

一种喜树碱类药物及其抗体偶联物

技术领域

本发明涉及作为抗肿瘤药用的喜树碱类药物及其抗体药物偶联物。

背景技术

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

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

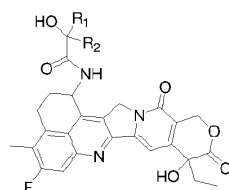
抗体药物偶联物（ADC）类药物的优势在于增加水溶性，提高靶向性，特异性抗体与抗原的结合，将药物携带至靶细胞周围，通过在靶细胞附近释放药物，有效杀灭肿瘤细胞，降低毒副作用。喜树碱类药物在ADC药物中具有可观的应用前景。

本专利所需要解决的技术问题，就是探索发现更优的抗肿瘤喜树碱化合物，提高对抗肿瘤的小分子化合物在ADC药物应用中的安全性、有效性，得到具有优异疗效的抗肿瘤药。

本发明人在对ADC类药物综合理解的基础上，设计出一系列抗肿瘤喜树碱活性衍生物，通过实验发现，抗肿瘤的小分子化合物在细胞实验中表现出更高的抗肿瘤活性。

发明内容

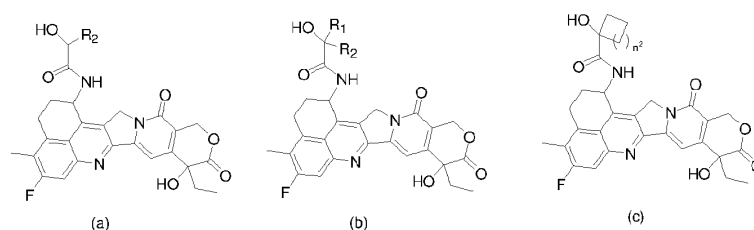
本发明旨在提供一种具有更优异抗肿瘤效果的喜树碱衍生物及其抗体药物偶联物，一种如式I所示的抗肿瘤喜树碱类化合物或其药学上可接受的盐：



式 I

其中 R_1 及 R_2 分别独立的选自 C_1 - C_3 烷基或取代烷基、-H、- CF_3 、芳基或取代的芳基；或 R_1 、 R_2 连同其所连接碳原子构成环丁烷、环戊烷或环己烷； R_1 、 R_2 不同时为氢。

作为优选方式， R_1 为氢， R_2 为 C_1 - C_3 烷基、- CF_3 、芳基、杂芳基、单氟取代的芳基或者双氟取代的芳基；或 R_1 及 R_2 为 C_1 - C_3 烷基、- CF_3 、芳基、杂芳基、单氟取代的芳基或者双氟取代的芳基；或 R_1 、 R_2 连同其所连接碳原子构成环丁烷、环戊烷或环己烷；

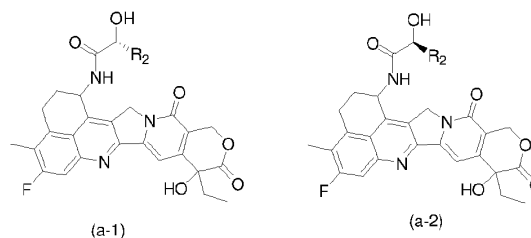


在结构式 (a) 中， R_2 独立地为 $-(CH_2)n^1-CH_3$ 、- CF_3 、芳基、杂芳基、单氟取代的芳基或者双氟取代的芳基，其中 $n^1=0$ 、1 或 2；

在结构式 (b) 中， R_1 及 R_2 独立地为 $-(CH_2)n^1-CH_3$ 、- CF_3 、芳基、杂芳基、单氟取代的芳基或者双氟取代的芳基，其中 $n^1=0$ 、1 或 2；

在结构式 (c) 中， R_1 、 R_2 连同其所连接碳原子构成环丁烷、环戊烷、环己烷， $m=1$ 、2 或 3。

更加优选的， R_1 为氢， R_2 独立地为 $-(CH_2)n^1-CH_3$ 、- CF_3 、芳基、杂芳基、单氟取代的芳基或者双氟取代的芳基，其中 $n^1=0$ 、1 或 2；

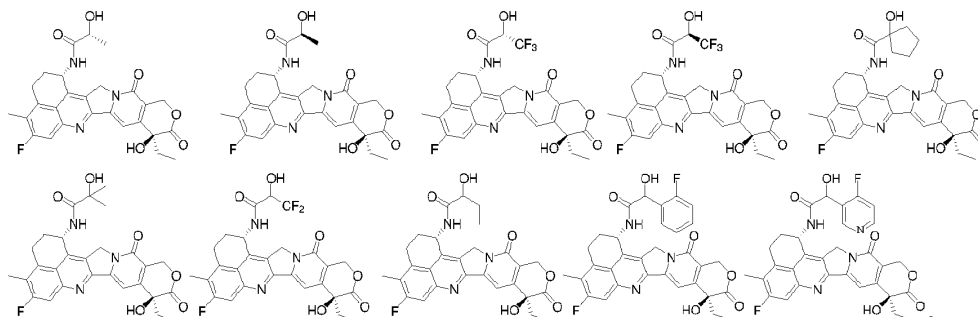


R_2 所连接碳有 R、S 两种构型，

在结构式 (a-1) 中， R_2 所连接碳为 R 构型，

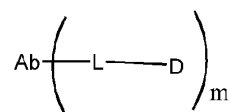
在结构式 (a-2) 中， R_2 所连接碳为 S 构型。

作为优选例，所述的喜树碱化合物或其药学上可接受的盐，包括以下结构：



作为优选例，所述的喜树碱化合物或其药学上可接受的盐为抗肿瘤药，其用于肺癌、肾癌、尿道癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、多形性胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、肺癌或食道癌等实体瘤及血液肿瘤。

本发明的另一方面，包括如式 II 所示的抗体药物偶联物，该偶联物到达靶细胞后通过释放药物 D 发挥药效。



式 II

其中 Ab 是抗体，抗体片段或蛋白；

L 是任意的连接单元；

D 选自上述的任一喜树碱化合物或其药学上可接受的盐，其通过分子中的羟基与 L 相连。

m 选自 1-20 的整数。

作为优选例，所述的抗体药物偶联物，连接单元 L 包含选自化学键-O-，-N(R)_{n1}-，-CH₂-，-CH(R)_{n1}-，酰胺，酯键，-S-，—(PEG)_{n2}—，组成的组；n₁选自 1-3 整数，n₂选自 1-20 整数。

本发明的另一方面，包括一种治疗有此需要的患者的方法，包括向所述患者给予前述权利要求中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述患者患有肿瘤、自身免疫疾病或感染性疾病，并且所述的药物-配体偶联物的抗体特异性结合至所述癌症、自身免疫疾病的靶细胞。

优选的，所述的抗体偶联药物或其盐，为抗肿瘤药或抗癌药，其用于肺癌、肾癌、尿道癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、多形性胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌等实体瘤及血液肿瘤。

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、通用药物和活性药物成分。

术语“亚烷基”是指具有 1-20 个碳原子的二价直链饱和烃基团，包括从 1 至 10 碳原子的基团。亚烷基基团的实施例包括但不限于亚甲基 ($-\text{CH}_2-$)，亚乙基 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)，亚正丙基，亚正丁基，亚正戊基和亚正己基。除非另有说明，术语“芳基”指多不饱和、一般是芳族的羟基团，它可以是单环或者稠合或共价连接的多环（至多三个环）。术语“芳杂基”指含有 1-5 个选自 N、O 或 S 的杂原子的芳基（或环），其中所述氮和硫原子任选被氧化，所述氮原子任选被季铵化。杂芳基团可通过杂原子连接于分子的其余部分。芳基基团的非限制性例子包括：苯基、萘基和二苯基，而杂芳基团的非限制性例子包括：吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基 (pyrimidinyl)、三嗪基、喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、酞嗪基 (phthalazinyl)、苯并三嗪基、嘌呤基、苯并咪唑基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并异唑基、异苯并呋喃基、异吲哚基、吲哚基、苯并三嗪基、噻吩并吡啶基、噻吩并嘧啶基、吡啶并嘧啶基、咪唑并吡啶、苯并噻唑基 (benzothiazolyl)、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、喹啉基、异喹啉基、异噻唑基、吡唑基、吲唑基、蝶啶基、咪唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、吡咯基、噻唑基、呋喃基、以及噻吩基等。当描述为“取代的”时，上述芳环和杂芳环系统的取代基选自下述可接受的取代基。

