	0.13
	ADC-48	0.06
U937	anti-CD33	>500
	ADC-3	4.16
	ADC-47	7.64
	ADC-48	176.88
CMK	anti-CD33	>500
	ADC-3	3.51
	ADC-47	7.05
	ADC-48	60.12

结果如上表 7 和图 5A~5G 所示。

结论：在 HL-60, HEL92.1.7, TF-1, MV4-11, MOLM-13, U937 与 CMK 细胞模型中，裸抗 anti-CD33 未见肿瘤细胞杀伤活性；ADC-3 在多株髓系来源的肿瘤细胞中效果最优。

5

实施例 112 抗体-药物偶联物体内药效检测

本发明建立了人红白细胞白血病细胞 HEL92.1.7 BALB/c Nude 皮下移植瘤模型，以评价 ADC 偶联药物 anti-CD33 mab、ADC-3 的体内药效。以 5×10^6 个 HEL92.1.7 细胞 (0.1mL/只) 通过皮下注射到 5~6 周鼠龄的 BALB/c Nude 右侧肩胛部，待小鼠肿瘤平均大小生长至 230~270 mm³ 左右，随机分为溶媒对照组 (Vehicle)、anti-CD33 mab 治疗组 (10 mg/kg)、ADC-3 治疗组 (5 mg/kg、10 mg/kg)，每组 5 只，并开始给药 (D0)。各组均按 10 mL/kg 体重尾静脉注射给药，每周给药 1 次，连续给药 4 周 (QWx4)。所有组观察到分组给药后第 24 天 (D24) (表 8、附图 6A) 数据显示为测量时肿瘤平均体积 $\pm$ SE。anti-CD33 以 10 mg/kg 剂量，ADC-3 以 5 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量分别进行尾静脉给药 (QWx4)，抑瘤效果显著。

表 8 在人红白血病细胞 HEL92.1.7 BALB/c-Nude 小鼠皮下移植瘤模型中各组药效分析表

实验组	给药后第 0 天	给药后第 24 天				
	平均肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$)mm ³	平均肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$) mm ³	相对肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$)	TGI (%)	T/C(%)	P value
Group 1 Vehicle	269.92 $\pm$ 68.00	3326.407 $\pm$ 375.15	19.25 $\pm$ 5.33	-	-	-
Group 2 anti-CD33 mab (10 mg/kg)	242.24 $\pm$ 48.81	1934.62 $\pm$ 483.76	10.12 $\pm$ 2.22	35.19	64.81	0.034
Group 3 ADC-3 (5 mg/kg)	244.91 $\pm$ 61.35	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	100.00	0.00	<0.001
Group 4 ADC-3 (10 mg/kg)	256.14 $\pm$ 61.73	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	100.00	0.00	<0.001

注：1. 数据以“平均值 $\pm$ 标准误差”表示；
2. $T/C \% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ ； $TGI \% = (1 - T/C) \times 100\%$ ；
3. P value 是通过比较各治疗组与溶媒对照组在 day 24 (给药后第 24 天) 的肿瘤体积得到。(由 Graphpad prism 6 进行分析，当 one-way ANOVA 分析的 P 值小于 0.05，Tukey 多

重检验用于进行所有组之间两两比较，*P* 值小于 0.05 时被认为具有统计显著性)。各组间比较结果如下：

Test	p.values	significance.level	Test	p.values	significance.level
G1 vs. G2	0.034	*	G1 vs. G3	<0.001	***
G1 vs. G4	<0.001	***	G2vs. G3	0.002	**
G2 vs. G4	0.002	**	G3 vs. G4	>0.999	ns

本发明建立了人髓性单核细胞白血病细胞 MV-4-11 BALB/c Nude 皮下移植
5 瘤模型，以评价 ADC 偶联药物 anti-CD33 mab 和 ADC-3 的体内药效。以 3.08×10^6
个 MV4-11 细胞 (0.1mL/只) 通过皮下注射到 5~6 周鼠龄的 BALB/c Nude 右侧
肩胛部，待小鼠肿瘤平均大小生长至 180~200mm³ 左右，随机分为溶媒对照组
(Vehicle)、anti-CD33 mab 治疗组 (10 mg/kg) 和 ADC-3 治疗组 (5 mg/kg、10
mg/kg)，每组 5 只，并开始给药 (D0)。各组均按 10 mL/kg 体重尾静脉注射给
10 药，每周给药 1 次，连续给药 4 周 (QWx4)。所有组观察到分组给药后第 28 天
(D28) (表 9、附图 6B) 数据显示为测量时肿瘤平均体积±SE。anti-CD33 以
10mg/kg 剂量，ADC-3 以 5 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量分别进行尾静脉给药(QWx4)，
抑瘤效果显著。

表 9 在人髓性单核细胞白血病细胞 MV4-11 BALB/c-Nude 小鼠皮下移植瘤模型中各组药效
15 分析表

实验组	给药后第 0 天	给药后第 28 天				
	平均肿瘤体 积 ($\bar{x}\pm S$)mm ³	平均肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$) mm ³	相对肿瘤 体积 ($\bar{x}\pm S$)	TGI (%)	T/C(%)	<i>P</i> value
Group 1 Vehicle	199.77±81.86	1299.85±390.87	13.94±5.90	-	-	-
Group 2 anti-CD33 mab (10 mg/kg)	197.05±81.40	1630.90±469.04	10.70±3.62	-27.20	127.20	0.896
Group 3 ADC-3 (5 mg/kg)	181.36±53.04	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00	0.00	0.068
Group 4 ADC-3 (10 mg/kg)	200.25±65.51	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00	0.00	0.068

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；
2.T/C % = $T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ ；TGI% = $(1-T/C) \times 100\%$ ；

3. *P* value 是通过比较各治疗组与溶媒对照组在 day 24（给药后第 24 天）的肿瘤体积得到。（由 Graphpad prism 6 进行分析，当 one-way ANOVA 分析的 *P* 值小于 0.05，Tukey 多重检验用于进行所有组之间两两比较，*P* 值小于 0.05 时被认为具有统计显著性）。各组间比较结果如下：

Test	p.values	significance.level	Test	p.values	significance.level
G1 vs. G2	0.896	ns	G1 vs. G3	0.068	ns
G1 vs. G4	0.068	ns	G2vs. G3	0.006	**
G2 vs. G4	0.006	**	G3 vs. G4	>0.999	ns

5

实施例 113：化合物 **P3** 的体外药效

1)实验材料：

细胞：测试用细胞来源于中国科学院细胞库；

细胞培养基 DMEM：Gibco；

10 FBS：BIOWEST。

2)培养基的配制：

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

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

3)操作：

15 提前 30 min 开启生物安全柜紫外灯照射，然后后开通风 3 min。将生长培养基、检测培养基、D-PBS 和胰酶放入 37℃恒温水浴锅里预热，之后用酒精对表面进行消毒，放入生物安全柜中。将汇合率在 80%左右的细胞放于生物安全柜中，吸掉旧培养基，用 D-PBS 润洗，吸弃，用胰酶消化 2~3 min，后加入生长培养基中和， 1200 rpm 离心 3 min。吸去离心上清，用 4 mL 检测培养基混匀，

20 取 100 uL 计数(其中取出 50 uL 细胞液，加入 50 uL Trypan Blue Stain 并混匀，混匀后计数)。按照预先优化好的细胞铺板密度铺板，80ul/孔铺于 96 孔板中，孔 E11、F11 只加 80 uL 检测培养基，边缘孔加入 150 uL 的 DPBS。铺板 24 h 后加入稀释抗体，每孔 20 uL 和设置对照，第 11 列只加入 20 uL 的检测培养基，每个浓度设置 2 个复孔，加入后于细胞涡旋震荡器上混匀，550 rpm，3 min。

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

4)检测:

4 天后取出 MTS 试剂，常温避光解冻后，充分涡旋混匀后，在生物安全柜中，沿孔侧壁按每 100 μ L 细胞培养体积加入 20 μ L CellTiter One Solution Reagen MTS 试剂，轻轻拍动板面，使 MTS 溶液混合均匀后，放于细胞培养箱中避光静置 5 2 h。反应结束后，取出 96 孔板，于酶标仪中检测 OD490 nm 吸光值，并进行数据记录、整理、分析和存储。

5)结果:

表 10 化合物 **P3** 对人非小细胞肺腺癌细胞 H1975、人非小细胞肺癌细胞 HCC827、人表皮癌细胞 A431、人胃癌细胞 NCI-N87、人原位胰腺腺癌细胞 BxPC-3、人表皮癌细胞 A431+人结肠癌细胞 SW620、人乳腺癌细胞 ZR-75-1、人浆细胞白血病细胞 H929、人多发性骨髓瘤细胞 RPMI8226、人白血病细胞 JJN-3、人乳腺癌细胞 MDA-MB-361、人乳腺癌细胞 SK-BR-3 的体外抑制效果。

Group	IC50(nM)	Efficacy%
H1975	970.33	76.78
HCC827	655.60	80.57
A431	438.77	84.97
NCI-N87	1023.92	63.93
BxPC-3	320.09	64.4
A431+SW620	604.87	68.26
ZR-75-1	557.95	54.79
H929	23.94	99.03
RPMI8226	147.00	93.61
JJN-3	36.11	80.59
MDA-MB-361	572.13	62.34
SK-BR-3	732.43	70.9

表 10 说明化合物 **P3** 对实体瘤细胞和血液瘤细胞均具有良好的抑制作用。

15 实施例 114: 裸抗、小分子药物及抗体-药物偶联物 (ADC) 的体外药效检测:

利用三种人源肿瘤细胞株 (HL-60、JVM-3、Raji) 的实验模型评价裸抗、小分子药物 ADC 偶联药物的体外药效。

接种一定数目的肿瘤细胞于 96 孔板中，向细胞中加入梯度稀释的小分子药物、受试抗体及对应的 ADC 药物，处理 5 天，利用 Alamar Blue 或 MTS 检测细胞活力，通过计算 IC50 评价受试药物对肿瘤细胞系的抑制效果。抗体药物起始浓度为 500 nM，稀释倍数为 7 倍，共 8 个浓度点，处理 5 天。最终算法按

照存活率=(实验组-空白)/(对照组-空白组)×100%，随后利用 Graph Pad Prism 拟合曲线，计算半数抑制浓度(IC50)。

结果见表 11 和附图 7A-7C。

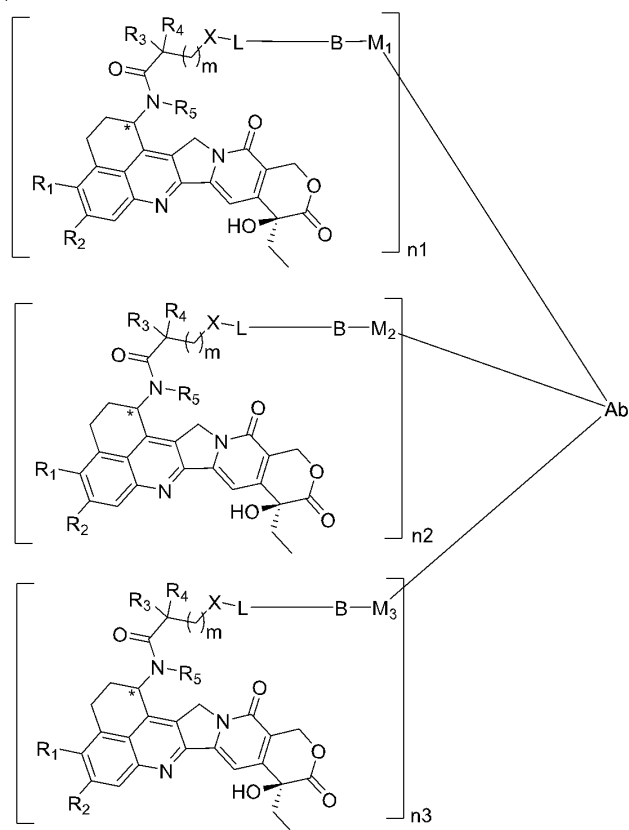
表 11 裸抗、小分子药物及抗体-药物偶联物（ADC）的体外药效检测：

Groups	HL-60		JVM-3		Raji	
	IC ₅₀ (nM)	Efficacy%	IC ₅₀ (nM)	Efficacy%	IC ₅₀ (nM)	Efficacy%
ANTI-CD33 抗体 1	>500	N/A	>500	N/A	>500	N/A
ADC-3	2.056	95.34	1.876	91.13	1.456	65.44
ANTI-CD33 抗体 2	>500	N/A	>500	N/A	>500	N/A
ADC-34	11.480	96.79	4.358	92.07	1.933	70.24
D3	0.630	96.65	0.215	75.47	0.100	69.86

5 结论：本发明制备的小分子药物及抗体-药物偶联物(ADC)在受试三种人源肿瘤细胞株（HL-60、JVM-3、Raji）的实验模型中均表现出优异的肿瘤抑制活性。

权利要求

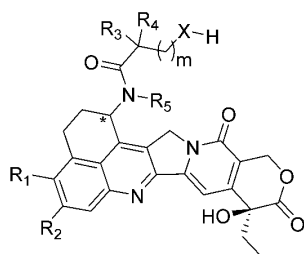
1. 一种如通式 **I** 所示的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，



I

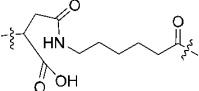
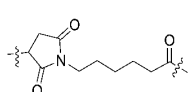
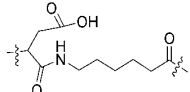
其中：

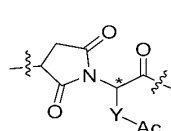
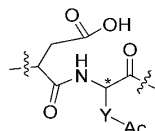
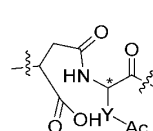
所述抗体-药物偶联物中的药物为如下式 **II** 所示的喜树碱类抗肿瘤药物或其立体异构体，



II

Ab 选自抗 CD33 抗体或其抗原结合片段；

M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自  ,  ,  ,
 , 且 M_1 、 M_2 、 M_3 互不相同；或者, M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自式 A₁、式 A₂、式 A₃ 所示结构, 且 M_1 、 M_2 、 M_3 互不相同；

式 A₁式 A₂式 A₃

其中 Y 为支架, 选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基；优选 Y 为 C1-C6 烷基；Ac 为亲水结构单元；左侧波浪线所示位置与 Ab 相连, 右侧波浪线所示位置与 B 相连或 L 相连；

B 存在或不存在, 当 B 存在时选自修饰单元；

L 选自连接单元, 优选为含肽连接单元；

X 选自 -NH-、-O- 或 -S-, 优选为 -O-；

R_1 和 R_2 相同或者不同, 且各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

R_3 和 R_4 相同或者不同, 各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、C6-C10 芳基 C1-C6 烷基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；优选 R_3 、 R_4 各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

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

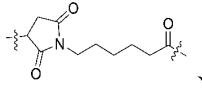
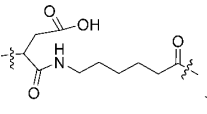
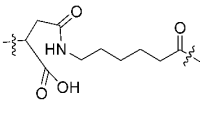
R_5 选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6

烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基, R_5 优选选自氢、C1-C6 烷基;

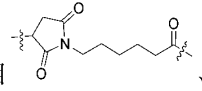
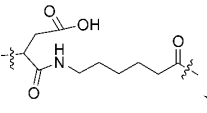
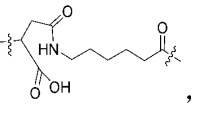
m 选自 0-5 的整数;

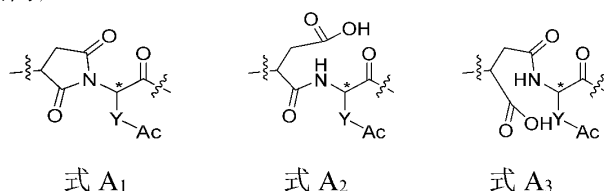
n_1 、 n_2 、 n_3 各自独立地选自 0-10 的任意整数或任意小数, n_1 、 n_2 、 n_3 不同时为 0, 且 $1 \leq n_1 + n_2 + n_3 \leq 10$;

*位置所示手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型;

且满足以下条件: M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自 、、, 且 M_1 、 M_2 、 M_3 互不相同, B 存在, 选自修饰单元。

2. 如权利要求 1 所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的

盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述 M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自 、、, 且 M_1 、 M_2 、 M_3 互不相同; 或者, M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自式 A₁、式 A₂、式 A₃ 所示结构, 且 M_1 、 M_2 、 M_3 互不相同; 优选地, M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自式 A₁、式 A₂、式 A₃ 所示结构, 且 M_1 、 M_2 、 M_3 互不相同;

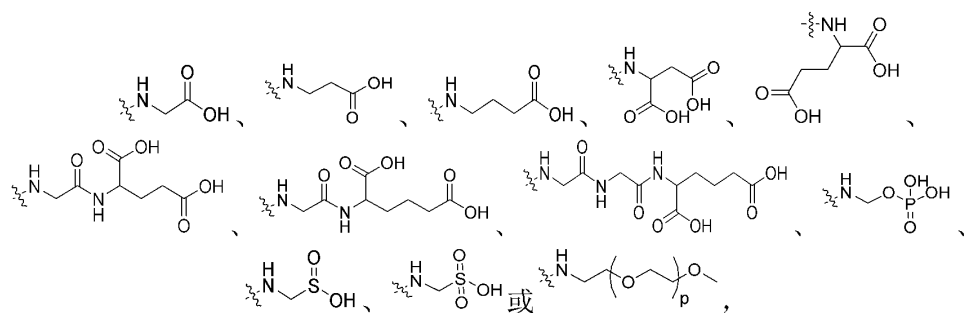


其中 Y 为支架, 选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基; 优选 Y 为 C1-C6 烷基, 更优选为 C1-C3 烷基, 最优选为亚甲基;

*所示位置具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性;

左侧波浪线所示位置与 Ab 相连, 右侧波浪线所示位置与 B 相连或 L 相连;

亲水结构单元 Ac 非限制性地选自天然或非天然氨基酸、1-20 聚乙二醇、磷酸基、羧酸基、磺酸基、亚磺酸基或以下结构,

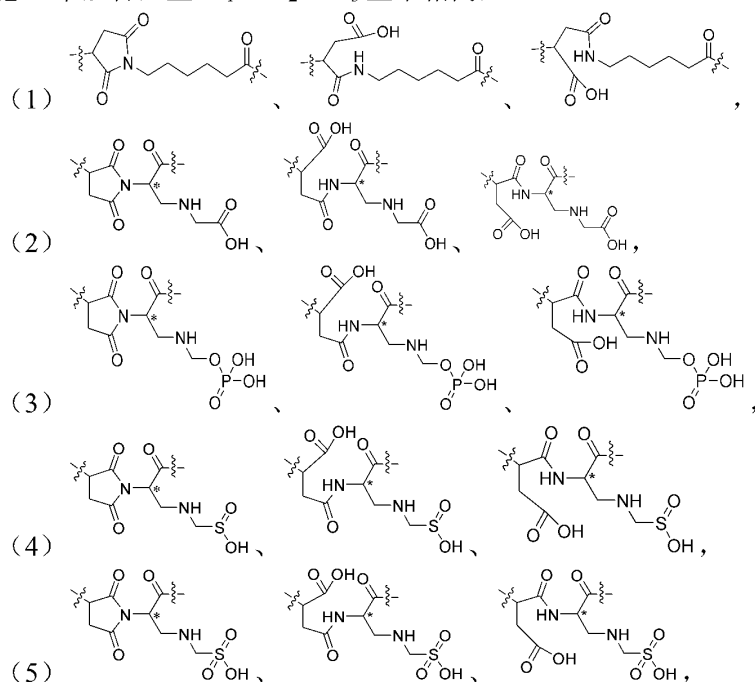


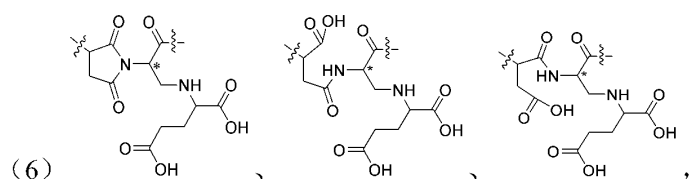
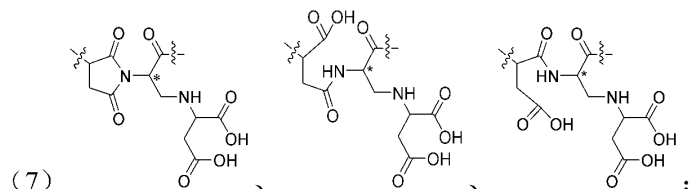
其中, p 选自 0-10 的整数; 波浪线所示位置与支架 Y 相连;

