

一类抗体药物偶联物、其药物组合物及应用

本申请是以 CN 申请号为 202311871776.6，申请日为 2023 年 12 月 29 日的申请，CN 申请号为 202411292297.3，申请日为 2024 年 9 月 14 日的申请为基础，并主张它们的优先权，这些 CN 申请的公开内容在此作为整体引入本申请中。

5 技术领域

本申请属于医药领域，具体涉及一类抗体药物偶联物、其药物组合物及应用。

背景技术

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

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

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

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

B7H3 也称为 CD276，是一种免疫检查点分子和共刺激/共抑制免疫调节蛋白，在免疫系统中发挥双重作用。B7H3 是 B7 家族的 I 型跨膜蛋白，有两种亚型：2Ig-B7H3 和 4Ig-B7H3，人类以膜结合形式的 4Ig-B7H3 为主。B7H3 在多种实体瘤中异常过表达，包

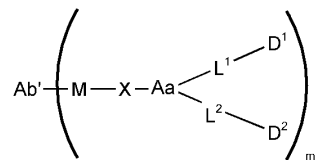
括头颈癌、肾癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、黑色素瘤等，在正常组织中以较低的水平表达，仅在胰腺、肝脏、结肠、皮肤等组织检测到低-中度表达。**B7H3** 参与多种癌症发展的生物学过程，包括促进肿瘤增殖/迁移、上皮间质转化、肿瘤血管生成、治疗耐药等，导致患者预后不佳，因此 **B7H3** 已成为抗癌治疗的一个有前途的治疗靶点。

5 发明内容

本申请涉及一种用于治疗与 **B7H3** 表达相关的癌症（例如，**B7H3** 阳性癌症）的抗体药物偶联物，所述偶联物是将细胞毒性药物和 **TLR** 激动剂与抗体偶联得到的一种双功能载荷免疫刺激抗体药物偶联物，其可同时进入肿瘤细胞及肿瘤微环境免疫细胞，发挥细胞毒药物的肿瘤杀伤和 **TLR** 激动剂的局部免疫活化双重功效，相较于单独偶联细胞毒性

10 药物的抗体药物偶联物，具有提高的癌症治疗效果。

一方面，本发明提供一种如式(I)所示的抗体药物偶联物：



I

其中，

15 **Ab'**为与 **B7H3** 特异性结合的抗体或其抗原结合片段；

M 为和所述抗体或其抗原结合片段连接的接头部位；

X 为连接 **M** 和 **Aa** 的连接子；

Aa 选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段；

L¹ 为连接 **Aa** 和 **D¹** 的连接子；

20 **L²** 为连接 **Aa** 和 **D²** 的连接子；

D¹ 为细胞毒性药物部分；

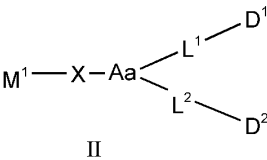
D² 为 **TLR** 激动剂部分；

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

在另一个方面, 本发明提供一种抗体药物偶联物的组合物, 其包括上述的抗体药物偶联物, 其中组合物的 DAR 值为 1.0-10.0, 优选为 1.0~5.0, 例如, 1.0~1.5, 1.0~2.0, 1.0~2.5, 1.0~3.0, 1.0~3.5, 1.0~4.0, 1.0~4.5, 1.0~5.0, 2.0~2.5, 2.0~3.0, 2.0~3.5, 2.0~4.0, 2.0~4.5, 2.0~5.0, 2.5~3.0, 2.5~3.5, 2.5~4.0, 2.5~4.5, 2.5~5.0, 3.0~3.5, 3.0~4.0, 3.0~4.5, 3.0~5.0, 3.5~4.0, 3.5~4.5, 3.5~5.0, 4.0~4.5, 4.0~5.0, 4.5~5.0。

在另一个方面, 本发明提供一种如式(II)所示的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药:

10



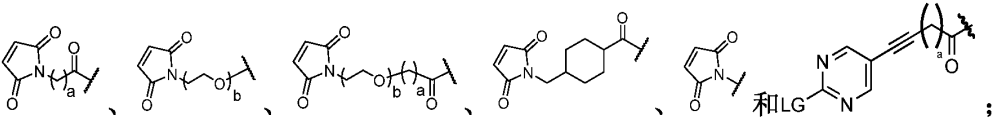
其中,

X、Aa、L¹、L²、D¹和 D²如前文任一项所定义,

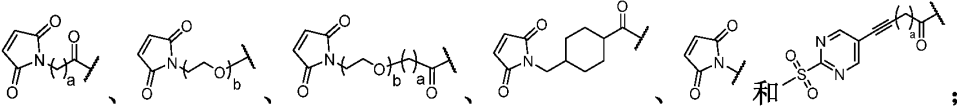
M¹ 为和抗体或其抗原结合片段连接的接头部位的前体;

优选地, M¹ 选自以下结构:

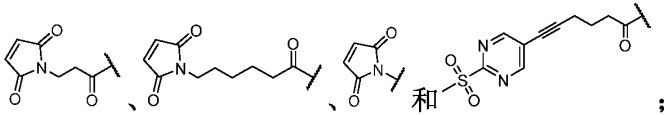
15



更优选地, M¹ 选自以下结构:



更优选地, M¹ 选自以下结构:



其中, 各 a 独立地选自 0-6 的整数, b 选自 1-10 的整数;

LG 代表离去基团，优选地，LG 各自独立地选自卤素（例如 F、Cl、Br、I）、卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺基、卤代苯氧基、羟基、巯基、氨基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段，所述的卤代 C₁₋₆ 烷基、

5 C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺基、卤代苯氧基、烯基、炔基及含炔基的结构片段任选地被一个或多个合适的取代基所取代；

优选地，LG 各自独立地选自卤素（例如 F、Cl、Br、I）、卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺基、卤代苯氧基、羟基、巯基、氨基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段；

10

更优选地，LG 为 C₁₋₆ 烷基磺酰基，例如为甲磺酰基。

在另一个方面，本发明提供一种特异性结合 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO: 23 或 1 所示的重链可变区（VH）或其变体，和/或，SEQ ID NO: 2 所示的轻链可变区（VL）或其变体。

15

在另一个方面，本发明提供一种药物组合物，其含有前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、抗体药物偶联物的组合物、抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药用辅料。

在另一个方面，本发明提供前文任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、抗体或其抗原结合片段在制备抗体药物偶联物中的用途，特别是制备前文任一项所述的抗体药物偶联物。

20

在另一个方面，本发明提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、抗体药物偶联物的组合物、抗体或其抗原结合片段或药物组合物在制备药物中的用途，特别是制备治疗和/或预防癌症（例如与 B7H3 表达相关

25

的癌症，例如 B7H3 阳性癌症）的药物中的用途。

在另一个方面，本发明提供一种治疗和/或预防癌症（例如与 B7H3 表达相关的癌症，例如 B7H3 阳性癌症）的方法，包括向有此需要的受试者施用治疗和/或预防有效量的前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR 激动剂或细胞毒性药
5 物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、抗体药物偶联物的组合物、抗体或其抗原结合片段、或药物组合物。

在另一方面，本发明还提供用于制备前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、
10 同位素标记的化合物、代谢物或前药的中间体。

具体实施方式

术语定义

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

术语“抗体”是指，通常由两对多肽链（每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC)）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ (lambda) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒
20 定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区

还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区 (VH 和 VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循本领域已知
5 的各种编号系统。

术语“抗体”还包括重链恒定区包含 C-末端赖氨酸、或缺少 C-末端赖氨酸或 C-末端甘氨酸-赖氨酸二肽的实施方案。该术语还包括抗体可变区的 N-末端氨基酸已经环化成焦谷氨酸盐的实施方案。因此,在包含本文公开的抗体的组合物中,其中的各种抗体可以独立地包含 C-末端赖氨酸、缺少 C-末端赖氨酸、缺少 C-末端甘氨酸-赖氨酸和/或包含
10 N-末端谷氨酰胺或谷氨酸或 N-末端氨基酸环化为焦谷氨酸。

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

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

下述通用规则(公开于 www.bioinf.org.uk: Andrew C.R. Martin 教授研究小组)可用于定义抗体序列中的 CDR,其中包括与抗体结合的抗原表位组成的氨基酸发生特异性相互作用的氨基酸。在极少数情况下,该等一般恒定特征不会出现;但 Cys 残基是最保

守的特征。

环	Kabat	AbM	Chothia ¹	Chothia ²	IMGT
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36	L27--L32
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55	L50--L52
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96	L89--L97
H1	H31--H35B (Kabat 编号系统) ³	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B	H26--H35B
H1	H31--H35 (Chothia 编号系统)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	H26--H33
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58	H51--H56
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101	H93--H102
¹ 其中一些编号系统（尤其是 Chothia 编号系统）因所审查的公开出版物不同而存在差异。 ² 除 Contact 编号系统使用 Chothia 或 Martin（扩展版 Chothia）定义外，其他任何编号系统均可用于所述 CDR 定义。 ³ 在使用 Kabat 编号系统进行编号时，Chothia CDR-H1 环的末端在 H32 和 H34 之间变动，具体取决于环长。（原因在于 Kabat 编号系统将插入点置于 H35A 和 H35B 处）。 如果 H35A 和 H35B 均不存在，则环的末端位于 H32 处； 如果仅存在 H35A，则环的末端位于 H33 处； 如果 H35A 和 H35B 均存在，则环的末端位于 H34 处。					

V_H 的全部氨基酸序列通常根据 Kabat 进行编号，而可变区内的三个 CDR 可根据上述任何一种编号系统进行定义。在某些实施方案中，V_H 中的氨基酸位点可从氨基酸位点 1 开始依次顺序编号，直至序列末端，也可根据 Kabat 进行编号。除非另有说明，本文

5 所述 V_H 和 V_L 中的氨基酸位点根据顺序编号定义。

重链恒定区中氨基酸位点的编号可从氨基酸位点 1 开始依次顺序编号，直至序列末端，也可根据 **Eu** 进行编号。**IgG1** 重链恒定区的氨基酸序列有 330 个氨基酸，编号依次为 1 至 330。根据 **Eu** 编号的相应序列从位点 118 开始，至位点 447 结束。除非另有说明，本文所述重链和轻链的氨基酸位点根据顺序编号定义。

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

- 术语抗体的“抗原结合片段”是指抗体的片段的多肽，例如全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，**Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989))**，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 **DNA** 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括 **Fab** 片段、**Fab'** 片段、**F(ab)₂'** 片段、**F(ab)₃'** 片段、**Fd**、**Fv**、**scFv**、**di-scFv**、**(scFv)₂**、二硫键稳定的 **Fv** 蛋白(“**dsFv**”)、单结构域抗体(**sdAb**，纳米抗体)和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。
- 10 工程改造的抗体变体综述于 **Holliger 等, 2005; Nat Biotechnol, 23: 1126-1136** 中。

- 术语“**Fd**”意指由 **VH** 和 **CH1** 结构域组成的抗体片段；术语“**dAb** 片段”意指由 **VH** 结构域组成的抗体片段 (**Ward 等人, Nature 341:544 546 (1989)**)；术语“**Fab** 片段”意指由 **VL**、**VH**、**CL** 和 **CH1** 结构域组成的抗体片段；术语“**F(ab')₂** 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 **Fab** 片段的抗体片段；术语“**Fab'** 片段”意指还原连接 **F(ab')₂** 片段中两个重链片段的二硫键后所获片段，由一条完整的轻链和重链的 **Fd** 片段（由 **VH** 和 **CH1** 结构域组成）组成。
- 20 术语“**Fv**”意指由抗体的单臂的 **VL** 和 **VH** 结构域组成的抗体片段。**Fv** 片段通常被认为是，能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为，六个 **CDRs** 赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是一个可变区（例如 **Fd** 片段，其仅仅含有三个对抗原特异的 **CDRs**）也能够识别并结合抗原，尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

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

术语“scFv”是指，包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链，其中所述 VL 和 VH 通过接头（linker）相连（参见，例如，Bird 等人，*Science* 242:423-426 (1988)；Huston 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)；和 Pluckthun，*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第 113 卷，Roseburg 和 Moore 编，Springer-Verlag，纽约，第 269-315 页(1994)）。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS（SEQ ID NO: 25）氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄（SEQ ID NO: 26）的接头，但也可使用其变体（Holliger 等人(1993)，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448）。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人(1995)，*Protein Eng.* 8:725-731，Choi 等人(2001)，*Eur. J. Immunol.* 31: 94-106，Hu 等人(1996)，*Cancer Res.* 56:3055-3061，Kipriyanov 等人(1999)，*J. Mol. Biol.* 293:41-56 和 Roovers 等人 (2001)，*Cancer Immunol.*描述。在一些情况下，scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键。在某些实施方案中，VH 和 VL 结构域可以以任何合适的排列彼此相对定位。例如，包含 NH₂-VH-VH-COOH、NH₂-VL-VL-COOH 的 scFv。

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

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

如本文中所使用的，术语“变体”，在多肽的情境中(包括多肽)也指包含已通过引入氨基酸残基置换、缺失或添加改变的氨基酸序列的多肽或肽。在某些情况下，术语“变体”还指已被修饰（即，通过将任何类型的分子共价连接至多肽或肽）的多肽或肽。例如，但非限制性地，多肽可以被修饰，例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团进行的衍生化、蛋白水解切割、连接至细胞配体或其它蛋白质等。衍生多肽或肽可使用本领域技术人员已知的技术通过化学修饰来产生，所述技术包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，变体具有与其所源自的多肽或肽相似、相同或改善的功能。在一些实施方案中，本发明的变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%

的序列同一性，或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）；优选地，所述的置换是保守置换。

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

如本文中所使用的，术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、

色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见,例如,Brummell 等人, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi 等人 *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); 和 Burks 等人 *Proc. Natl Acad. Set USA* 94:412-417 (1997), 其通过引用并入本文)。

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

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

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

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

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

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

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

术语“亚烷基”表示直链或支链饱和烃基去掉 2 个氢原子得到的基团,例如“C₁₋₂₀ 亚烷基”、“C₁₋₁₀ 亚烷基”、“C₃₋₁₀ 亚烷基”、“C₅₋₈ 亚烷基”、“C₁₋₆ 亚烷基”、“C₁₋₄ 亚烷基”、“C₁₋₃ 亚烷基”等,具体实例包括但不限于:亚甲基、亚乙基、1,3-亚丙基、1,4-亚丁基、1,5-亚戊基或 1,6-亚己基等。

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

术语“杂环基”是指含至少一个选自 N、O 和 S 的环成员的饱和或部分饱和的环状结构。具体实例包括但不限于 3-12 元杂环基、3-8 元杂环基、5-6 元杂环基等,例如四氢呋喃基、吡咯烷基、哌啶基、四氢吡喃基等。

术语“杂芳基”是指含至少一个选自 N、O 和 S 的环成员的芳香环状结构。具体实例包括但不限于 5-10 元杂芳基、5-6 元杂芳基等,例如呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、咪唑基、吡唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、1,2,3-三嗪基、1,3,5-三嗪基、1,2,4,5-四嗪基等。

术语“芳基”是指芳烃分子的芳核碳原子上去掉一个氢原子得到的基团。例如 C₆₋₁₀ 芳基,具体实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基等。

本文中所用术语“片段”或“结构片段”,是指化合物分子失去一个或多个原子或原子团后剩余的部分。例如“细胞毒性药物片段”是指本文中所述细胞毒性药物失去一个氢原子或羟基等与所述抗体药物偶联物中连接子连接后得到的该细胞毒性药物的剩余部分,也被称为“细胞毒性药物部分”。在一些具体的实施方案中,该细胞毒性药物片段/部分用 D¹ 表示。

同样地,“TLR 激动剂片段”表示本文中所述 TLR 激动剂失去一个或多个原子或原子团与抗体药物偶联物中连接子连接得到的该 TLR 激动剂的剩余部分,也被称为“TLR 激动剂部分”。在一些具体的实施方案中,该 TLR 激动剂片段/部分用 D² 表示。

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

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

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

如本文中所使用的,术语“合适的取代基”是指本领域技术人员可根据化合物取代基的需要对化合物进行的变型。“合适的取代基”包括氧代(=O)、卤素、氰基、NR⁸R⁹、羧基、

巯基、羟基、酯基（例如-C₁₋₆烷基-C(=O)-OC₁₋₆烷基）、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₆烷基-O-C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₃₋₆环烷基、3-10元杂环基、5-10元杂芳基、C₆₋₁₀芳基、苄基、羟基取代的苄基、吡啶基亚甲基和C₁₋₆卤代烷氧基，R⁸、R⁹各自独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、3-10元杂环基、5-10元杂芳基、C₆₋₁₀芳基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆卤代烷氧基、卤素、羟基、羧基和酯基（例如-C₁₋₆烷基-C(=O)-OC₁₋₆烷基）。

无论是否明确指明，本申请的数值均由术语“约”修饰。术语“约”是指在所述数值的±20%范围内，±10%范围内，±5%范围内，或±2%范围内。

本文中提供的范围应理解为该范围内所有数值的简写。例如，“1-10”的范围应理解为包括选自该范围内的任何数字、数字的组合、或子范围等。具体地，“选自1-10的整数”是指选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的整数，“选自0-6的整数”是指选自0、1、2、3、4、5或6的整数。

本发明涵盖本发明的化合物的所有可能的结晶形式或多晶型物，其可为单一多晶型物或多于一种多晶型物的任意比例的混合物。

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

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

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

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

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

本发明在其范围内进一步包括本发明的化合物的前药，其为自身可具有较小药理学活性或无药理学活性的本发明的化合物的某些衍生物，当被给药至身体中或其上时可通过例如水解裂解转化成具有期望活性的本发明的化合物。通常这样的前药会是所述化合物的官能团衍生物，其易于在体内转化成期望的治疗活性化合物。关于前药的使用的其他信息可参见“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”，第 14 卷，ACS Symposium Series (T. Higuchi 及 V. Stella)及“Bioreversible Carriers in Drug Design,” Pergamon Press, 1987 (E. B. Roche 编辑，American Pharmaceutical Association)。本发明的前药可例如通过用本领域技术人员已知作为“前-部分(pro-moiety)(例如“Design of Prodrugs”，H. Bundgaard (Elsevier, 1985)中所述)”的某些部分替代本发明的化合物中存在的适当官能团来制备。

术语“约”是指在所述数值的±10%范围内，优选±5%范围内，更优选±2%范围内。

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

在本文中，本发明抗体药物偶联物中出现的 $\left(\text{NH} \right)$ 表示靶向部分为抗体或抗原结合

片段时，抗体或抗原结合片段中的氨基与药物连接体的具体连接方式。

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

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

在一些实施方案中，本申请的抗体药物偶联物的结构可以如通式 I 表示，其中，m 指每一个抗体分子所连接的小分子药物片段的个数。在抗体药物偶联物制备过程中，各抗体分子可能连接不同数量的小分子药物片段，因此，一般而言，抗体药物偶联物的组合物是具有不同药物抗体偶联比例的抗体药物偶联物的混合物。在实践中，通常用 DAR 表示抗体所连接药物数量的平均值。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的组合物的 DAR 值（偶联样品的药物/抗体比值）为 1-10，例如：1~2，1~3，1~4，1~5，1~6，1~7，1~8，1~9，1~10，2~3，2~4，2~5，2~6，2~7，2~8，2~9，2~10，3~4，3~5，3~6，3~7，3~8，3~9，3~10，4~5，4~6，4~7，4~8，4~9，4~10，5~6，5~7，5~8，5~9，5~10，6~7，6~8，6~9，6~10，7~8，7~9，7~10，8~9，8~10，或 9~10，优选为 3~8，例如，3.0~3.5，3.0~4.0，3.0~4.5，3.0~5.0，3.0~5.5，3.0~6.0，3.5~4.0，3.5~4.5，3.5~5.0，3.5~5.5，3.5~6.0，3.5~6.5，3.5~7.0，3.5~7.5，3.5~8.0，4.0~4.5，4.0~5.0，4.0~5.5，4.0~6.0，4.0~6.5，4.0~7.0，4.0~7.5，4.0~8.0，4.5~5.0，4.5~5.5，4.5~6.0，4.5~6.5，4.5~7.0，4.5~7.5，4.5~8.0，5.0~5.5，5.0~6.0，5.0~6.5，5.0~7.0，5.0~7.5，5.0~8.0，5.5~6.0，5.5~6.5，5.5~7.0，5.5~7.5，5.5~8.0，6.0~6.5，6.0~7.0，6.0~7.5，6.0~8.0，6.5~7.0，6.5~7.5，6.5~8.0，7.0~7.5，7.0~8.0 或 7.5~8.0，或优选为 1.0~5.0，例如，1.0~1.5，1.0~2.0，1.0~2.5，1.0~3.0，1.0~3.5，1.0~4.0，1.0~4.5，1.0~5.0，2.0~2.5，2.0~3.0，2.0~3.5，2.0~4.0，2.0~4.5，2.0~5.0，2.5~3.0，2.5~3.5，2.5~4.0，2.5~4.5，2.5~5.0，3.0~3.5，3.0~4.0，3.0~4.5，3.0~5.0，3.5~4.0，3.5~4.5，3.5~5.0，4.0~4.5，4.0~5.0，

4.5~5.0。

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

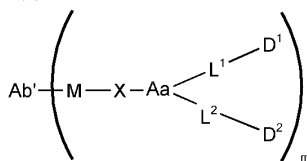
- 5 在本发明中，“预防”是指抑制和延迟疾病的发作，不仅包括在发展疾病之前的预防，还包括在治疗后预防疾病的复发。

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

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

抗体药物偶联物

本发明的一方面提供一种如式(I)所示的抗体药物偶联物：



20

I

其中，

Ab'为与 **B7H3** 特异性结合的抗体或其抗原结合片段；

M 为和所述抗体或其抗原结合片段连接的接头部位；

X 为连接 **M** 和 **Aa** 的连接子；

Aa 选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段；

L¹ 为连接 Aa 和 D¹ 的连接子；

L² 为连接 Aa 和 D² 的连接子；

D¹ 为细胞毒性药物部分；

5 D² 为 TLR 激动剂部分；

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

10 在一些实施方案中，m 为 1~2，1~3，1~4，1~5，1~6，1~7，1~8，1~9，1~10，1~16，
2~3，2~4，2~5，2~6，2~7，2~8，2~9，2~10，3~4，3~5，3~6，3~7，3~8，3~9，3~10，
4~5，4~6，4~7，4~8，4~9，4~10，5~6，5~7，5~8，5~9，5~10，6~7，6~8，6~9，6~10，
7~8，7~9，7~10，8~9，8~10，或 9~10。

在一些实施方案中，m 为整数。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

15 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 11 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 12 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；

(2) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

20 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 14 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 15 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；

(3) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) :

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH) : 序列为 SEQ ID NO: 8 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 9 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 10 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL) : 序列为 SEQ ID NO: 3 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 4 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3; 或

(4) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) :

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH) : 序列为 SEQ ID NO: 16 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 17 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL) : 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) , 其中 CDR 按 Chothia 编号系统定义:

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH) : 序列为 SEQ ID NO: 11 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 12 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL) : 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3;

(2) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) , 其中 CDR 按 Kabat 编号系统定义:

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH) : 序列为 SEQ ID NO: 14 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 15 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL) : 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3;

其变体的 CDR-L3;

(3) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL), 其中 CDR 按 IMGT 编号系统定义:

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH): 序列为 SEQ ID NO: 8 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 9 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 10 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 3 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 4 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3; 或

(4) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL), 其中 CDR 按 AbM 编号系统定义:

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH): 序列为 SEQ ID NO: 16 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 17 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3。

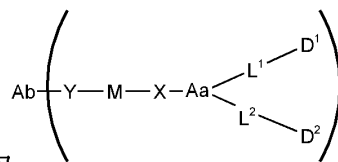
在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: SEQ ID NO: 23 所示的 VH 或其变体, 和/或, SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体; 优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含: SEQ ID NO: 23 所示的 VH 或其变体和 SEQ ID NO: 18 所示的重链恒定区 (CH) 或其变体的重链, 和/或, SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链恒定区 (CL) 或其变体的轻链; 优选地, 所述抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: SEQ ID NO: 1 所示的 VH 或其变体, 和/或, SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体; 优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含: SEQ ID NO: 1 所示的 VH 或其变体和 SEQ ID NO: 18 所示的重链恒定区 (CH) 或其变体的重链, 和/或, SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链恒定区 (CL) 或其变体的轻链; 优选地, 所述抗体或其抗原结合片段的重链的氨基

酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示。

5 在一些实施方案中, 所述重链或重链可变区和/或轻链或轻链可变区的 N 端谷氨酰胺经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐; 和/或, 所述重链或重链恒定区 (CH) 或其变体不存在 C-末端赖氨酸。

10 在一些实施方案中, 所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性, 或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加); 优选地, 所述的置换是保守置换。

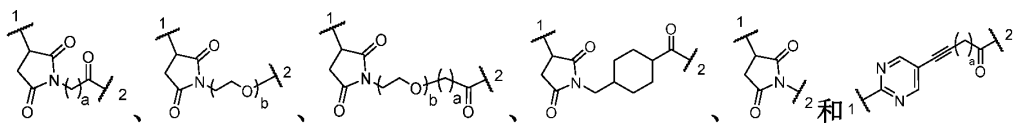


在一些实施方案中, 式(I)进一步为
 上所述的抗体或其抗原结合片段, -(Y-表示所述抗体或其抗原结合片段中的氨基酸残基与 M 的连接部分。

在一些实施方案中, 所述氨基酸残基为半胱氨酸、赖氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基。

15 在一些实施方案中, Y 为 S、NH 或 O。

在一些实施方案中, M 为共价键或选自以下结构:

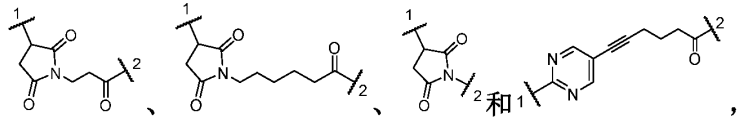


其中, 各 a 独立地选自 0-6 的整数, b 选自 1-10 的整数, 并且 M 的 1 位置与 Ab' 相连, 2 位置与 X 相连。

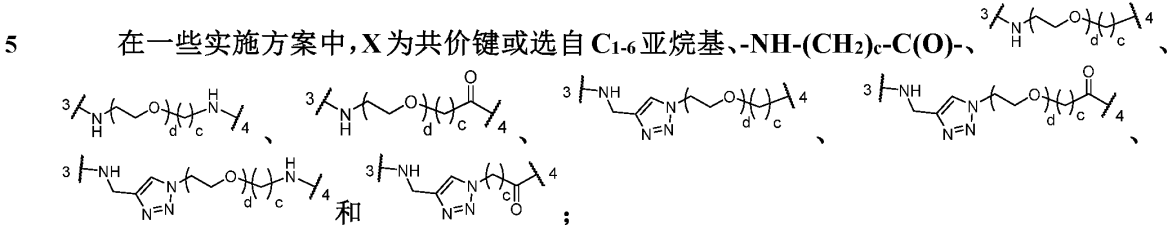
20 在一些实施方案中, 各 a 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6。在一些实施方案中, 各 a 独立地选自 1、2、3、4、5 和 6。在一些实施方案中, 各 a 独立地选自 2、3、4、5 和 6。

在一些实施方案中，b 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

在一些实施方案中，M 为共价键或选自以下结构：



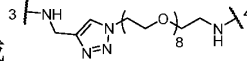
其中 M 的 1 位置与 Ab'相连，2 位置与 X 相连。



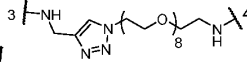
其中，各 c 独立地选自 0-6 的整数，各 d 独立地选自 1-10 的整数；X 的 3 位置与 M 相连，4 位置与 Aa 相连。

10 在一些实施方案中，各 c 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6。在一些实施方案中，各 c 独立地选自 1、2、3、4、5 和 6。在一些实施方案中，c 为 2。

在一些实施方案中，各 d 独立地选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

在一些实施方案中，X 为共价键或；其中，X 的 3 位置与 M 相连，4 位置与 Aa 相连。

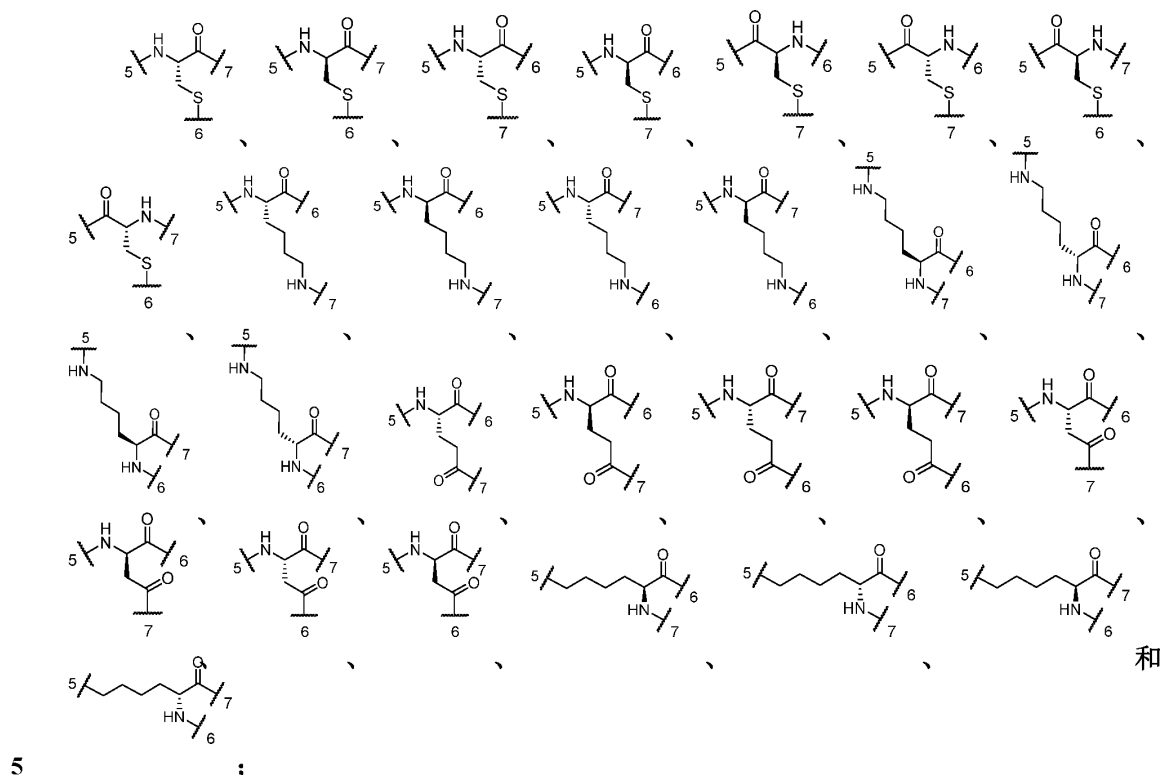
15 在一些实施方案中，X 为共价键。

在一些实施方案中，X 为；其中，X 的 3 位置与 M 相连，4 位置与 Aa 相连。

在一些实施方案中，Aa 选自下述氨基酸的片段：Gly、Phe、Ala、Val、Cys、Asp、Glu、Lys、Nle 和 Arg。

20 在一些实施方案中，Aa 选自下述氨基酸的片段：Cys、Asp、Glu、Lys 和 Nle。

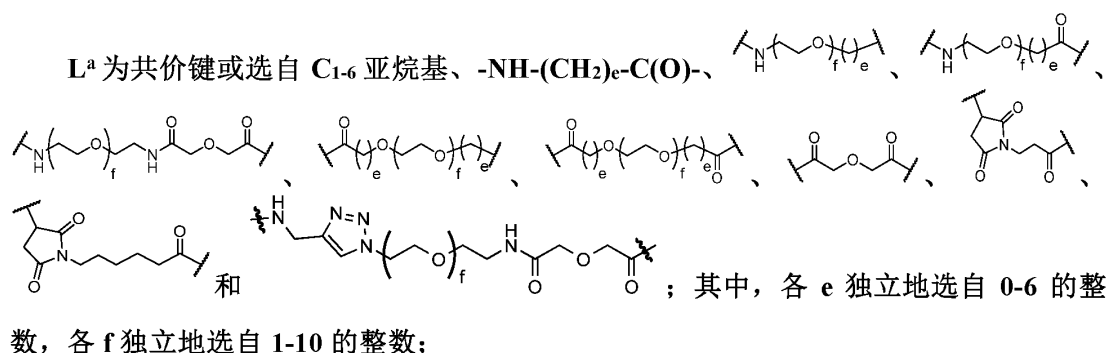
在一些实施方案中，Aa 选自以下结构：



其中, Aa 的 5 位置与 X 相连, 6 位置与 L^1 相连, 7 位置与 L^2 相连。

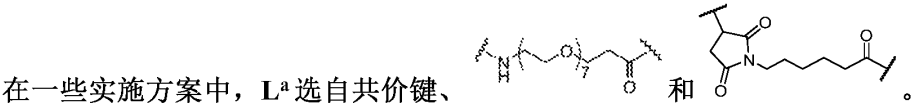
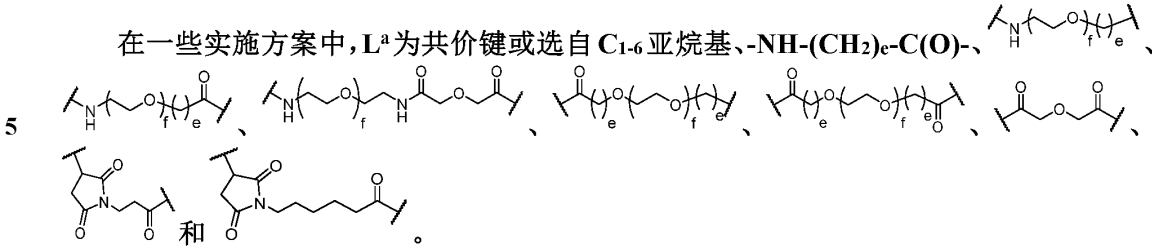
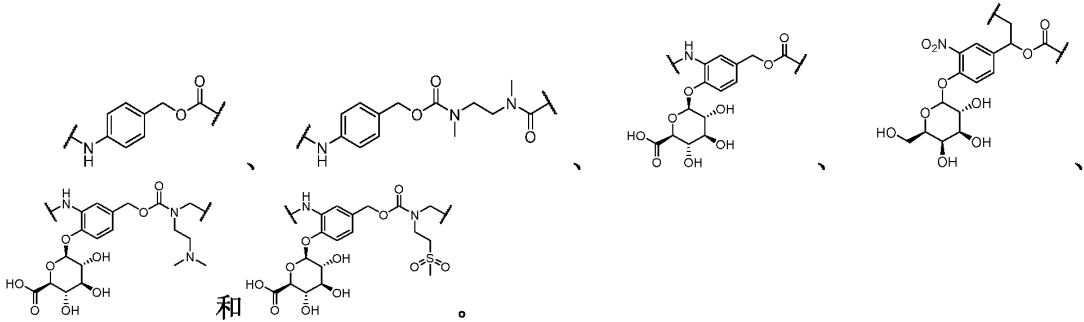
在一些实施方案中, L^1 为共价键或选自不可断裂连接子和可断裂连接子, 所述可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割, 所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶。

10 在一些实施方案中, L^1 为 $-L^a-L^b-L^c-$, 其中:



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

L^c 为共价键或选自-NH-CH₂-和以下结构：



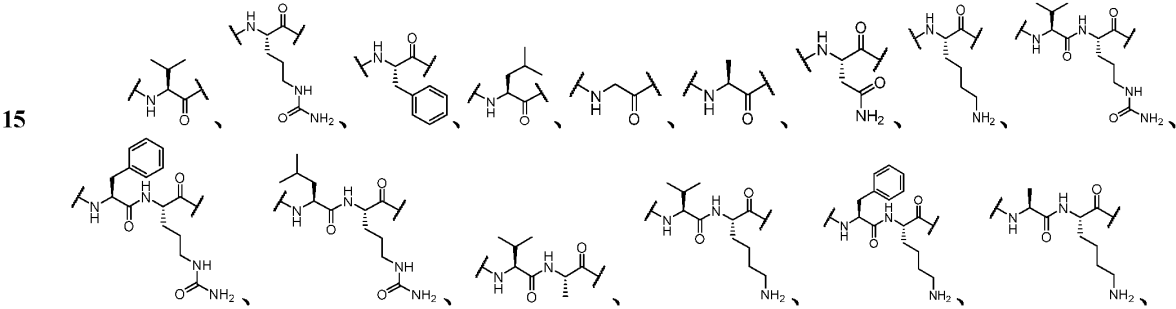
在一些实施方案中，L^a 为共价键。

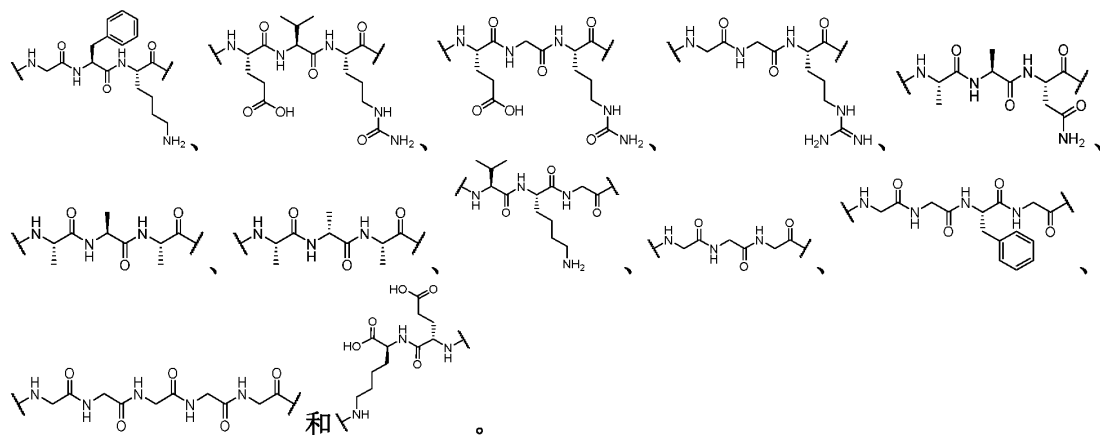
10 在一些实施方案中，各 e 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6。在一些实施方案中，各 e 独立地选自 1、2、3、4、5 和 6。在一些实施方案中，e 为 2。

在一些实施方案中，各 f 独立地选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

在一些实施方案中，L^b 选自 Val-Cit、Ala-Ala-Ala、Val-Lys-Gly 和 Gly-Gly-Phe-Gly (SEQ ID NO: 24)。

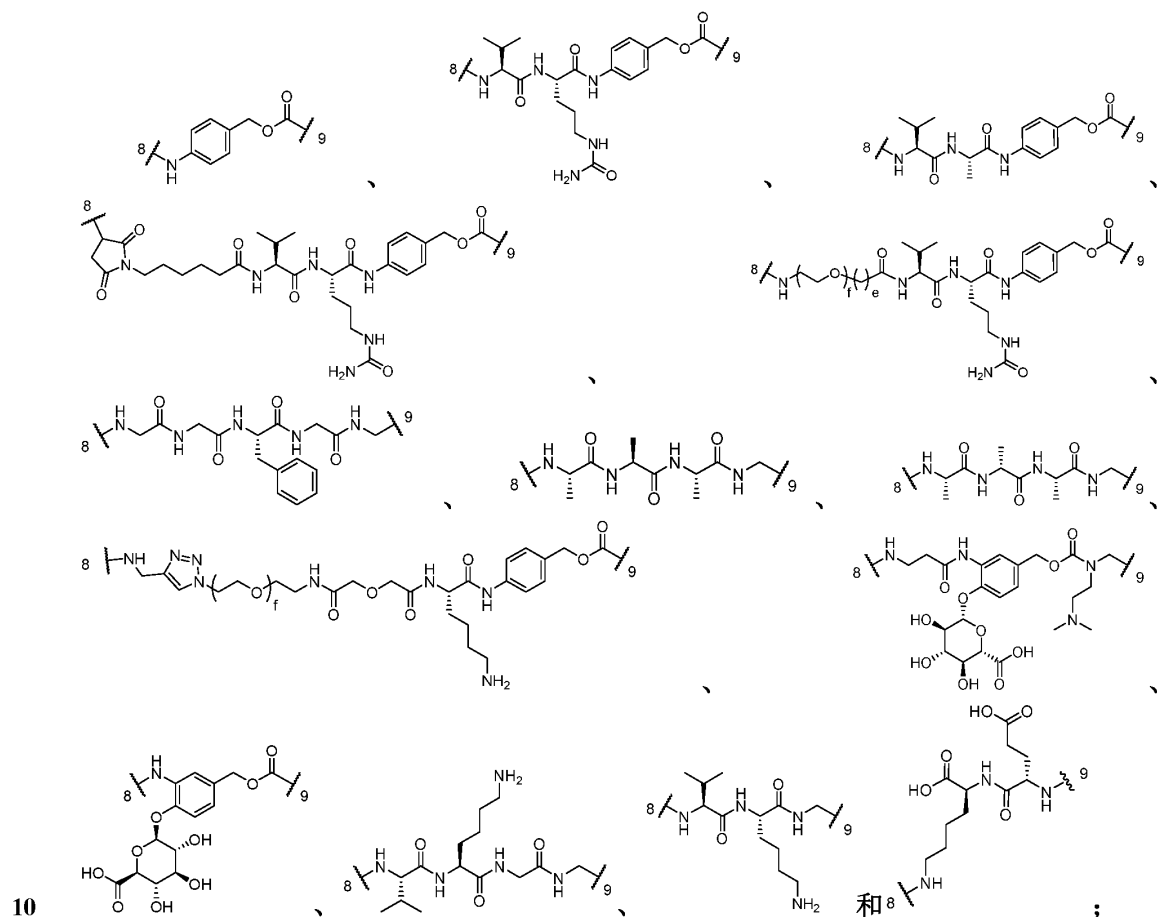
在一些实施方案中，L^b 为共价键或选自以下结构：





在一些实施方案中， L^c 为-NH-CH₂-或。

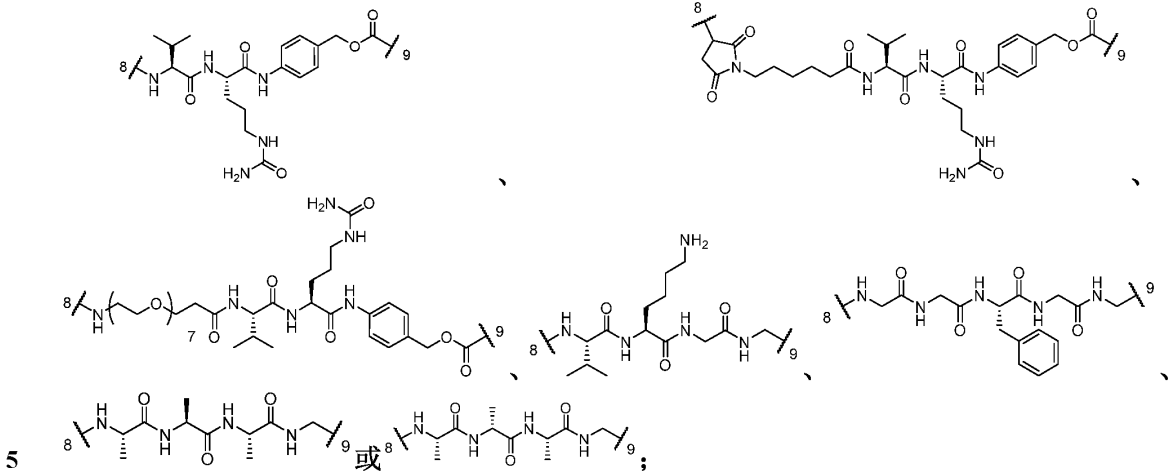
5 在一些实施方案中， L^1 为共价键或选自以下结构：



其中, 各 e 独立地选自 0-6 的整数, 各 f 独立地选自 1-10 的整数; L^1 的 8 位置与 Aa

相连，9 位置与 D¹ 相连。

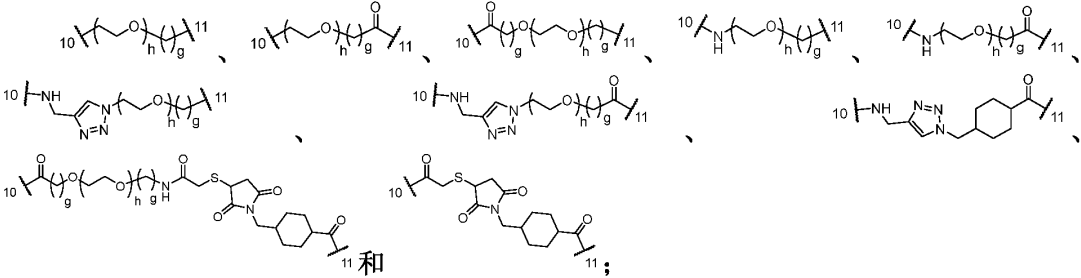
在一些实施方案中，L¹ 为：



其中，L¹ 的 8 位置与 Aa 相连，9 位置与 D¹ 相连。

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

10 在一些实施方案中，L² 选自以下结构：

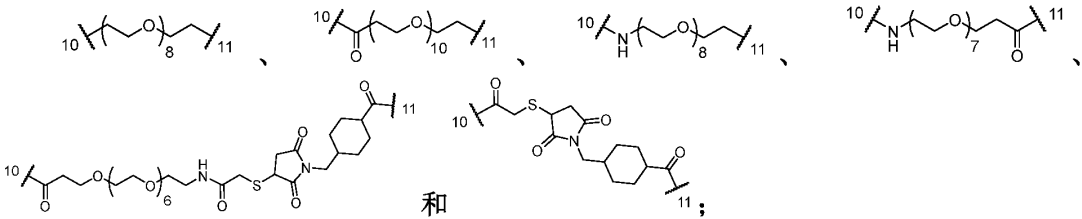


15 其中，各 g 独立地选自 0-6 的整数，各 h 独立地选自 1-10 的整数；L² 的 10 位置同 Aa 相连，11 位置同 D² 相连。

在一些实施方案中，各 g 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6。在一些实施方案中，各 g 独立地选自 1、2、3、4、5 和 6。在一些实施方案中，g 为 2。

在一些实施方案中，各 h 独立地选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

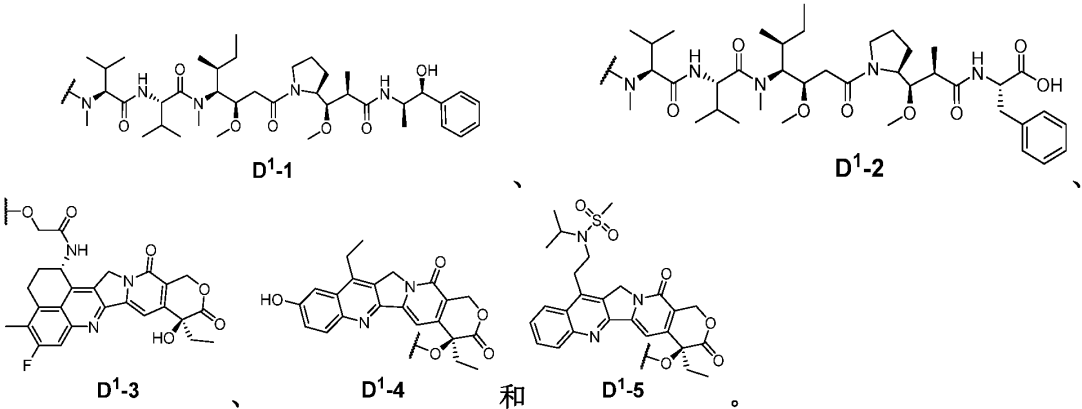
在一些实施方案中， L^2 选自以下结构：



其中， L^2 的 10 位置同 Aa 相连，11 位置同 D^2 相连。

- 5 在一些实施方案中， D^1 选自细胞毒性药物部分。在一些实施方案中，所述细胞毒性药物包括但不限于微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂和拓扑异构酶抑制剂。在一些实施方案中，所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素（dolastatin）及澳瑞他汀（auristatin）类、美登素（maytansine）类、微管溶素（Tubulysins）类和隐粘菌素（cryptomycins）类。在一些实施方案中，所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素 10、MMAE、MMAF、美登素、DM1、DM3 和 DM4。在一些实施方案中，所述拓扑异构酶抑制剂包括但不限于喜树碱及其衍生物、表鬼臼毒素（Epidodophyllotoxin）类、蒽环类和蒽醌类。在一些实施方案中，所述拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱、SN-38、依喜替康、拓扑替康、贝洛替康、鲁比替康、二氟替康、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、Dxd、T030、阿霉素、表柔比星和 PNU-159682。在一些实施方案中，所述 DNA 损伤剂包括但不限于吡咯并苯二氮草
- 10 素（Pyrrolobenzodiazepine）类、杜卡霉素（duocarmycin）类和卡齐霉素（calicheamicin）类。
- 15

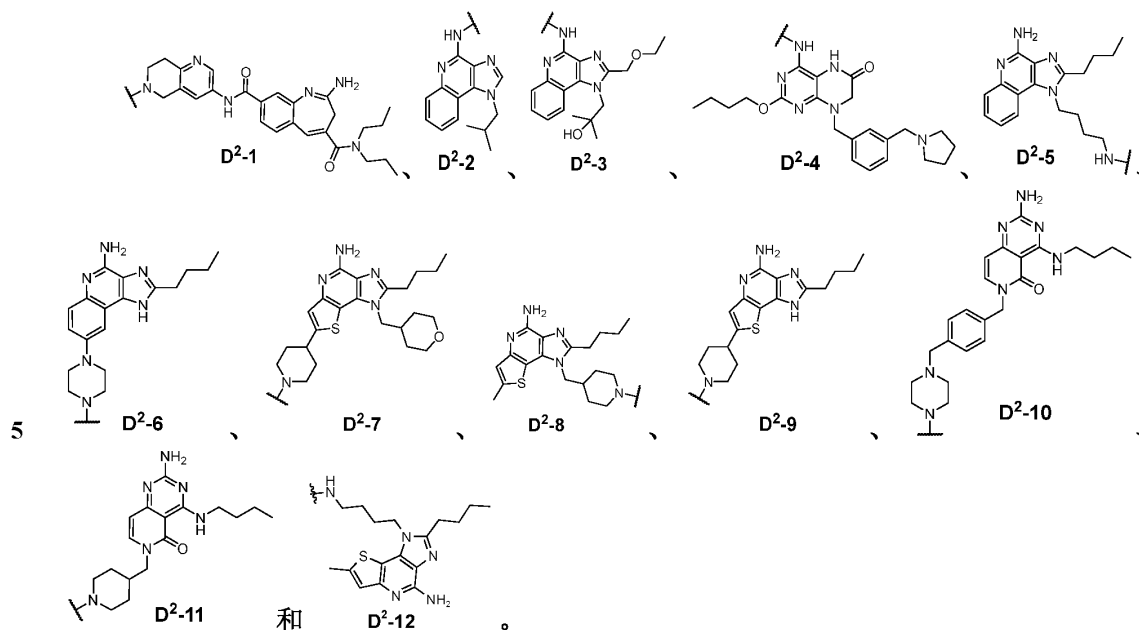
在一些实施方案中， D^1 选自以下结构：

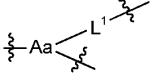


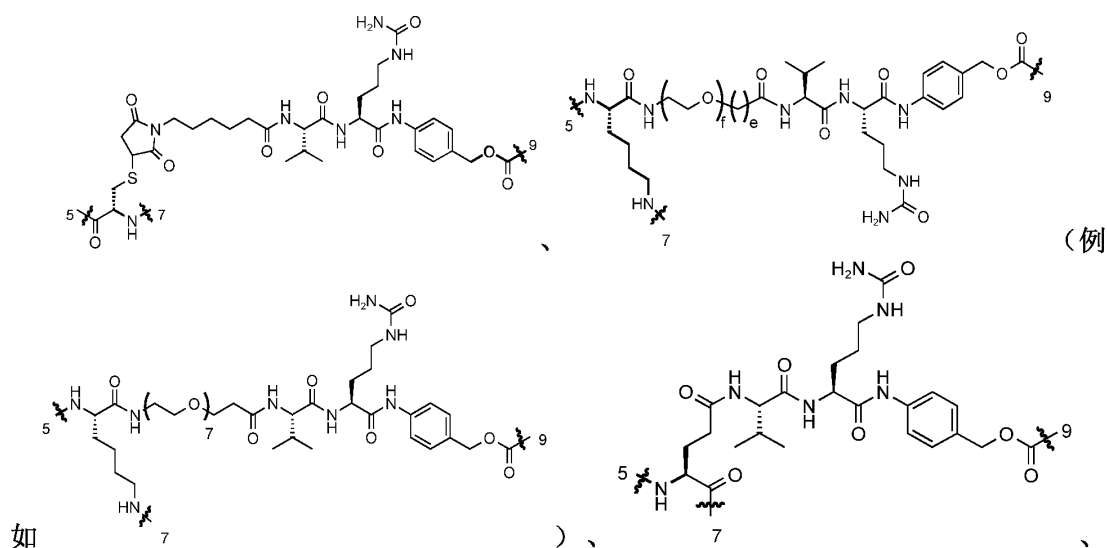
- 20 在一些实施方案中， D^2 为 TLR 激动剂部分，所述 TLR 激动剂选自 TLR2 激动剂、TLR4 激动剂、TLR6 激动剂、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂、TLR7/8 激动剂和 TLR9 激

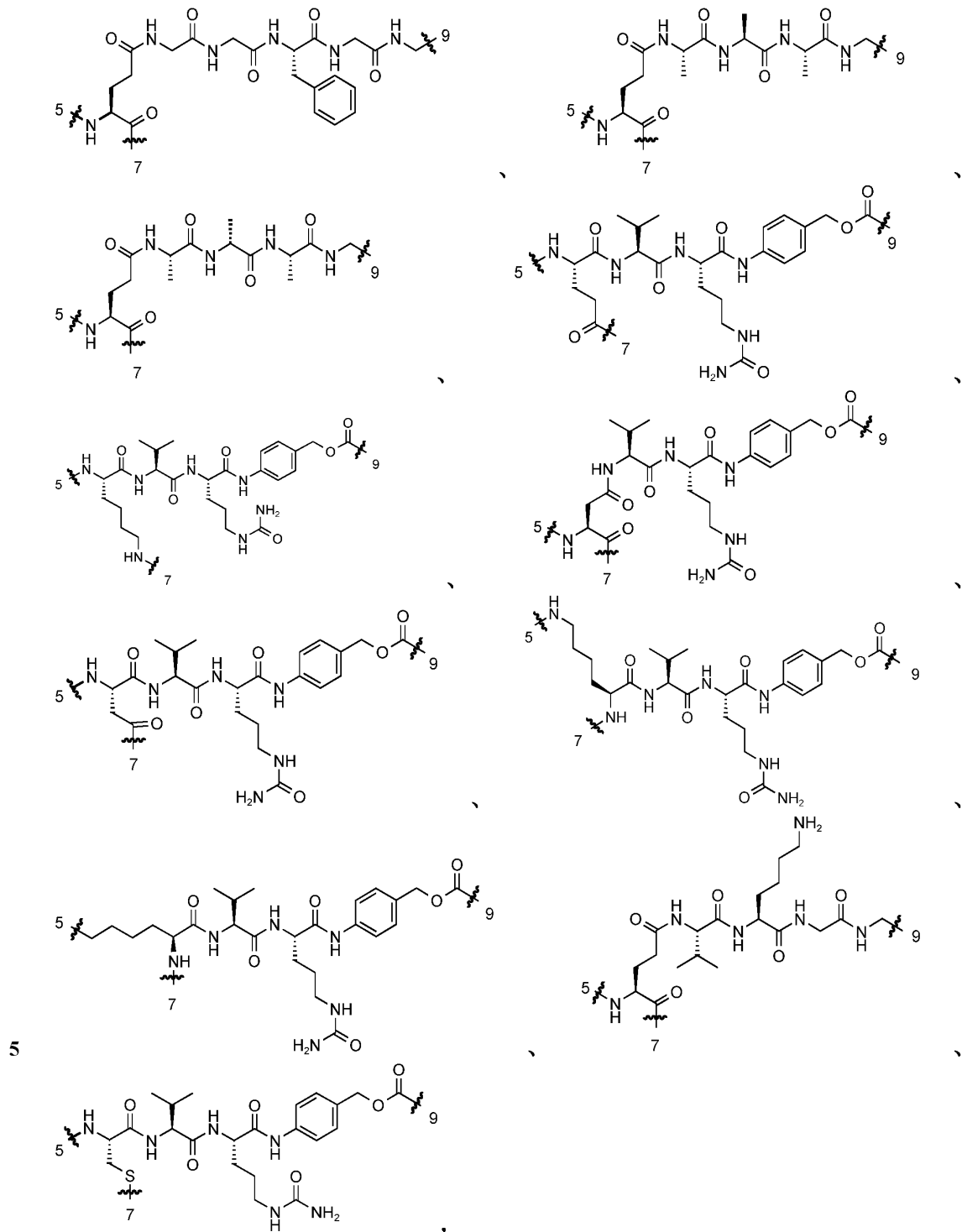
动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂选自 TLR7 激动剂、TLR8 激动剂和 TLR7/8 激动剂。

在一些实施方案中，D² 选自以下结构：

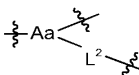


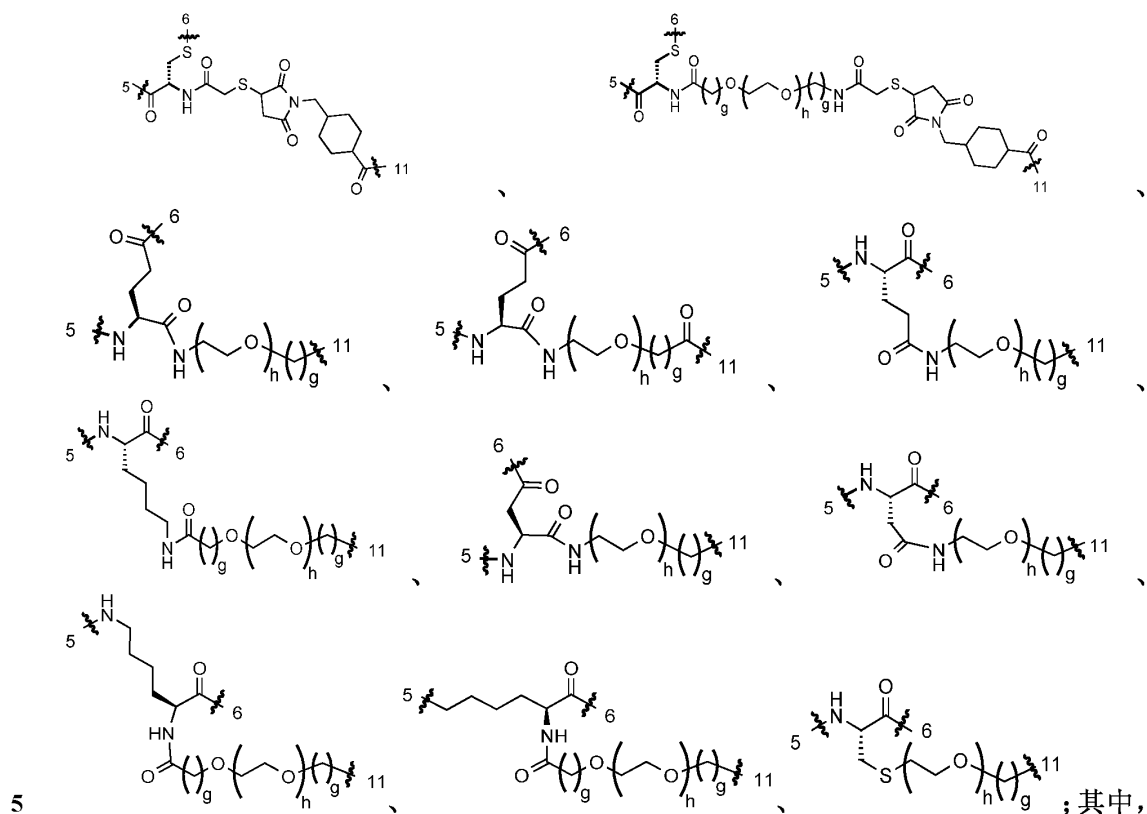
在一些实施方案中， 选自：



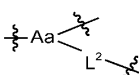


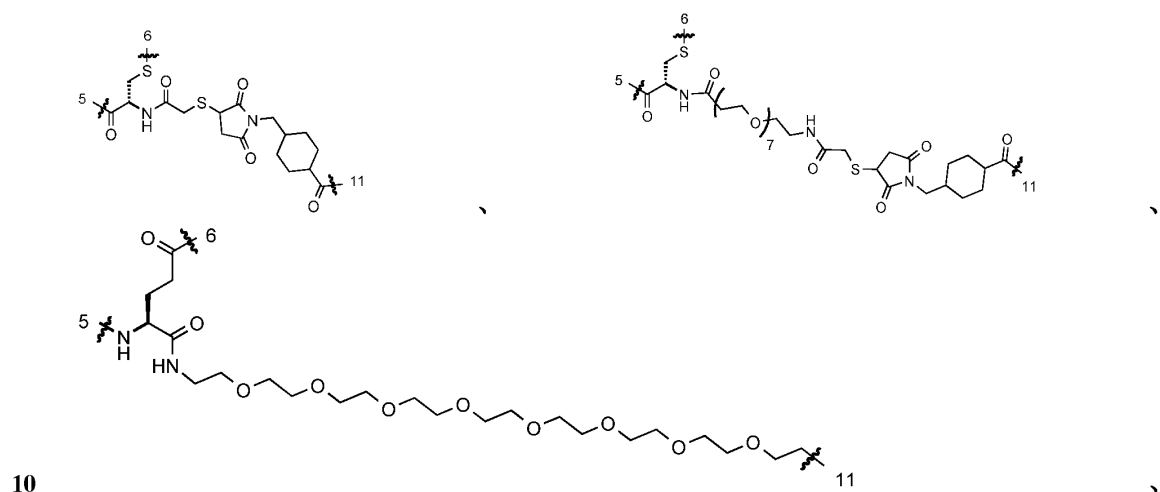
其中, e 选自 0-6 的整数, f 选自 1-10 的整数; 5 位置与 X 相连, 7 位置与 L^2 相连, 9 位置与 D^1 相连。

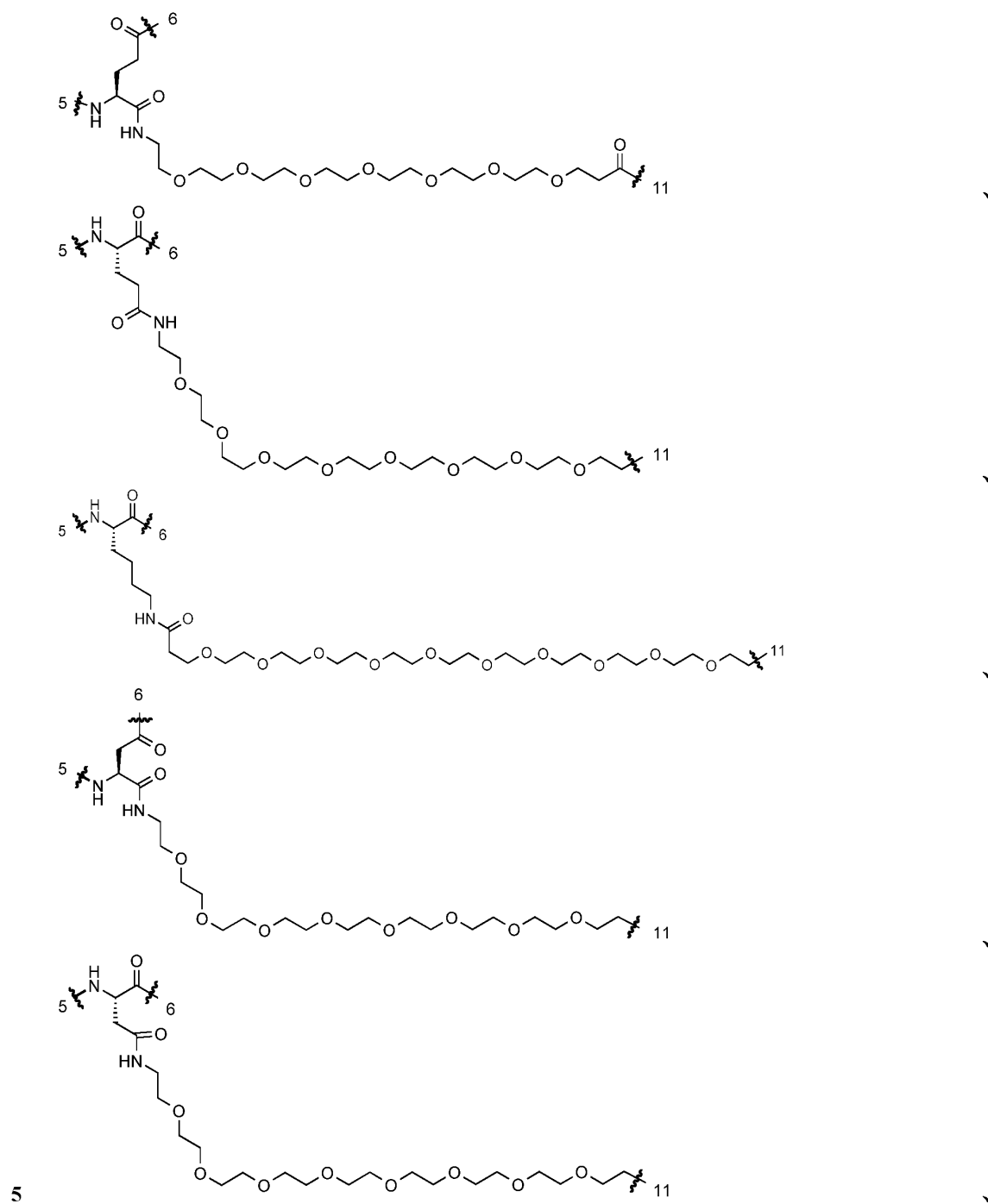
在一些实施方案中， 选自：

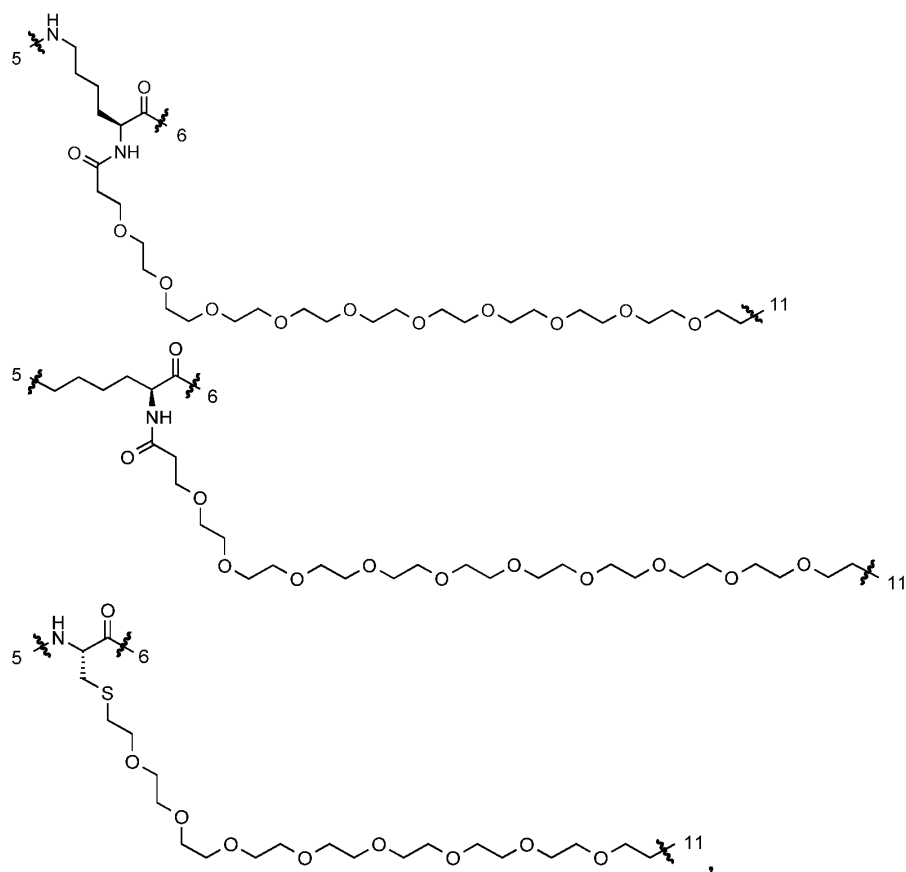


各 g 独立地选自 0-6 的整数，各 h 独立地选自 1-10 的整数；5 位置与 X 相连，6 位置与 L^1 相连，11 位置与 D^2 相连。

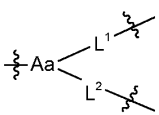
在一些实施方案中， 选自：

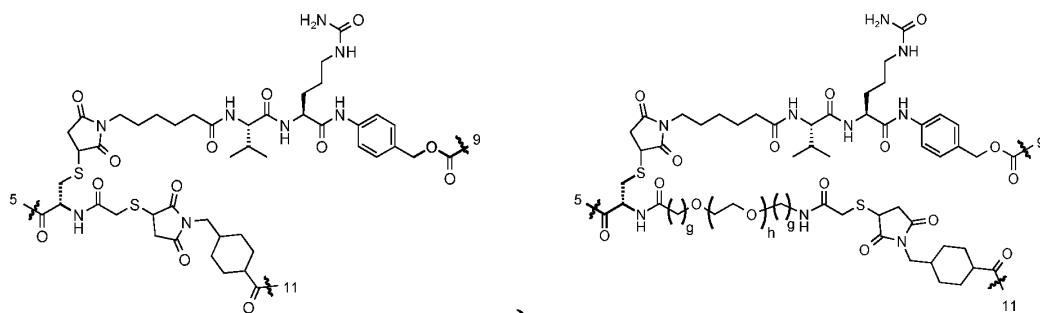


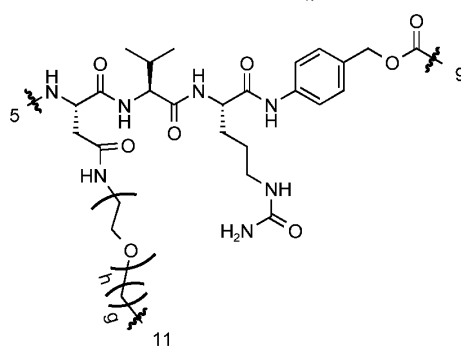
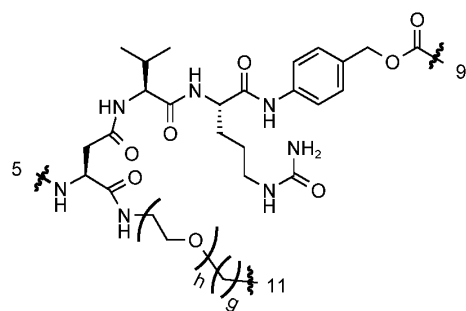
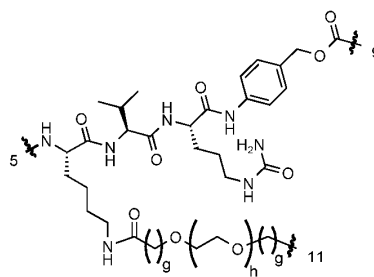
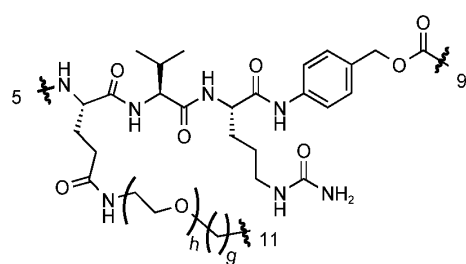
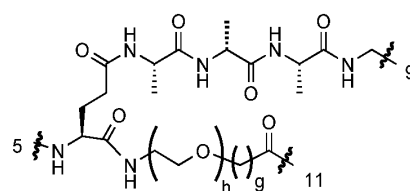
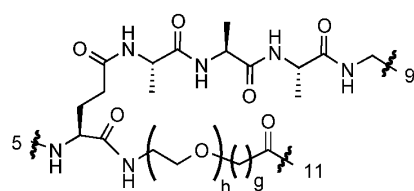
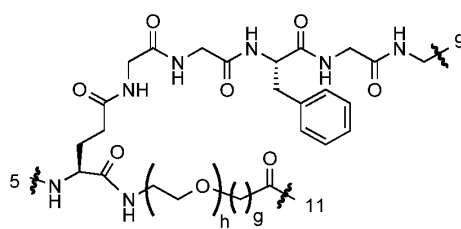
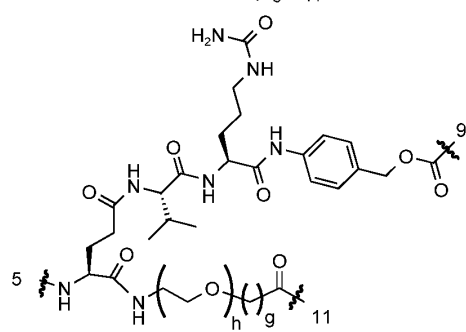
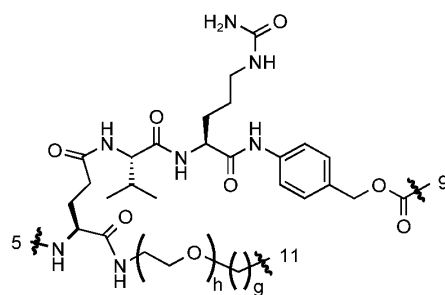
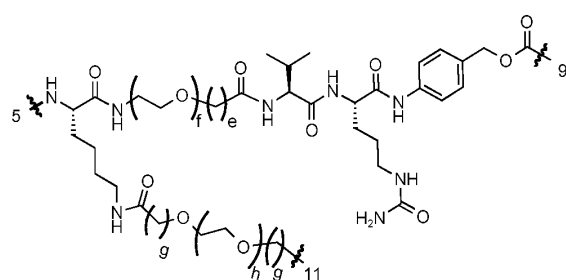