除非文中另有说明，烷基的取代基可以是选自下组的多种基团： $-\text{卤素}$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $-\text{OC(O)R}'$ 、 $-\text{C(O)R}'$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OC(O)NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}''\text{C(O)R}'$ 、 $-\text{NR}'\text{C(O)NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{NR}''\text{C(O)}_2\text{R}'$ 、 $-\text{NH-C(NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{NR}'\text{C(NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{NH-C(NH}_2)=\text{NR}'$ 、 $-\text{S(O)R}'$ 、 $-\text{S(O)}_2\text{R}'$ 、 $-\text{S(O)}_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{S(O)}_2\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ 和 $-\text{NO}_2$ ，取代基数量为 0 至 $(2m'+1)$ ，其中 m' 为该基团中碳原子的总数。 R' 、 R'' 和 R''' 各自独立的指代氢、未取代的 C_{1-8} 烷基、未取代的芳基、由 1-3 个卤素取代的芳基、未取代的 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷氧基或 C_{1-8} 硫代烷氧基、或未取代的芳基- C_{1-4} 烷基。 R' 和 R'' 连接于同一个氮原子时，它们可与该氮原子一起形成 3-，4-，5-，6-或 7-元环。例如， $-\text{NR}'\text{R}''$ 包括 1-吡咯烷基和 4-吗啉基。

本文中所用的化合物的“衍生物”是指具有与化合物相似的化学结构但还含有至少一个化合物中不存在的化学基团和/或缺少至少一个化合物中存在的化学基团的物质。衍生物所比较的化合物被称为“母体”化合物。通常，“衍生物”可在一个或多个化学反应步骤中由母体

化合物产生。

L-配体

配体单元是与靶标部分特异性结合的靶向剂。所述配体能够特异性结合至细胞组分或结合至细胞组分或结合至其他感兴趣的靶标分子。靶标部分或靶标通常在细胞表面上。在一些方面中，配体单元的作用是将药物单元递送至配体单元与之相互作用的特定靶细胞群。配体包括但不限于蛋白质、多肽和肽，以及非蛋白质如糖。合适的配体单元包括，例如，抗体，例如全长（完整）抗体及其抗原结合片段。在配体单元是非抗体靶向试剂的实施方式中，其可以是肽或多肽，或非蛋白质分子。这类靶向试剂的示例包括干扰素、淋巴因子、激素、生长因子和集落刺激因子、维生素、营养转运分子、或任何其他细胞结合分子或物质。在一些实施方式中，连接子共价连接至配体的硫原子。在一些方面中，硫原子是半胱氨酸残基的硫原子，其形成抗体的链间二硫键。在另一方面中，硫原子是已经导入配体单元的半胱氨酸残基的硫原子，其形成抗体的链间二硫键。在另一方面中，硫原子是已经导入配体单元的半胱氨酸残基的硫原子（例如，通过定点诱变或化学反应）。在其他方面中，连接子结合的硫原子选自形成抗体的链间二硫键的半胱氨酸残基或已经引入配体单元的额半胱氨酸残基（例如，通过定点诱变或化学反应）。在一些实施方式中，按照 Kabat（Kabat E.A 等，（1991））《免疫学感兴趣的蛋白质序列》（Sequences of proteins of Immunological Interest），第五版，NIH 出版物 91-3242）中的 EU 索引编号系统。

如本文所用，“抗体”或“抗体单元”在其所属的范围内，包括抗体结构的任何部分。这一单元可以结合，反应性关联，或者络合一个受体，抗原，或者靶向细胞群体具有的其它受体单元。抗体可以是任何蛋白或蛋白类分子，它可以结合，络合，或者与待治疗或生物改造的细胞群体的一部分发生反应。

本发明中组成抗体药物偶联物的抗体最好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，最好专一性的与抗原结合。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）。与本发明中所述

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。

肿瘤相关抗原包括，但不局限于以下列出的肿瘤相关抗原（1）-（36）。为方便起见，为业内所熟知的抗原相关信息标示如下，包括名称，其他名称，基因库登录号。与肿瘤相关抗原对应的核酸和蛋白序列可参见公开数据库，例如 Genbank。抗体靶向对应的肿瘤相关抗原包括所有的氨基酸序列变种和同种，与参考文献中确认的序列具有至少 70%，80%，85%，90%，或者 95%的同源性，或者具备与引用文献中的肿瘤相关抗原序列具有完全一致的生物性质和特征。

术语“抑制”或“的抑制”指，减少了可检测的量，或完全阻止。

术语“癌症”指的是以失调的细胞生长为特征的生理病症或疾病。“肿瘤”包括癌细胞。

术语“自身免疫疾病”是源自针对个体自身的组织或蛋白质的疾病或紊乱。

本文中所用的短语“药学上可接受的盐”指的是，化合物（例如，药物，药物-接头或配体-接头-药物偶联物）的药学上可接收到有机或无机盐。该化合物可含有至少一个氨基或羧基，并且因此可与相应的酸或碱形成加成盐。示例性的盐包括但不限于：硫酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、单宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、甲酸盐、本甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐，钾盐、钠盐等。另外，药学上可接受的盐在结构中具有超过一个的带点原子。其中多个带电原子是药学上可接受的盐的一部分的示例能有多重抗衡例子。例如，药学上可接受的盐具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡原子。

按照在细胞内药物释放的机制，如本文所用，“连接子”或“抗体药物偶联物的连接子”可被分为两类：不可断裂连接子和可断裂连接子。

对于含有不可断裂连接子的抗体药物偶联物，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，连接子，和抗体氨基酸残基共同组成的活性分子。由此带来的药物分子结构改变并不减弱其细胞毒性，但由于活性分子是带电荷的（氨基酸残基），从而导致其不能渗入邻近细胞。因此，此类活性药物不能杀死邻近不表达靶向抗原（抗原阴性细胞）的肿瘤细胞（旁观者效应，bystander effect）（Ducry 等，2010，Bioconjugate Chem.21:5-13）。

可断裂连接子，顾名思义，可以在目标细胞内断裂并释放出活性药物（小分子药物本身）。可断裂连接子可分为两个主要的类别：化学不稳定连接子和酶不稳定连接子。

化学不稳定连接子可以由于血浆和细胞质性质的不同而选择性的断裂。这样的性质包括 pH 值，谷胱甘肽浓度等。

对 pH 值敏感的连接子，通常又称为酸断裂连接子。这样的连接子在血液的中性环境下相对稳定 (pH7.3-7.5)，但是在弱酸性的内涵体 (pH5.0-6.5) 和溶酶体 (pH4.5-5.0) 内将会被水解。第一代的抗体药物偶联物大多应用这类连接子，例如脲，碳酸酯，缩醛，缩酮类。由于酸断裂连接子有限的血浆稳定性，基于此类连接子的抗体药物偶联物通常具有较短的半衰期 (2-3 天)。这种较短的半衰期在一定程度上限制了 pH 敏感连接子在新一代抗体药物偶联物中的应用。

对于谷胱甘肽敏感的连接子，又称二硫键连接子。药物释放是基于细胞内谷胱甘肽的高浓度 (毫摩尔范围) 与血液中相对较低的谷胱甘肽浓度 (微摩尔范围) 差异引起的。对于肿瘤细胞而言尤其如此，其低含氧量导致还原酶的活性增强，因而导致更高的谷胱甘肽浓度。二硫键具有热力学稳定性，因此在血浆中具有较好的稳定性。

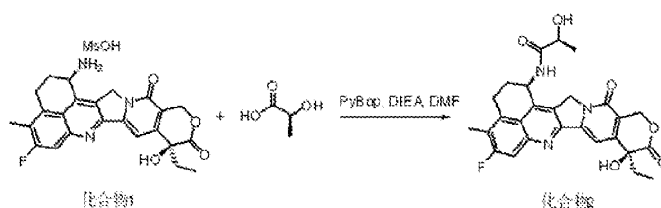
酶不稳定连接子，如肽连接子，能够更好的控制药物释放。肽连接子能够被溶酶体内蛋白酶，如组织蛋白酶 (Cathepsin B) 或纤溶酶 (在一些肿瘤组织中此类酶含量增加)，有效的切断。这种肽连接被认为在血浆循环中非常稳定，这是因为细胞外不合宜的 pH 值及血清蛋白酶抑制剂导致蛋白酶通常不具备活性。鉴于较高的血浆稳定性和良好的细胞内断裂选择性和有效性，酶不稳定连接子被广泛用做抗体药物偶联物的可断裂连接子。典型的酶不稳定性连接子包括 Val-Cit (vc)，Phe-Lys 等。