优选地，亲水结构单元 Ac 选自 、、，波浪线所示位置与支架 Y 相连；

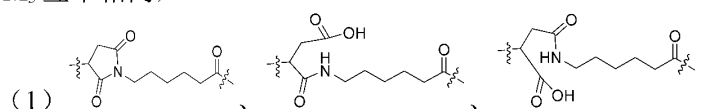
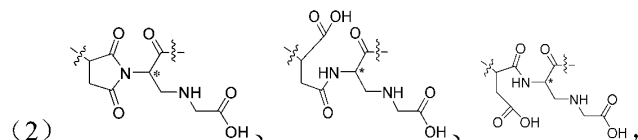
更优选地，亲水结构单元 Ac 为 ，波浪线所示位置与支架 Y 相连。

3. 如权利要求 1 或 2 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: M_1 、 M_2 、 M_3 选自以下 (1) - (7) 中的任意一个组合, 且 M_1 、 M_2 、 M_3 互不相同,

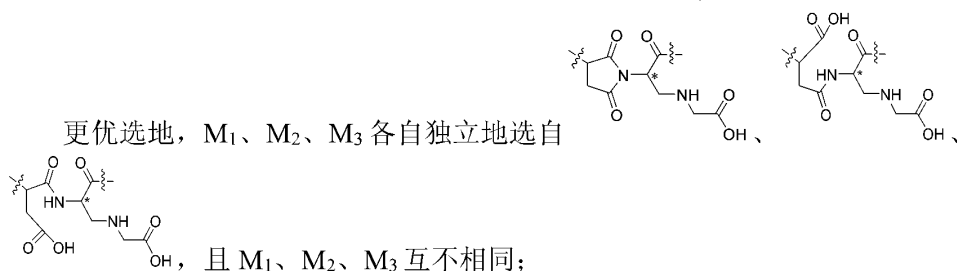




优选地, M_1 、 M_2 、 M_3 选自以下 (1) - (2) 中的任意一个组合, 且 M_1 、 M_2 、 M_3 互不相同,



更优选地, M_1 、 M_2 、 M_3 各自独立地选自



其中:

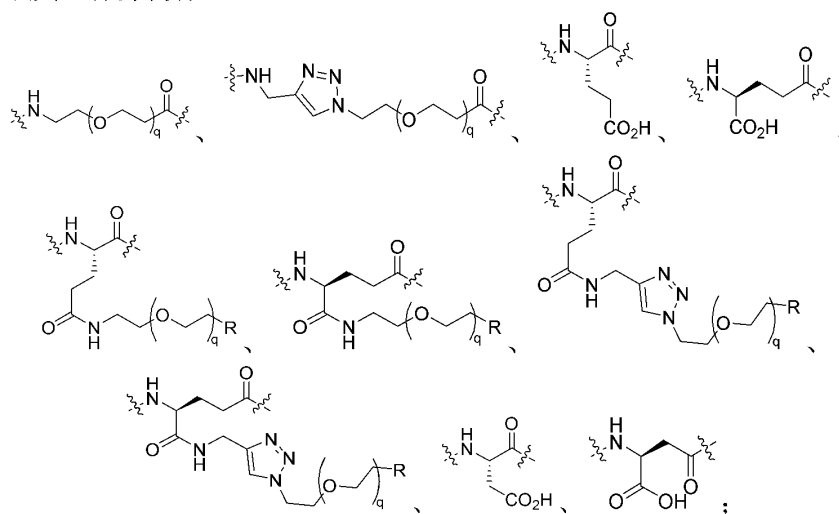
*位置具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种构型;

左侧波浪线所示位置与 Ab 相连; 右侧波浪线所示位置与修饰单元 B 或连接单元 L 相连。

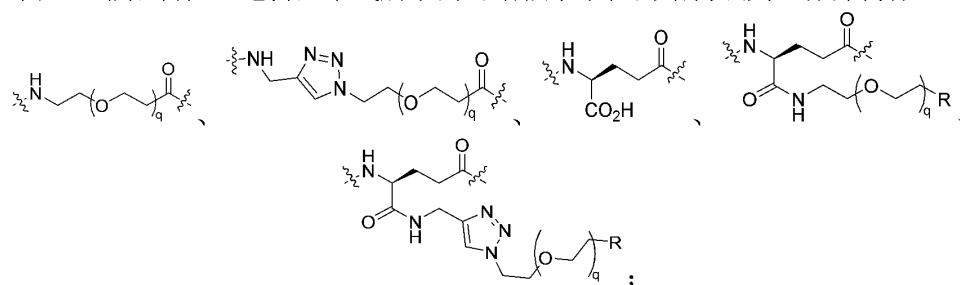
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 修饰单元 B 存在或不存在, 当所述修饰单元 B 存在时, 非限制性地选自可增强亲水性的结构或其立体异构体。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 修饰单元 B 存在或不存在, 当所述修饰

单元 B 存在时，所述修饰单元 B 非限制性地选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体，



优选地，修饰单元 B 存在或不存在，当所述修饰单元 B 存在时，所述修饰单元 B 非限制性地选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体，



其中:

R 非限制性地选自羟基、氨基、聚乙二醇、羧酸基、磺酸基、亚磺酸基、磷酸基、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、天然或非天然氨基酸残基、糖或其衍生物中的一种或几种的组合；

优选地，R选自C1-C6烷氧基、羧酸基、氨基；

更优选地，R选自甲氧基、羧酸基、氨基；

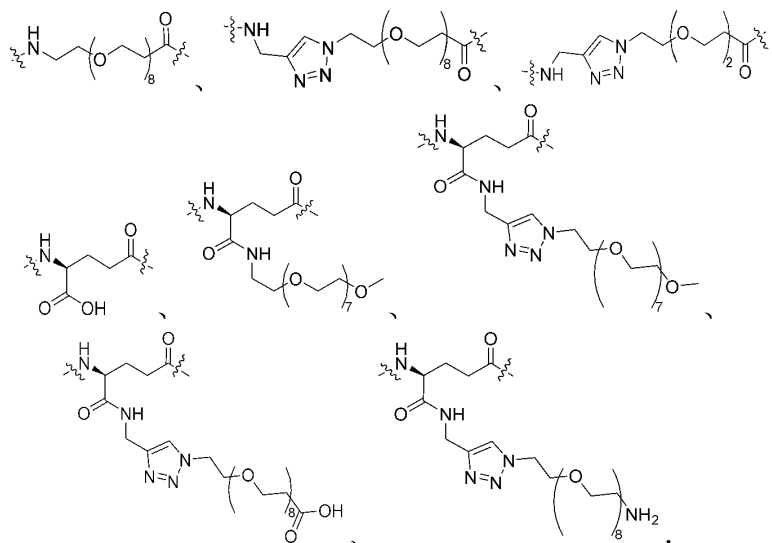
左侧波浪线所示位置与 M_1 、 M_2 、 M_3 相连;

右侧波浪线所示位置与连接单元 L 相连;

q 选自 1-10 的整数, 优选选自 2、7、8;

最优选地，所述修饰单元 B 选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立

体异构体:



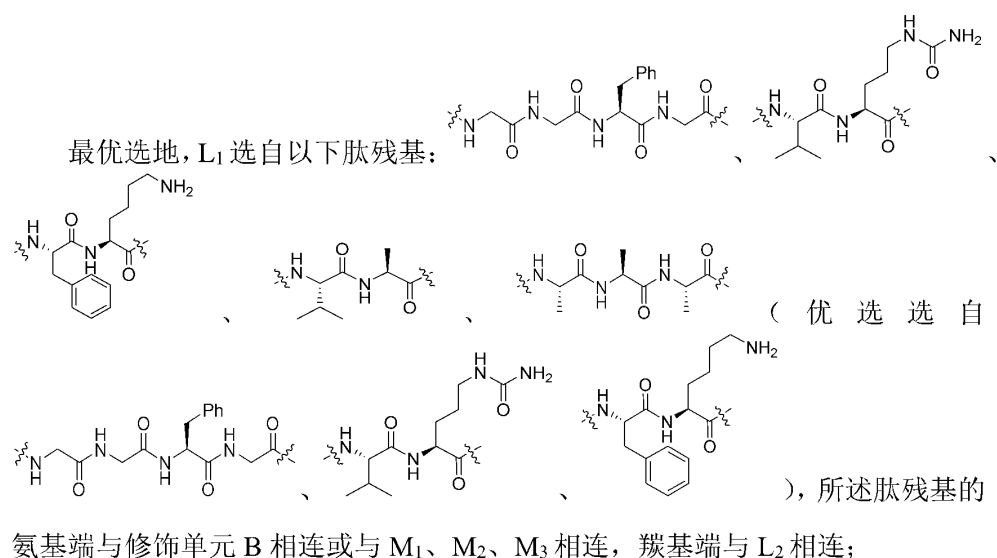
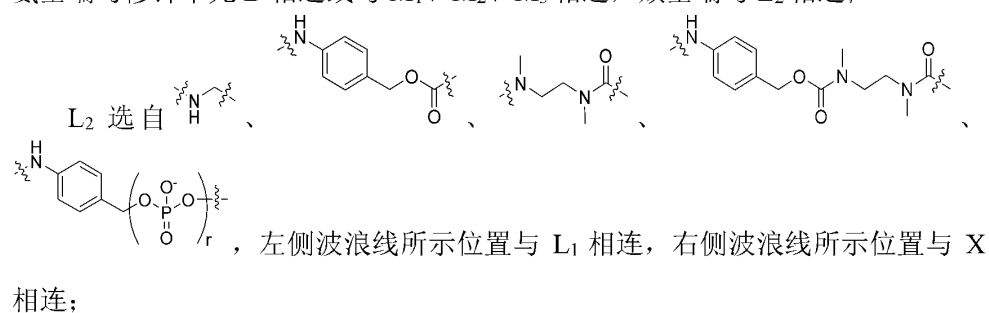
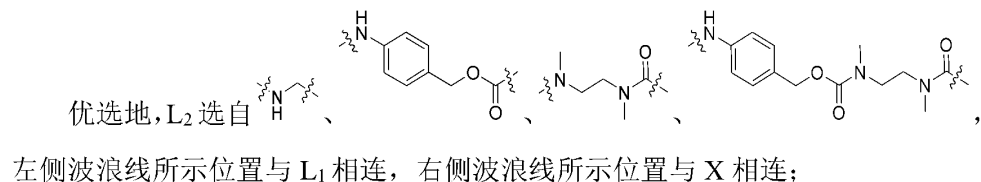
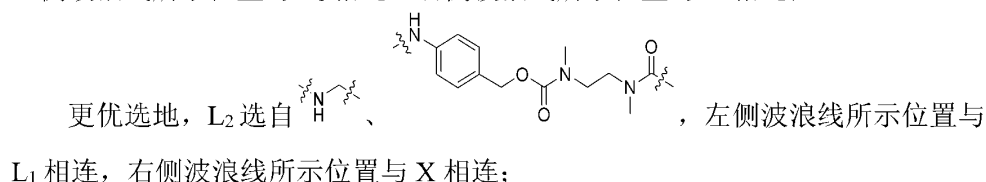
左侧波浪线所示位置与 M_1 、 M_2 、 M_3 相连，右侧波浪线所示位置与连接单元 L 相连。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述连接单元 L 为 L_1 - L_2 ，

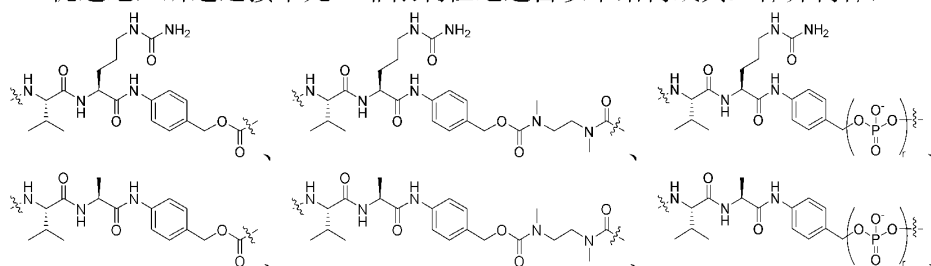
L_1 为由 2-10 个氨基酸残基组成的肽残基，所述肽残基的氨基端与修饰单元 B 相连或与 M_1 、 M_2 、 M_3 相连，羧基端与 L_2 相连；

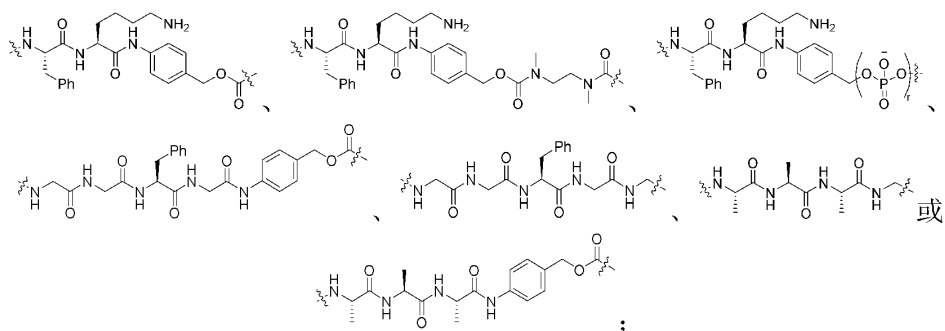
优选地， L_1 为由 2-4 个氨基酸残基组成的肽残基，所述肽残基的氨基端与修饰单元 B 相连或与 M_1 、 M_2 、 M_3 相连，羧基端与 L_2 相连；优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸；更优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸；最优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸；

更优选地， L_1 选自以下肽残基：甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-丙氨酸、丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸（优选选自甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸），所述肽残基的氨基端与修饰单元 B 相连或与 M_1 、 M_2 、 M_3 相连，羧基端与 L_2 相连；



优选地, 所述连接单元 L 非限制性地选自以下结构或其立体异构体,

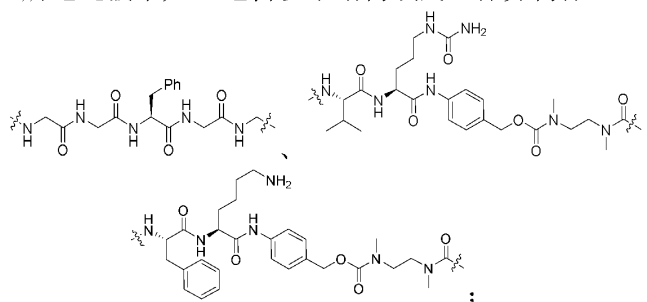




其中：

r 选自 1-10 的整数；

更优选地，所述连接单元 L 选自以下结构或其立体异构体：



所述连接单元 L 左侧波浪线所示位置与修饰单元 B 相连或与 M₁、M₂、M₃ 相连；

所述连接单元 L 右侧波浪线所示位置与 X 相连。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：

R₁ 和 R₂ 相同或者不同，且各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地，R₁ 和 R₂ 相同或者不同，且各自独立地选自卤素、C1-C6 烷基；

更优选地，R₁ 选自 C1-C6 烷基，R₂ 选自卤素；

最优选地，R₁ 为甲基，R₂ 为氟；

R₃ 和 R₄ 相同或者不同，各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代

C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、C6-C10 芳基 C1-C6 烷基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地， R_3 、 R_4 相同或者不同，各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

进一步优选地， R_3 、 R_4 相同或者不同，各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C6 环烷基、C3-C6 环烷基 C1-C6 烷基或苯基 C1-C6 烷基；

更优选地， R_3 、 R_4 相同或者不同，各自独立地选自氢、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基、环丙甲基、苄基；

最优选地， R_3 、 R_4 中，任意一个选自氢、甲基，另一个选自氢、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基、环丙甲基、苄基；

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

优选地， R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基；

更优选地， R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成 C3-C6 环烷基；

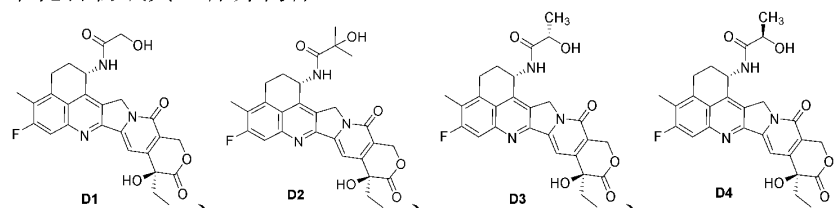
最优选地， R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成环丙基、环丁基或环戊基；

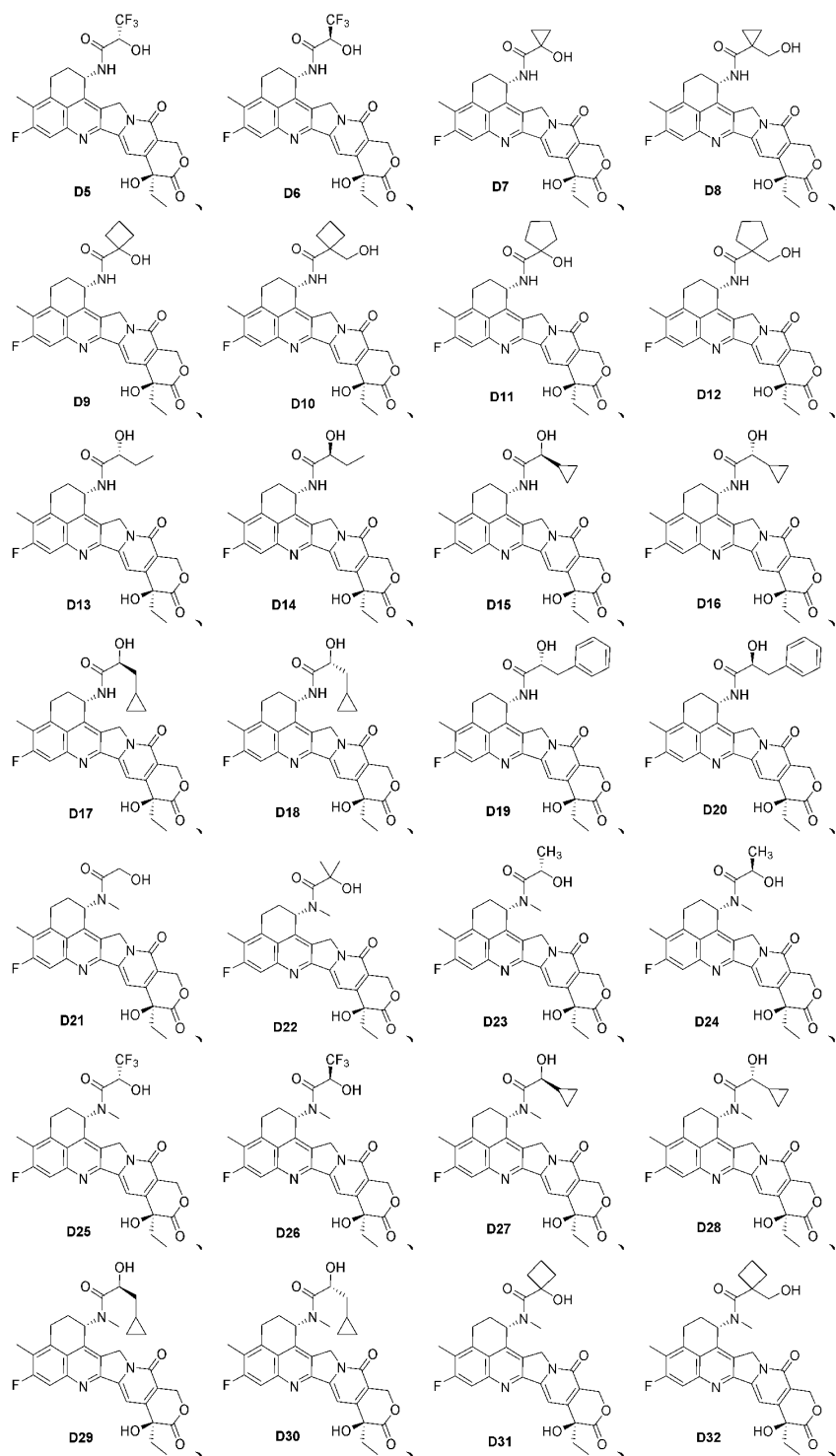
R_5 选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基， R_5 优选选自氢、C1-C6 烷基， R_5 更优选选自氢、甲基；