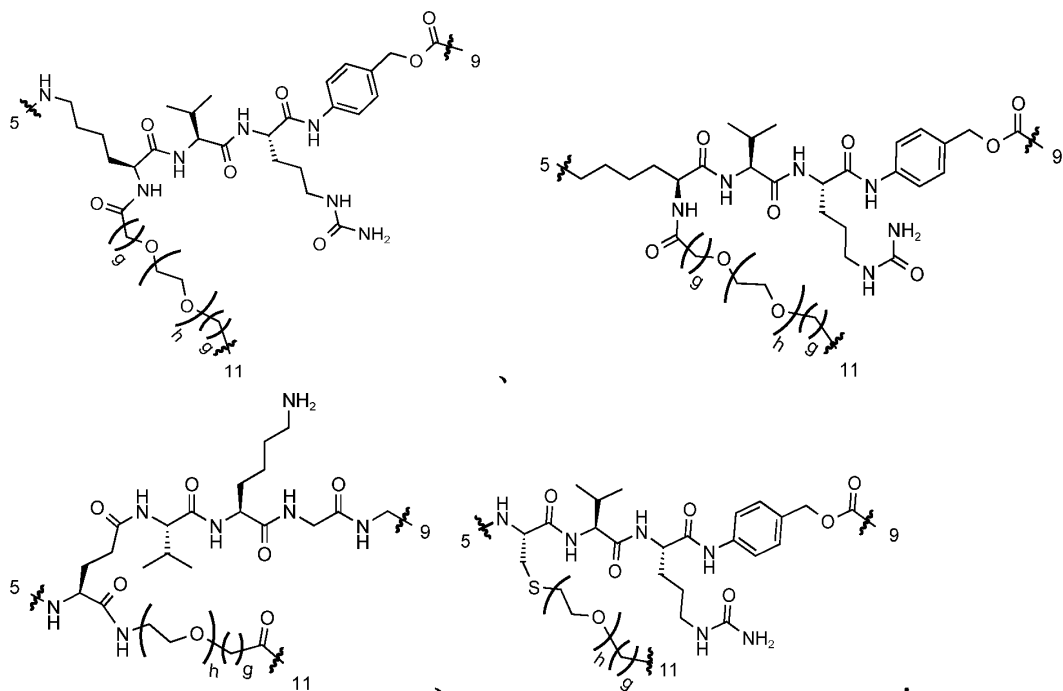
其中，5 位置与 X 相连，6 位置与 L^1 相连，11 位置与 D^2 相连。

5 在一些实施方案中， 选自：





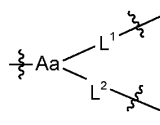
5



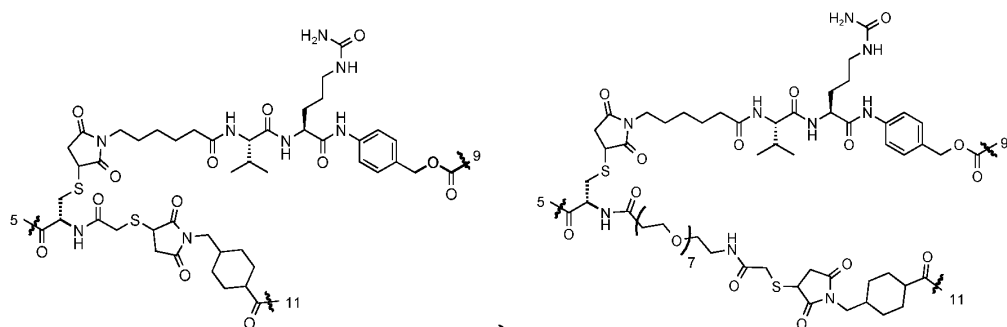
其中, 各 g 独立地选自 0-6 的整数, 各 h 独立地选自 1-10 的整数; 5 位置与 X 相连, 9 位置与 D^1 相连, 11 位置与 D^2 相连。

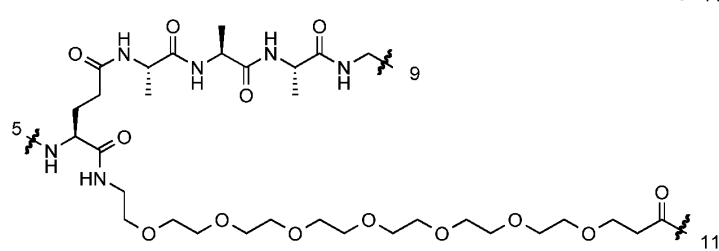
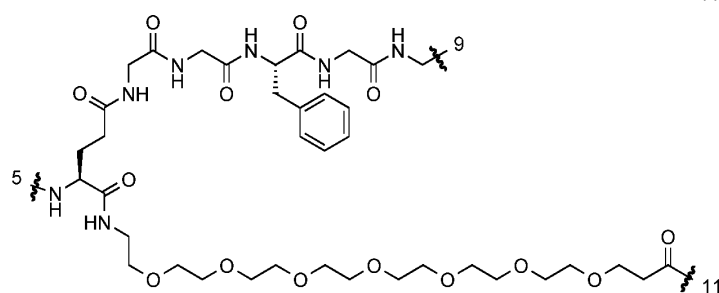
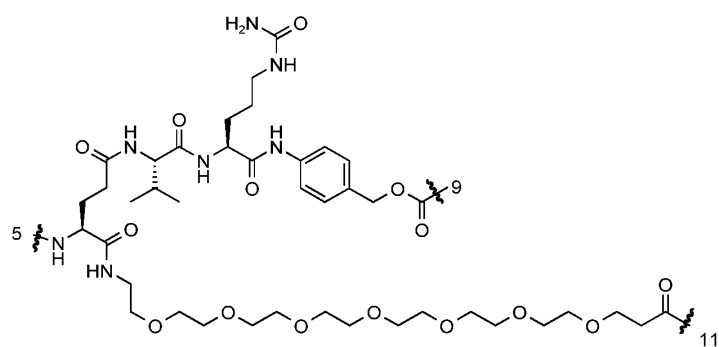
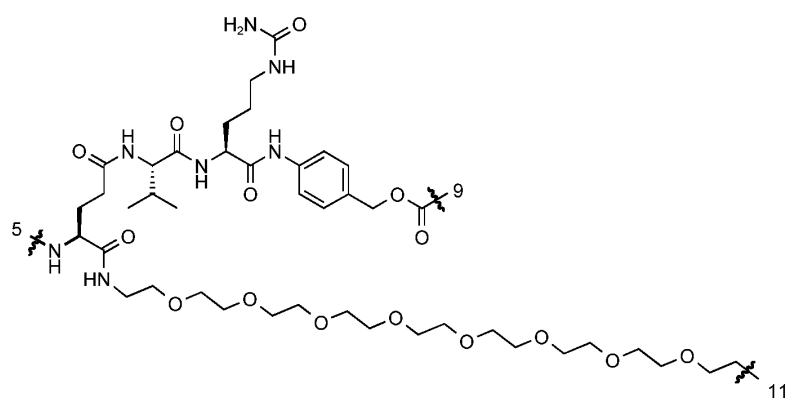
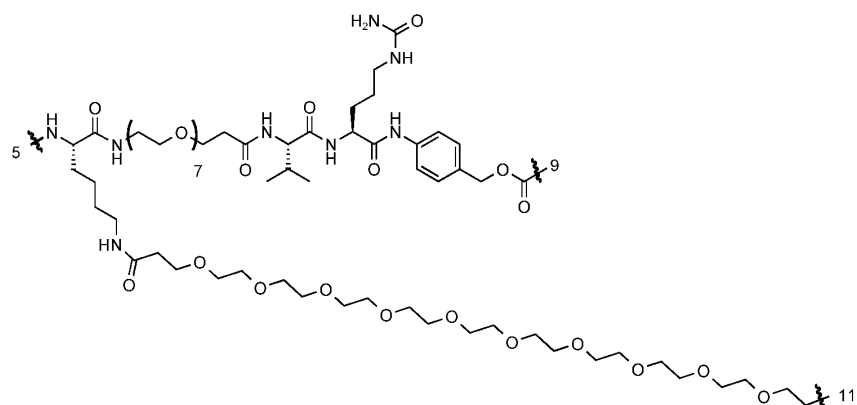
5

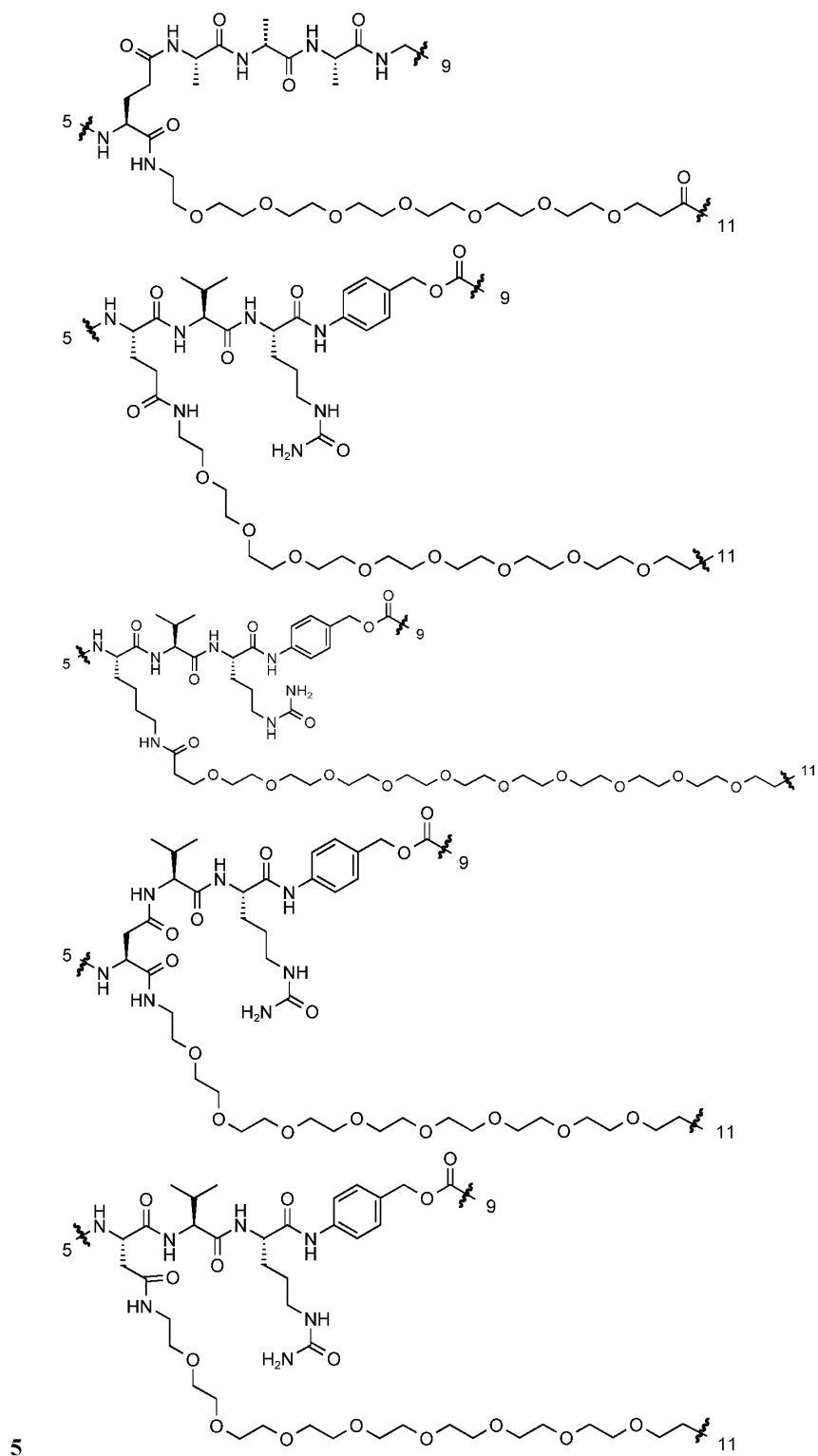
在一些实施方案中,

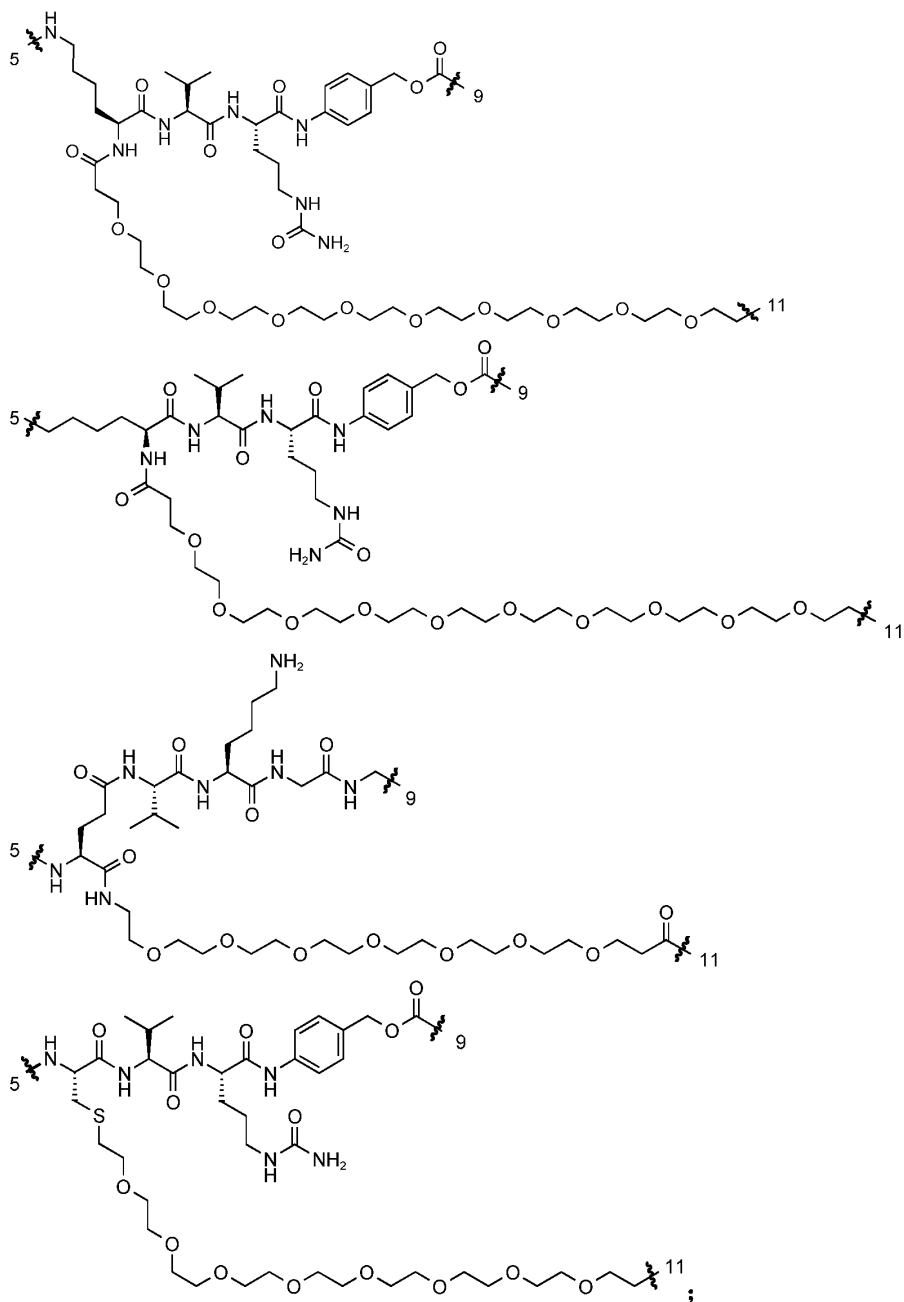


选自:



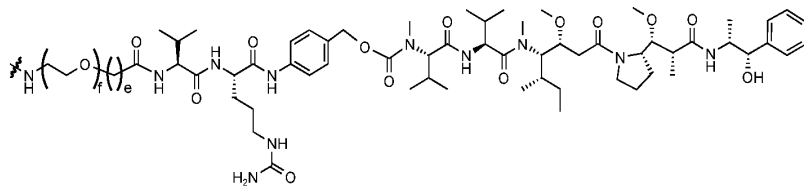
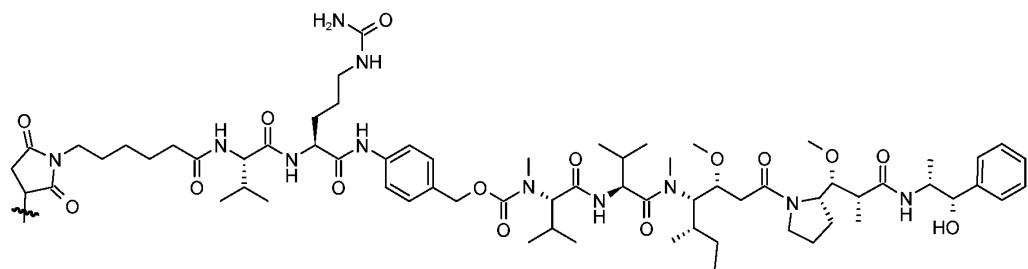




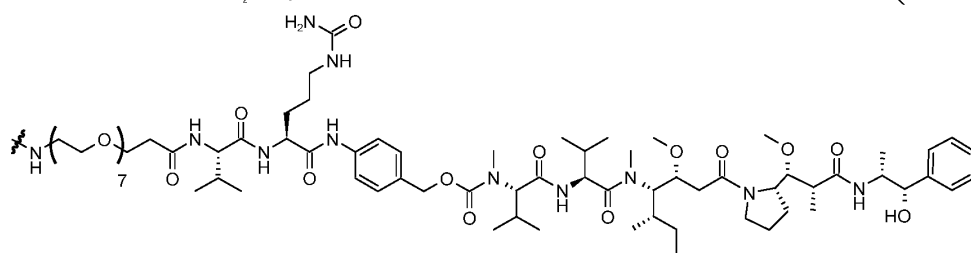


5 其中 5 位置与 X 相连，9 位置与 D¹ 相连，11 位置与 D² 相连。

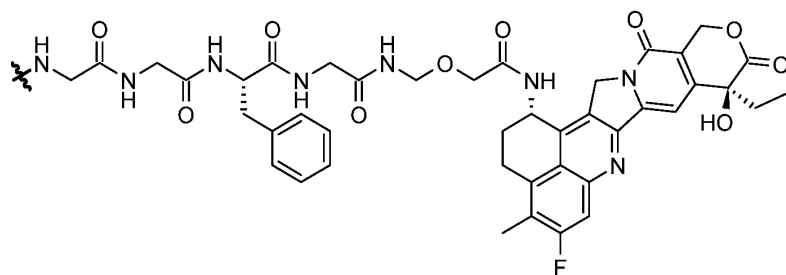
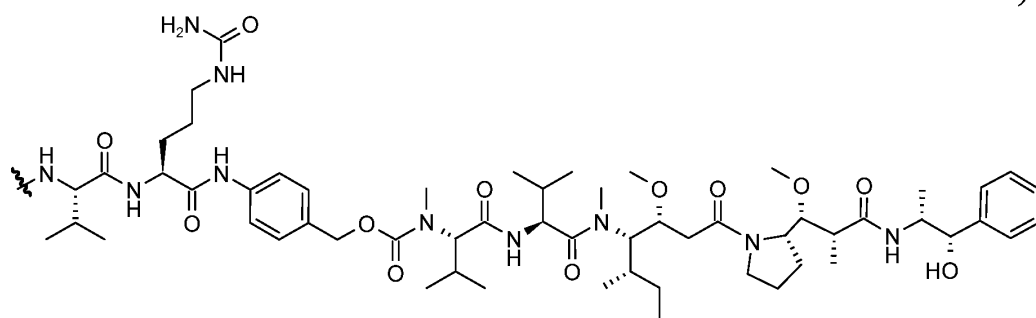
在一些实施方案中， $\frac{2}{3}L^1-D^1$ 选自：



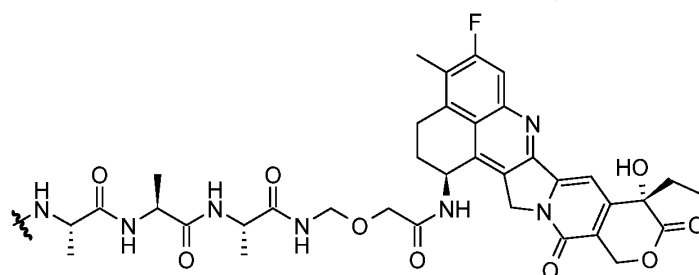
(例 如

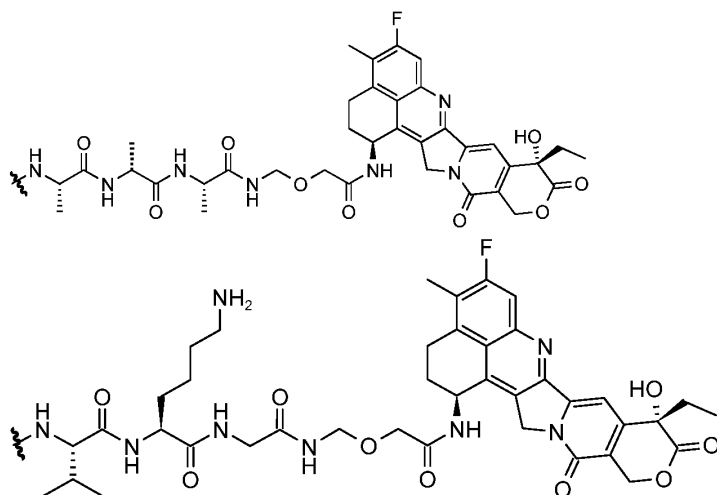


) 、



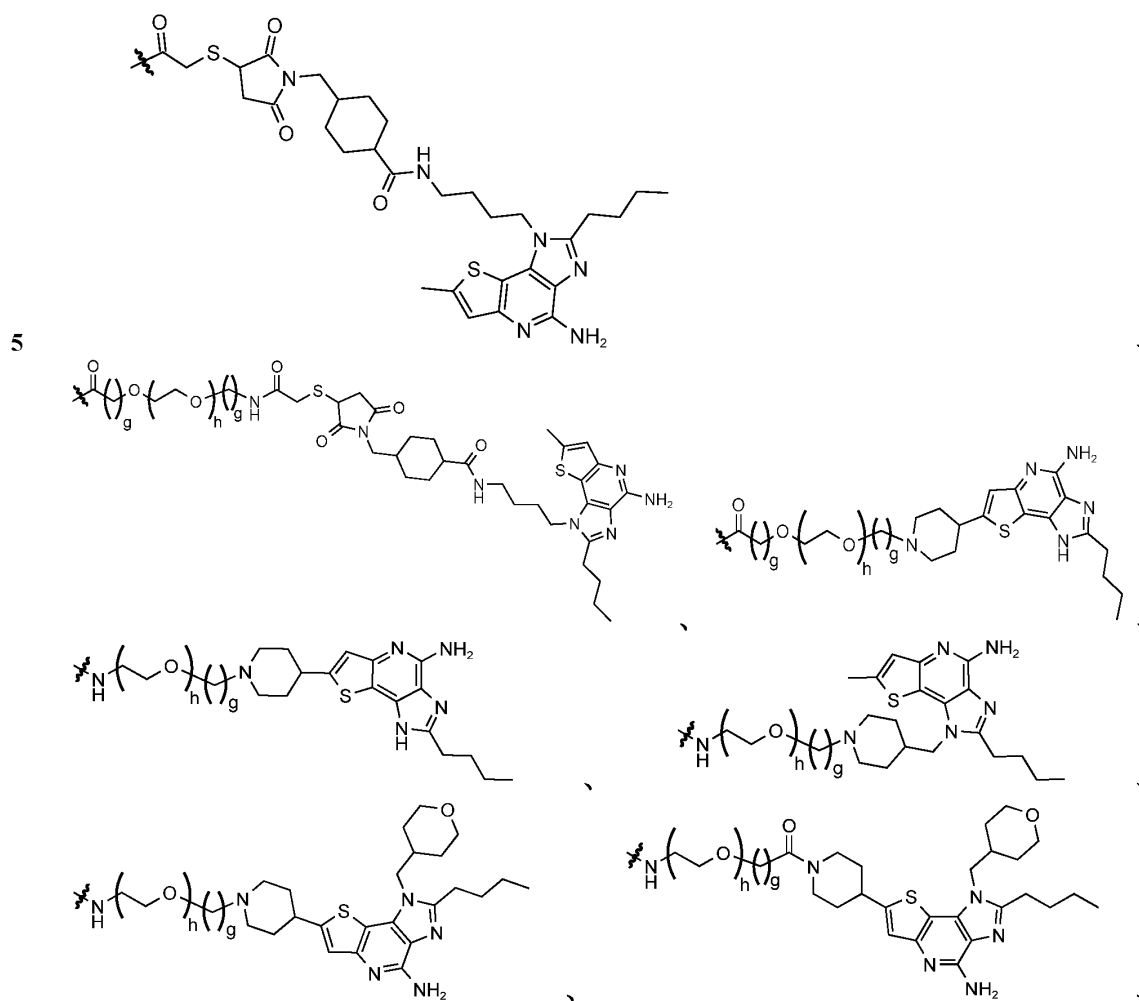
5

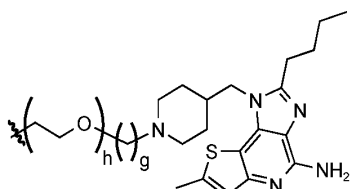
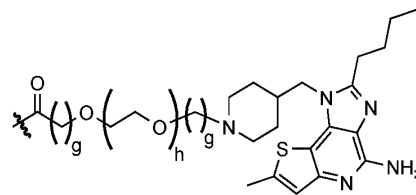
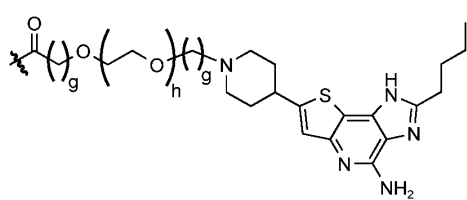




其中各 e 独立地选自 0-6 的整数, 各 f 独立地选自 1-10 的整数。

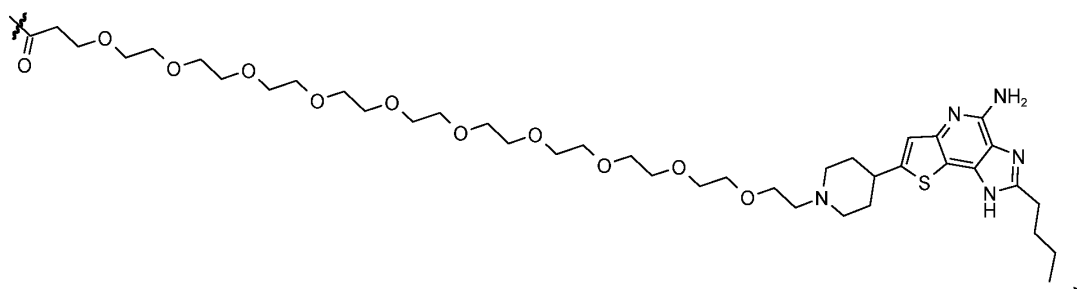
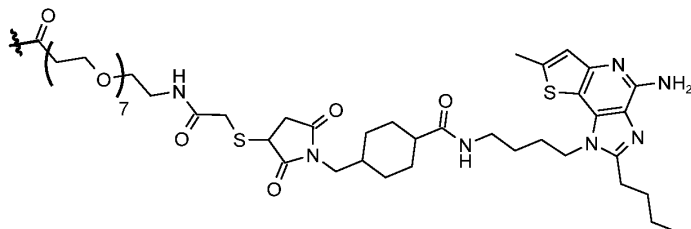
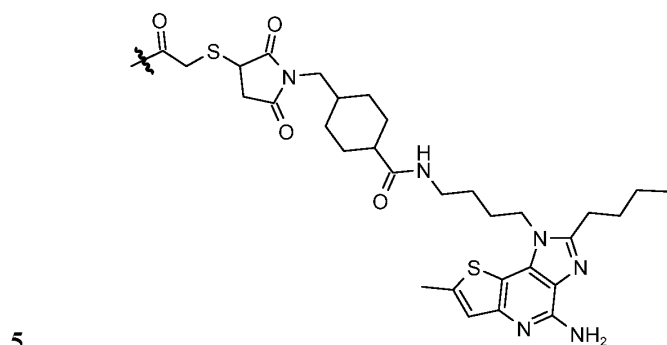
在一些实施方案中, $\frac{1}{2}L^2-D^2$ 选自:

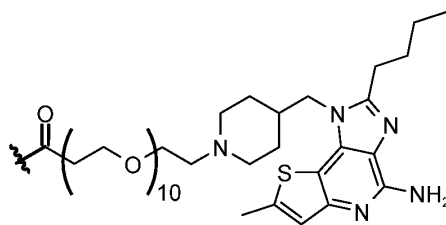


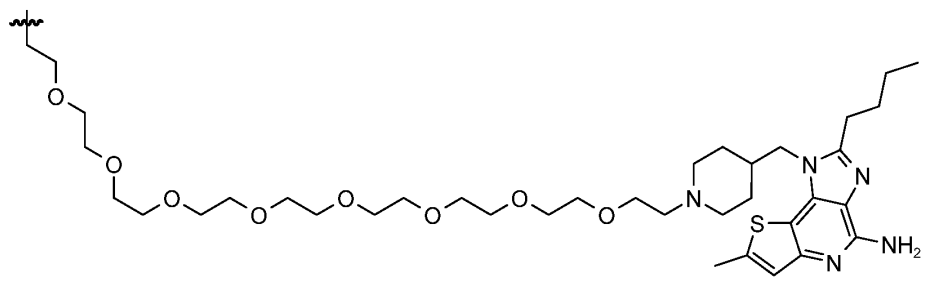


；其中，各 g 独立地选自 0-6 的整数，各 h 独立地选自 1-10 的整数。

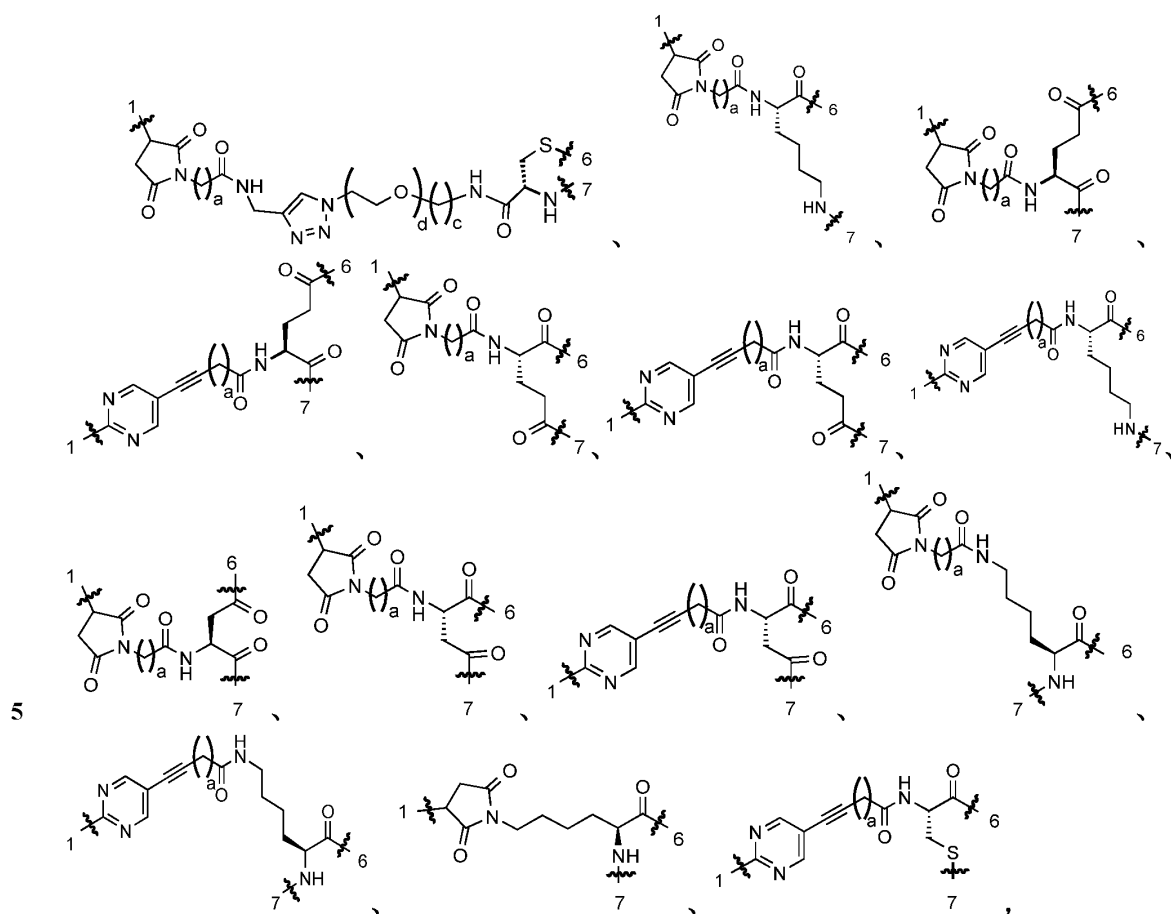
在一些实施方案中， $\frac{1}{2}L^2-D^2$ 选自：





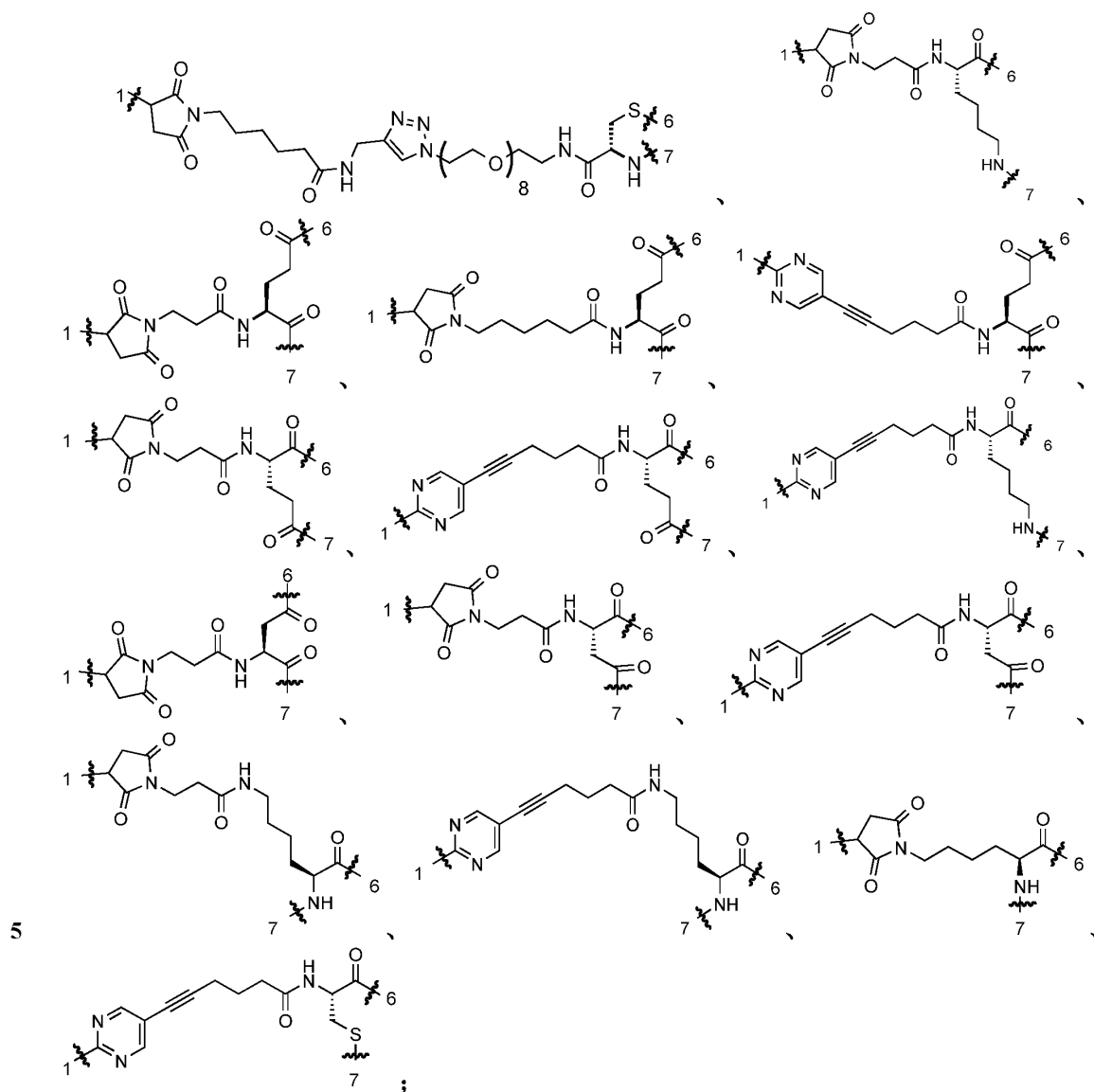


在一些实施方案中， $\text{M}-\text{X}-\text{Aa}$ 选自：



其中，各 a 独立地选自 0-6 的整数，各 c 独立地选自 0-6 的整数，各 d 独立地选自 1-10 的整数；1 位置与 Ab' 相连，6 位置与 L^1 相连，7 位置与 L^2 相连。

在一些实施方案中， $\text{M}-\text{X}-\text{Aa}$ 选自：

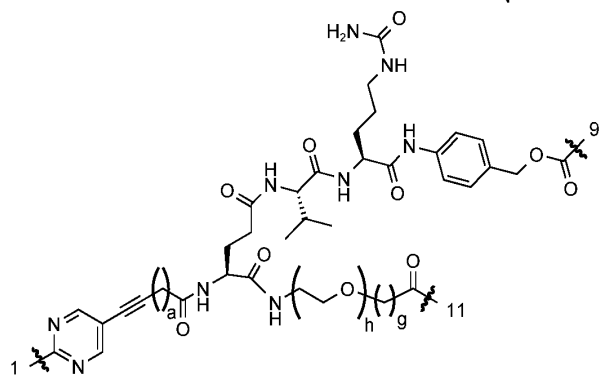
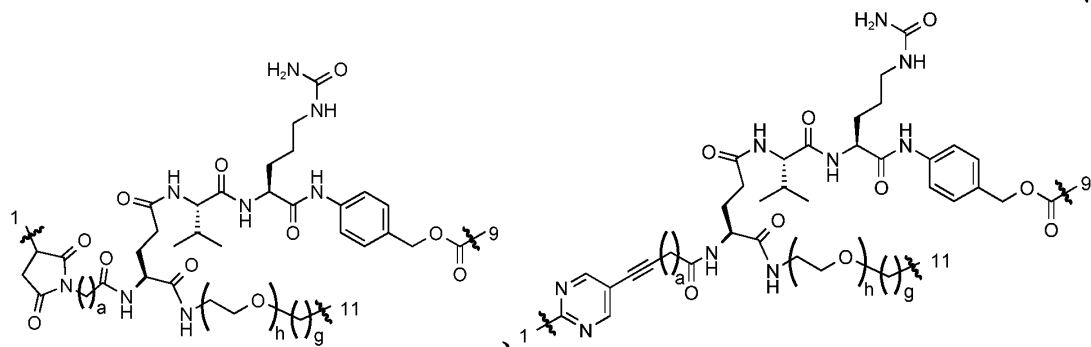
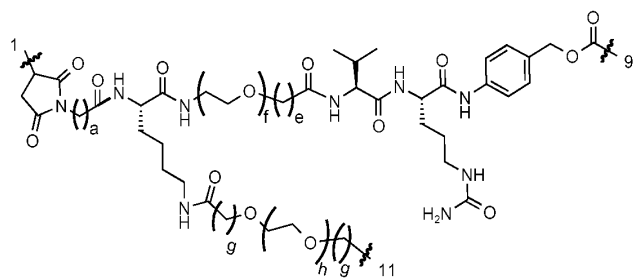
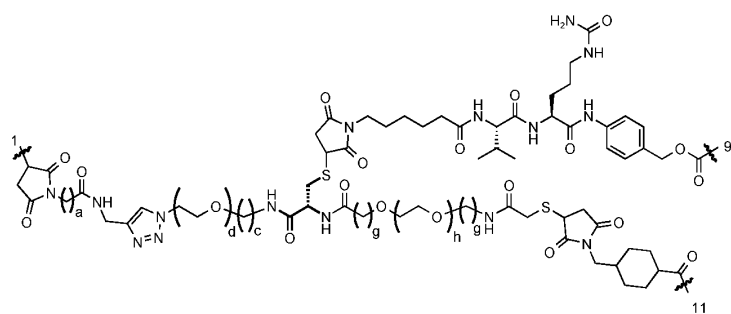
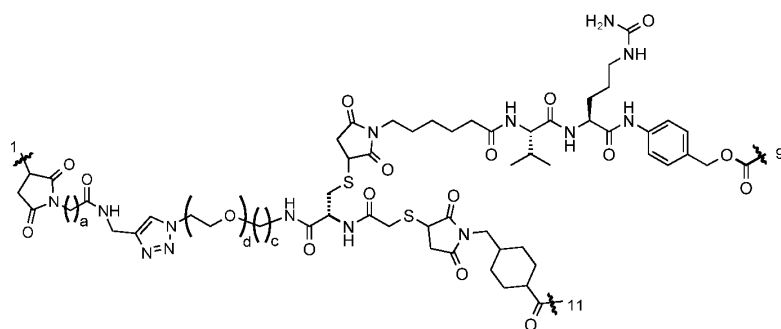


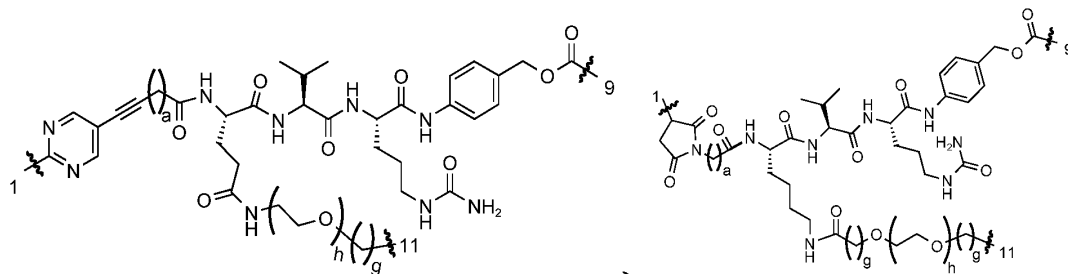
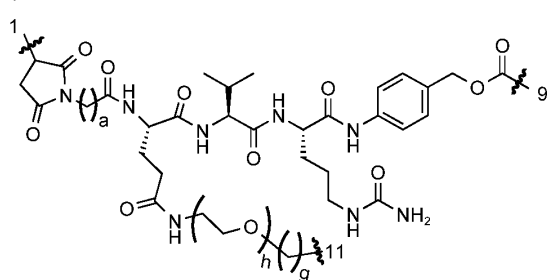
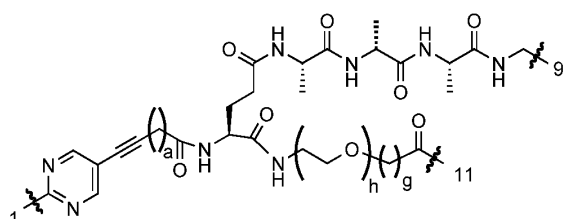
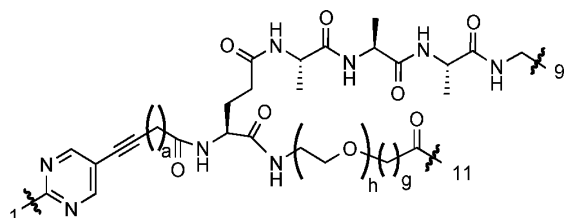
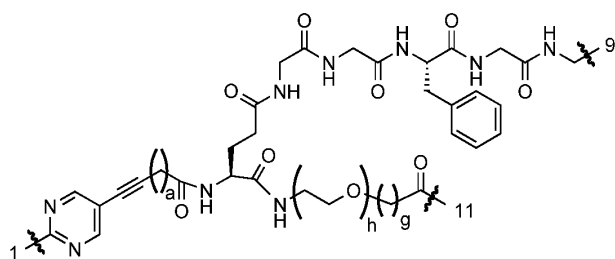
其中，1 位置与 Ab' 相连，6 位置与 L¹ 相连，7 位置与 L² 相连。

在一些实施方案中，

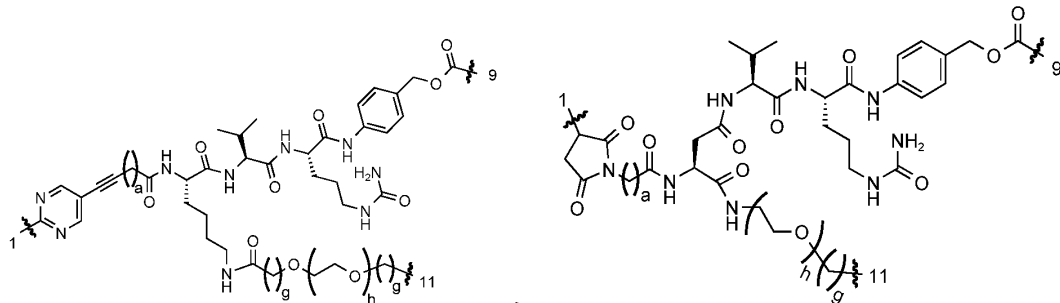
$$\begin{array}{c} \text{---} \text{M} \text{---} \text{X} \text{---} \text{Aa} \begin{array}{l} \text{---} \text{L}^1 \text{---} \\ \text{---} \text{L}^2 \text{---} \end{array} \end{array}$$

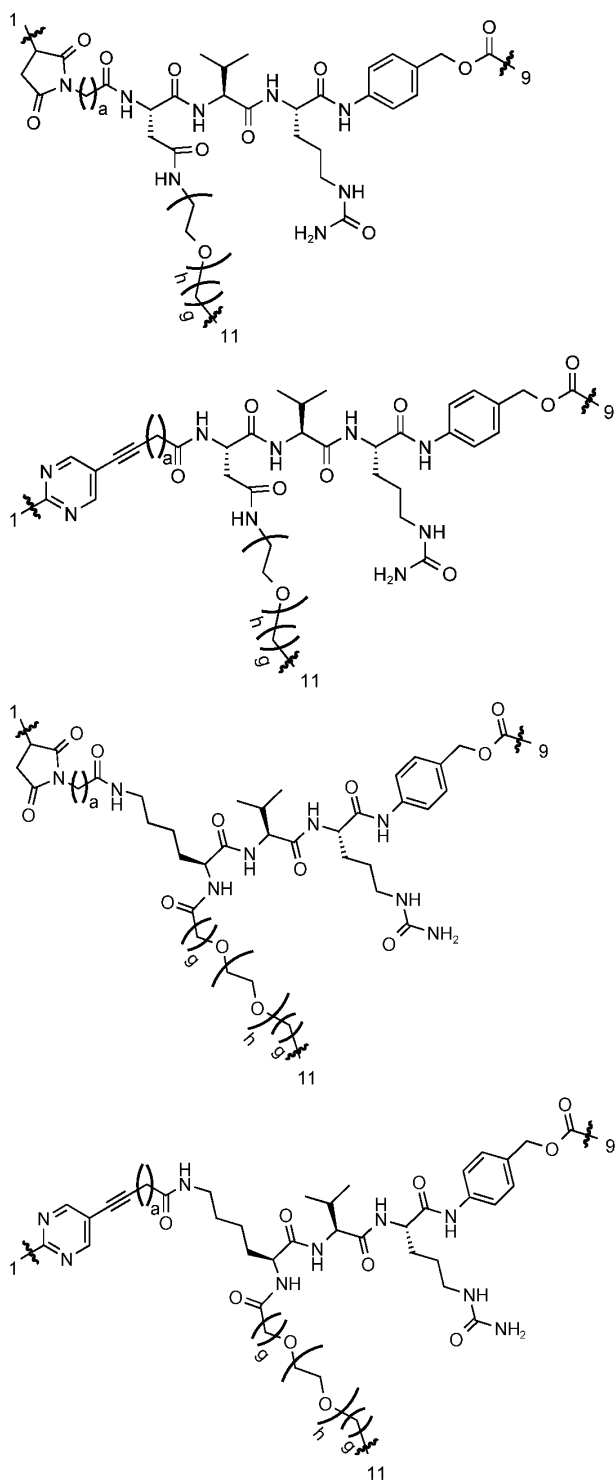
选自：

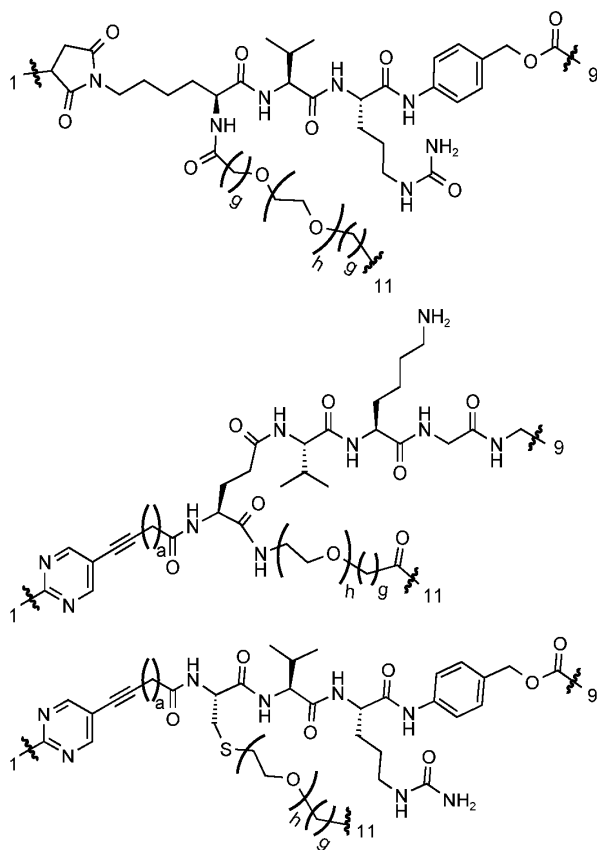




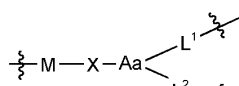
5



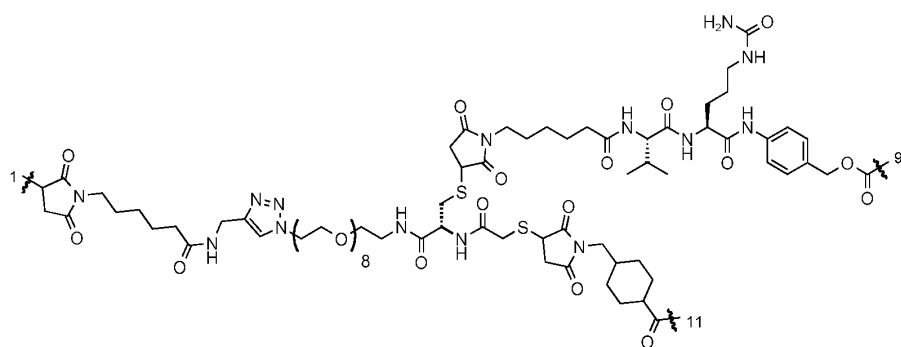


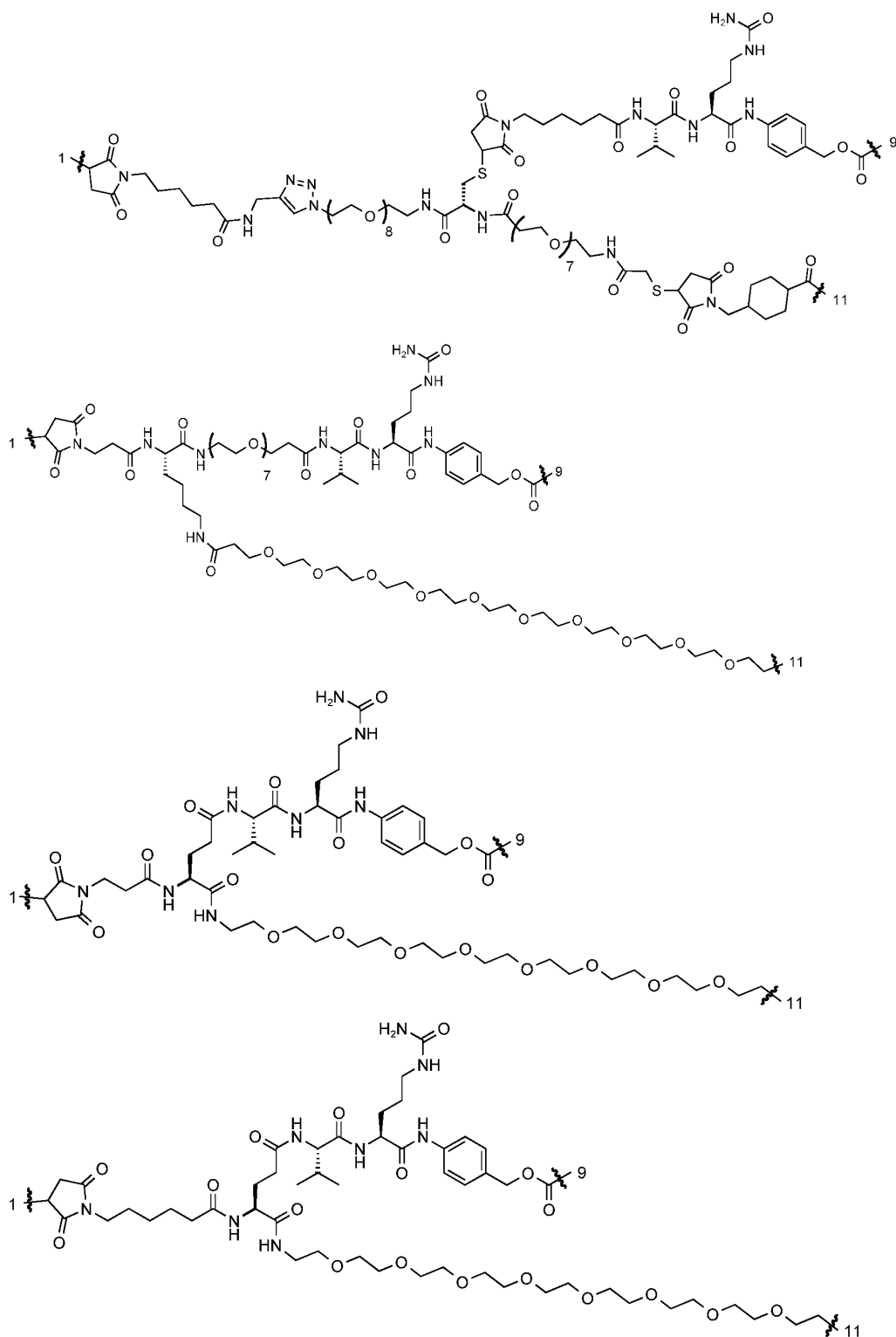


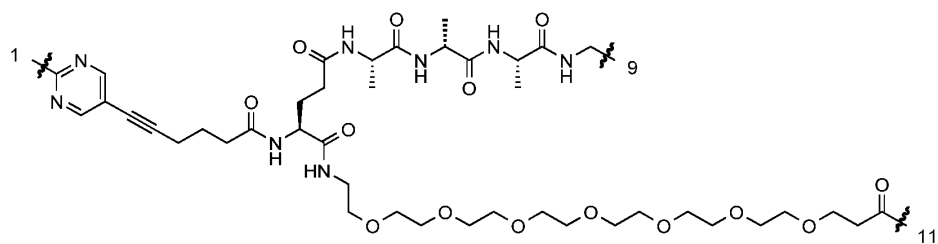
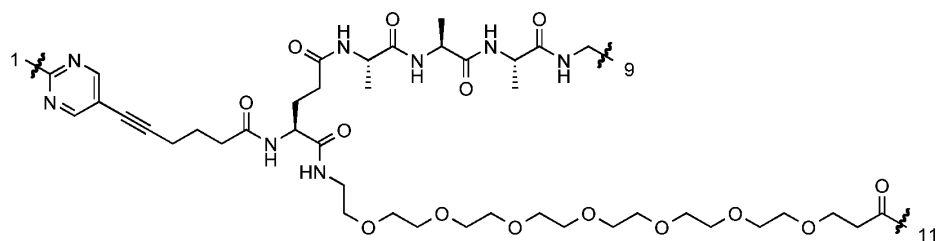
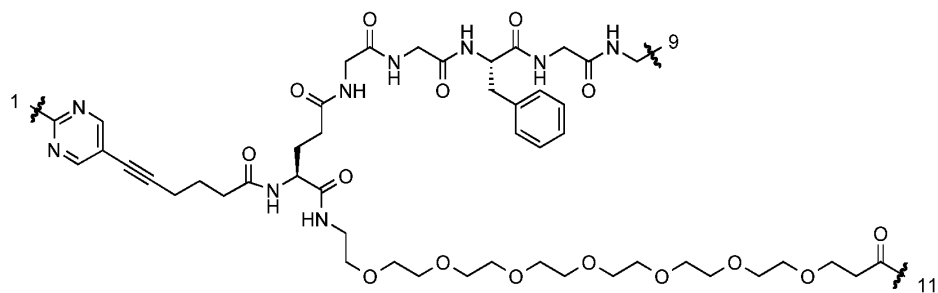
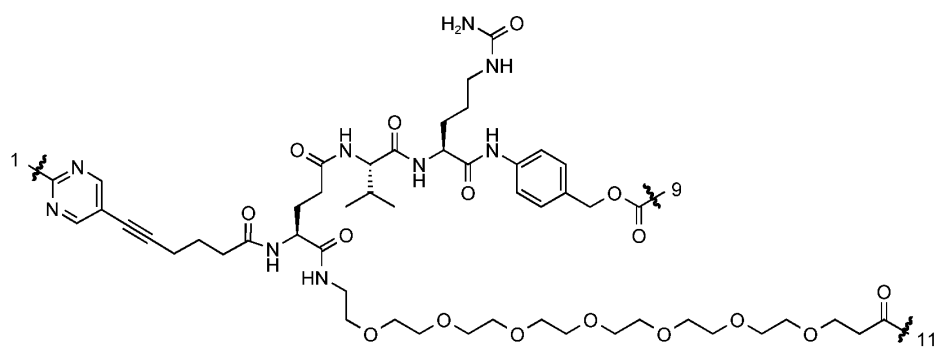
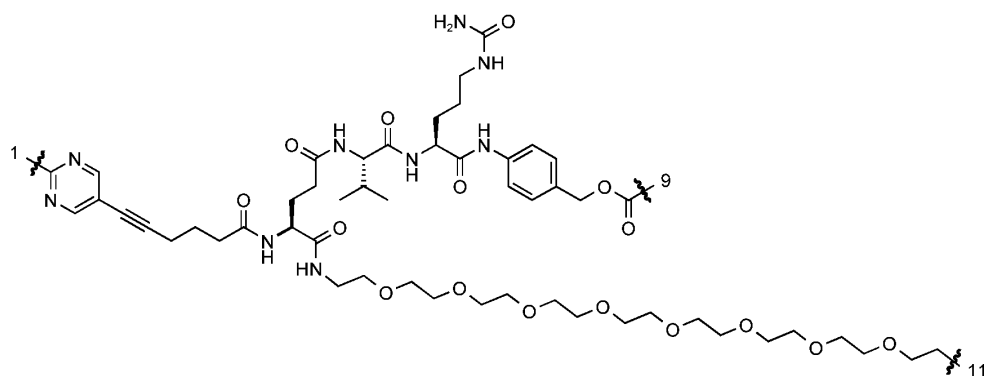
- ，其中，各 **a** 独立地选自 0-6 的整数，各 **c** 独立地选自 0-6 的整数，各 **d** 独立地选自 1-10 的整数，各 **e** 独立地选自 0-6 的整数，
- 5 各 **f** 独立地选自 1-10 的整数，各 **g** 独立地选自 0-6 的整数，各 **h** 独立地选自 1-10 的整数；1 位置与 **Ab'** 相连，9 位置与 **D¹** 相连，11 位置与 **D²** 相连。

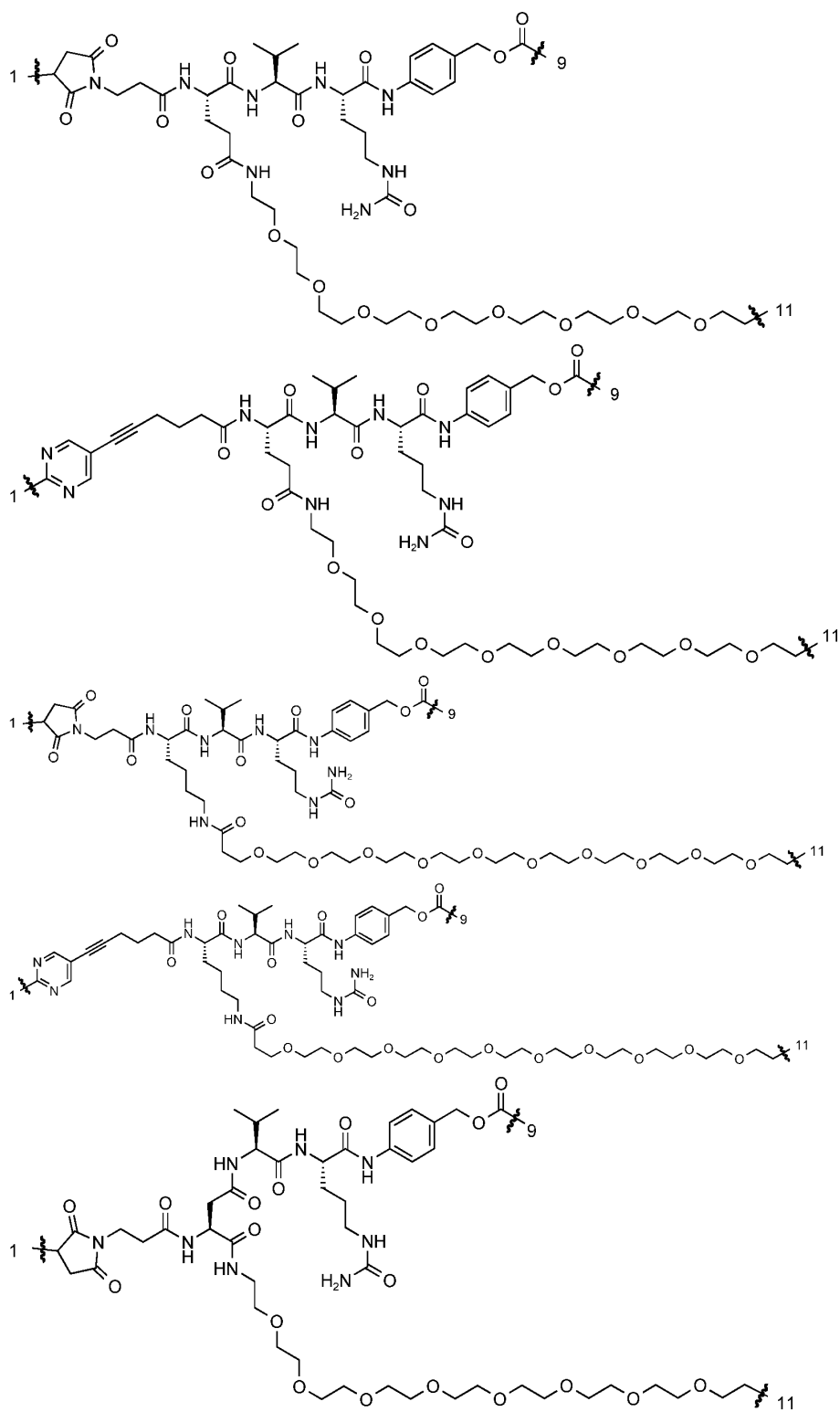


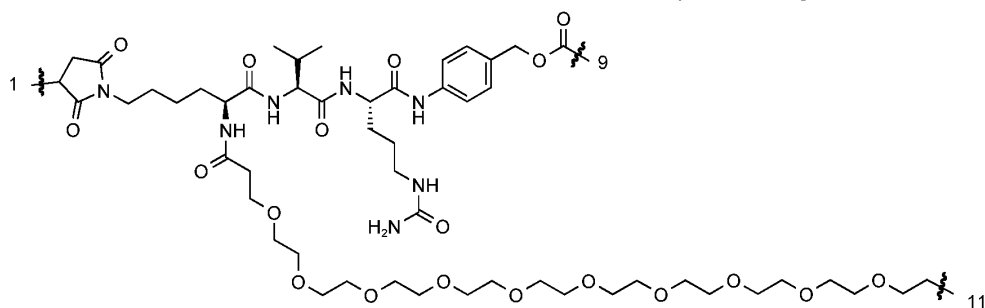
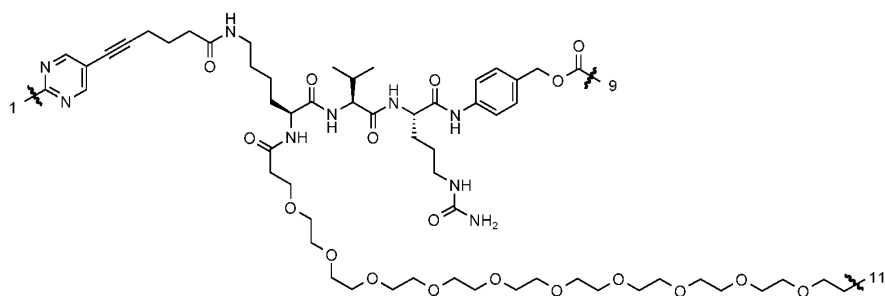
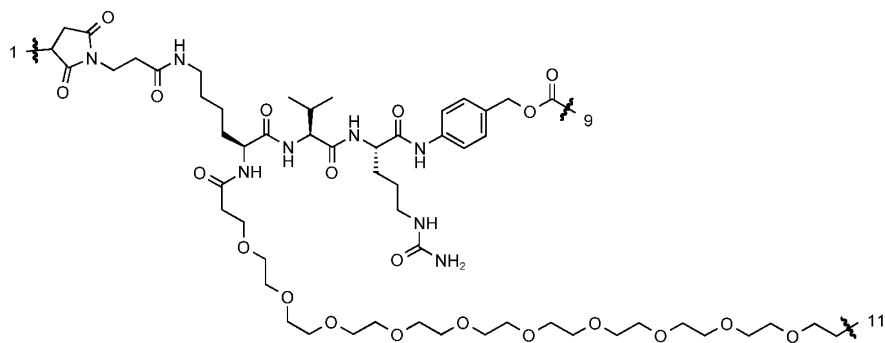
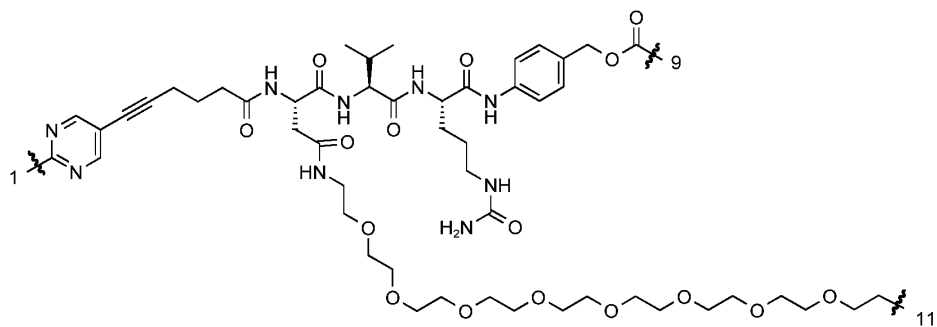
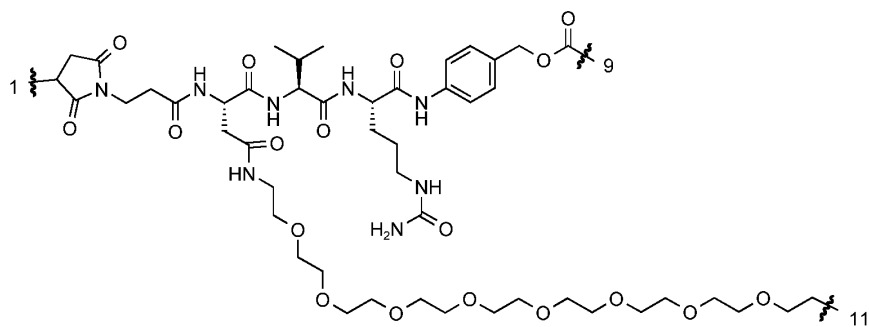
在一些实施方案中，选自：

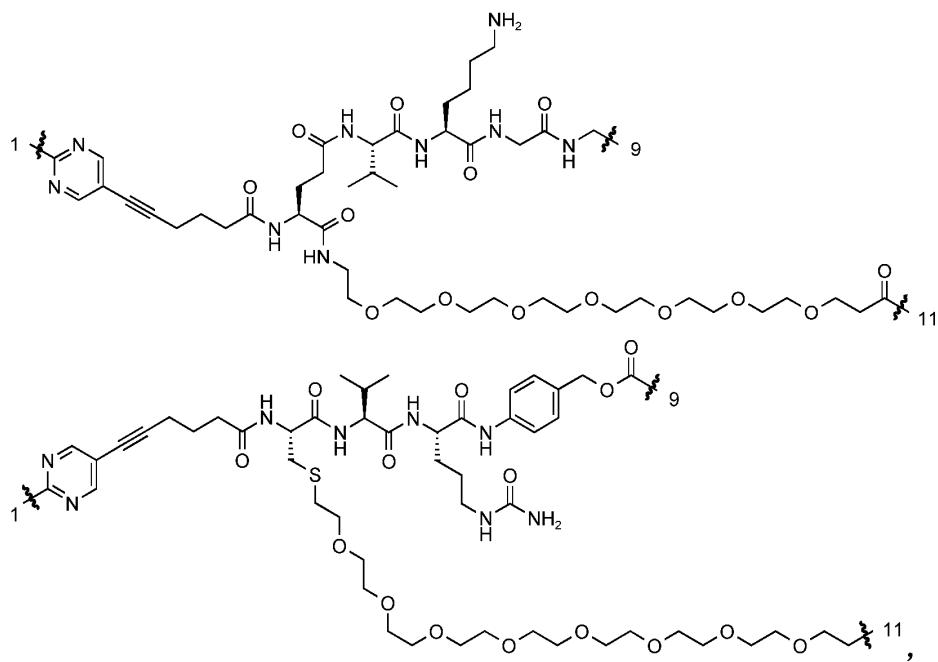






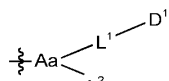




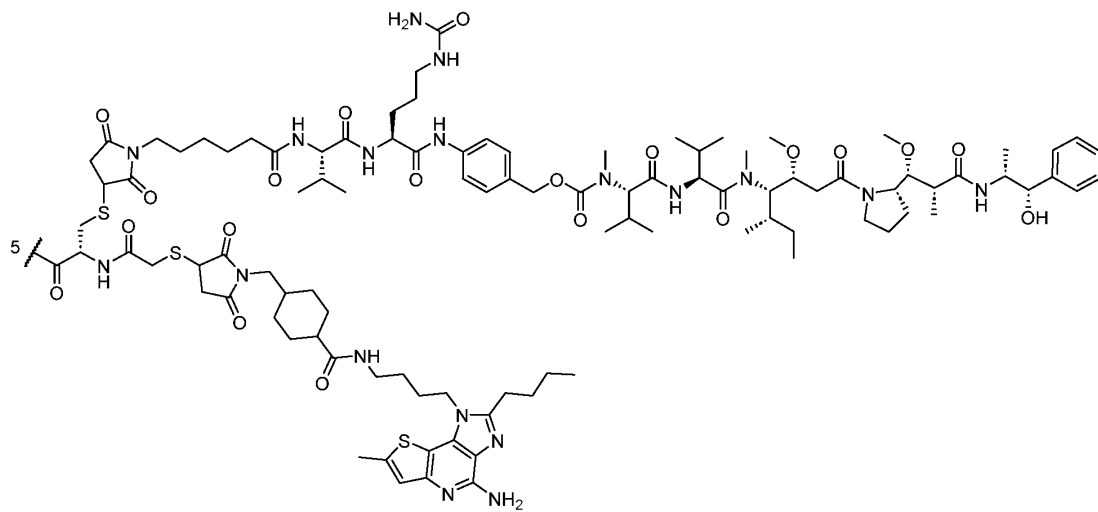


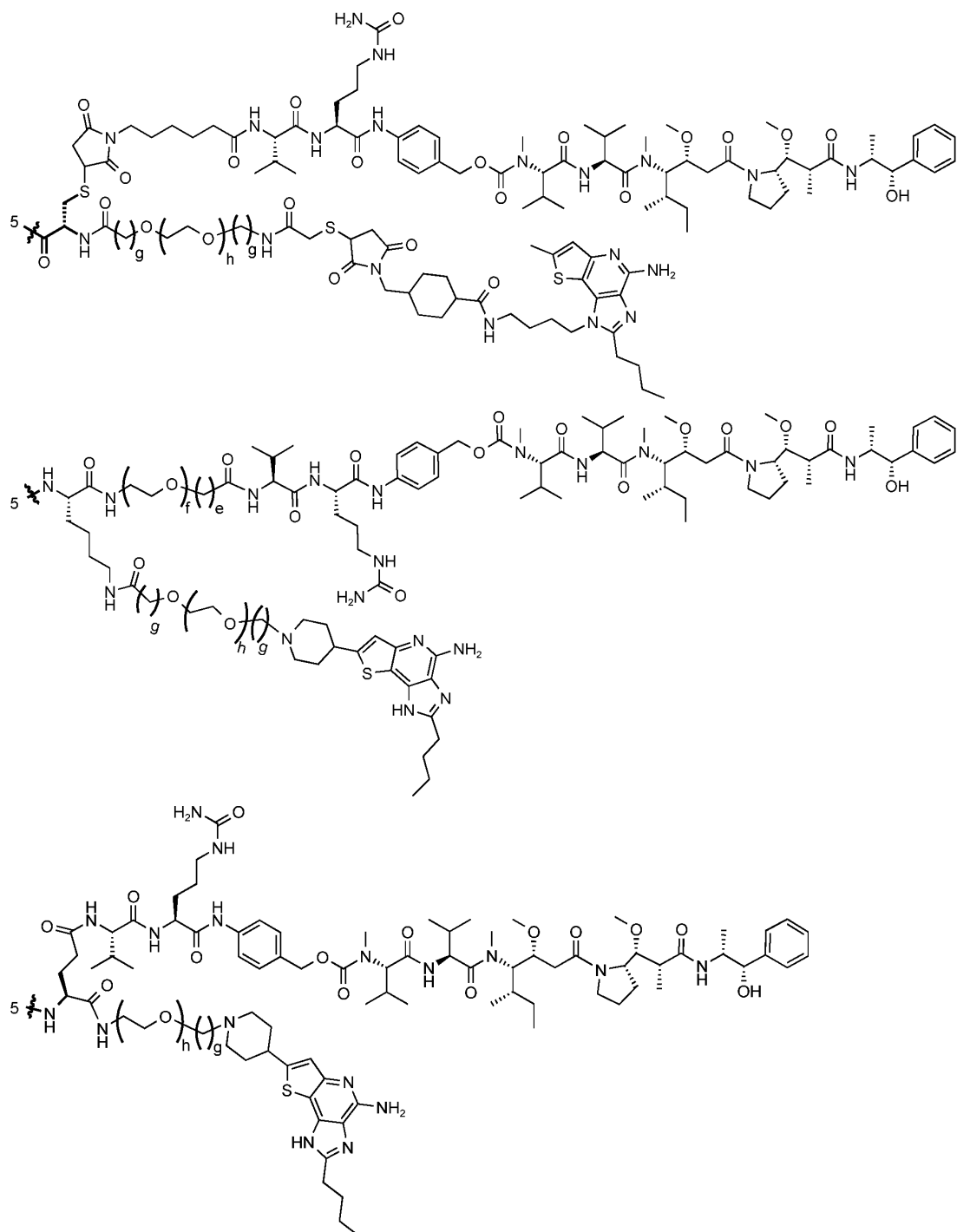
其中，1 位置与 Ab' 相连，9 位置与 D¹ 相连，11 位置与 D² 相连。