自杀式连接子一般嵌合在可断裂连接子与活性药物之间，或者本身就是可断裂连接子的一部分。自杀式连接子的作用机制是：当可断裂连接子在合宜的条件下断裂后，自杀式连接子能够自发的进行结构重排，进而释放与之连接的活性药物。常见的自杀式连接子包括对氨基苯醇类 (PAB) 和 β -葡萄糖醛酸苷类 (β -Glucuronide) 等。

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

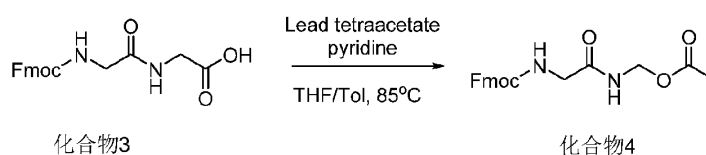
除非另行定义，文中所使用的所有专业和科学用于与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

实施例 1 化合物 2 的合成



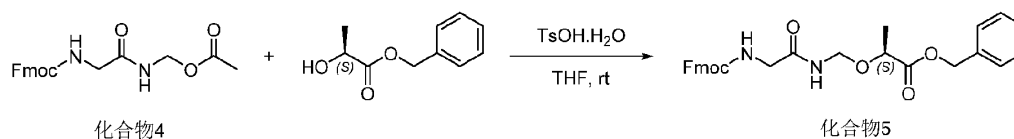
将化合物 1 (依喜替康甲磺酸盐, 外购) (40 mg, 75.3 mmol, 1.0eq) 和 L-乳酸 (10 mg, 113.0 mmol, 1.5eq) 溶于干燥 5 mL DMF, 再加入 PyBop (58.8 mg, 113.0 mmol, 1.5eq) 和 DIEA (15.7 μ L, 113.0 mmol, 1.5eq)。室温搅拌 3 小时后, TLC 检测反应完全, 加水淬灭, 二氯甲烷萃取 (10 mL $\times$ 3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物经柱色谱纯化, 得化合物 2 (30.9 mg, 81.1%)。LC-MS: $[M+H]^+$: 508.2。 ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$): 0.91-0.94 (3H, m), 1.32-1.39 (3H, m), 1.71-1.83 (2H, m), 2.31 (3H, s), 2.78-3.02 (2H, m), 3.16-3.26 (2H, m), 4.27-4.35 (1H, m), 4.81-4.92 (1H, m), 5.15-5.24 (2H, m), 5.49-5.76 (2H, m), 7.52 (1H, d, $J=12.0$ Hz), 7.58 (1H, s), 7.75 (1H, d, $J=12.0$ Hz)。

实施例 2 化合物 4 的合成



于 500mL 单口瓶中加入化合物 3: N-苄氧羰基-甘氨酸-甘氨酸 (10g, 28.2mmol, 1.0eq), 四乙酸铅 (17.5g, 55.3mmol, 1.4eq), 200mL 干燥四氢呋喃和 67mL 甲苯, 搅拌均匀, 氮气保护, 加热至 85°C 反应 2.5h。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 4 (8.7g, 83.7%)。

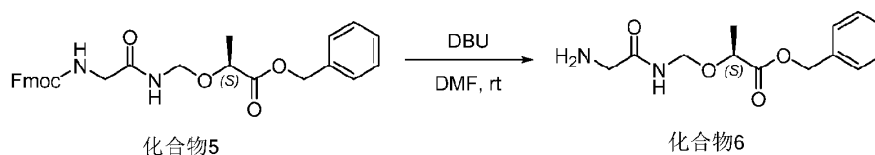
实施例 3 化合物 5 的合成



于 25mL 单口瓶中加入化合物 3 (500mg, 1.4mmol, 1.0eq), 对甲苯磺酸一水合物 (26mg, 0.1mmol, 0.1eq) 及 10mL THF, 搅拌均匀后, 降至 0°C, 再缓慢加入 L-乳酸苄酯 (1.2g, 7.0mmol, 5eq), 加完后升至室温反应。TLC 监控, 反应结束后, 加入饱和 $NaHCO_3$ 溶液, 用乙酸乙酯

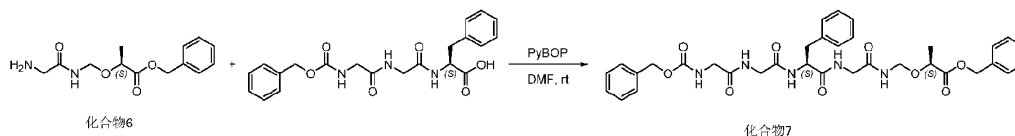
萃取，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经反相柱纯化得化合物 5 (400mg, 60.3%)。¹H NMR(400 Mz, CDCl₃): 1.39 (3H, d, J=6.8 Hz), 3.78 (2H, t, J=4.0 Hz), 4.17-4.27 (2H, m), 4.42 (2H, d, J=4.0 Hz), 4.72-4.85 (2H, m), 5.11-5.58 (2H, m), 5.43 (1H, s), 7.06 (1H, t, J=8.0 Hz), 7.25-7.33 (6H, m), 7.38 (2H, t, J=8.0 Hz), 7.57 (2H, d, J=8.0 Hz), 7.75 (2H, d, J=8.0 Hz)。

实施例 4 化合物 6 的合成



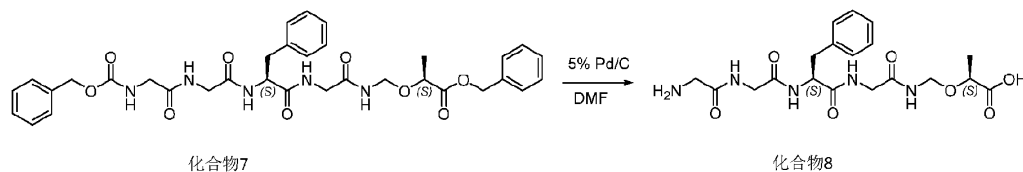
于 25mL 单口瓶中加入化合物 5(400mg, 0.8mmol, 1.0eq)和 10mL DMF, 搅拌均匀后, 降至 0℃, 再缓慢加入 DBU (137mg, 0.9mmol, 1.1eq), 加完后升至室温反应。TLC 监控, 反应结束后, 浓缩, 得化合物 6 粗品 (550mg), 不经纯化, 直接投下一步。

实施例 5 化合物 7 的合成



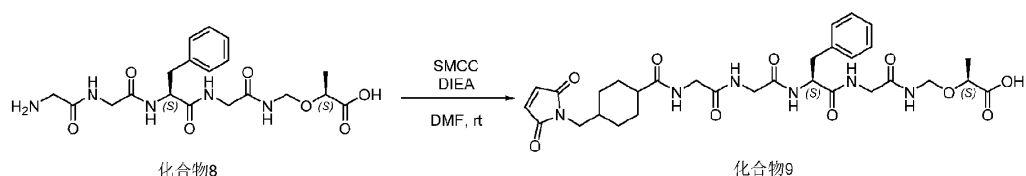
于 25mL 单口瓶中加入 Z-Gly-Gly-Phe-OH (372mg, 0.9mmol, 1.1eq), PyBOP (852mg, 1.6mmol, 2.0eq) 和 3mL DMF, 室温搅拌 5 分钟, 再加入化合物 6 粗品 (550mg), 室温反应, HPLC 监测。反应完毕, 加入水, 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经反相柱柱纯化得化合物 7 (326mg, 59.2%)。