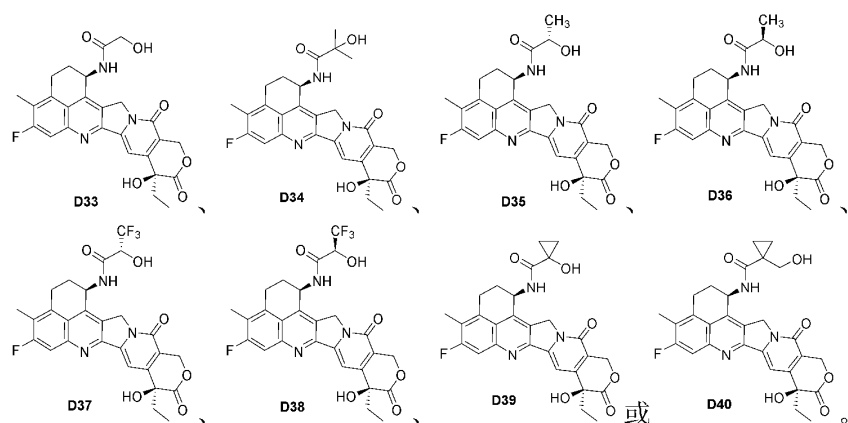
X 选自 -NH-、-O- 或 -S-，优选为 -O-；

m 选自 0-5 的整数，优选选自 0、1。

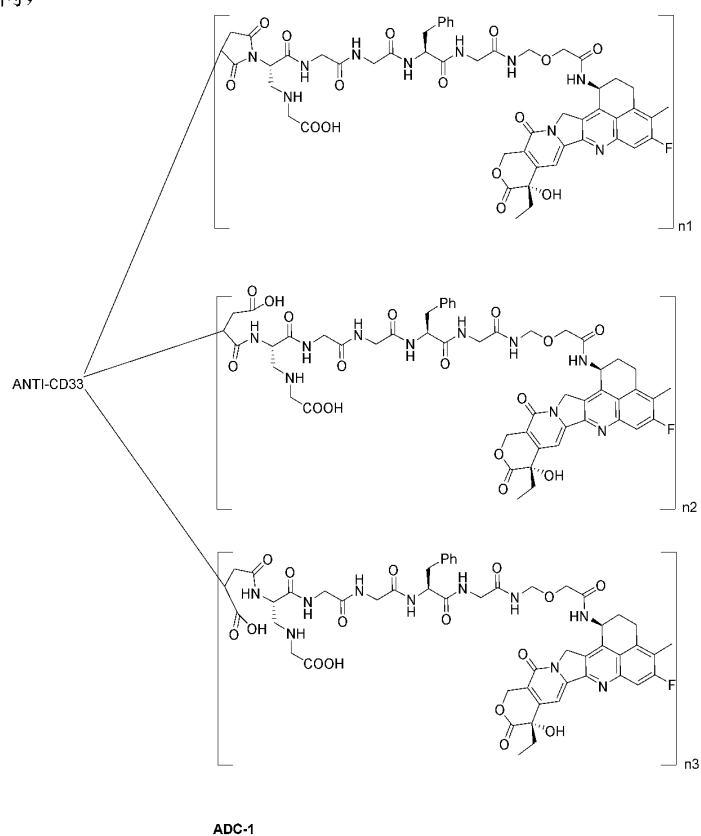
8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述喜树碱类抗肿瘤药物非限制性地选自以下化合物或其立体异构体，

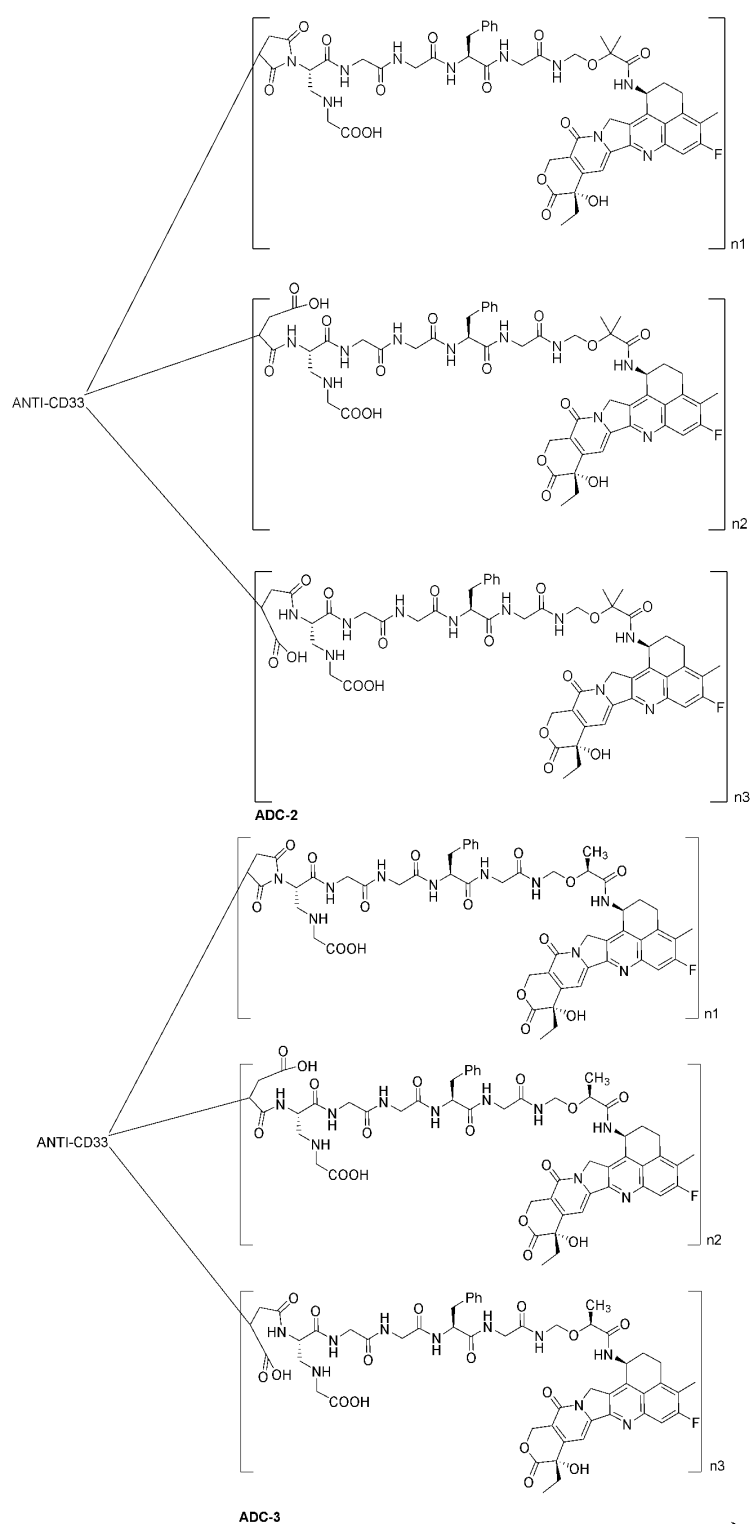


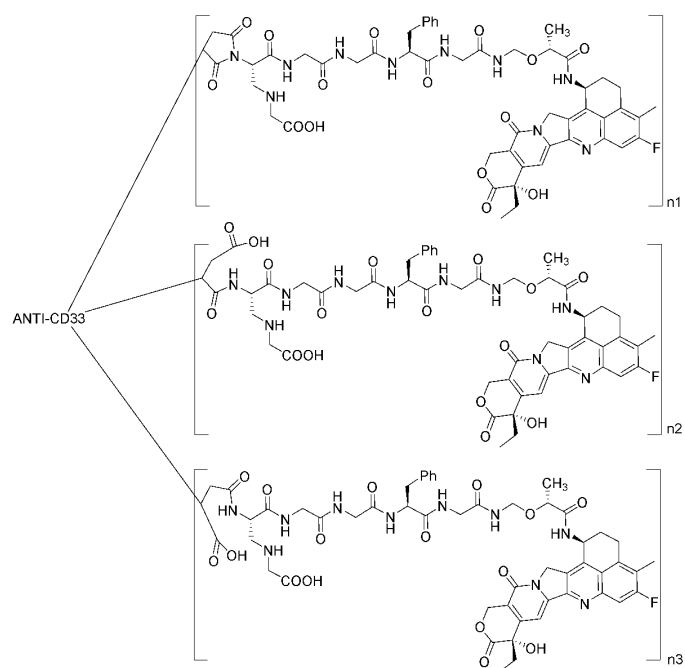
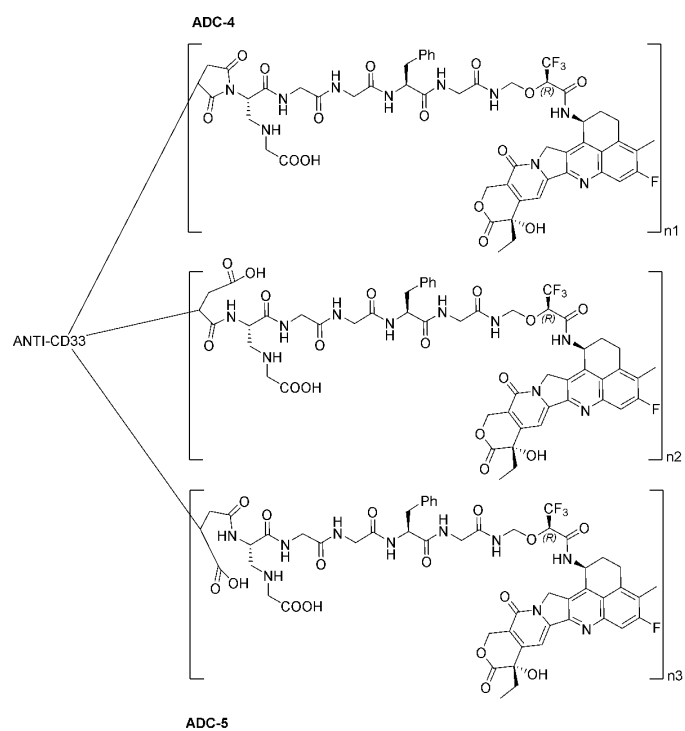


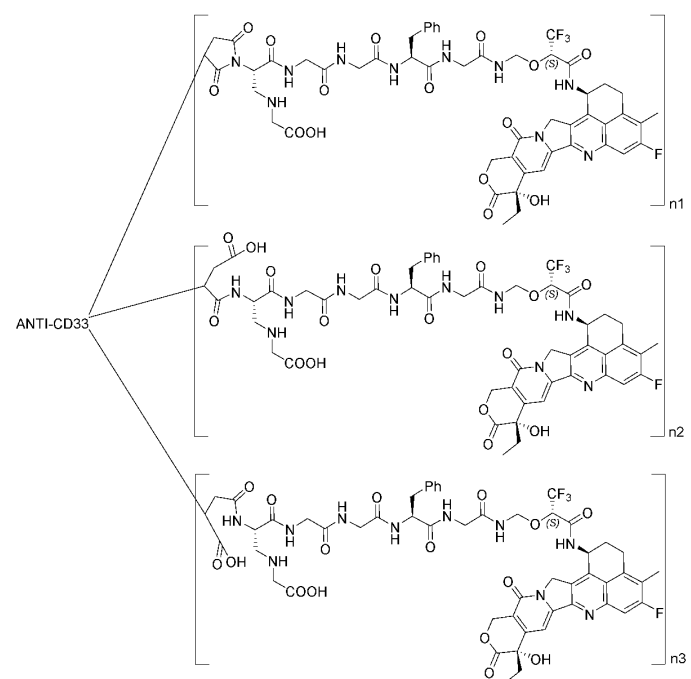
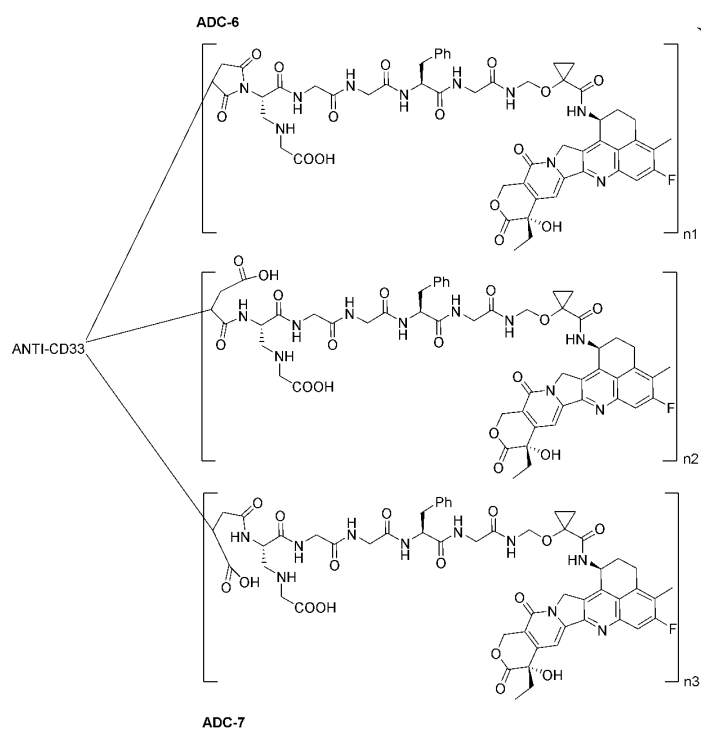


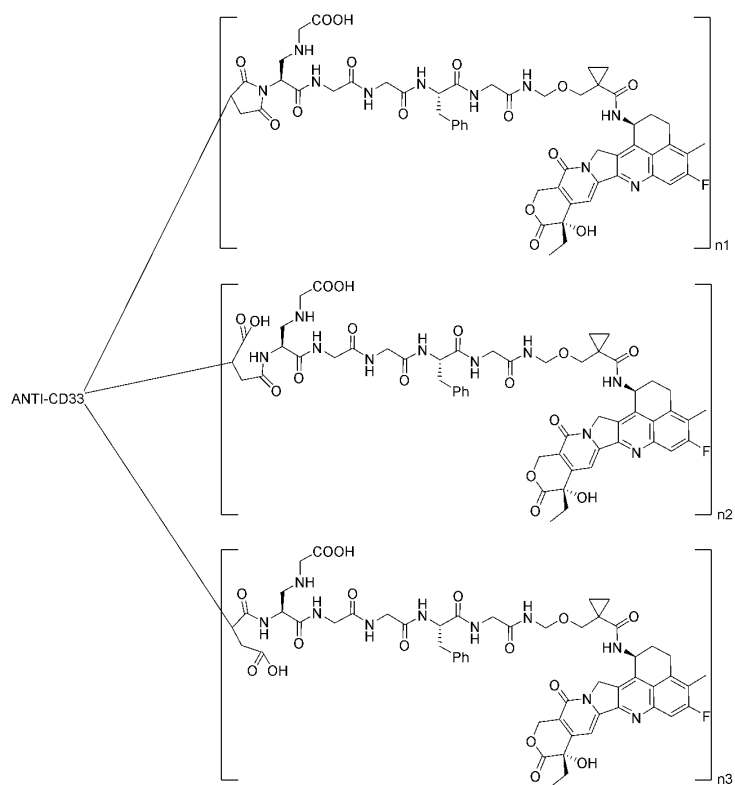
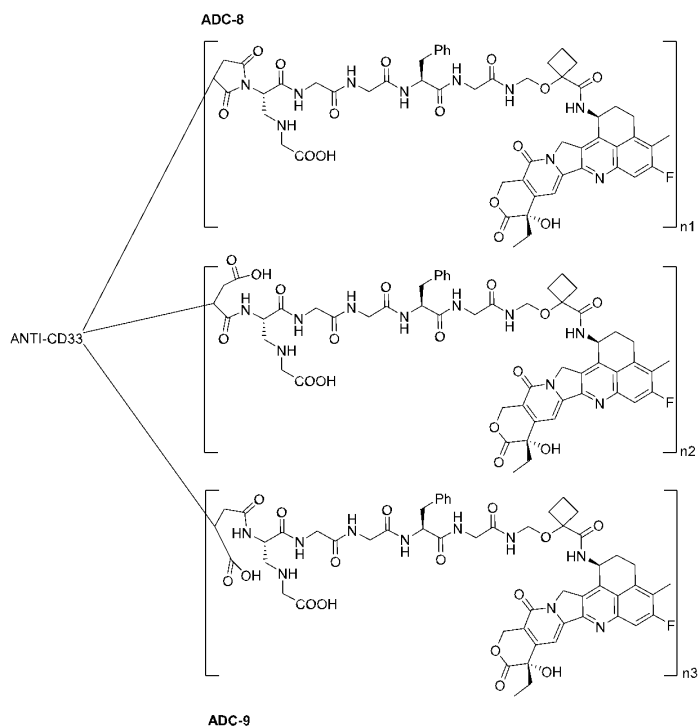
9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述的抗体-药物偶联物非限制性地选自以下结构，