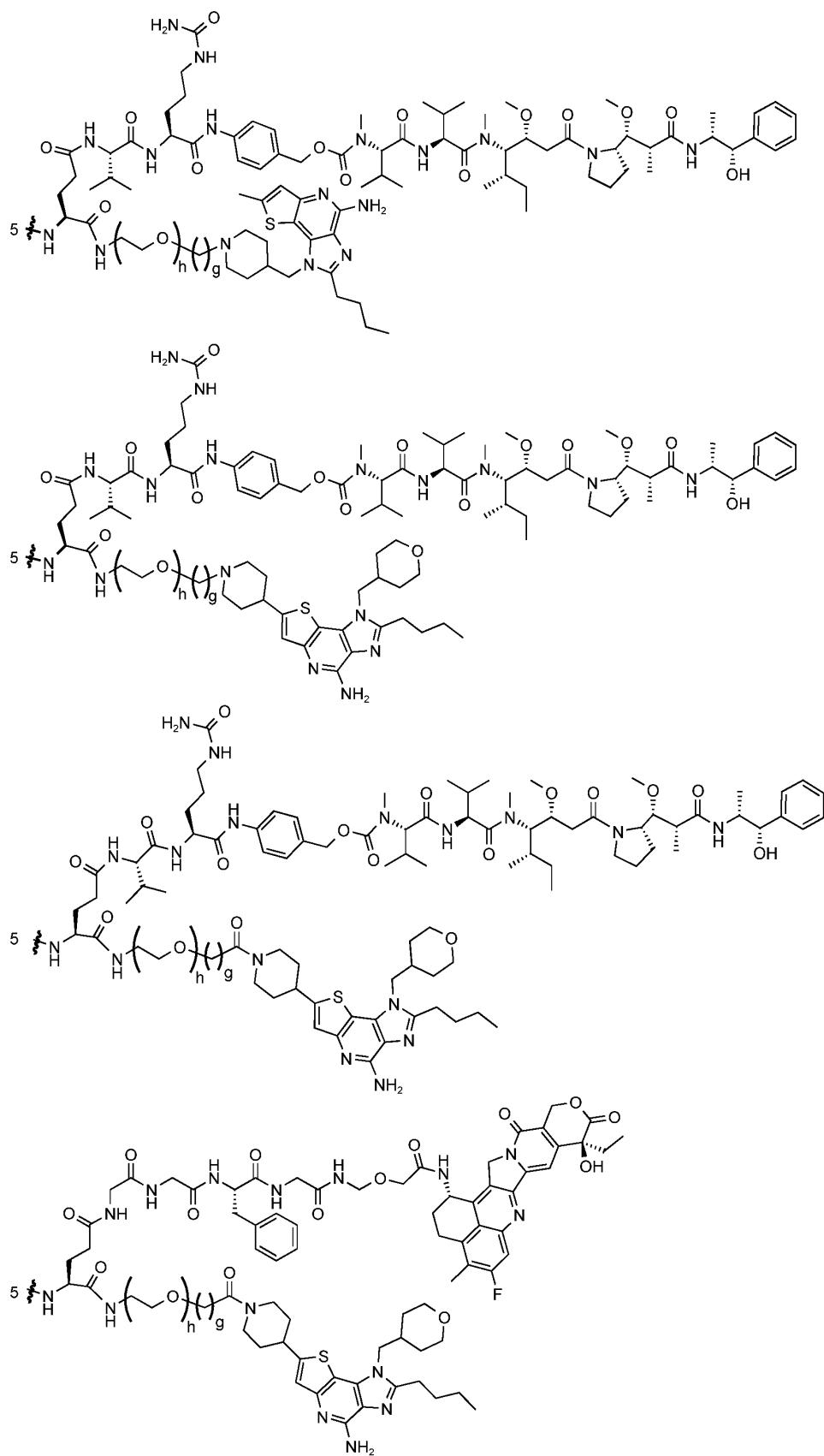
在一些实施方案中，

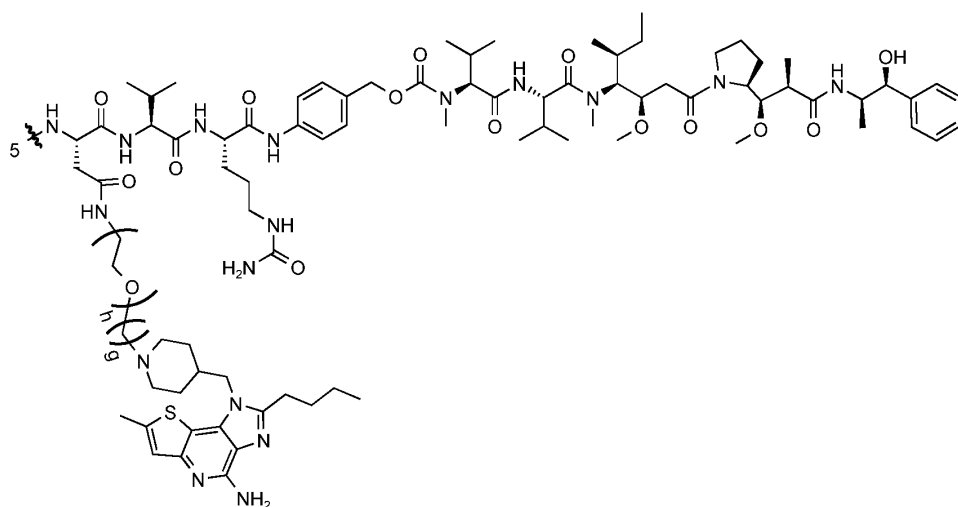
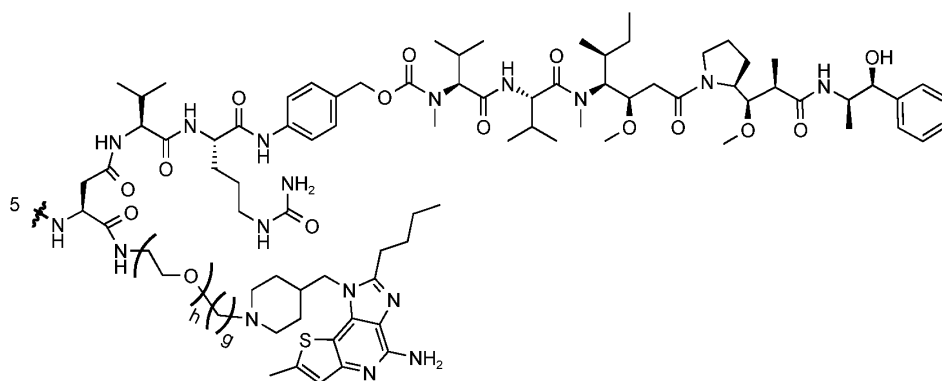
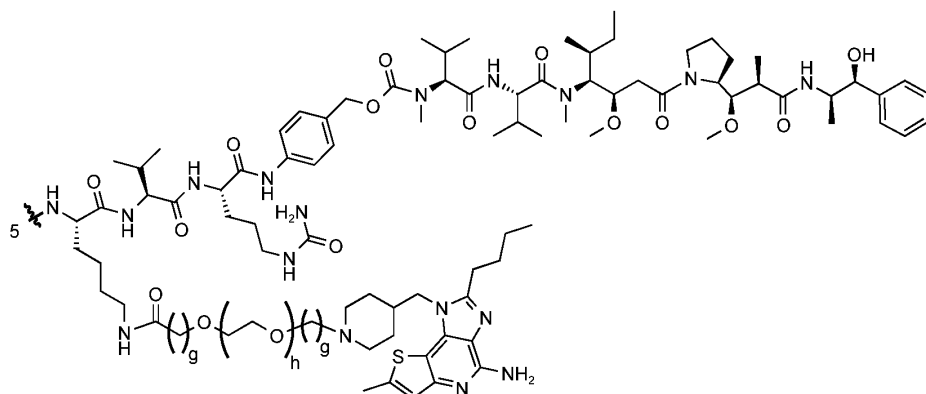


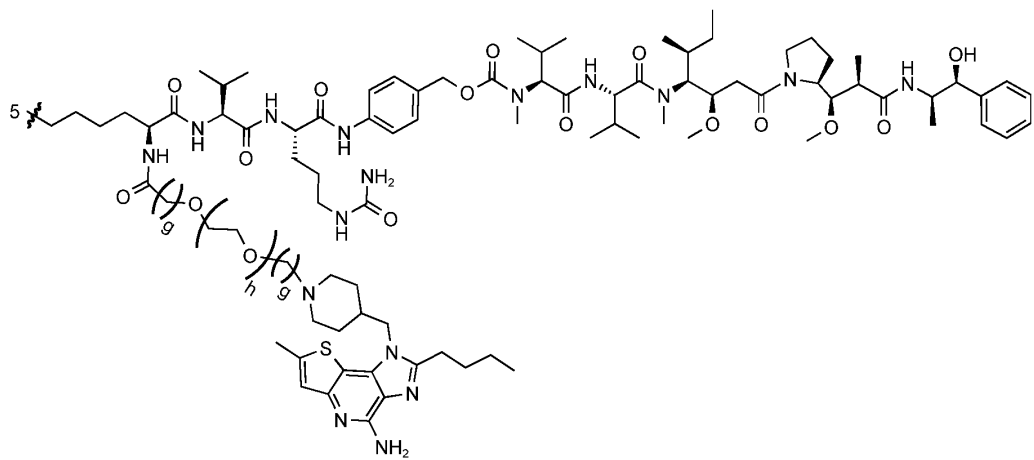
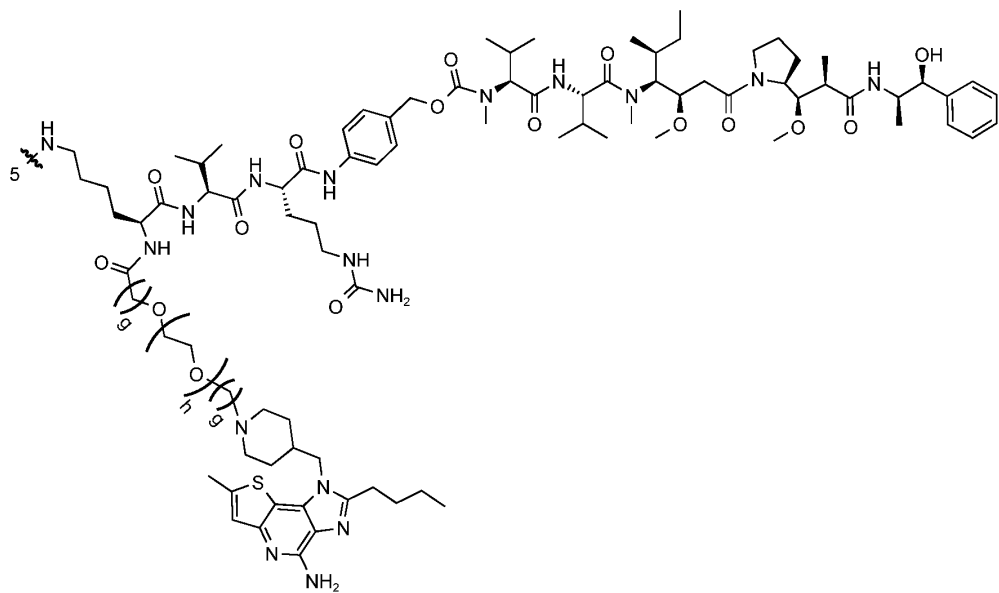
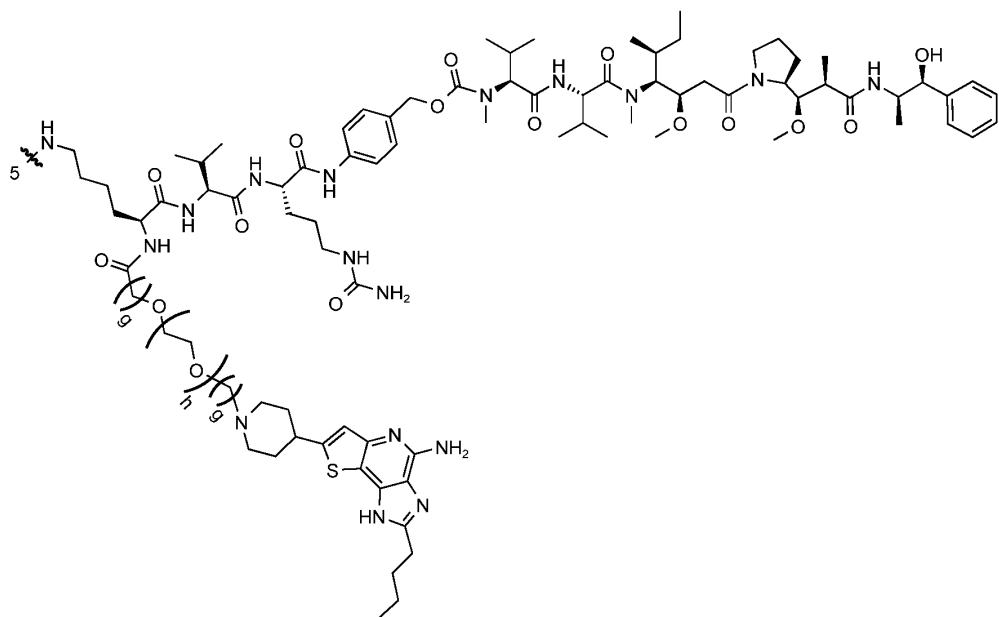
在 D¹ 和 D² 选自：

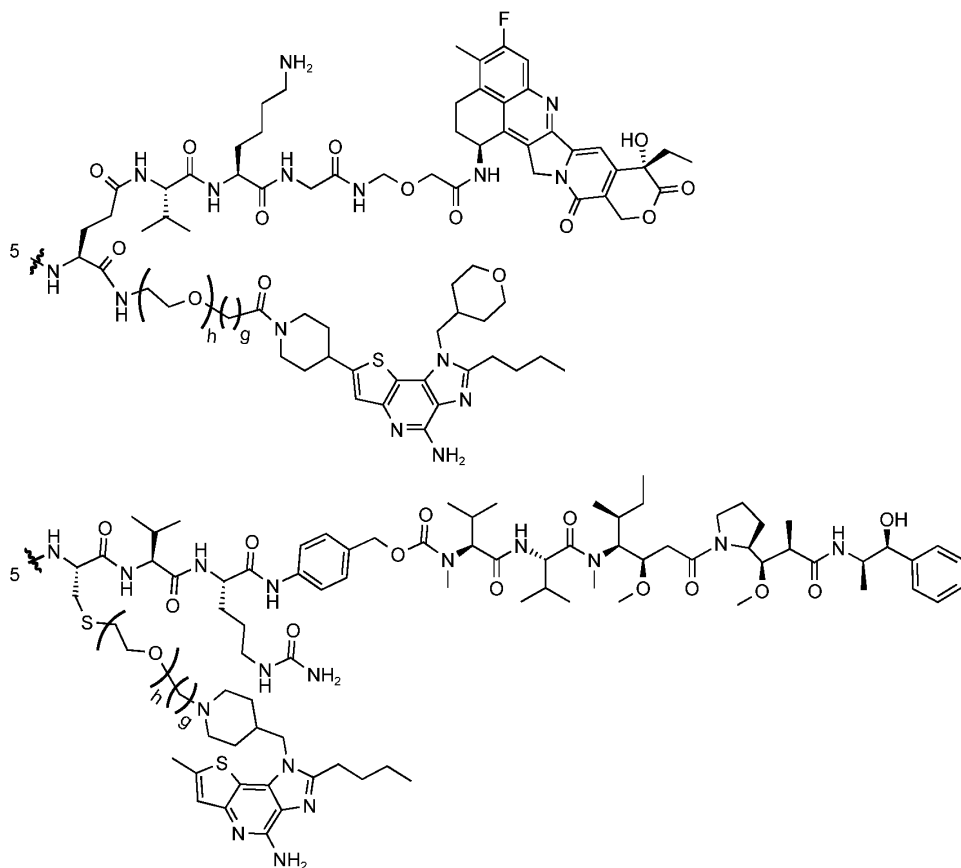










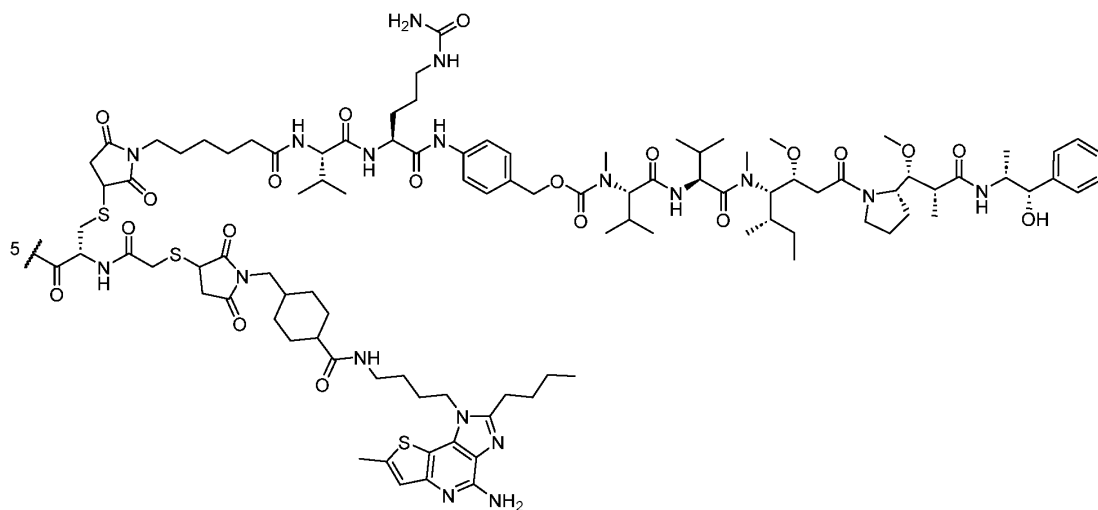


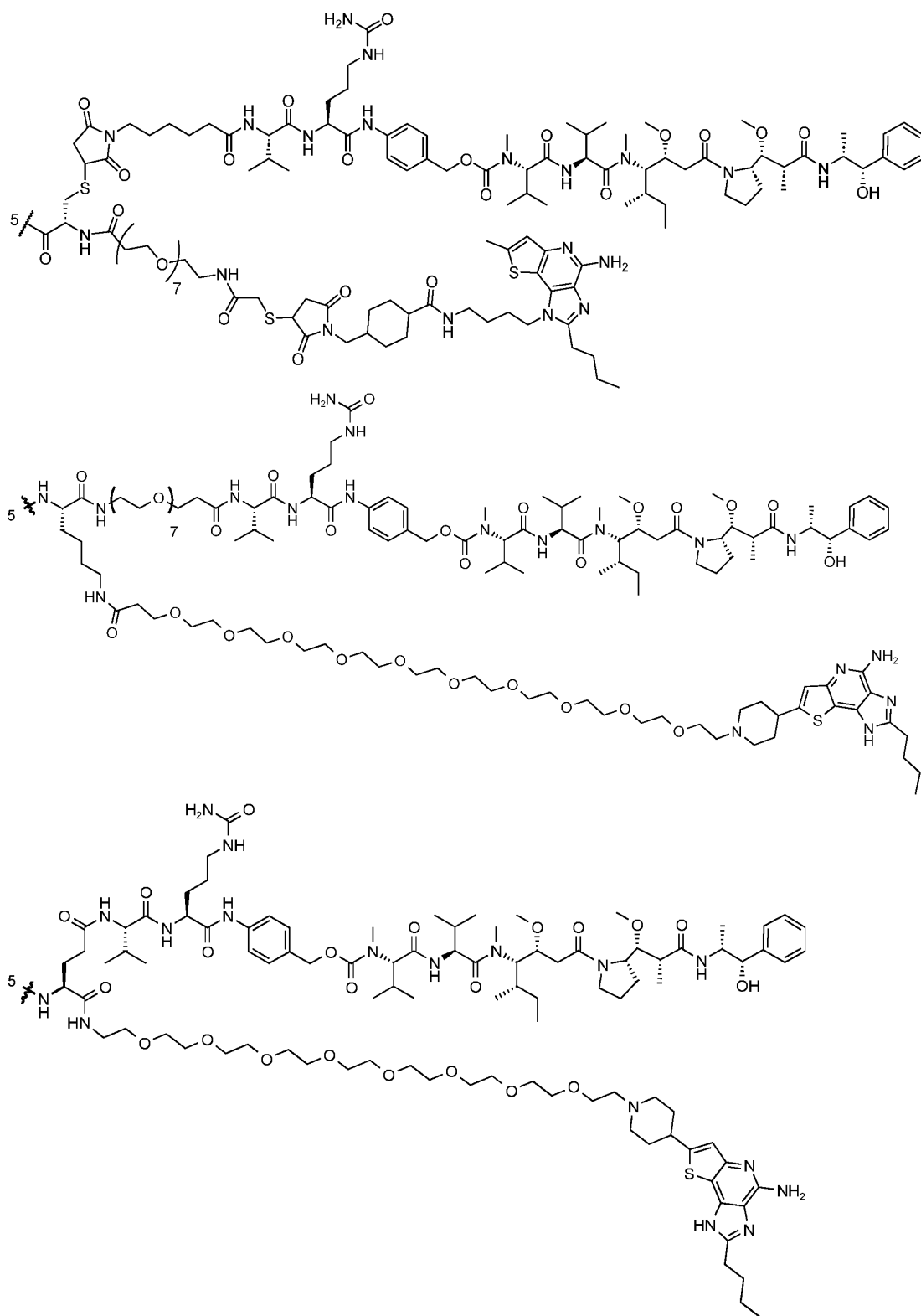
其中, 各 g 独立地选自 0-6 的整数, 各 h 独立地选自 1-10 的整数; 5 位置与 X 相连。

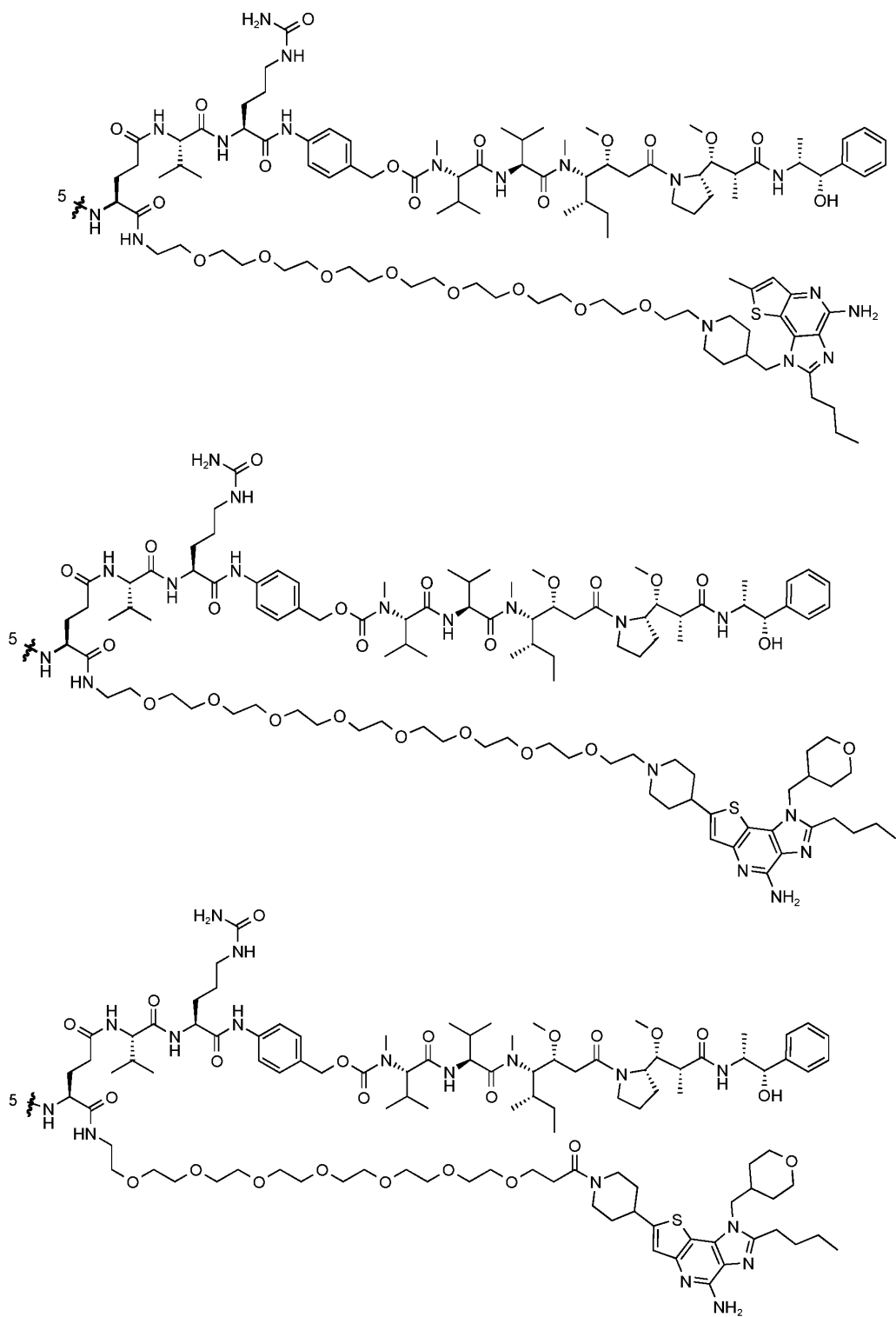
在一些实施方案中,

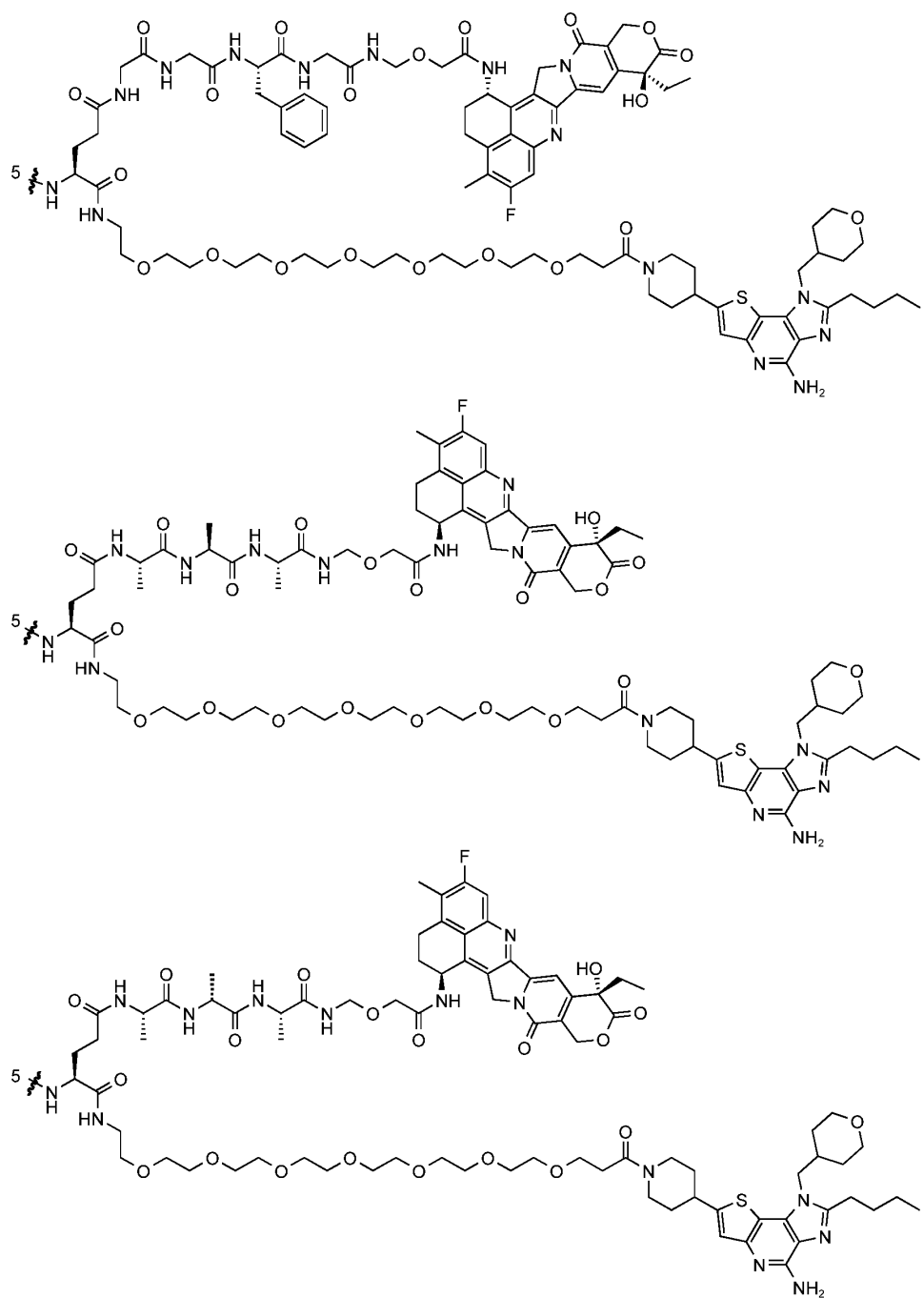
$$\begin{array}{c} \text{D}^1 \\ \text{L}^1 \\ \text{Aa} \\ \text{L}^2 \\ \text{D}^2 \end{array}$$

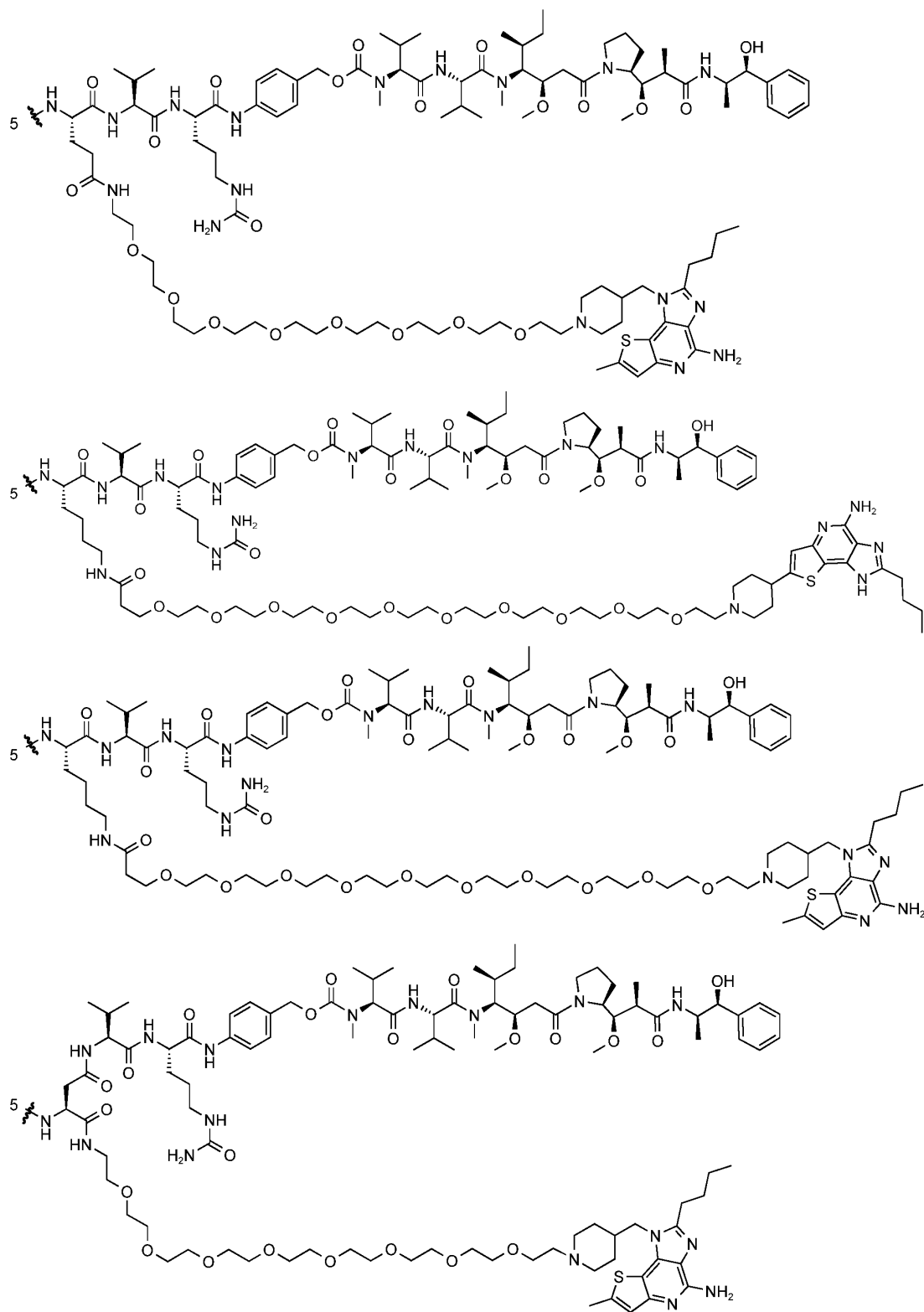
选自:

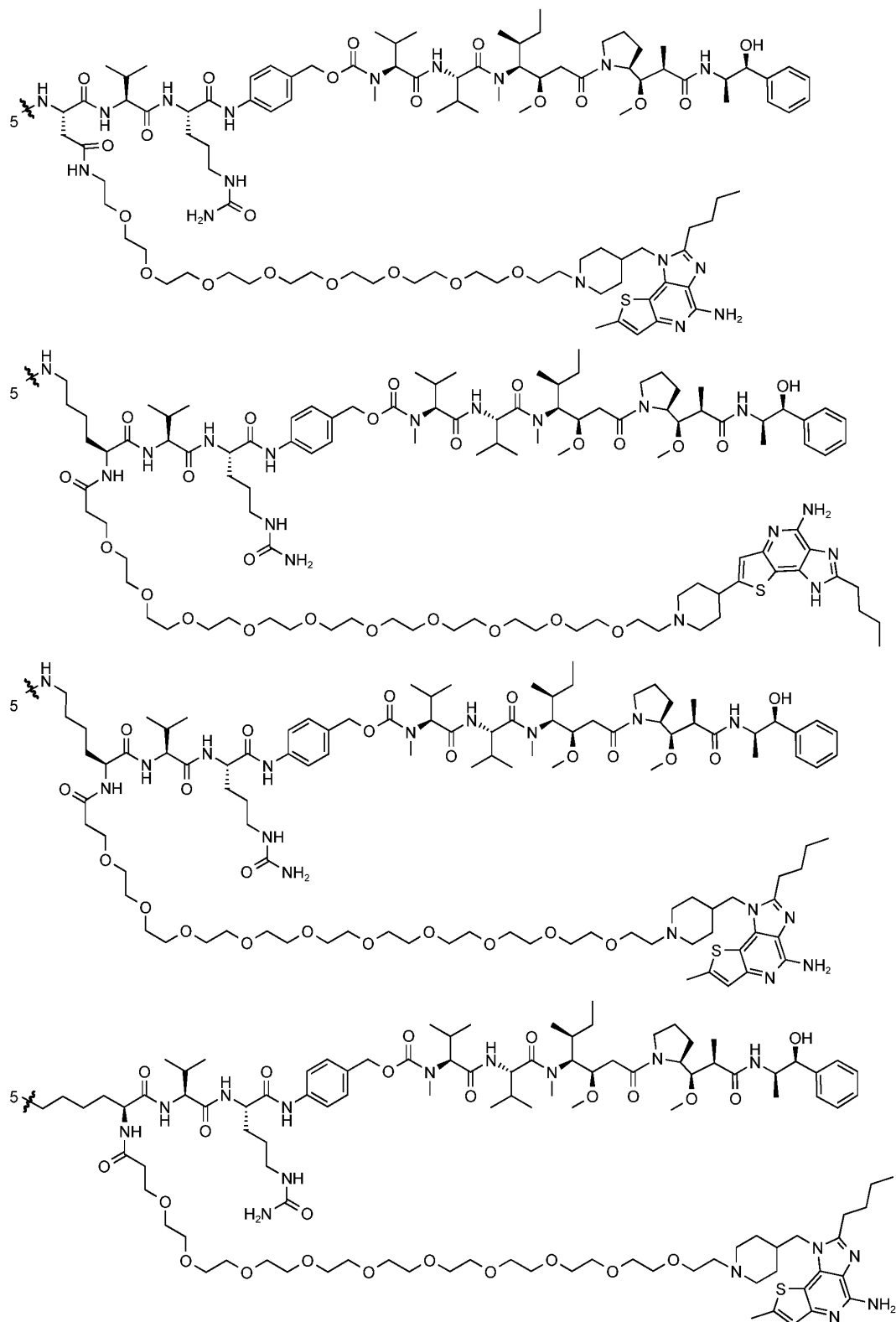


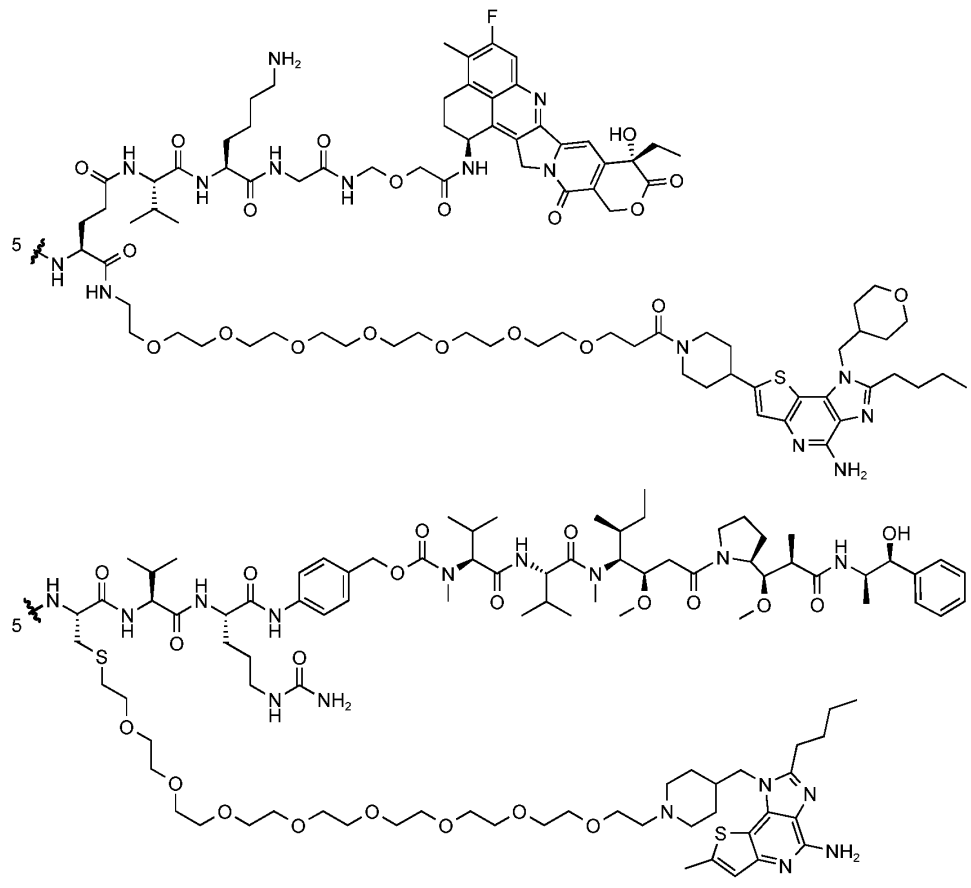






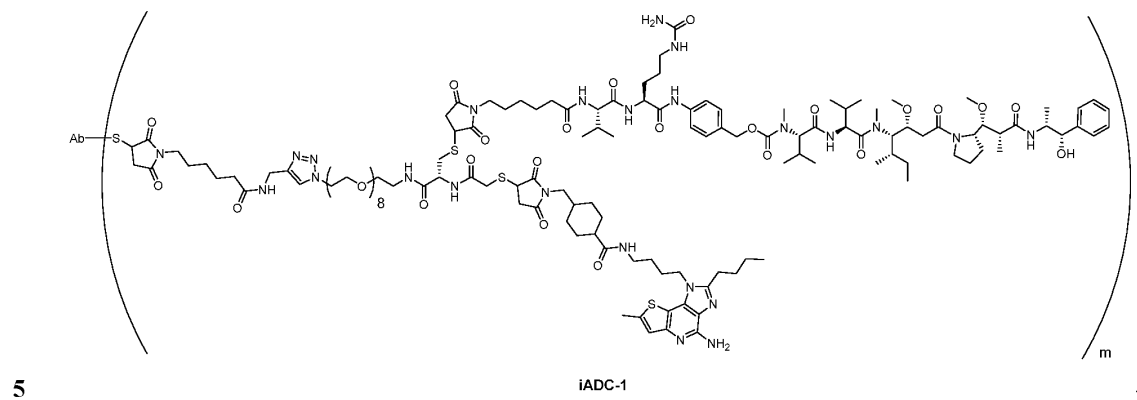


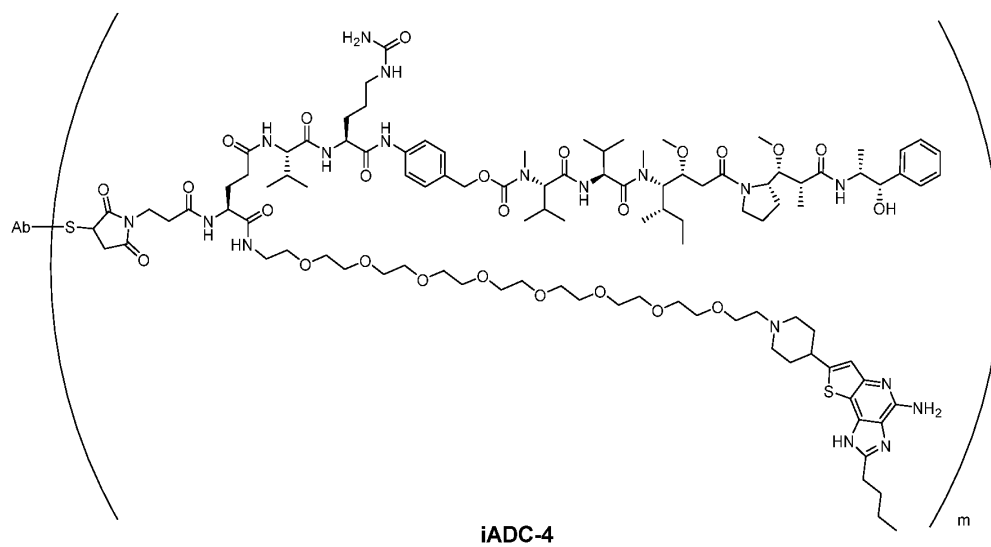
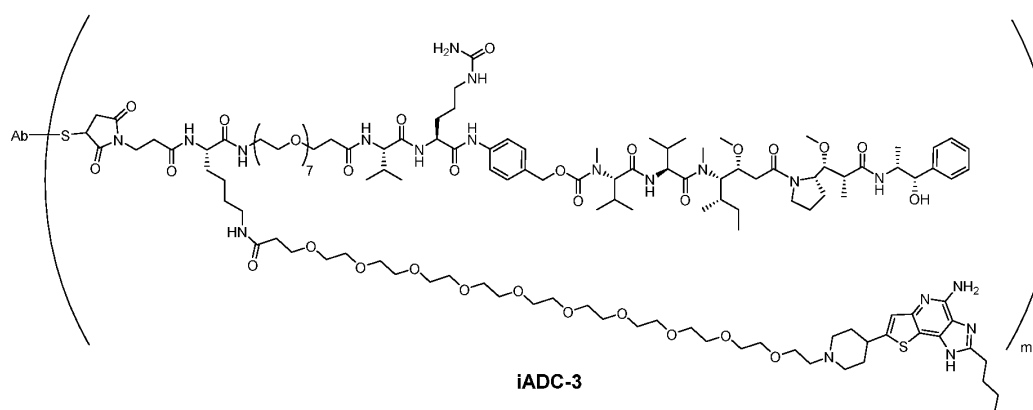
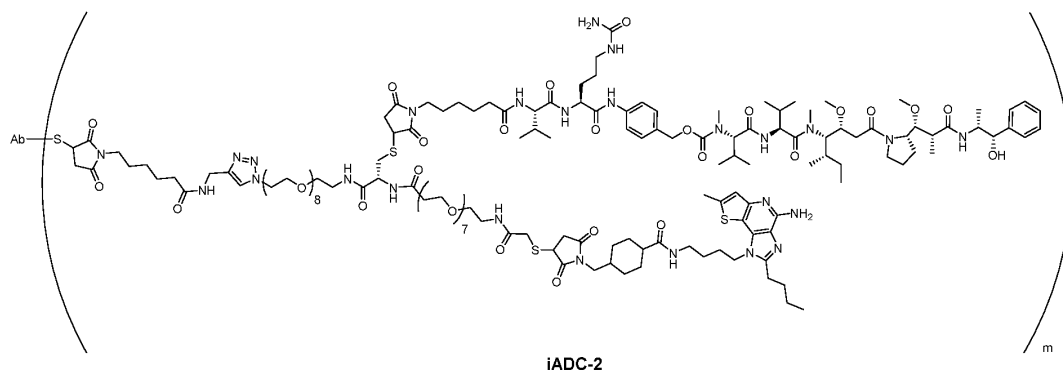


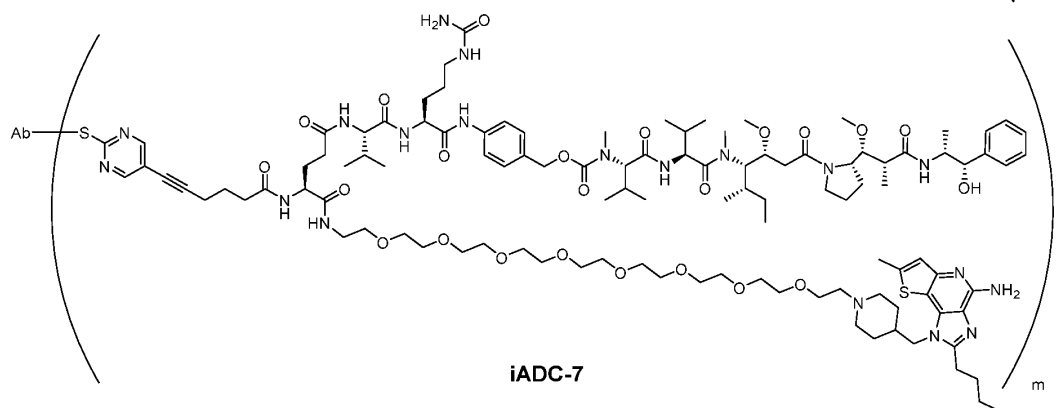
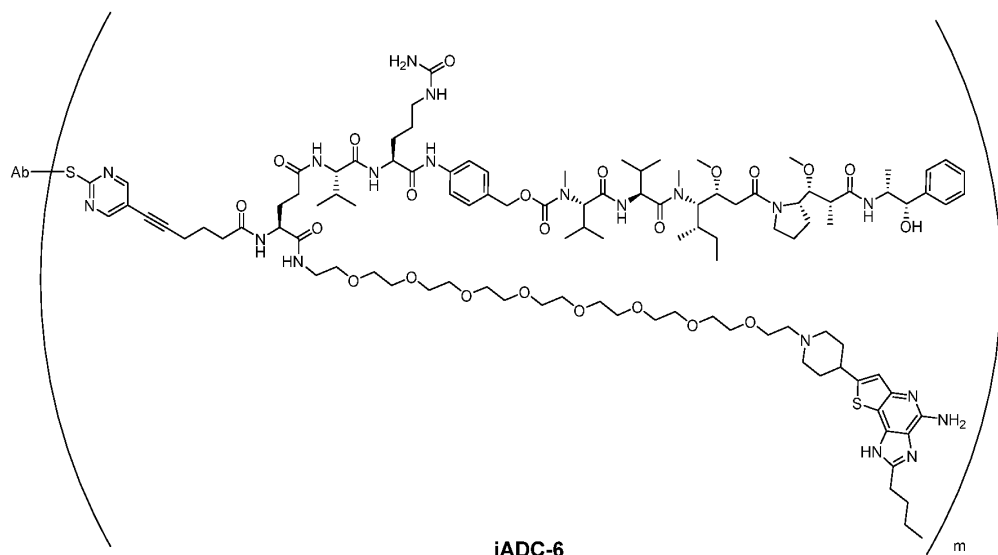
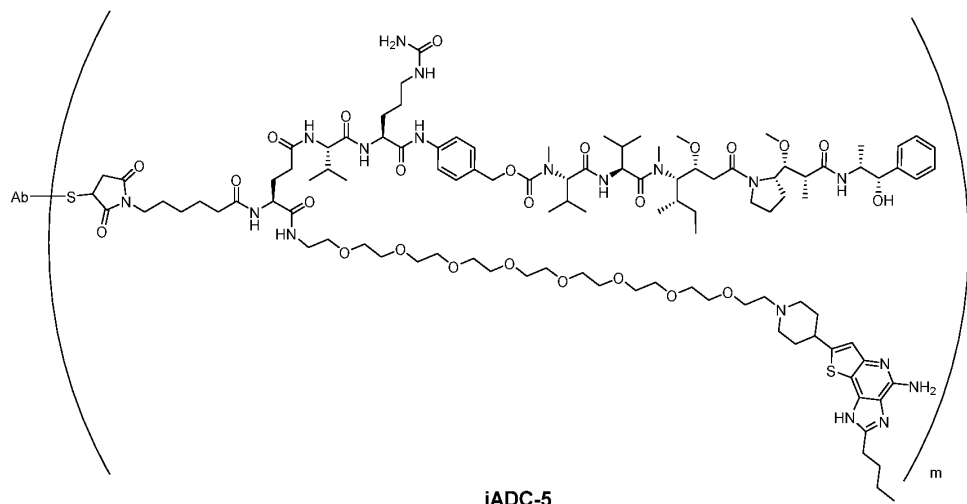


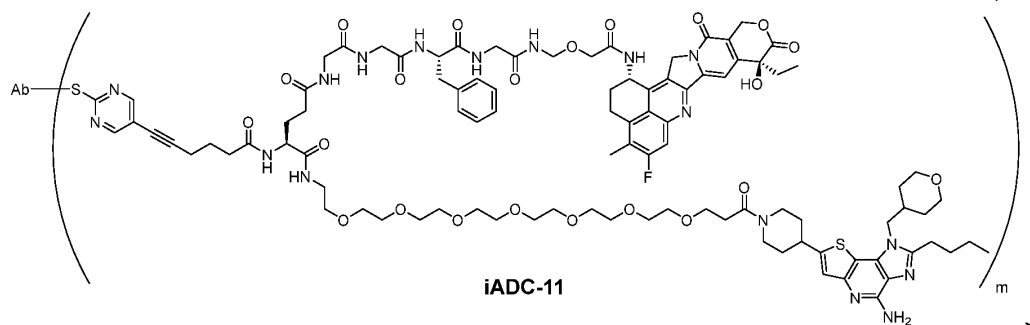
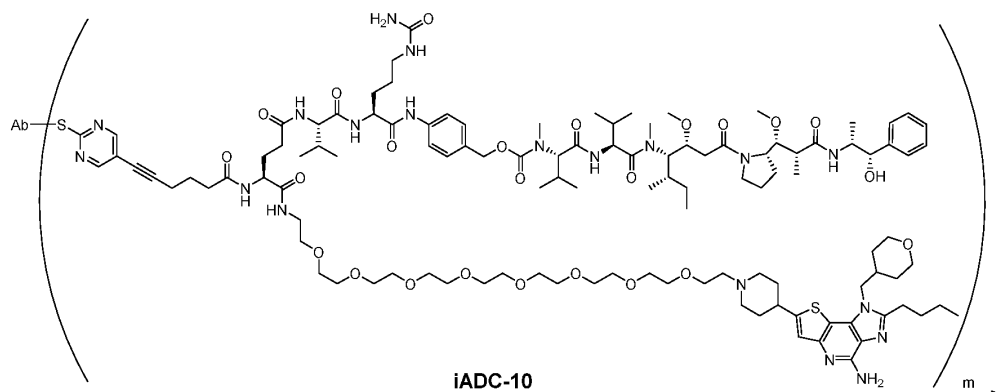
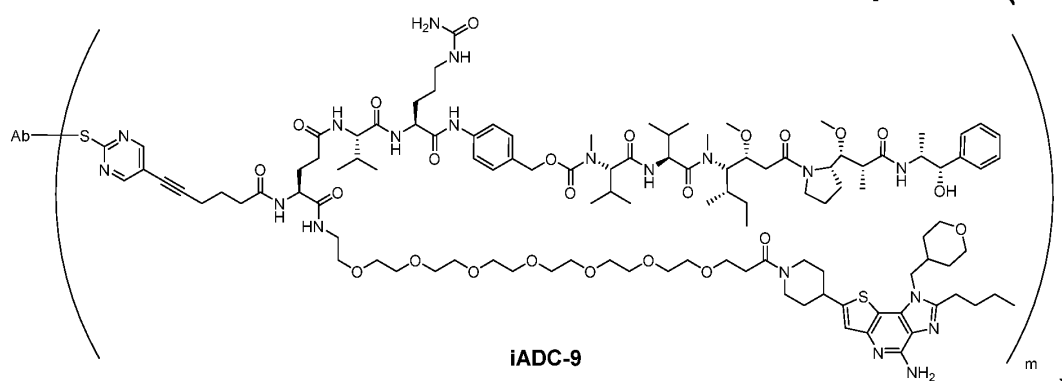
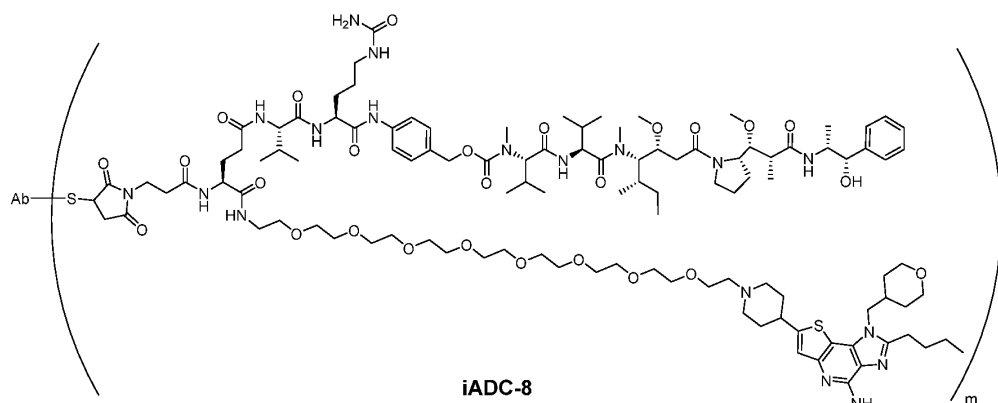
其中 5 位置与 X 相连。

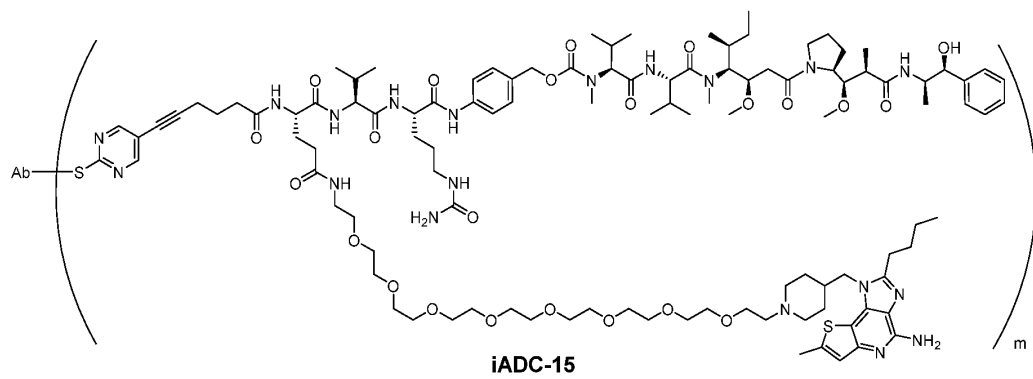
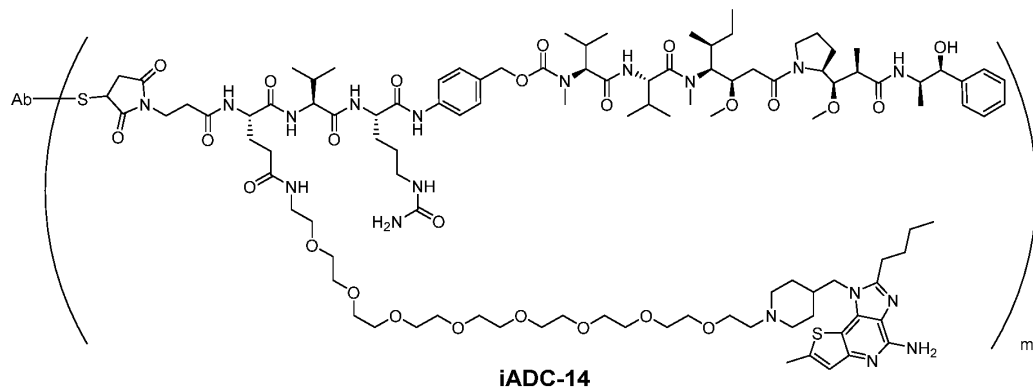
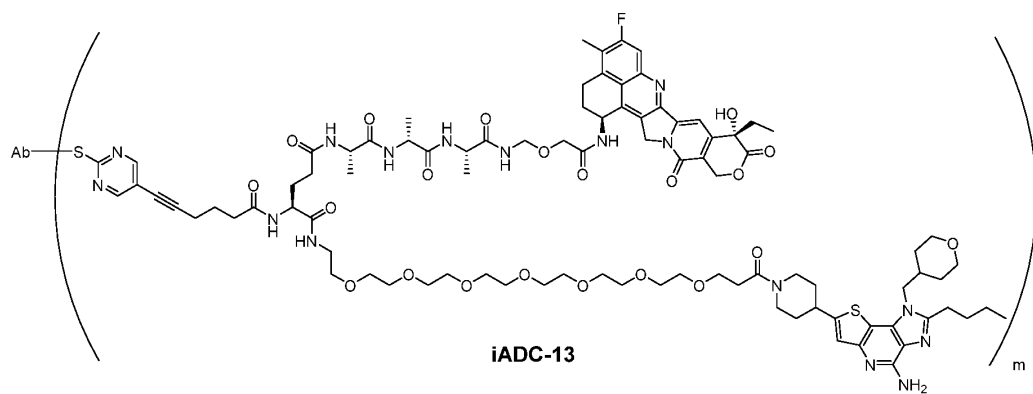
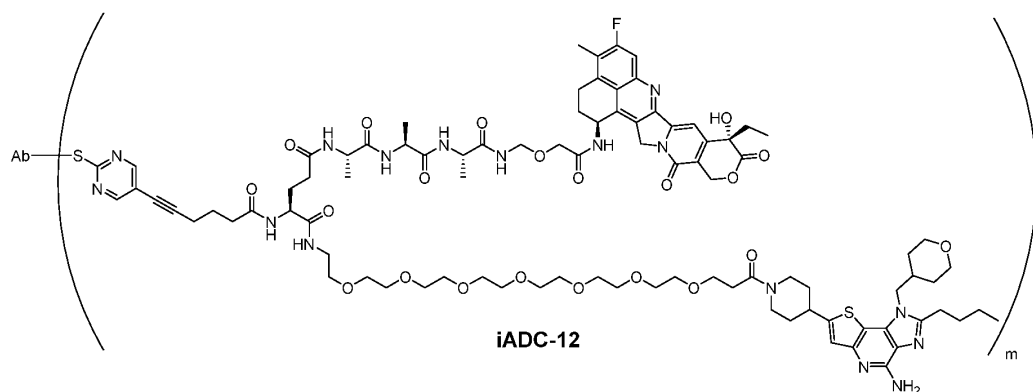
在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物选自以下的结构：

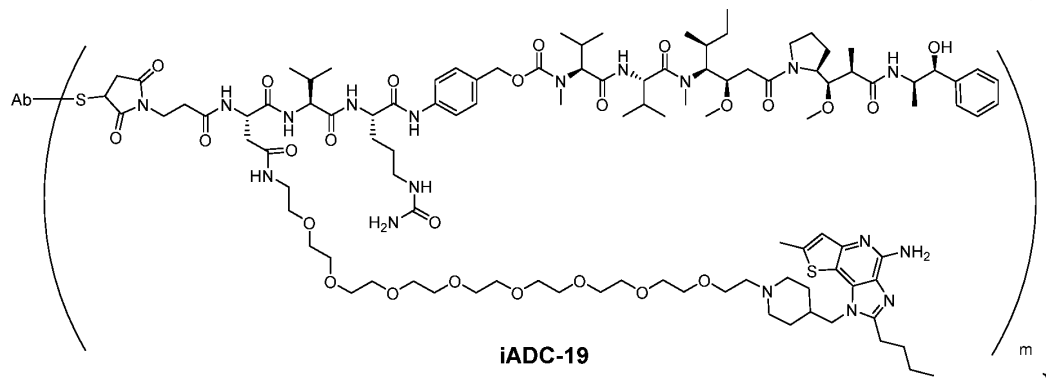
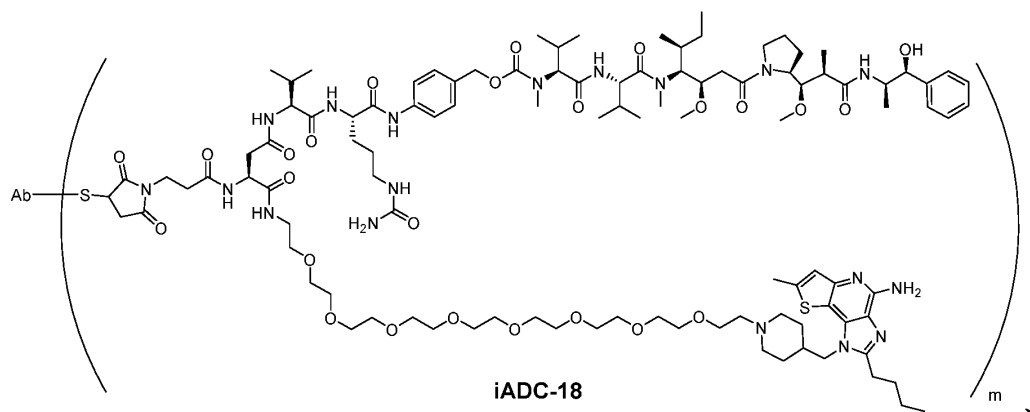
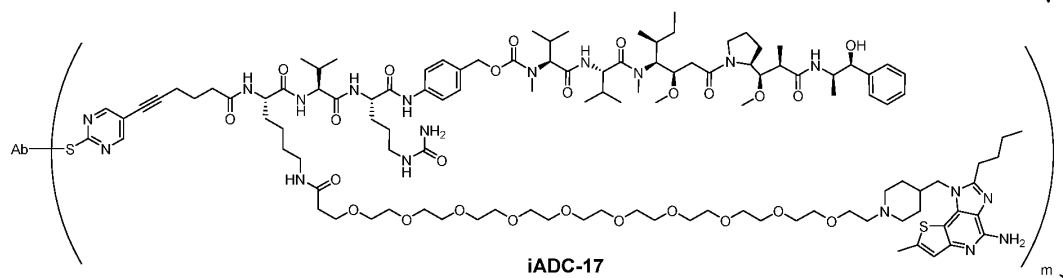
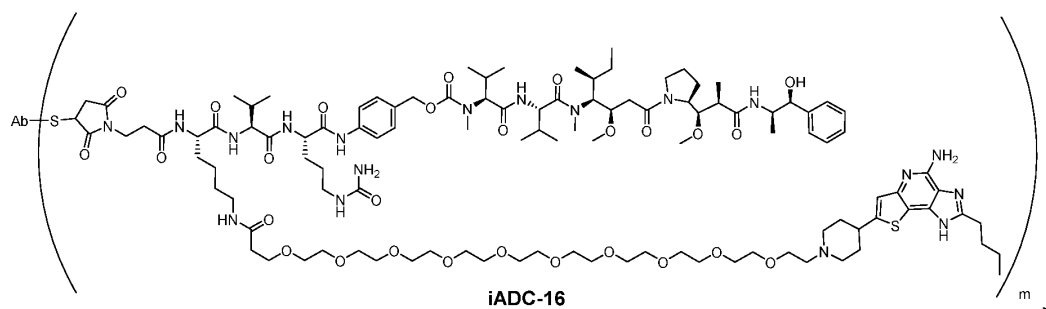


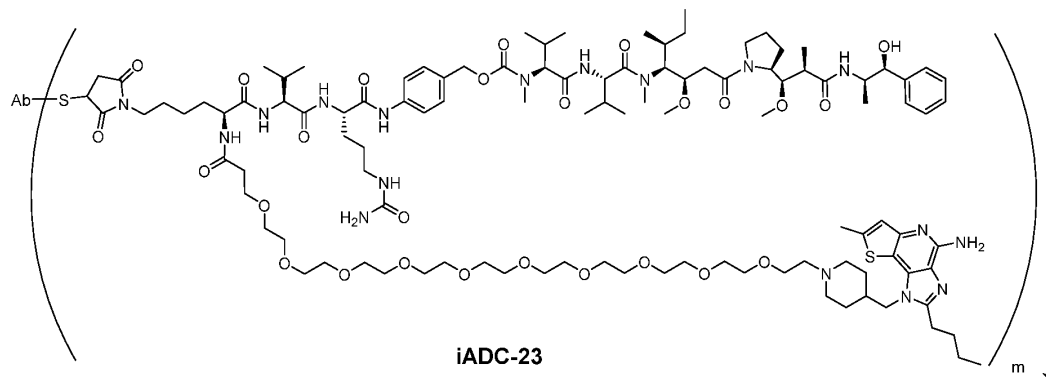
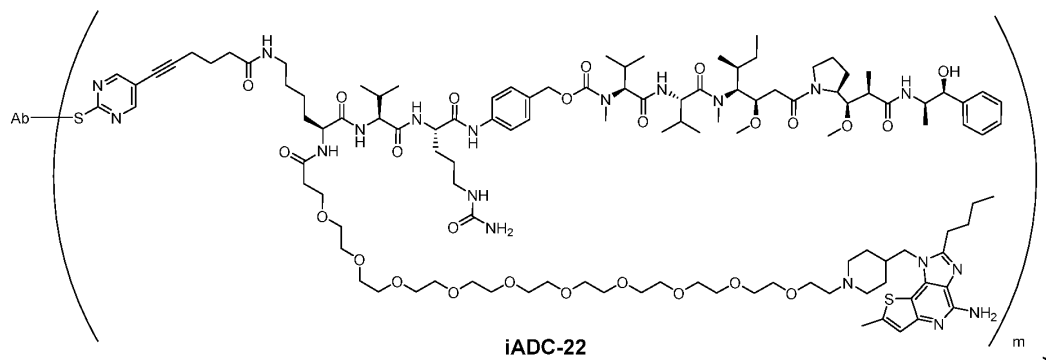
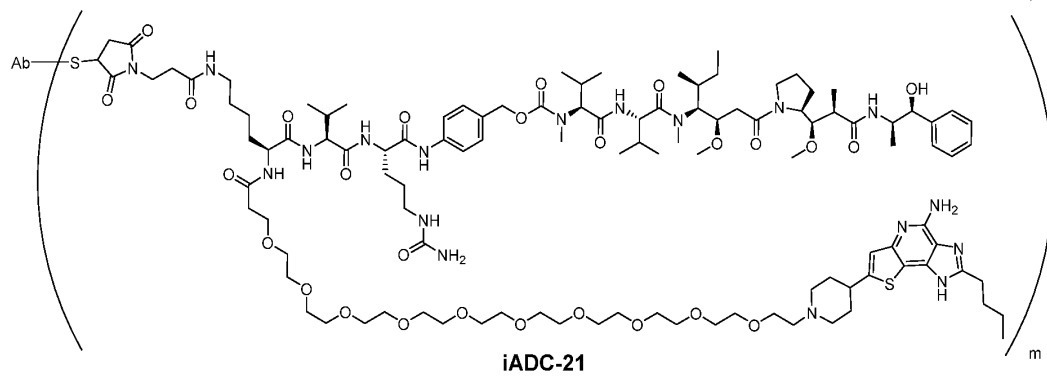
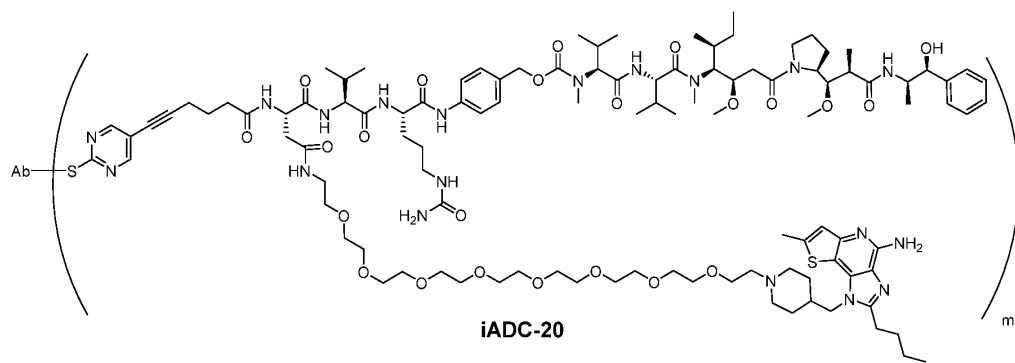


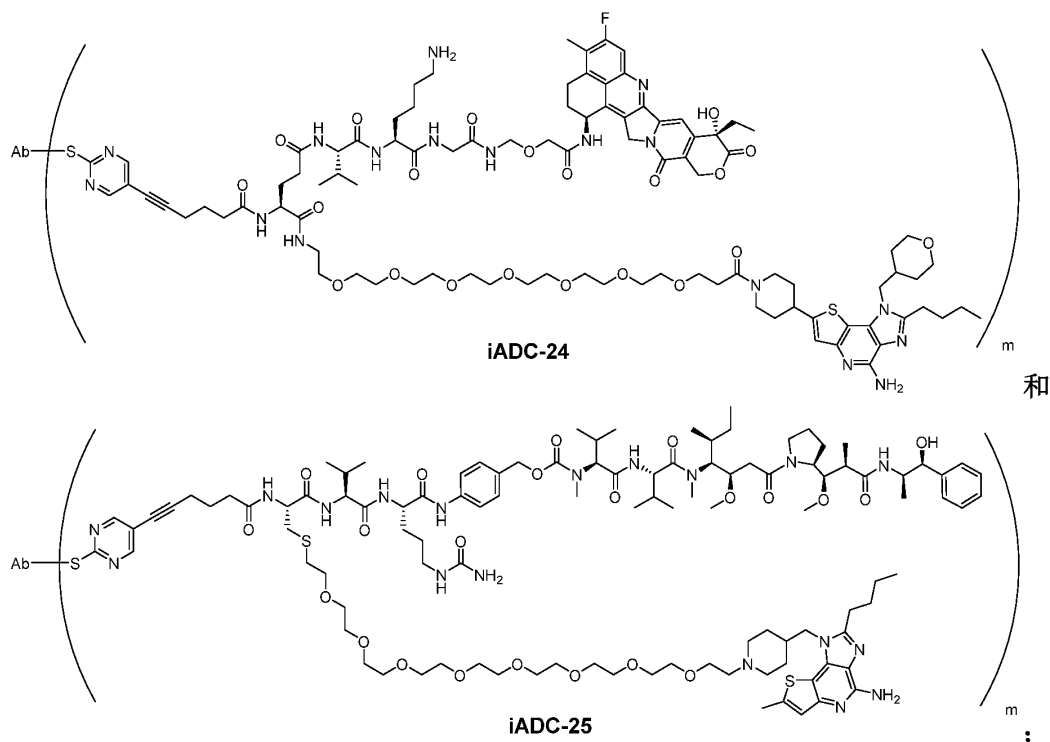












各 m 独立地选自 1-10，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一些实施方案中，各抗体药物偶联物中的 Ab-(S-为如前文任一项所定义的抗体或其抗原结合片段，Ab-(S-中的 S 源自抗体或其抗原结合片段中的巯基。在一些实施方案中，各抗体药物偶联物中的 Ab-(S-为包含如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH 或 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 的抗体或其抗原结合片段，例如为 Ab-01（其包含：SEQ ID NO: 22 所示的重链，和 SEQ ID NO: 21 所示的轻链），例如为 Ab-02（其包含：SEQ ID NO: 20 所示的重链，和 SEQ ID NO: 21 所示的轻链）。

10 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的重链或重链可变区和/或轻链或轻链可变区的 N 端谷氨酰胺经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐；和/或，所述重链或重链恒定区（CH）或其变体不存在 C-末端赖氨酸。