实施例 6 化合物 8 的合成



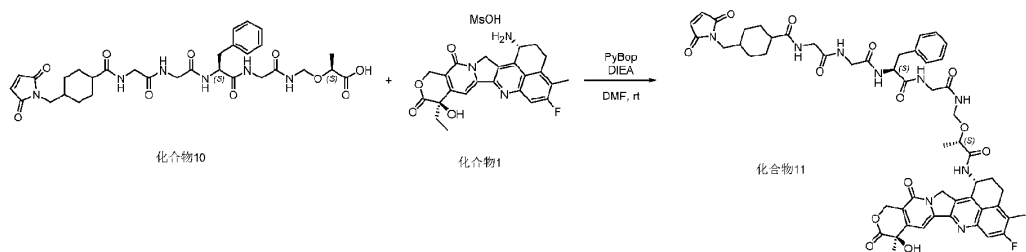
于 25mL 单口瓶中加入化合物 7 (50mg, 1.0eq, 0.08mmol), 5%Pd/C (50mg), 3mLDMF, 室温氢化反应。HPLC 监控, 反应结束后加水过滤, 滤液浓缩得化合物 8 粗品 (52mg), 不经纯化, 直接投下一步。

实施例 7 化合物 9 的合成



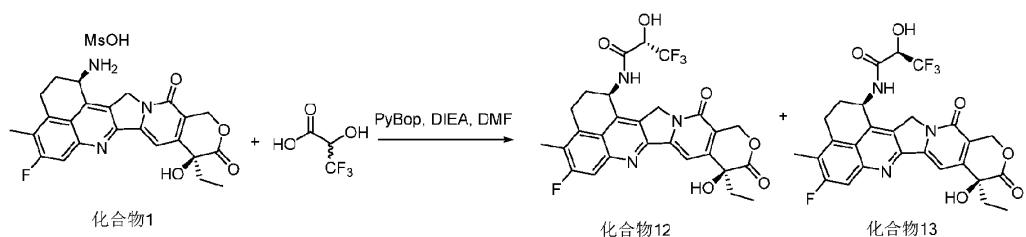
于 25mL 单口瓶中加入化合物 8 (52mg), SMCC (23mg, 0.07mmol, 1.0eq), DIEA (22.2mg, 0.24mmol, 2.5eq) 及 3mLDMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 9 (9.0mg, 18.1%)。MS: [M-H] 655.1。

实施例 8 化合物 11 的合成



于 25mL 单口瓶中加入化合物 9 (9.0mg, 0.014 mmol, 1.0eq), 依喜替康甲磺酸盐 (6.6mg, 0.014mmol, 1.0eq), PyBOP (14.3mg, 0.028mmol, 2.0eq), DIEA (6.2mg, 0.048mmol, 3.5eq) 及 0.5mLDMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 11 (7.0mg, 48.3%)。TOF: [M+Na]⁺ 1096.42。

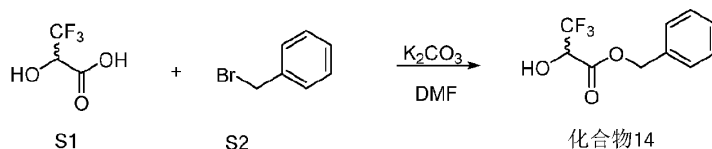
实施例 9 化合物 12、13 的合成



将化合物 1 (依喜替康甲磺酸盐) (40 mg, 75.3 mmol, 1.0eq) 和三氟乳酸 (16.3 mg, 113.0 mmol, 1.5eq) 溶于干燥 5 mL DMF, 再加入 PyBop (58.8 mg, 113.0 mmol, 1.5eq) 和 DIEA (15.7 uL, 113.0 mmol, 1.5eq)。室温搅拌 3 小时后, TLC 检测反应完全, 加水淬灭, 二氯甲烷萃取 (10 mL × 3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物经柱色谱纯化,

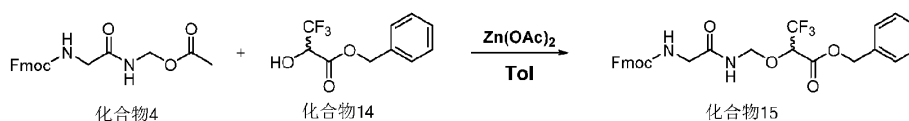
得化合物 12 (13.5 mg, 32%)。LC-MS: [M+H]⁺: 562.2。1H NMR(400 Mz, CDCl₃/CD₃OD):0.91-0.95 (3H, m), 1.78-1.84 (2H, m), 2.34 (3H, s), 3.04-3.14 (2H, m), 3.27-3.32 (2H, m), 4.42-4.47 (1H, m), 5.08-5.20 (3H, m), 5.41-5.58 (2H, m), 7.23-7.25 (1H, m), 7.52-7.55 (1H, m); 化合物 13 (15.5 mg, 36.7%)。LC-MS: [M+H]⁺: 562.2。1H NMR(400 Mz, CDCl₃/CD₃OD):0.90-1.00 (3H, m), 1.74-1.89 (2H, m), 2.34 (3H, s), 3.01-3.09 (2H, m), 3.32-3.38 (2H, m), 4.65-4.71 (1H, m), 4.89-4.96 (1H, m), 5.17-5.30 (2H, m), 5.55-5.65 (2H, m), 7.53-7.61 (2H, m)。

实施例 10 化合物 14 的合成



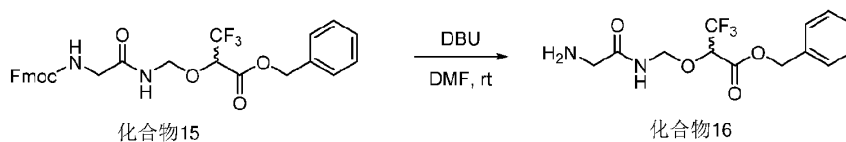
将三氟乙酸 (3.5 g, 24.3 mmol, 1.0eq) 和 K₂CO₃ (5.0 g, 36.5 mmol, 1.5eq) 溶于干燥 35 mL DMF, 冰水浴下滴加溴化苄 (5.0 g, 29.2 mmol, 1.2eq), 氮气保护, 加完后升至室温反应 5 小时, TLC 检测反应完全, 加水淬灭, 二氯甲烷萃取 (100 mL × 3), 合并有机相, 依次用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物经柱色谱纯化, 得化合物 14 (3.14 g, 55%)。1H NMR(400 Mz, DMSO):4.91-4.94 (1H, m), 5.25 (2H, s), 7.17-7.19 (1H, d), 7.39 (5H, s);

实施例 11 化合物 15 的合成



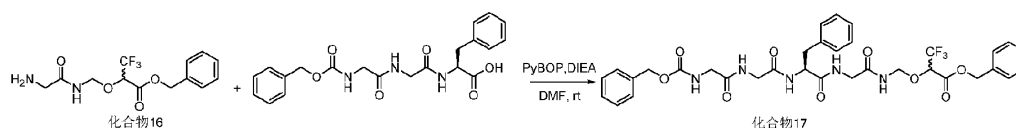
于 50mL 单口瓶中加入化合物 4 (1.45g, 3.9mmol, 1.0eq), 化合物 14 (1.84g, 7.8mmol, 2.0eq), Zn(OAc)₂ (1.44g, 7.86mmol, 2.0eq) 及 25mLTol, 氮气保护, 搅拌均匀后, 升至 100℃ 反应 5.5 h. TLC 监控, 产品点明显, 过滤, 滤液浓缩得黄色油状物 (4.0g), 粗品经柱色谱纯化, 得化合物 15 (0.99 g, 46%)。1H NMR(400 Mz, CDCl₃):3.68-3.83 (2H, m), 4.20-4.23 (1H, m), 4.49 (2H, d, J=8.0 Hz), 4.73-4.78 (1H, m), 4.89-5.00 (2H, m), 5.19(1H, s), 5.25 (2H, s), 7.11 (1H, s,), 7.29-7.35 (7H, m), 7.43 (2H, t, J=8.0 Hz), 7.59 (2H, d, J=8.0 Hz), 7.79 (2H, d, J=8.0 Hz)。