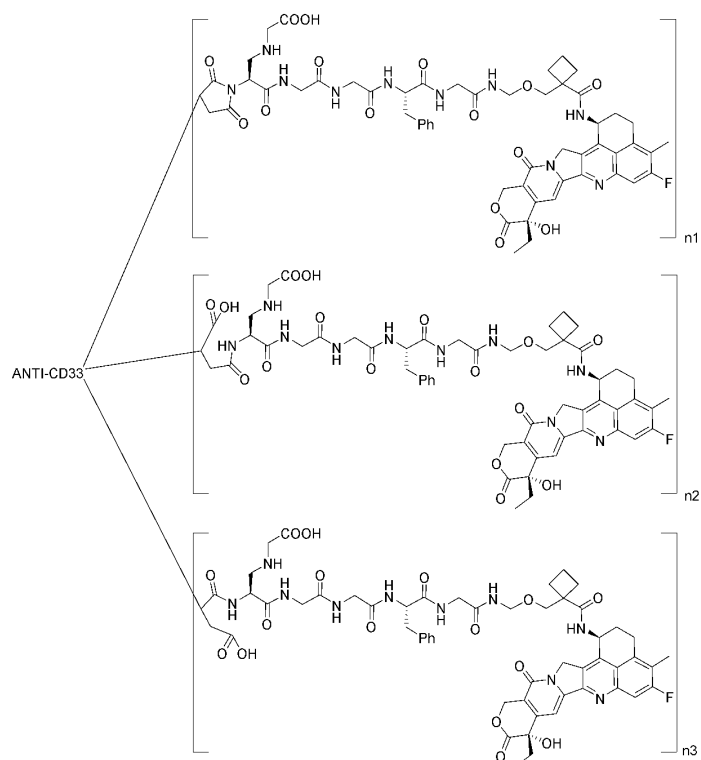




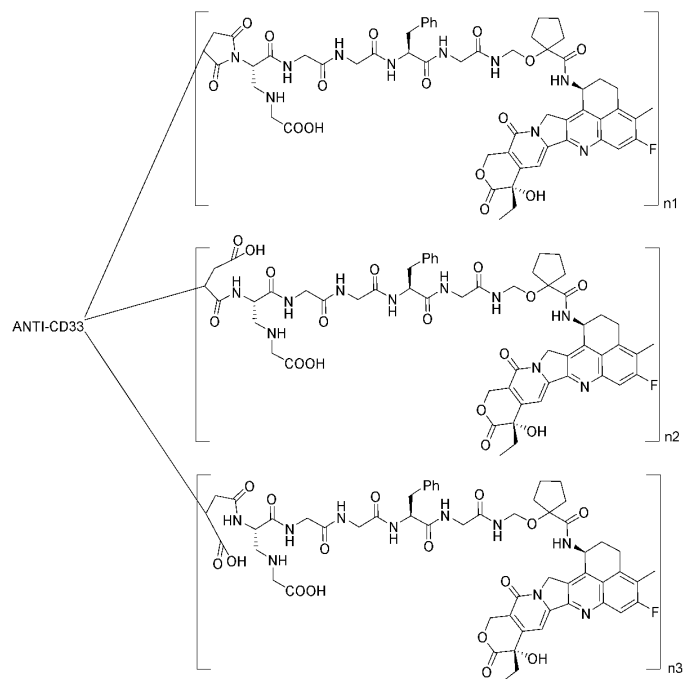




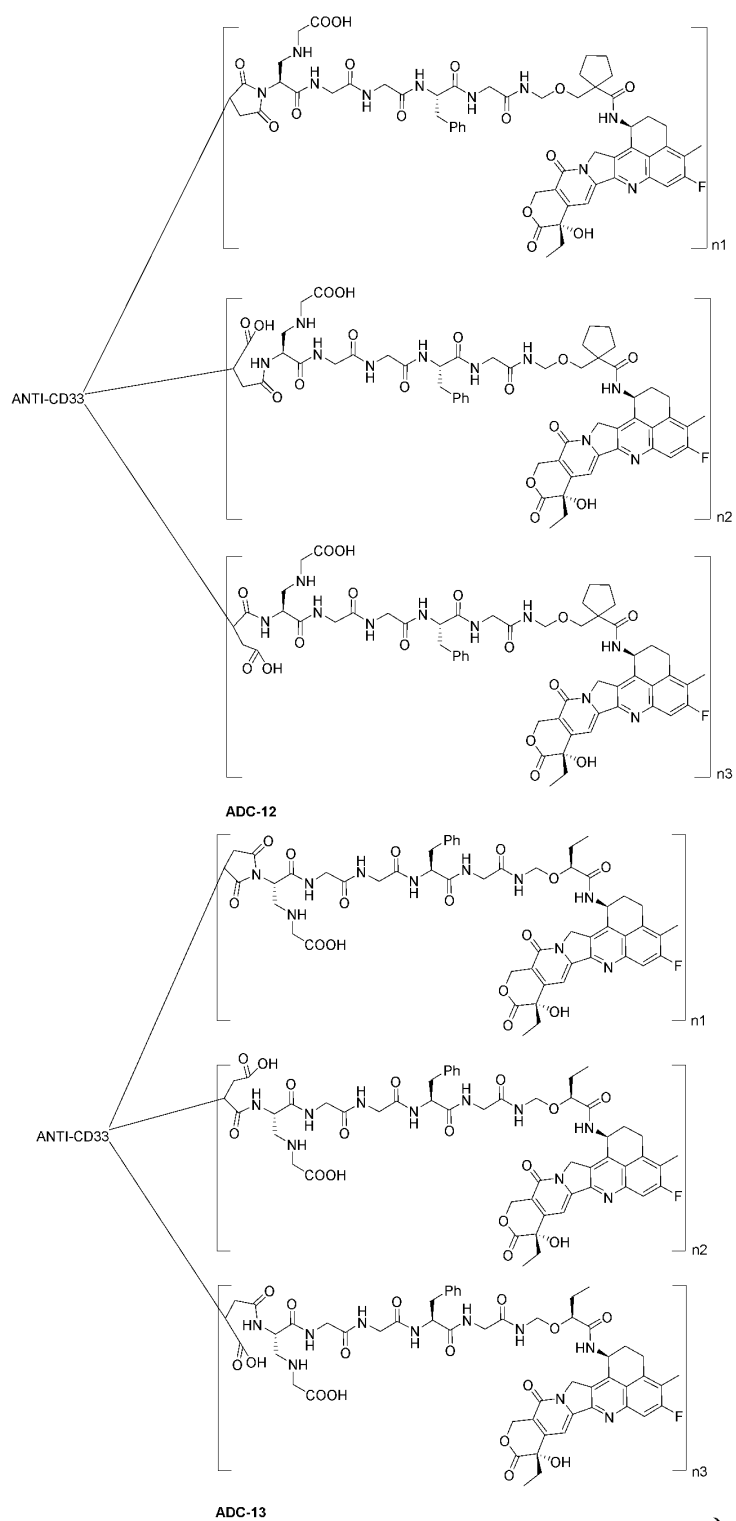
ADC-9

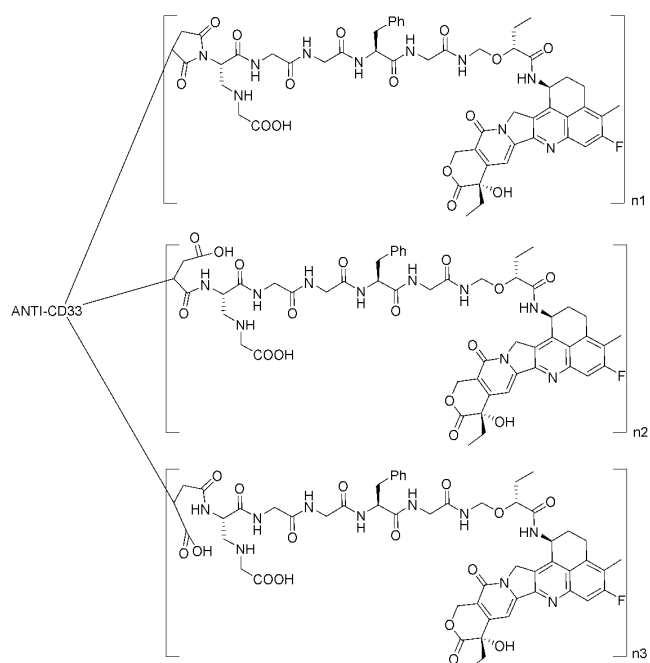


ADC-10

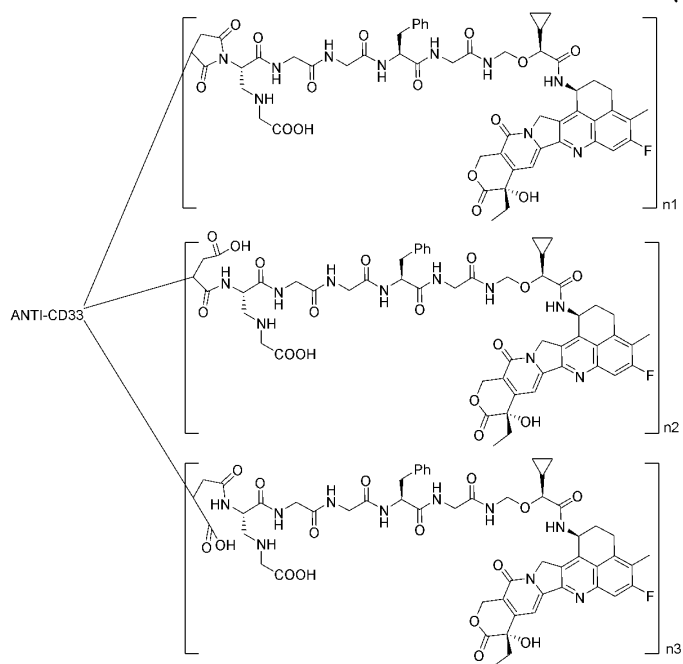


ADC-11

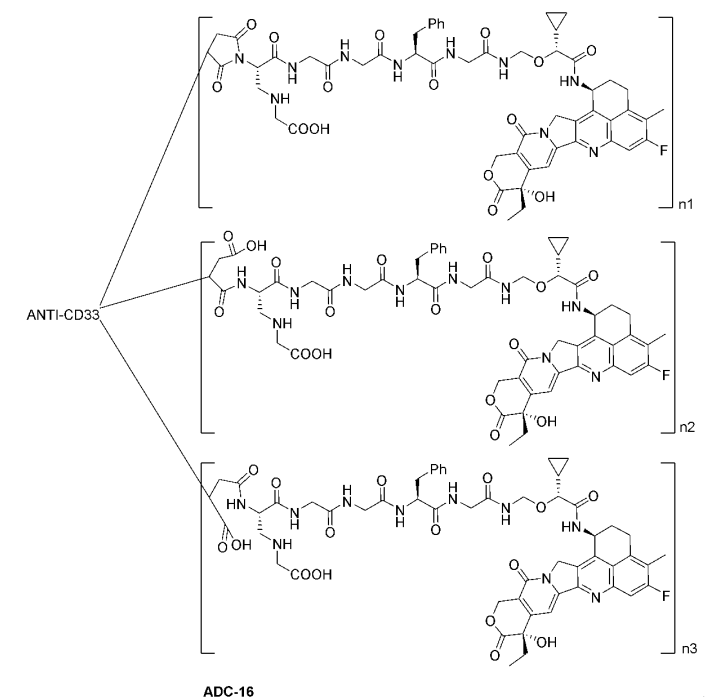
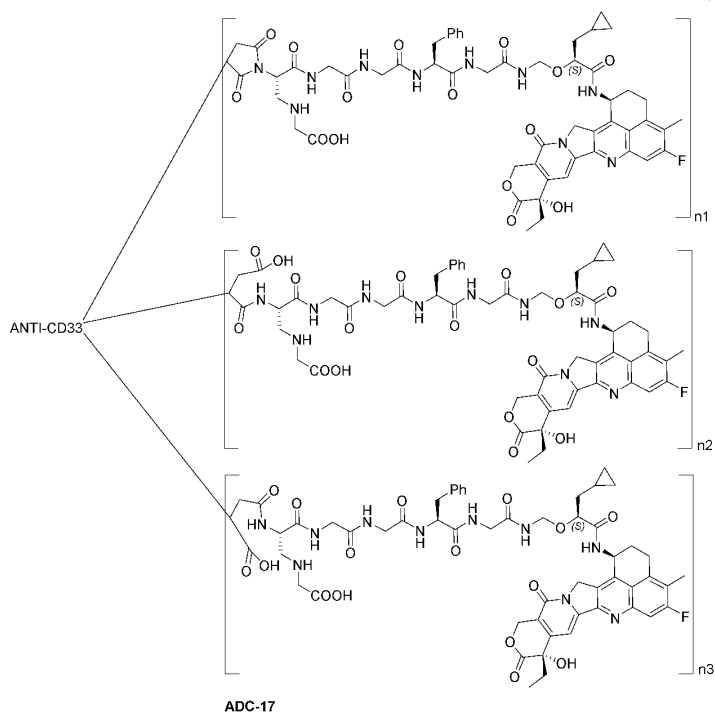


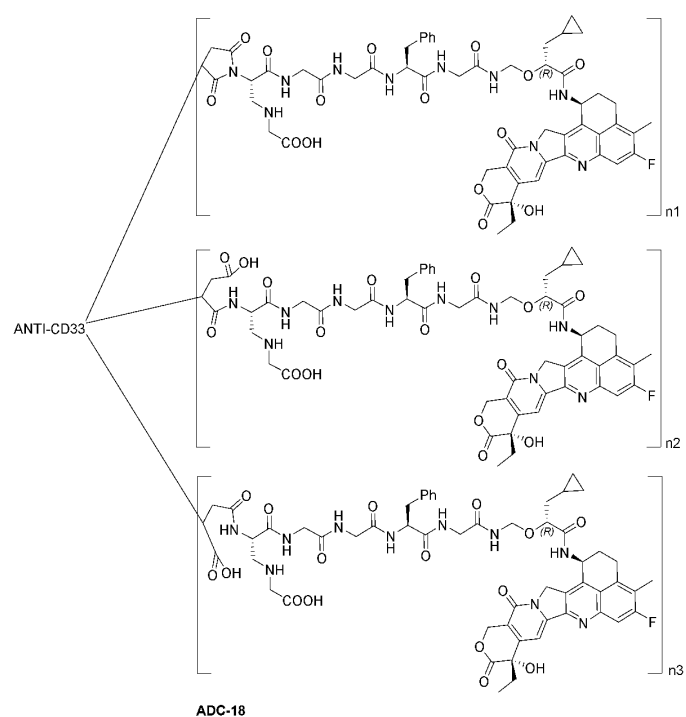
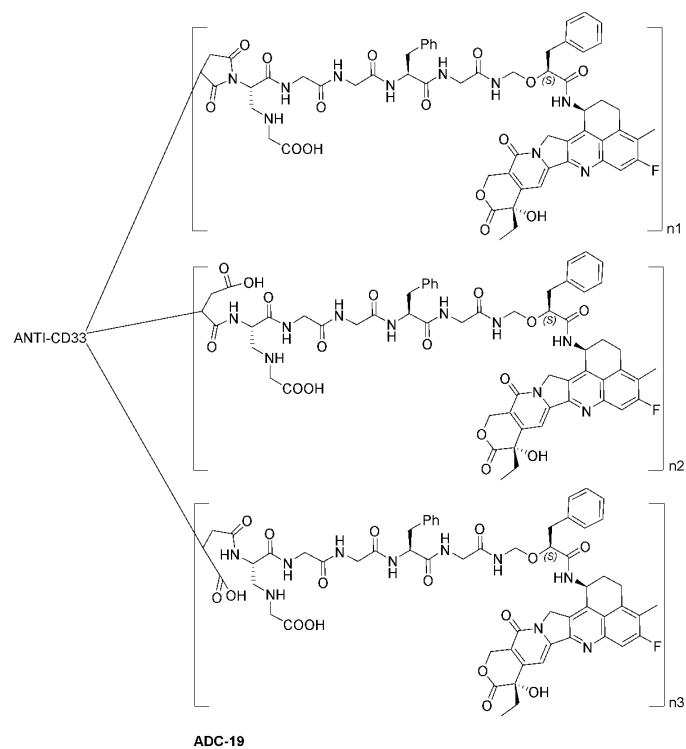


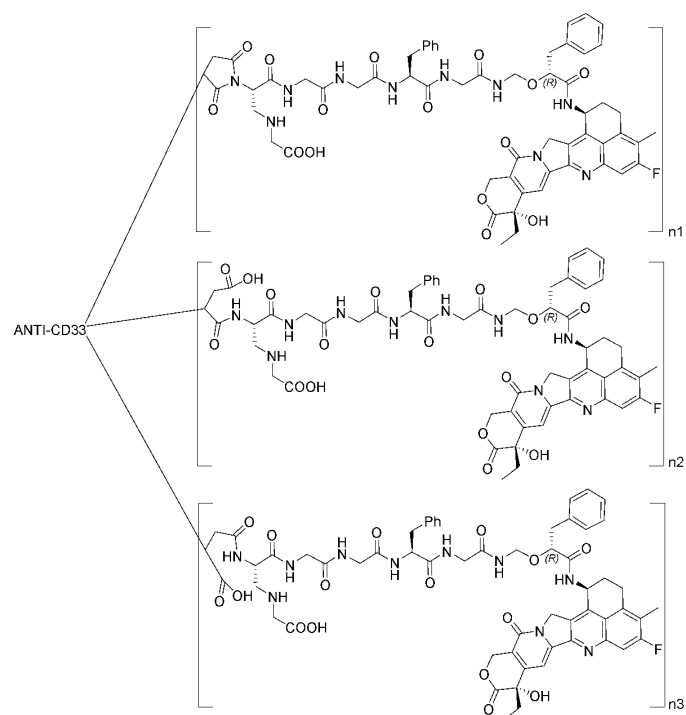
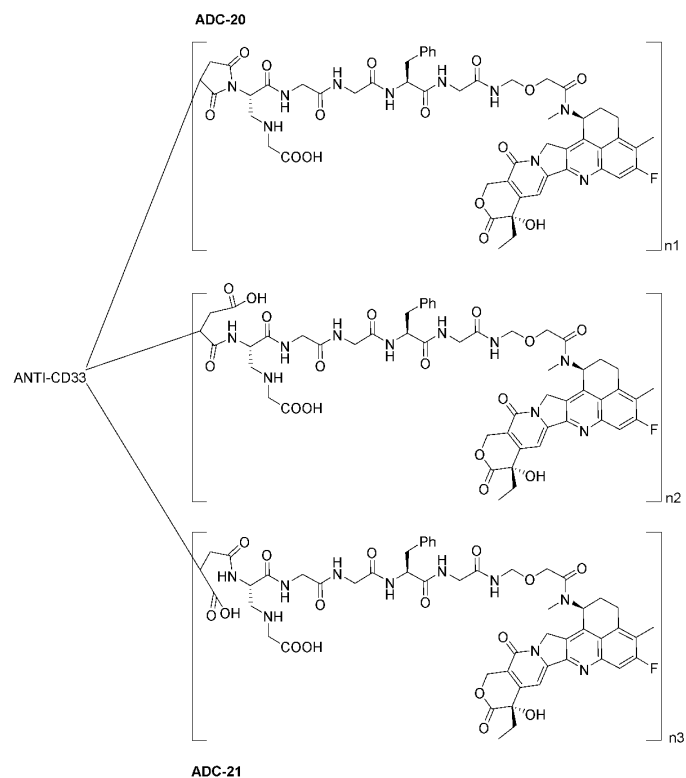
ADC-14