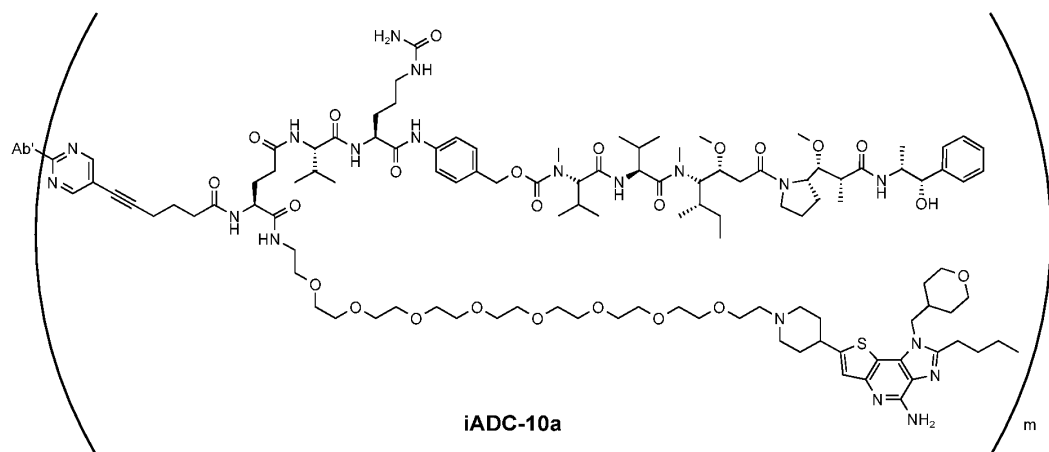
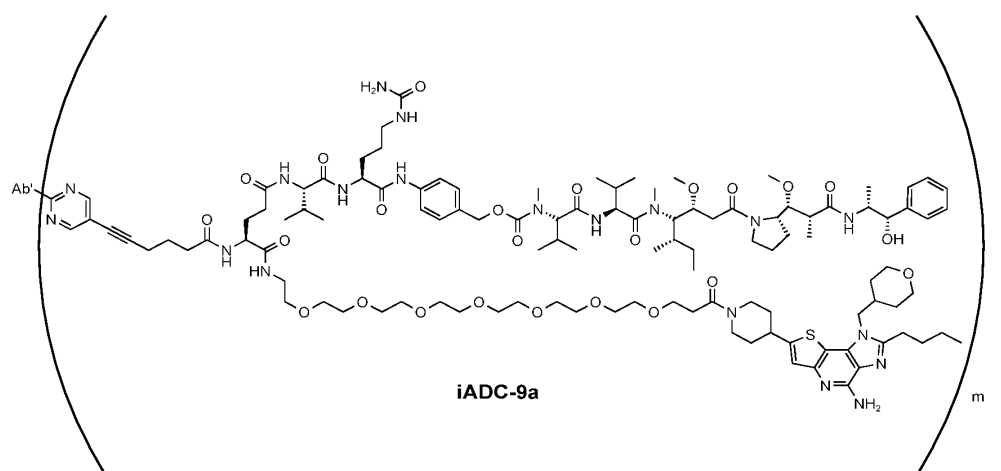
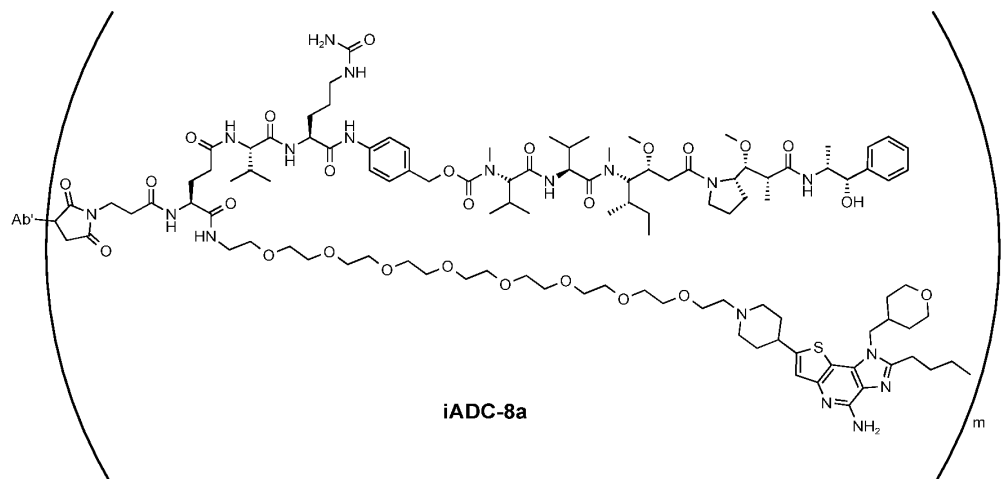
在一些实施方案中，本发明提供抗体药物偶联物的组合物，其包括前文任一项所定义的抗体药物偶联物，其中所述组合物的 DAR 值为 1.0-10.0，优选为 1.0~5.0，例如，
 15 1.0~1.5, 1.0~2.0, 1.0~2.5, 1.0~3.0, 1.0~3.5, 1.0~4.0, 1.0~4.5, 1.0~5.0, 2.0~2.5, 2.0~3.0, 2.0~3.5, 2.0~4.0, 2.0~4.5, 2.0~5.0, 2.5~3.0, 2.5~3.5, 2.5~4.0, 2.5~4.5, 2.5~5.0, 3.0~3.5, 3.0~4.0, 3.0~4.5, 3.0~5.0, 3.5~4.0, 3.5~4.5, 3.5~5.0, 4.0~4.5, 4.0~5.0, 4.5~5.0，例

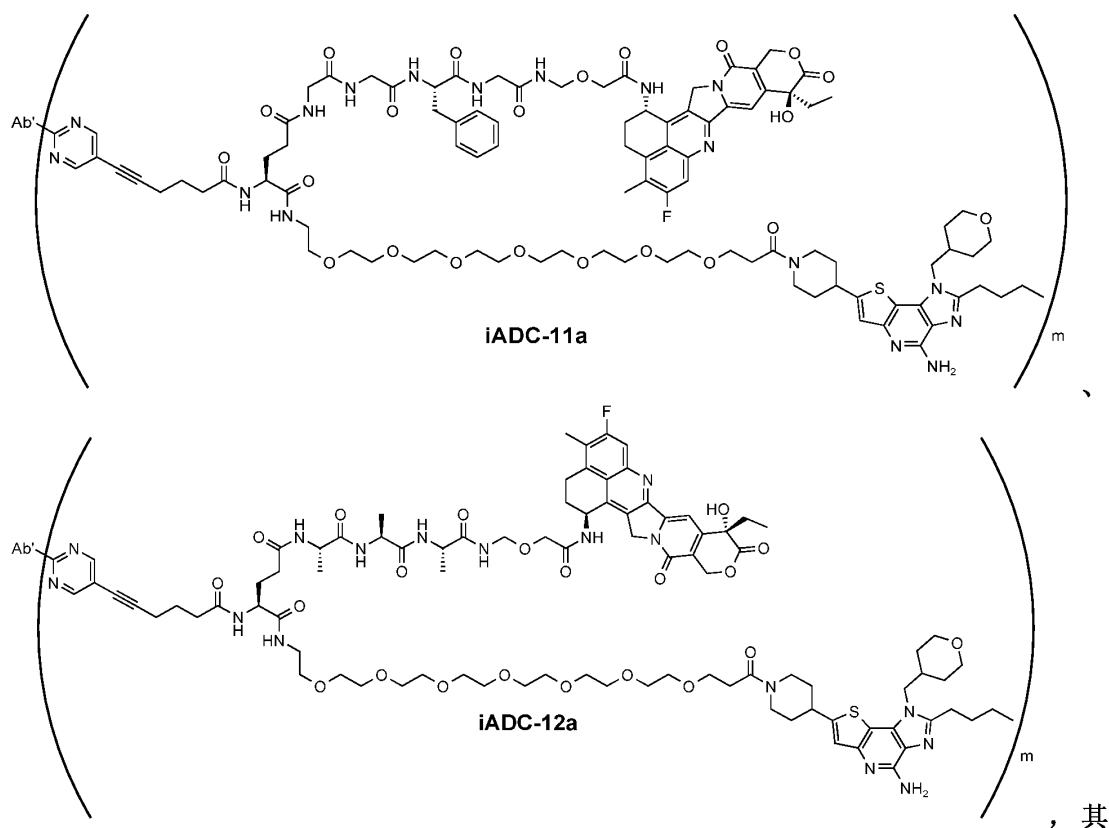
如约 1.0、约 1.01、约 1.02、约 1.03、约 1.04、约 1.05、约 1.06、约 1.07、约 1.08、约 1.09、约 1.1、约 1.11、约 1.12、约 1.13、约 1.14、约 1.15、约 1.16、约 1.17、约 1.18、约 1.19、约 1.2、约 1.21、约 1.22、约 1.23、约 1.24、约 1.25、约 1.26、约 1.27、约 1.28、约 1.29、约 1.3、约 1.31、约 1.32、约 1.33、约 1.34、约 1.35、约 1.36、约 1.37、
5 约 1.38、约 1.39、约 1.4、约 1.41、约 1.42、约 1.43、约 1.44、约 1.45、约 1.46、约 1.47、约 1.48、约 1.49、约 1.5、约 1.51、约 1.52、约 1.53、约 1.54、约 1.55、约 1.56、约 1.57、约 1.58、约 1.59、约 1.6、约 1.61、约 1.62、约 1.63、约 1.64、约 1.65、约 1.66、约 1.67、约 1.68、约 1.69、约 1.7、约 1.71、约 1.72、约 1.73、约 1.74、约 1.75、约 1.76、约 1.77、约 1.78、约 1.79、约 1.8、约 1.81、约 1.82、约 1.83、约 1.84、约
10 1.85、约 1.86、约 1.87、约 1.88、约 1.89、约 1.9、约 1.91、约 1.92、约 1.93、约 1.94、约 1.95、约 1.96、约 1.97、约 1.98、约 1.99、约 2.0、约 2.01、约 2.02、约 2.03、约 2.04、约 2.05、约 2.06、约 2.07、约 2.08、约 2.09、约 2.1、约 2.11、约 2.12、约 2.13、约 2.14、约 2.15、约 2.16、约 2.17、约 2.18、约 2.19、约 2.2、约 2.21、约 2.22、约 2.23、约 2.24、约 2.25、约 2.26、约 2.27、约 2.28、约 2.29、约 2.3、约 2.31、约 2.32、
15 约 2.33、约 2.34、约 2.35、约 2.36、约 2.37、约 2.38、约 2.39、约 2.4、约 2.41、约 2.42、约 2.43、约 2.44、约 2.45、约 2.46、约 2.47、约 2.48、约 2.49、约 2.5、约 2.51、约 2.52、约 2.53、约 2.54、约 2.55、约 2.56、约 2.57、约 2.58、约 2.59、约 2.6、约 2.61、约 2.62、约 2.63、约 2.64、约 2.65、约 2.66、约 2.67、约 2.68、约 2.69、约 2.7、约 2.71、约 2.72、约 2.73、约 2.74、约 2.75、约 2.76、约 2.77、约 2.78、约 2.79、约
20 2.8、约 2.81、约 2.82、约 2.83、约 2.84、约 2.85、约 2.86、约 2.87、约 2.88、约 2.89、约 2.9、约 2.91、约 2.92、约 2.93、约 2.94、约 2.95、约 2.96、约 2.97、约 2.98、约 2.99、约 3.0、约 3.01、约 3.02、约 3.03、约 3.04、约 3.05、约 3.06、约 3.07、约 3.08、约 3.09、约 3.1、约 3.11、约 3.12、约 3.13、约 3.14、约 3.15、约 3.16、约 3.17、约 3.18、约 3.19、约 3.2、约 3.21、约 3.22、约 3.23、约 3.24、约 3.25、约 3.26、约 3.27、
25 约 3.28、约 3.29、约 3.3、约 3.31、约 3.32、约 3.33、约 3.34、约 3.35、约 3.36、约 3.37、约 3.38、约 3.39、约 3.4、约 3.41、约 3.42、约 3.43、约 3.44、约 3.45、约 3.46、约 3.47、约 3.48、约 3.49、约 3.5、约 3.51、约 3.52、约 3.53、约 3.54、约 3.55、约 3.56、约 3.57、约 3.58、约 3.59、约 3.6、约 3.61、约 3.62、约 3.63、约 3.64、约 3.65、约 3.66、约 3.67、约 3.68、约 3.69、约 3.7、约 3.71、约 3.72、约 3.73、约 3.74、约
30 3.75、约 3.76、约 3.77、约 3.78、约 3.79、约 3.8、约 3.81、约 3.82、约 3.83、约 3.84、

约 3.85、约 3.86、约 3.87、约 3.88、约 3.89、约 3.9、约 3.91、约 3.92、约 3.93、约 3.94、约 3.95、约 3.96、约 3.97、约 3.98、约 3.99、约 4.0、约 4.01、约 4.02、约 4.03、约 4.04、约 4.05、约 4.06、约 4.07、约 4.08、约 4.09、约 4.1、约 4.11、约 4.12、约 4.13、约 4.14、约 4.15、约 4.16、约 4.17、约 4.18、约 4.19、约 4.2、约 4.21、约 4.22、
5 约 4.23、约 4.24、约 4.25、约 4.26、约 4.27、约 4.28、约 4.29、约 4.3、约 4.31、约 4.32、约 4.33、约 4.34、约 4.35、约 4.36、约 4.37、约 4.38、约 4.39、约 4.4、约 4.41、约 4.42、约 4.43、约 4.44、约 4.45、约 4.46、约 4.47、约 4.48、约 4.49、约 4.5、约 4.51、约 4.52、约 4.53、约 4.54、约 4.55、约 4.56、约 4.57、约 4.58、约 4.59、约 4.6、约 4.61、约 4.62、约 4.63、约 4.64、约 4.65、约 4.66、约 4.67、约 4.68、约 4.69、约
10 4.7、约 4.71、约 4.72、约 4.73、约 4.74、约 4.75、约 4.76、约 4.77、约 4.78、约 4.79、约 4.8、约 4.81、约 4.82、约 4.83、约 4.84、约 4.85、约 4.86、约 4.87、约 4.88、约 4.89、约 4.9、约 4.91、约 4.92、约 4.93、约 4.94、约 4.95、约 4.96、约 4.97、约 4.98、约 4.99、约 5.0。

在一些实施方案中，抗体药物偶联物选自 iADC-1 至 iADC-25，其中各 m 独立地
15 选自 1-10，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10，Ab-(S-为包含如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH 或 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 的抗体或其抗原结合片段，例如为 Ab-01（其包含：SEQ ID NO: 22 所示的重链，和 SEQ ID NO: 21 所示的轻链），例如为 Ab-02（其包含：SEQ ID NO: 20 所示的重链，和 SEQ ID NO: 21 所示的轻链），Ab-(S-中的 S 源自抗体或其抗原结合片段中的巯基，例如源自抗体或其抗
20 原结合片段中的半胱氨酸残基的巯基。

在一些实施方案中，抗体药物偶联物选自 iADC-8a 至 iADC-12a：





中 **Ab'** 如前文任一项所述的抗体或其抗体结合片段, 各 **m** 独立地选自 1-10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

- 5 在一些实施方案中, 抗体药物偶联物选自 **iADC-8a** 至 **iADC-12a**, 其中各 **m** 独立地选自 1-10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10, **Ab'** 为包含如 **SEQ ID NO: 23** 所示的 **VH** 或 **SEQ ID NO: 1** 所示的 **VH** 和如 **SEQ ID NO: 2** 所示的 **VL** 的抗体或其抗原结合片段, 例如为 **Ab-01** (其包含: **SEQ ID NO: 22** 所示的重链, 和 **SEQ ID NO: 21** 所示的轻链), 例如为 **Ab-02** (其包含: **SEQ ID NO: 20** 所示的重链, 和 **SEQ ID NO: 21** 所示的轻链)。
- 10

在一些实施方案中, **Ab'** 通过抗体中的半胱氨酸残基的一个或多个巯基、赖氨酸残基的一个或多个氨基、苏氨酸残基的一个或多个羟基、或丝氨酸残基的一个或多个羟基连接以形成偶联物。

- 在一些实施方案中, **Ab'** 通过抗体中半胱氨酸残基的一个或多个巯基连接以形成偶联物。
- 15

在一些实施方案中, **Ab'**通过抗体中赖氨酸残基的一个或多个氨基连接以形成偶联物。

在一些实施方案中, **Ab'**通过抗体中苏氨酸残基的一个或多个羟基连接以形成偶联物。

在一些实施方案中, **Ab'**通过抗体中丝氨酸残基的一个或多个羟基连接以形成偶联物。

5 在一些实施方案中, **Ab'**通过抗体中半胱氨酸残基的 **m** 个巯基、赖氨酸残基的 **m** 个氨基、苏氨酸残基的 **m** 个羟基或丝氨酸残基的 **m** 个羟基连接以形成偶联物。

在一些实施方案中, **Ab'**通过抗体中半胱氨酸残基的 **m** 个巯基连接。

在一些实施方案中, **Ab'**通过抗体中赖氨酸残基的 **m** 个氨基连接。

在一些实施方案中, **Ab'**通过抗体中苏氨酸残基的 **m** 个羟基连接。

在一些实施方案中, **Ab'**通过抗体中丝氨酸残基的 **m** 个羟基连接。

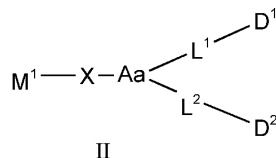
10 在一些实施方案中, 本发明所述的抗体药物偶联物任选地被一个或多个合适的取代基所取代。

在一些实施方案中, 本发明的抗体药物偶联物具有提高的癌症治疗效果。在一些实施方案中, 本发明的抗体药物偶联物具有较好的理化性质。在一些实施方案中, 本发明的抗体药物偶联物具有较好的安全性。

15 药物连接体

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

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



20

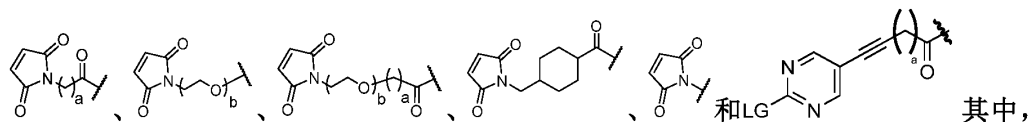
其中,

X、**Aa**、**L¹**、**L²**、**D¹**和**D²**如前文任一项所定义,

M¹ 为和抗体或其抗原结合片段连接的接头部位的前体。

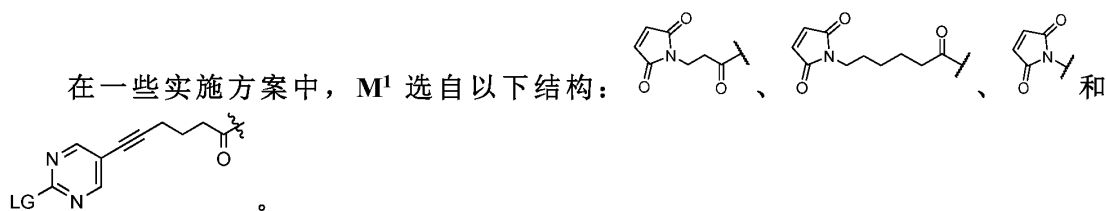
在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段如前文任一项所定义。

在一些实施方案中，M¹ 选自以下结构：



- 5 各 a 独立地选自 0-6 的整数，b 选自 1-10 的整数，LG 代表离去基团。

在一些实施方案中，M¹ 选自以下结构：

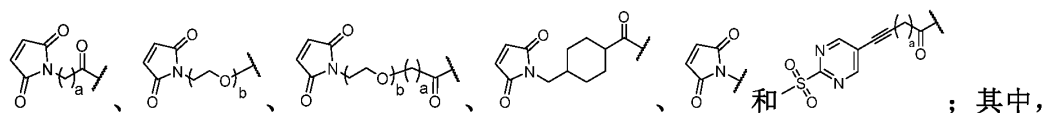


- 10 在一些实施方案中，LG 各自独立地选自卤素（例如 F、Cl、Br、I）、卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺基、卤代苯氧基、羟基、巯基、氨基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段，所述的卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺基、卤代苯氧基、烯基、炔基及含炔基的结构片段任选地被一个或多个合适的取代基所取代。

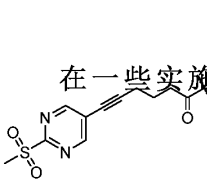
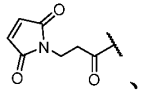
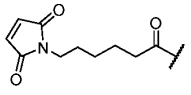
- 15 在一些实施方案中，LG 各自独立地选自卤素（例如 F、Cl、Br、I）、卤代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酰基、卤代磺酰基、C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、卤代 C₁₋₆ 烷基磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺酸酯基、C₁₋₆ 烷基亚磺基、卤代苯氧基、羟基、巯基、氨基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段。

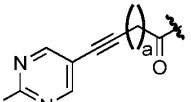
在一些实施方案中，LG 为 C₁₋₆ 烷基磺酰基，例如为甲磺酰基。

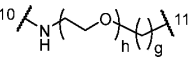
- 20 在一些实施方案中，M¹ 选自以下结构：

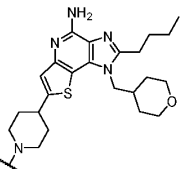


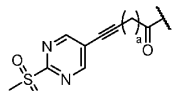
各 a 独立地选自 0-6 的整数，b 选自 1-10 的整数。

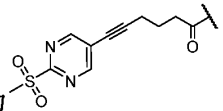
在一些实施方案中， M^1 选自以下结构：、、和。

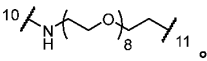
在一些实施方案中， M^1 为 ， a 选自 0-6 的整数；

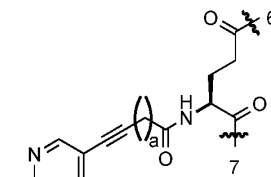
L_2 为 ，其中， g 选自 0-6 的整数， h 选自 1-10 的整数，并且， L^2 的 10 位置同 Aa 相连，11 位置同 D^2 相连；

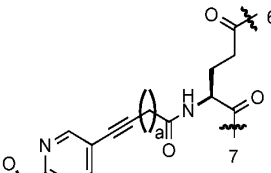
D^2 为  D^{2-7} 。

在一些实施方案中， M^1 为 ， a 选自 0-6 的整数。

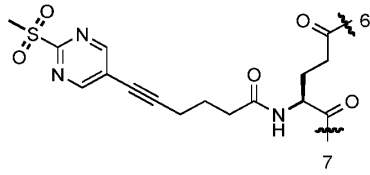
在一些实施方案中， M^1 为 。

在一些实施方案中， L_2 为 。

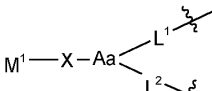
10 在一些实施方案中， M^1-X-Aa 选自：，其中 a 选自 0-6 的整数；6 位置与 L^1 相连，7 位置与 L^2 相连。

在一些实施方案中， M^1-X-Aa 选自：，其中 a 选自 0-6 的

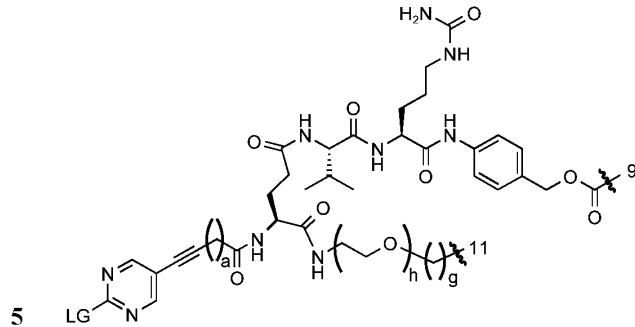
整数；6 位置与 L¹ 相连，7 位置与 L² 相连。



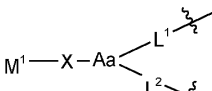
在一些实施方案中， M^1-X-Aa 选自：
与 L¹ 相连，7 位置与 L² 相连。



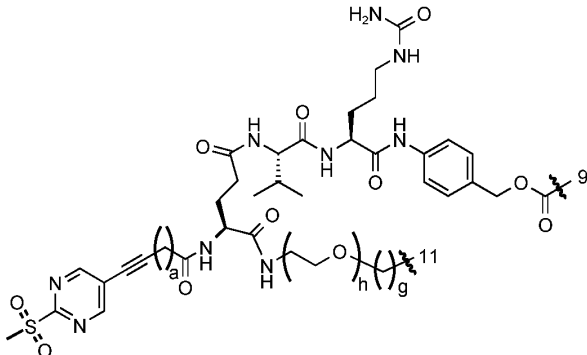
在 一 些 实 施 方 案 中 ， M^1-X-Aa 选自：



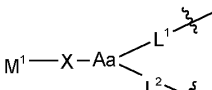
5 其中 a 选自 0-6 的整数，g 选自 0-6 的整数，h 选自 1-10 的整数；9 位置与 D¹ 相连，11 位置与 D² 相连，LG 如前任一项所定义。



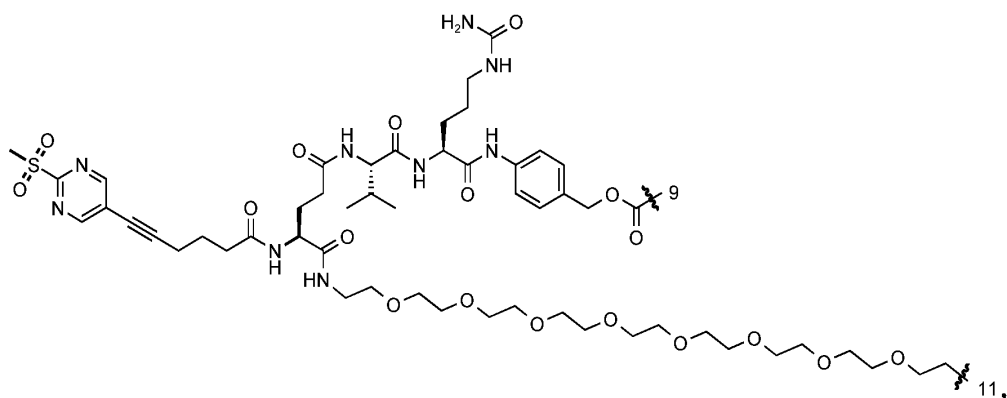
在 一 些 实 施 方 案 中 ， M^1-X-Aa 选自：



其中 a 选自 0-6 的整数，g 选自 0-6 的整数，h 选自 1-10 的整数；9 位置与 D¹ 相连，11 位置与 D² 相连。

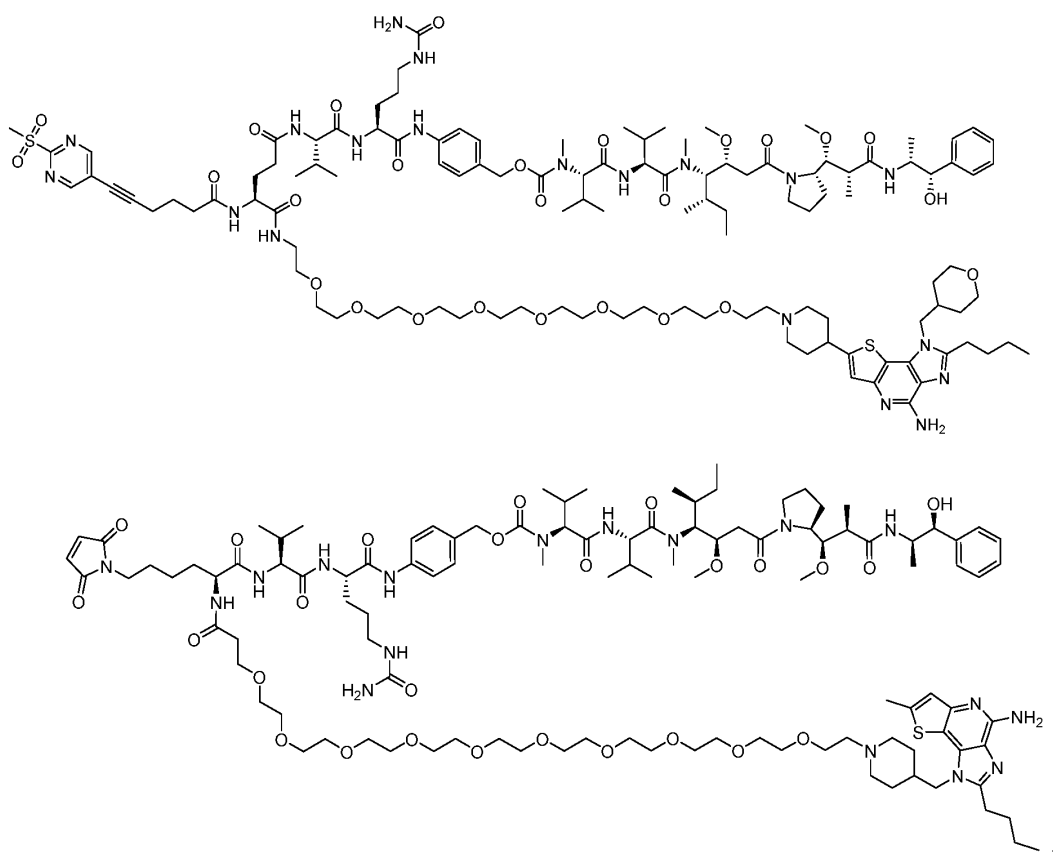


10 在 一 些 实 施 方 案 中 ， M^1-X-Aa 选自：



其中 9 位置与 D^1 相连, 11 位置与 D^2 相连。

在一些实施方案中，式(II)所示的化合物选自以下结构：



5

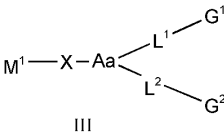
在一些实施方案中，本发明所述的药物连接体任选地被一个或多个合适的取代基所取代。

本发明的上述式 I 和式 II 中，所有实施方案的基团可以适宜地选择任意组合，从而得到不同的通式范围或具体方案。这些范围和方案均属于本发明。本发明涵盖对各个实

施方案进行任意组合所得的化合物或抗体药物偶联物。

中间体/连接单元

在一些实施方案中，本发明提供如式(III)所示的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



其中，

X、Aa、L¹、L²、M¹如前文任一项所定义，

G¹为对硝基苯氧基或 C₁₋₆ 烷酰氧基；

G²为羟基或氧代基。

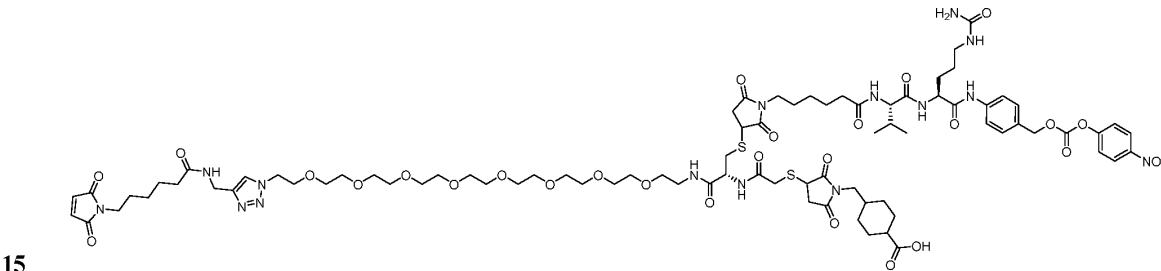
10 在一些实施方案中，当 L¹ 的 9 位置结构是  时，G¹ 为对硝基苯氧基。

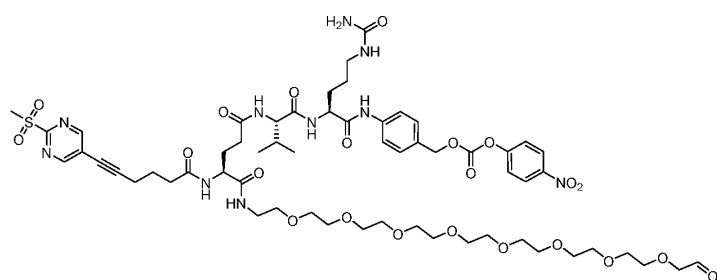
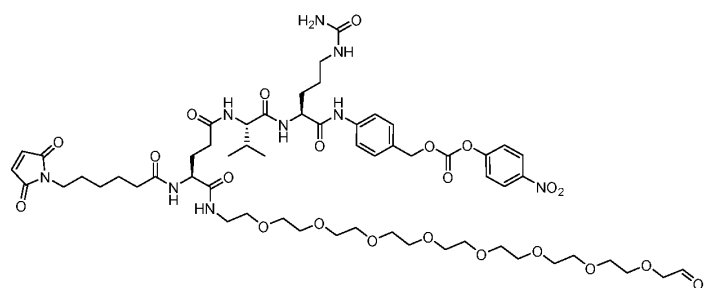
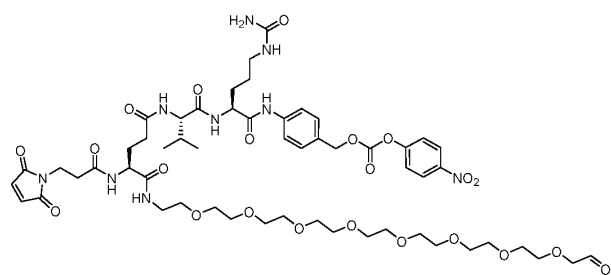
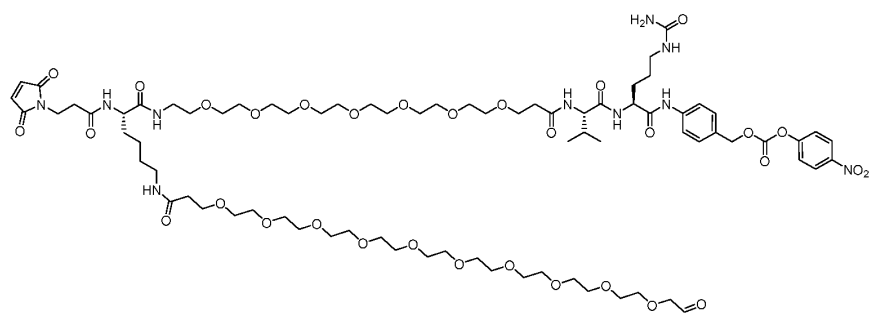
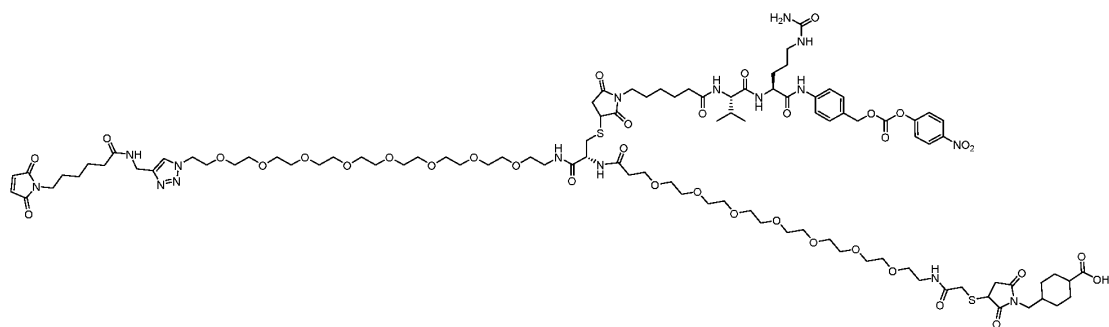
在一些实施方案中，当 L¹ 的 9 位置结构是  时，G¹ 为 C₁₋₆ 烷酰氧基。

在一些实施方案中，当 L² 的 11 位置结构是  时，G² 为氧代基。

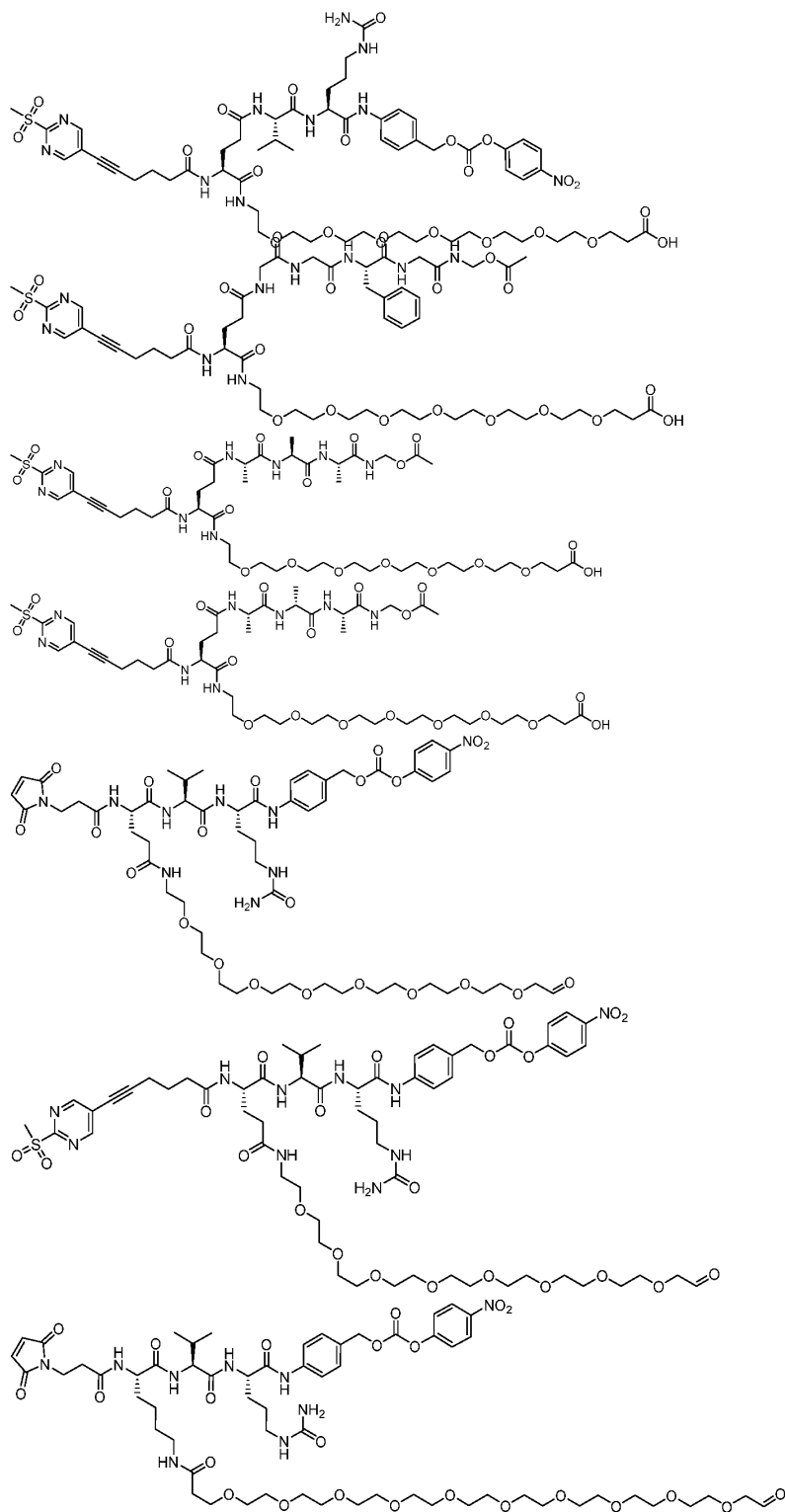
在一些实施方案中，当 L² 的 11 位置结构是  时，G² 为羟基。

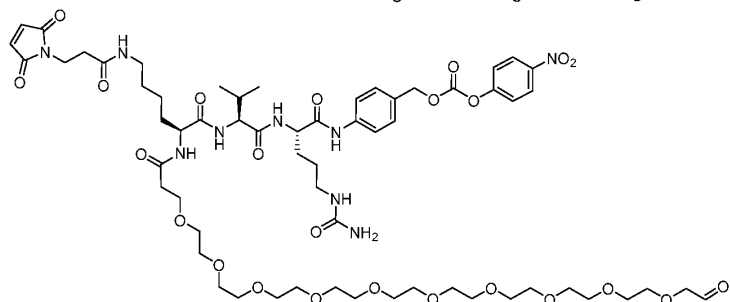
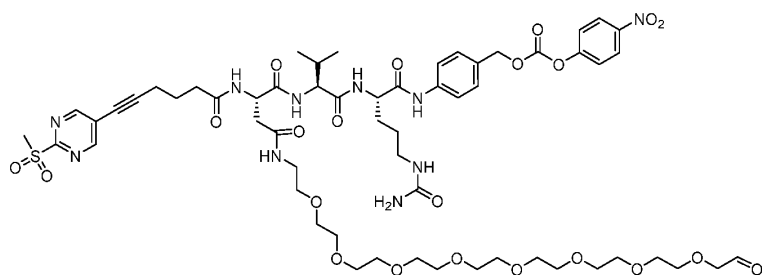
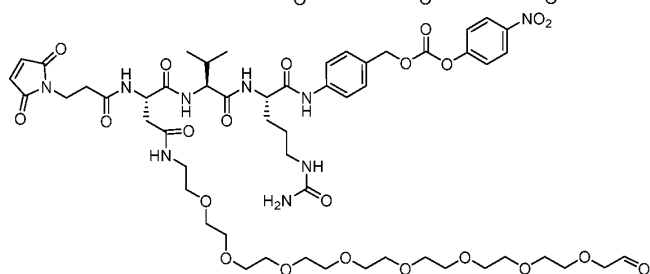
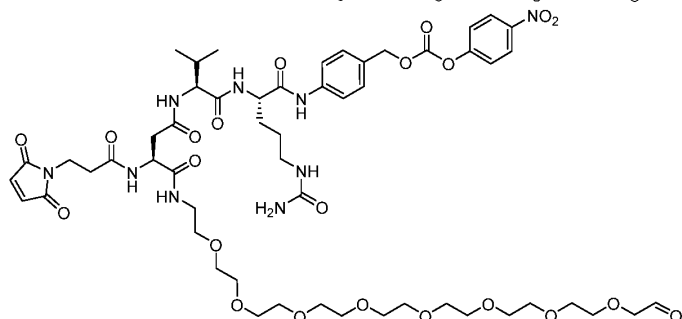
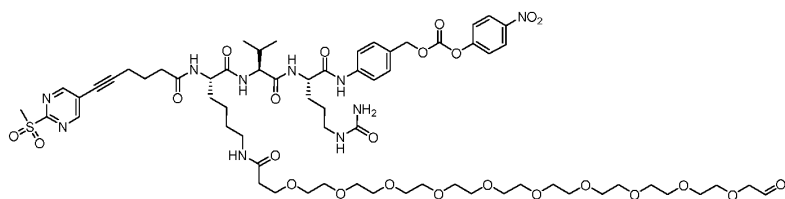
在一些实施方案中，式(III)所示的化合物选自：



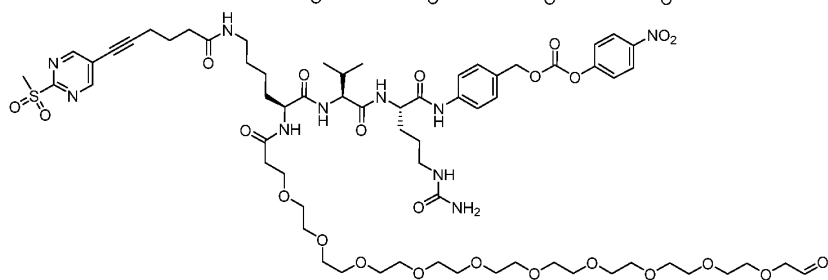


5



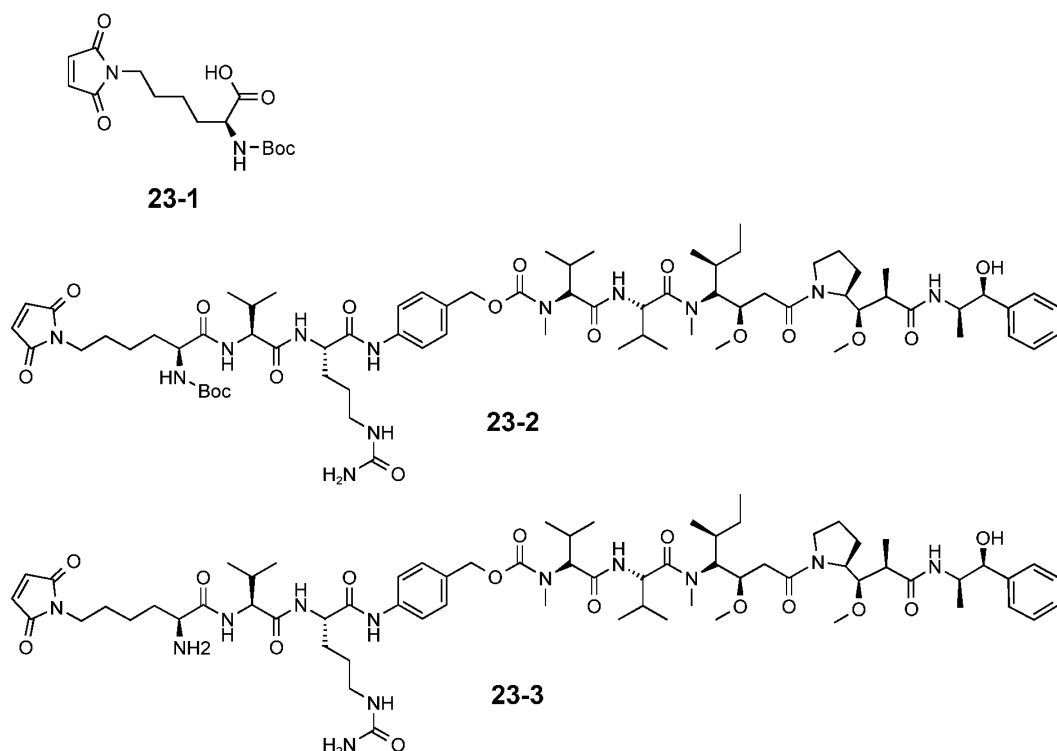


5

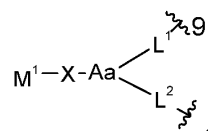


基、叔丁氧羰基、9-苄氧羰基、烯丙氧羰基、三氯乙氧羰基、三甲基硅乙氧羰基、苄氧羰基、对甲基苯磺酰基、对硝基苯磺酰基、三氟乙酰基、甲氧羰基、或乙氧羰基；烷基类氨基保护基，例如三苯甲基(Trt)、2,4-二甲氧基苄基(Dmb)、4-甲氧基苄基(PMB)、苄基(Bn)。

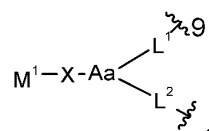
- 5 在一些实施方案中，本发明提供如下所示的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



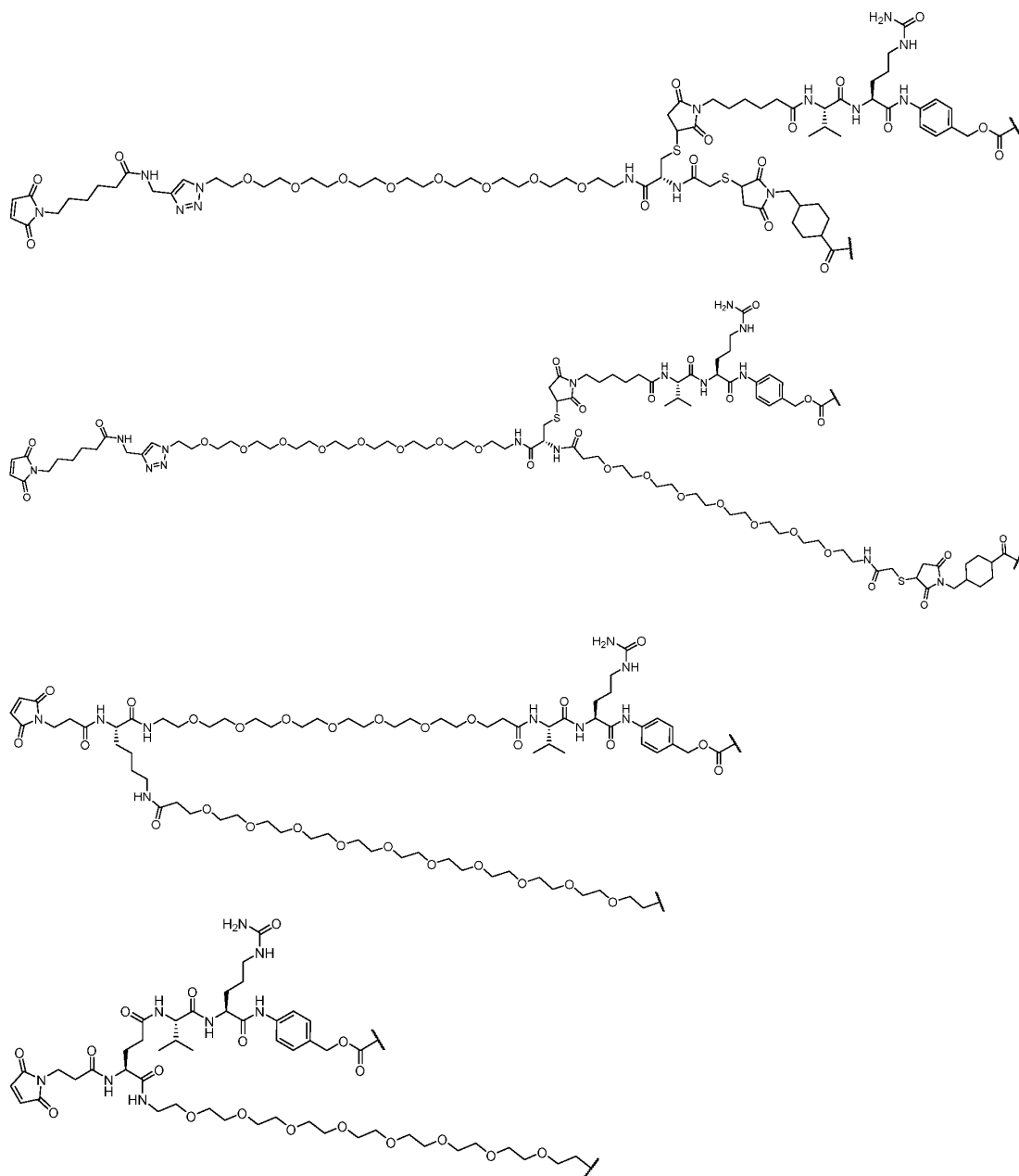
- 10 上述所示的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药可用于制备本文的药物连接体或抗体药物偶联物。

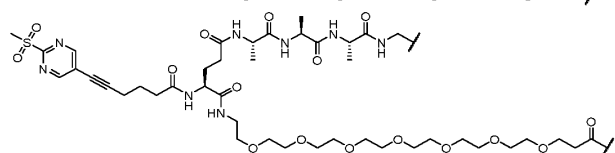
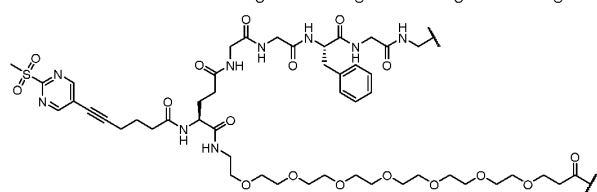
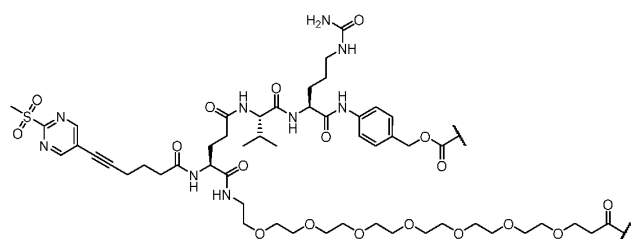
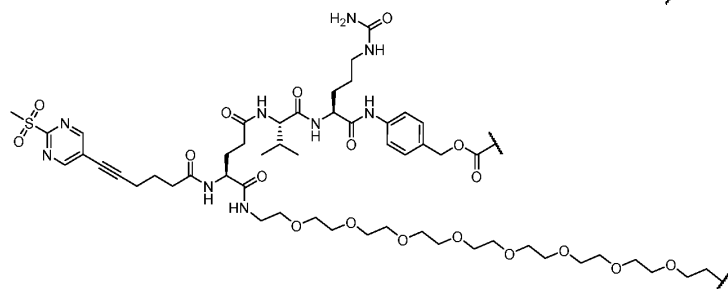
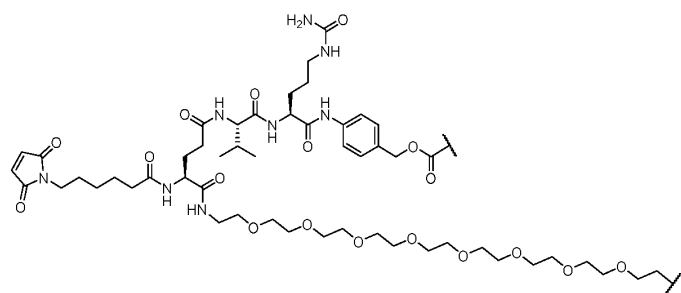


- 15 在一些实施方案中，本发明提供一种连接单元，其为具有化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，其中，X、Aa、L¹、L²、M¹如前文任一项所定义。

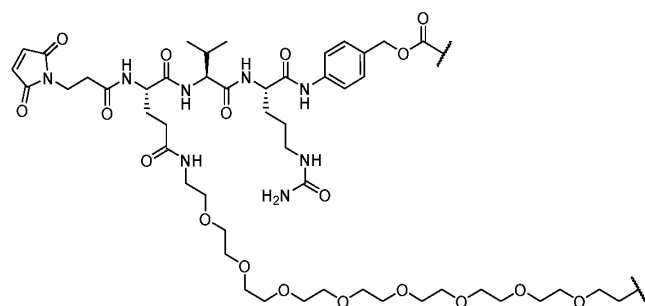
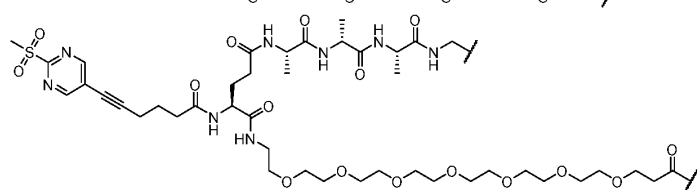


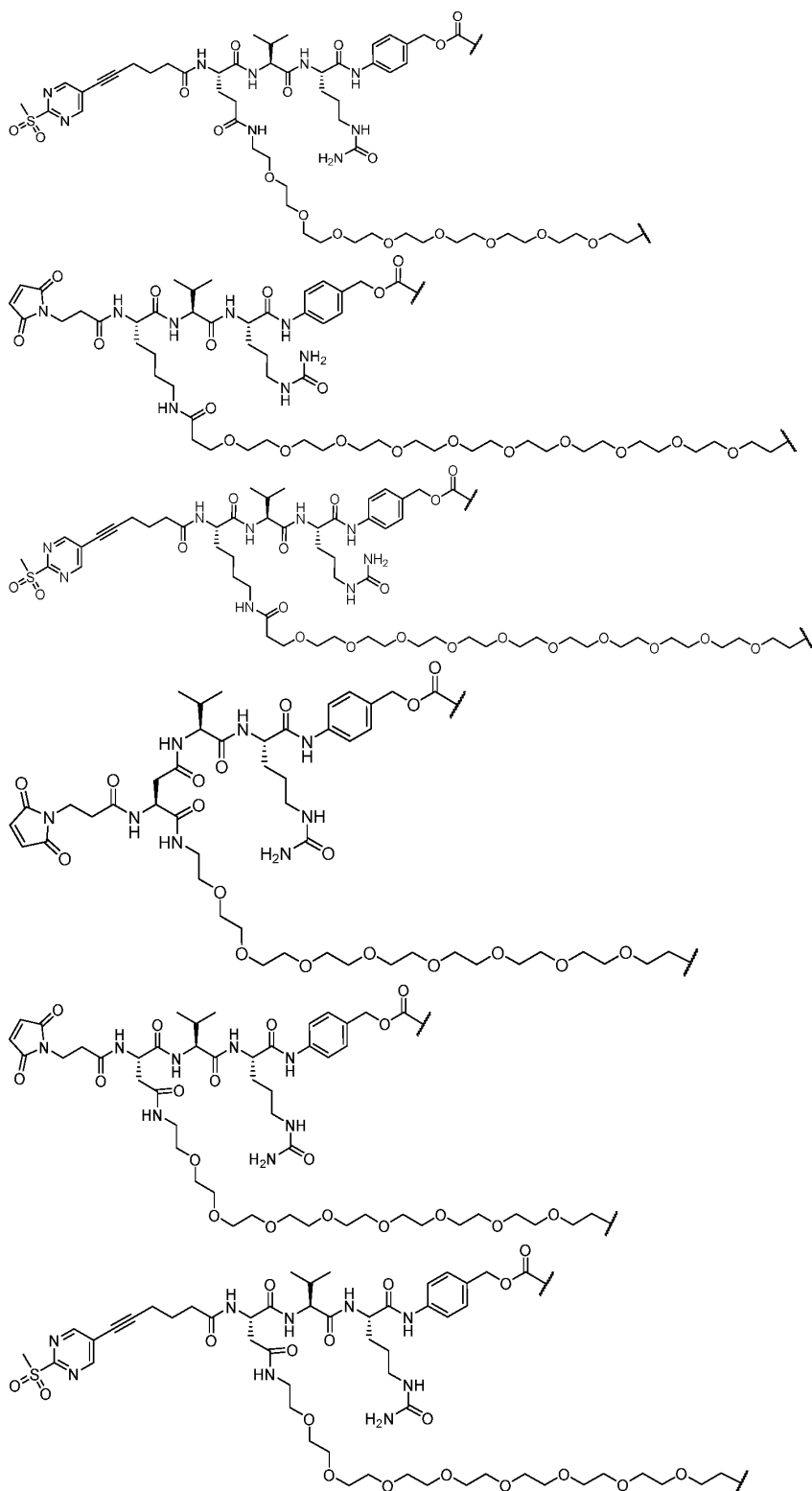
在一些实施方案中，具有 ¹¹ 结构的化合物选自：

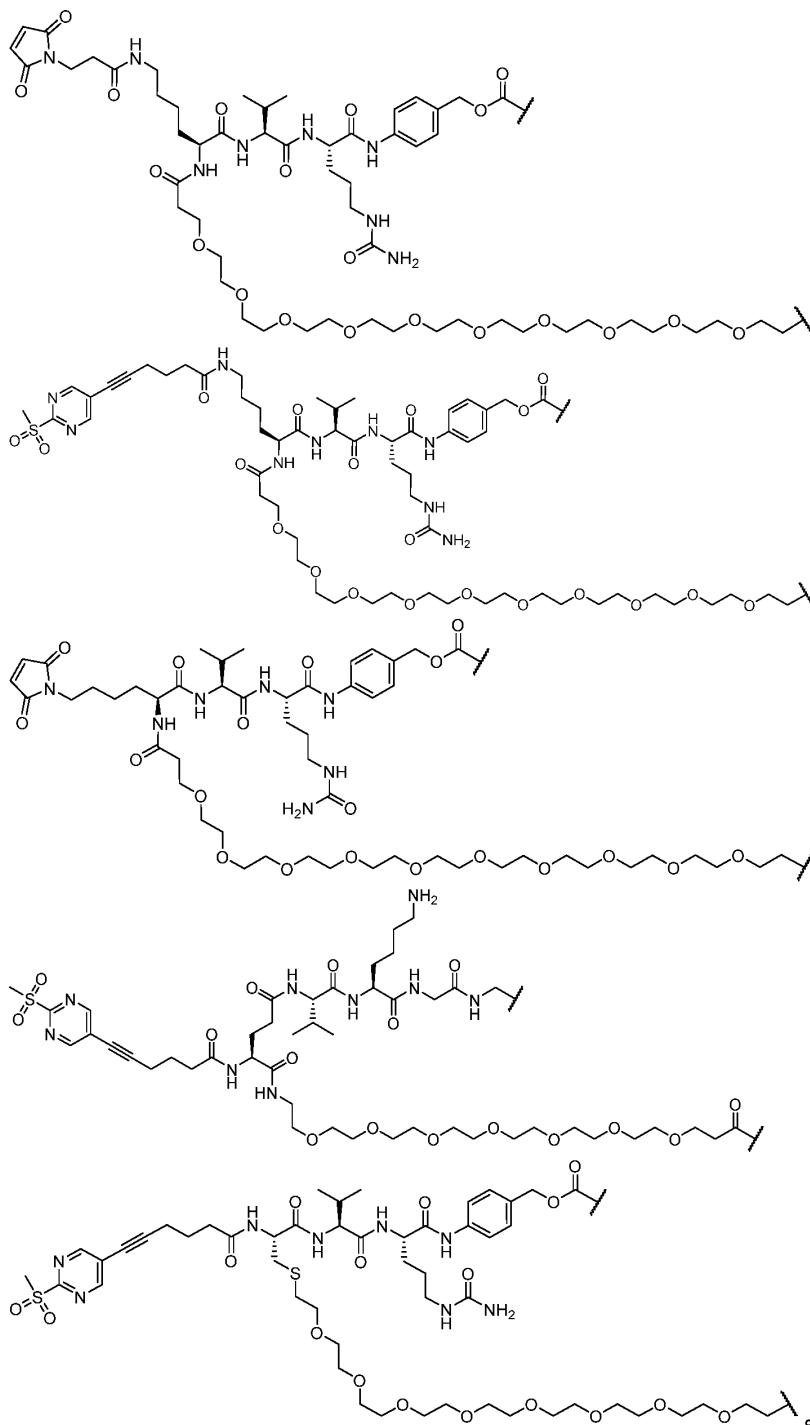




5

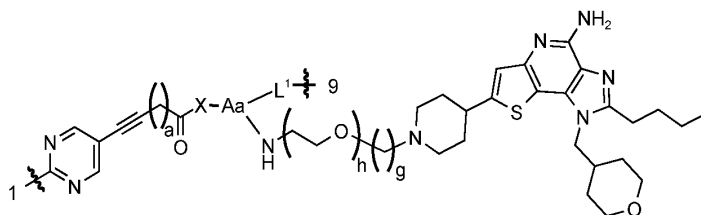






5

在一些实施方案中, 本发明提供一种连接单元, 其为具有式(IV)所示结构的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药:

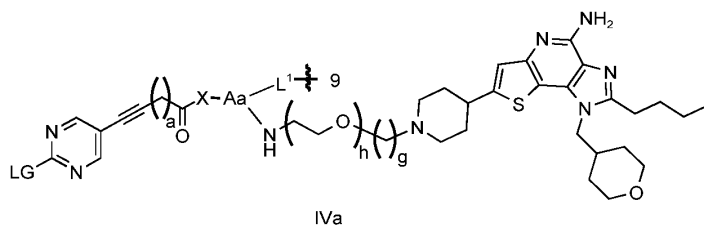


IV

其中 X、Aa、L¹、a、g 和 h 如前文任一项所定义。

5 在一些实施方案中，提供一种化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，其包含式(IV)所示结构的连接单元以及 LG 或 D¹ 中的至少一个，所述的连接单元与 LG 或 D¹ 连接，其中 D¹ 与连接单元的位置 9 进行连接；LG 与连接单元的位置 1 进行连接；其中 D¹ 如前文任一项所定义，LG 如前文任一项所定义。

10 在一些实施方案中，本发明提供一种连接单元，其为具有式(IVa)所示结构的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：

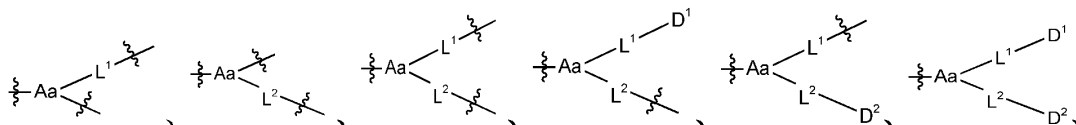


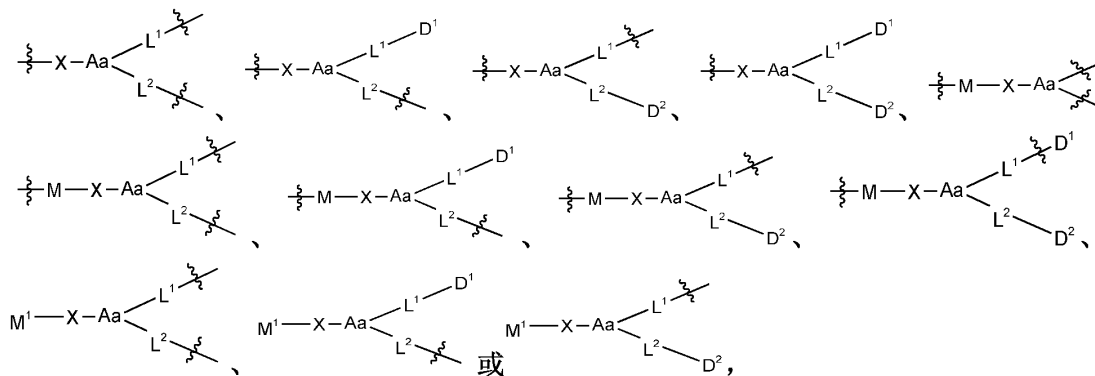
IVa

其中 LG、X、Aa、L¹、a、g 和 h 如前文任一项所定义。

15 在一些实施方案中，提供一种化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，其包含式(IVa)所示结构的连接单元以及任选的 D¹，所述的连接单元与 D¹ 连接，其中 D¹ 与连接单元的位置 9 进行连接；D¹ 如前文任一项所定义。

在一些实施方案中，本发明提供一种连接单元，其具有以下结构：





其中，M、M'、X、Aa、L¹、L²、D¹和D²如前文任一项所定义。

- 5 在一些实施方案中，本发明所述的中间体任选地被一个或多个合适的取代基所取代。

抗体或其抗原结合片段

在另一个方面，本发明提供一种特异性结合 **B7H3** 的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- (1) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

- 10 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 11 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 12 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；

- 15 (2) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

- 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 14 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 15 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；
- 20

- (3) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 8 或其变体的 CDR-

H1, 序列为 SEQ ID NO: 9 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO:10 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 3 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 4 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3; 或

5 (4) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL):

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH): 序列为 SEQ ID NO: 16 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 17 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL), 其中 CDR 按 Chothia 编号系统定义:

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH): 序列为 SEQ ID NO: 11 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 12 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3;

(2) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL), 其中 CDR 按 Kabat 编号系统定义:

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH): 序列为 SEQ ID NO: 14 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 15 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO:13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3;

(3) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL), 其中 CDR 按 IMGT 编号系统

定义：

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO: 8 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 9 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 10 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO: 3 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 4 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；或

(4) 下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 AbM 编号系统定义：

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO: 16 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 17 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO: 23 或 1 所示的 VH 或其变体，和/或，SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO: 23 或 1 所示的 VH 或其变体和 SEQ ID NO: 18 所示的重链恒定区（CH）或其变体的重链，和/或，SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链恒定区（CL）或其变体的轻链。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 或 20 所示，所述抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示。

在一些实施方案中，所述重链或重链可变区和/或轻链或轻链可变区的 N 端谷氨酰胺经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐；和/或，所述重链或重链恒定区（CH）或其变体不存在 C-末端赖氨酸。

在一些实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少

97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性，或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）；优选地，所述的置换是保守置换。

5 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示，所述抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示，所述抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示。

10 在本文公开的抗体或抗原结合片段的某些实施方案中，重链恒定结构域可包含 C-末端赖氨酸或缺乏 C-末端赖氨酸或 C-末端甘氨酸-赖氨酸二肽。在抗体或其抗原结合片段的一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段的 N 端氨基酸可以环化成焦谷氨酸。在抗体或其抗原结合片段的一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段的 N 端氨基酸可以环化成焦谷氨酸。

如本领域技术人员已知的，焦谷氨酸是焦谷氨酸盐的共轭酸，并且与溶液中的焦谷氨酸盐相互平衡。

15 在某些实施方案中，本文提供了包含本文公开的抗体或抗原结合片段的组合物，其中的各种抗体或抗原结合片段可以独立地包含 C 端赖氨酸、缺乏 C 端赖氨酸、缺乏 C 端甘氨酸-赖氨酸和/或包含 N 端谷氨酰胺或谷氨酸、N 端氨基酸环化为焦谷氨酸或 N 端氨基酸环化为焦谷氨酸盐。

20 在某些实施方案中，本文公开的抗体或抗原结合片段包括特异性结合抗原的抗体或抗原结合片段，并且可以包括其翻译后修饰（例如，重链中的 C 端赖氨酸剪切）（重链或轻链中的 N-末端谷氨酰胺或谷氨酸转化为焦谷氨酸或焦谷氨酸盐），这可以在宿主细胞（例如，CHO 细胞）中重组表达时或在纯化/储存期间发生。

25 在某些实施方案中，所述包含如 SEQ ID NO: 23 或 1 所示的序列或其变体的 VH 的 N 端谷氨酰胺经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐；和/或所述包含如 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体的 VL 的 N 端谷氨酸经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐。

在一些实施方案中，SEQ ID NO: 22 或 20 所示重链和/或 SEQ ID NO: 21 所示轻链

的 N 端谷氨酰胺经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐；和/或，SEQ ID NO: 18 所示重链恒定区（CH）或其变体不存在 C-末端赖氨酸。

偶联物

在另一个方面，本申请提供一种偶联物，其包括前文任一项所述的化合物（例如药物连接体、TLR 激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，或前文任一项所述的连接单元。在一些实施方案中，所述偶联物是抗体药物偶联物，其中所述化合物（例如药物连接体、TLR 激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药与抗体或其抗原结合片段连接。

在一些实施方案中，本申请提供一种抗体药物偶联物，其包括前文任一项所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段通过连接单元与生物活性分子（例如 TLR 激动剂和/或细胞毒性药物）连接。

药物组合物

在另一个方面，本发明提供一种药物组合物，其含有前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR 激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，以及一种或多种药用辅料。

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

治疗方法和应用

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

用途，特别是制备前文任一项所述的抗体药物偶联物。

在另一个方面，本发明提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、抗体
5 药物偶联物的组合物、抗体或其抗原结合片段、或药物组合物在制备药物中的用途，特别是制备治疗和/或预防癌症（例如与 **B7H3** 表达相关的癌症）的药物中的用途。

在另一个方面，本发明提供前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、抗体
10 药物偶联物的组合物、抗体或其抗原结合片段、或药物组合物，其用于治疗 and/或预防疾病，例如癌症（例如与 **B7H3** 表达相关的癌症）。

在另一个方面，本发明提供一种治疗和/或预防癌症（例如与 **B7H3** 表达相关的癌症）的方法，包括向有此需要的受试者施用治疗和/或预防有效量的前文任一项所述的抗体药物偶联物、化合物（例如药物连接体、TLR激动剂或细胞毒性药物）或其药学上可接受的
15 的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、抗体药物偶联物的组合物、抗体或其抗原结合片段、或药物组合物。

在一些实施方案中，所述癌症选自乳腺癌（例如，乳腺导管癌）、胃癌、肺癌（例如，肺腺癌）和结肠癌。

20 实施例

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

25 化合物的结构是通过核磁共振(¹H NMR)或质谱(MS)来确定的。¹H NMR 的测定仪器为 JEOL Eclipse 400 核磁仪，测定溶剂为氘代甲醇(CD₃OD)、氘代氯仿(CDCl₃)或六氘代

二甲基亚砜(DMSO-*d*₆), 内标为四甲基硅烷(TMS), 化学位移(δ)以百万分之一(ppm)的单位给出。

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

制备高效液相色谱仪的制备方法:

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

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

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

反向柱层析的制备方法:

- 15 制备方法 A:

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

制备方法 B:

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

制备方法 C:

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

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

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

实施例 1 中无特殊说明，反应的温度为室温(20℃~35℃)。

10 本发明所使用的试剂购自 Acros Organics、Aldrich Chemical Company、特伯化学公司等。

在常规的合成法以及实施例、和中间体合成例中，各缩写的意思如以下所示。

缩写	含义	缩写	含义
TLC	薄层色谱法	DMSO- <i>d</i> ₆	六氘代二甲基亚砜
LC-MS	液相色谱-质谱联用	s	单峰(singlet)
DMSO	二甲基亚砜	d	二重峰(doublet)
TCEP	三(2-羧乙基)膦	t	三重峰(triplet)
EDTA	乙二胺四乙酸	q	四重峰(quartet)
MS	质谱	dd	双二重峰(double doublet)
NMR	核磁共振	m	多重峰(multiplet)
TMS	四甲基硅烷	br	宽峰(broad)
CD ₃ OD	氘代甲醇	<i>J</i>	偶合常数
CDCl ₃	氘代氯仿	Hz	赫兹
Nle	正亮氨酸		

本发明涉及的序列的信息描述于下面的表中：

SEQ ID NO:	描述	序列

1	Ab-02 VH 氨基酸序列	QVQLQESGPGGLVQPSGTLSTCAVSGGSDSSTN WWTWVRQSPGQGLEWIGEISPIGFTSYSPSLRS RVTISVDKSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD RLYFAFWGQGTLVTVSS
2	Ab-01、Ab-02 VL 氨基酸序列	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGS GTEFTLTISSESEDFAVYYCQQYNNWPITFGQ GTRLEIK
3	Ab-01、Ab-02 CDR-L1 (IMGT 定义)	QSVSSN
4	Ab-01、Ab-02 CDR-L2 (IMGT 定义)	GAS
5	Ab-01、Ab-02 CDR-L3 (IMGT 定义 /Chothia 定义 /Kabat 定义 /AbM 定义)	QQYNNWPIT
6	Ab-01、Ab-02 CDR-L1 (Chothia 定义 /Kabat 定义 /AbM 定义)	RASQSVSSNLA
7	Ab-01、Ab-02 CDR-L2 (Chothia 定义 /Kabat 定义 /AbM 定义)	GASTRAT

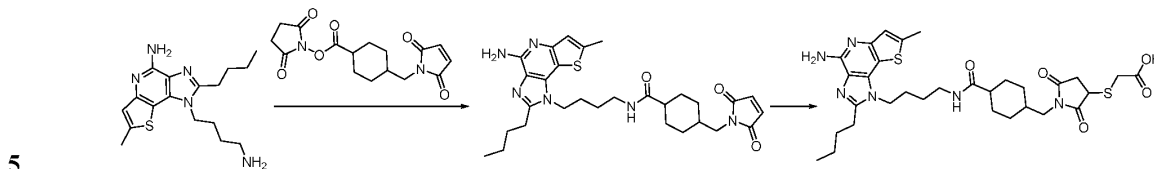
8	Ab-01、Ab-02 CDR-H1 (IMGT 定义)	GGSDSSTNW
9	Ab-01、Ab-02 CDR-H2 (IMGT 定义)	ISPIGFT
10	Ab-01、Ab-02 CDR-H3 (IMGT 定义)	ARDRLYFAF
11	Ab-01、Ab-02 CDR-H1 (Chothia 定义)	GGSDSSTN
12	Ab-01、Ab-02 CDR-H2 (Chothia 定义)	SPIGF
13	Ab-01、Ab-02 CDR-H3 (Chothia 定义 / Kabat 定义 / AbM 定义)	DRLYFAF
14	Ab-01、Ab-02 CDR-H1 (Kabat 定义)	STNWWT
15	Ab-01、Ab-02 CDR-H2 (Kabat 定义)	EISPIGFTSYSPSLRS
16	Ab-01、Ab-02 CDR-H1 (AbM 定义)	GGSDSSTNWWT
17	Ab-01、Ab-02 CDR-	EISPIGFTS

	H2 (AbM 定义)	
18	Ab-01、Ab-02 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVPSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	Ab-01、Ab-02 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
20	Ab-02 抗体的重链 氨基酸序列	QVQLQESGPGLVQPSGTLSTCAVSGGSDSSTN WWTWVRQSPGQGLEWIGEISPIGFTSYSPSLRS RVTISVDKSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD RLYFAFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

21	Ab-01、Ab-02 抗体的轻链氨基酸序列	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGS GTEFTLTISSESEDAVYYCQQYNNWPITFGQ GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
22	Ab-01 抗体的重链氨基酸序列	QVQLQESGPGGLVQPSGTLSTCAVSGGSDSSTN WWTWVRQSPGQGLEWIGEISPIGFTSYSPSLRS RVTISVDKSKTQFSLNLSSVTAADTAVYYCARD RLYFAFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
23	Ab-01 VH 氨基酸序列	QVQLQESGPGGLVQPSGTLSTCAVSGGSDSSTN WWTWVRQSPGQGLEWIGEISPIGFTSYSPSLRS RVTISVDKSKTQFSLNLSSVTAADTAVYYCARD RLYFAFWGQGTLVTVSS
24	连接体片段	GGFG
25	抗体轻重链的接头亚单元	GGGGS
26	抗体轻重链的接头	GGGGSGGGSGGGSGGGGS

一、化合物实施例

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



第一步: *N*-(4-(4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)-4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)甲基)环己基-1-甲酰胺的制备