实施例 12 化合物 16 的合成



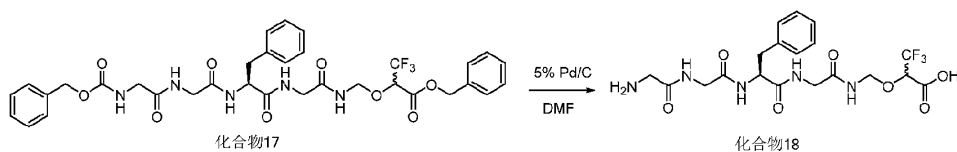
于 25mL 单口瓶中加入化合物 15(990mg, 1.8mmol, 1.0eq)和 10mL DMF, 搅拌均匀后, 降至 0℃, 再缓慢加入 DBU(335mg, 2.2mmol, 1.2eq), 氮气保护, 加完后继续 0℃ 反应 30 min。TLC 监控, 原料反应完, 反应液直接下一步反应。

实施例 13 化合物 17 的合成



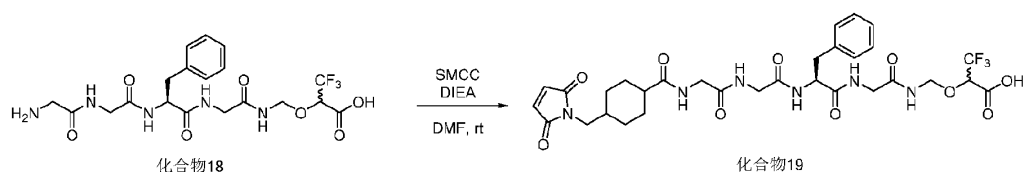
于 50mL 单口瓶中加入 Z-Gly-Gly-Phe-OH (909mg, 2.2mmol, 1.2eq), PyBOP (1.4g, 2.7mmol, 1.5eq) 和 10mL DMF, 冰水浴下滴加 DIEA, 氮气保护, 继续反应 10 min, 将化合物 16 反应液冰水浴下缓慢滴加至此反应液中, 加完后升至室温反应 1.5 h, HPLC 监测, 反应完毕, 制备纯化, 冻干得化合物 17 (0.91 g, 71%)。

实施例 14 化合物 18 的合成



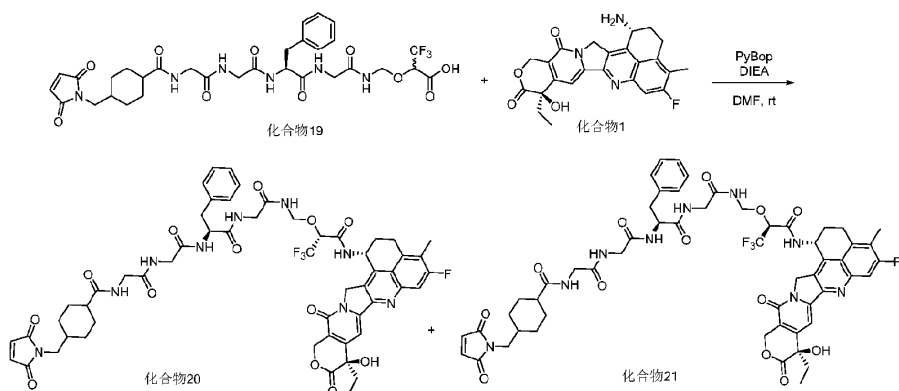
于 25mL 单口瓶中加入化合物 17 (85mg, 1.0eq, 0.12mmol), 5%Pd/C (85mg), 6mLDMF, 室温氢化反应 1h。HPLC 监控, 原料反应完, 反应液过滤, 滤液直接投下一步反应。

实施例 15 化合物 19 的合成



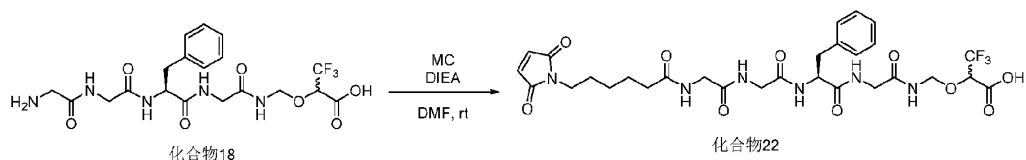
将化合物 18 反应液过滤至 25mL 单口瓶中, 冰水浴下依次加入 SMCC (80mg, 0.24mmol, 2.0eq), DIEA (62mg, 0.48mmol, 4.0eq), 氮气保护, 加完后升至室温反应 1 h, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 19 (66 mg, 78%), MS: [M-H] 709.2。

实施例 16 化合物 20、21 的合成



将化合物 19 (10 mg, 14 μ mol, 1.0eq)、化合物 1 (9 mg, 21 μ mol, 1.5eq) 和 PyBop (14.6 mg, 28 μ mol, 2.0eq) 溶于干燥 DMF (0.5 mL), 冰水浴下加入 DIEA (5 μ L, 28 μ mol, 2.0eq), 氮气保护, 加后升至室温反应 1 h, HPLC 监控, 原料化合物 19 反应完, 反应液直接 HPLC 纯水制备后分别得到化合物 20 (2.77 mg, 17.5%), LC-MS: [M+H]⁺: 1128.0; 化合物 21 (3.92 mg, 24.8%), LC-MS: [M+H]⁺: 1128.0。

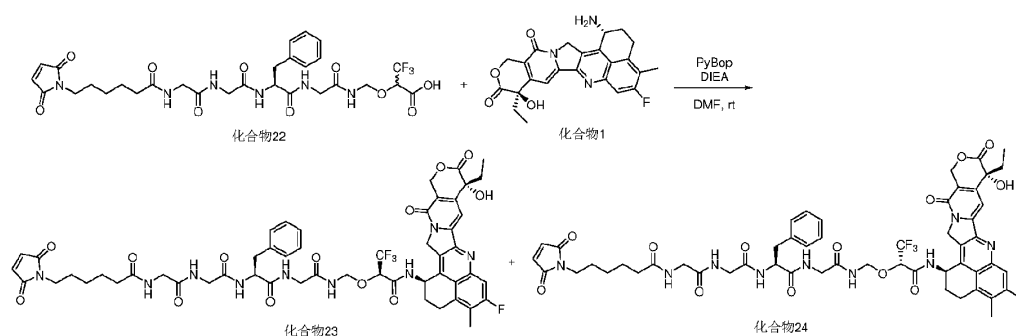
实施例 17 化合物 22 的合成



将化合物 18 反应液 (0.15mmol, 1.0eq) 过滤至 25mL 单口瓶中, 冰水浴下依次加入 MC

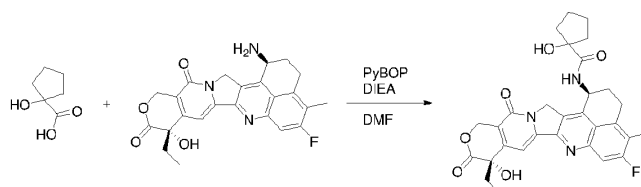
(93mg, 0.3mmol, 2.0eq), DIEA (78mg, 0.6mmol, 4.0eq), 氮气保护, 加完后升至室温反应 1 h, HPLC 监控, 纯水制备纯化, 冻干得化合物 22 (90 mg, 86%), MS: [M-H] 683.2。

实施例 18 化合物 23、24 的合成



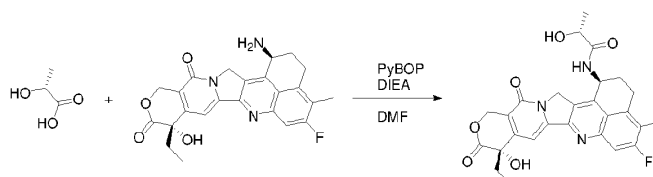
将化合物 22 (15 mg, 21.9 μ mol, 1.0eq)、化合物 1 (14.3 mg, 32.8 μ mol, 1.5eq) 和 PyBop (22.8 mg, 43.8 mmol, 2.0eq) 溶于干燥 DMF (0.8 mL), 冰水浴下加入 DIEA (7.3 μ L, 43.8 μ mol, 2.0eq), 氮气保护, 加后升至室温反应 1 h, HPLC 监控, 原料化合物 22 反应完, 反应液直接 HPLC 纯水制备后分别得到化合物 23 (6.01 mg, 25%), LC-MS: [M+H]⁺: 1102.0; 化合物 24 (5.57 mg, 23.2%), LC-MS: [M+H]⁺: 1102.0。