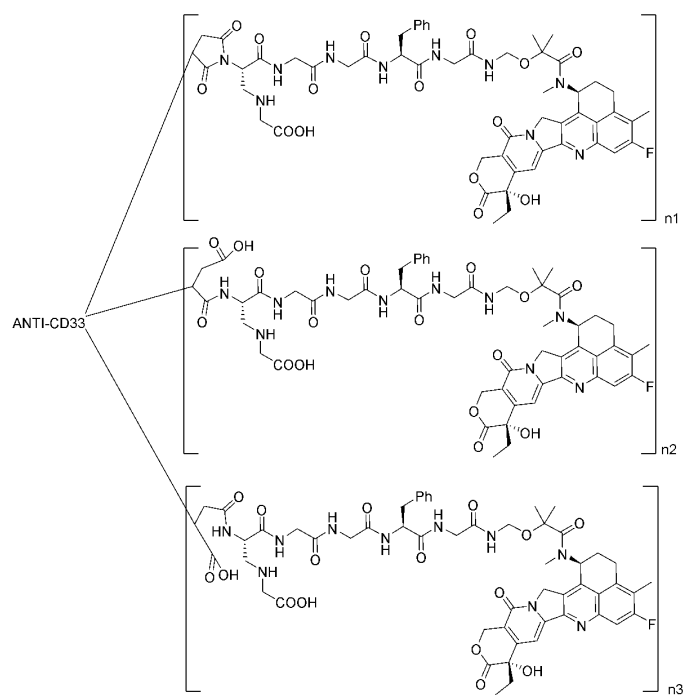


ADC-15

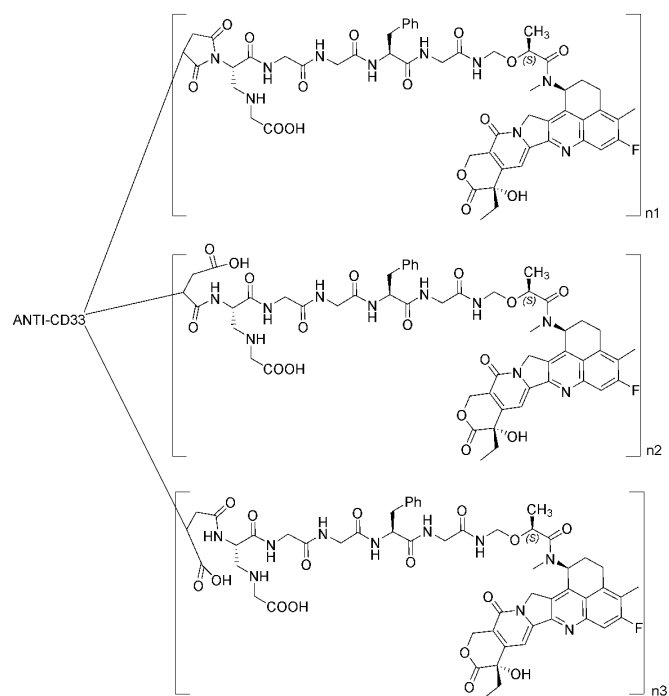




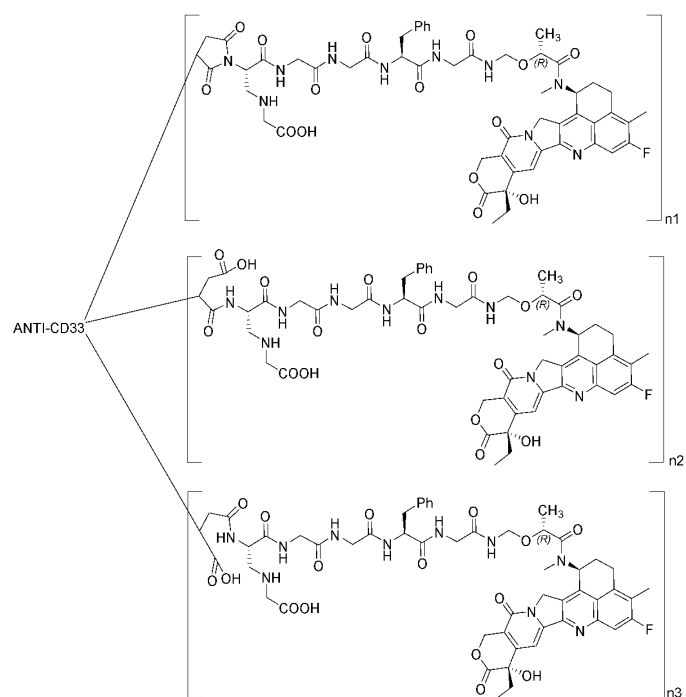




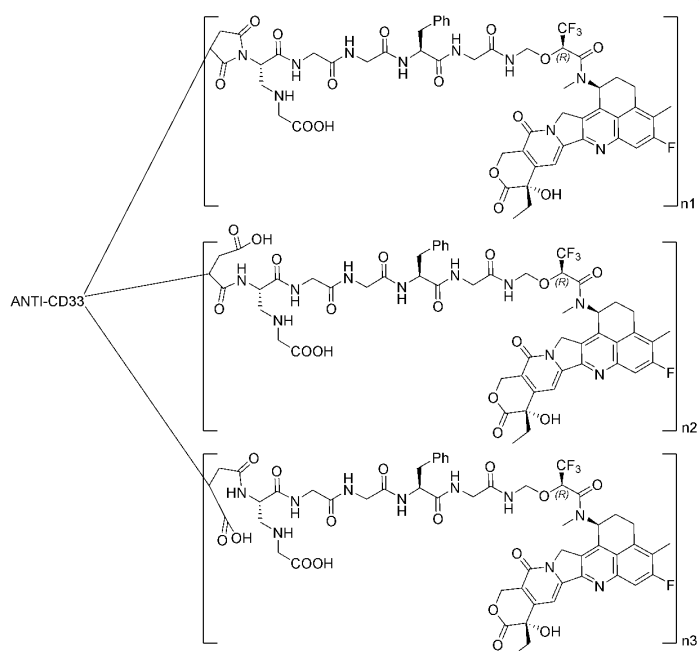
ADC-22



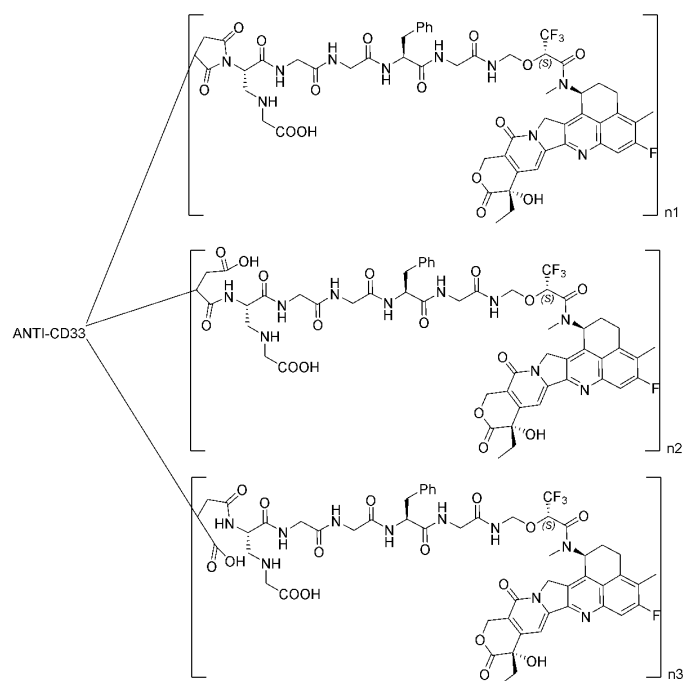
ADC-23



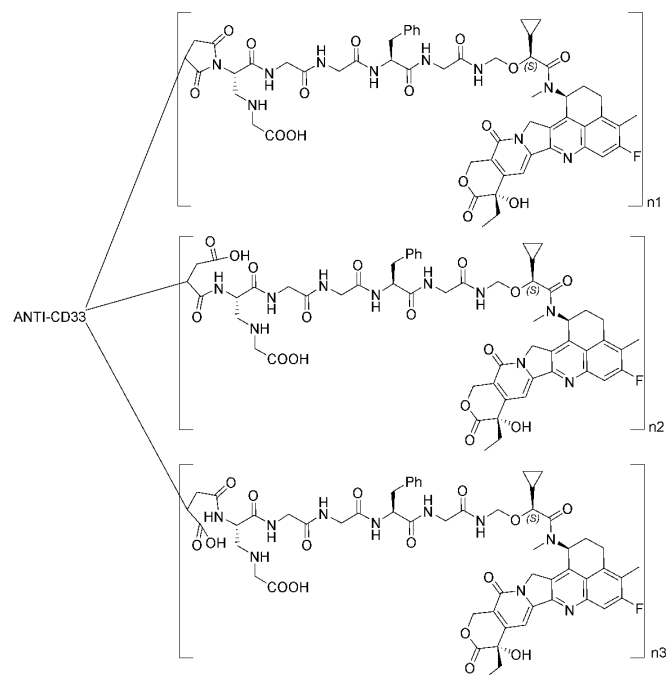
ADC-24



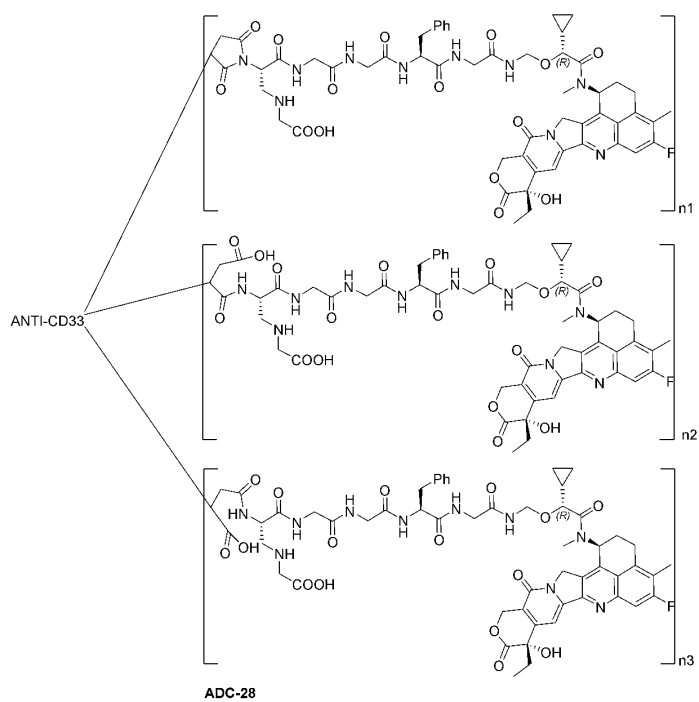
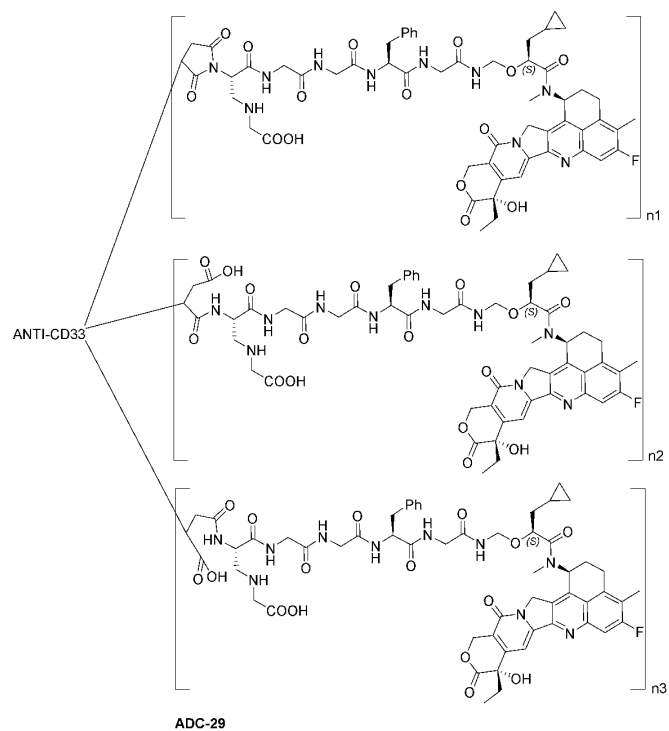
ADC-25

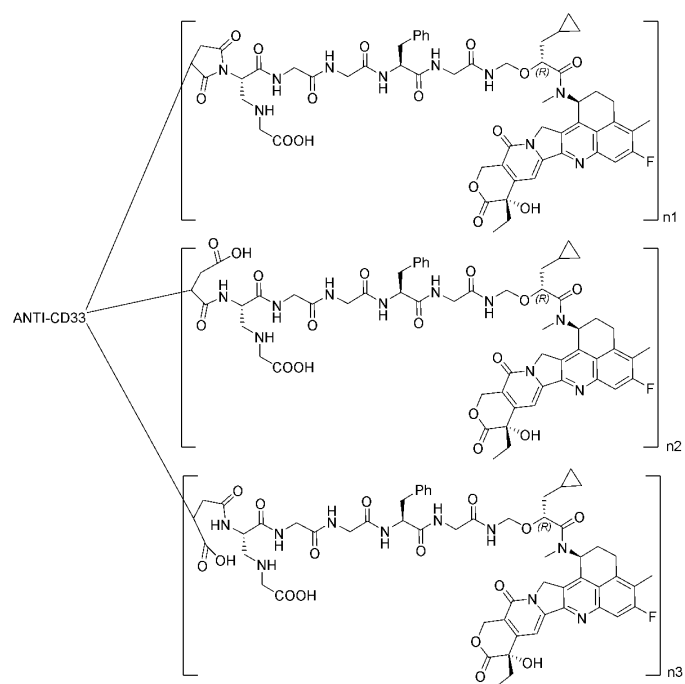
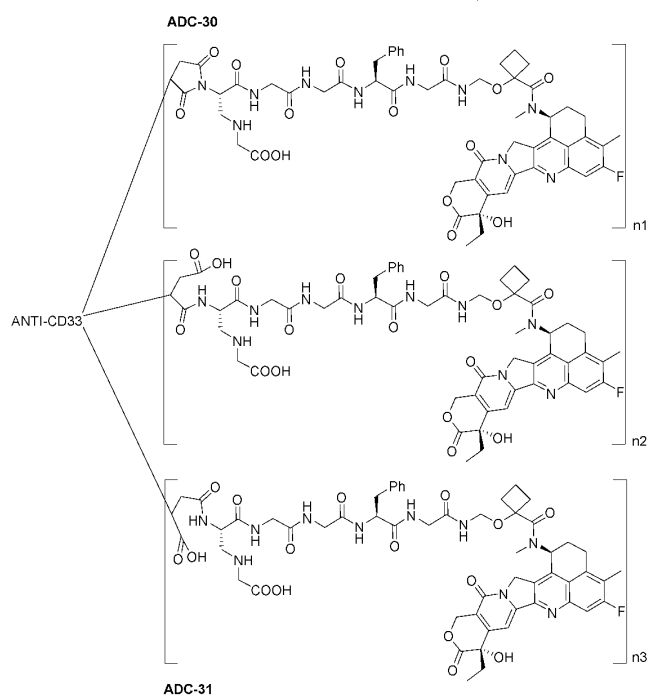


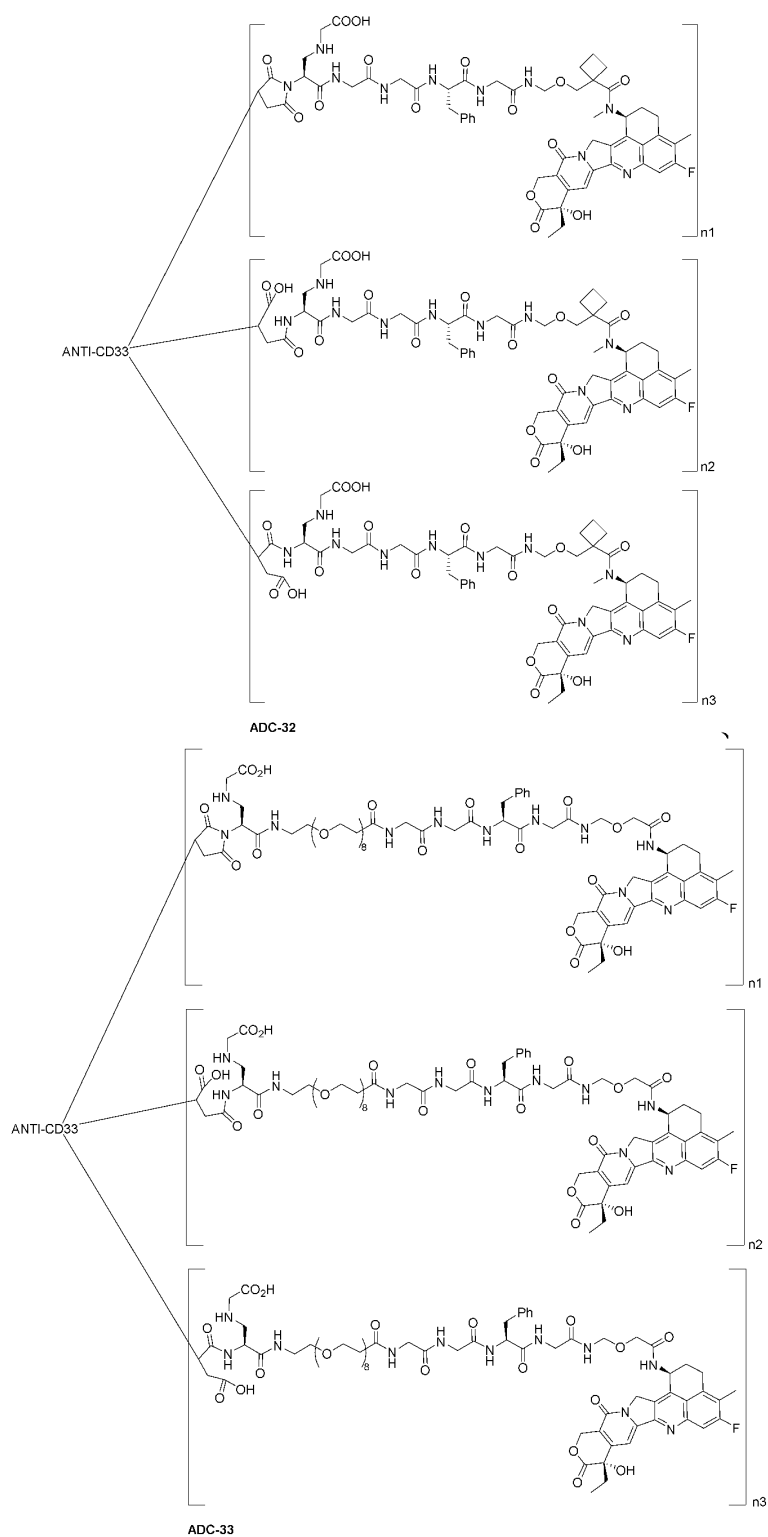
ADC-26

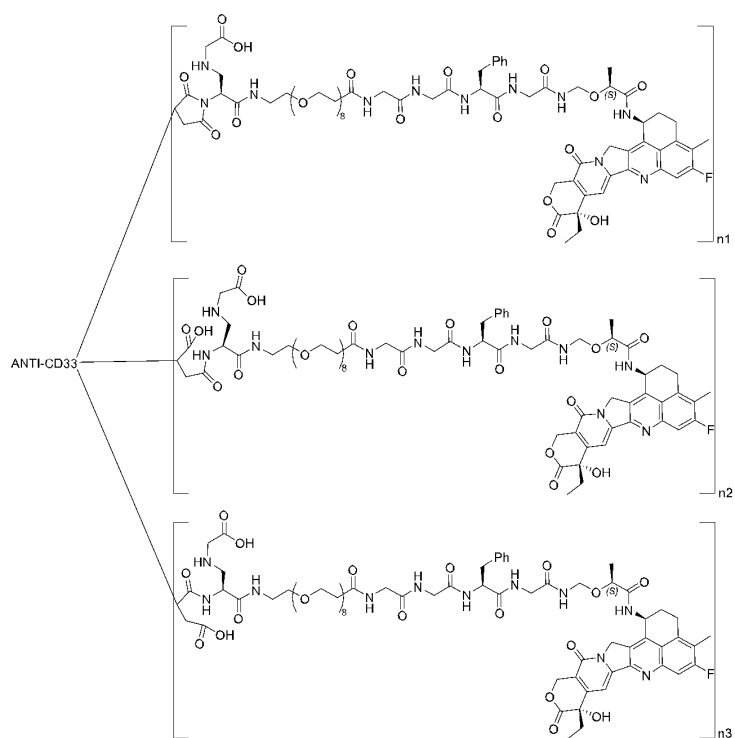
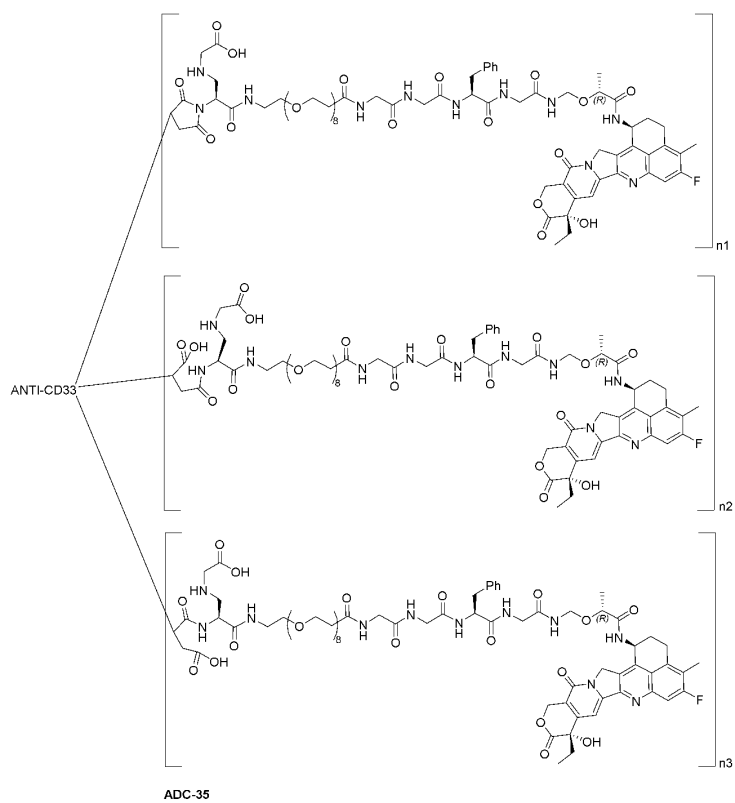