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

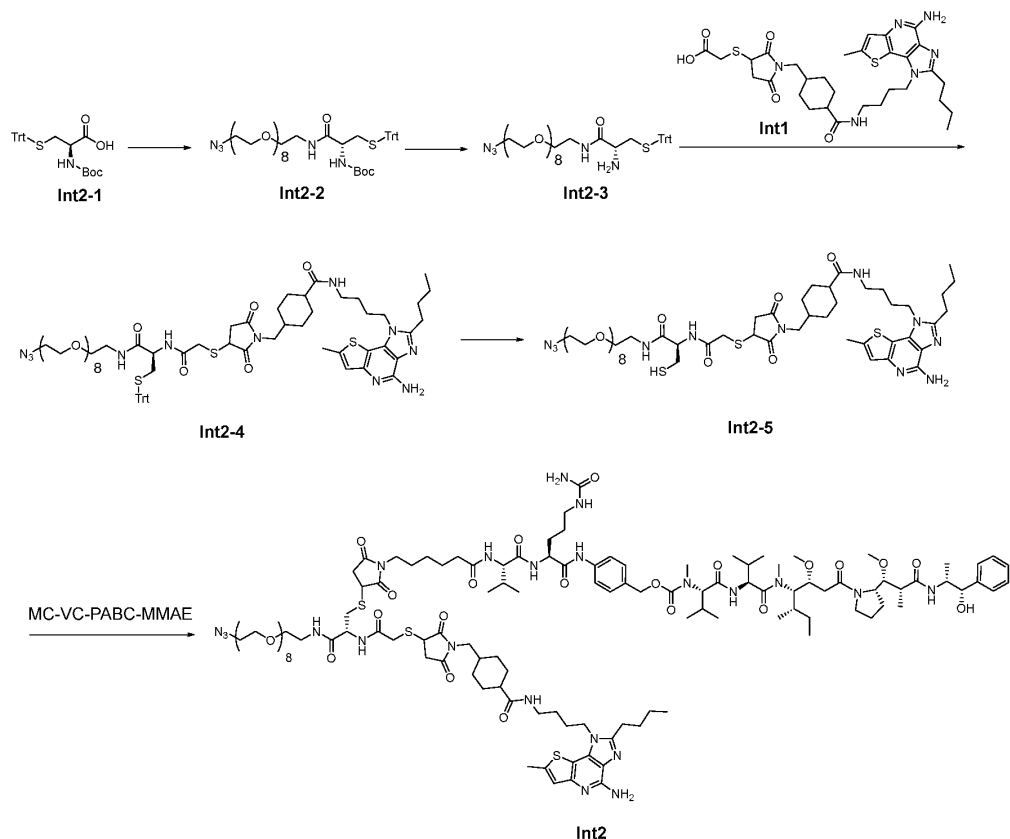
15 MS *m/z* (ESI): 551.3 [M+H]⁺。

第二步: 2-((1-((4-((4-氨基-2-丁基-7-甲基-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-1-基)丁基)氨基甲酰基)环己基)甲基)-2,5-二氧代吡咯烷-3-基)硫基)乙酸(Int1)的制备

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

MS *m/z* (ESI): 643.3 [M+H]⁺。

中间体制备例 2: 化合物 Int2 的制备



第一步：化合物 Int2-2 的制备

将 *N*-叔丁氧羰基-*S*-三苯甲基-*L*-半胱氨酸(384 mg, 0.83 mmol)和 26-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷-1-胺(435 mg, 0.99 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 在冰浴下加入 1-羟基苯并三唑(167.58 mg, 1.24 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(320.43 mg, 2.48 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(238 mg, 1.24 mmol), 20°C 搅拌 3 小时, 将反应液滴入水中, 二氯甲烷萃取, 有机相干燥, 浓缩, 得到本步的标题化合物(0.69 g, 收率: 78.4%)。

MS m/z (ESI): 884.4 $[M+H]^+$ 。

10 第二步：化合物 Int2-3 的制备

将化合物 Int2-2 (0.69 g, 0.78 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)中, 滴加三氟乙酸(10 mL), 室温搅拌 2 小时, 浓缩, 二氯甲烷(20 mL)稀释, 有机相用碳酸氢钠溶液洗, 干燥, 浓缩, 得到本步的标题化合物(0.6 g, 收率: 98%)。

MS m/z (ESI): 784.4 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int2-4 的制备

将化合物 Int1 (136 mg, 211 mmol)和化合物 Int2-3 (182 mg, 233 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中，在冰浴下加入 1-羟基苯并三唑(43.2 mg, 0.32 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(81.6 mg, 0.63 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(61.3 mg, 0.32 mmol)，20°C搅拌 3 小时，将反应液滴入水中，二氯甲烷萃取，有机相干燥，浓缩，得到本步的标题化合物(0.23 g，收率：95.8%)。

MS m/z (ESI): 1408.6 [M+H]⁺。

第四步：化合物 Int2-5 的制备

10 将化合物 Int2-4 (0.23 g, 0.16 mmol)溶于二氯甲烷(2 mL)和三乙基硅烷(0.52 mL)中，滴加三氟乙酸(1 mL)，室温搅拌 1 小时，浓缩，二氯甲烷(20 mL)稀释，有机相用碳酸氢钠溶液洗，干燥，浓缩，得到本步的标题化合物(0.15 g，收率：78.9%)。

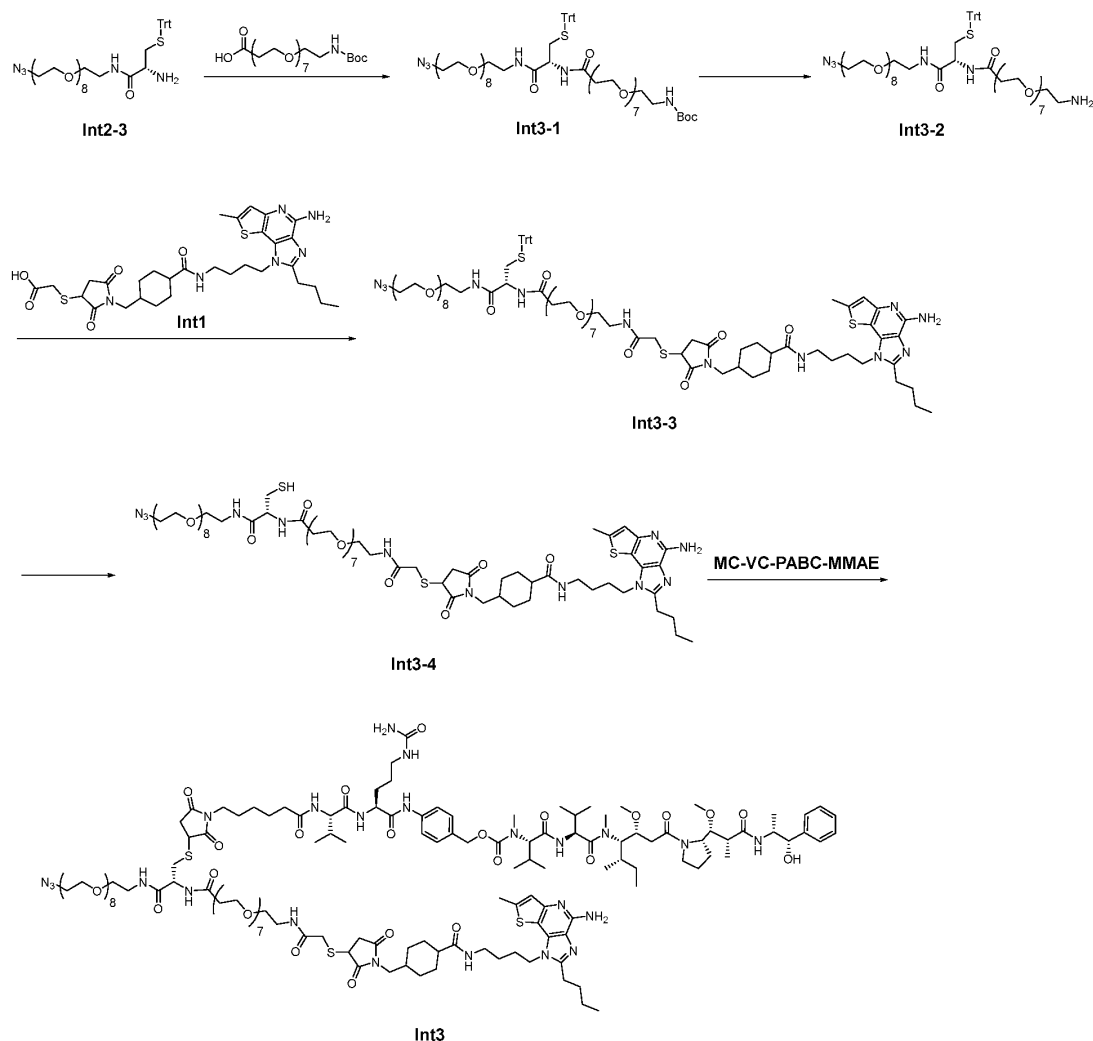
MS m/z (ESI): 1166.5 [M+H]⁺。

第五步：化合物 Int2 的制备

15 将化合物 Int2-5 (0.15 g, 0.13 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中，加入 MC-VC-PABC-MMAE (0.17 g, 0.13 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(50.3 mg, 0.39 mmol)，室温搅拌 1 小时，加入氯化铵的水溶液(10 mL)，用二氯甲烷(10mL)萃取三次，有机相干燥，浓缩得到的粗品用制备薄层硅胶板纯化(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v))，得到本步的标题化合物(150 mg，收率：47.0%)。

20 MS m/z (ESI): 1241.7 [M/2+H]⁺。

中间体制备例 3：化合物 Int3 的制备



第一步：化合物 Int3-1 的制备

5 将化合物 Int2-3 (192 mg, 0.244 mmol)和 2,2-二甲基-4-氧代-3,8,11,14,17,20,23,26-八氧杂-5-二十九烷-29-酸(110.53 mg, 0.222 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 在冰浴下加入 1-羟基苯并三唑(45 mg, 0.333 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(85.9 mg, 0.666 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(63.8 mg, 0.333 mmol), 20℃搅拌 6 小时, 将反应液滴入水(10 mL)中, 二氯甲烷(10 mL)萃取三次, 有机相干燥, 浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(145 mg, 收率: 51.6%)。

10 MS m/z (ESI): 1263.6 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int3-2 的制备

将化合物 Int3-1 (145 mg, 0.11 mmol)溶于二氯甲烷(2 mL)中, 滴加三氟乙酸(1 mL), 室温搅拌 2 小时, 浓缩, 二氯甲烷(10 mL)稀释, 有机相用碳酸氢钠溶液洗, 干燥, 浓缩, 得到本步的标题化合物(130 mg, 收率: 97.0%)。

MS m/z (ESI): 1163.6 [M+H]⁺。

5 第三步: 化合物 Int3-3 的制备

将化合物 Int1 (65 mg, 0.10 mmol)和化合物 Int3-2 (130 mg, 0.11 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 在冰浴下加入 1-羟基苯并三唑(20.3 mg, 0.15 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(38.7 mg, 0.3 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(28.8 mg, 0.15 mmol), 20°C 搅拌 3 小时, 将反应液滴入水(10 mL)中, 二氯甲烷(10 mL)萃取三次, 有机相干燥, 浓缩得到的粗品用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=10/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(110 mg, 收率: 60.8%)。

MS m/z (ESI): 1787.8 [M+H]⁺。

第四步: 化合物 Int3-4 的制备

将化合物 Int3-3 (110 mg, 0.06 mmol)溶于二氯甲烷(2 mL)和三乙基硅烷(0.4 mL)中, 滴加三氟乙酸(1 mL), 室温搅拌 1 小时, 浓缩, 二氯甲烷(20 mL)稀释, 有机相用碳酸氢钠溶液洗, 干燥, 浓缩, 得到本步的标题化合物(95 mg, 收率: 100.0%)。

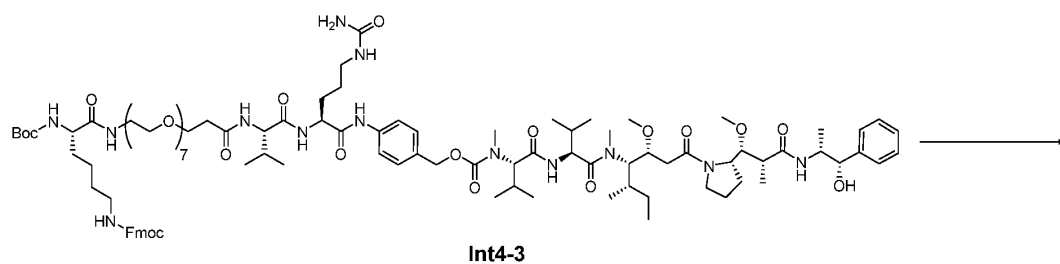
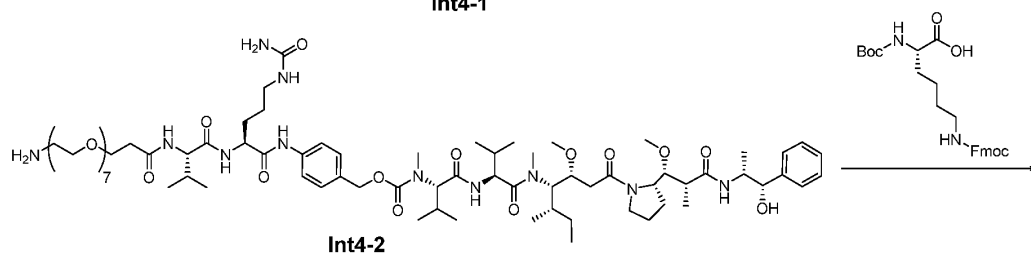
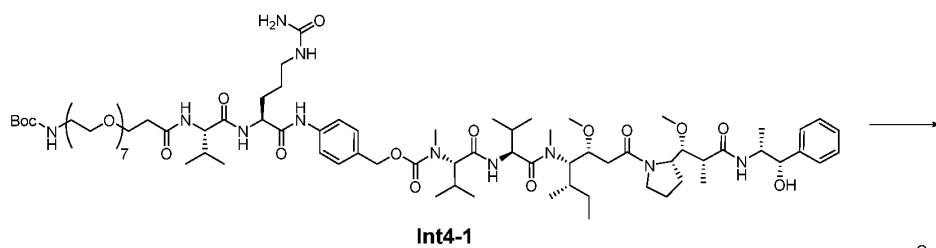
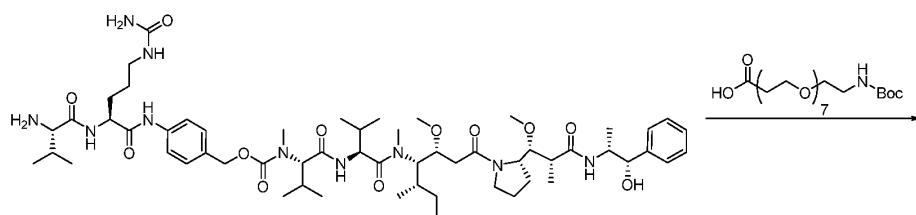
MS m/z (ESI): 1545.7 [M+H]⁺。

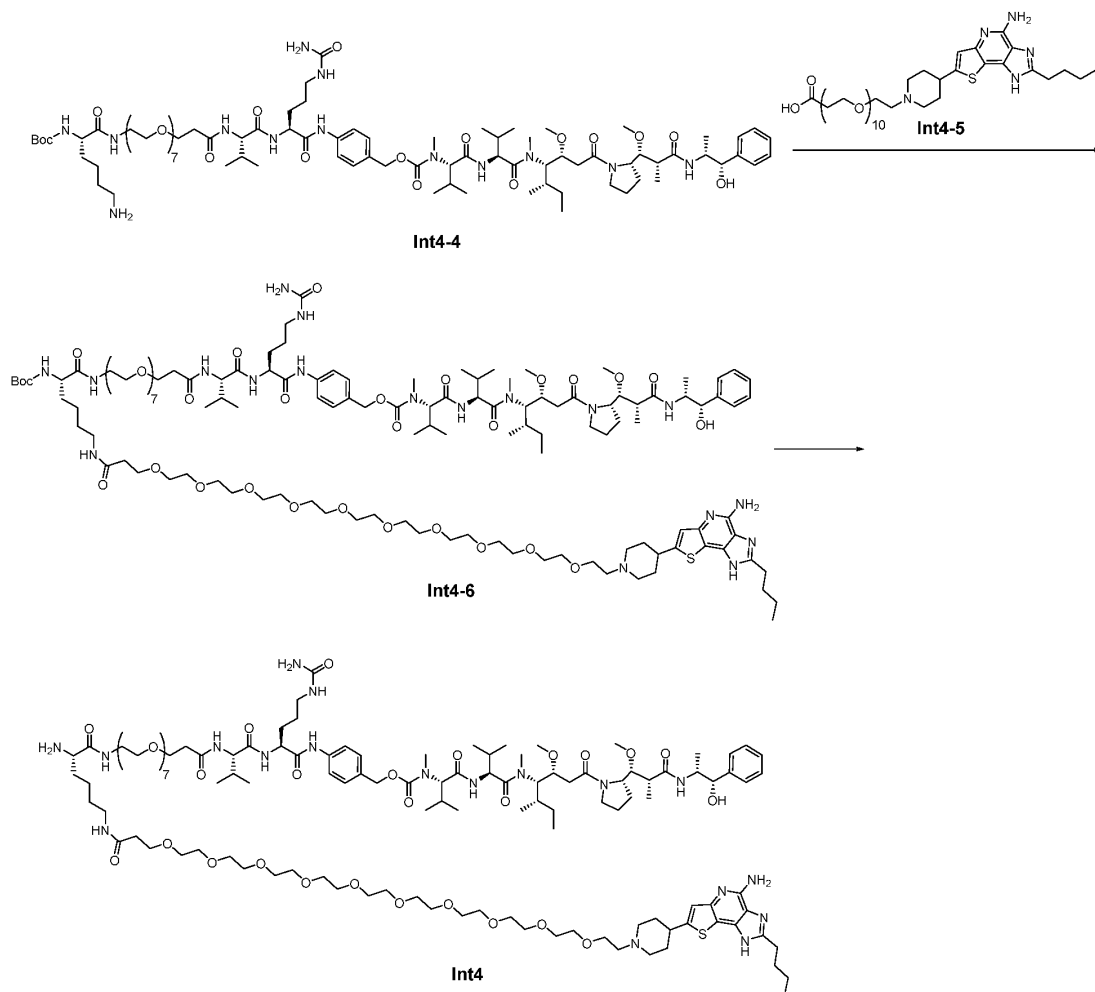
第五步: 化合物 Int3 的制备

将化合物 Int3-4 (95 mg, 0.06 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(25 mL)中, 加入 MC-VC-PABC-MMAE (79 mg, 0.06 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(23.2 mg, 0.18 mmol), 室温搅拌 1 小时, 加入氯化铵的水溶液(10 mL), 用二氯甲烷(10 mL)萃取三次, 有机相干燥, 浓缩得到的粗品用制备薄层硅胶板纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=8/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(73 mg, 收率: 41.4%)。

MS m/z (ESI): 1431.3 [M/2+H]⁺。

25 中间体制备例 4: 化合物 Int4 的制备





第一步：化合物 **Int4-1** 的制备

将 VC-PABC-MMAE (155 mg, 131.07 μmol) 和 2,2-二甲基-4-氧代-3,8,11,14,17,20,23,26-八氧杂-5-二十九烷-29-酸(68.65 mg, 131.07 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 向其中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(42.78 mg, 327.68 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(75.53 mg, 196.61 μmol), 25°C反应 5 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=20/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(193 mg, 收率: 87.3%)。

MS m/z (ESI): 1603.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

10 第二步：化合物 **Int4-2** 的制备

氮气保护下依次将化合物 **Int4-1** (165 mg, 97.79 μmol)和溴化锌(139.08 mg, 586.72

μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中, 25°C反应 2 小时。浓缩反应液得到本步标题化合物的粗品, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 1502.9 [M+H]⁺。

第三步: 化合物 Int4-3 的制备

5 将化合物 Int4-2 (114 mg, 72.06 μmol)和 *N*⁶-(((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)-*N*²-(叔丁氧基羰基)-*L*-赖氨酸(37.43 mg, 72.06 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 向其中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(23.52 mg, 180.16 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(41.53 mg, 108.09 μmol), 25°C下反应 5 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=50/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(110 mg, 收率: 70.4%)。

MS m/z (ESI): 1953.1 [M+H]⁺。

第四步: 化合物 Int4-4 的制备

将化合物 Int4-3 (100 mg, 46.07 μmol)溶于二氯甲烷(3 mL)中, 加入二乙胺(67.40 mg, 921.47 μmol), 20°C下反应 10 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=20/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(40 mg, 收率: 42.8%)。

MS m/z (ESI): 1731.1 [M+H]⁺。

第五步: 化合物 Int4-6 的制备

将化合物 Int4-4 (100 mg, 54.88 μmol)和化合物 Int4-5 (46.64 mg, 54.88 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 向其中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(10.75 mg, 82.31 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(25.29 mg, 65.85 μmol), 25°C下反应 5 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(60 mg, 收率: 40.7%)。

MS m/z (ESI): 1277.8 [M/2+H]⁺。

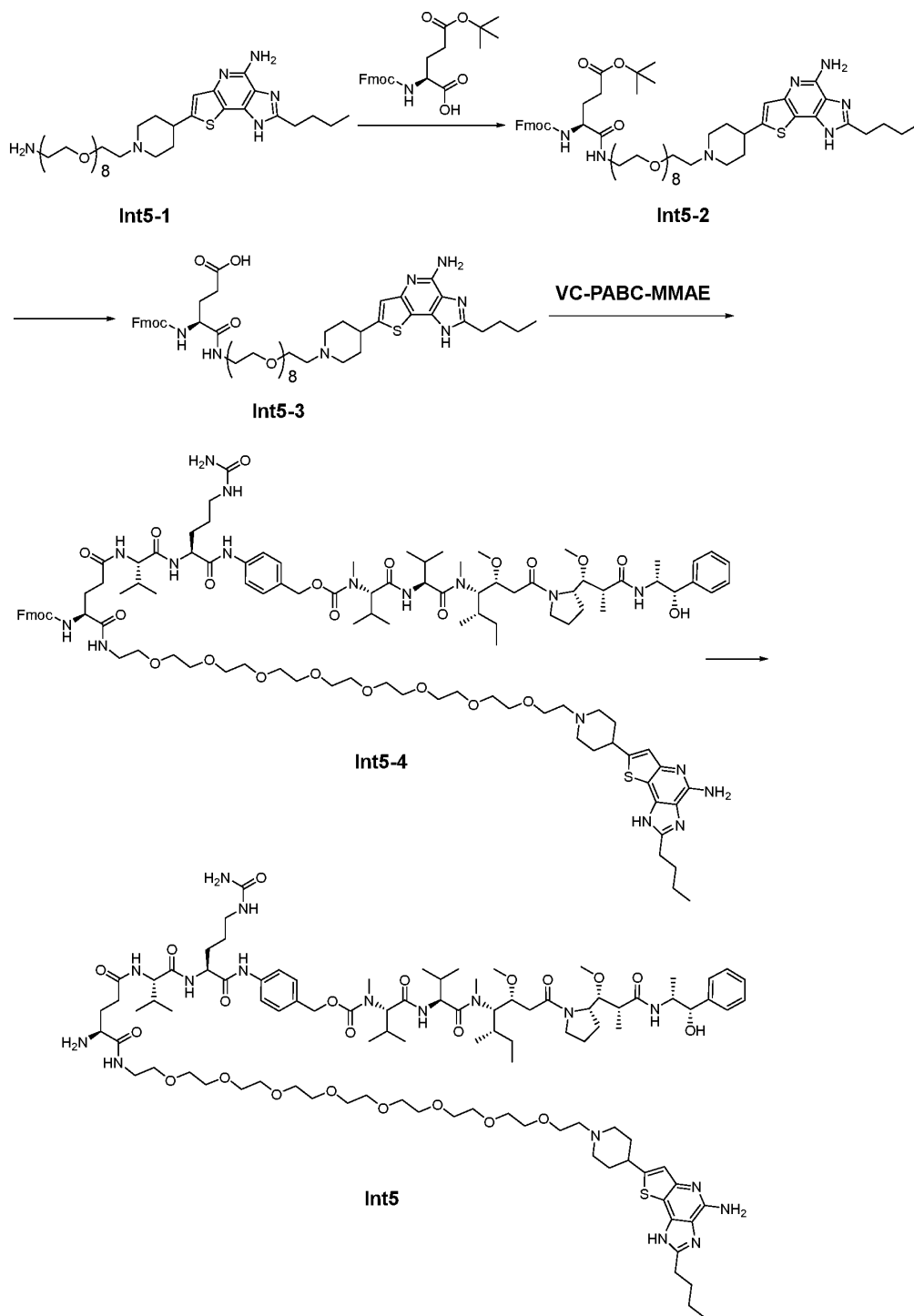
第四步: 化合物 Int4 的制备

25 氮气保护下依次将化合物 Int4-6 (45 mg, 7.04 μmol)和溴化锌(6.68 mg, 28.18 μmol)加

入无水二氯甲烷(2 mL)中, 25°C下反应 2 小时。浓缩反应液得到本步标题化合物的粗品, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 1227.8 [M/2+H]⁺。

中间体制备例 5: 化合物 Int5 的制备



第一步：化合物 **Int5-2** 的制备

依次将化合物 **Int5-1** (186 mg, 243.74 μmol)、(*S*)-2-((((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(131 mg, 292.49 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(66.32 mg, 487.48 μmol)

和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(136.58 mg, 341.24 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(270 mg, 收率: 92.9%)。

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

5 第二步: 化合物 Int5-3 的制备

将化合物 Int5-2 (340 mg, 285.23 μmol)和三氟乙酸(2 mL)加入二氯甲烷(6 mL)中, 25°C反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用硅胶柱层析色谱法纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=4/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(250mg, 收率: 77.4%)。

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

10 第三步: 化合物 Int5-4 的制备

依次将化合物 Int5-3 (150 mg, 132.40 μmol)、VC-PABC-MMAE (156.57 mg, 132.40 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(25.93 mg, 198.60 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(61.02 mg, 158.88 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(250 mg, 收率: 82.2%)。

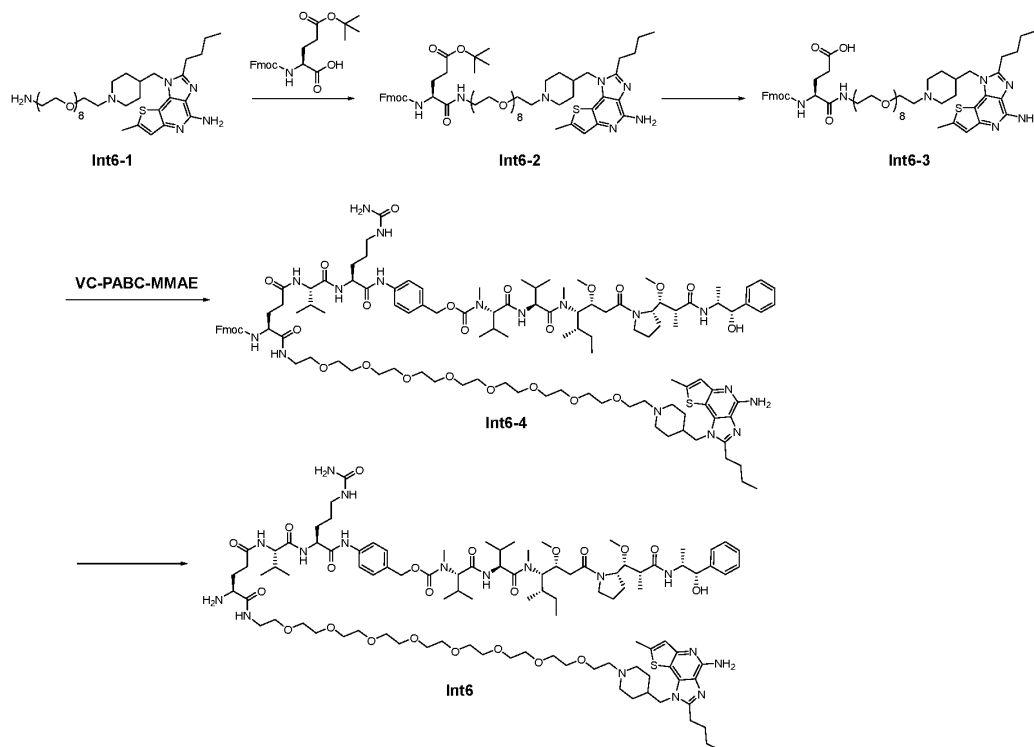
MS m/z (ESI): 1091.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第四步: 化合物 Int5 的制备

将化合物 Int5-4 (250 mg, 8.86 μmol)和哌啶(37.45 mg, 435.44 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(185 mg, 收率: 82.4%)。

MS m/z (ESI): 980.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 6: 化合物 Int6 的制备



第一步：化合物 Int6-2 的制备

依次将(*S*)-2-((((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(85.29 mg, 200.46 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(45.2 mg, 346.26 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(103.94 mg, 270.22 μmol)和化合物 Int6-1 (150 mg, 182.24 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(170 mg, 收率: 79.8%)。

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

第二步：化合物 Int6-3 的制备

10 将化合物 Int6-2 (170 mg, 138.15 μmol)溶于无水二氯甲烷(6 mL)和三氟乙酸(3 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(133 mg, 收率: 86.3%)。

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

第三步：化合物 Int6 的制备

依次将化合物 Int6-3 (51 mg, 46.19 μmol)、VC-PABC-MMAE (51.88 mg, 46.19 μmol)、

N,N-二异丙基乙胺(24.37 mg, 187.03 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(19.14 mg, 49.88 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 1.5 小时。将反应体系倒入冰水(10 mL)中, 乙酸乙酯萃取(5 mL*3), 合并有机相并用饱和食盐水反洗(3 mL*2), 无水硫酸钠干燥有机相, 有机相浓缩得到本步的标题化合物(86 mg, 收率:

5 84.3%)。

MS m/z (ESI): 1105.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

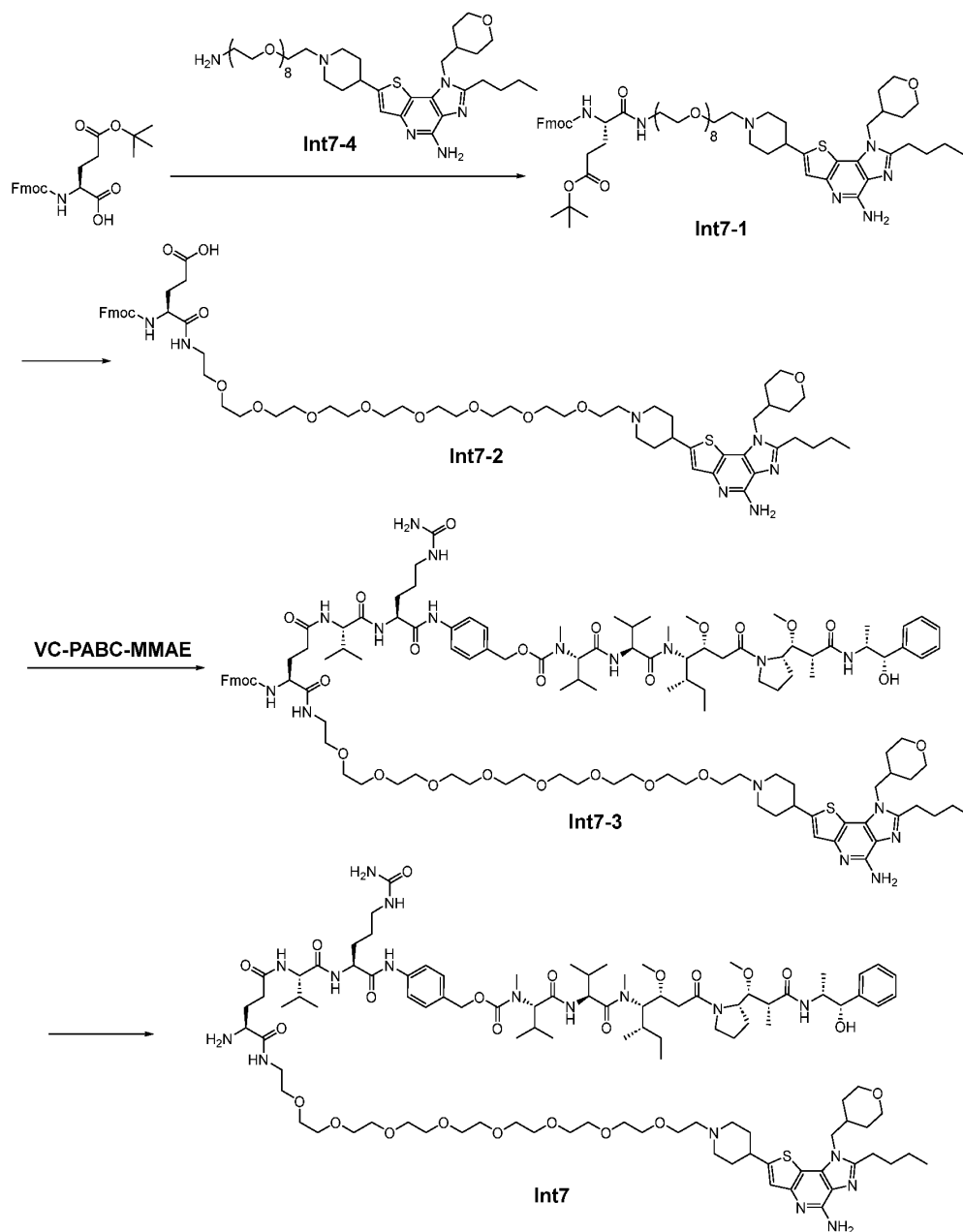
第四步: 化合物 Int6 的制备

将化合物 Int6-4 (86 mg, 38.93 μmol)和哌啶(5.36 mg, 62.27 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度:

10 A%=20%-25%), 得到本步的标题化合物(47 mg, 收率: 60.8%)。

MS m/z (ESI): 1988.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 7: 化合物 Int7 的制备



第一步：化合物 Int7-1 的制备

将(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(91.93 mg, 216.06 μmol)、化合物 Int7-4 (148.2 mg, 180.05 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(46.54 mg, 360.11 μmol)和 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(75.26 mg, 198.06 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，25°C 搅拌 2 小时。反应液用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=30%-40%)，得到本步的标题化合物(152 mg，收率：68.6%)。

MS m/z (ESI): 1230.7 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int7-2 的制备

将化合物 Int7-1 (133 mg, 108.08 μmol)溶于二氯甲烷(3 mL)中，加入三氟乙酸(1 mL)，25°C 搅拌 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物的粗品，直接用于下一步。

5 MS m/z (ESI): 1174.6 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int7-3 的制备

将化合物 Int7-2 (47.5 mg, 40.44 μmol)、VC-PABC-MMAE (54.52 mg, 48.53 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(10.45 mg, 80.89 μmol)和 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(16.91 mg, 44.49 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中，25°C 搅拌 2 小时。反
10 应液加入 *N,N*-二甲基甲酰胺稀释后用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=40%-50%)，得到本步的标题化合物(57.8 mg, 产率: 62.7%)。

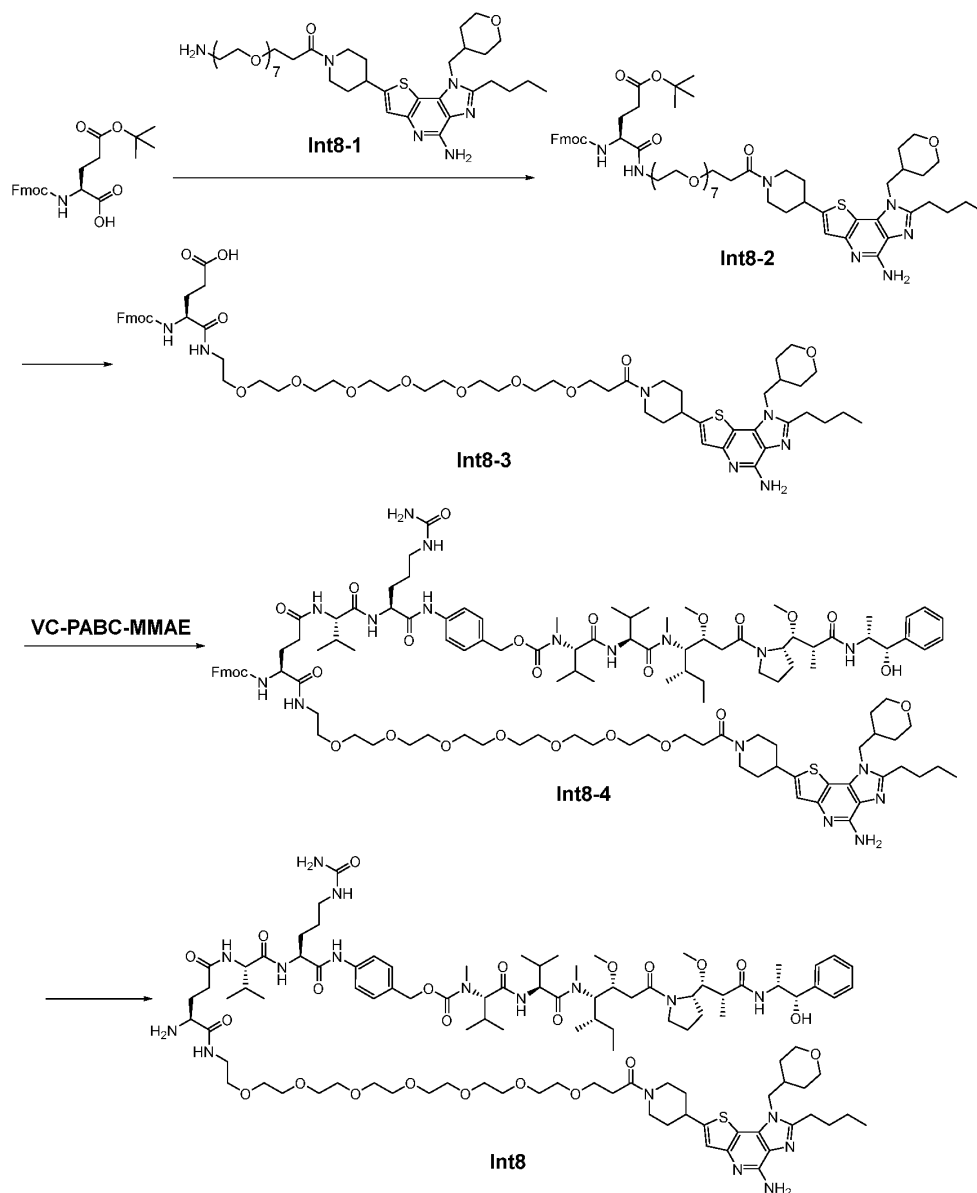
MS m/z (ESI): 1140.7 [M/2+H]⁺。

第四步：化合物 Int7 的制备

将化合物 Int7-3 (57.8 mg, 25.35 μmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，加入二乙胺
15 (9.27 mg, 126.76 μmol)，25°C 搅拌 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=40%-50%)，得到本步的标题化合物(39.6 mg, 产率: 75.9%)。

MS m/z (ESI): 1029.6 [M/2+H]⁺。

中间体制备例 8：化合物 Int8 的制备



第一步：化合物 Int8-2 的制备

将 (*S*)-2-(((*9H*-芴-*9*-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸 (276.97 mg, 644.45 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺 (209.93 mg, 1610 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯 (296.84 mg, 773.34 μmol) 和化合物 Int8-1 (604 mg, 644.45 μmol) 加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺 (4 mL) 中，0°C 搅拌 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=25%-35%)，得到本步的标题化合物 (747.9 mg，收率：95.6%)。

MS m/z (ESI): 1214.6 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int8-3 的制备

将化合物 Int8-2 (460 mg, 378.75 μmol)溶于无水二氯甲烷(6 mL)和三氟乙酸(3 mL)的混合溶剂中, 25°C 搅拌 2 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(400 mg, 收率: 91.2%)。

5 MS m/z (ESI): 1158.6 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int8-4 的制备

将化合物 Int8-3 (113.74 mg, 91.19 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(23.24 mg, 178.03 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(51.28 mg, 133.52 μmol)和 VC-PABC-MMAE (95 mg, 84.56 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 搅拌 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=55%-65%), 得到本步的标题化合物(170 mg, 收率: 93.5%)。

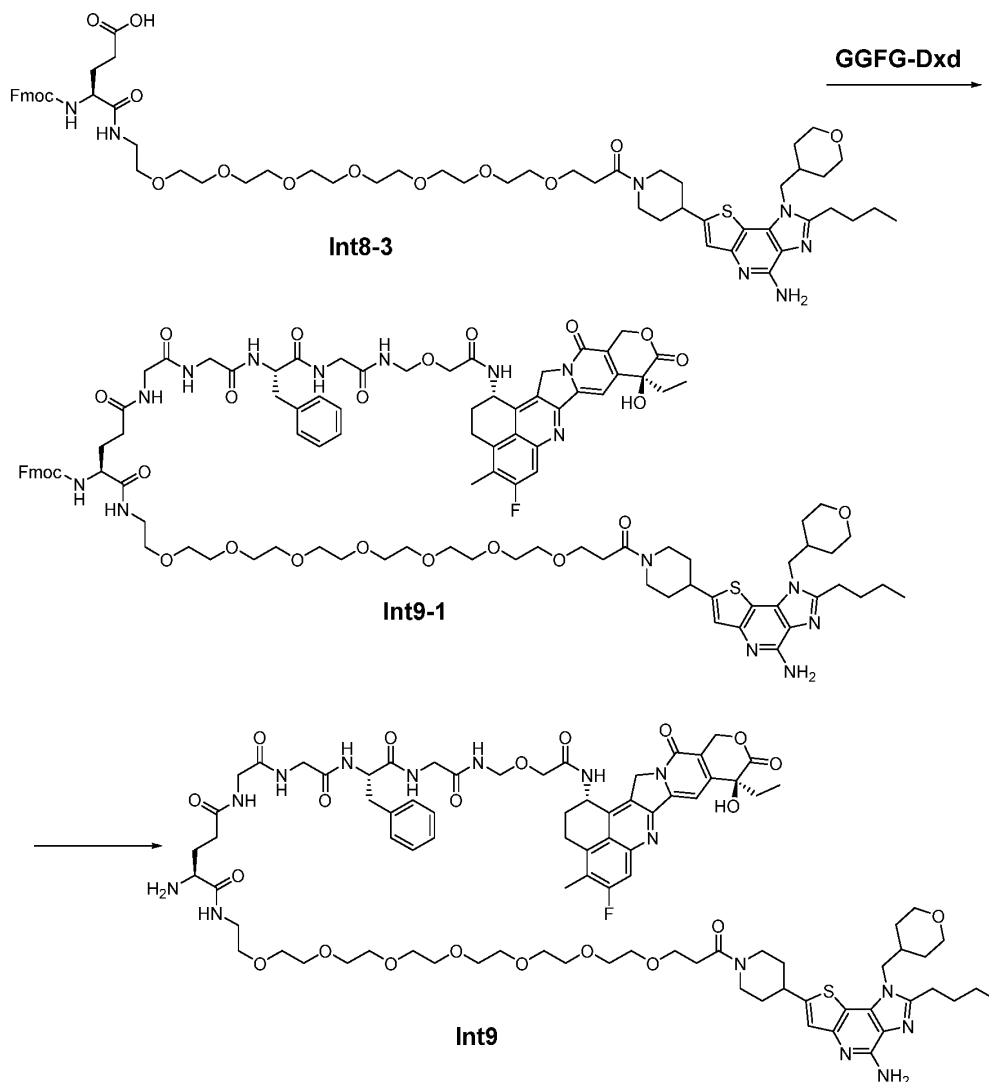
MS m/z (ESI): 1132.7 [M/2+H]⁺。

第四步：化合物 Int8 的制备

15 将化合物 Int8-4 (170 mg, 75.09 μmol)和二乙胺(27.74 mg, 375.47 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 搅拌 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=55%-65%), 得到标题化合物(110 mg, 收率: 71.9%)。

MS m/z (ESI): 1021.6 [M/2+H]⁺。

中间体制备例 9：化合物 Int9 的制备



第一步：化合物 Int9-1 的制备

将化合物 Int8-3 (440 mg, 379.83 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(98.18 mg, 759.66 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(173.31 mg, 455.8 μmol)和 GGFG-Dxd (319.38 mg, 379.83 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL)中，0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=25%-35%)，得到本步的标题化合物(250 mg，收率：35.0%)。

MS m/z (ESI): 991.5 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

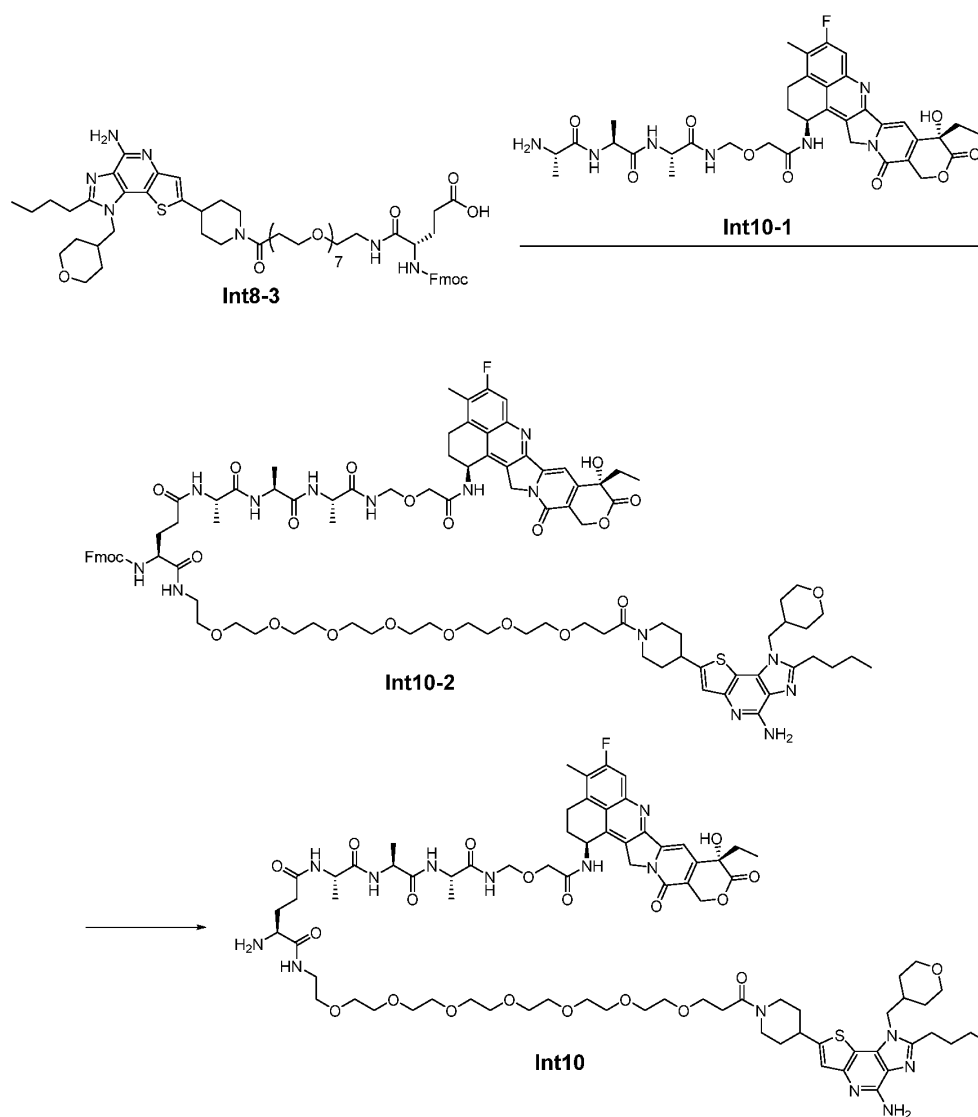
第二步：化合物 Int9 的制备

10 将化合物 Int9-1 (205 mg, 103.47 μmol)和二乙胺(36.31 mg, 491.49 μmol)加入 *N,N*-二

甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(160 mg, 收率: 93.1%)。

MS m/z (ESI): 586.9 [M/3+H]⁺。

中间体制备例 10: 化合物 Int10 的制备



5

第一步: 化合物 Int10-2 的制备

将化合物 Int8-3 (75.54 mg, 61.78 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(15.97 mg, 123.56 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(30.54 mg, 80.32 μmol)和化合物 Int10-1 (50 mg, 67.96 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反

应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(85 mg, 收率: 77.2%)。

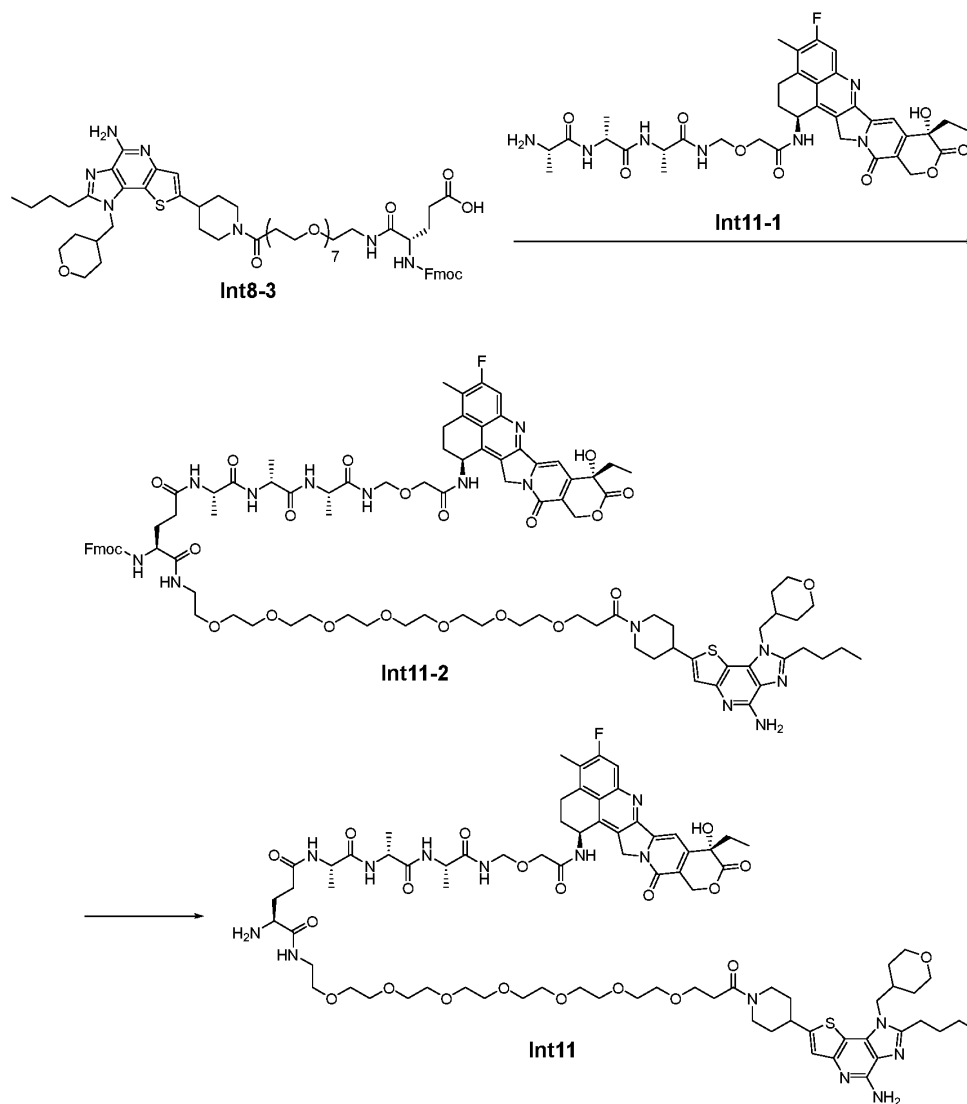
MS m/z (ESI): 1876.9 [M+H]⁺。

第二步: 化合物 Int10 的制备

- 5 将化合物 Int10-2 (85 mg, 45.3 μmol)和二乙胺(15.9 mg, 215.2 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(70 mg, 收率: 98.3%)。

MS m/z (ESI): 1653.8 [M+H]⁺。

中间体制备例 11: 化合物 Int11 的制备



第一步：化合物 **Int11-2** 的制备

依次将化合物 **Int8-3** (51.95 mg, 44.85 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(11.09 mg, 85.84 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(22.85 mg, 60.08 μmol)和化
 5 合物 **Int11-1** (30 mg, 40.77 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 **B**, 洗脱梯度: **A**%=45%-50%), 得到本步的标题化合物(56 mg, 收率: 73.2%)。

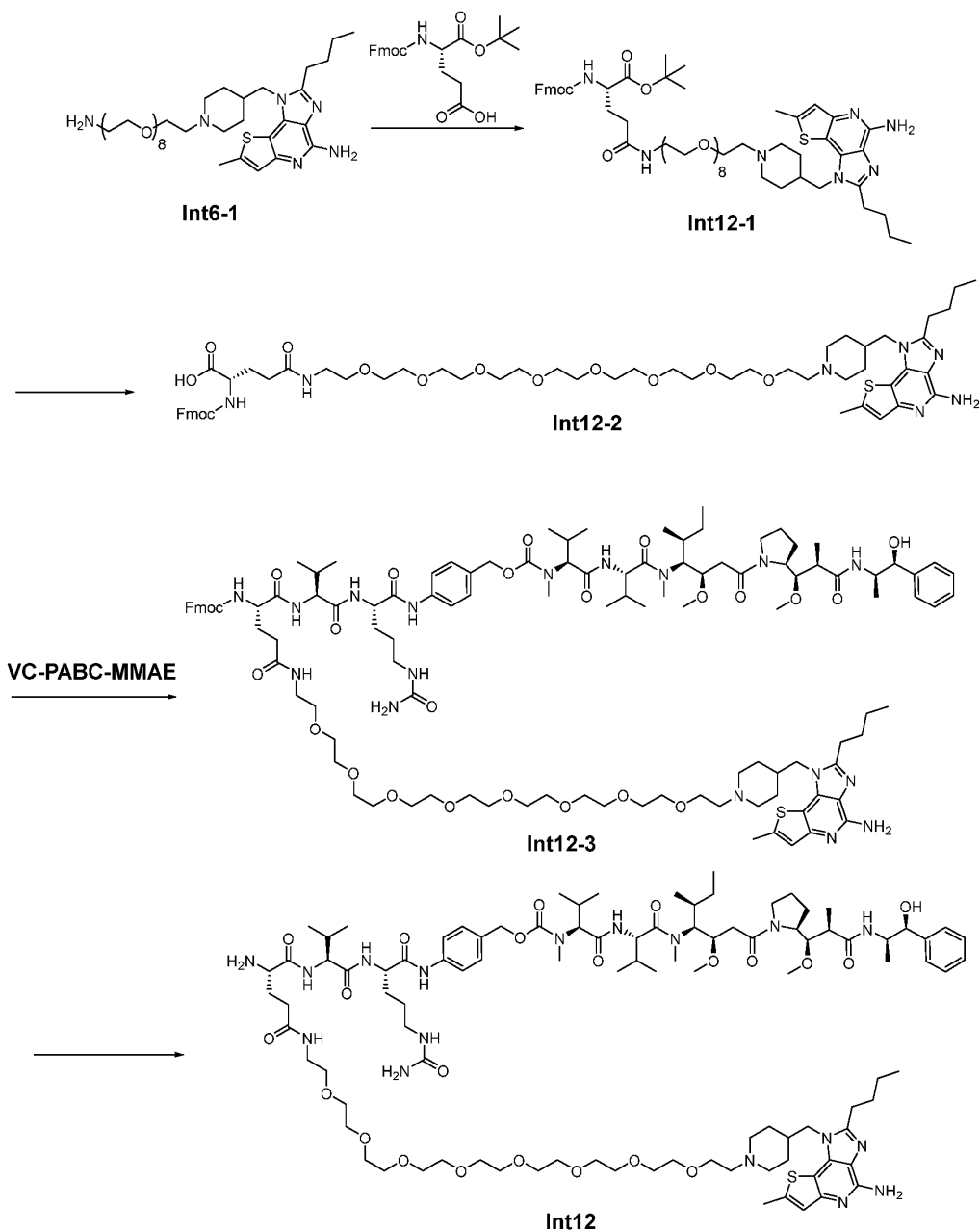
MS m/z (ESI): 1876.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 **Int11** 的制备

将化合物 Int11-2 (57 mg, 30.38 μmol)和二乙胺(11.22 mg, 151.91 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 59.7%)。

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

5 中间体制备例 12: 化合物 Int12 的制备



第一步：化合物 Int12-1 的制备

依次将(*S*)-2-((((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁氧基)-5-氧代戊酸(37.29 mg, 87.65 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(14.16 mg, 109.56 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(38.88 mg, 102.25 μmol)和化合物 Int6-1 (55 mg, 73.04 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(80 mg, 收率: 99.4%)。

MS *m/z* (ESI): 1160.6 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int12-2 的制备

将化合物 Int12-1 (50 mg, 43.09 μmol)溶于无水二氯甲烷(3 mL)和三氟乙酸(1.5 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 4 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(45 mg, 收率: 62.2%)。

MS *m/z* (ESI): 1104.6 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int12-3 的制备

将化合物 Int12-2 (45 mg, 40.74 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(7.58 mg, 58.07 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(20.81 mg, 54.19 μmol)和 VC-PABC-MMAE (45.78 mg, 40.74 μmol), 加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 35.1%)。

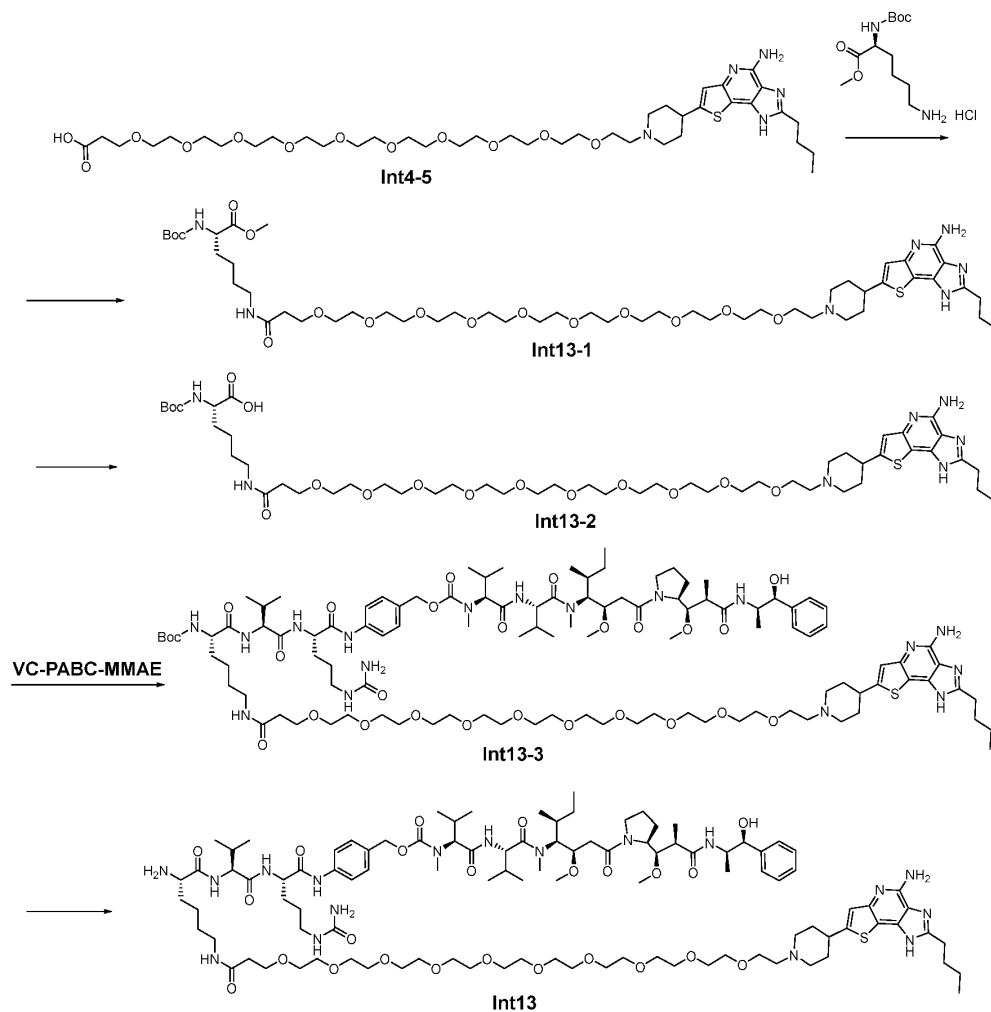
MS *m/z* (ESI): 1105.7 [M/2+H]⁺。

20 第四步：化合物 Int12 的制备

将化合物 Int12-3 (30 mg, 13.44 μmol)和二乙胺(4.58 mg, 53.76 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(25 mg, 收率: 93.6%)。

MS *m/z* (ESI): 994.6 [M/2+H]⁺。

25 中间体制备例 13: 化合物 Int13 的制备



第一步：化合物 Int13-1 的制备

将化合物 Int4-5 (150 mg, 169.23 μmol)和 *N*-叔丁氧羰基赖氨酸甲酯盐酸盐(46.37 mg, 169.23 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 然后依次加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (44.18 mg, 338.46 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(78.01 mg, 203.08 μmol), 25°C反应 2 小时。减压浓缩反应液得到的剩余物用硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=6/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(160mg, 收率: 95.8%)。

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

第二步：化合物 Int13-2 的制备

10 将化合物 Int13-1 (185 mg, 162.08 μmol)溶于四氢呋喃(1 mL)、甲醇(1 mL)和水(1 mL)的混合溶剂中, 加入一水合氢氧化锂(28.63 mg, 648.31 μmol), 25°C反应 3 小时。反应液

浓缩, 加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL), 所得溶液用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(160 mg, 收率: 87.6%)。

MS m/z (ESI): 1070.6 [M+H]⁺。

第三步: 化合物 Int13-3 的制备

- 5 依次将化合物 Int13-2 (50 mg, 42.04 μmol)、VC-PABC-MMAE (52.48 mg, 42.04 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(13.70 mg, 105.11 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(19.37 mg, 50.45 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1.5 mL)中, 室温反应 1.5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=45%-55%), 得到本步的标题化合物(41 mg, 收率: 40.3%)。

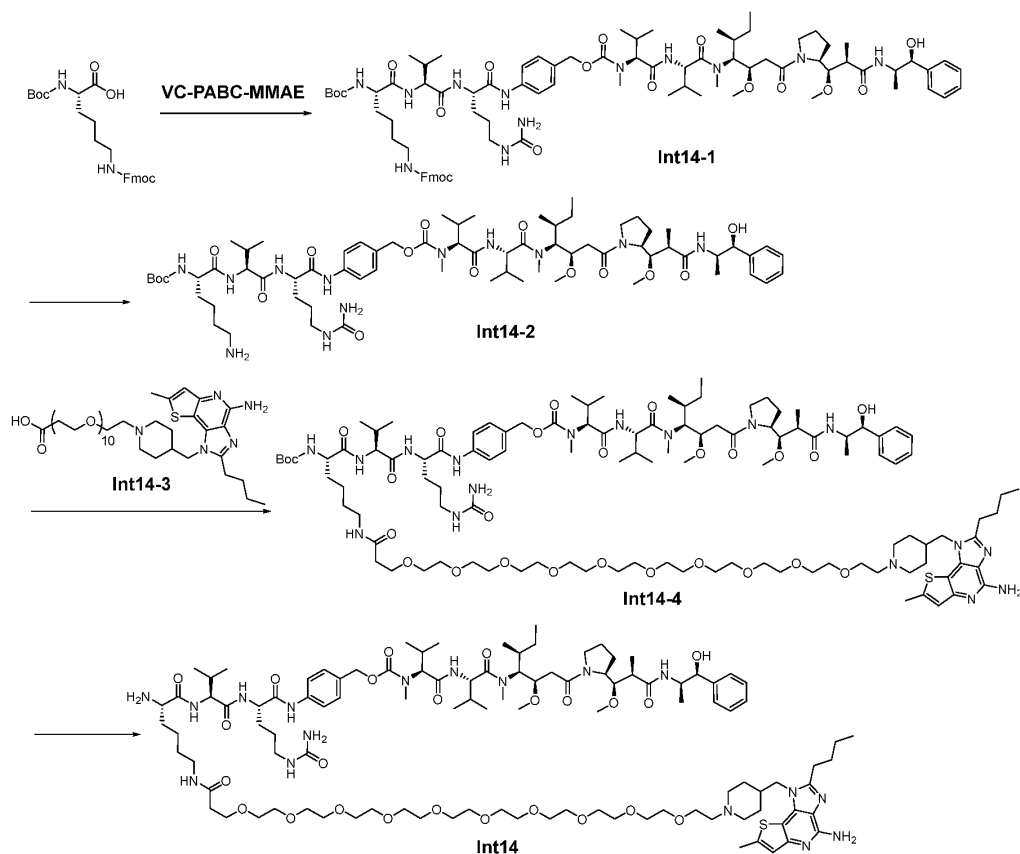
- 10 MS m/z (ESI): 1088.7 [M/2+H]⁺。

第四步: 化合物 Int13 的制备

将化合物 Int13-3 (38 mg, 15.72 μmol)和无水溴化锌(17.88 mg, 78.59 μmol)加入无水二氯甲烷(3 mL)中, 室温反应 5 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 82.8%)。

- 15 MS m/z (ESI): 1038.6 [M/2+H]⁺。

中间体制备例 14: 化合物 Int14 的制备



第一步：化合物 Int14-1 的制备

依次将 VC-PABC-MMAE (150 mg, 133.52 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(22.43 mg, 173.58 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脒六氟磷酸酯(66 mg, 173.58 μmol)和 *N*⁶-(((9*H*-苈-9-基)甲氧基)羰基)-*N*²-(叔丁氧基羰基)-*L*-赖氨酸(62.56 mg, 133.52 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=60%-70%), 得到本步的标题化合物(170 mg, 收率: 85.1%)。

MS *m/z* (ESI): 1573.9 [M+H]⁺。

第二步：化合物 Int14-2 的制备

10 将化合物 Int14-1 (85 mg, 53.46 μmol)和二乙胺(19.75 mg, 267.32 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(73 mg, 收率: 98.6%)。

MS *m/z* (ESI): 1351.8 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int14-4 的制备

- 依次将化合物 Int14-3 (55.52 mg, 63.81 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(10.32 mg, 79.07 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(28.34mg, 73.8 μmol)和化合物 Int14-2 (75 mg, 55.48 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中，0°C 反应 1 小时。
- 5 反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=25%-40%)，得到本步的标题化合物(38 mg，收率：32.7%)。

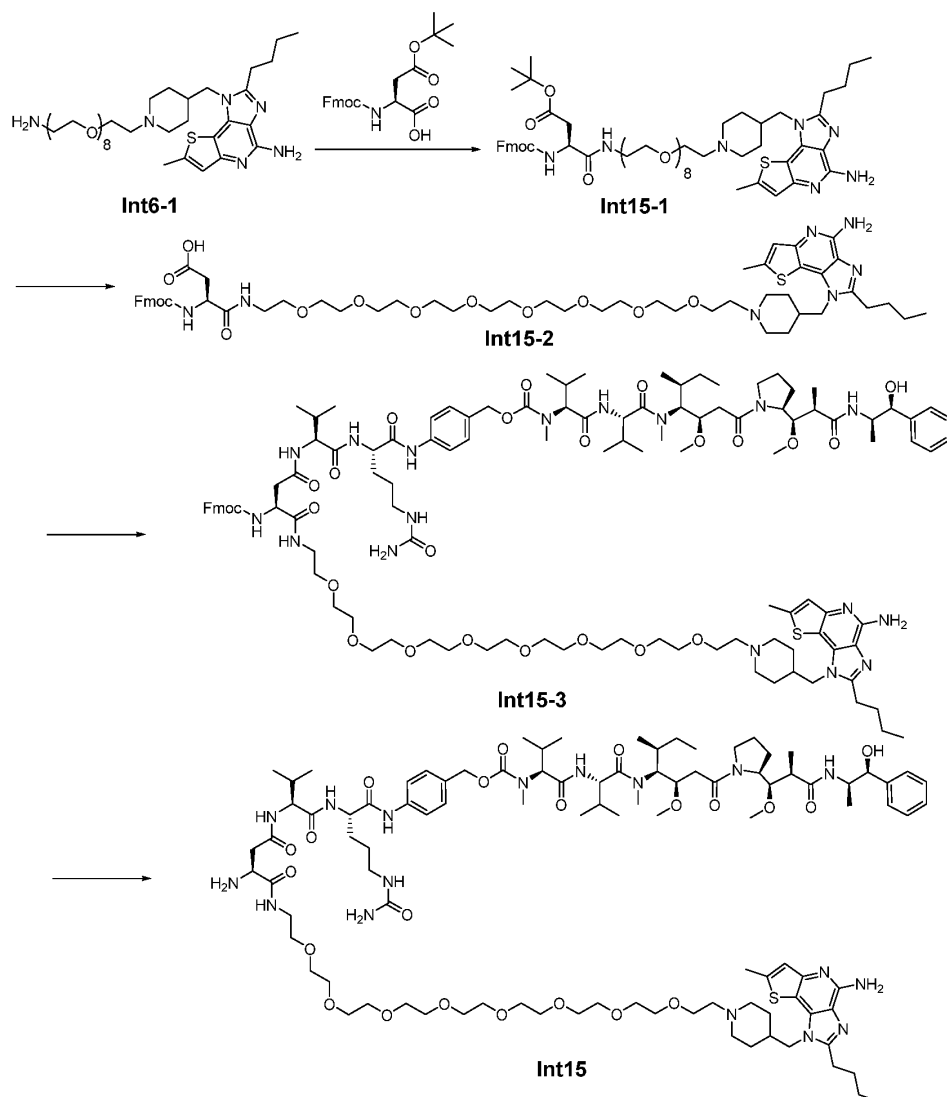
MS m/z (ESI): 1102.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第四步：化合物 Int14 的制备

- 将化合物 Int14-4 (38 mg, 17.24 μmol)和溴化锌(29.81 mg, 131.05 μmol)加入无水二氯
- 10 甲烷(3 mL)中，25°C 反应 3 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-30%)，得到本步的标题化合物(61 mg，收率：78.8%)。

MS m/z (ESI): 702.1 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 15：化合物 Int15 的制备



第一步：化合物 Int15-1 的制备

依次将化合物 Int6-1 (60 mg, 79.78 μmol)、(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酸(32.78 mg, 79.78 μmol)、N,N-二异丙基乙胺(25.73 mg, 199.46 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(36.38 mg, 95.73 μmol)加入 N,N-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温搅拌 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=35%-40%)，得到本步的标题化合物(52 mg，收率：56.9%)。

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

第二步：化合物 Int15-2 的制备

依次将化合物 Int15-1 (50 mg, 43.60 μmol)和 48%氢溴酸水溶液(0.5 mL)加入乙腈(1 mL)中, 室温搅拌 3 小时。反应液浓缩得到本步的标题化合物(35 mg, 收率: 73.4%)。

MS m/z (ESI): 1090.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步: 化合物 Int15-3 的制备

- 5 依次将化合物 Int15-2 (35 mg, 32.09 mmol)、VC-PABC-MMAE (36.04 mg, 32.09 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(10.34 mg, 80.22 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(14.63 mg, 38.50 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温搅拌 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=40%-45%), 得到本步的标题化合物(63 mg, 收率: 89.3%)。

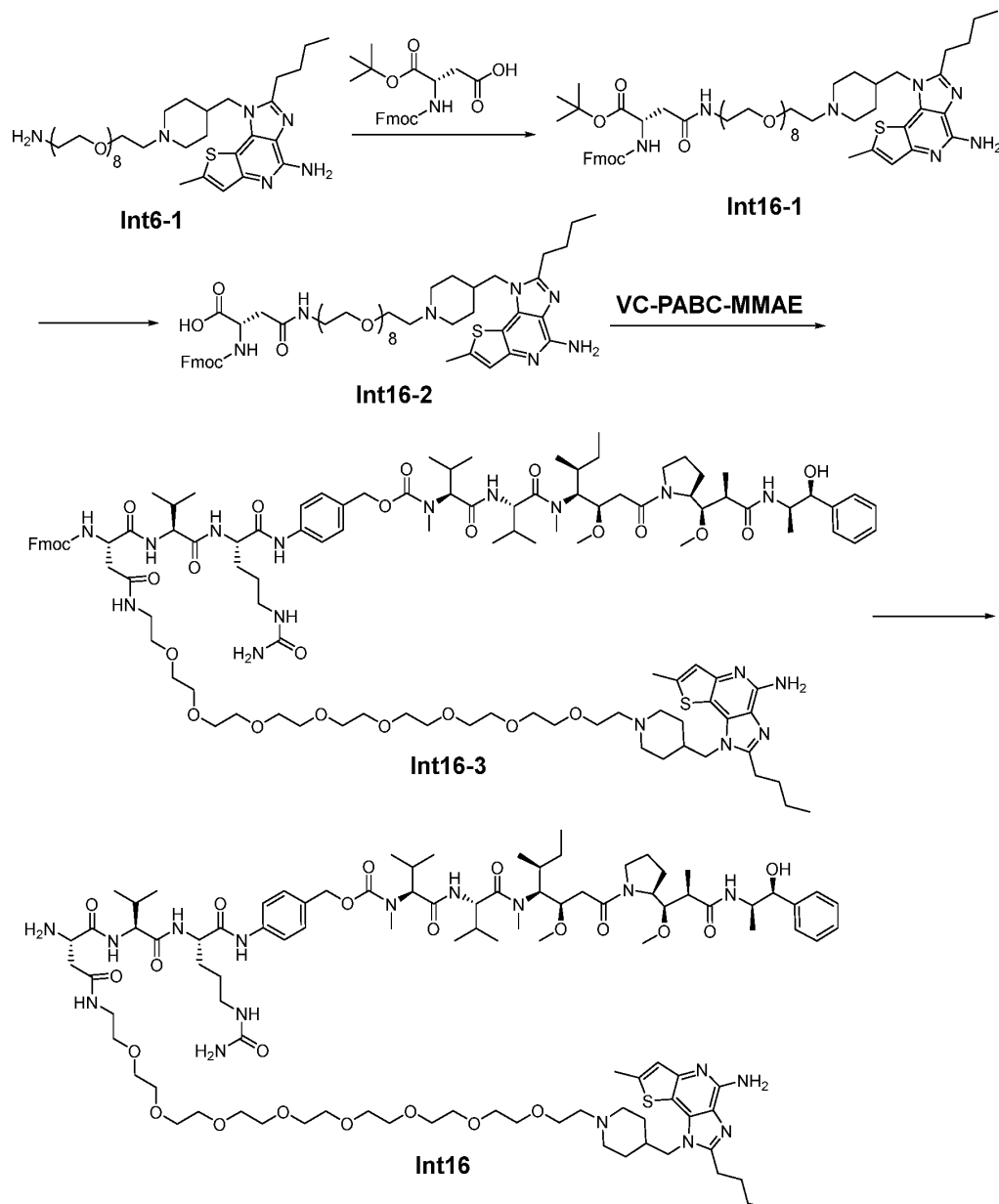
- 10 MS m/z (ESI): 1098.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第四步: 化合物 Int15 的制备