实施例 18 化合物 25 的合成



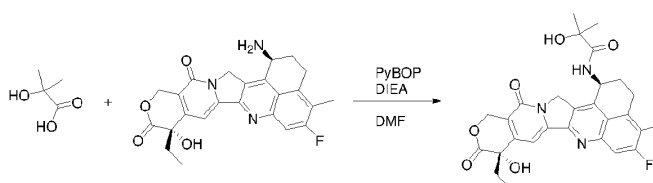
于 5mL 单口瓶中加入扁桃酸 (42mg, 0.09mmol, 1.1eq), 依喜替康 (35mg, 0.08mmol, 1.0eq), PyBOP (84mg, 0.16mmol, 2.0eq), DIEA (36.4mg, 0.28mmol, 3.5eq) 及 1mLDMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 25 (15.0mg, 32.6%)。¹H NMR(CDCl₃, 400Mz) δ 7.70 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.64 (s, 1H), 5.64-5.75 (m, 2H), 5.48-5.38 (m, 1H), 5.29-5.21 (m, 1H), 5.19-5.11 (m, 1H), 3.37-3.11 (m, 2H), 2.55-2.38 (m, 4H), 2.32-2.15 (m, 2H), 2.08-1.99 (m, 1H), 1.94-1.85(m, 4H), 1.33-1.24 (m, 4H), 1.05 (t, 3H, J=7.2Hz); LC-MS: [M+H] 548.4。

实施例 19 化合物 26 的合成



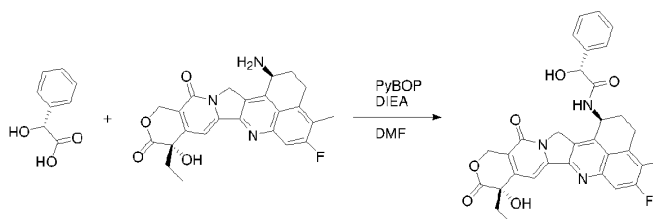
于 5mL 单口瓶中加入 D-乳酸 (11.2mg, 0.08mmol, 1.1eq), 依喜替康 (30.0mg, 0.07mmol, 1.0eq), PyBOP (119.5mg, 0.14mmol, 2.0eq), DIEA (31.2mg, 0.25mmol, 3.5eq) 及 1mLDMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 26 (7.2mg, 20.6%)。¹H NMR(CDCl₃, 400Mz) δ 7.75 (d, 1H, J=10.4Hz), 7.70 (s, 1H), 5.75-5.63 (m, 2H), 5.46-5.38 (m, 1H), 5.30-5.16 (m, 2H), 4.50-4.40 (m, 1H), 3.34-3.13 (m, 2H), 2.50-2.36 (m, 3H), 2.34-2.21 (m, 1H), 2.05-2.02 (s, 1H), 1.96-1.84(m, 2H), 1.35-1.23 (m, 3H), 1.06 (t, 3H, J=4.0Hz); LC-MS: [M+H] 508.3。

实施例 20 化合物 27 的合成



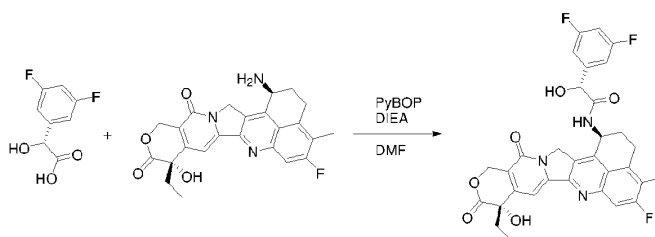
于 5mL 单口瓶中加入 2-甲基乳酸 (10.5mg, 0.10mmol, 1.1eq), 依喜替康 (40mg, 0.09mmol, 1.0eq), PyBOP (95.6mg, 0.18mmol, 2.0eq), DIEA (41.4mg, 0.32mmol, 3.5eq) 及 1mLDMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 27 (10.0mg, 20.8%)。¹H NMR(CDCl₃, 400Mz) δ 7.68 (d, 1H, J=24Hz), 7.63 (s, 1H), 5.77-5.59 (m, 2H), 5.48-5.39 (m, 1H), 5.30-5.22 (m, 1H), 5.19-5.11 (m, 1H), 3.33-3.10 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.71-1.63 (m, 2H), 1.58-1.52 (m, 2H), 1.40-1.20(m, 6H), 1.05 (t, 3H, J=7.2Hz); LC-MS: [M+H] 522.2。

实施例 4 化合物 28 的合成



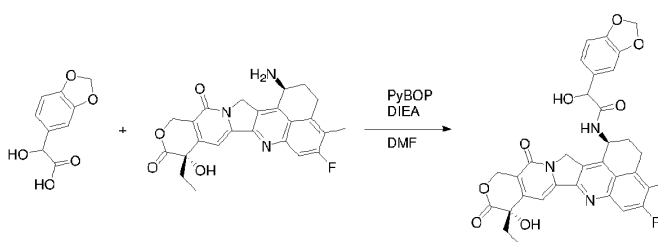
于 5mL 单口瓶中加入 R)-(-)-扁桃酸 (15.2mg, 0.10mmol, 1.1eq), 依喜替康 (40mg, 0.09mmol, 1.0eq), PyBOP (95.6mg, 0.18mmol, 2.0eq), DIEA (41.4mg, 0.32mmol, 3.5eq) 及 1mLDMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 28 (12.2mg, 23.3%)。¹H NMR(CDCl₃, 400Mz) δ 7.76 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.69 (s, 1H), 7.53-7.35 (m, 5H), 5.77-5.70 (m, 1H), 5.65-5.55 (m, 1H), 5.34-5.20 (m, 4H), 3.32-3.31 (m, 2H), 2.47-2.40 (m, 3H), 2.30-2.27 (m, 1H), 2.05-2.02 (s, 1H), 1.93-1.89(m, 3H), 1.07 (t, 3H, J=8.0Hz); LC-MS: [M+H] 570.2。

实施例 21 化合物 29 的合成



于 5mL 单口瓶中加入 3,5-二氟扁桃酸 (23.7mg, 0.13mmol, 1.1eq), 依喜替康 (50mg, 0.11mmol, 1.0eq), PyBOP (119.5mg, 0.23mmol, 2.0eq), DIEA (37.1mg, 0.29mmol, 2.5eq) 及 1mLDMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 29 (13.5mg, 19.4%)。¹H NMR(DMSO, 400Mz) δ 8.76 (d, 1H, J=8.4Hz), 7.81 (d, 1H, J=10.8Hz), 7.31 (s, 1H), 7.27-7.07 (m, 4H), 5.54-5.47 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.20-5.03 (m, 4H), 3.20-3.09 (m, 2H), 2.43-2.38 (m, 3H), 2.17-2.09 (m, 1H), 1.96-1.79 (m, 3H), 0.88 (t, 3H, J=7.2Hz); LC-MS: [M+H] 606.2。

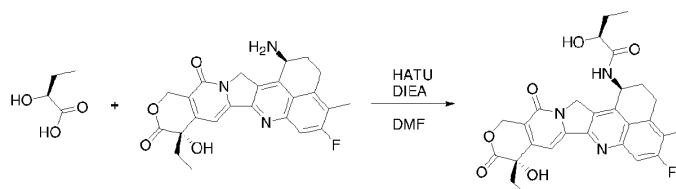
实施例 22 化合物 30 的合成



于 5mL 单口瓶中加入 3,5-二氟扁桃酸 (22.5mg, 0.13mmol, 1.1eq), 依喜替康 (50mg, 0.11mmol, 1.0eq), PyBOP (119.5mg, 0.23mmol, 2.0eq), DIEA (37.1mg, 0.29mmol, 2.5eq) 及 1mLDMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 30 (8.2mg, 11.7%)。¹H NMR(DMSO, 400Mz) δ 8.60 (d, 1H, J=8.4Hz), 7.79 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.31 (s, 1H), 7.02-6.90 (m, 2H), 6.90-6.72 (m, 1H), 6.05-5.93 (m, 2H), 5.52-5.40 (m, 2H), 5.19-5.