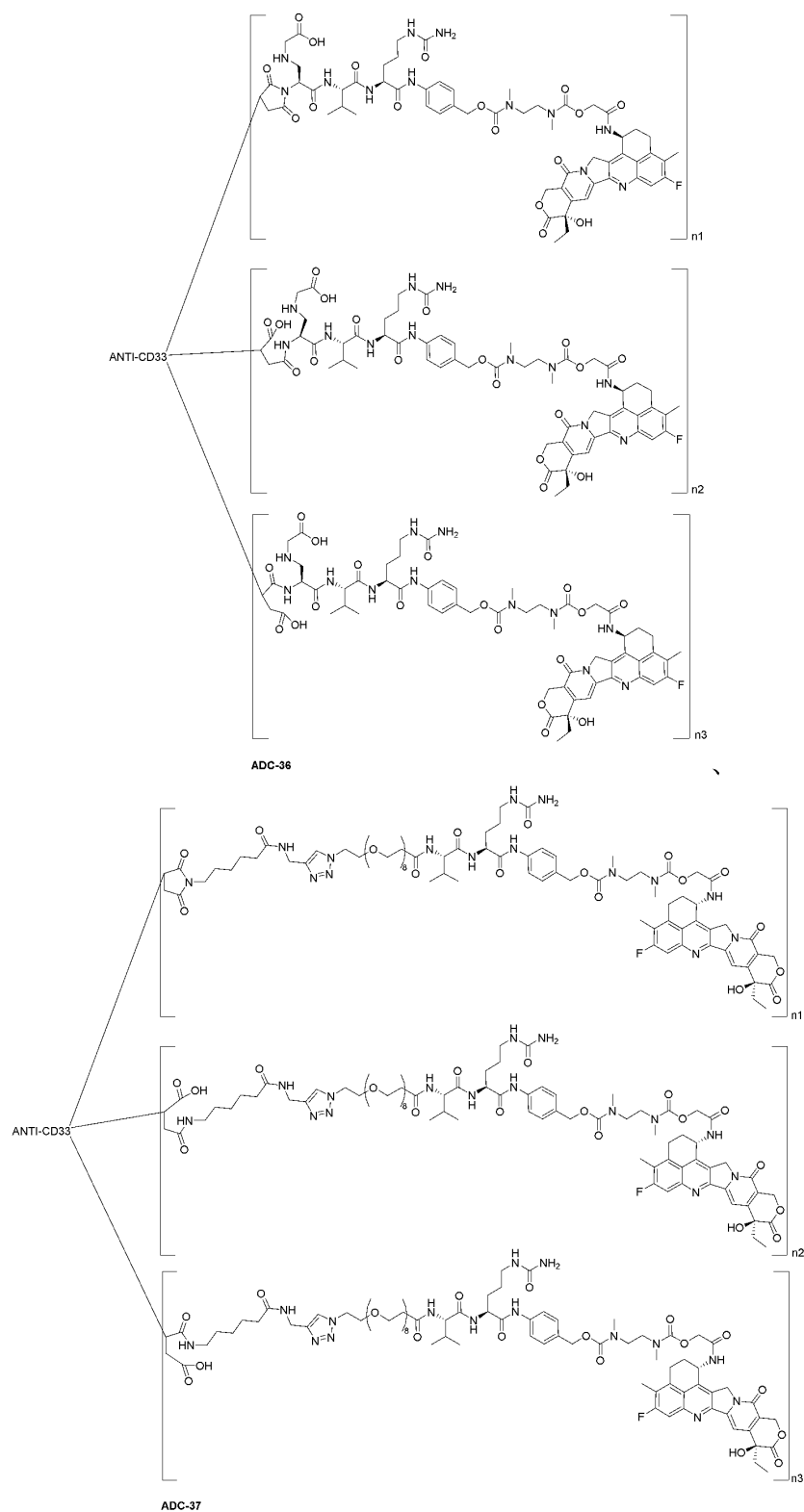
ADC-27

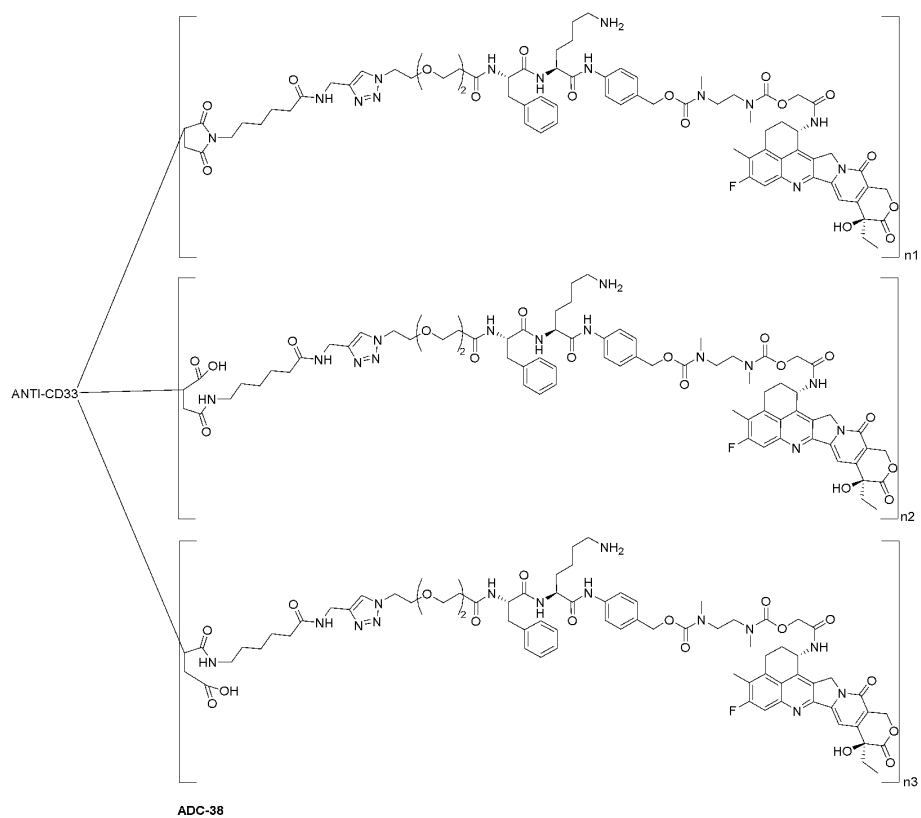
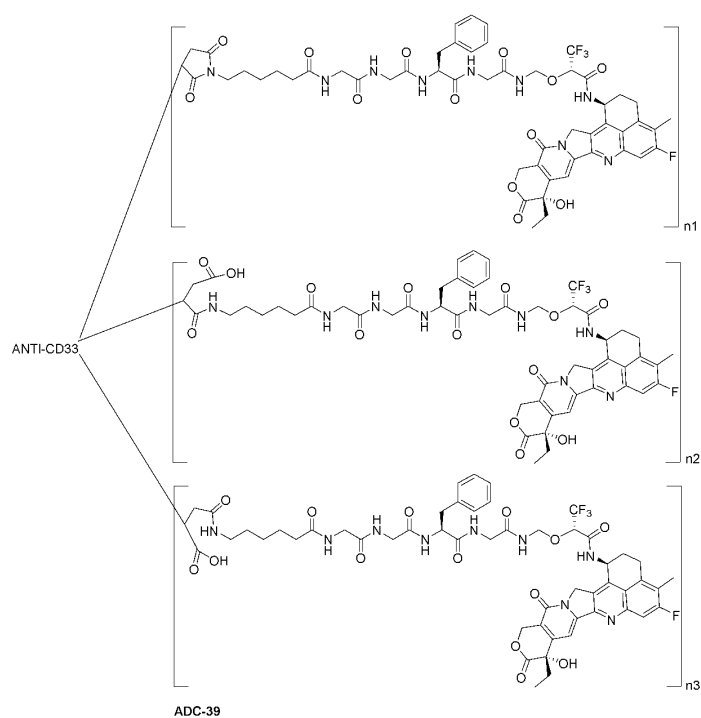


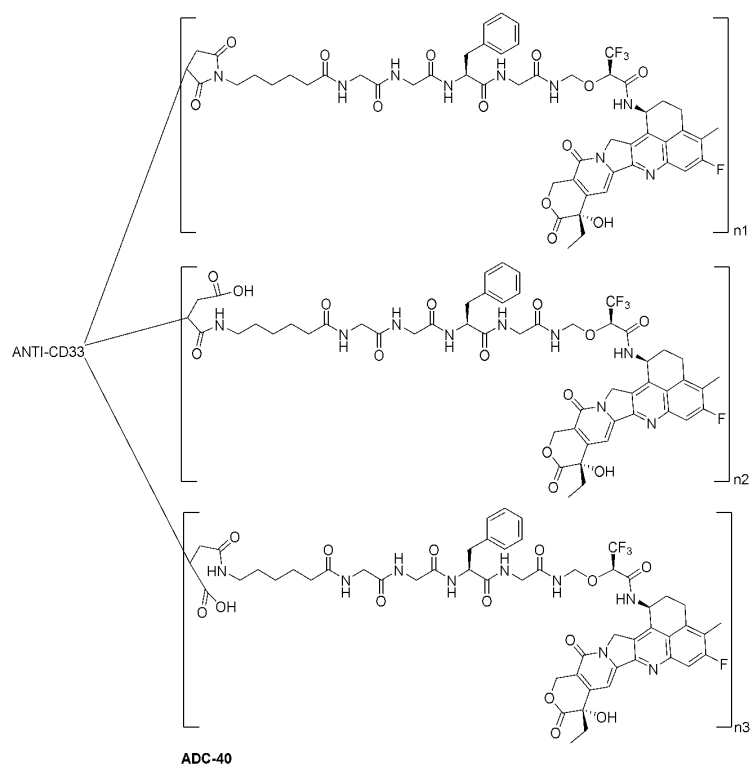
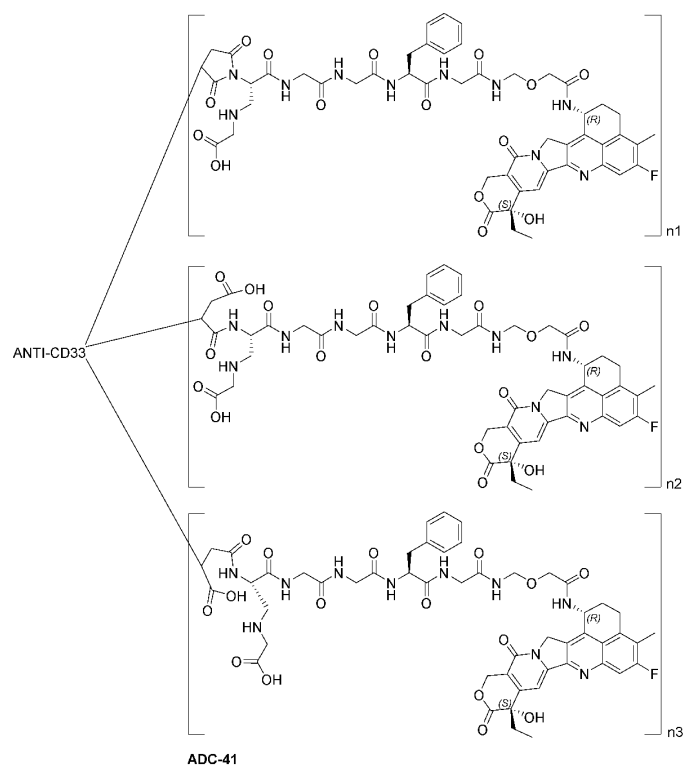


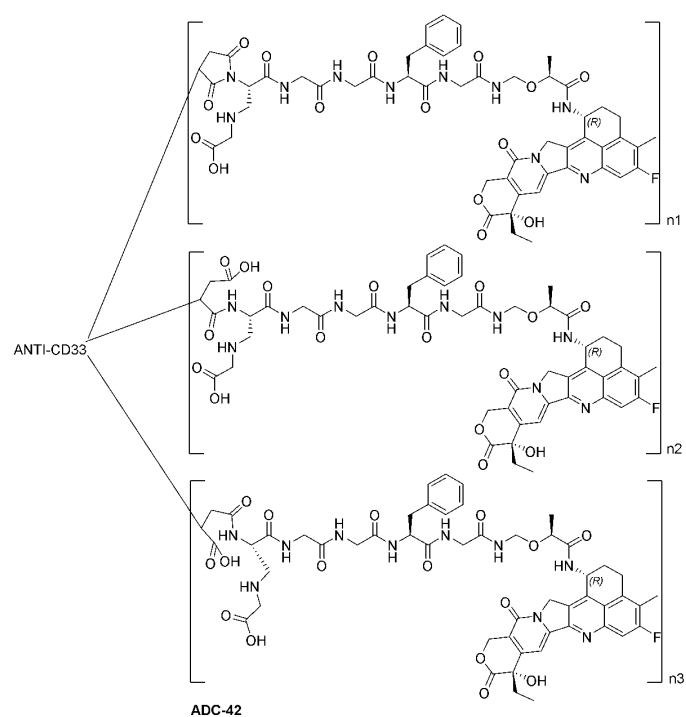
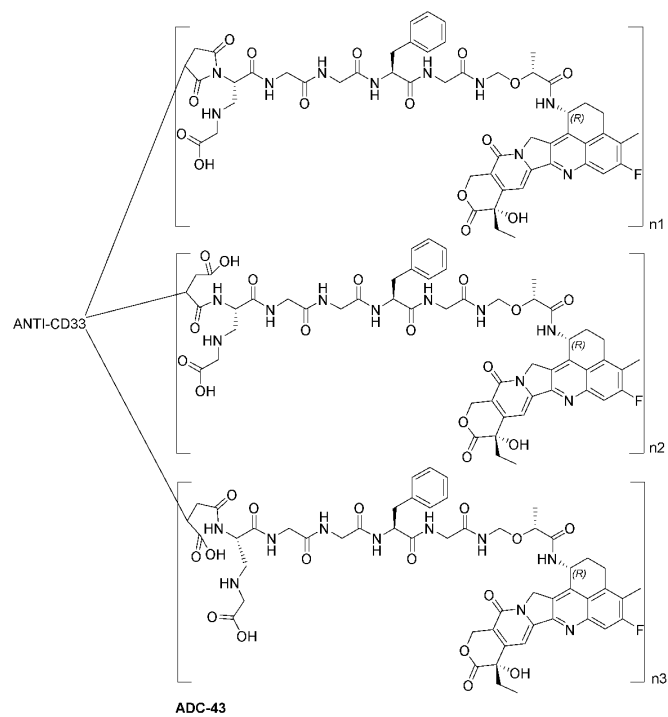


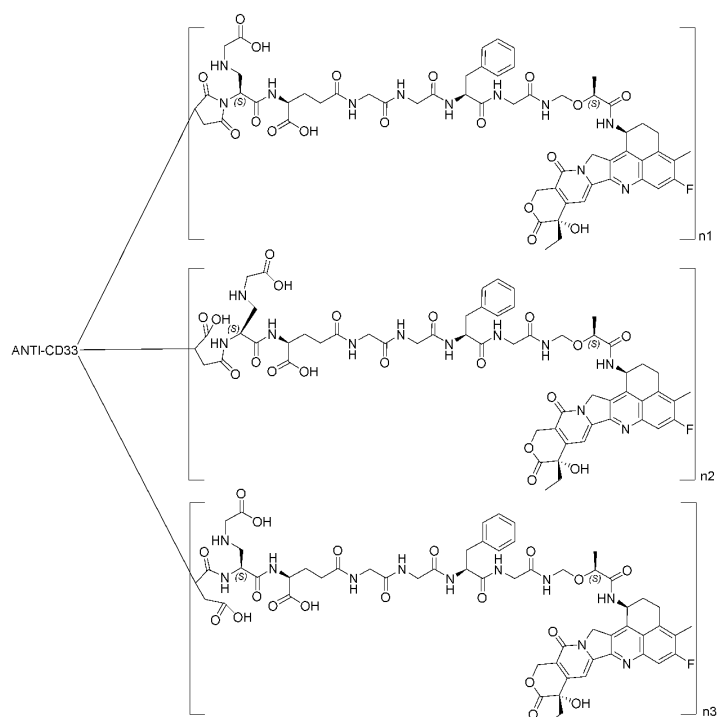
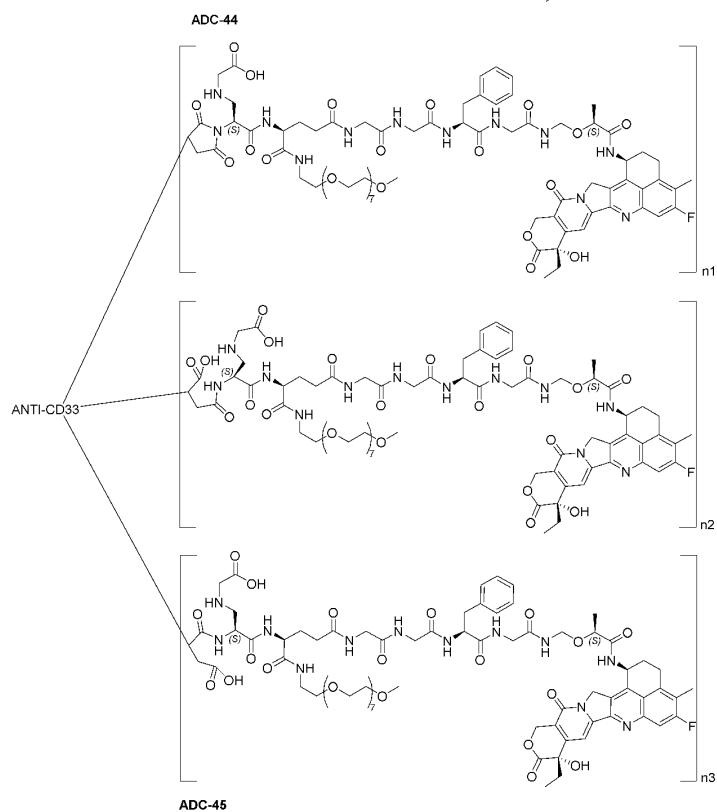


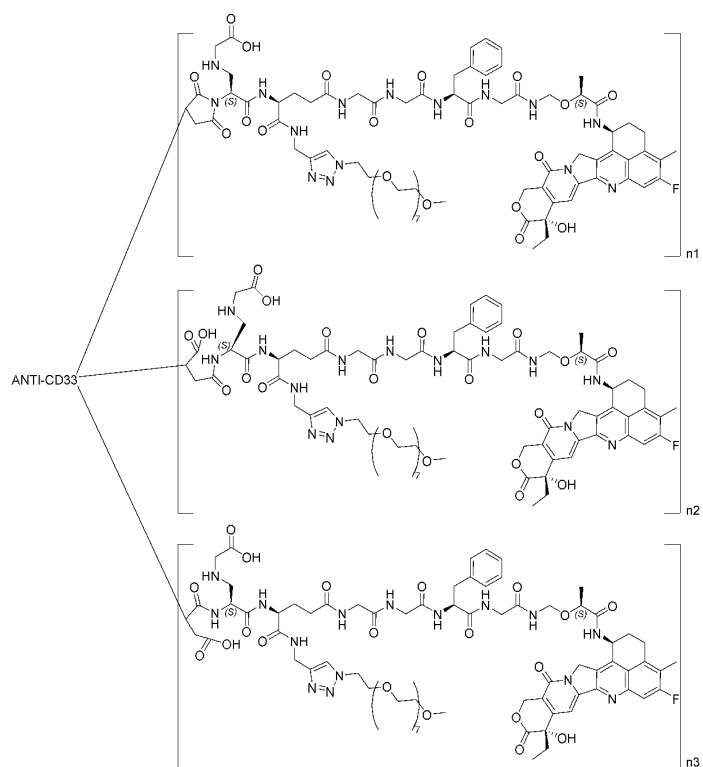
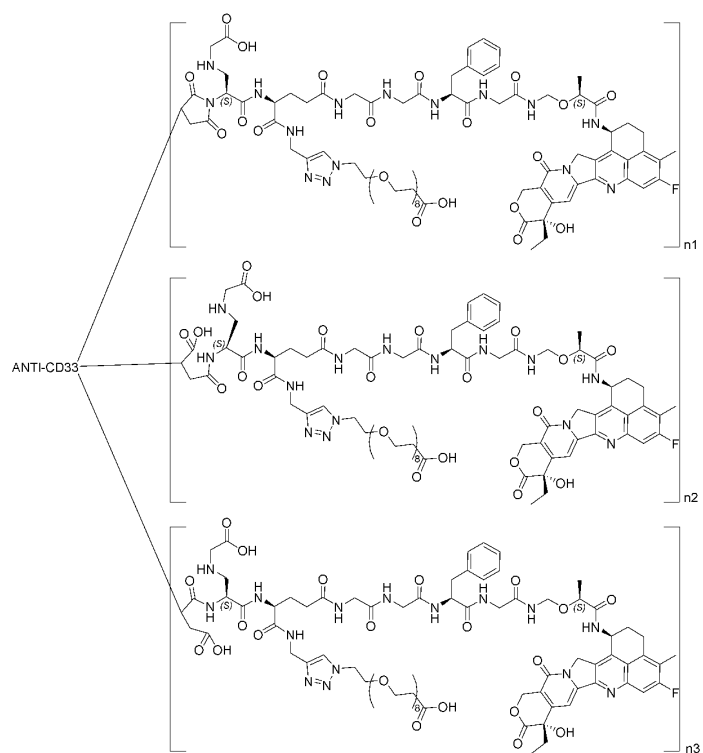