将化合物 Int15-3 (63 mg, 28.7 μmol)和哌啶(4.82 mg, 57.40 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温搅拌 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(28 mg, 收率: 49.5%)。

- 15 MS m/z (ESI): 1974.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 16: 化合物 Int16 的制备



第一步：化合物 Int16-1 的制备

依次将(S)-3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酸(35.52 mg, 86.33 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(14.16 mg, 109.56 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(38.88 mg, 102.25 μmol)和化合物 Int6-1 (65 mg, 86.33 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(50 mg, 收率: 53.2%)。

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

第二步：化合物 Int16-2 的制备

将化合物 Int16-1 (50 mg, 43.18 μmol)溶于无水二氯甲烷(3 mL)和三氟乙酸(1.5 mL)的混合溶剂中，25°C 反应 4 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=35%-45%)，得到本步的标题化合物(45 mg，收率：89.2%)。

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

第三步：化合物 Int16-3 的制备

依次将化合物 Int16-2 (41.53 mg, 38.09 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(6.82 mg, 52.37 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(18.07 mg, 47.05 μmol)和 VC-PBAC-MMAE (42.8 mg, 38.09 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中，0°C 反应
10 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-25%)，得到本步的标题化合物(52 mg，收率：65.4%)。

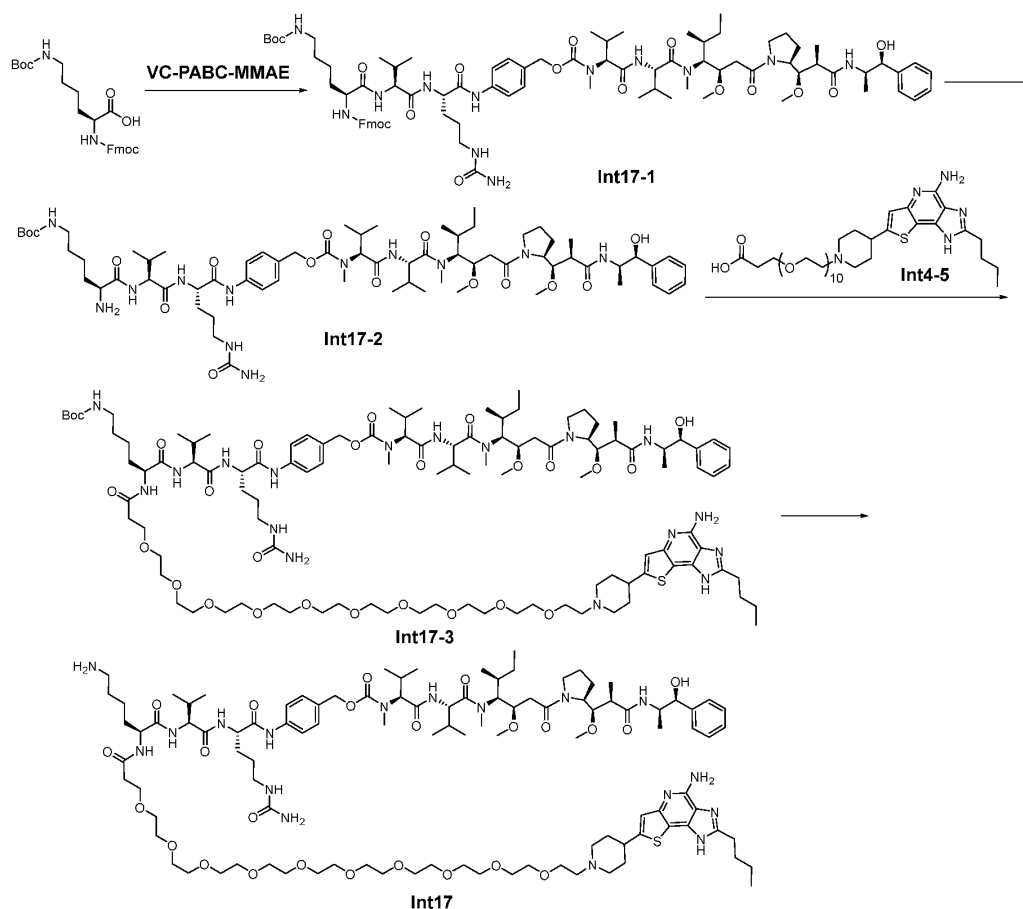
MS m/z (ESI): 1098.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第四步：化合物 Int16 的制备

将化合物 Int16-3 (52 mg, 23.69 μmol)和哌啶(6.52 mg, 76.54 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲
15 酰胺(2 mL)中，25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=35%-45%)，得到本步的标题化合物(31 mg，收率：82.9%)。

MS m/z (ESI): 658.7 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$ 。

中间体制备例 17：化合物 Int17 的制备



第一步：化合物 Int17-1 的制备

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

MS m/z (ESI): 1574.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

10 第二步：化合物 Int17-2 的制备

依次将化合物 Int17-1 (82.00 mg，粗品)和哌啶(8.07 mg, 93.78 μmol)加入 N,N -二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=25%-35%)，得到本步的标题化合物(41 mg，两步总收率：56.8%)。

MS m/z (ESI): 1351.9 [M+H]⁺。

第三步：化合物 Int17-3 的制备

依次将化合物 Int17-2 (41.00 mg, 30.32 μmol)、化合物 Int4-5 (25.52 mg, 30.32 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(9.78 mg, 75.81 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(17.28 mg, 45.48 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=45%-50%)，得到本步的标题化合物(35 mg，收率：53.1%)。

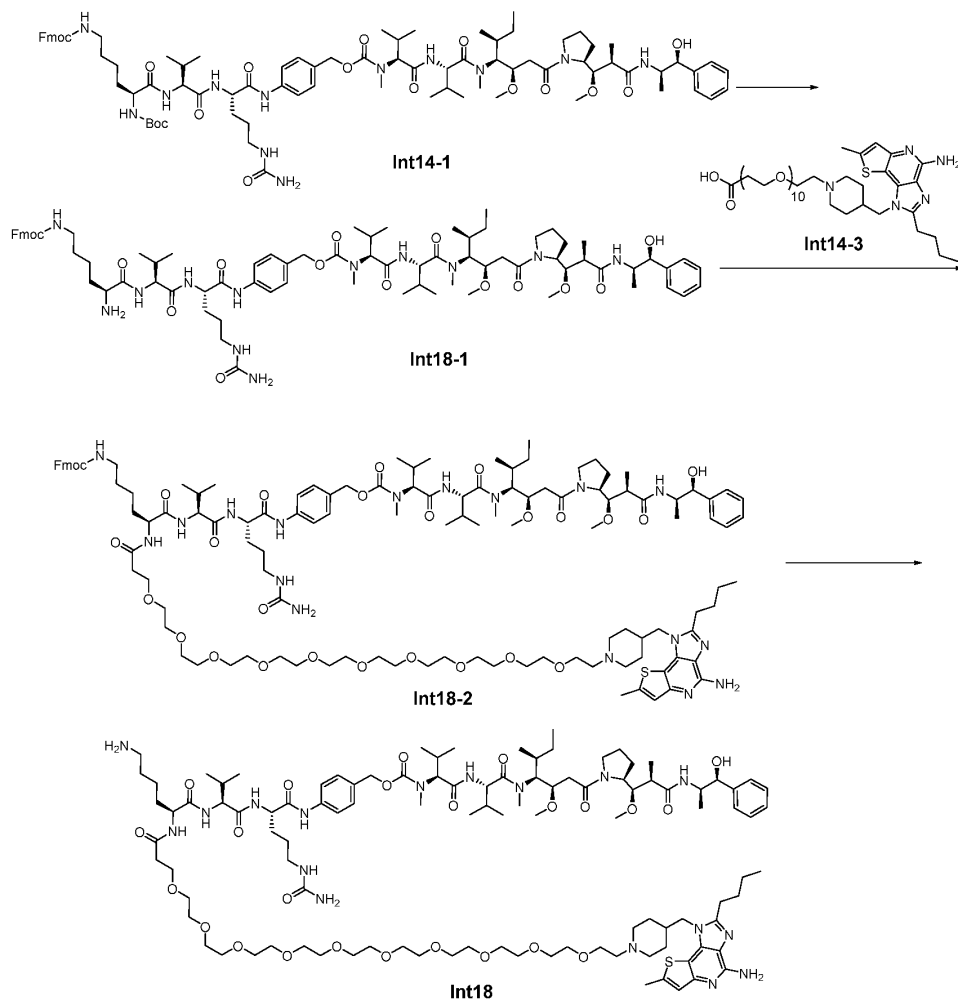
MS m/z (ESI): 1088.7 [M/2+H]⁺。

第四步：化合物 Int17 的制备

10 将化合物 Int17-3 (35 mg, 16.09 μmol)和无水溴化锌(14.28 mg, 64.36 μmol)加入二氯甲烷(2 mL)中，室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=25%-30%)，得到本步的标题化合物(25 mg，收率：74.9%)。

MS m/z (ESI): 1038.6 [M/2+H]⁺。

中间体制备例 18：化合物 Int18 的制备



第一步：化合物 Int18-1 的制备

将化合物 Int14-1 (87 mg, 55.27 μmol)和溴化锌(95.56 mg, 420.09 μmol)加入无水二氯甲烷(3 mL)中, 25°C 反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(61 mg, 收率: 78.8%)。

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

第二步：化合物 Int18-2 的制备

依次将化合物 Int14-3 (21.25 mg, 24.42 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(4.54 mg, 34.81 μmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(12.48 mg, 32.49 μmol)和化合物 Int18-1 (36 mg, 24.42 μmol), 加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 1 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步

的标题化合物(45 mg, 收率: 83.4%)。

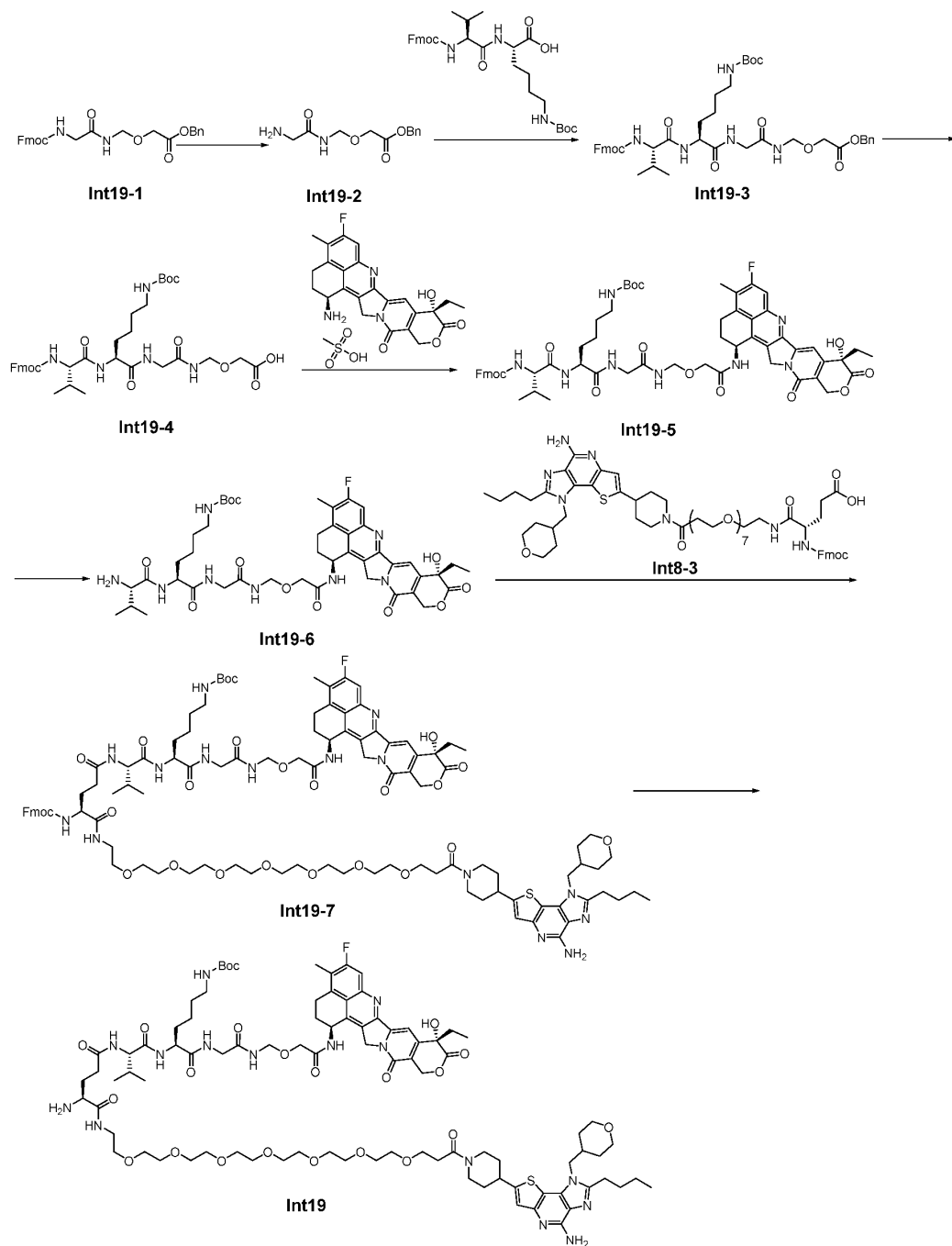
MS m/z (ESI): 1163.7 $[M/2+H]^+$ 。

第三步: 化合物 Int18 的制备

将化合物 Int18-2 (40 mg, 17.03 μmol)和二乙胺(6.29 mg, 85.13 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(30 mg, 收率: 83.8%)。

MS m/z (ESI): 1052.7 $[M/2+H]^+$ 。

中间体制备例 19: 化合物 Int19 的制备



第一步：化合物 Int19-2 的制备

将化合物 Int19-1 (800 mg, 1.67 mmol)和哌啶(287.11 mg, 3.34 mmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)中，室温反应 2 小时。反应液浓缩后，加入甲基叔丁基醚(20 mL)，超声 5 分钟后，静置，过滤，固体干燥得到本步的标题化合物(315 mg，收率：73.5%)。

MS m/z (ESI): 253.1 $[M+H]^+$ 。

第二步：化合物 Int19-3 的制备

将化合物 Int19-2 (90 mg, 321.09 μmol)、 N^2 -((((9*H*-苈-9-基)甲氧基)羰基)-*L*-缬氨酸)- N^6 -(叔丁氧羰基)-*L*-赖氨酸(202.53 mg, 321.09 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(104.60 mg, 802.72 μmol)、1-羟基苯并三唑(49.23 mg, 353.20 μmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐
5 酸盐(77.43 mg, 401.36 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中，室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=50%-55%)，得到本步的标题化合物(142 mg，收率：47.4%)。

MS m/z (ESI): 802.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步：化合物 Int19-4 的制备

10 将化合物 Int19-3 (142 mg, 159.37 μmol)、甲酸铵(50.75 mg, 796.84 μmol)和 10%钯碳(15 mg)加入无水甲醇(4 mL)中，室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=30%-35%)，得到本步的标题化合物(101 mg，收率：80.1%)。

MS m/z (ESI): 712.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第四步：化合物 Int19-5 的制备

15 将化合物 Int19-4 (95 mg, 133.46 μmol)、甲磺酸依喜替康(70.94 mg, 133.46 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(43.04 mg, 333.66 μmol)和双(2-氧代-3-恶唑烷基)次磷酰氯(50.85 mg, 200.20 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 3 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=45%-55%)，得到本步的标题化合物(105 mg，收率：69.7%)。

20 MS m/z (ESI): 1129.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第五步：化合物 Int19-6 的制备

将化合物 Int19-5 (105 mg, 92.98 μmol)和哌啶(15.83 mg, 185.97 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A，洗脱梯度：A%=27%-33%)，得到本步的标题化合物(46 mg，收率：54.5%)。

25 MS m/z (ESI): 907.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第六步：化合物 Int19-7 的制备

- 依次将化合物 Int8-3 (50 mg, 41.85 μmol)、化合物 Int19-6 (37.95 mg, 41.85 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(13.63 mg, 104.61 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(19.27 mg, 50.21 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。
- 5 反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A，洗脱梯度：A%=40%-48%)，得到本步的标题化合物(43 mg，收率：50.2%)。

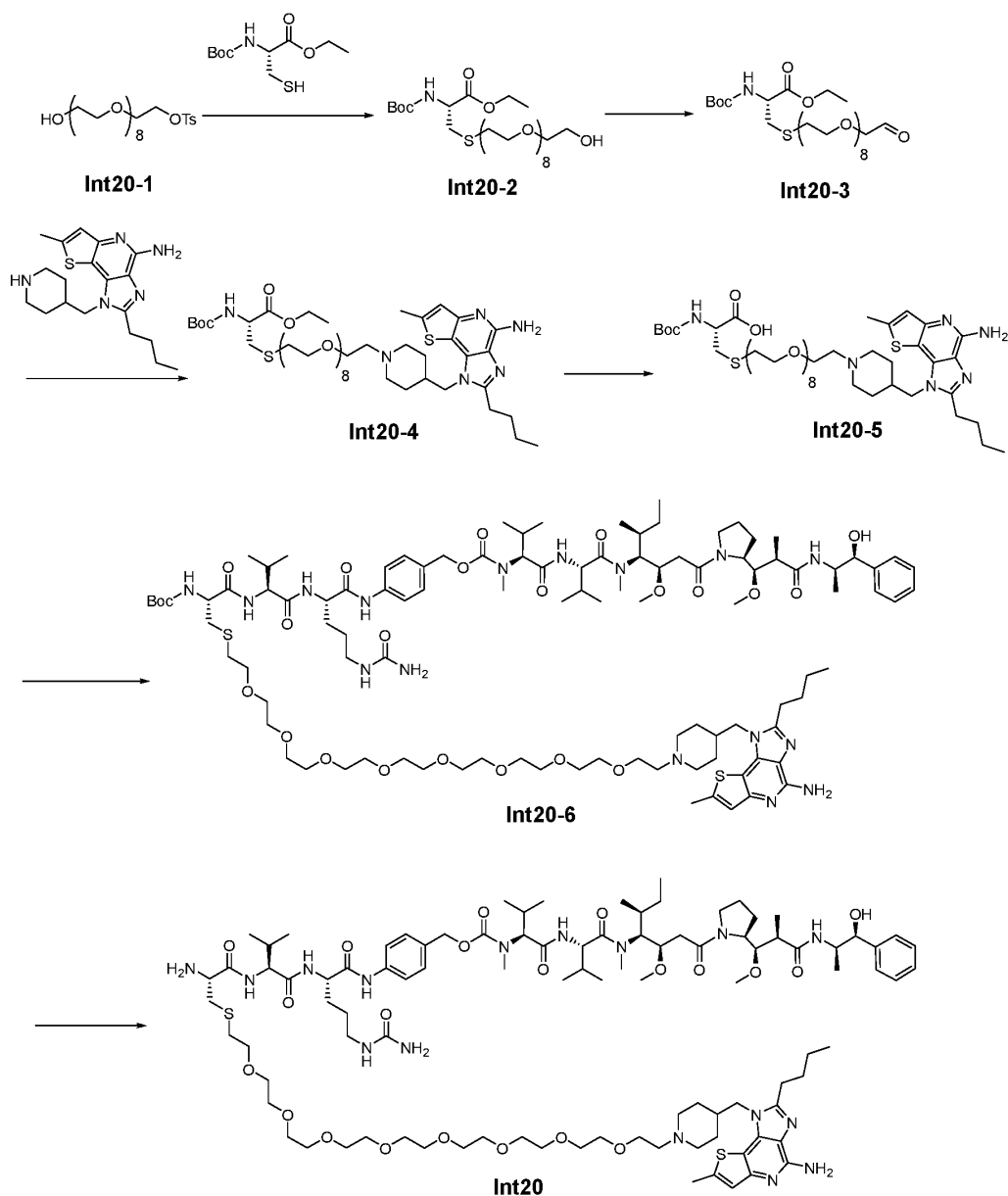
MS m/z (ESI): 1024.5 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第七步：化合物 Int19 的制备

- 将化合物 Int19-7 (40 mg, 19.54 μmol)和哌啶(3.33 mg, 39.07 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。反应液浓缩后，加入甲基叔丁基醚(5 mL)，超声 5 分钟后，静置，过滤，固体干燥得到本步的标题化合物(28 mg，收率：70.7%)。
- 10

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

中间体制备例 20：化合物 Int20 的制备



第一步：化合物 Int20-2 的制备

将化合物 Int20-1 (460 mg, 808.9 μmol)和 *N*-叔丁氧羰基-*L*-半胱氨酸乙酯(242 mg, 970.67 μmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL)中, 再加入碘化钾(13.43 mg, 80.89 μmol)和

5 *N,N*-二异丙基乙胺(150 mg, 1152.68 μmol), 25°C 反应 10 小时。反应液浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=5/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(320 mg, 收率: 64.5%)。

MS m/z (ESI): 646.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 Int20-3 的制备

将化合物 Int20-2 (220 mg, 337.26 μmol)和戴斯马丁氧化剂(216.66 mg, 505.89 μmol)加入二氯甲烷(15 mL)中, 25°C 反应 10 小时。向反应液中加入饱和硫代硫酸钠溶液(5 mL)和饱和碳酸氢钠水溶液(10 mL), 搅拌至澄清, 再加入二氯甲烷萃取三次, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩, 所得剩余物经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=20/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(185 mg, 收率: 85.2%)。

MS m/z (ESI): 644.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步：化合物 Int20-4 的制备

依次将化合物 Int20-3 (146.31 mg, 227.26 μmol)、2-丁基-7-甲基-1-(哌啶-4-基甲基)-1*H*-咪唑并[4,5-*d*]噻吩并[3,2-*b*]吡啶-4-胺(65 mg, 181.81 μmol)、氰基硼氢化钠(31.56 mg, 502.2 mmol)和冰乙酸(31.4 mg, 518.16 mmol)加入 1,2-二氯乙烷(4 mL)和甲醇(2 mL)的混合溶剂中, 25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品溶于甲醇(3 mL)中, 用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-30%), 得到本步的标题化合物(109 mg, 收率: 63.8%)。

MS m/z (ESI): 985.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第四步：化合物 Int20-5 的制备

将化合物 Int20-4 (100 mg, 101.49 μmol)溶于甲醇(4 mL)中, 加入一水合氢氧化锂(21.31 mg, 507.46 μmol)的水溶液(1 mL), 25°C 反应 4 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=35%-45%), 得到本步的标题化合物(85 mg, 收率: 87.5%)。

MS m/z (ESI): 957.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第五步：化合物 Int20-6 的制备

依次将化合物 Int20-5 (65 mg, 67.91 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(12.63 mg, 96.76 μmol , 16.15 μL)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(34.69 mg, 90.31 μmol)和 VC-PABC-MMAE (76.28 mg, 67.91 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=30%-45%), 得到本步的标题化合物(85 mg, 收率: 63.9%)。

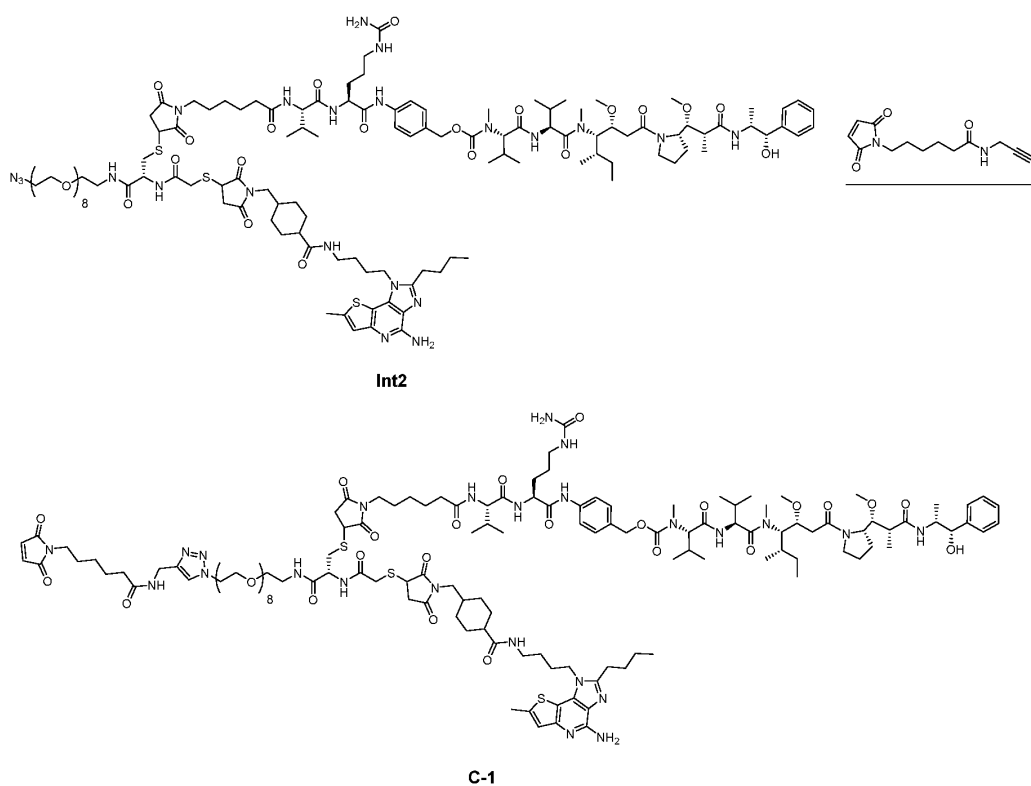
MS m/z (ESI): 1032.1 [M/2+H]⁺。

第六步：化合物 Int20 的制备

将化合物 Int20-6 (38 mg, 18.42 μmol)和溴化锌(31.85 mg, 140.01 μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中，25°C 反应 4 小时。反应液浓缩得到的粗品用反相柱层析纯化(制备方法 5 B，洗脱梯度：A%=20%-30%)，得到本步的标题化合物(30 mg，收率：87.0%)。

MS m/z (ESI): 982.1 [M/2+H]⁺。

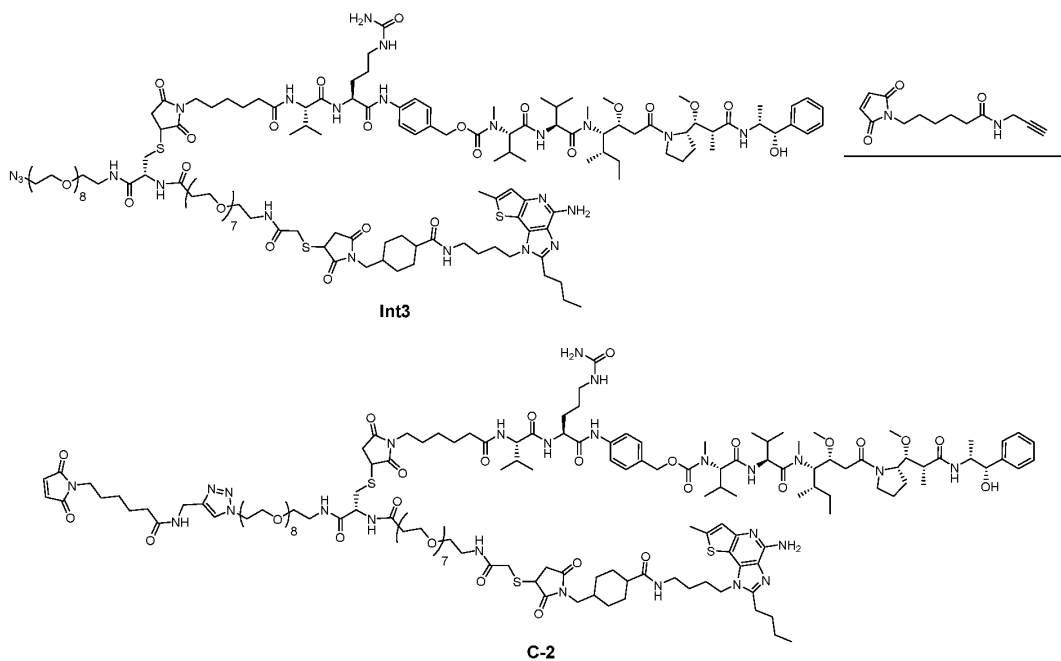
药物连接体制备例 1-1：化合物 C-1 的制备



10 将化合物 Int2 (50 mg, 0.02 mmol)溶于 DMSO (6 mL)和水(0.6 mL)中，氮气保护下，加入 6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-(丙-2-炔-1-基)己酰胺(5.99 mg, 0.024 mmol)、抗坏血酸钠(5.94 mg, 0.03 mmol)和无水硫酸铜(6.4 mg, 0.04 mmol)，室温搅拌 1 小时，加水 and 乙酸乙酯萃取，有机相干燥，浓缩得到的粗品经制备高效液相色谱仪纯化，得到本步的标题化合物(15 mg，收率：27.2%)。

MS m/z (ESI): 1365.7 [M/2+H]⁺。

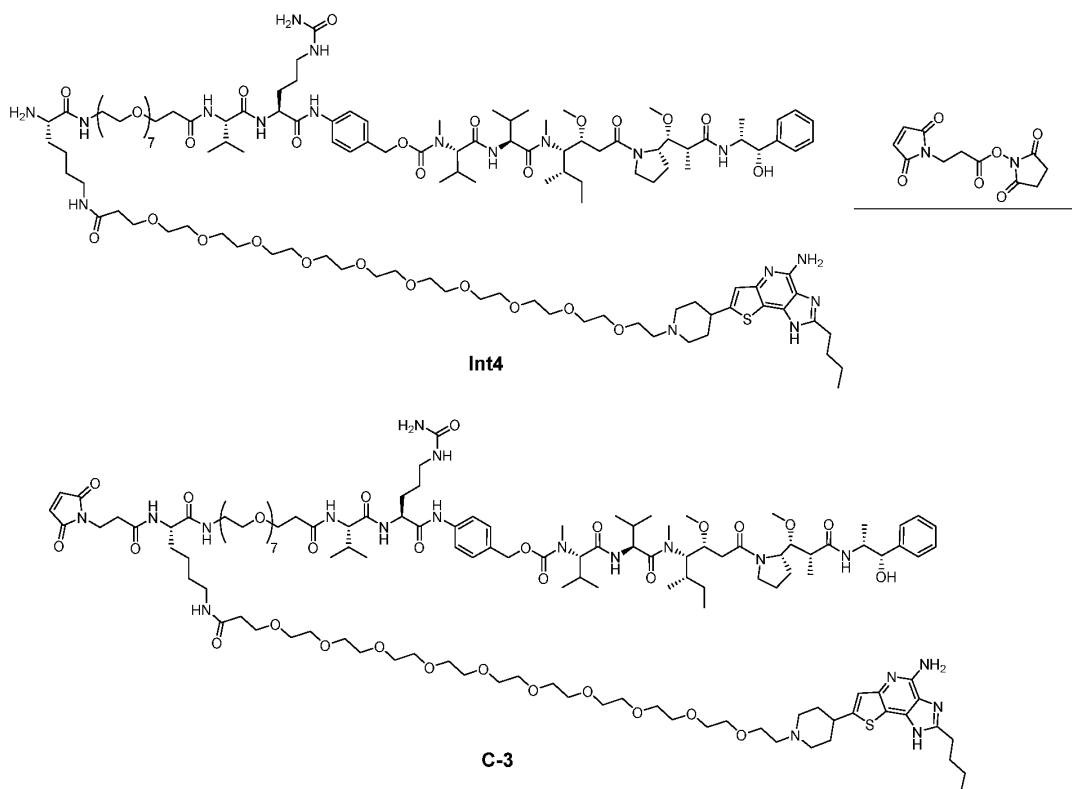
药物连接体制备例 1-2：化合物 C-2 的制备



采用实施例 1-1 的合成路线，将反应原料化合物 Int2 替换为化合物 Int3，得到本步的标题化合物(10 mg，收率：6%)。

5 **MS m/z (ESI): 1555.3 [M/2+H]⁺。**

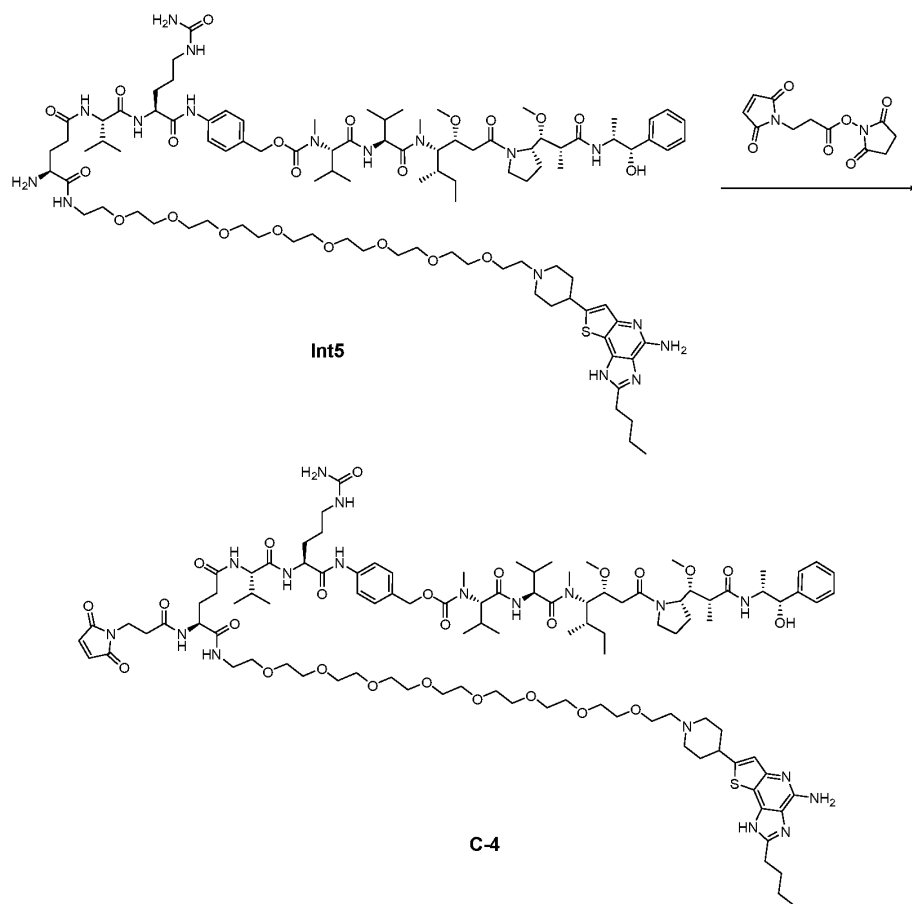
药物连接体制备例 1-3：化合物 C-3 的制备



依次将化合物 Int4 (20 mg, 7.74 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)丙酸酯(2.17 mg, 7.74 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(1.52 mg, 11.61 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(1.5 mL)中, 25°C下反应 3 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(0.64 mg, 收率: 3%)。

MS m/z (ESI): 1303.8 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

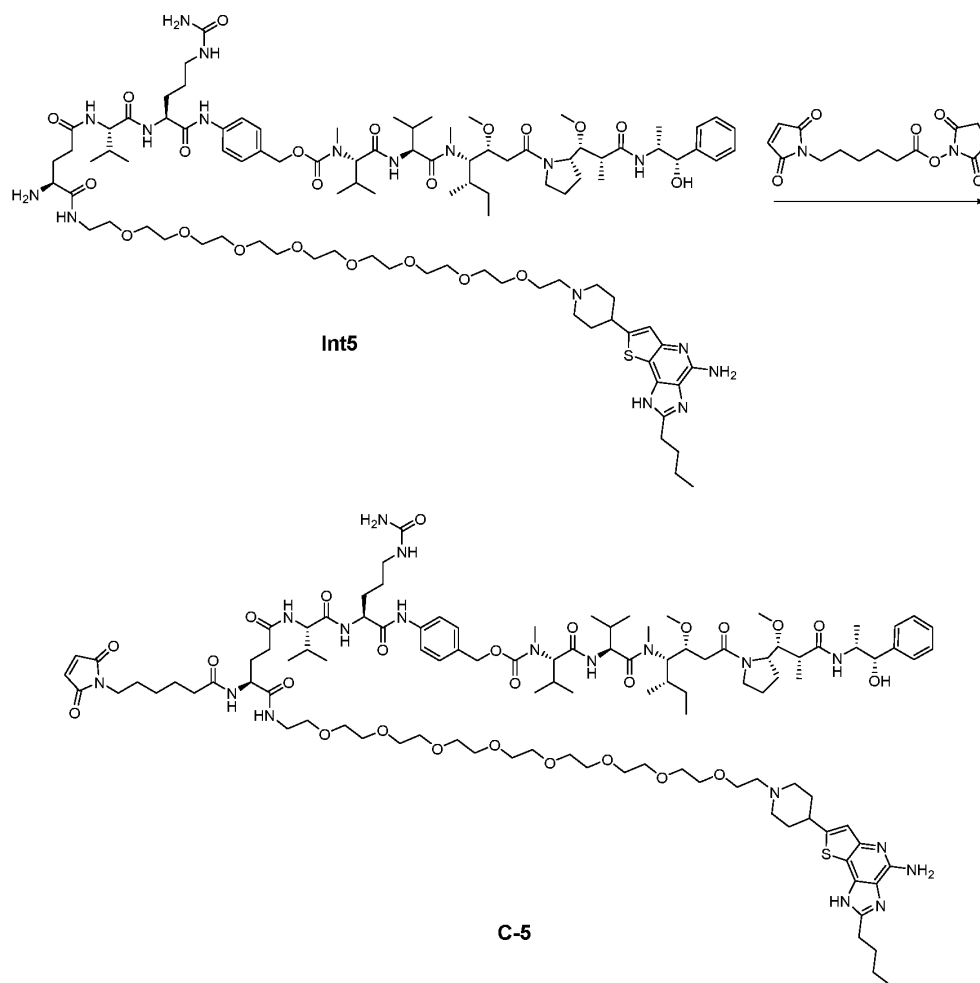
药物连接体制备例 1-4: 化合物 C-4 的制备



依次将化合物 **Int5** (50 mg, 24.24 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)丙酸酯(20.38 mg, 72.72 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(4.75 mg, 36.36 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪 5 纯化, 得到本步的标题化合物(11 mg, 收率: 20.2%)。

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

药物连接体制备例 1-5: 化合物 **C-5** 的制备

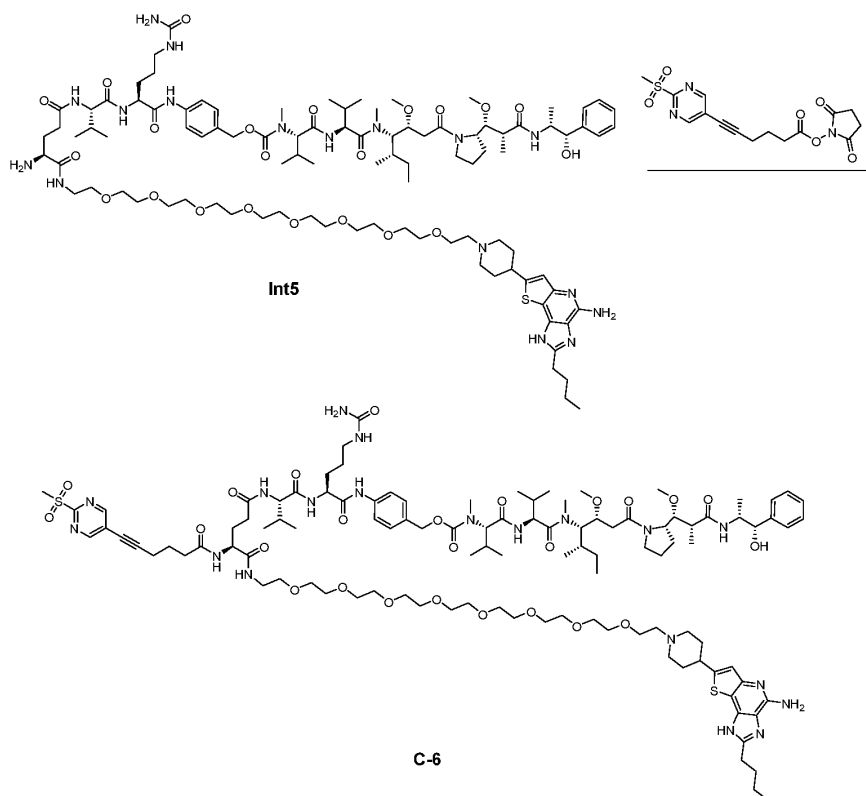


依次将化合物 **Int5** (60 mg, 29.09 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酸酯(9.44 mg, 09.09 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(45.70 mg, 43.63 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪

5 纯化, 得到本步的标题化合物(11 mg, 收率: 16.3%)。

MS m/z (ESI): 1077.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

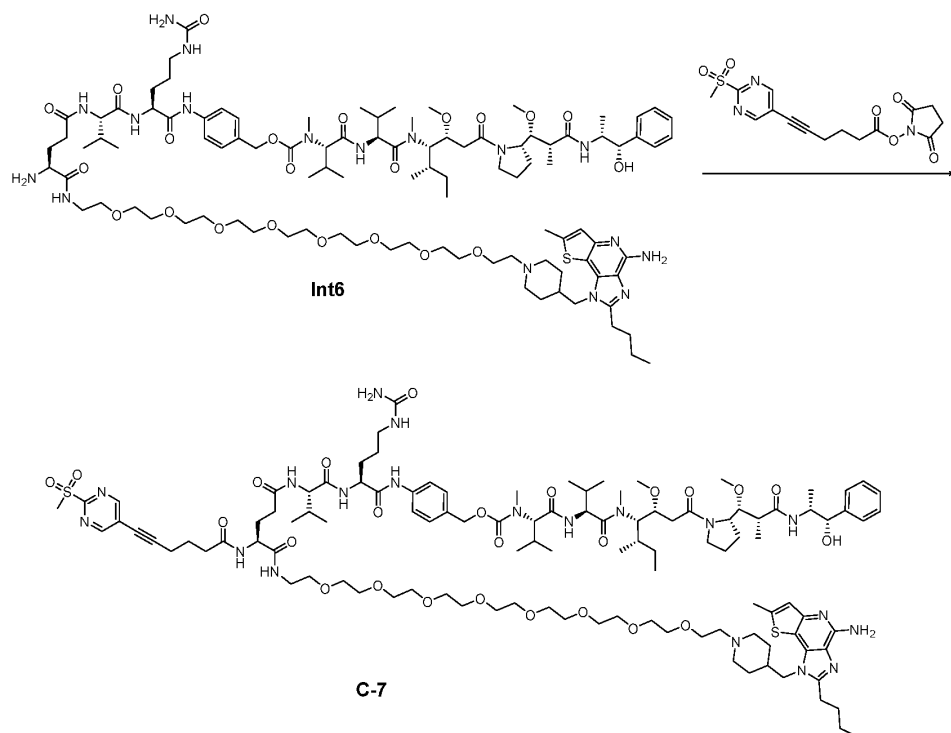
药物连接体制备例 1-6: 化合物 **C-6** 的制备



依次将化合物 Int5 (60 mg, 29.09 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(22.38 mg, 58.18 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(5.7 mg, 43.63 μmol)和 1-羟基苯并三唑(5.09 mg, 14.55 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 25°C反应 2 5 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(4 mg, 收率: 5.8%)。

MS m/z (ESI): 1105.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

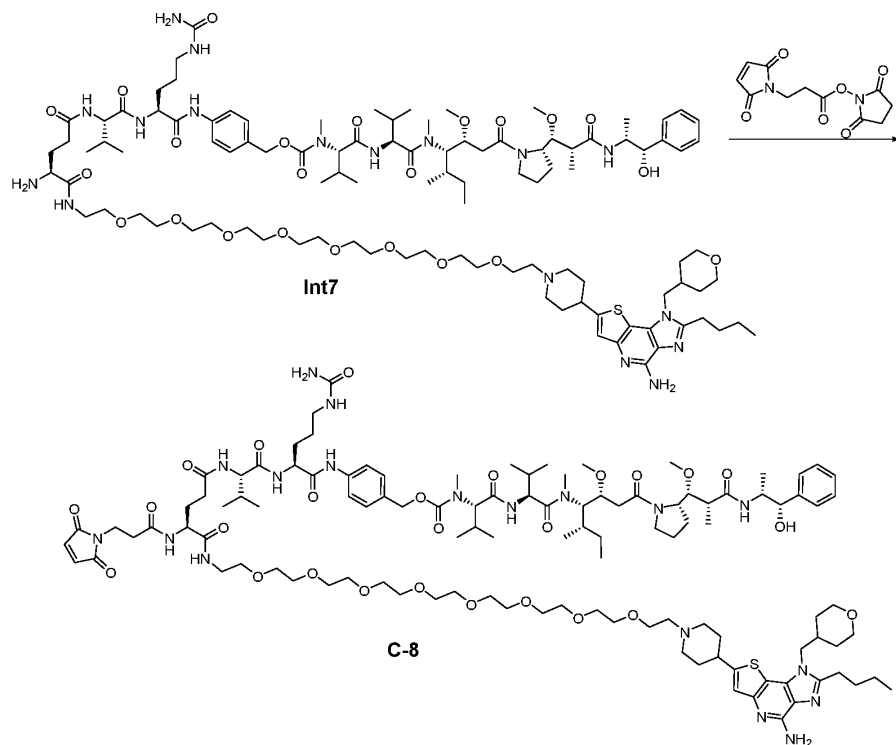
药物连接体制备例 1-7: 化合物 C-7 的制备



依次将化合物 Int6 (47 mg, 23.66 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酸酯(12.99 mg, 35.49 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(5.55 mg, 42.57 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(0.5 mL)中, 室温反应 1.5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制
5 备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步的标题化合物(37.38 mg, 收率: 70.6%)。

MS m/z (ESI): 1119.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

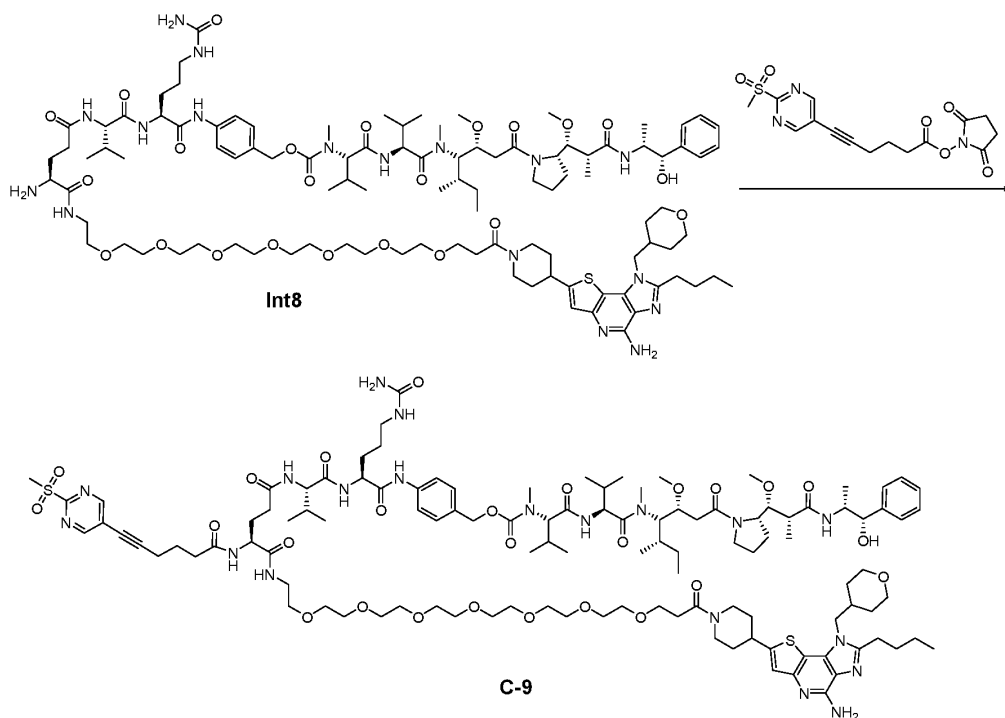
药物连接体制备例 1-8: 化合物 C-8 的制备



依次将化合物 **Int7** (50 mg, 24.31 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酸酯(7.76 mg, 29.16 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(4.52 mg, 34.63 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪
5 纯化, 得到本步的标题化合物(21.5 mg, 收率: 41.3%)。

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

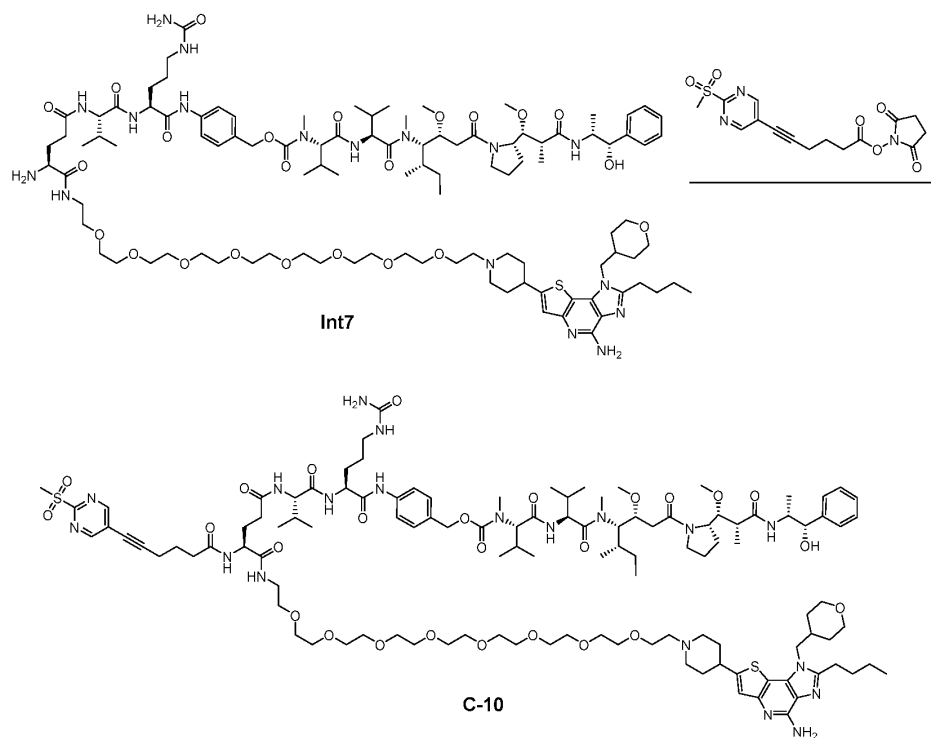
药物连接体制备例 1-9: 化合物 **C-9** 的制备



依次将化合物 **Int8** (113.67 mg, 55.68 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(22.27 mg, 60.95 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(11.63 mg, 89.08 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(55 mg, 收率: 53.9%)。

MS m/z (ESI): 1146.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

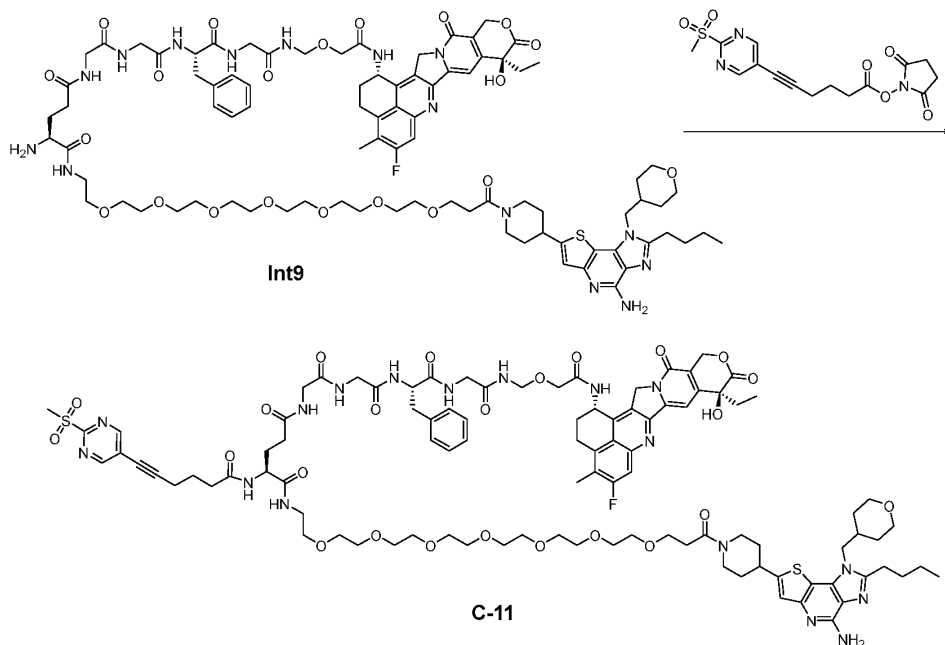
药物连接体制备例 1-10: 化合物 **C-10** 的制备



依次将化合物 **Int7** (70 mg, 30.62 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(18.64 mg, 45.93 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(7.98 mg, 61.24 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 25°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪
5 纯化, 得到本步的标题化合物(42 mg, 收率: 55.4%)。

MS m/z (ESI): 1154.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

药物连接体制备例 1-11: 化合物 **C-11** 的制备

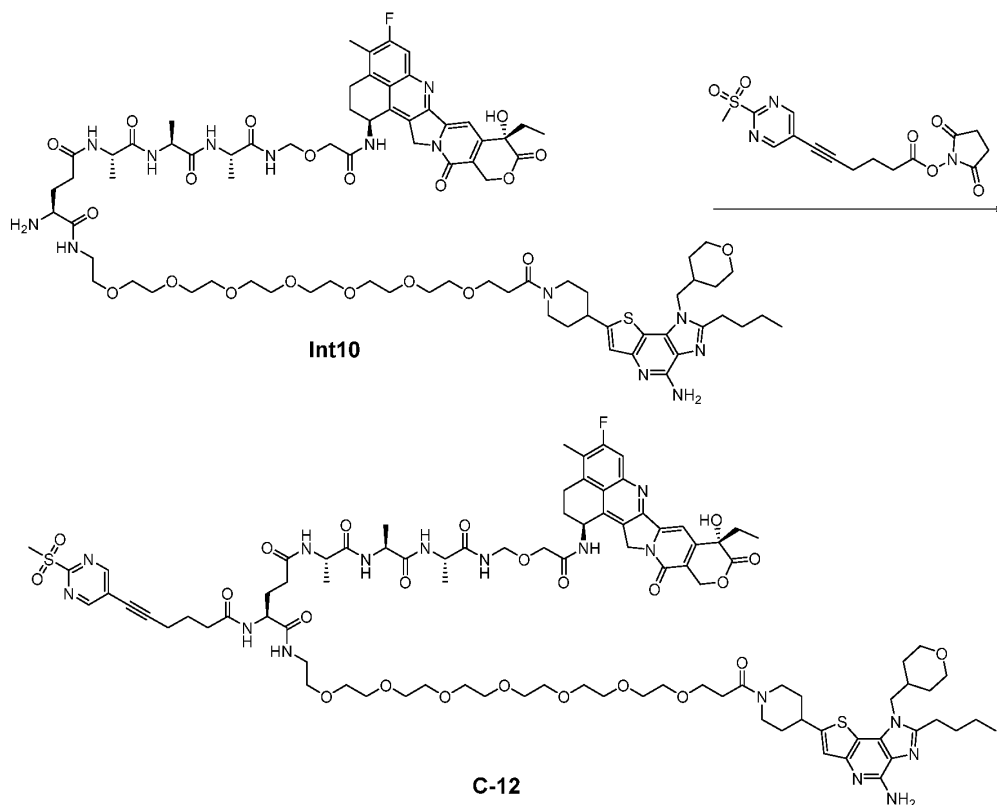


依次将化合物 Int9 (90 mg, 51.17 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(23.02 mg, 63.01 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(12.02 mg, 92.1 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪

5 纯化, 得到本步的标题化合物(27 mg, 收率: 29.2%)。

MS m/z (ESI): 1005.5 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

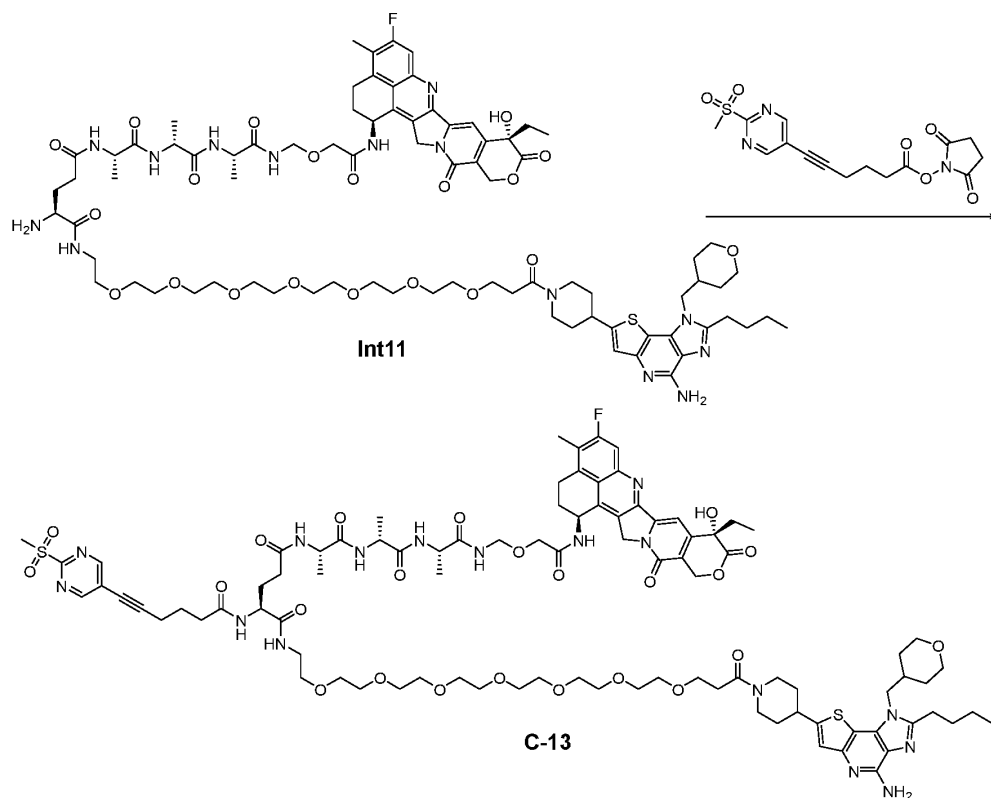
药物连接体制备例 1-12: 化合物 C-12 的制备



依次将化合物 Int10 (70 mg, 42.33 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(20.1 mg, 55.02 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(7.87 mg, 60.31 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(2.53 mg, 收率: 7.1%)。

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

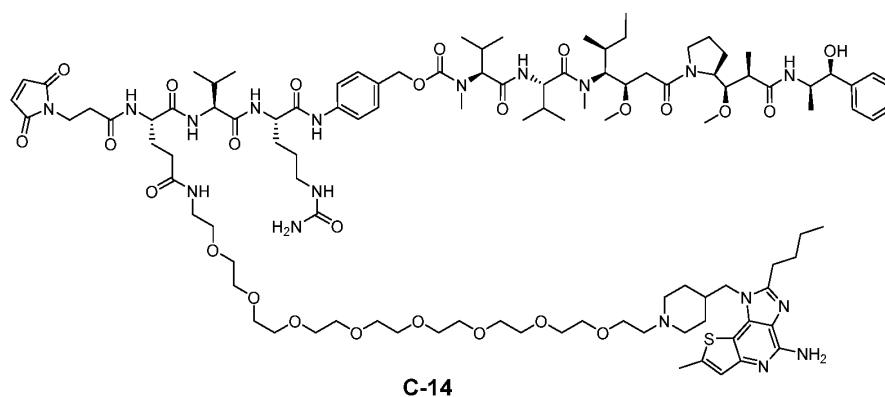
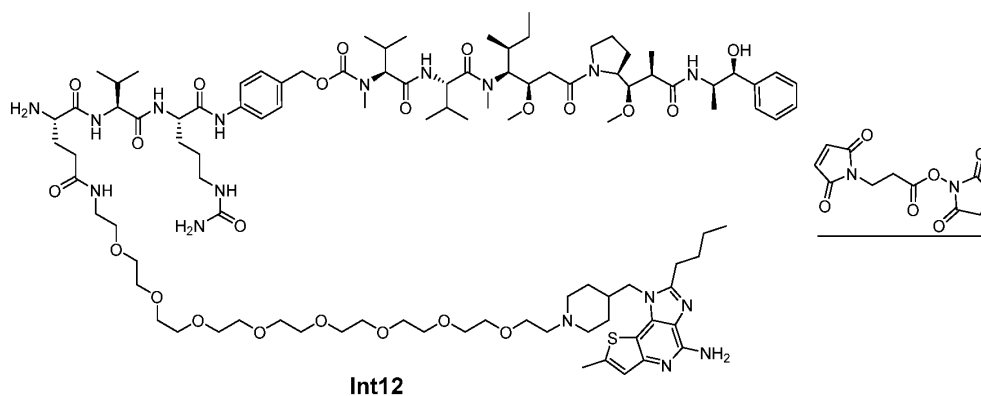
药物连接体制备例 1-13: 化合物 C-13 的制备



依次将化合物 Int11 (30 mg, 18.14 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(8.62 mg, 23.58 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.55 mg, 27.21 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(11 mg, 收率: 31.8%)。

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

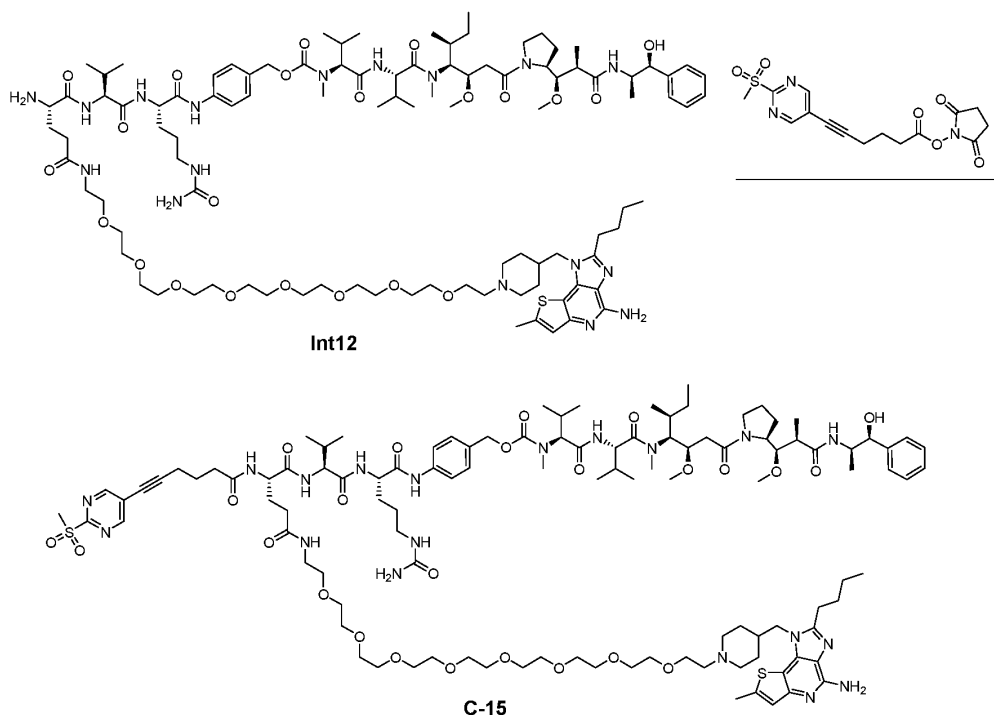
药物连接体制备例 1-14: 化合物 C-14 的制备



依次将化合物 Int12 (25 mg, 12.58 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酸酯(10.05 mg, 37.74 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.34 mg, 17.92 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(8 mg, 收率: 31.3%)。

MS m/z (ESI): 1070.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

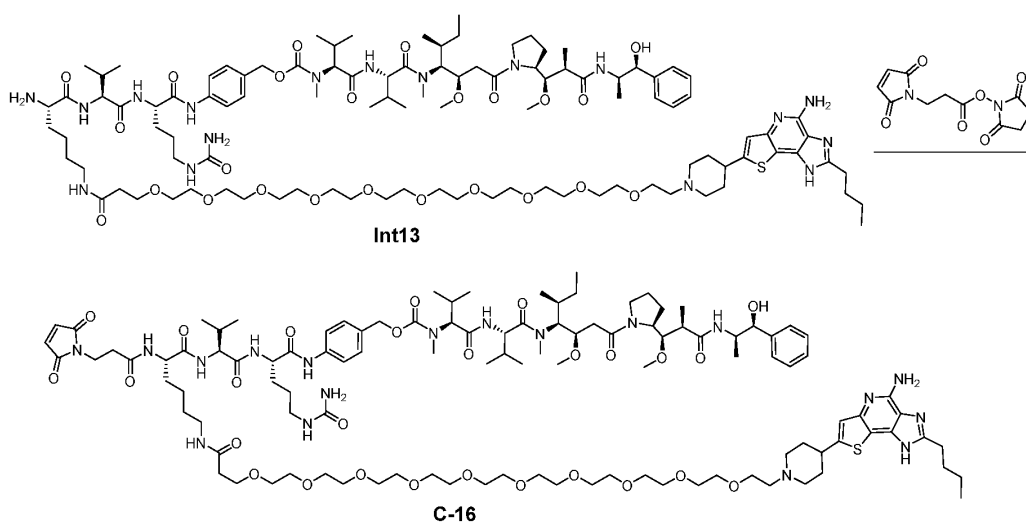
药物连接体制备例 1-15: 化合物 C-15 的制备



依次将化合物 **Int12** (28.80 mg, 14.49 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(5.88 mg, 14.49 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.78 mg, 28.98 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(0.5 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 **B**，洗脱梯度：A%=20%-35%)，得到本步的标题化合物(13.57 mg，收率：41.8%)。

MS m/z (ESI): 1119.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

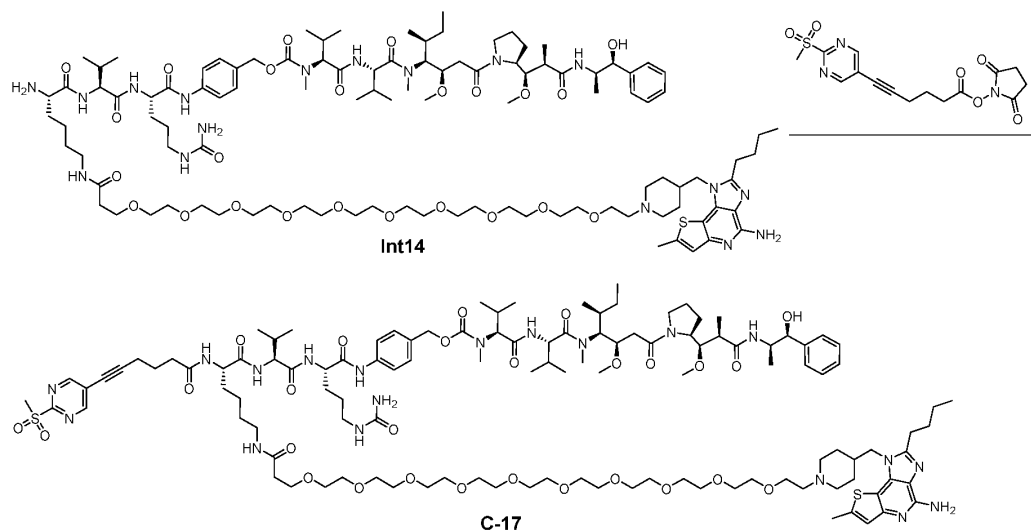
药物连接体制备例 1-16：化合物 **C-16** 的制备



依次将化合物 Int13 (30 mg, 13.01 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酸酯(5.25 mg, 19.51 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.54 mg, 19.51 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 1.5 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=25%-40%), 得到本步的标题化合物(9.81 mg, 收率: 31.5%)。

MS m/z (ESI): 1114.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

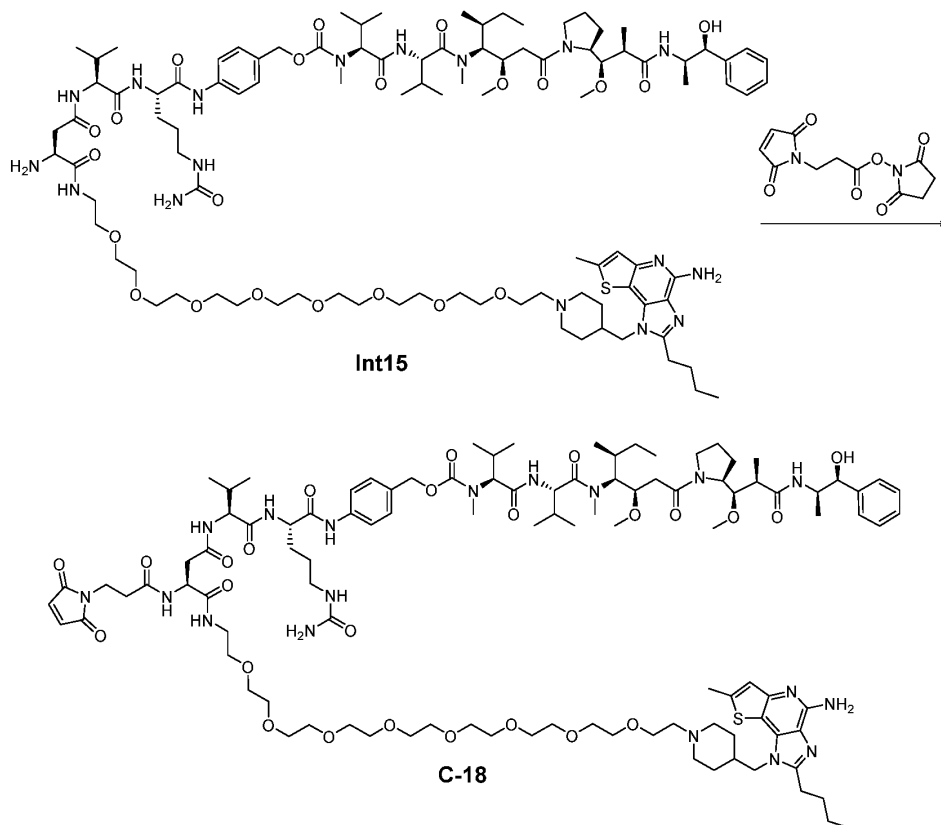
药物连接体制备例 1-17: 化合物 C-17 的制备



依次将化合物 Int14 (20 mg, 9.50 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(5.56 mg, 15.21 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(1.77 mg, 13.67 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(6 mg, 收率: 28.2%)。

MS m/z (ESI): 1177.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

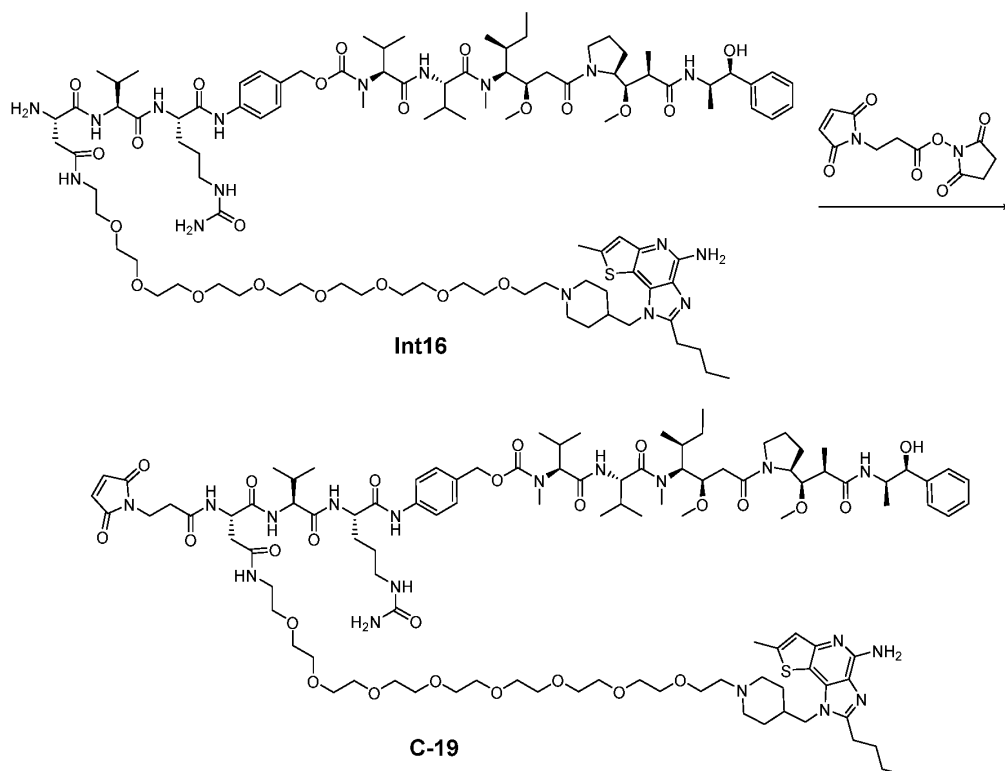
药物连接体制备例 1-18: 化合物 C-18 的制备



依次将化合物 Int15 (28 mg, 14.19 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酸酯(5.66 mg, 21.28 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.75 mg, 21.28 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(0.5 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-35%)，得到本步的标题化合物(7.64 mg，收率：25.3%)。

MS m/z (ESI): 1063.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

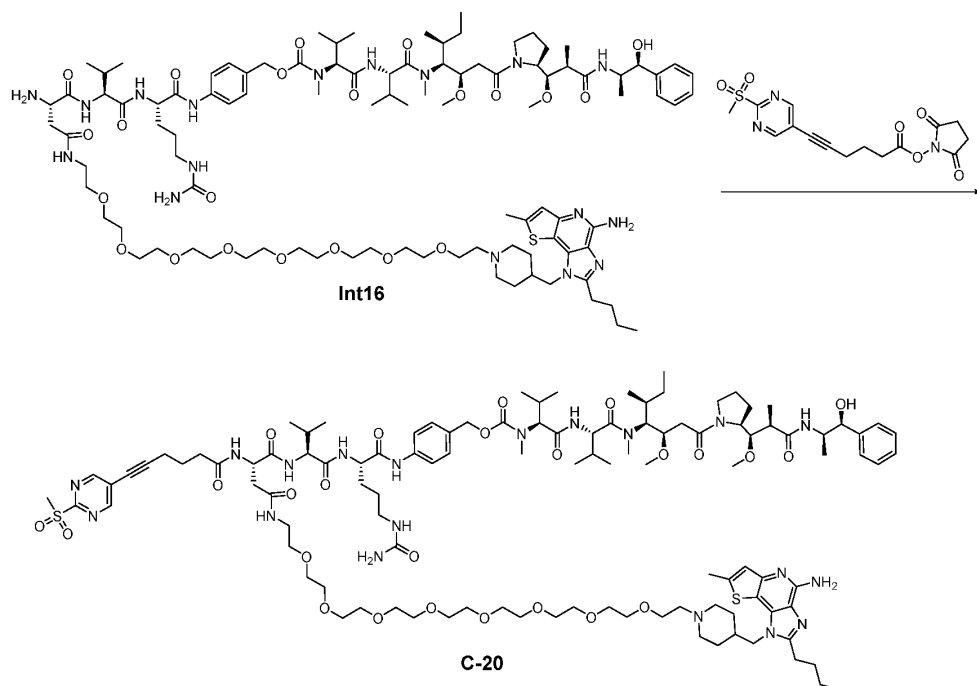
药物连接体制备例 1-19：化合物 C-19 的制备



- 依次将化合物 Int16 (23.15 mg, 11.73 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酸酯(6.25 mg, 23.46 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.18 mg, 16.72 μmol)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(12 mg, 收率: 50.7%)。