09 (m, 1H), 5.09-4.92 (m, 2H), 2.98-2.85 (m, 2H), 2.22-2.14 (m, 3H), 1.94-1.83 (m, 1H), 1.75-1.59 (m, 1H), 1.53-1.45 (m, 2H), 0.66 (t, 3H, J=7.2Hz); LC-MS: [M+H]⁺ 614.2。

实施例 23 化合物 31 的合成



于 5mL 单口瓶中加入 S-2-羟基丁酸 (16.3mg, 0.16mmol, 1.1eq), 依喜替康 (68.0mg, 0.16mmol, 1.0eq), HATU (59.4mg, 0.16mmol, 1.0eq), DIEA (50.5mg, 0.39mmol, 2.5eq) 及 1mL DMF, 室温反应, HPLC 监控, 制备纯化, 冻干得化合物 31 (16.3mg, 20.1%)。¹H NMR(DMSO, 400MHz) δ 8.36 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.79 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.60-5.52 (m, 1H), 5.46-5.40 (m, 3H), 5.24-5.17 (m, 2H), 3.23-3.09 (m, 2H), 2.45-2.38 (m, 3H), 2.28-2.08 (m, 2H), 1.94-1.80 (m, 2H), 1.79-1.66 (m, 1H), 1.66-1.55 (m, 1H), 1.05-0.84 (m, 6H); LC-MS: [M+H]⁺ 522.3。

实施例 24 喜树碱药物细胞活性测试

通过下列实验过程测定喜树碱药物细胞毒性活性: 将喜树碱药物分别加入到 A431、Fadu、Bxpc-3 (EGFR 阳性表达细胞) 和 U87-MG、SW620 (阴性对照细胞) 表达的人的肿瘤细胞培养基中, 细胞培养 72 小时后测定细胞存活率。基于细胞的体外实验用于测定细胞存活率、细胞毒性和本发明喜树碱药物诱导的细胞程序性死亡。

通过细胞增殖试验测定喜树碱药物的体外药效。CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 为商购的 (Promega Corp., Madison, WI)。CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (a) 是一种用比色法来检测细胞增殖和细胞毒性实验中的活细胞数量的检测试剂。此试剂含有一个新型的四唑化合物 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] 和一种电子偶联剂 (phenazine ethosulfate; PES)。PES 具有增强的化学稳定性, 这使它可与 MTS 混合形成稳定的溶液。这种方便的“单溶液”模式, 是在第一代 CellTiter 96®Aqueous Assay 的基础上的改进, CellTiter 96®Aqueous Assay 中使用的电子偶联剂 PMS 与 MTS 溶液是分开提供的。MTS (Owen's reagent) 被细胞生物还原成为一种有色的甲臌产物, 可直接溶解于培养基中 (图 1)。这

种转化很可能是在代谢活跃的细胞中的脱氢酶产生的 NADPH 或 NADH 的作用下完成的。检测时，只需将少量的 CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent 直接加入培养板孔的培养基中，孵育 1 - 4 小时，然后以酶标仪读取 490nm 的吸光度值。

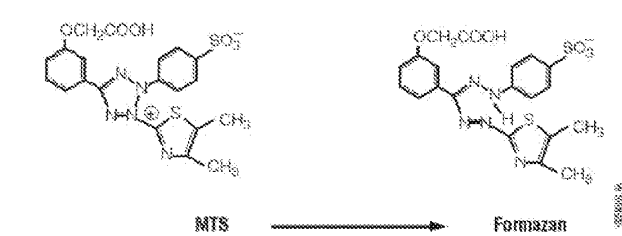


图1. MTS四唑盐及其甲臍产物的结构。

在 490nm 处检测到的甲臍产物的量与培养中的活细胞数成正比。由于 MTS 的甲臍产物在组织培养基中可溶，CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay 与 MTT 或 INT 法相比操作步骤更少。

本发明中采用 A431、Fadu、Bxpc-3 (EGFR 阳性表达细胞) 和 U87-MG、SW620 (阴性对照细胞) 作为体外药效检测的研究体系。在 96 孔板中，使用适当的细胞密度进行铺板，24 小时后，进行喜树碱药物加药。24 小时后用检测培养基稀释喜树碱药物 (1uM 起始，5 倍稀释，9 个浓度，第十列添加检测培养基用来作为空白对照)，将稀释好的喜树碱药物加入对应的细胞孔中然后用微孔板震荡器 (型号：MX100-4A) 震荡 3min，震速 550rpm/min，震荡完放入二氧化碳培养箱孵育 3 天。3 天后每孔加入 20ul MTS (Promega, G3581) 反应 2 小时，酶标仪 (Molecular Device, 型号：SpectraMAX190) 490nm 读数。通过检测线粒体内的脱氢酶的活性，评价喜树碱药物对细胞的增殖抑制作用。

化合物编号	细胞活性 (nm)				
	Fadu	BXPC-3	A431	U87-MG	SW620
SN38	42.14	119.85	13.62	15.65	3.28
2	11.09	38.82	40.93	7.4	10.43
12	0.002	1.6	15.47	0.06	0.06
13	0.06	40.02	6.37	0.32-1.6	1.06
25	41.03	15.79	11.67	10.41	1.50
28	14.25	80.98	5.12	18.34	11.90
29	41.29	90.10	19.55	23.61	2.15
30	19.23	34.21	19.88	29.90	2.25

31	17.52	55.41	14.78	10.80	17.53
----	-------	-------	-------	-------	-------

SN38 为经典的高活性喜树碱药物，并已经在 IMMU-132 ADC 中获得临床证明。发明人通过细胞活性实验，证明本发明所述的喜树碱衍生物在代表性的肿瘤细胞 Fadu、BXPc-3、A431、U87-MG、SW620 中均表现出了与 SN38 相当或更高的细胞活性。

实施例 25 偶联制备 ADC 通法

将通过初步的纯化后单体率大于 95% 的抗体分子 C，使用超滤离心管换液至磷酸盐缓冲液中，浓度 10mg/ml。加入 20 倍于抗体摩尔分子数的 TCEP，室温下反应 4h 以打开抗体链间二硫键。加入 20 倍于抗体摩尔分子数的 payload，室温下反应 2h。反应结束后，使用截留分子量为 30KDa 的超滤离心管换液至 PBS 中，并去除未偶联的 payload。换液后的 ADC 样品使用 0.22 微米除菌过滤器过滤后备用。将偶联用化合物 11、20、21、23、24 采用本实施例 25 所述偶联通法，与抗体分子 C 偶联。

化合物编号	偶联所得 ADC 编号
11	C-11
20	C-20
21	C-21
23	C-23
24	C-24

实施例 26 ADC 抗肿瘤细胞活性测试

与喜树碱药物细胞活性测试方法相似，本发明中采用 A431、Fadu、Bxpc-3（抗原阳性表达细胞）、SW620（抗原阴性对照细胞）作为体外药效检测的研究体系。在 96 孔板中，使用适当的细胞密度进行铺板，24 小时后，进行 ADC 药物加药。24 小时后用检测培养基稀释 ADC 药物（1uM 起始，5 倍稀释，9 个浓度，第十列添加检测培养基用来作为空白对照），将稀释好的 ADC 药物加入对应的细胞孔中然后用微孔板震荡器（型号：MX100-4A）震荡 3min，震速 550rpm/min，震荡完放入二氧化碳培养箱孵育 3 天。3 天后每孔加入 20ul MTS(Promega, G3581) 反应 2 小时，酶标仪（Molecular Device，型号：SpectraMAX190）490nm 读数。通过检测线粒体内的脱氢酶的活性，评价 ADC 药物对细胞的增殖抑制作用。

化合物编号	细胞活性 (nm)			
	Fadu	BXPc-3	A431	SW620
C-11	12.44	242.09	27.86	221.24

C-20	3.98	186.98	30.74	85.16
C-21	2.49	86.97	8.15	48.17
C-23	4.74	25.18	11.16	154.40
C-24	4.09	15.79	11.67	1.50

经过以上 ADC 细胞活性测试，本发明所述的喜树碱药物在通过连接单元 L 与抗体偶联后，在多个抗原阳性肿瘤细胞系中均表现出良好的抗肿瘤活性，具有极大的临床应用价值。