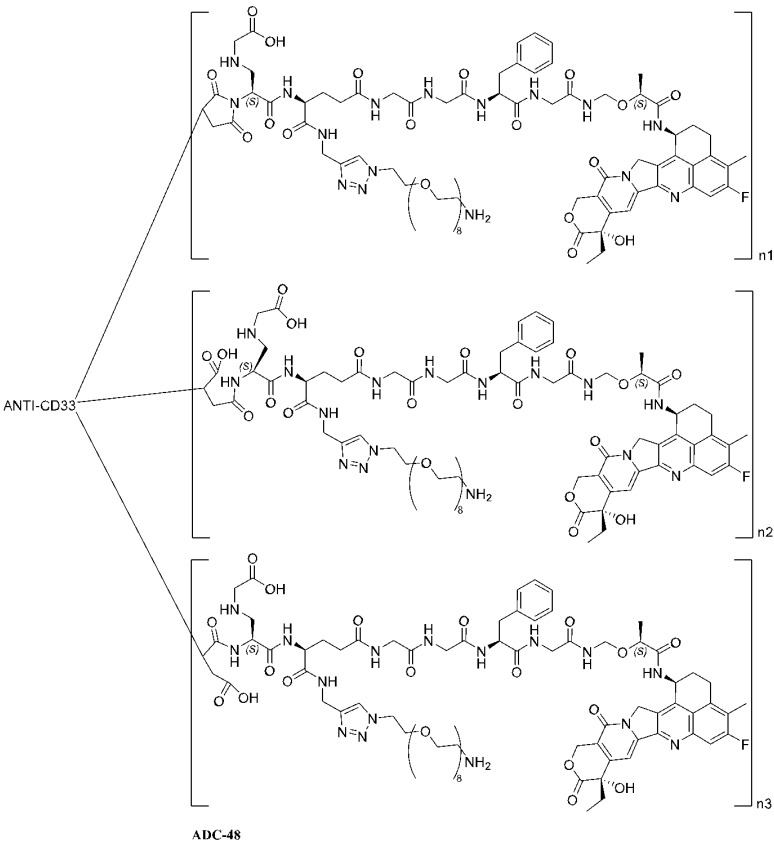








或



其中：

ANTI-CD33 为抗 CD33 抗体或其抗原结合片段；

n1、n2、n3 各自独立地选自 0-10 的任意整数或任意小数，n1、n2、n3 不同时为 0，且 $1 \leq n1+n2+n3 \leq 10$ ；

优选地，n1、n2、n3 各自独立地选自 0-10 的任意整数或任意小数，n1、n2、n3 不同时为 0，且 $8 \leq n1+n2+n3 \leq 10$ 。

10. 如权利要求 1-9 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，所述抗 CD33 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 所示的 CDR1、CDR2、CDR3，重链可变区包含如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 所示的 CDR1、CDR2、CDR3。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, 所述抗 CD33 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区如 SEQ ID NO: 7 所示, 重链可变区如 SEQ ID NO: 1 所示。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, 所述抗 CD33 抗体包含来源于人免疫球蛋白的恒定区;

优选地, 所述抗 CD33 抗体的轻链包含来源于人免疫球蛋白 (例如 kappa 或 lambda) 的轻链恒定区; 所述抗体的重链包含来源于人免疫球蛋白 (例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4) 的重链恒定区,

优选地, 所述抗 CD33 抗体的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 11, 重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5;

优选地, 所述抗 CD33 抗体的轻链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 23, 重链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 17。

13. 如权利要求 10-12 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, 所述抗 CD33 抗体进一步包含半胱氨酸定点插入;

优选地, 所述半胱氨酸的插入位点在轻链恒定区;

优选地, 所述半胱氨酸的插入位点为 kappa 轻链恒定区第 206 位 (Kabat 编号);

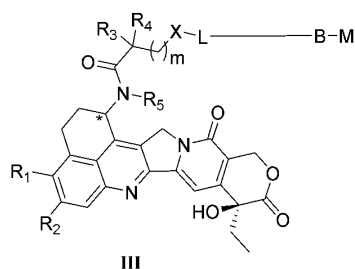
优选地, 所述抗 CD33 抗体的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 25, 重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5;

优选地, 所述抗 CD33 抗体的轻链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 27, 重链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 17。

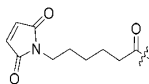
14. 如权利要求 1-13 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述药学上可接受的盐包括与结构式中

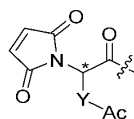
酸性官能团形成的钠盐、钾盐、钙盐或镁盐以及与结构中碱性官能团形成的醋酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、硝酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、乳酸盐、油酸盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。

15. 一种如式 **III** 所示的连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，



其中：

M'选自  或如下式 **A'**所示的接头单元；



式 **A'**

其中 Y 为支架，选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基；优选 Y 为 C1-C6 烷基；Ac 为亲水结构单元；右侧波浪线所示位置与 B 相连或 L 相连；

B 存在或不存在，当 B 存在时选自修饰单元；

L 选自连接单元，优选为含肽连接单元；

X 选自 -NH-、-O-或-S-，优选为-O-；

R₁ 和 R₂ 相同或者不同，且各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地，R₁ 和 R₂ 相同或者不同，且各自独立地选自卤素、C1-C6 烷基；

更优选地, R_1 选自 C1-C6 烷基, R_2 选自卤素;

最优选地, R_1 为甲基, R_2 为氟;

R_3 和 R_4 相同或者不同, 各自独立地选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、C6-C10 芳基 C1-C6 烷基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选地, R_3 、 R_4 相同或者不同, 各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基;

进一步优选地, R_3 、 R_4 相同或者不同, 各自独立地选自氢、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C6 环烷基、C3-C6 环烷基 C1-C6 烷基或苯基 C1-C6 烷基;

更优选地, R_3 、 R_4 相同或者不同, 各自独立地选自氢、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基、环丙甲基、苄基;

最优选地, R_3 、 R_4 中, 任意一个选自氢、甲基, 另一个选自氢、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基、环丙甲基、苄基;

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

优选地, R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基;

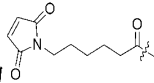
更优选地, R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成 C3-C6 环烷基;

最优选地, R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成环丙基、环丁基或环戊基;

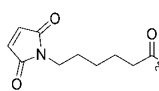
R_5 选自氢、氘、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基, R_5 优选选自氢、C1-C6 烷基, R_5 更优选选自氢、甲基;

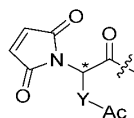
m 选自 0-5 的整数, 优选选自 0、1;

*位置所示手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型;

且满足以下条件: M' 为  时, B 存在, 选自修饰单元。

16. 如权利要求 15 所述的连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐

或溶剂化物, 其特征在于: 所述 M' 选自  或如下式 A' 所示的接头单元, 优选选自如下式 A' 所示的接头单元;



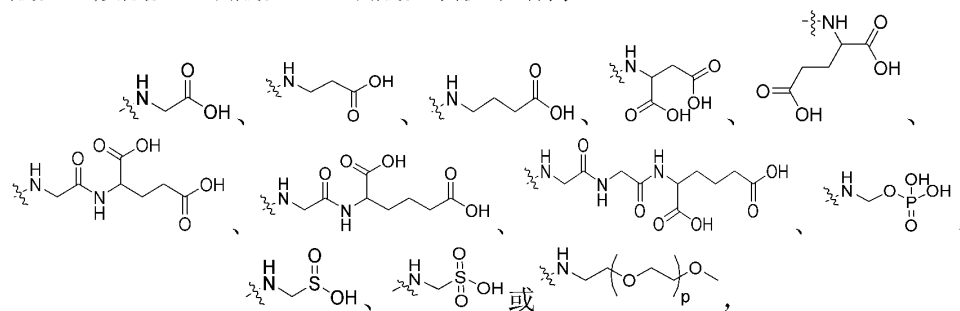
式 A'

其中 Y 为支架, 选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基; 优选 Y 为 C1-C6 烷基, 更优选为 C1-C3 烷基, 最优选为亚甲基;

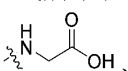
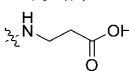
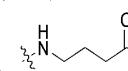
*所示位置具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性;

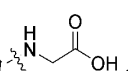
右侧波浪线所示位置与 B 相连或 L 相连;

亲水结构单元 Ac 非限制性地选自天然或非天然氨基酸、1-20 聚乙二醇、磷酸基、羧酸基、磺酸基、亚磺酸基或以下结构,

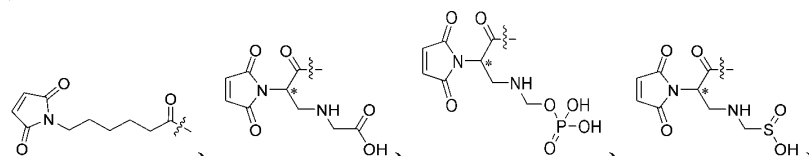


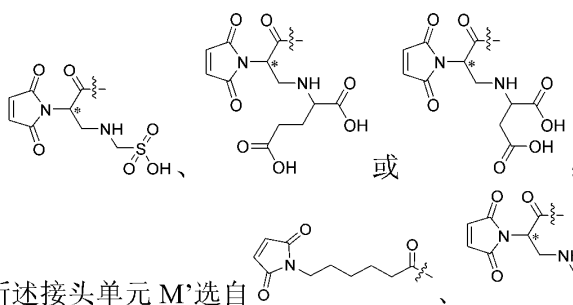
其中, p 选自 0-10 的整数; 波浪线所示位置与支架 Y 相连;

优选地, 亲水结构单元 Ac 选自 , , , 波浪线所示位置与支架 Y 相连;

更优选地, 亲水结构单元 Ac 为 , 波浪线所示位置与支架 Y 相连。

17. 如权利要求 15 或 16 中所述的连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述接头单元 M' 非限制性地选自如下式所示的结构,





优选地, 所述接头单元 M' 选自



更优选地, 所述接头单元 M' 为

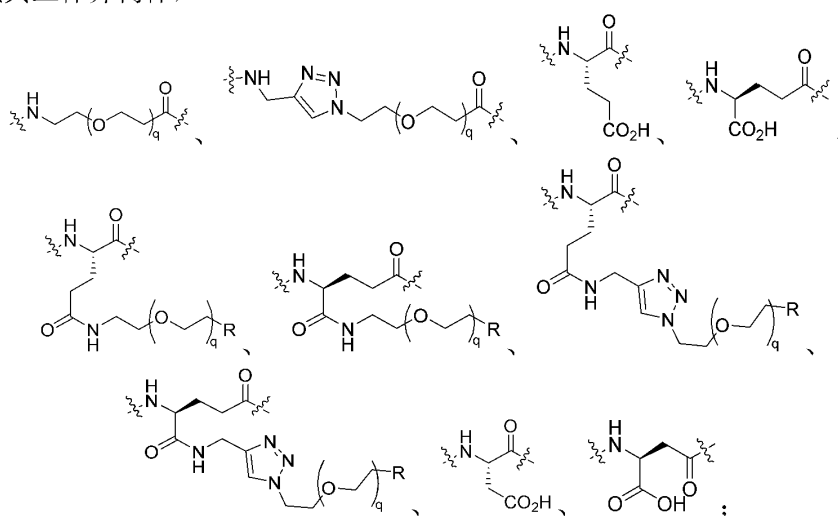
其中:

*位置具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种构型;

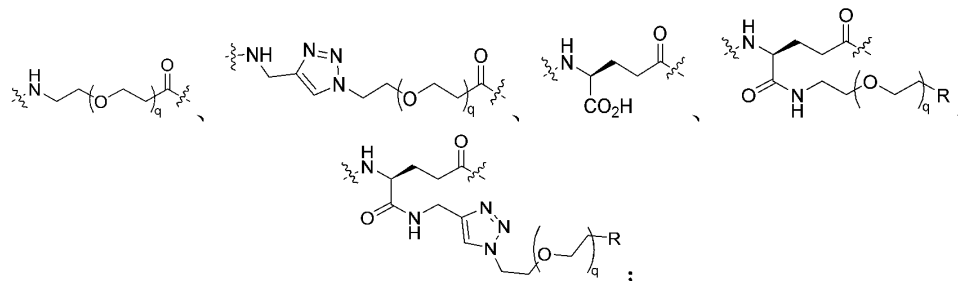
右侧波浪线所示位置与修饰单元 B 或连接单元 L 相连。

18. 如权利要求 15-17 中任一项所述的连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 修饰单元 B 存在或不存在, 当所述修饰单元 B 存在时, 非限制性地选自可增强亲水性的结构或其立体异构体。

19. 如权利要求 15-18 中任一项所述的连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 修饰单元 B 存在或不存在, 当所述修饰单元 B 存在时, 所述修饰单元 B 非限制性地选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体,



优选地，修饰单元 B 存在或不存在，当所述修饰单元 B 存在时，所述修饰单元 B 非限制性地选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体，



其中：

R 非限制性地选自羟基、氨基、聚乙二醇、羧酸基、磺酸基、亚磺酸基、磷酸基、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、天然或非天然氨基酸残基、糖或其衍生物中的一种或几种的组合；

优选地，R 选自 C1-C6 烷氧基、羧酸基、氨基；

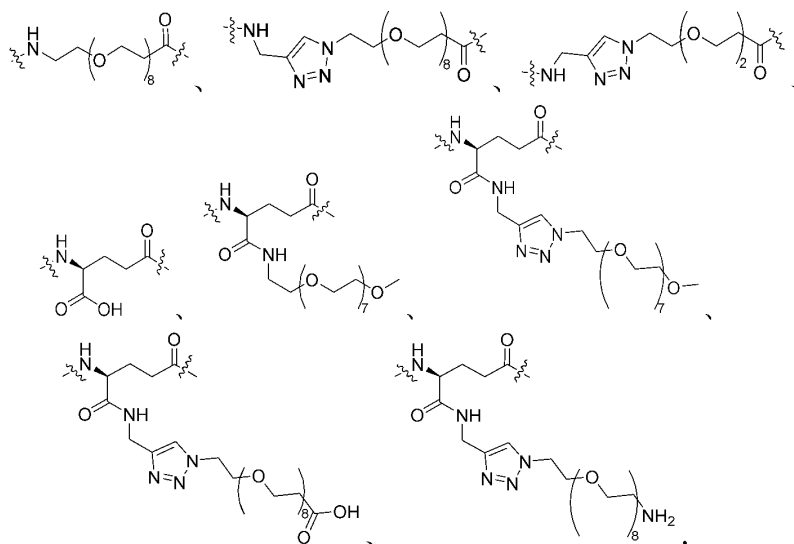
更优选地，R 选自甲氧基、羧酸基、氨基；

左侧波浪线所示位置与接头单元 M' 相连；

右侧波浪线所示位置与连接单元 L 相连；

q 选自 1-10 的整数，优选选自 2、7、8；

最优选地，所述修饰单元 B 选自如下式所示的可增强亲水性的结构或其立体异构体：



左侧波浪线所示位置与接头单元 M' 相连，右侧波浪线所示位置与连接单元

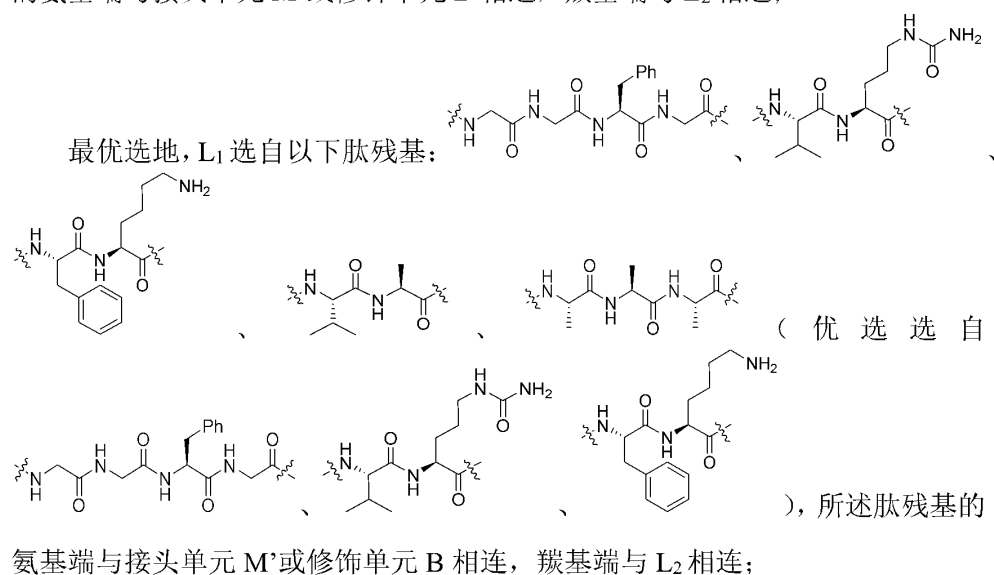
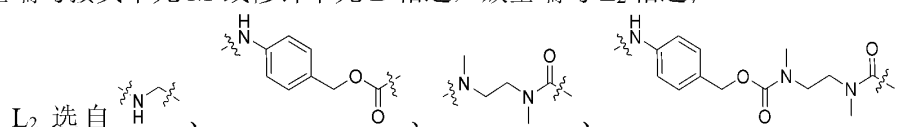
L 相连。

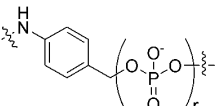
20. 如权利要求 15-19 中任一项所述的连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述连接单元 L 为 L₁-L₂，

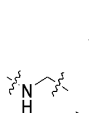
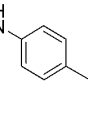
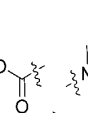
L₁ 为由 2-10 个氨基酸残基组成的肽残基，所述肽残基的氨基端与接头单元 M' 或修饰单元 B 相连，羧基端与 L₂ 相连；

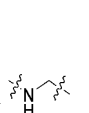
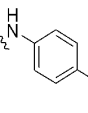
优选地，L₁ 为由 2-4 个氨基酸残基组成的肽残基，所述肽残基的氨基端与接头单元 M' 或修饰单元 B 相连，羧基端与 L₂ 相连；优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸；更优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸；最优选地，所述氨基酸选自缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、瓜氨酸；

更优选地，L₁ 选自以下肽残基：甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-丙氨酸、丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸（优选选自甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸），所述肽残基的氨基端与接头单元 M' 或修饰单元 B 相连，羧基端与 L₂ 相连；

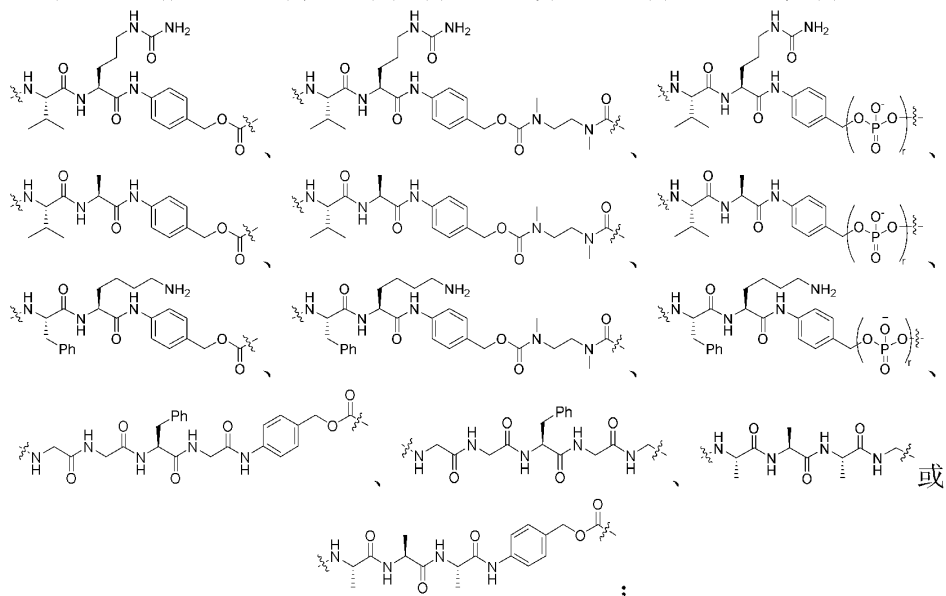



 $\left(\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O} \right)_r$
, 左侧波浪线所示位置与 L_1 相连, 右侧波浪线所示位置与 X 相连;