MS m/z (ESI): 1063.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

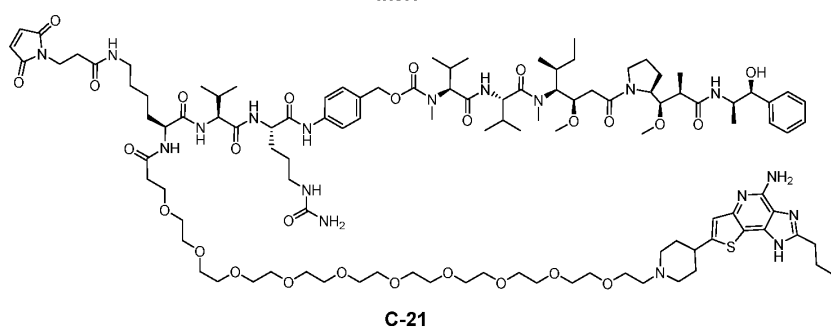
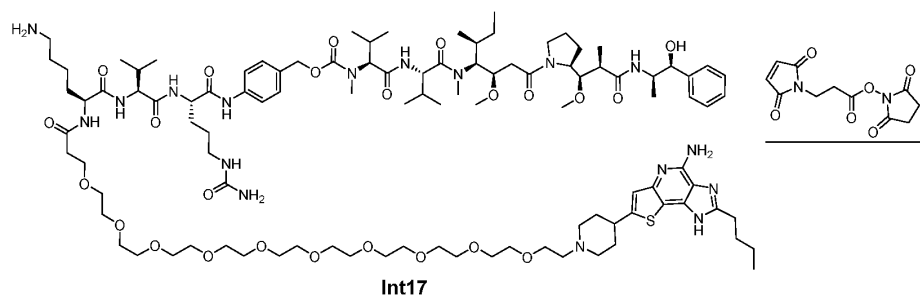
药物连接体制备例 1-20: 化合物 C-20 的制备



依次将化合物 Int16 (24.7 mg, 12.52 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)噻啉-5-基)己-5-炔酸酯(5.08 mg, 12.52 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.26 mg, 25.03 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B, 洗脱梯度: A%=20%-35%), 得到本步的标题化合物(17.16 mg, 收率: 61.7%)。

MS m/z (ESI): 1112.6 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

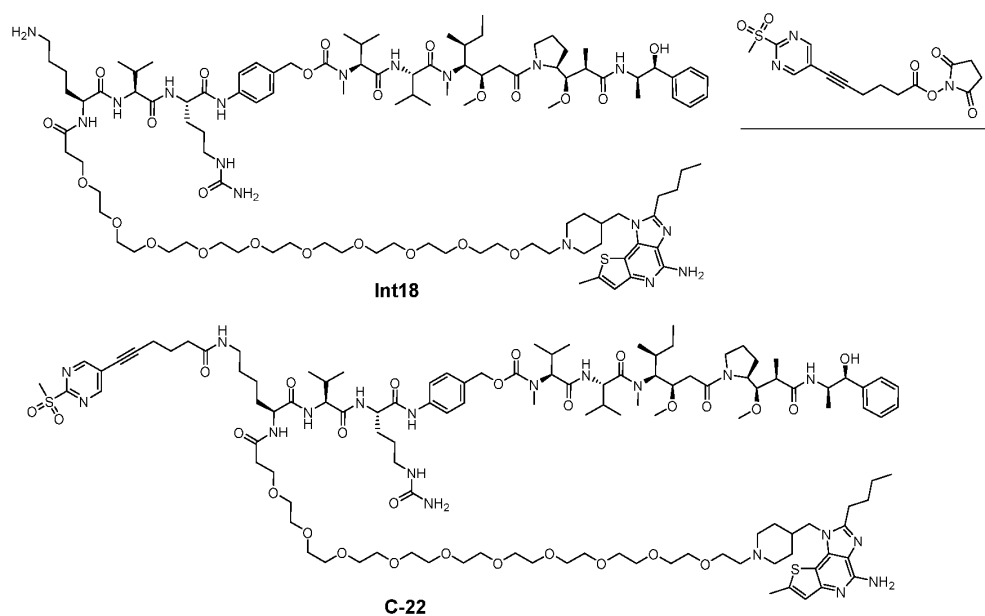
药物连接体制备例 1-21: 化合物 C-21 的制备



- 依次将化合物 **Int17** (25 mg, 12.05 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酸酯(4.37 mg, 16.26 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(3.12 mg, 24.10 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化
- 5 (制备方法 B, 洗脱梯度: A%=30%-45%), 得到本步的标题化合物(11.1 mg, 收率: 41.4%)。

MS m/z (ESI): 1114.2 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

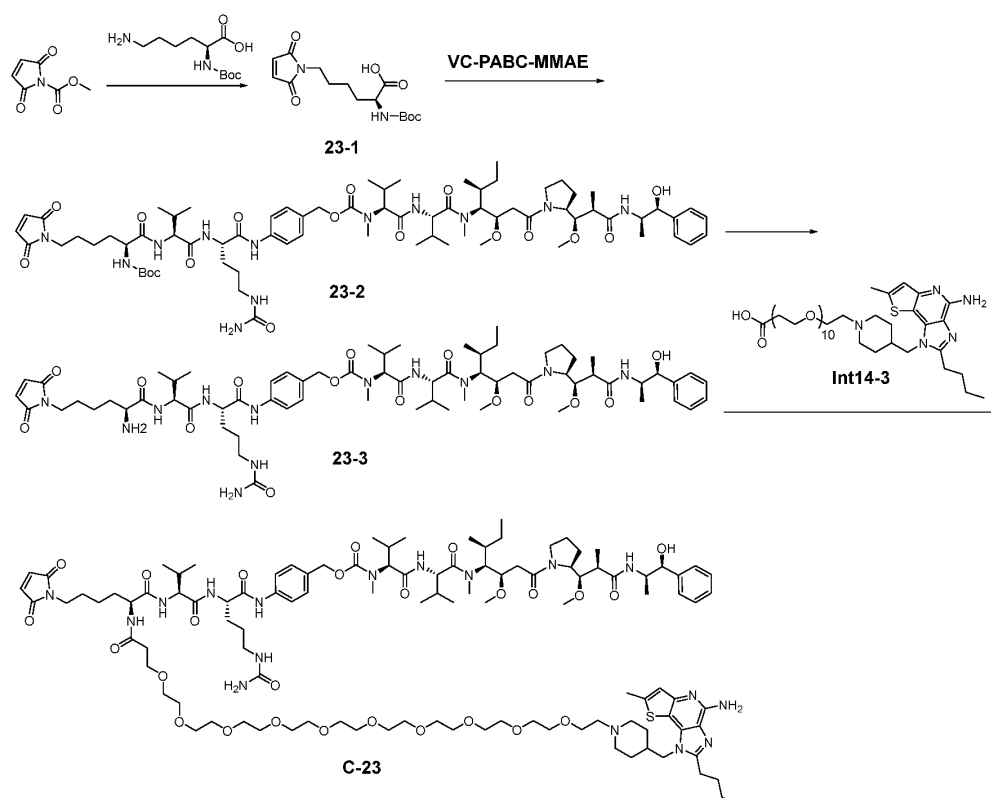
药物连接体制备例 1-22: 化合物 C-22 的制备



依次将化合物 Int18 (20 mg, 9.50 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(5.56 mg, 15.21 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(1.77 mg, 13.67 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中, 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(8 mg, 收率: 37.6%)。

5 MS m/z (ESI): 1177.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

药物连接体制备例 1-23: 化合物 C-23 的制备



第一步: 化合物 23-1 的制备

0°C下将(叔丁氧基羰基)-*L*-赖氨酸(500 mg, 1.93 mmol)溶解在饱和碳酸氢钠水溶液
10 (10 mL)中, 加入 2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-甲酸甲酯(314.87 mg, 1.93 mmol), 0°C 反应 40 分钟, 25°C反应 50 分钟。冷却至 0°C, 加入浓硫酸调节 pH 至 3.0 左右, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用盐水洗涤, 有机相浓缩得到的粗品用硅胶柱层析色谱法纯化(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=5/1(v/v)), 得到本步的标题化合物(320 mg, 收率: 50.9%)。

MS m/z (ESI): 349.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

第二步：化合物 23-2 的制备

依次将化合物 23-1 (23.75 mg, 72.78 μmol)、VC-PABC-MMAE (81.76 mg, 72.78 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(14.25 mg, 109.25 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(39.13 mg, 101.89 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(3 mL)中，0°C反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=30%-35%)，得到本步的标题化合物(80 mg，收率：72.9%)。

MS m/z (ESI): 1431.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第三步：化合物 23-3 的制备

将化合物 23-2 (56 mg, 39.11 μmol)溶于无水二氯甲烷(3 mL)中，加入溴化锌(71.18 mg, 2312.9 μmol)，25°C反应 2 小时。反应液浓缩得到的剩余物用甲醇溶解后反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=30%-35%)，得到本步的标题化合物(28.5 mg，收率：54.7%)。

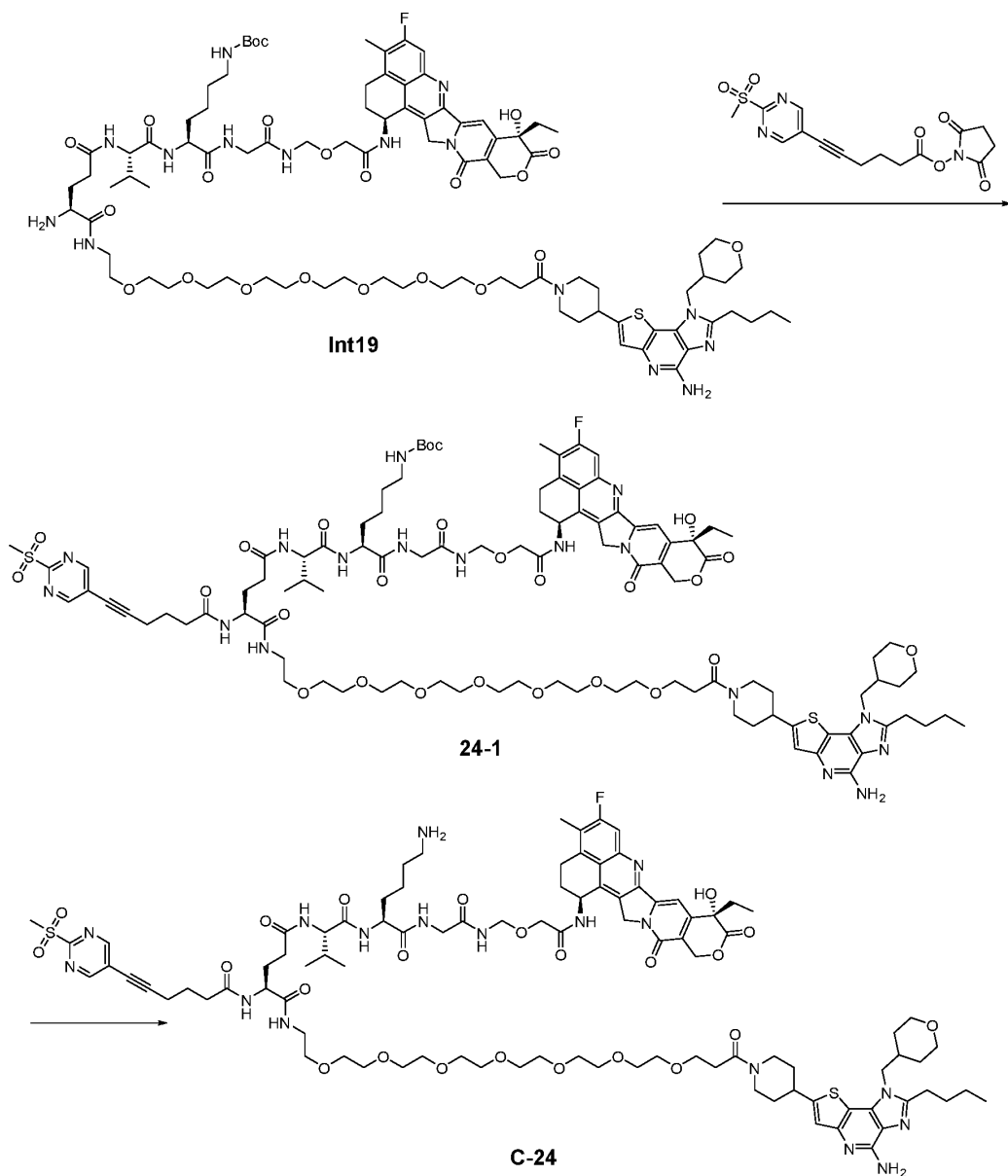
MS m/z (ESI): 1331.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

第四步：化合物 C-23 的制备

依次将化合物 Int14-3 (9.31 mg, 10.7 μmol)、化合物 23-3 (14.25 mg, 10.7 μmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(2.1 mg, 16.05 μmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(5.34 mg, 13.91 μmol)加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL)中，0°C反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 B，洗脱梯度：A%=20%-30%)，得到本步的标题化合物(15 mg，收率：64.2%)。

MS m/z (ESI): 1092.7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

20 药物连接体制备例 1-24：化合物 C-24 的制备



第一步：化合物 24-1 的制备

依次将化合物 Int19 (28 mg, 15.34 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(8.41 mg, 23.01 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(4.00 mg, 30.68 μmol)加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(1 mL)中，室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A，洗脱梯度：A%=35%-40%)，得到本步的标题化合物(30 mg，收率：94.2%)。

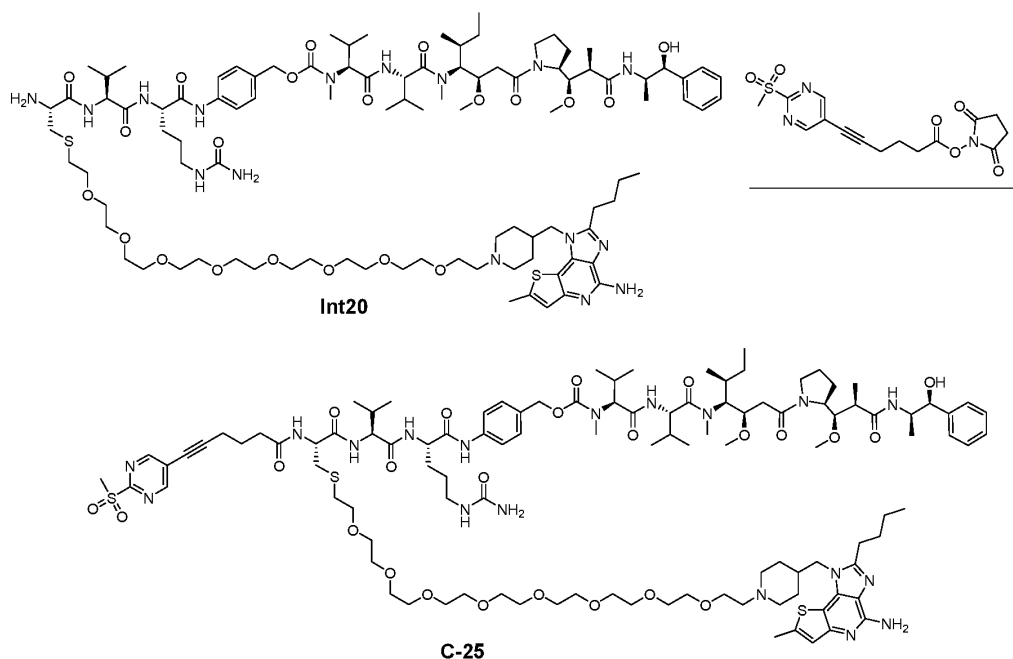
MS m/z (ESI): 1038.5 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

第二步：化合物 C-24 的制备

将化合物 24-1 (30 mg, 13.01 μmol)和无水溴化锌(11.72 mg, 52.04 μmol)加入无水二氯甲烷(2 mL)中, 室温反应 2 小时。反应液直接用反相柱层析纯化(制备方法 A, 洗脱梯度: A%=25%-35%), 得到本步的标题化合物(4.65 mg, 收率: 16.8%)。

MS m/z (ESI): 1975.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

5 药物连接体制备例 1-25: 化合物 C-25 的制备



依次将化合物 Int20 (30 mg, 15.28 μmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸酯(8.94 mg, 24.46 μmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(2.84 mg, 21.75 μmol , 3.64 μL)溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(2 mL), 0°C 反应 2 小时。反应液用制备高效液相色谱仪纯化, 得到本步的标题化合物(20 mg, 收率: 62.2%)。

MS m/z (ESI): 1107.1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

二、免疫刺激抗体药物偶联物(iADC)的制备

用 1 M 磷酸氢二钠溶液调节 B7H3 单抗(Ab-01)储备液至目标 pH 值, 向所得 B7H3 单抗(Ab-01)缓冲溶液中加入 0.1M EDTA, 同时加入 TCEP (10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 分别向其中加入药物连接体 C-1~C-25 的 DMSO 溶液(10 mM), 摇匀, 室温反应 2 小时后, 用 NAP-5 凝胶柱纯化, 并用 pH = 6.0-6.1 盐酸组氨酸缓冲溶液洗涤, 收集滤

液,得到免疫刺激抗体药物偶联物(iADC)iADC-1~iADC-25 的盐酸组氨酸缓冲液,于-20℃ 储存。

三、免疫刺激抗体药物偶联物(iADC)的药物/抗体比值：DAR 值的测定

LC-MS 测定 iADC 分子量，计算药物/抗体比 DAR 值。

5 色谱测定条件：

液相色谱柱：Thermo MAbPac RP 3.0*100 mm；

流动相 A：0.1%FA/H₂O；流动相 B：0.1%FA/ACN；

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

时间(分钟)	2	20	22	25	26	30
流 动 相 A (体 积%)	75	60	5	5	75	75
流 动 相 B (体 积%)	25	40	95	95	25	25

质谱测定条件：

10 质谱型号：AB Sciex Triple TOF 5600+；

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

m/z 600-4000；Time bins to sum 40。

CE-SDS 计算免疫刺激抗体药物偶联物(iADC)的 DAR 值，如表 1 所示：

15 表 1. 免疫刺激抗体药物偶联物（iADC）平均 DAR 值测试结果

iADC 名 称	药物连接体编 号	偶 联 pH 值	TCEP 当 量	药 物 连 接 体 当量	平均 DAR 值
iADC-1	C-1	7.49	5.5	10	2.55
iADC-2	C-2	7.69	2.5	10	2.39
iADC-3	C-3	6.51	2.5	5	3.87

iADC-4	C-4	6.51	2.5	5.5	3.62
iADC-5	C-5	6.51	2.5	5.5	3.32
iADC-6	C-6	6.51	2.5	5.5	2.97
iADC-7	C-7	6.55	2.5	5.5	2.94
iADC-8	C-8	6.50	2.5	5.5	3.15
iADC-9	C-9	7.67	3	6	4.74
iADC-10	C-10	7.67	1.5	3	1.97
iADC-11	C-11	7.66	2.5	5.5	3.48
iADC-12	C-12	7.66	2.5	5.5	1.64
iADC-13	C-13	7.60	2.5	5.5	3.68
iADC-14	C-14	6.54	2.5	5	2.07
iADC-15	C-15	6.55	2.5	5.5	3.11
iADC-16	C-16	6.58	2.5	5.5	2.94
iADC-17	C-17	6.55	2.5	5.5	2.48
iADC-18	C-18	6.55	2.5	5.5	2.30
iADC-19	C-19	6.49	2.5	6	3.29
iADC-20	C-20	6.55	2.5	5.5	2.89
iADC-21	C-21	6.58	2.5	6	2.92
iADC-22	C-22	6.55	2.5	5.5	2.88
iADC-23	C-23	6.55	2.5	5.5	3.78
iADC-24	C-24	7.60	2.5	5.5	1.14
iADC-25	C-25	6.55	2.5	5.5	3.38

生物学测试

实验例 1：免疫刺激抗体药物偶联物（immunomodulatory antibody drug conjugate, iADC）对 B7H3 阳性肿瘤细胞的增殖抑制作用

5 实验步骤：

1. 收集对数生长期的 B7H3 阳性肿瘤细胞 HCC1954(康诺泰)和 NCI-N87(ATCC), 并计数。
2. 将两种肿瘤细胞分别接种于 96 孔板（康宁）中，每孔 2000 个细胞（HCC1954）或 3000 个细胞（NCI-N87），体积 80 μL，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜使细胞贴壁（18~24 h）。
3. 按照试验设计进行梯度浓度配制 5×药物工作液。取出 96 孔细胞板，从化合物板中转 20 μL 工作液加到细胞板中。细胞板置于 37℃ 、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。
4. 测板：取出细胞板，在显微镜下观察细胞状态。观察结束后，按照 CellCounting-Lite® 2.0 试剂盒（诺唯赞）说明书，细胞板加检测液，并通过 PHERA Star FS 获得原始数据。
5. 计算抑制率（Inhibition Rate, IR%）=1-（实验孔发光均值/ DMSO 对照孔发光均值）*100%。使用 Graphpad Prism 8.0 软件进行数据分析与作图，以细胞存活率与药物浓度的对数经四参数拟合曲线，计算 IC₅₀ 值。

实验结果：

按照上述方法测定各免疫刺激抗体药物偶联物(iADC)对肿瘤细胞的增殖抑制作用，如表 2 和表 3 所示：

表 2. 免疫刺激抗体药物偶联物（iADC）对肿瘤细胞 HCC1954 的增殖抑制作用

iADC 名称	IC ₅₀ (HCC1954, nM)
iADC-1	0.011
iADC-4	0.017
iADC-5	0.040
iADC-6	0.020
iADC-8	0.077
iADC-10	0.009
iADC-14	0.510
iADC-16	0.046

iADC-18	0.119
iADC-19	0.054
iADC-21	0.090
iADC-23	0.187
iADC-25	0.080

表 3. 免疫刺激抗体药物偶联物（iADC）对肿瘤细胞 NCI-N87 的增殖抑制作用

iADC 名称	IC ₅₀ (NCI-N87, nM)
iADC-1	3.07
iADC-4	7.27
iADC-5	2.24
iADC-6	3.44
iADC-8	2.22
iADC-10	7.00
iADC-16	1.04
iADC-18	1.49
iADC-19	1.14
iADC-23	1.17
iADC-25	1.31

结果表明：各 iADC 对 HCC1954 细胞和 NCI-N87 细胞有很强的增殖抑制作用。

实验例 2：免疫刺激抗体药物偶联物（immunomodulatory antibody drug conjugate, iADC）对 HER2 低表达 B7H3 阳性肿瘤细胞 Calu-6 的增殖抑制作用

5 实验步骤：

1. 收集对数生长期的 HER2 低表达 B7H3 阳性肿瘤细胞 Calu-6（南京科佰）。
2. 将肿瘤细胞接种于 96 孔板（康宁）中，每孔 8000 个细胞，体积 80 μL，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜使细胞贴壁（18~24 h）。
3. 按照试验设计进行梯度浓度配制 5×药物工作液。取出 96 孔细胞板，从化合物板中

转 20 μL 工作液加到细胞板中。细胞板置于 37℃ 、 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。

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

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

实验结果：

按照上述方法测定各免疫刺激抗体药物偶联物（iADC）对肿瘤细胞 Calu-6 的增殖抑制作用，结果如表 4 所示：

表 4. 免疫刺激抗体药物偶联物（iADC）对肿瘤细胞 Calu-6 的增殖抑制作用

iADC 名称	IC ₅₀ (Calu-6, nM)
iADC-10	0.0100
iADC-19	0.0002
iADC-23	0.0040
iADC-25	0.0020

结果表明：各 iADC 对 Calu-6 细胞有很强的增殖抑制作用。

实验例 3：免疫刺激抗体药物偶联物（immunomodulatory antibody drug conjugate, iADC）在肿瘤细胞存在的情况下刺激外周血单个核细胞(PBMC)分泌 TNF-α 能力的测定

15 实验步骤：

1. 收集对数生长期的 HCC1954 肿瘤细胞（康诺泰），用 PBS 清洗两遍，并用 RPMI1640+10%热灭活 FBS 完全培养基重悬细胞调整细胞密度为 2×10⁵ 个/mL，将 HCC1954 肿瘤细胞接种于 96 孔板（康宁）中，每孔 1×10⁴ 个细胞。

2. 复苏 PBMC（赛笠生物），用 RPMI1640+10%热灭活 FBS 完全培养基重悬细胞，

调整密度为 6×10^5 个/mL，加入接种了肿瘤细胞的 96 孔板中，每孔 3×10^4 个 PBMC 细胞。

3. 将 100 μL 不同浓度待测药物加入孔板中,使其终浓度分别为 500 nM、166.7 nM、55.6 nM、18.52 nM、6.17 nM、2.06 nM、0.69 nM，空白孔加入 100 μL RPMI1640+10% 热灭活 FBS 完全培养基。

5 4. 放在 5% CO_2 、37°C 培养箱中培养，培养 24 小时后，各孔取 50 μL 上清检测，根据 human TNF- α ELISA 检测试剂盒(Invitrogen)步骤孵育一抗抗体及 HRP 标记的二抗，显色，并读取 450 nm 波长下的吸光度。使用 Graphpad Prism 8.0 软件根据标准曲线，计算出 TNF- α 的浓度。

实验结果:

10 按照上述方法测定各免疫刺激抗体药物偶联物 iADC 在 HCC1954 肿瘤细胞存在的情况下刺激人外周血单个核细胞(PBMC)分泌 TNF- α 的能力，结果如表 5 所示：

表 5 免疫刺激抗体药物偶联物（iADC）刺激 TNF- α 的分泌结果

iADC 名称	EC ₅₀ (nM)
iADC-4	8.19
iADC-5	10.79
iADC-6	42.34
iADC-14	6.38
iADC-16	10.25
iADC-19	6.42
iADC-21	47.51
iADC-25	75.30

结果表明：各 iADC 在体外 HCC1954 肿瘤细胞和 PBMC 共孵育体系下均能有效刺激 PBMC 分泌 TNF- α 。本申请其它 iADC 也具有类似的刺激 PBMC 分泌 TNF- α 的能力，例如 iADC-1、iADC-8、iADC-10、iADC-11、iADC-13、iADC-18、iADC-23、iADC-24 等都具有小于 600nM 的 EC₅₀ 值。

实验例 4：免疫刺激抗体药物偶联物（immunomodulatory antibody drug conjugate, iADC）在 CT26-hB7H3 细胞皮下移植瘤模型中的体内药效研究

实验步骤:

1. 每只 Balb/c 小鼠（成都药康）右侧腋下处皮下接种 3×10^5 个 CT26-hB7H3 细胞 (悬浮于 0.1 ml PBS)。
2. 待平均肿瘤体积生长至约 100 mm^3 时，剔除瘤体积不规则及过小或过大的小鼠，
- 5 剩余小鼠根据肿瘤体积和动物体重进行随机分组，分别尾静脉注射（i.v.）给予 0.9%氯化钠注射液（溶媒对照）、iADC-8（20 mg/kg，每周一次给药，共两次）、iADC-9（20 mg/kg，单次给药）、iADC-10（23.81 mg/kg，单次给药），观察受试化合物对该荷瘤鼠模型的药效及动物对受试化合物的耐受性。
3. 试验中每周 2 次称量小鼠体重并测量瘤体积，记录数据。
- 10 4. 数据统计，肿瘤体积（V）计算公式： $V=1/2\times a\times b^2$ ，其中 a 和 b 分别表示长和宽。抗肿瘤药效用肿瘤生长抑制率 TGI(%)评价，计算公式： $TGI(\%)_{(瘤体积)}=[1-(T_{Vt}-T_{V0})/(C_{Vt}-C_{V0})]\times 100\%$ ， T_{V0} 为分组给药时受试化合物组的平均瘤体积， T_{Vt} 为给药后 t 天受试化合物组的平均瘤体积； C_{V0} 为分组给药时溶媒组的平均瘤体积； C_{Vt} 为给药后 t 天溶媒组的平均瘤体积。当肿瘤出现消退时， $TGI(\%)_{(瘤体积)}=100\%-(T_{Vt}-T_{V0})/T_{V0}\times 100\%$ 。如果肿瘤
- 15 比起始体积缩小，即 $V_t<V_0$ 时，即定义为肿瘤部分消退（PR）；如果肿瘤完全消失，即定义为肿瘤完全消退（CR）。

实验结果:

给药后，各受试物均能显著抑制肿瘤生长。与溶媒对照组比较，iADC-8 给药后 17 天的 TGI 为 60.72%， $P<0.05$ ；iADC-9 给药后 18 天的 TGI 为 145.74%， $P<0.001$ ；iADC-10 给药后 18 天的 TGI 为 98.02%， $P<0.01$ （表 6）。结果表明，在 CT26-hB7H3 细胞皮下移植瘤模型中，iADC-8、iADC-9 和 iADC-10 具有显著的抑瘤效果。另外，各试验组均无小鼠死亡，且小鼠无明显体重下降（表 7），表明小鼠对各受试物的耐受性良好。

表 6. 免疫刺激抗体药物偶联物在 CT26-hB7H3 细胞皮下移植瘤中的药效

iADC 名称	抑瘤率 TGI%				肿瘤消退
	第 7 天	第 14 天	第 17 天	第 18 天	
iADC-8	66.77%	63.61%	60.72%	/	2/7 PR
iADC-9	137.78%	155.52%	/	145.74%	5/6 PR

iADC-10	106.58%	109.42%	/	98.02%	4/6 PR
---------	---------	---------	---	--------	--------

PR：表示部分消退。

表 7. CT26-hB7H3 细胞皮下移植瘤体内药效中小鼠体重变化情况

iADC 名称	小鼠体重变化率			
	第 7 天	第 14 天	第 17 天	第 18 天
iADC-8	+ 0.73%	+ 5.29%	+ 8.58%	/
iADC-10	+ 0.08%	+ 2.64%	/	+ 5.47%

+: 体重增加； -: 体重减少。

实验例 5：免疫刺激抗体药物偶联物（immunomodulatory antibody drug conjugate,

5 iADC）在 MC38-hB7H3 细胞皮下移植瘤模型中的体内药效研究

实验步骤：

1. 每只 C57BL/6J 小鼠（成都药康）右侧腋下处皮下接种 1×10^6 个 MC38-hB7H3 细胞（悬浮于 0.1 ml PBS）。
2. 待平均肿瘤体积生长至约 100 mm^3 时，剔除瘤体积不规则及过小或过大的小鼠，
- 10 剩余小鼠根据肿瘤体积和动物体重进行随机分组，分别尾静脉注射（i.v.）给予 0.9%氯化钠注射液（溶媒对照）、iADC-11（10 mg/kg，单次给药）、iADC-12（21.2 mg/kg，单次给药），观察受试化合物对该荷瘤鼠模型的药效及动物对受试化合物的耐受性。
3. 试验中每周 2 次称量小鼠体重并测量瘤体积，记录数据。
4. 数据统计，肿瘤体积（V）计算公式： $V=1/2\times a\times b^2$ ，其中 a 和 b 分别表示长和宽。
- 15 抗肿瘤药效用肿瘤生长抑制率 TGI(%)评价，计算公式： $TGI(\%)_{(瘤体积)}=[1-(T_{Vt}-T_{V0})/(C_{Vt}-C_{V0})]\times100\%$ ， T_{V0} 为分组给药时受试化合物组的平均瘤体积， T_{Vt} 为给药后 t 天受试化合物组的平均瘤体积； C_{V0} 为分组给药时溶媒组的平均瘤体积； C_{Vt} 为给药后 t 天溶媒组的平均瘤体积。当肿瘤出现消退时， $TGI(\%)_{(瘤体积)}=100\%-(T_{Vt}-T_{V0})/T_{V0}\times100\%$ 。如果肿瘤比起始体积缩小，即 $V_t<V_0$ 时，即定义为肿瘤部分消退（PR）；如果肿瘤完全消失，即
- 20 定义为肿瘤完全消退（CR）。

实验结果：

给药后，iADC-11 和 iADC-12 均能显著抑制肿瘤生长。与溶媒对照组比较，iADC-11 给药后 32 天的 TGI 为 94.33%， $P<0.01$ ；iADC-12 给药后 32 天的 TGI 为 60.18%， $P<0.01$ （表 8）。结果表明，在 MC38-hB7H3 细胞皮下移植瘤模型中，iADC-11 和 iADC-12 具有抑瘤效果。另外，各试验组均无小鼠死亡，且小鼠无明显体重下降（表 9），表明小鼠对各受试物的耐受性良好。

表 8. 免疫刺激抗体药物偶联物 MC38-hB7H3 细胞皮下移植瘤的药效

iADC 名称	抑瘤率 TGI%			肿瘤消退
	第 7 天	第 18 天	第 32 天	
iADC-11	113.74%	115.99%	94.33%	2/6 CR+2/6 PR
iADC-12	76.52%	38.78%	60.18%	1/6 PR

PR：表示部分消退；CR：表示完全消退。

表 9. MC38-hB7H3 细胞皮下移植瘤体内药效中小鼠体重变化情况

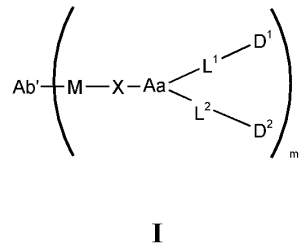
iADC 名称	小鼠体重变化率		
	第 7 天	第 18 天	第 32 天
iADC-11	+ 2.67%	+ 5.47%	+ 9.43%
iADC-12	+ 2.82%	+ 7.59%	+ 11.89%

10 +：体重增加；-：体重减少。

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

权 利 要 求

1. 一种如式(I)所示的抗体药物偶联物:



其中,

Ab'为与 B7H3 特异性结合的抗体或其抗原结合片段;

M 为和所述抗体或其抗原结合片段连接的接头部位;

X 为连接 M 和 Aa 的连接子;

Aa 选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段;

L¹ 为连接 Aa 和 D¹ 的连接子;

L² 为连接 Aa 和 D² 的连接子;

D¹ 为细胞毒性药物部分;

D² 为 TLR 激动剂部分;

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

2. 权利要求 1 所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL):

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH): 序列为 SEQ ID NO: 11 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 12 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL): 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3;

(2) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) :

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH) : 序列为 SEQ ID NO: 14 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 15 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL) : 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3;

(3) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) :

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH) : 序列为 SEQ ID NO: 8 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 9 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 10 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL) : 序列为 SEQ ID NO: 3 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 4 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3; 或

(4) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) :

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH) : 序列为 SEQ ID NO: 16 或其变体的 CDR-H1, 序列为 SEQ ID NO: 17 或其变体的 CDR-H2, 序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3; 和/或, 包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL) : 序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1, 序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2, 序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

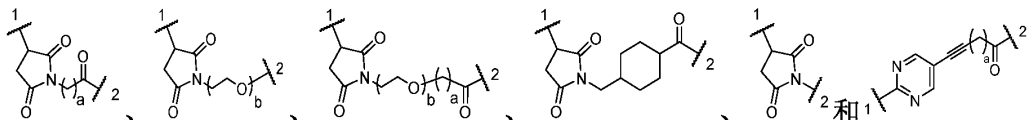
SEQ ID NO: 23 或 1 所示的 VH 或其变体, 和/或, SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含: SEQ ID NO: 23 或 1 所示的 VH 或其变体和 SEQ ID NO: 18 所示的重链恒定区 (CH) 或其变体的重链, 和/或, SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链恒定区 (CL) 或其变体的轻链;

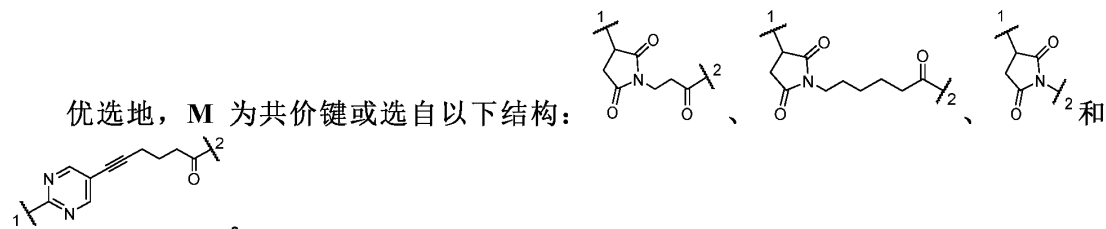
优选地, 所述抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 或 20 所示, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示;

可选地, 所述重链或重链可变区和/或轻链或轻链可变区的 N 端谷氨酰胺经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐; 和/或, 所述重链或重链恒定区 (CH) 或其变体不存在 C-末端赖氨酸。

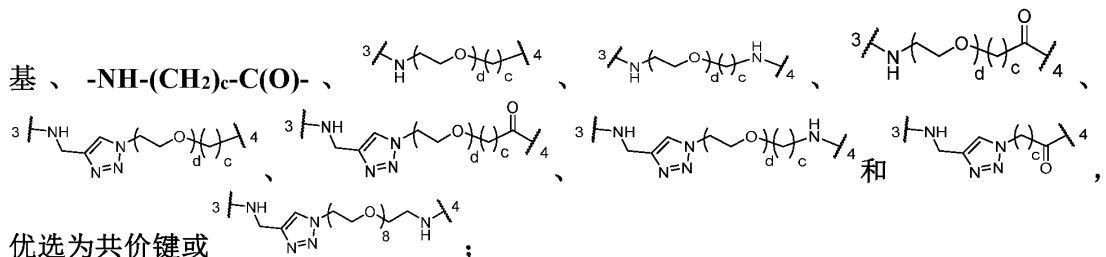
4. 权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中, M 为共价键或选自以下结构:



其中, 各 a 独立地选自 0-6 的整数, b 选自 1-10 的整数, 并且 M 的 1 位置与 Ab' 相连, 2 位置与 X 相连;



5. 权利要求 1-4 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中, X 为共价键或选自 C₁₋₆ 亚烷基、-NH-(CH₂)_c-C(O)-、

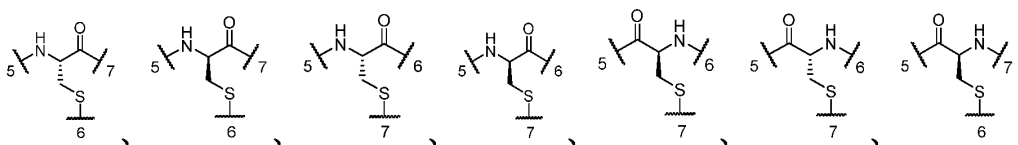


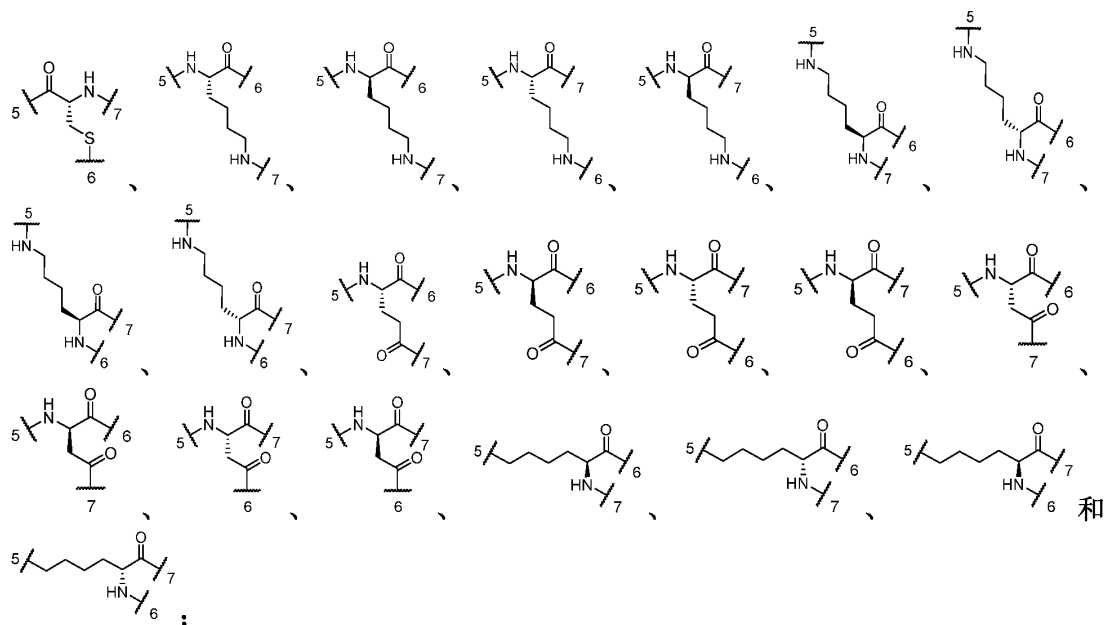
其中, 各 c 独立地选自 0-6 的整数, 各 d 独立地选自 1-10 的整数; X 的 3 位置与 M 相连, 4 位置与 Aa 相连。

6. 权利要求 1-5 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中, Aa 选自下述氨基酸的片段:

Gly、Phe、Ala、Val、Cys、Asp、Glu、Lys、Nle 和 Arg;

优选地, Aa 选自以下结构:

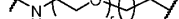
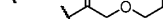
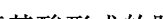




其中, Aa 的 5 位置与 X 相连, 6 位置与 L^1 相连, 7 位置与 L^2 相连。

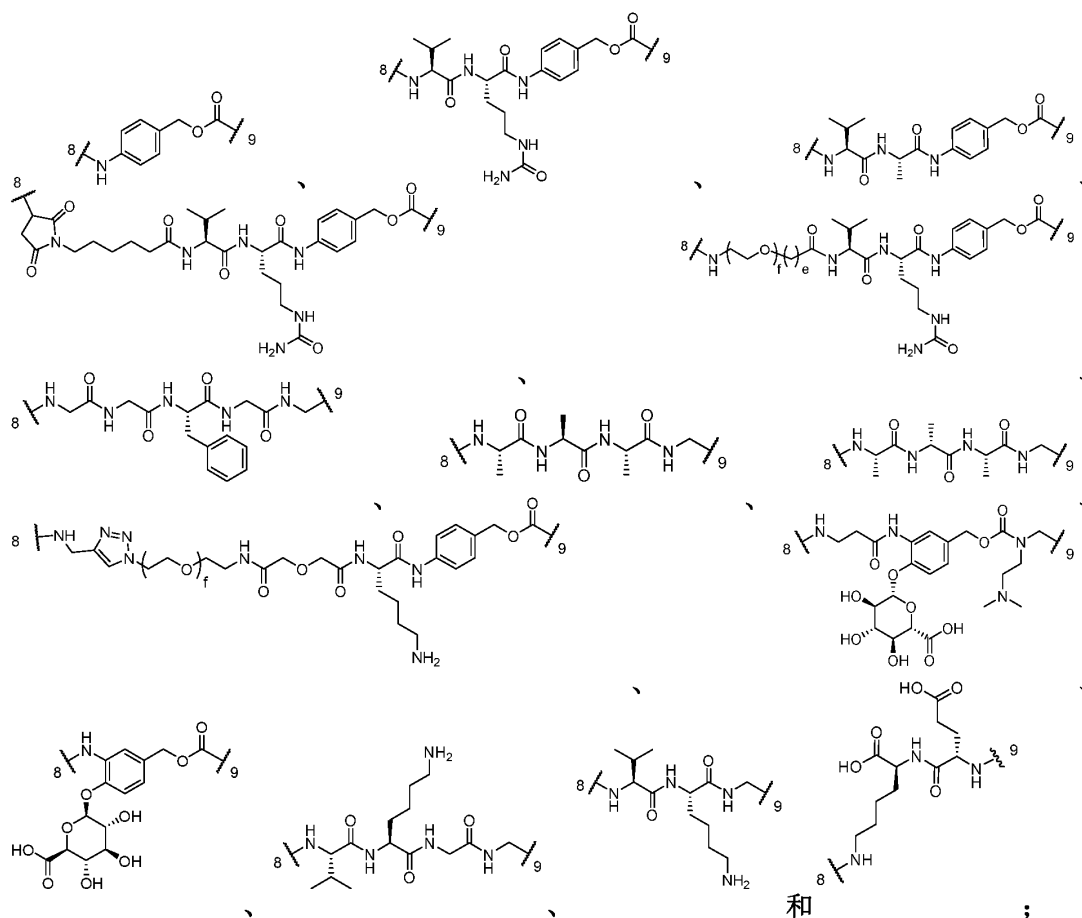
7. 权利要求 1-6 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中, L^1 为共价键或选自不可断裂连接子和可断裂连接子, 所述可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割, 所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶;

优选地, L^1 为 $-L^a-L^b-L^c-$, 其中:

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

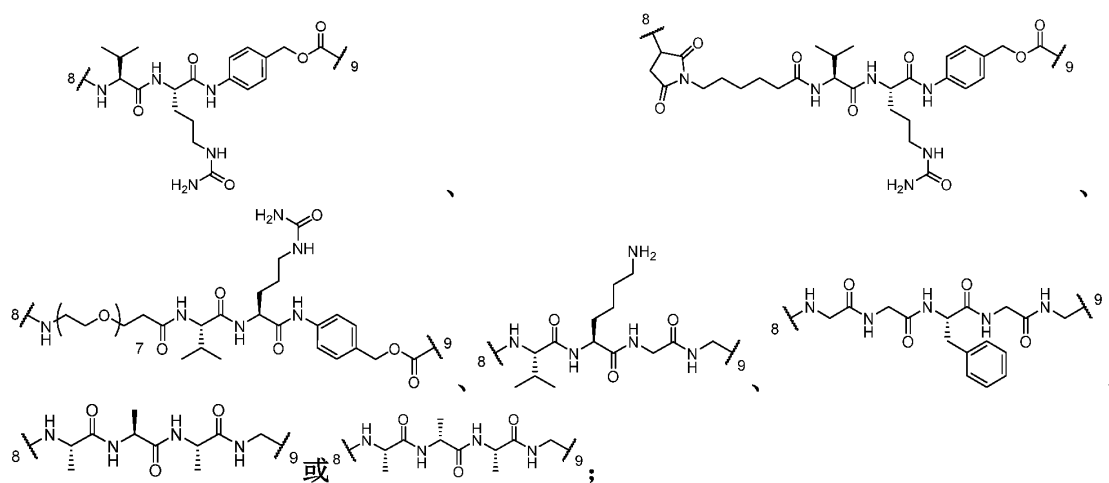
L^b 为共价键或选自氨基酸片段和由两个或两个以上氨基酸形成的肽片段，其中所述氨基酸选自 Val、Cit、Glu、Lys、Arg、Phe、Leu、Gly、Ala 和 Asn；

L^c 为共价键或选自-NH-CH₂-和以下结构:



其中, 各 e 独立地选自 0-6 的整数, 各 f 独立地选自 1-10 的整数; L^1 的 8 位置与 Aa 相连, 9 位置与 D^1 相连;

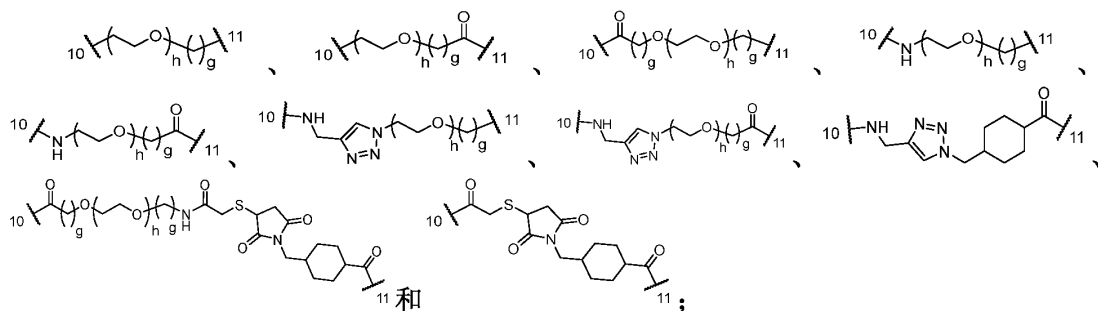
优选地， L^1 为：



其中, L^1 的 8 位置与 Aa 相连, 9 位置与 D^1 相连。

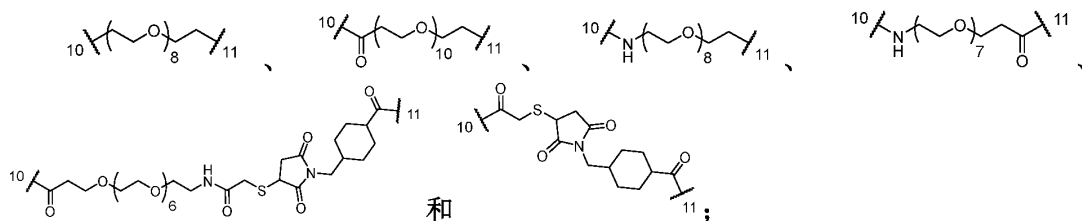
9. 权利要求 1-8 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中, L^2 选自不可断裂连接子和可断裂连接子, 所述可断裂连接子被病理环境中存在的酶切割, 所述酶选自蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶和硫酸酯酶。

10. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中, L^2 选自以下结构:



其中, 各 g 独立地选自 0-6 的整数, 各 h 独立地选自 1-10 的整数; L^2 的 10 位置同 Aa 相连, 11 位置同 D^2 相连;

优选地, L^2 选自以下结构:



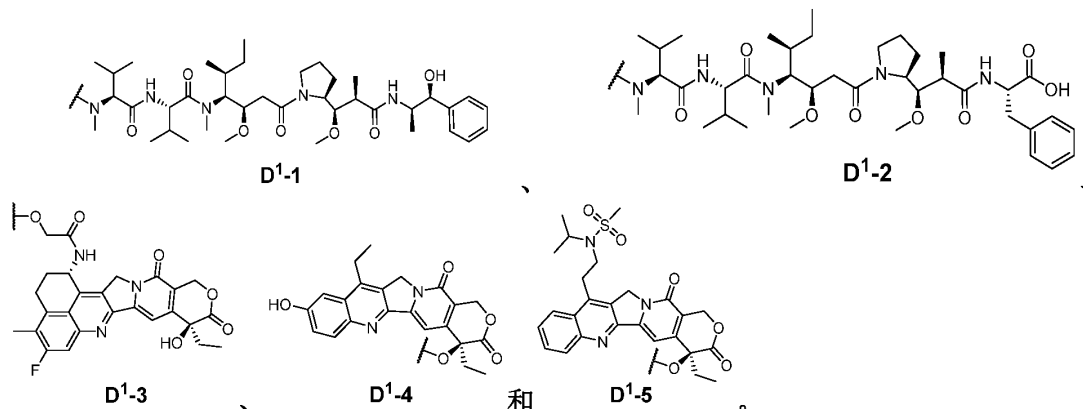
其中, L^2 的 10 位置同 Aa 相连, 11 位置同 D^2 相连。

11. 权利要求 1-10 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中, D^1 选自细胞毒性药物部分, 所述细胞毒性药物包括微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂和拓扑异构酶抑制剂, 所述微管蛋白抑制剂包括海兔毒素 (dolastatin) 及澳瑞他汀 (auristatin) 类、美登素 (maytansine) 类、微管溶素 (Tubulysins) 类和隐粘菌素 (cryptomycins) 类, 所述 DNA 损伤剂包括吡咯并苯二氮草 (Pyrrolobenzodiazepine) 类、杜卡霉素 (duocarmycin) 类和卡齐霉素 (calicheamicin) 类, 所述拓扑异构酶抑制剂包括喜树碱及其衍生物、表鬼臼毒素 (Epipodophyllotoxin) 类、蒽环类和蒽醌类;

优选地, 所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素 10、MMAE、MMAF、美登素、DM1、

DM3 和 DM4, 所述拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱、SN-38、依喜替康、拓扑替康、贝洛替康、鲁比替康、二氟替康、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、Dxd、T030、阿霉素、表柔比星和 PNU-159682;

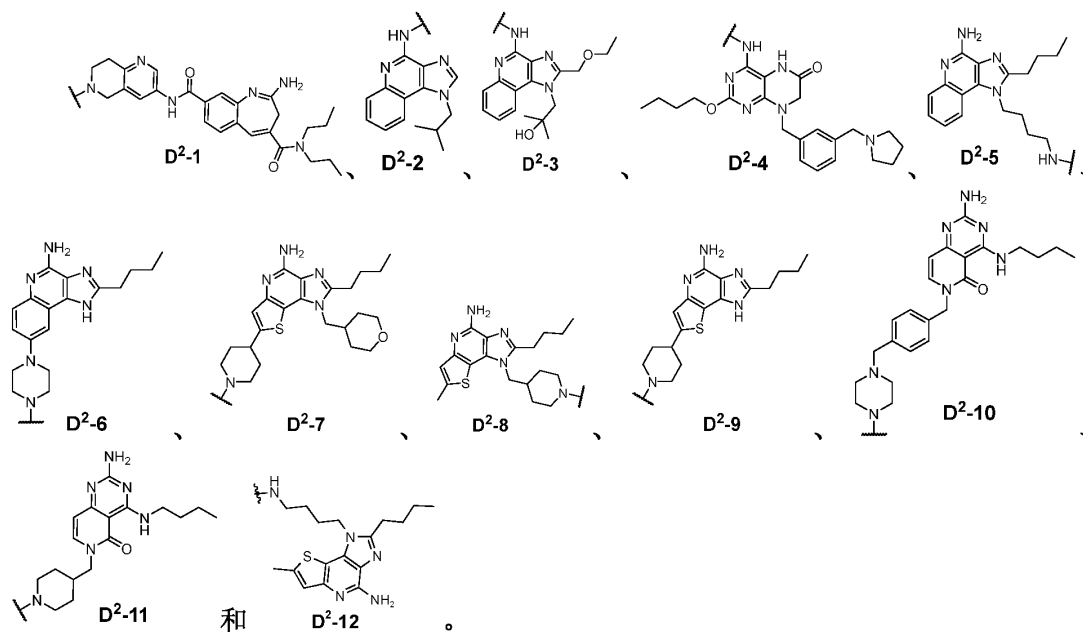
优选地, D¹ 选自以下结构:



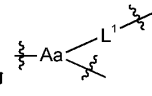
12. 权利要求 1-11 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中, D² 为 TLR 激动剂部分, 所述 TLR 激动剂选自 TLR2 激动剂、TLR4 激动剂、TLR6 激动剂、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂、TLR7/8 激动剂和 TLR9 激动剂;

优选地, 所述 TLR 激动剂选自 TLR7 激动剂、TLR8 激动剂和 TLR7/8 激动剂;

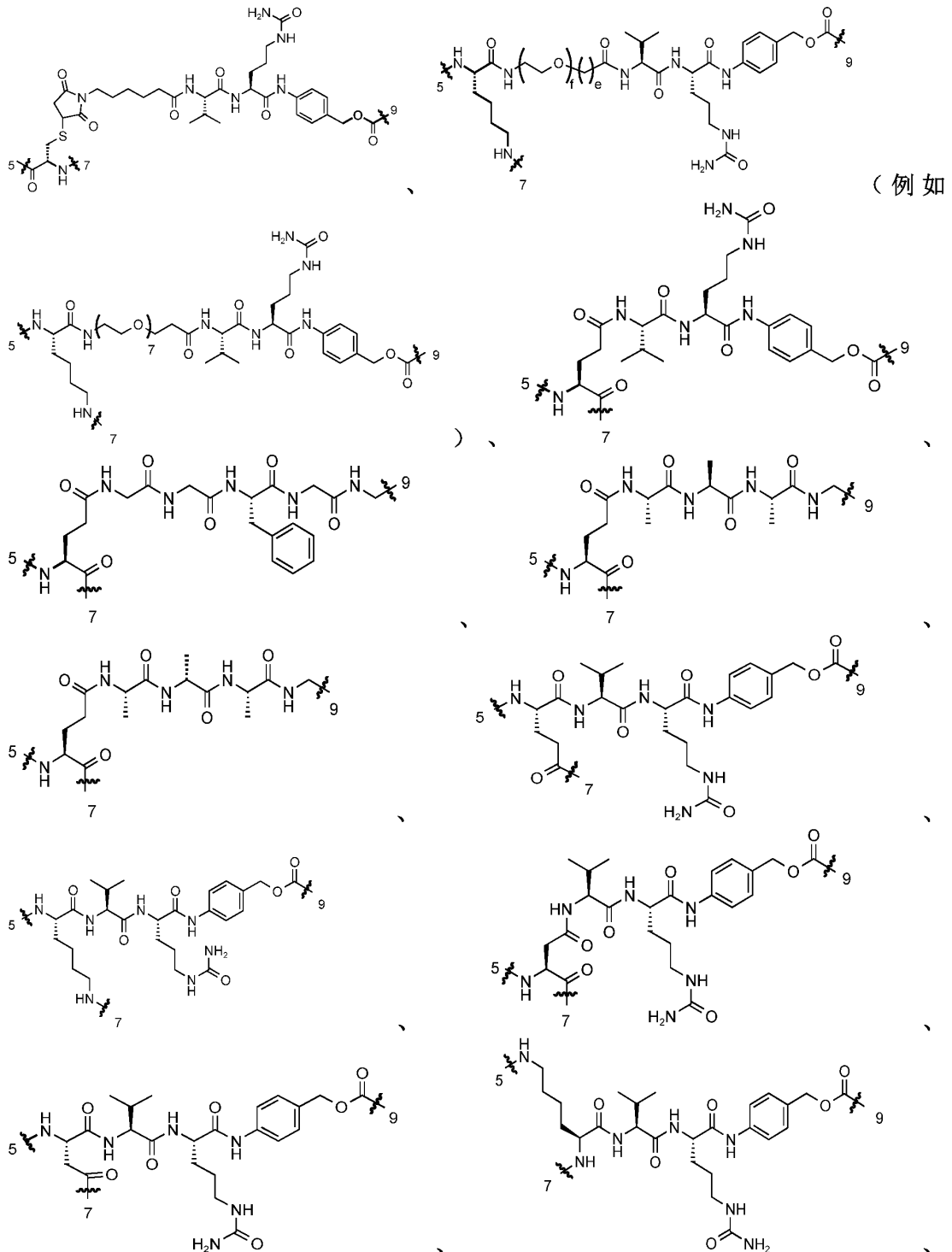
优选地, D² 选自以下结构:

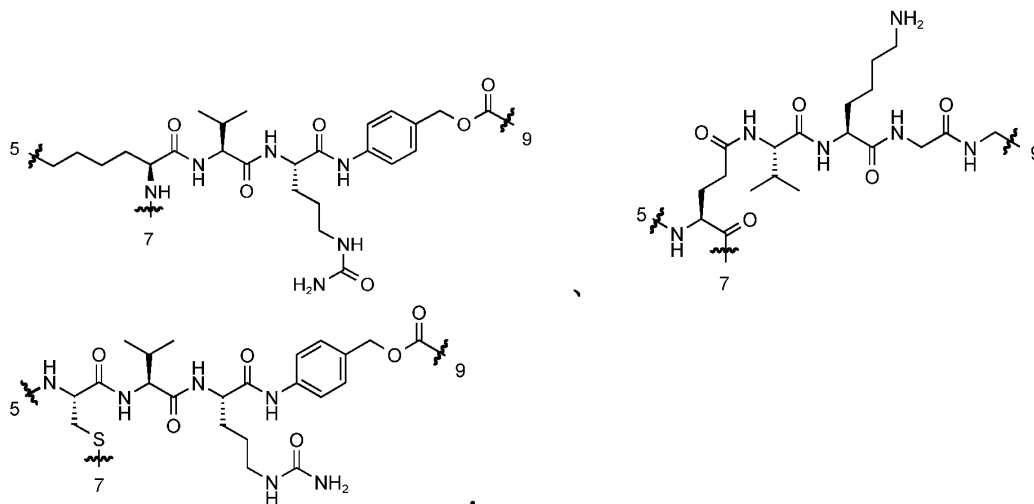


13. 权利要求 1-12 任一项所述的抗体药物偶联物，其中



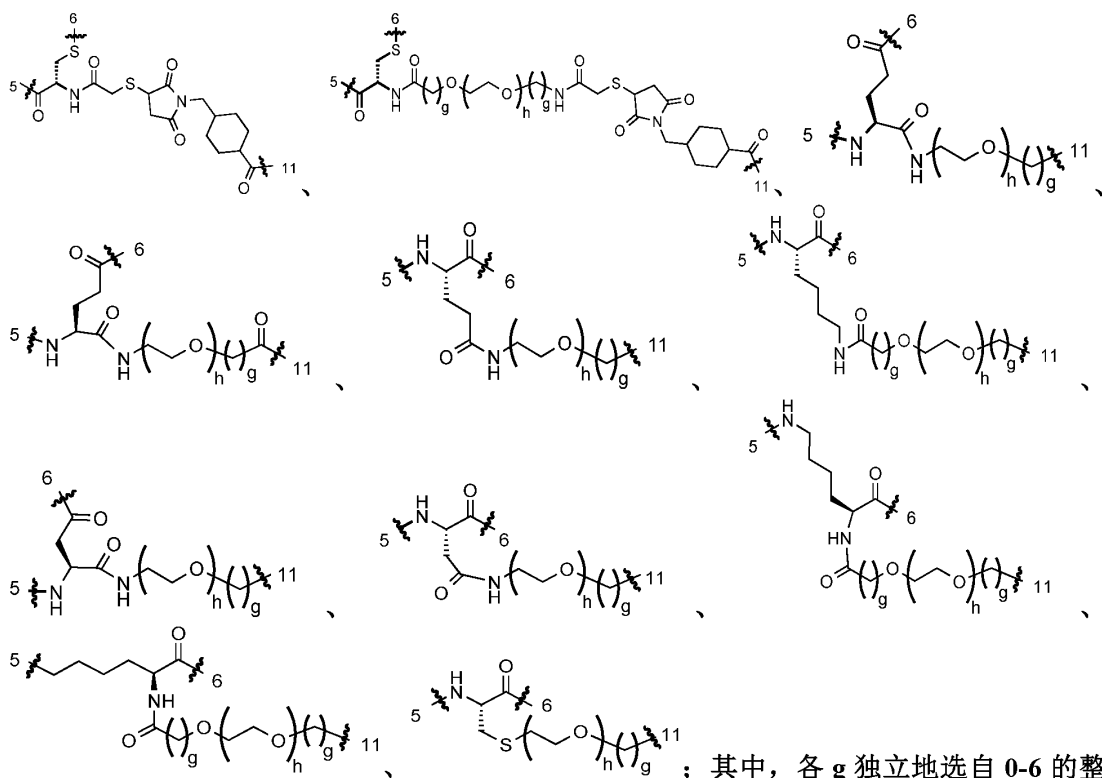
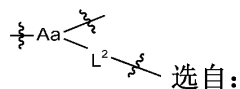
选自：



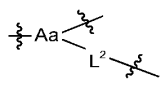


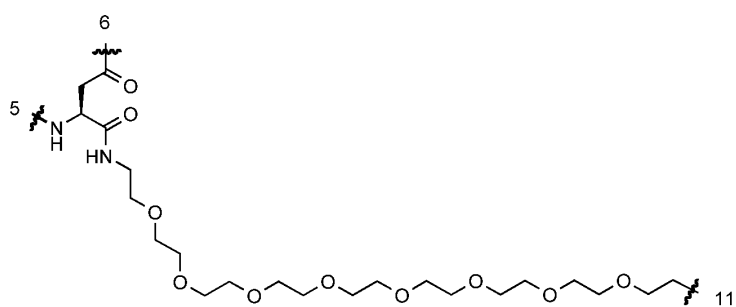
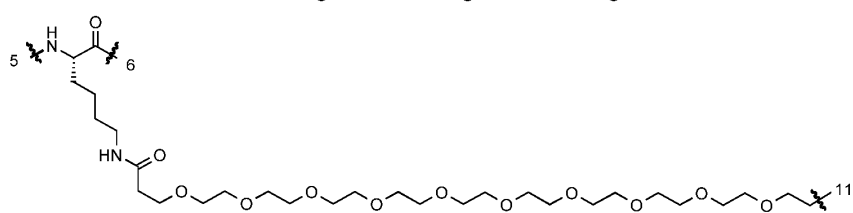
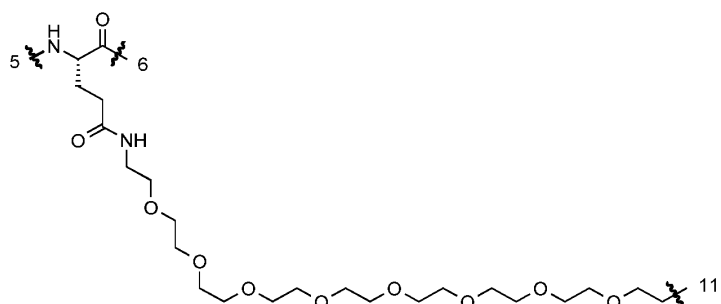
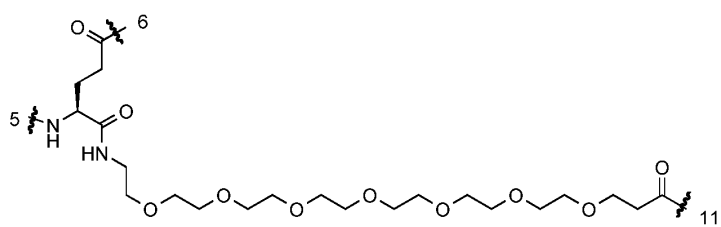
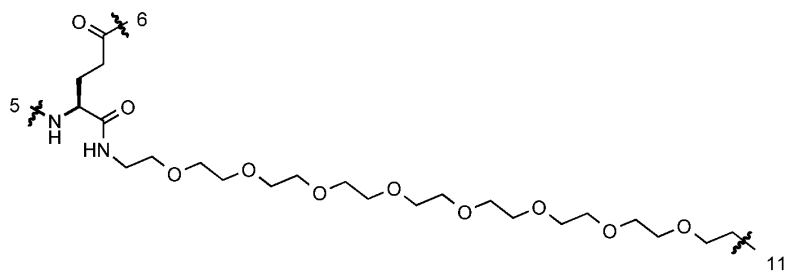
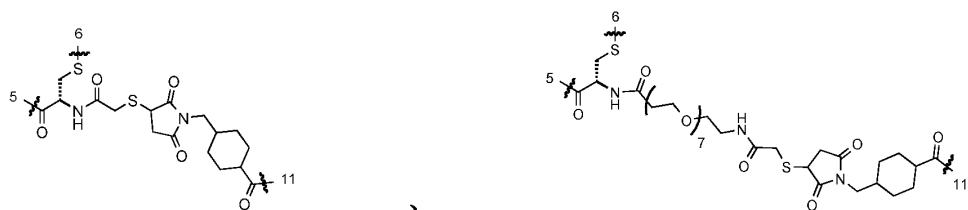
其中，**e** 选自 0-6 的整数，**f** 选自 1-10 的整数；5 位置与 X 相连，7 位置与 L^2 相连，9 位置与 D^1 相连。

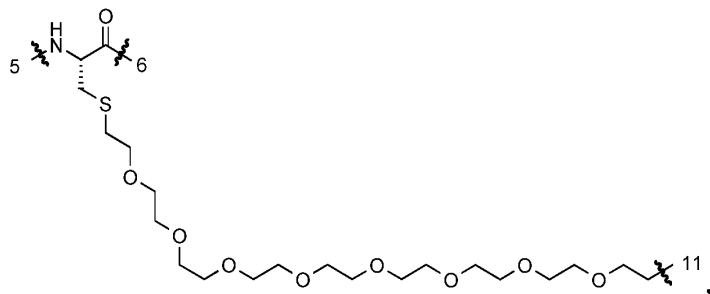
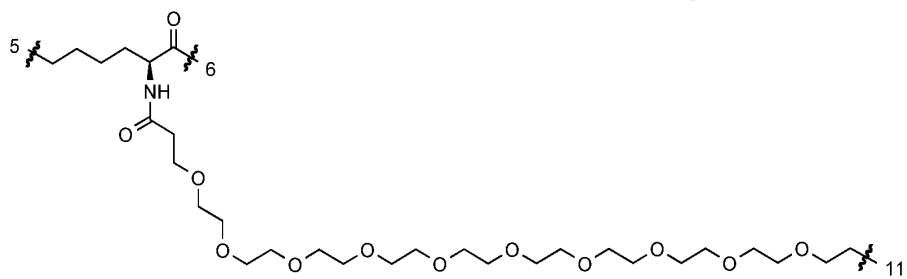
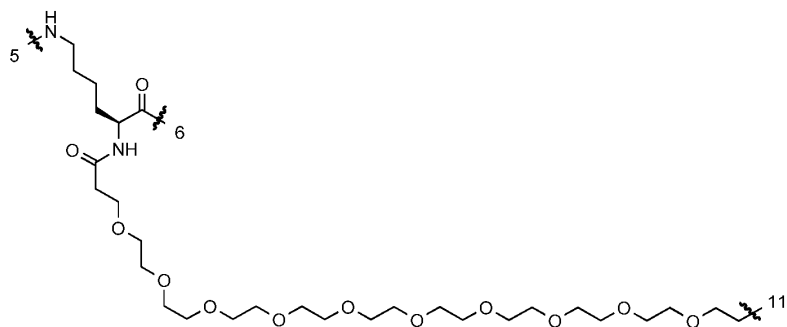
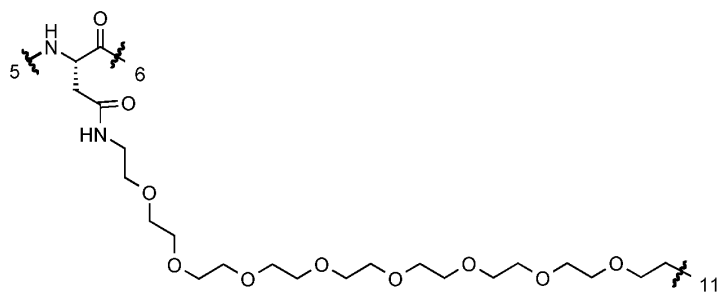
14. 权利要求 1-13 任一项所述的抗体药物偶联物，其中



其中，各 **g** 独立地选自 0-6 的整数，各 **h** 独立地选自 1-10 的整数；

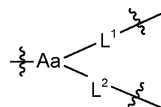
优选地，选自：



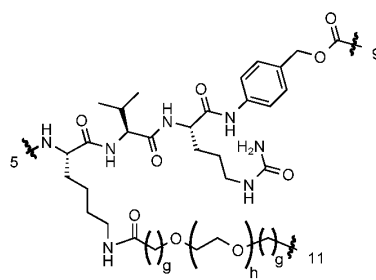
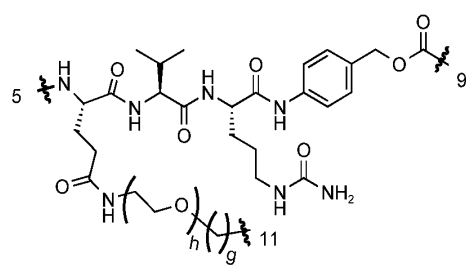
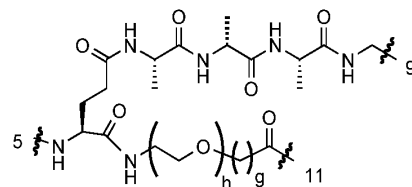
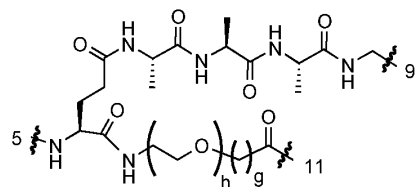
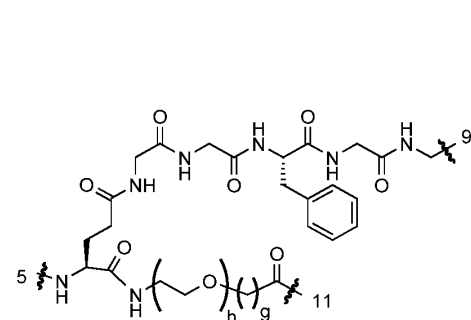
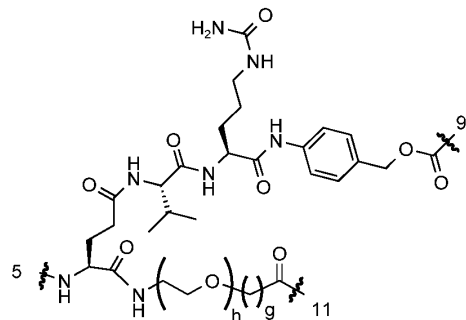
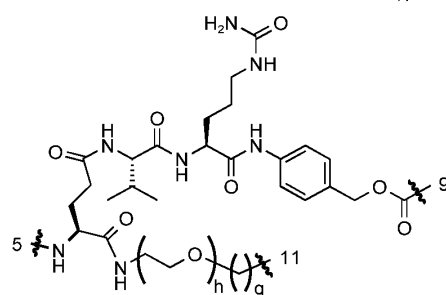
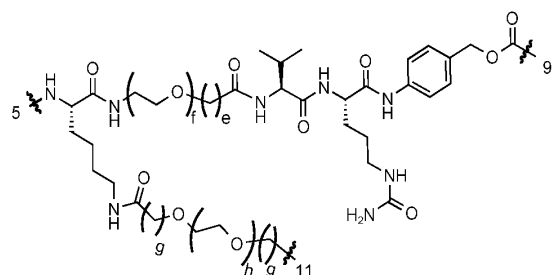
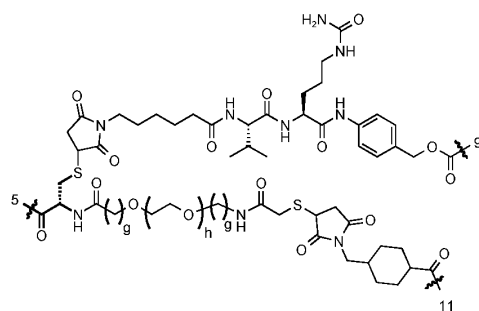
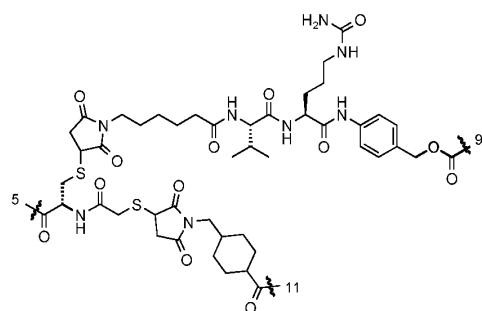