实施例 27 ADC 体内药效测试

本发明中建立了 A431 荷瘤小鼠模型，以评价毒素 ADC 偶联药物的体内药效。即以 3×10^6 A431 细胞通过皮下注射到 4~6 周鼠龄的 BALB/c 裸鼠右侧，待小鼠肿瘤平均大小生长至 $140 \sim 150 \text{ mm}^3$ ，随机分组，每组 5 只，在第 0, 7, 14, 21 天分别给与空白对照（缓冲溶液空白）、抗体药物偶联物 C-11，均以 10 mg/kg 剂量进行静脉给药。肿瘤体积测量数据显示为测量时肿瘤平均体积 $\pm \text{SE}$ ，同时记录小鼠体重变化情况，用以观察 ADC 药物的体内初步毒性。

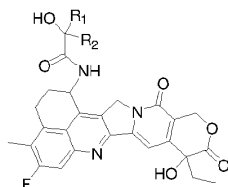
类别	小鼠体重						
	D0	D3	D7	D10	D13	D16	D20
空白对照	16.4 $\pm$ 0.31	17.4 $\pm$ 0.32	18.3 $\pm$ 0.47	18.5 $\pm$ 0.42	18.9 $\pm$ 0.45	18.9 $\pm$ 0.35	19.5 $\pm$ 0.33
C-11	17.6 $\pm$ 0.16	18.2 $\pm$ 0.14	18.8 $\pm$ 0.31	19.2 $\pm$ 0.29	19.6 $\pm$ 0.30	19.9 $\pm$ 0.28	20.1 $\pm$ 0.39

类别	肿瘤平均体积 (mm ³)						
	D0	D3	D7	D10	D13	D16	D20
空白对照	152.0 $\pm$ 16.22	296.0 $\pm$ 38.14	621.6 $\pm$ 87.52	823.6 $\pm$ 71.51	1,028.0 $\pm$ 94.51	1,227.5 $\pm$ 98.30	1,526.5 $\pm$ 97.14
C-11	147.4 $\pm$ 8.04	168.8 $\pm$ 6.76	256.5 $\pm$ 26.69	316.8 $\pm$ 35.44	352.8 $\pm$ 39.31	333.0 $\pm$ 79.16	347.2 $\pm$ 107.67

经过以上 ADC 小鼠体内药效实验，证明本发明所述的喜树碱药物在通过连接单元 L 与抗体偶联后，在荷瘤小鼠中表现出了明确的抗肿瘤活性，平均瘤体明显低于空白对照。小鼠体重在给药期间无明显变化，组内无小鼠死亡，本发明所述的喜树碱药物具有良好的安全性。

权 利 要 求 书

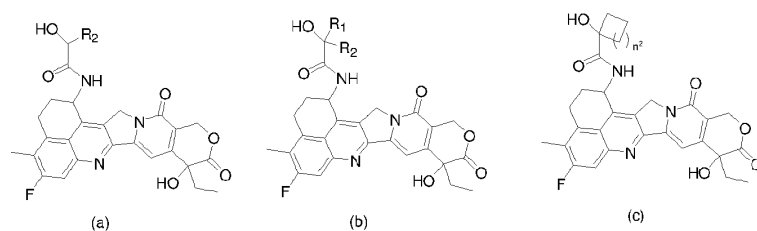
1、一种如式 I 所示的喜树碱类化合物或其药学上可接受的盐：



式 I

其中 R_1 及 R_2 分别独立的选自 C_1 - C_3 烷基或取代烷基、-H、- CF_3 、芳基、取代的芳基或杂芳基；或 R_1 、 R_2 连同其所连接碳原子构成环丁烷、环戊烷或环己烷； R_1 、 R_2 不同时为氢。

2、如权利要求 1 所述的喜树碱类化合物或其药学上可接受的盐，其特征在于： R_1 为氢， R_2 为 C_1 - C_3 烷基、- CF_3 、芳基、取代的芳基或杂芳基；或 R_1 及 R_2 为 C_1 - C_3 烷基、- CF_3 、芳基、杂芳基或取代的芳基；或 R_1 、 R_2 连同其所连接碳原子构成环丁烷、环戊烷或环己烷：

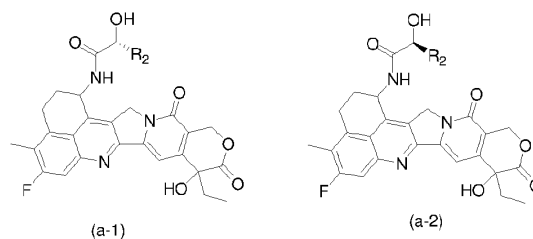


在结构式 (a) 中， R_2 独立地为 $-(CH_2)^{n^1}-CH_3$ 、- CF_3 、芳基、杂芳基、取代的芳基，其中 $n^1=0$ 、1 或 2；

在结构式 (b) 中， R_1 及 R_2 独立地为 $-(CH_2)^{n^1}-CH_3$ 、- CF_3 、芳基、杂芳基、取代的芳基，其中 $n^1=0$ 、1 或 2；

在结构式 (c) 中， R_1 、 R_2 连同其所连接碳原子构成环丁烷、环戊烷、环己烷， $n^2=1$ 、2 或 3。

3、如权利要求 2 所述的喜树碱类化合物或其药学上可接受的盐，其特征在于： R_1 为氢， R_2 独立地为 $-(CH_2)^{n^1}-CH_3$ 、- CF_3 、芳基、杂芳基或取代的芳基，其中 $n^1=0$ 、1 或 2：



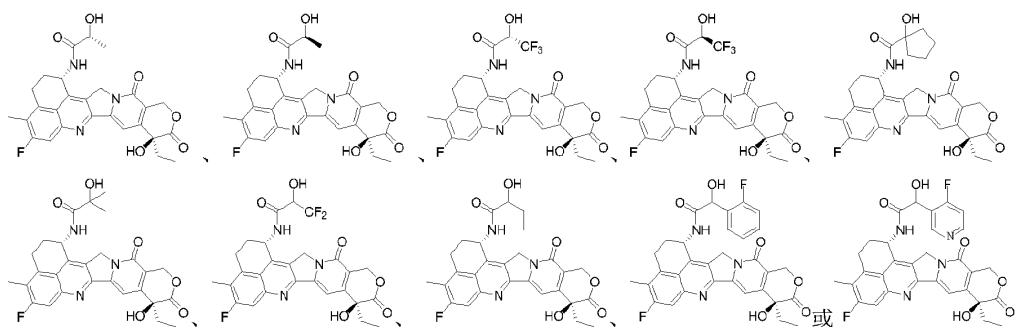
R_2 所连接碳有 R、S 两种构型，

在结构式 (a-1) 中, R_2 所连接碳为 R 构型,

在结构式 (a-2) 中, R_2 所连接碳为 S 构型。

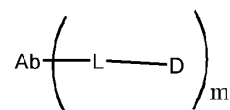
4、如权利要求 1-3 任一所述的喜树碱类化合物或其药学上可接受的盐, 其特征在于: 芳基取代基选自卤素、烃基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、羧基或氰基。

5、如权利要求 1 所述的喜树碱类化合物或其药学上可接受的盐, 其特征在于:, 选自以下结构:



6、包括权利要求 1~5 任一所述的喜树碱类化合物或其药学上可接受的盐的抗肿瘤药, 其特征在于: 用于肺癌、肾癌、尿道癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、多形性胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、肺癌或食道癌等实体瘤或血液肿瘤。

7、一种如式 II 所示的抗体药物偶联物, 该偶联物到达靶细胞后通过释放药物 D 发挥药效:



式 II

其中 Ab 是抗体, 抗体片段或蛋白;

L 是任意的连接单元, 一端与 Ab 连接, 一端与药物 D 连接;

D 选自权利要求 1~6 任一所述的喜树碱类化合物或其药学上可接受的盐, 其通过分子中的羟基与 L 相连;

m 选自 1-20 整数;

8、如权利要求 7 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于: 连接单元 L 结构中包含选自化学键-O-, -N(R)_{n1}-, -CH₂-, -CH(R)_{n1}-, 酰胺, 酯键, -S-, -(PEG)_{n2}-, 组成的组; n₁ 选自 1-3 整数, n₂ 选自 1-20 整数。

9、如权利要求 7 或 8 中所述的抗体药物偶联物, 其特征在于: 所述的药物-抗体偶联物的抗体特异性结合至癌症、自身免疫疾病的靶细胞。

10、包括权利要求 7~9 中任一所述的抗体偶联药物的药物，其特征在于：用于肺癌、肾癌、尿道癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、多形性胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌等实体瘤或血液肿瘤。