优选地, L_2 选自
 
,
 
,
 
,
 左侧波浪线所示位置与 L_1 相连, 右侧波浪线所示位置与 X 相连;

更优选地, L_2 选自
 
,
 
,
 左侧波浪线所示位置与 L_1 相连, 右侧波浪线所示位置与 X 相连;

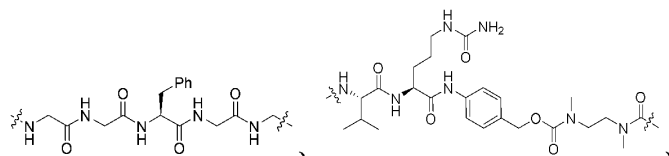
优选地, 所述连接单元 L 非限制性地选自以下结构或其立体异构体,

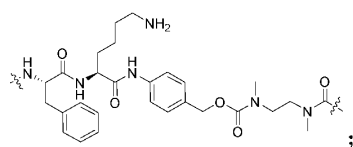


其中:

r 选自 1-10 的整数;

更优选地, 所述连接单元 L 选自以下结构或其立体异构体:

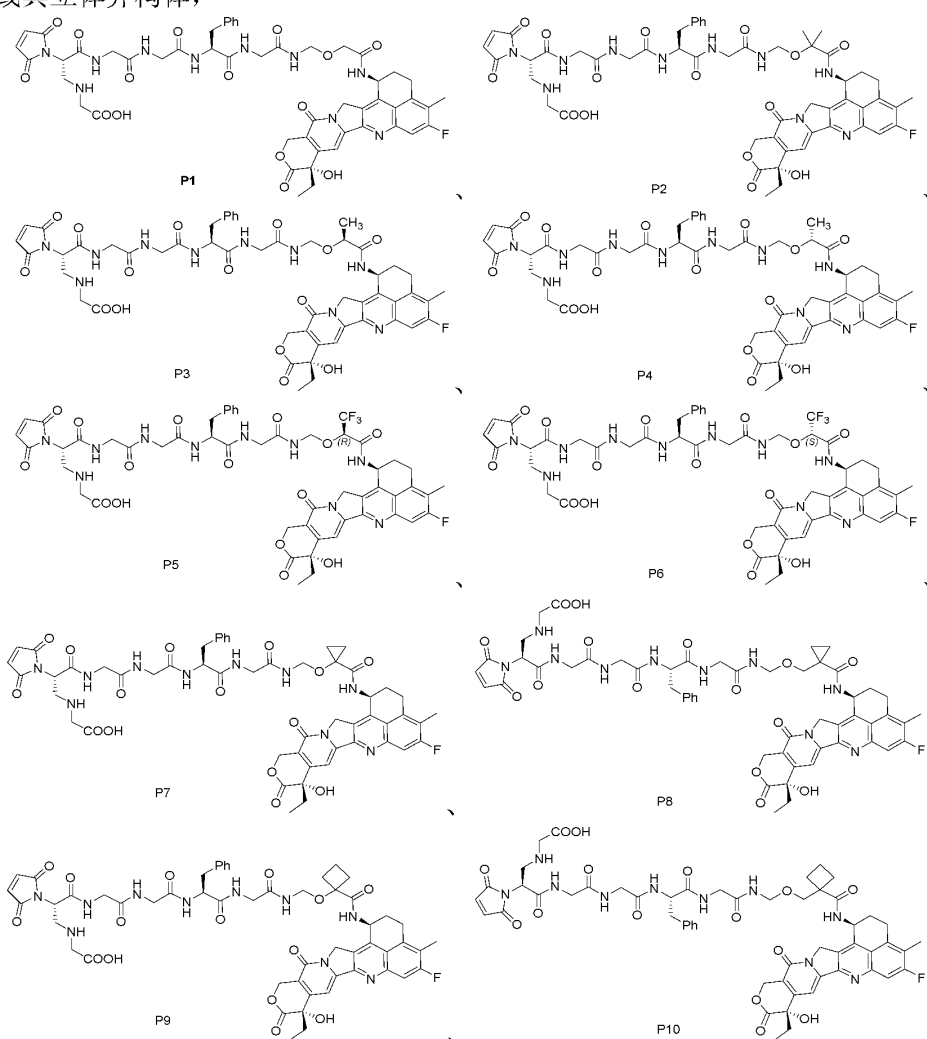


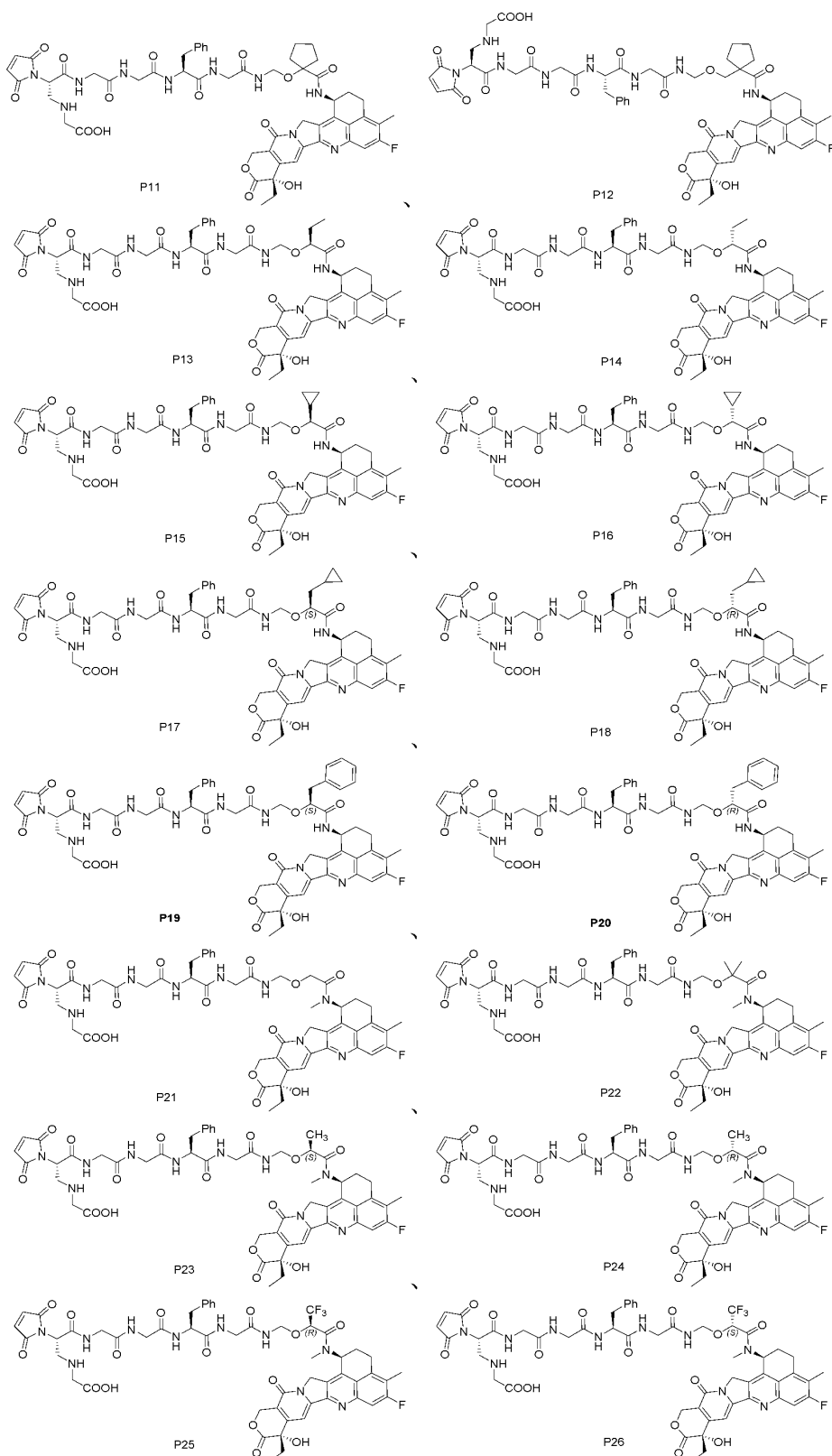


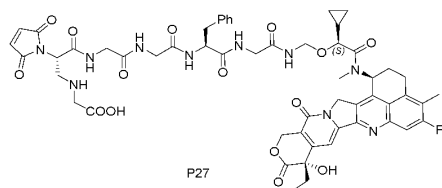
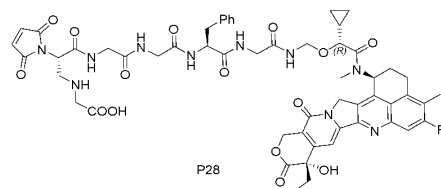
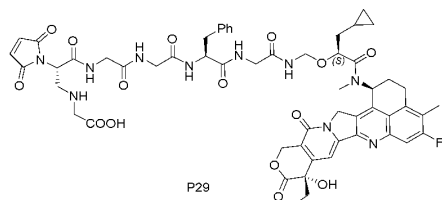
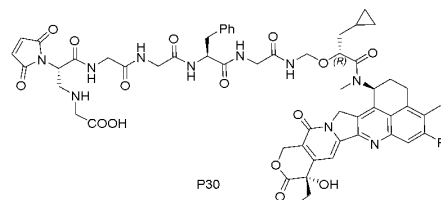
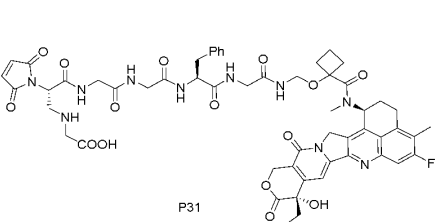
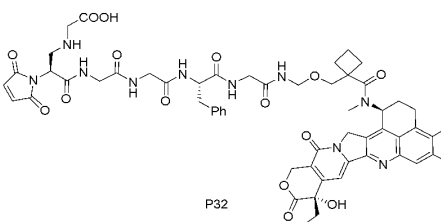
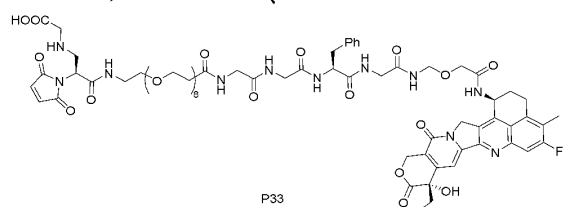
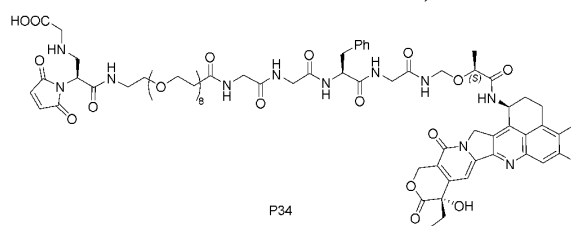
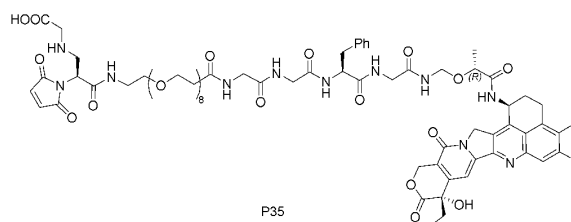
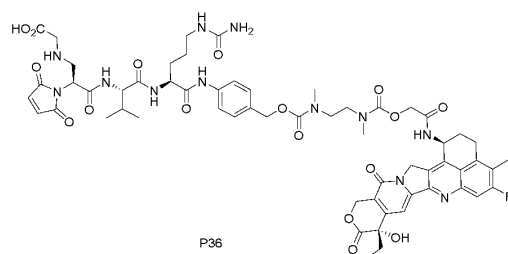
所述连接单元 L 左侧波浪线所示位置与接头单元 M' 或修饰单元 B 相连；

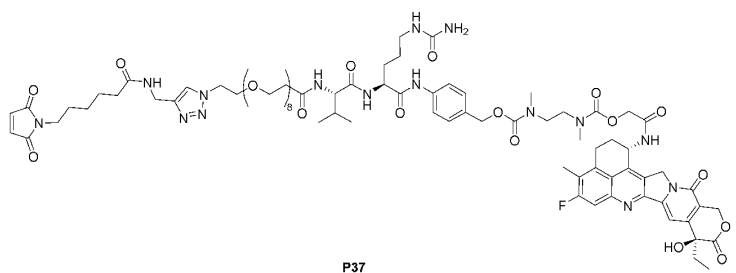
所述连接单元 L 右侧波浪线所示位置与 X 相连。

21. 如权利要求 15-20 中任一项所述的连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述连接子药物非限制性的选自以下结构或其立体异构体，

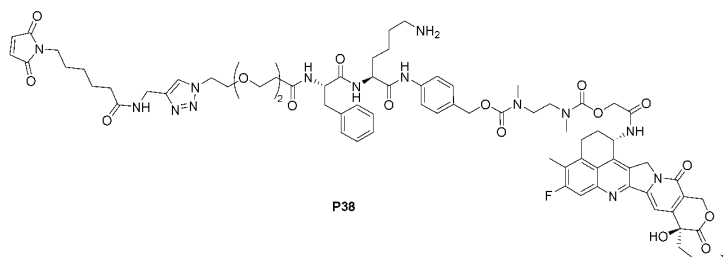




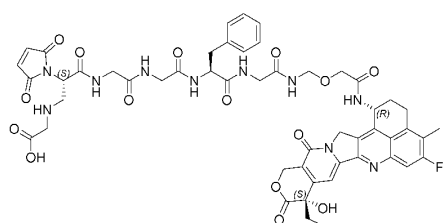




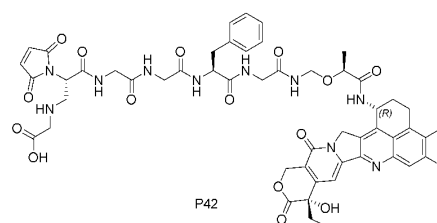
P37



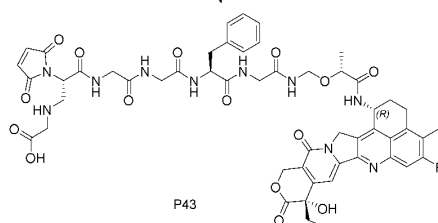
P38



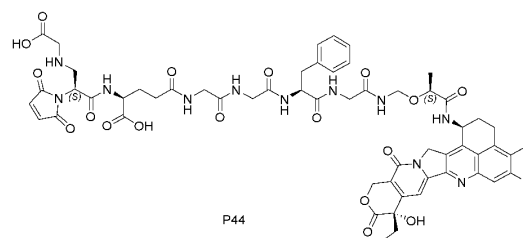
P41



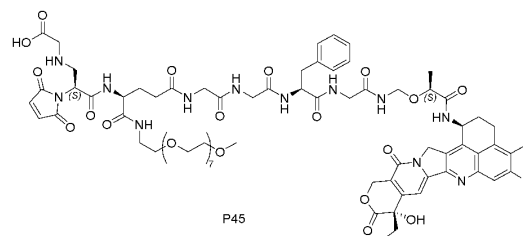
P42



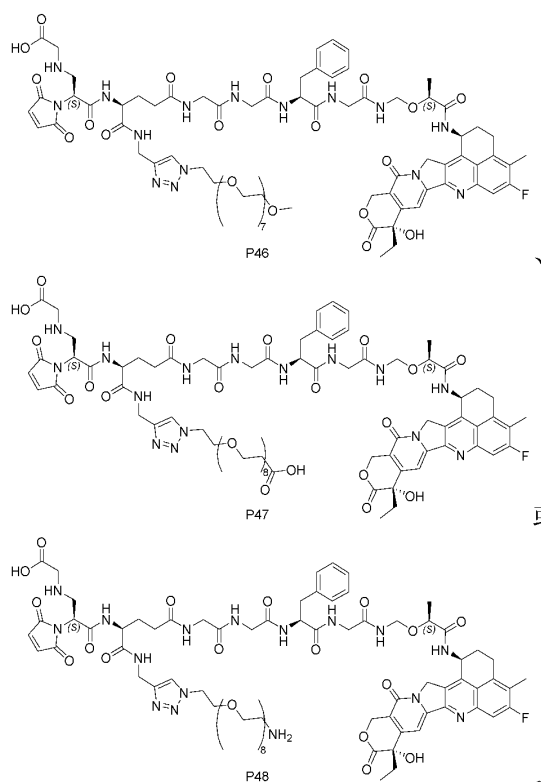
P43



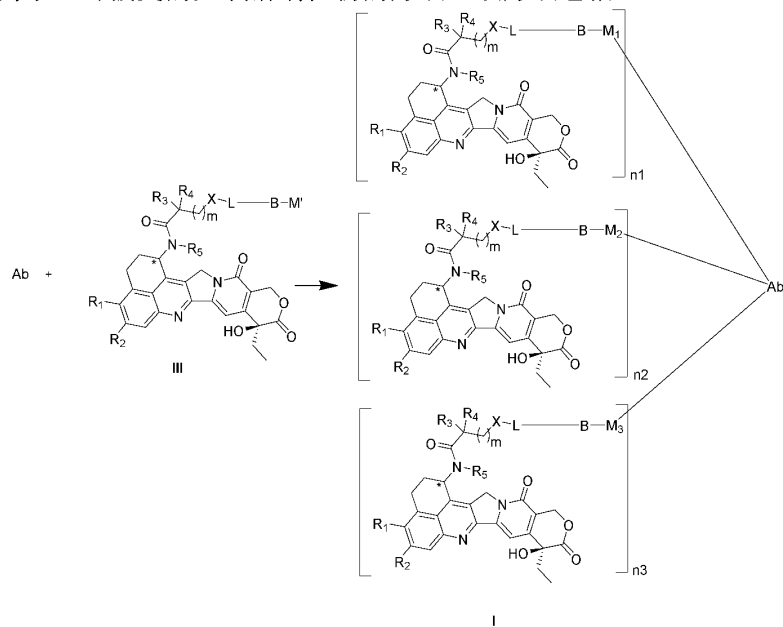
P44



P45



22. 一种制备如权利要求 1-14 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物的方法，该方法包括：



Ab 与通式III所示的连接子药物进行偶联,制备得到如权利要求 1-14 中任一项所述的通式 I 所示的抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物;

其中:

Ab 选自抗 CD33 抗体或其抗原结合片段;

优选地,所述抗 CD33 抗体如权利要求 10-13 任一项所限定;

M₁、M₂、M₃、B、L、X、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、m、n₁、n₂、n₃ 如权利要求 1-8 中任一项所限定, M' 如权利要求 15-17 任一项所限定;

*所示位置手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性。

23. 一种药物组合物,其包含权利要求 1-14 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 15-21 中任一项所述连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物,以及任选的药学上可接受的载体。

24. 一种药物制剂,其包含权利要求 1-14 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 15-21 中任一项所述连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物。

25. 如权利要求 1-14 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 15-21 中任一项所述连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物,或权利要求 23 所述的药物组合物和/或权利要求 24 所述的药物制剂,在制备用于治疗或预防癌症或者肿瘤的药物中的用途;

优选地,所述癌症或者肿瘤表达有 CD33;

更优选地,所述癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌(如非小细胞肺癌)、结肠癌、乳腺癌(如三阴乳腺癌)、直肠癌、结直肠癌、

骨癌、皮肤癌（如表皮癌）、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤、骨髓瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

26. 如权利要求 1-14 中任一项所述抗体-药物偶联物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 15-21 中任一项所述连接子药物或其立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物，或权利要求 23 所述的药物组合物和/或权利要求 24 所述的药物制剂，其用于治疗或预防癌症或者肿瘤；

优选地，所述癌症或者肿瘤表达有 CD33；

更优选地，所述癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌（如非小细胞肺癌）、结肠癌、乳腺癌（如三阴乳腺癌）、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌（如表皮癌）、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤、骨髓瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。