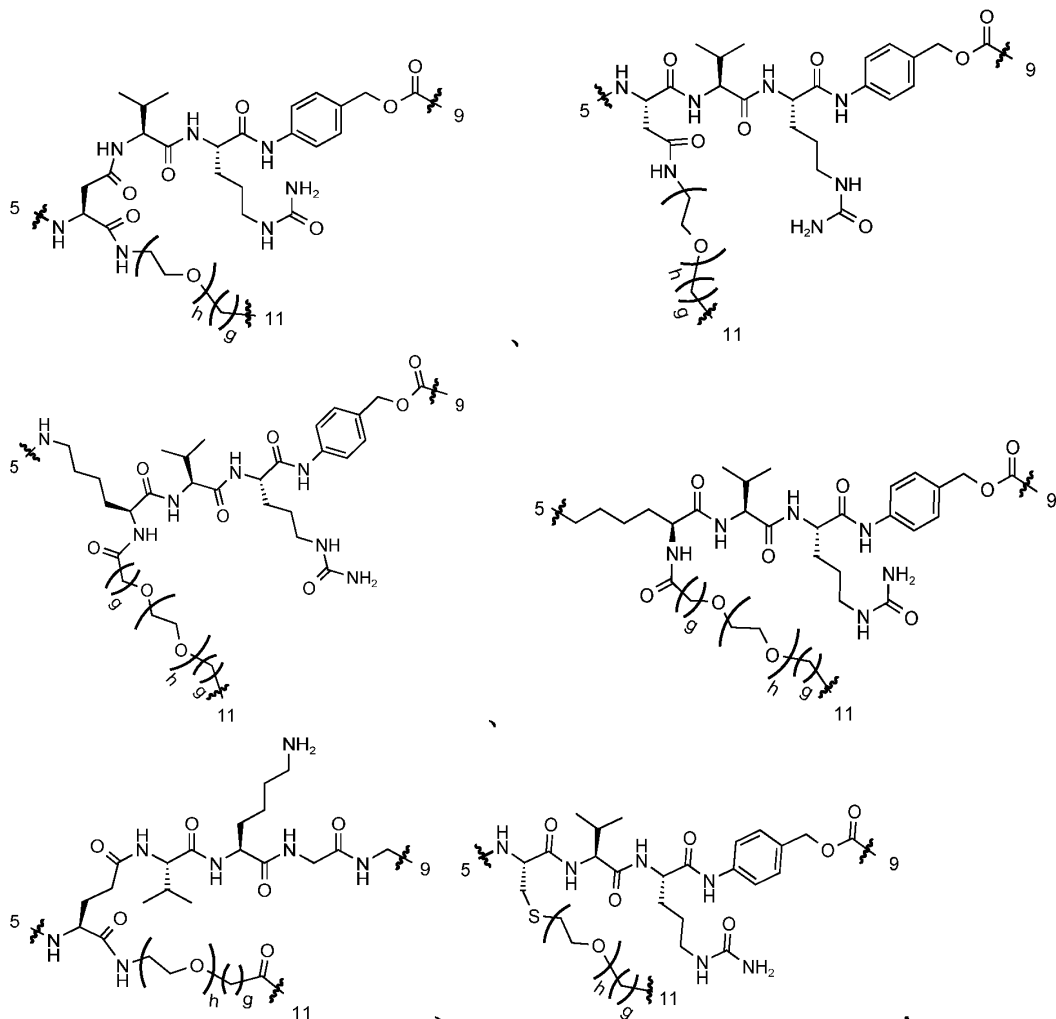
其中，5 位置与 X 相连，6 位置与 L¹ 相连，11 位置与 D² 相连。

15. 权利要求 1-14 任一项所述的抗体药物偶联物，其中



选自：

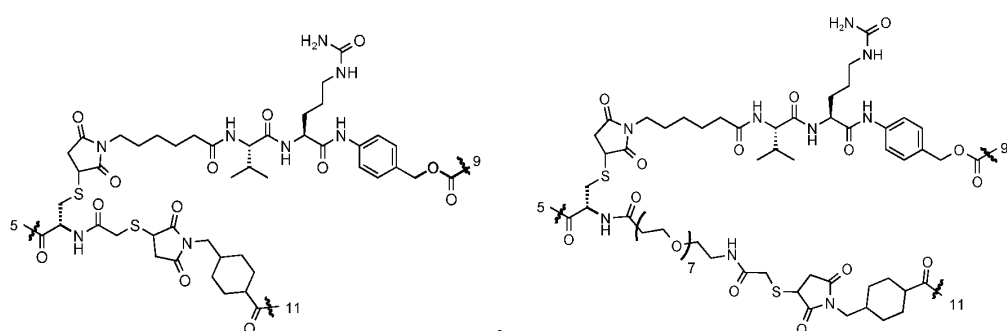


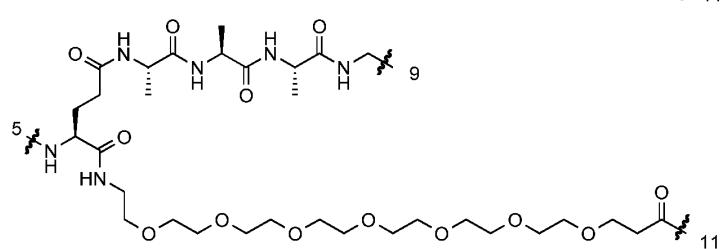
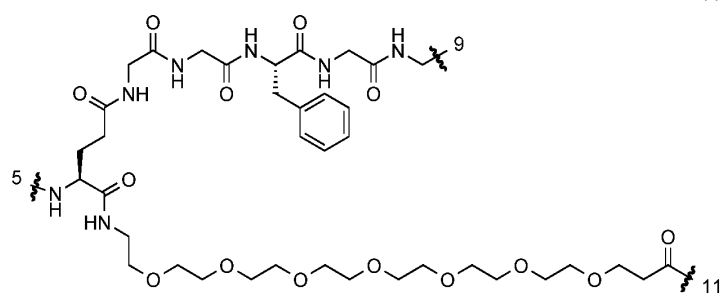
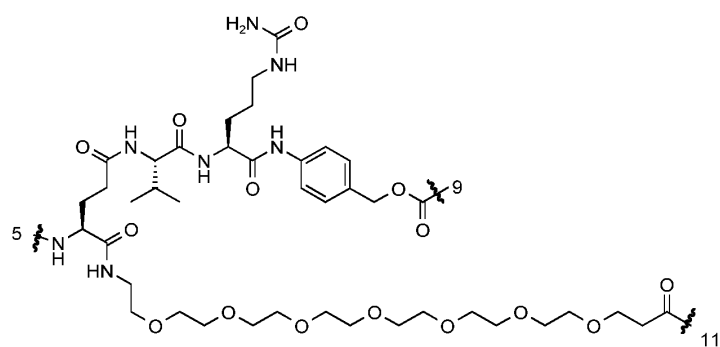
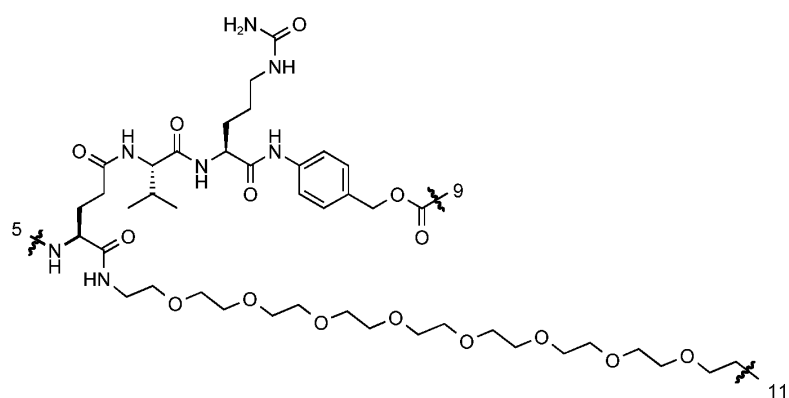
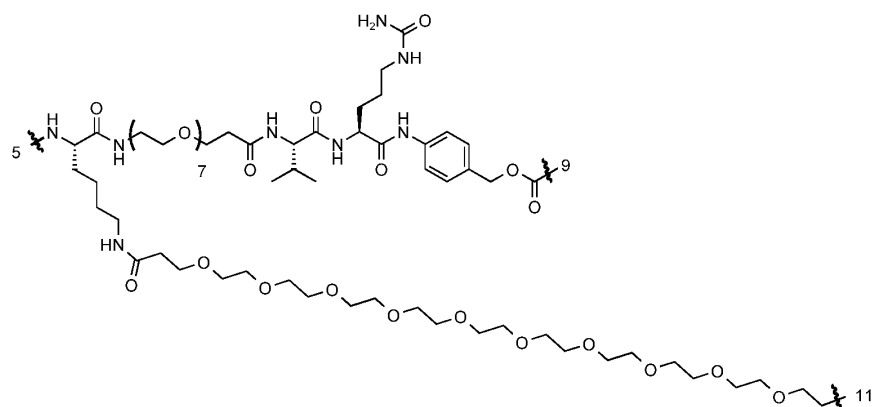


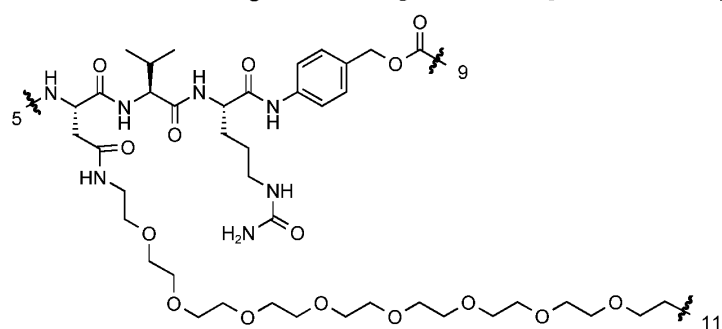
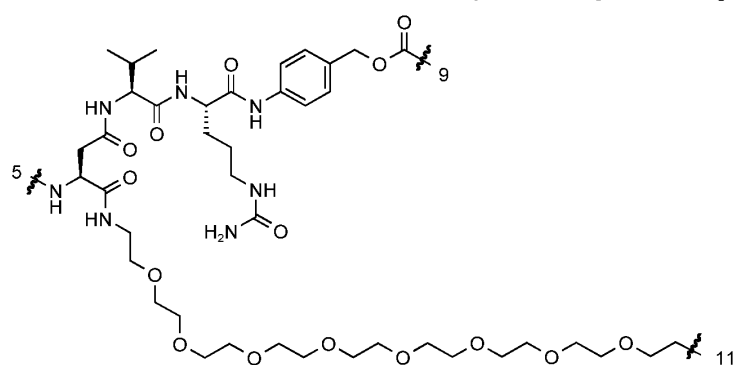
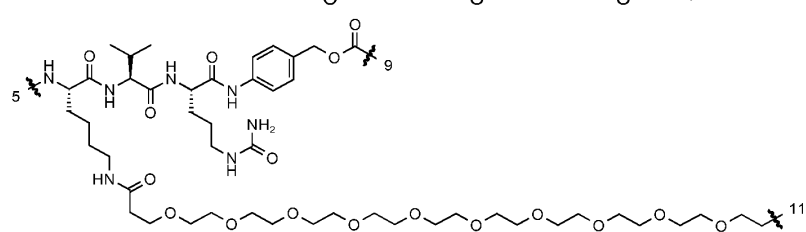
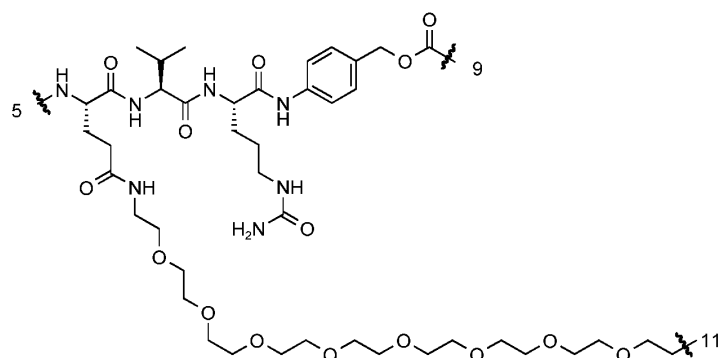
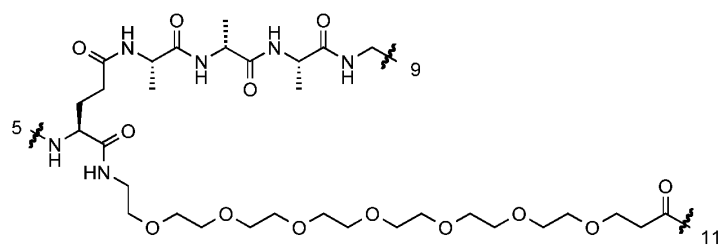
其中，各 g 独立地选自 0-6 的整数，各 h 独立地选自 1-10 的整数；

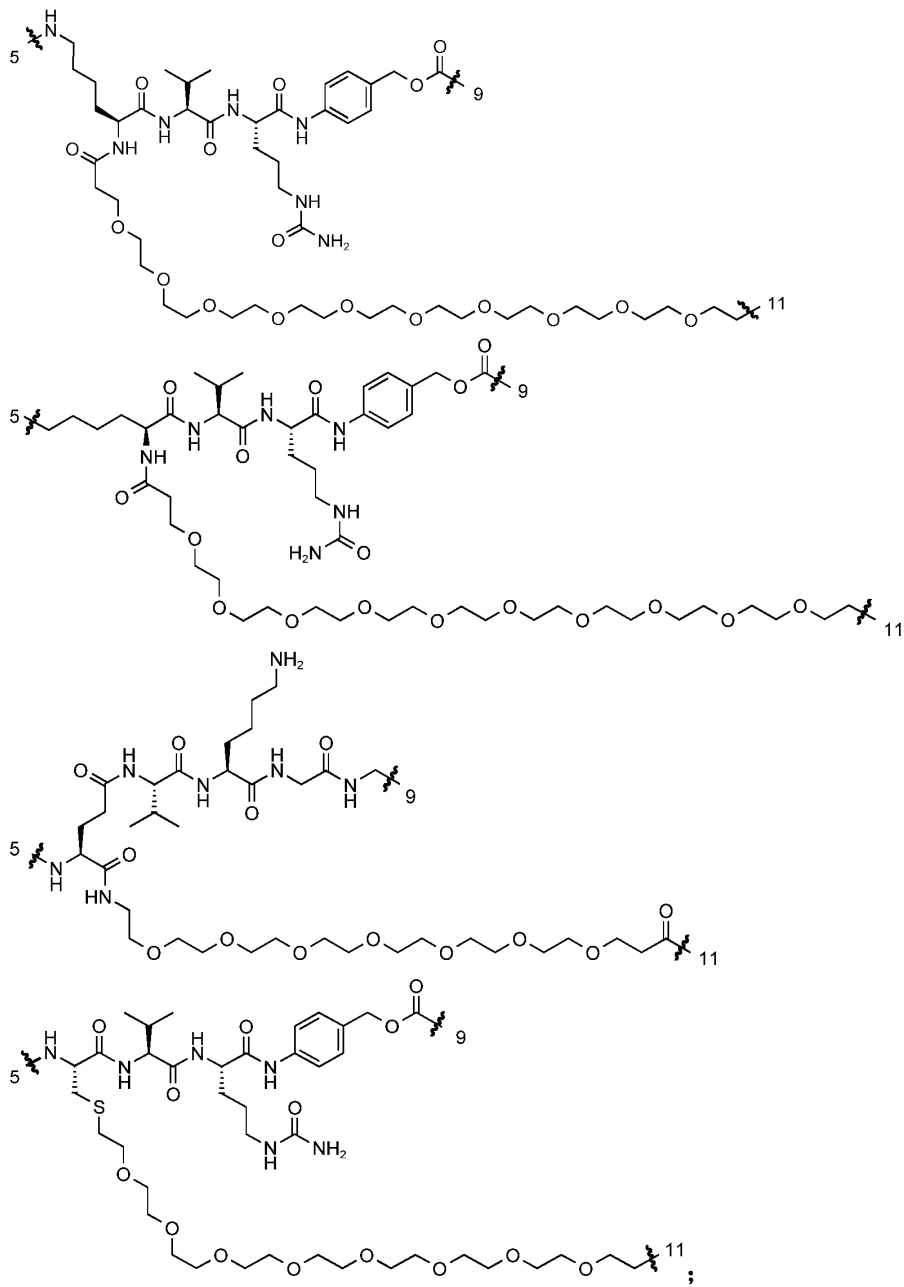
优选地，

$$\sum_{i=1}^n Aa \begin{cases} L^1 \\ L^2 \end{cases}$$
 选自：



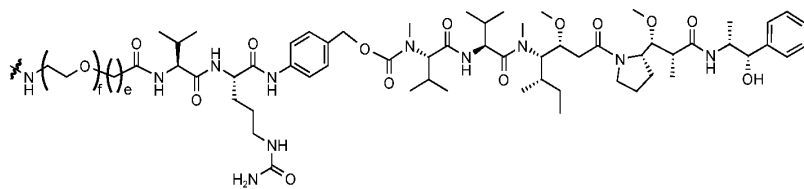
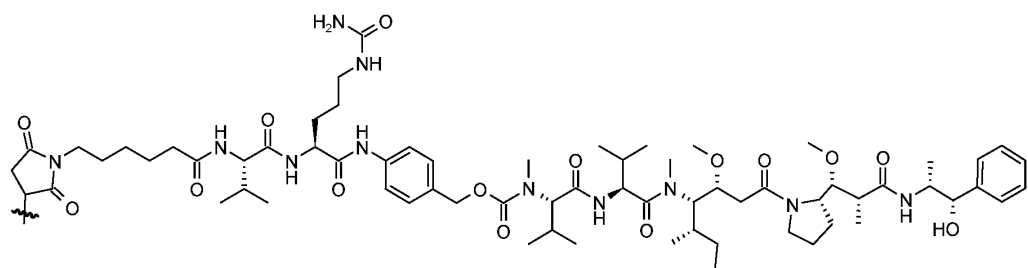




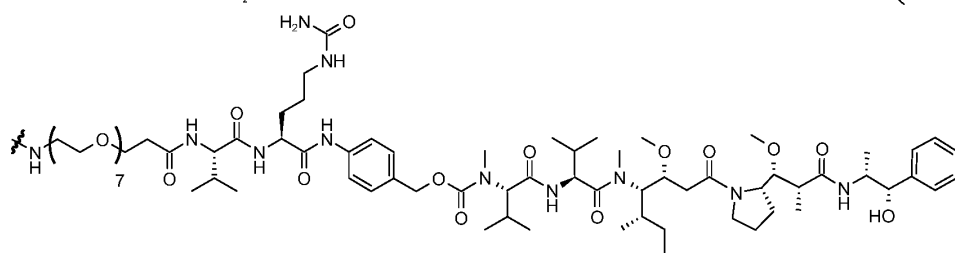


其中 5 位置与 X 相连，9 位置与 D^1 相连，11 位置与 D^2 相连。

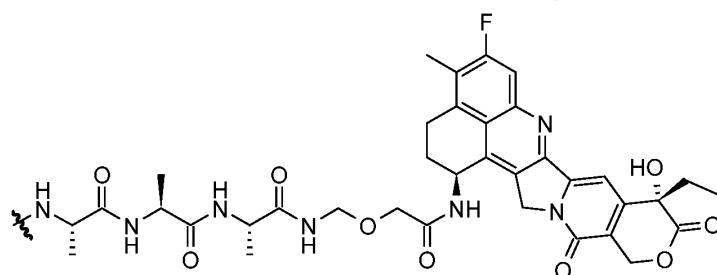
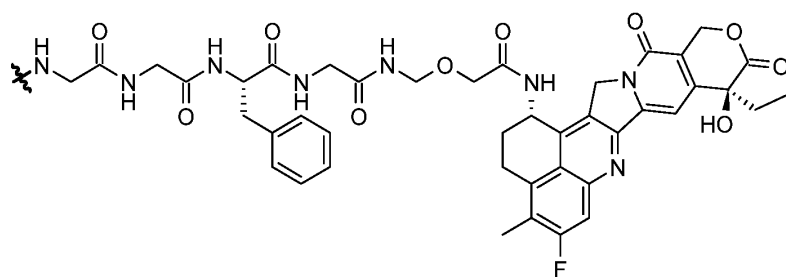
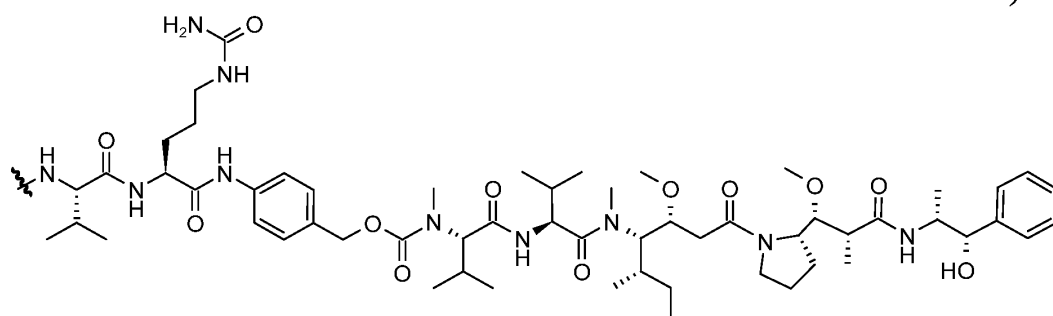
16. 权利要求 1-15 任一项所述的抗体药物偶联物，其中 $\frac{5}{9}L^1-D^1$ 选自：

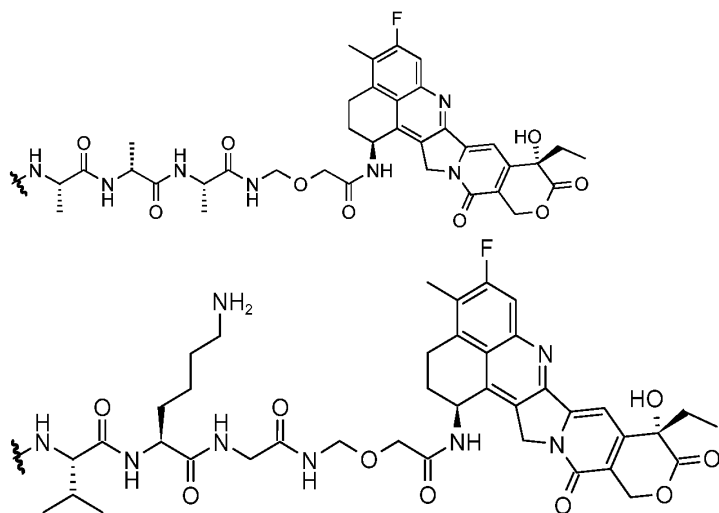


(例 如



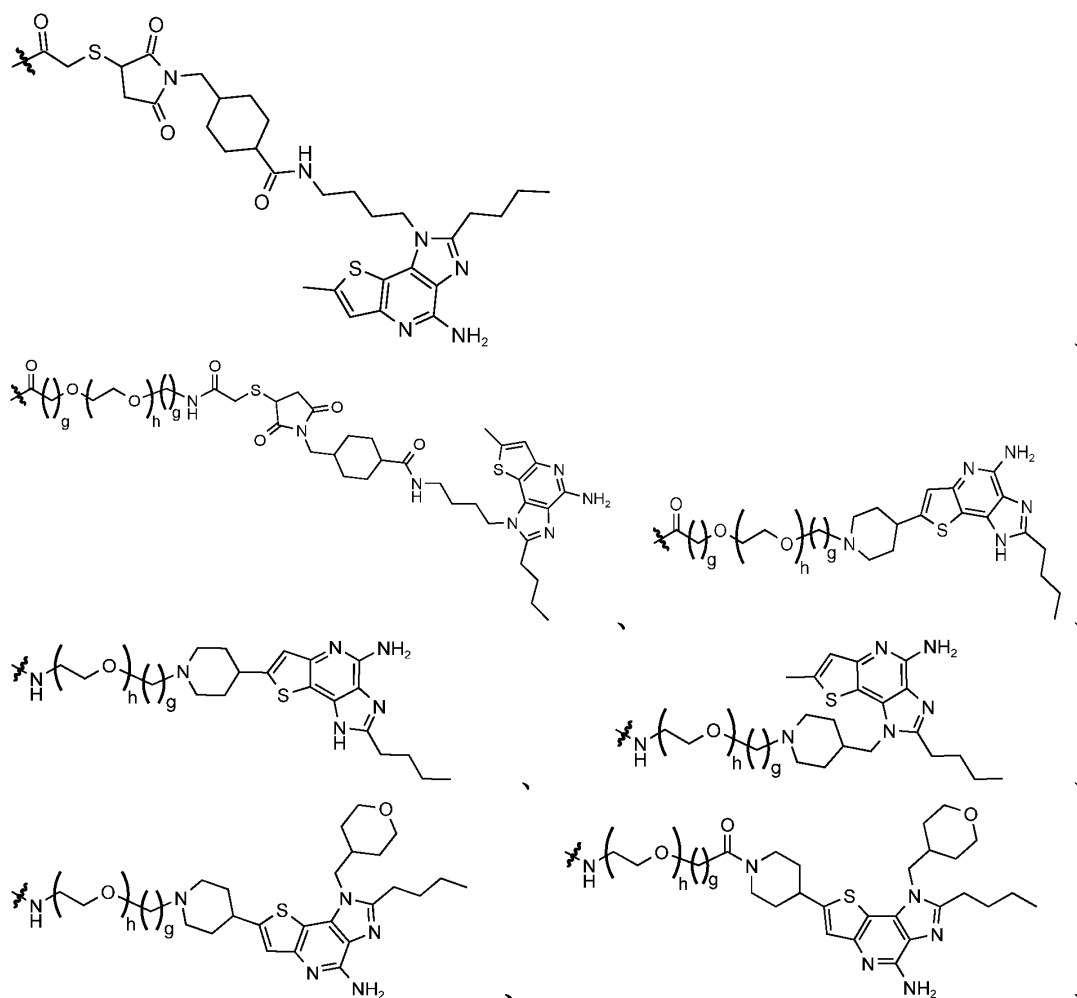
) 、

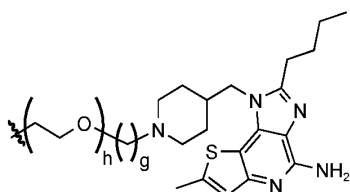
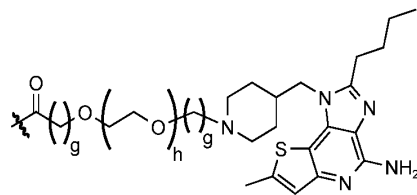
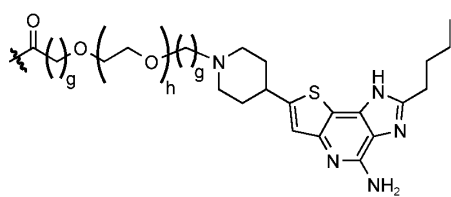




其中各 e 独立地选自 0-6 的整数, 各 f 独立地选自 1-10 的整数。

17. 权利要求 1-16 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中 $\frac{1}{2}L^2-D^2$ 选自:

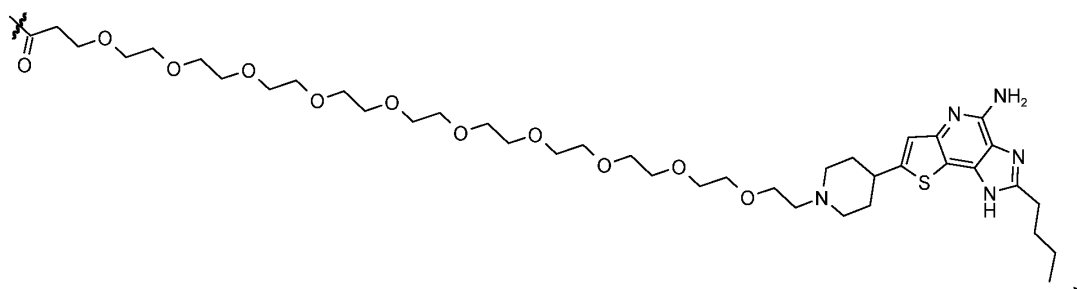
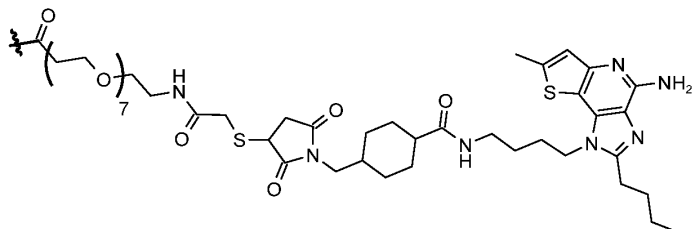
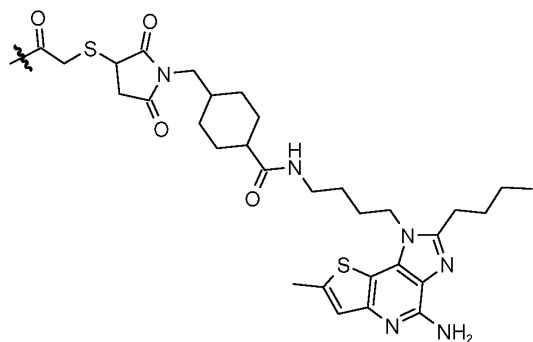


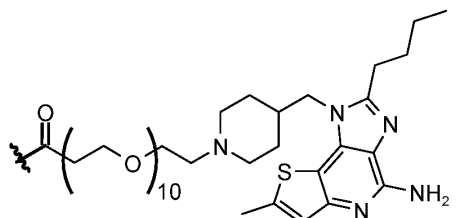
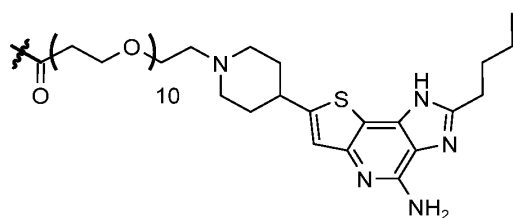
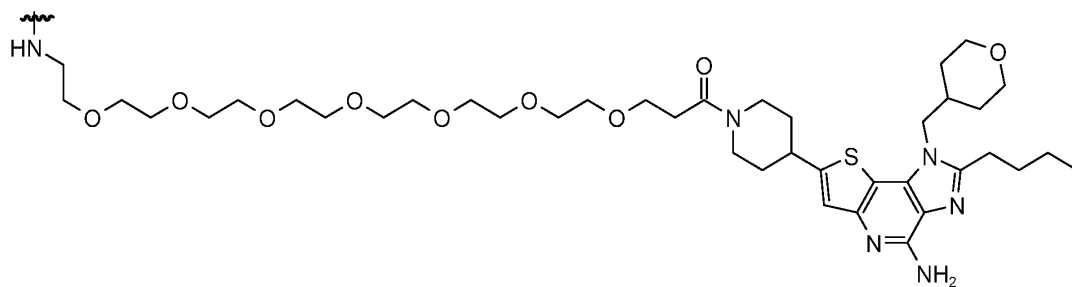
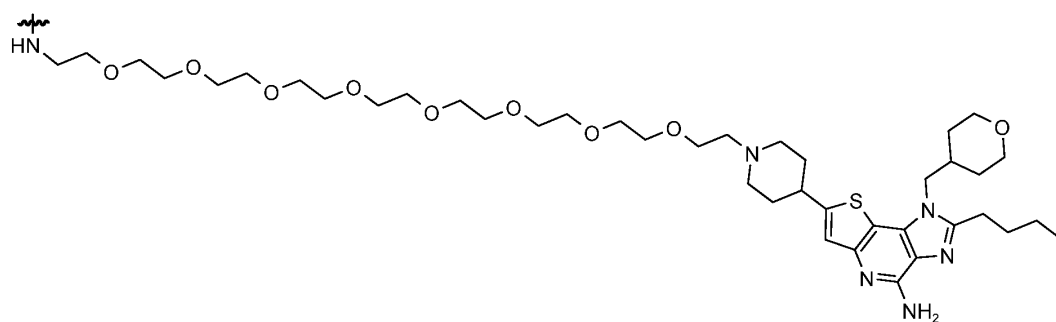
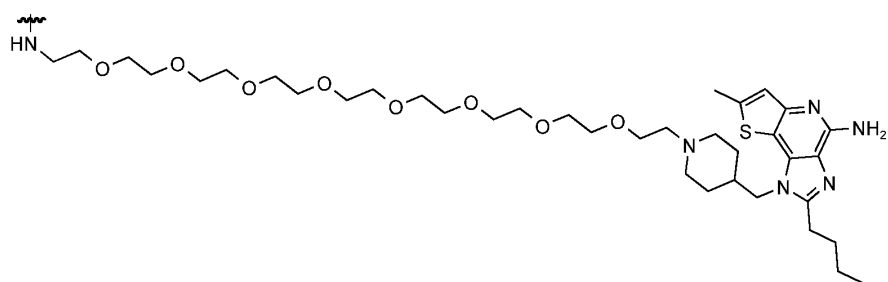
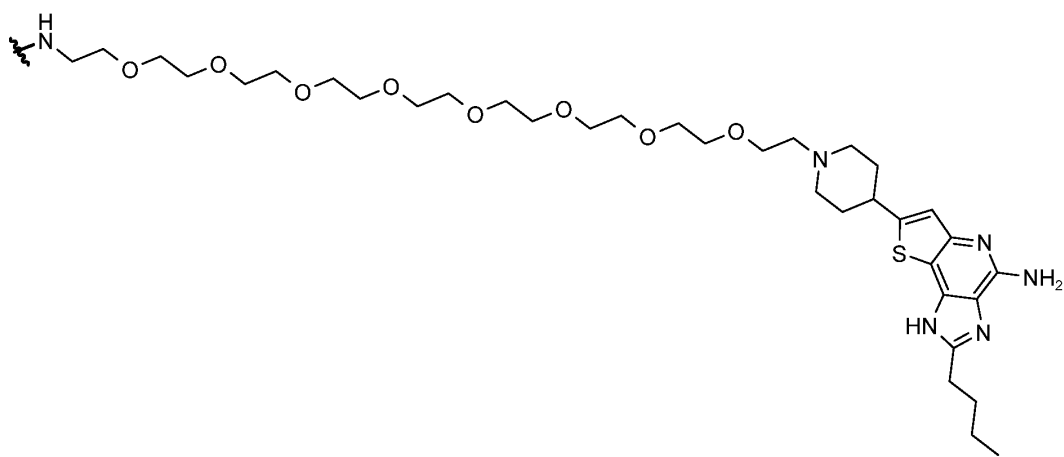


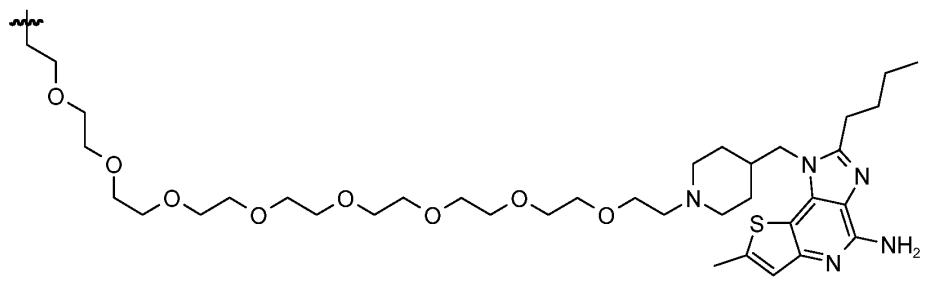
；其中，各 g 独立地选自 0-6 的整数，各 h 独立地选自 1-10

的整数；

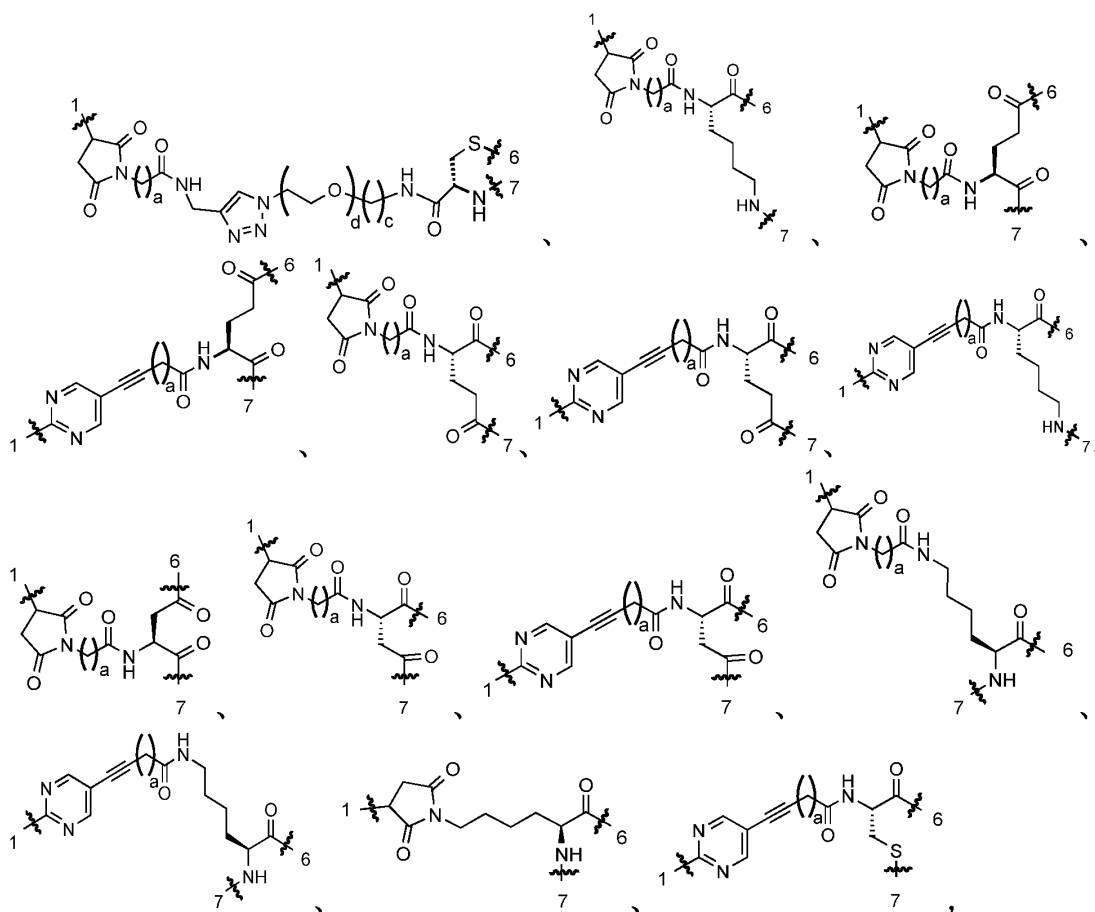
优选地， $\frac{2}{3}L^2-D^2$ 选自：





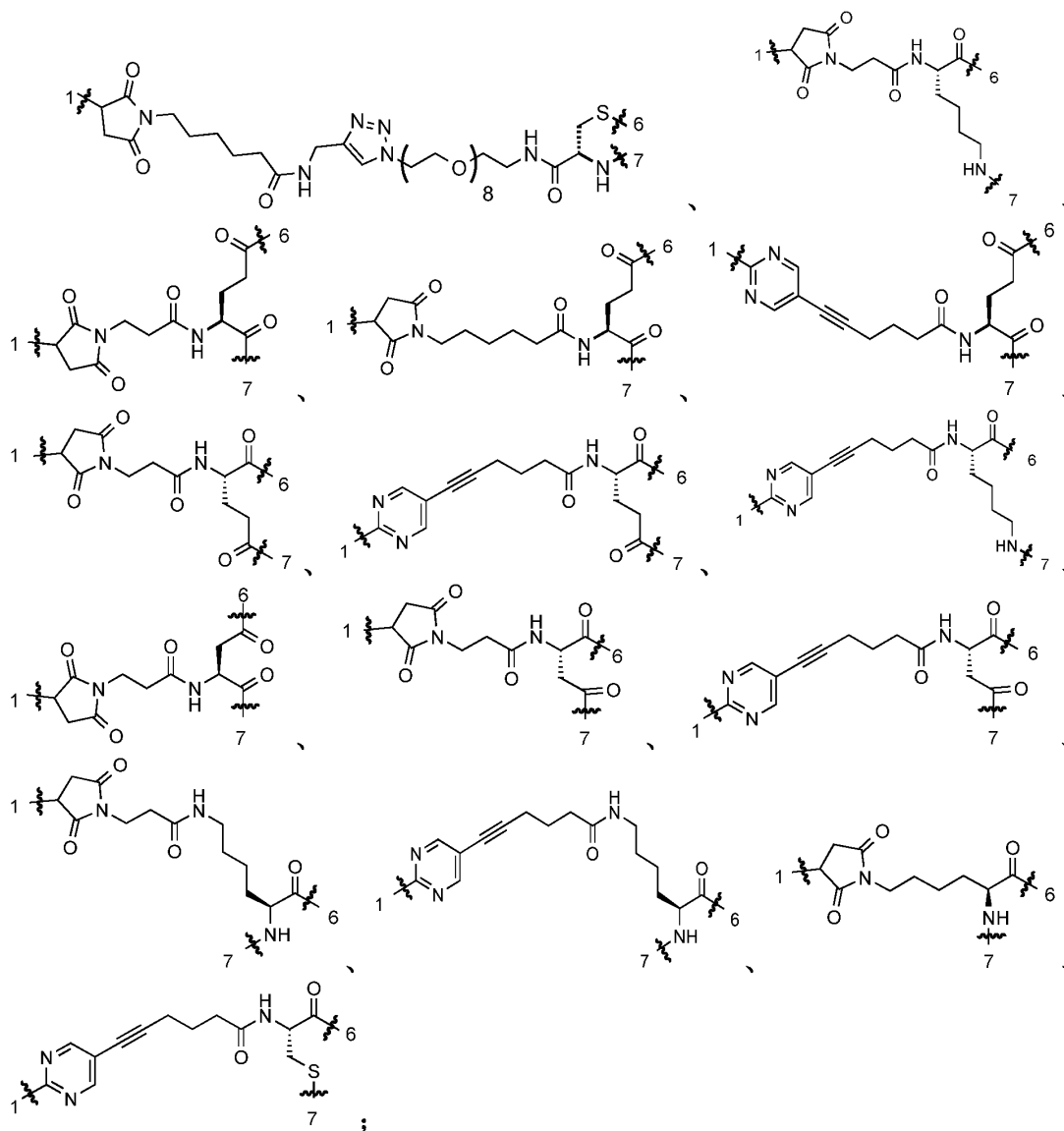


18. 权利要求 1-17 任一项所述的抗体药物偶联物，其中 $\frac{1}{2} \text{M}-\text{X}-\text{Aa}$ 选自：



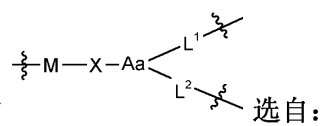
其中，各 a 独立地选自 0-6 的整数，各 c 独立地选自 0-6 的整数，各 d 独立地选自 1-10 的整数；

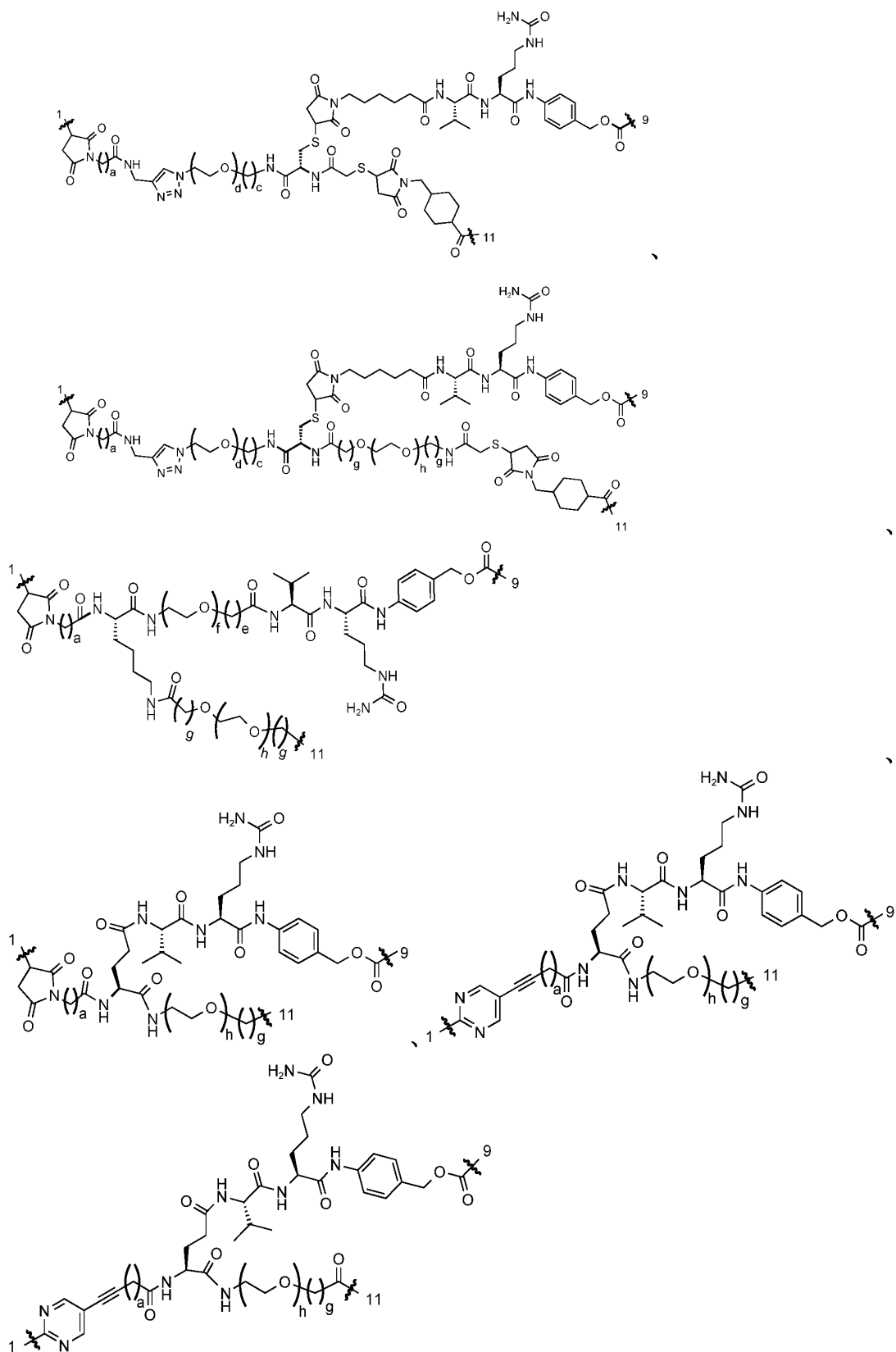
优选地， $\frac{1}{2} \text{M}-\text{X}-\text{Aa}$ 选自：

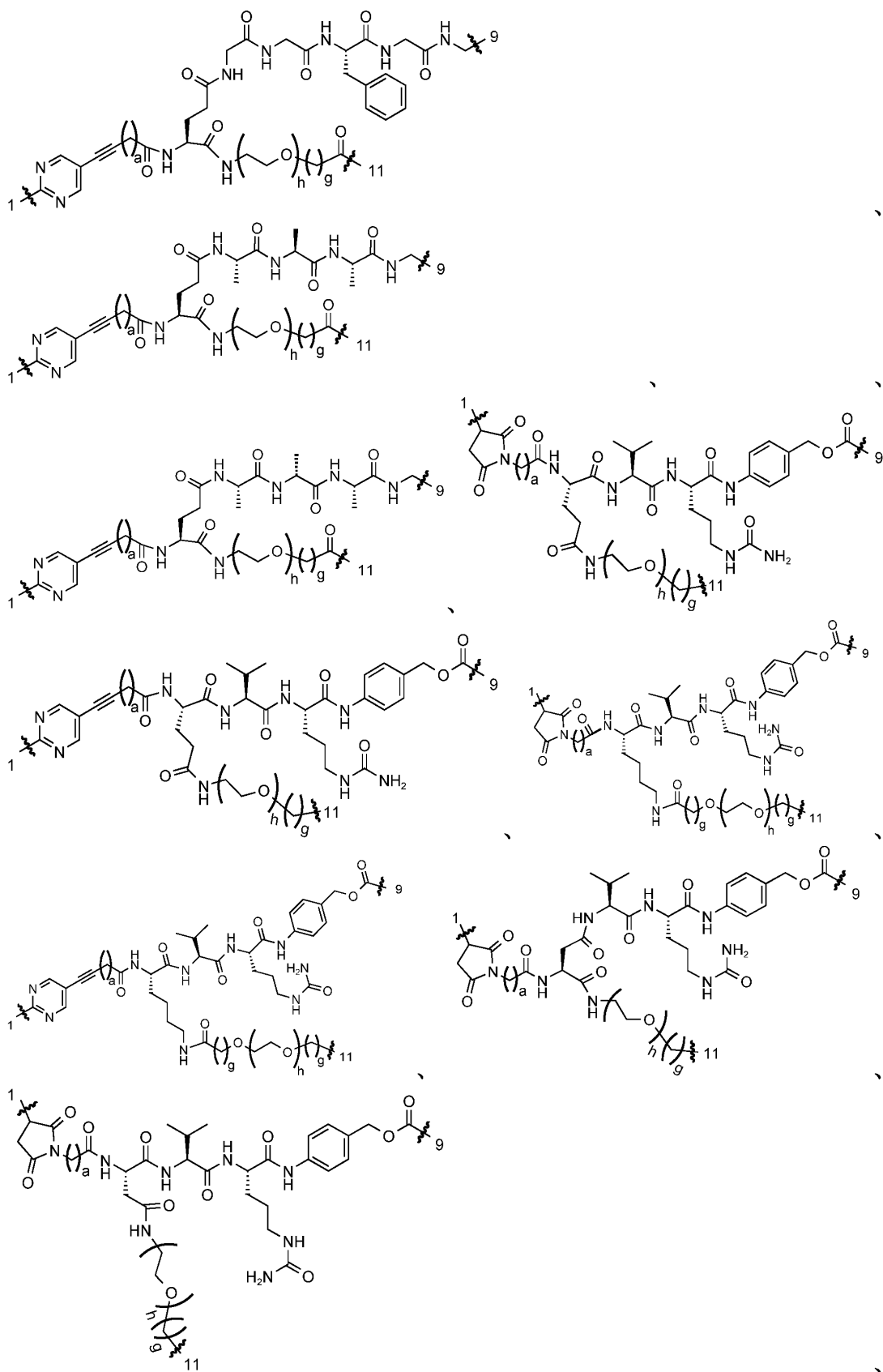


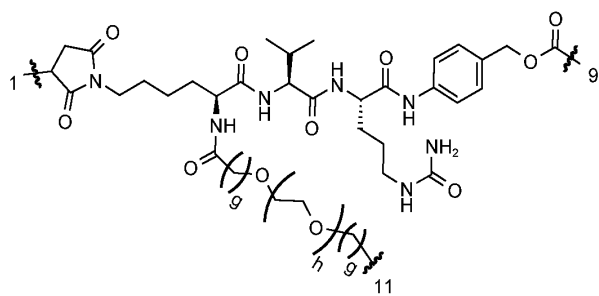
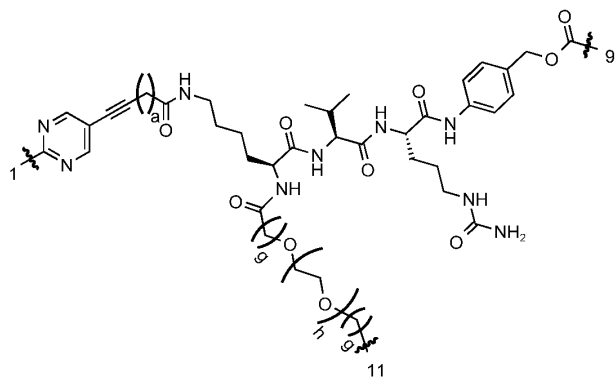
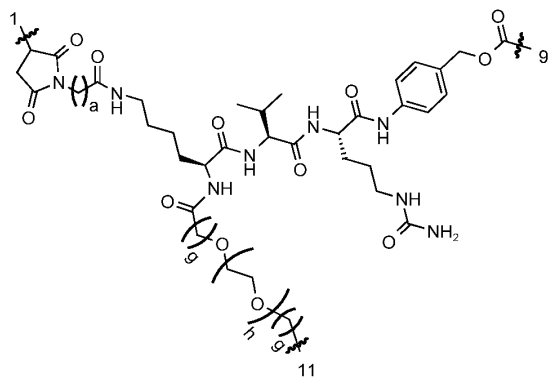
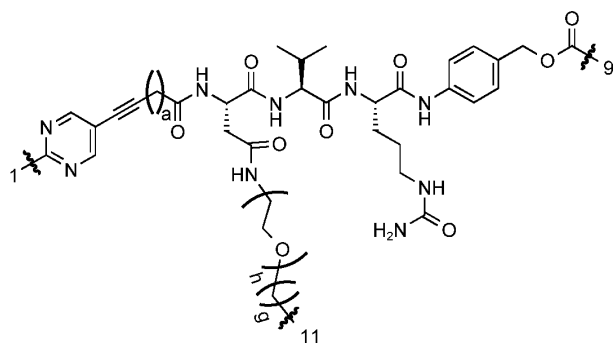
其中，1 位置与 Ab' 相连，6 位置与 L¹ 相连，7 位置与 L² 相连。

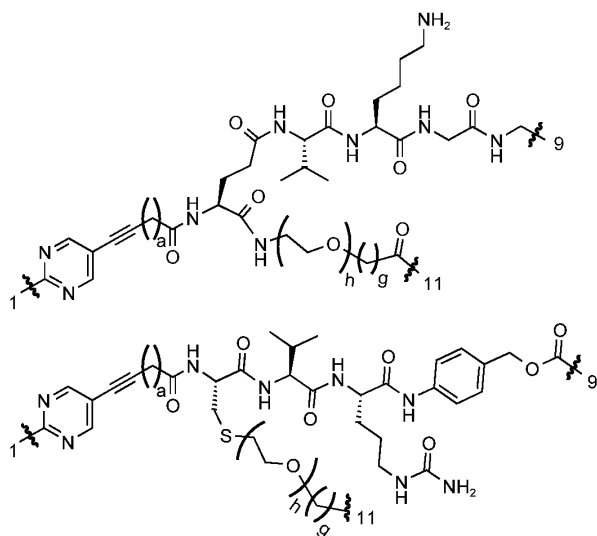
19. 权利要求 1-18 任一项所述的抗体药物偶联物，其中



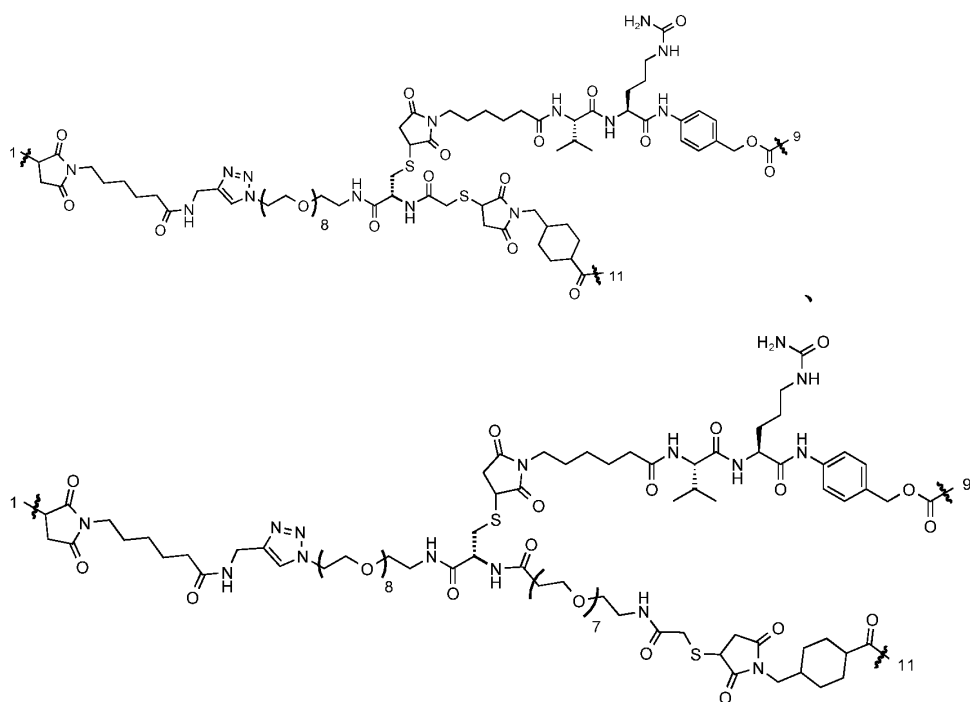
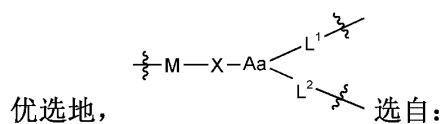


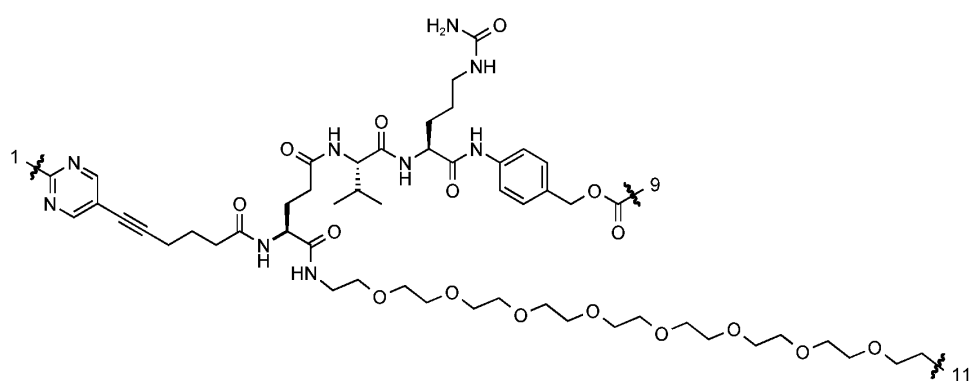
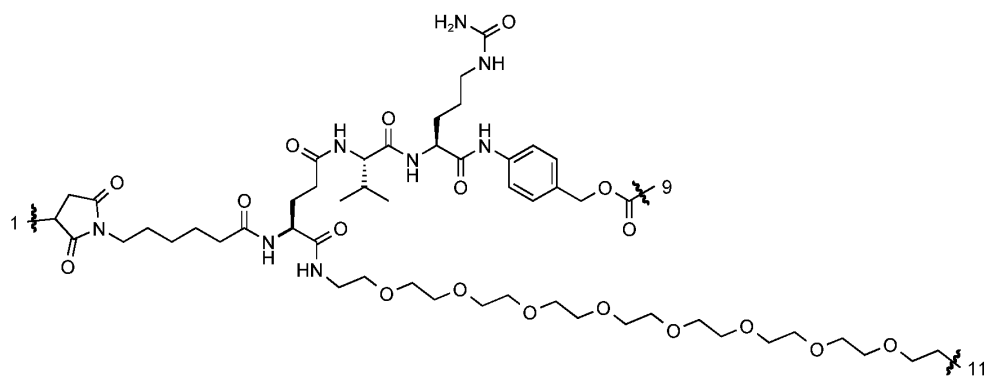
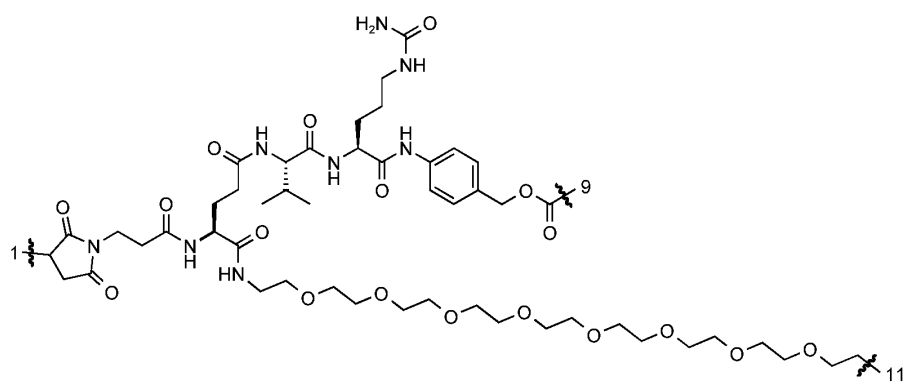
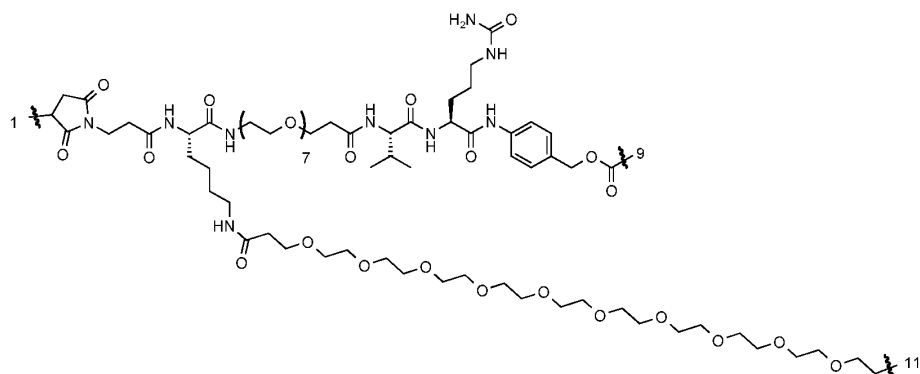


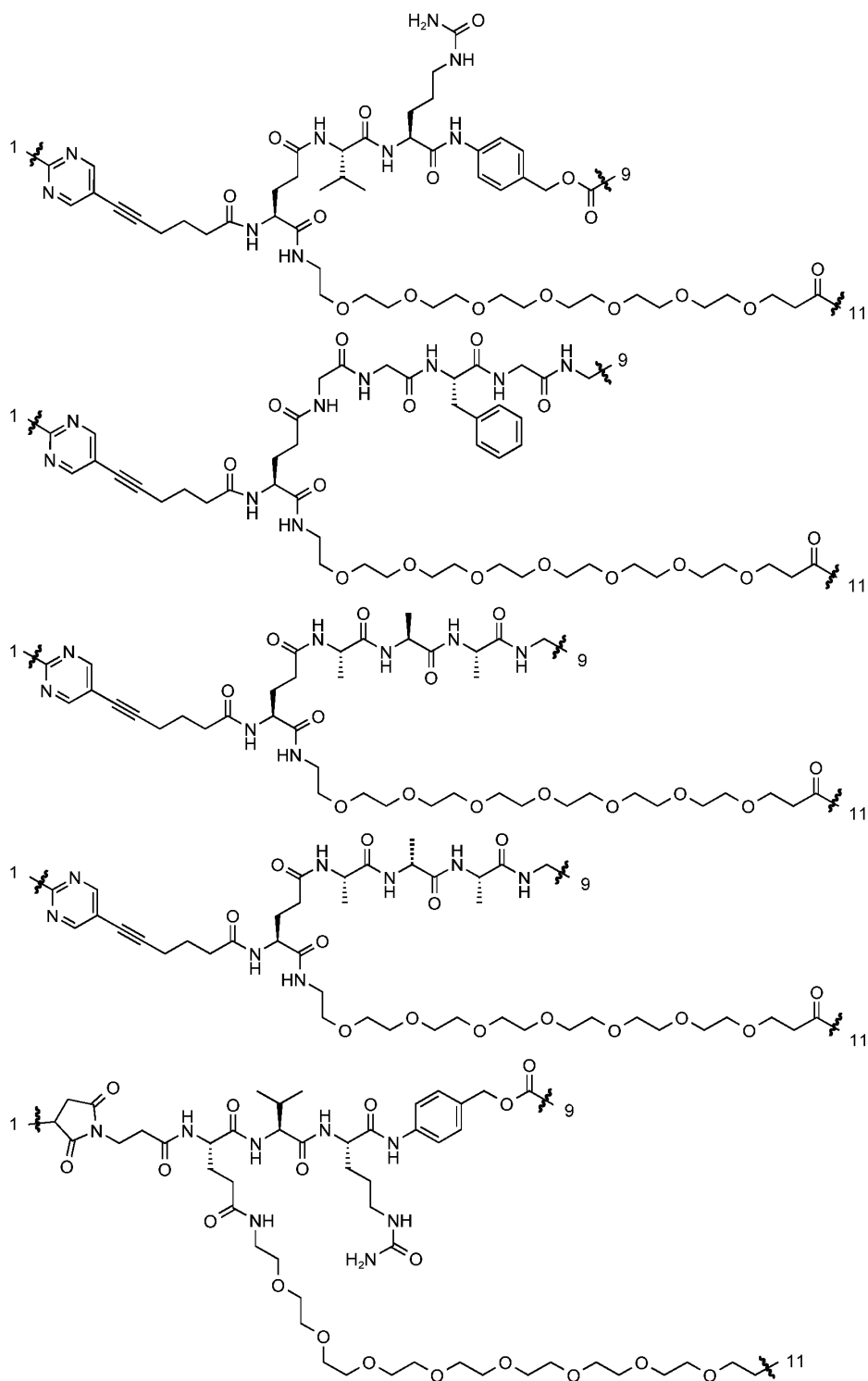


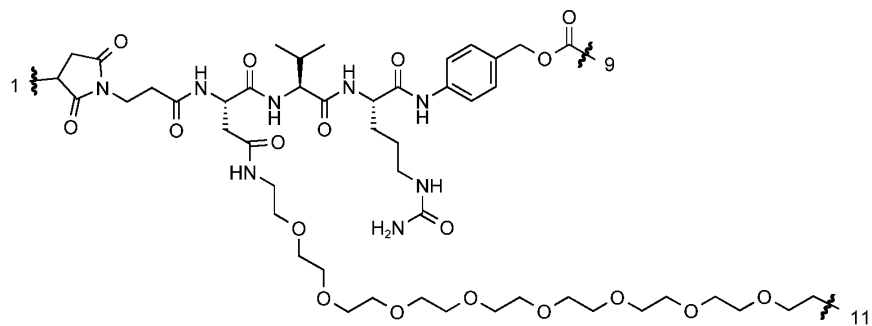
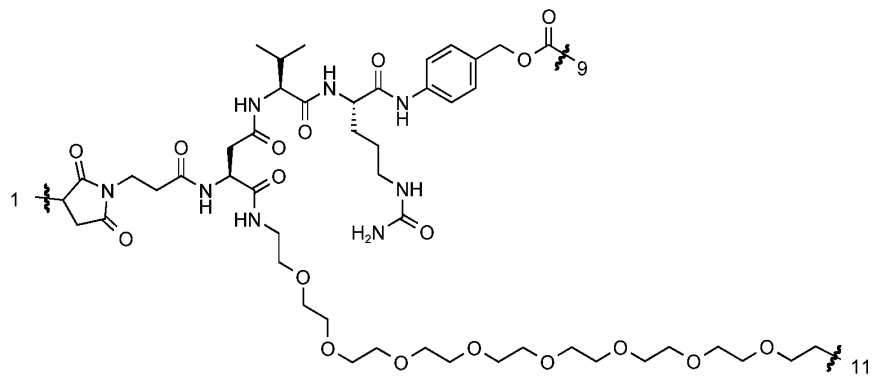
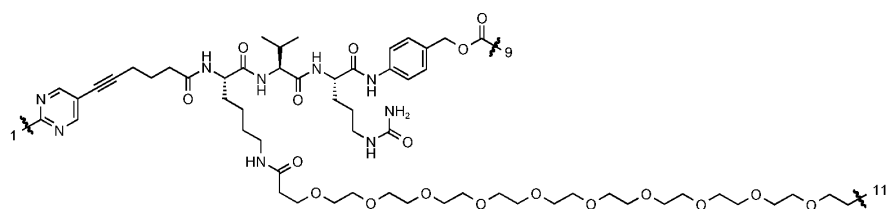
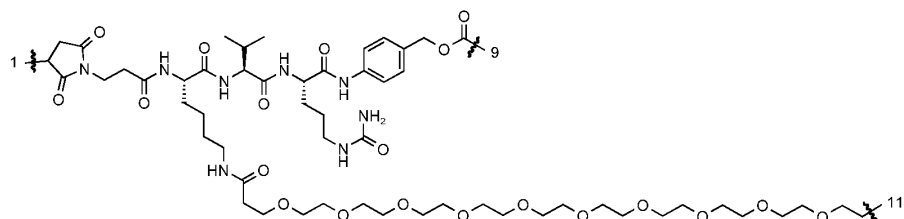
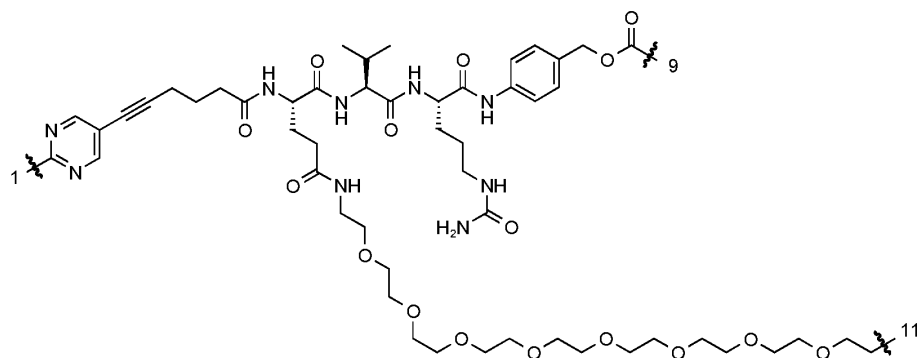


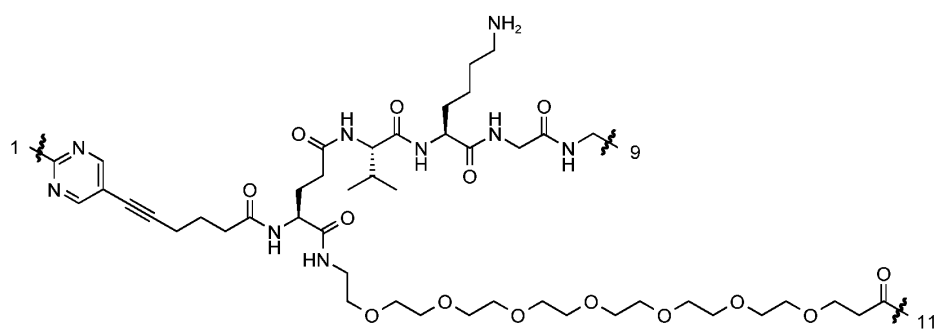
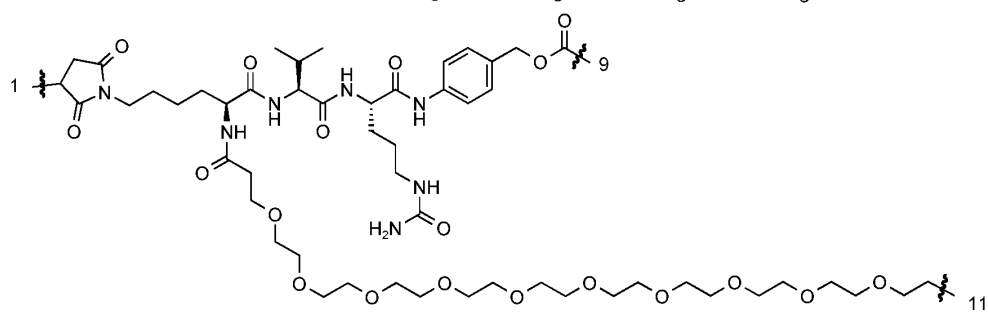
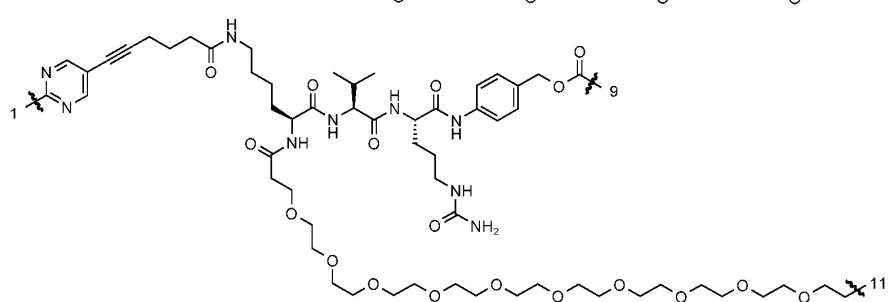
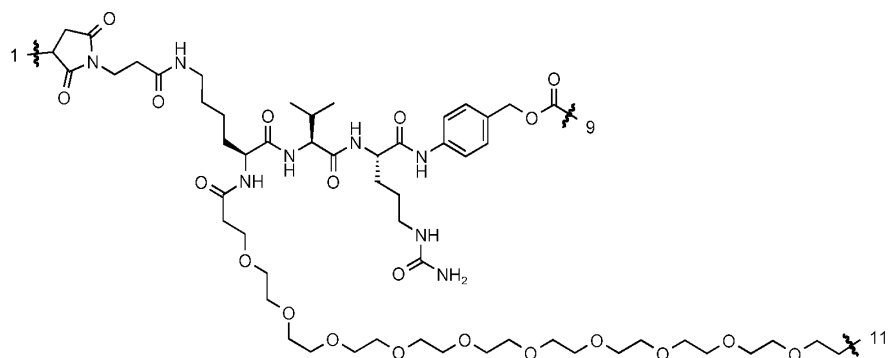
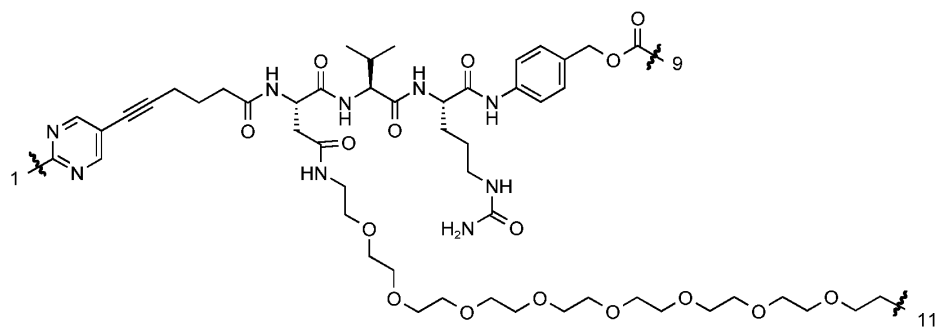
，其中，各 **a** 独立地选自 0-6 的整数，各 **c** 独立地选自 0-6 的整数，各 **d** 独立地选自 1-10 的整数，各 **e** 独立地选自 0-6 的整数，各 **f** 独立地选自 1-10 的整数，各 **g** 独立地选自 0-6 的整数，各 **h** 独立地选自 1-10 的整数；

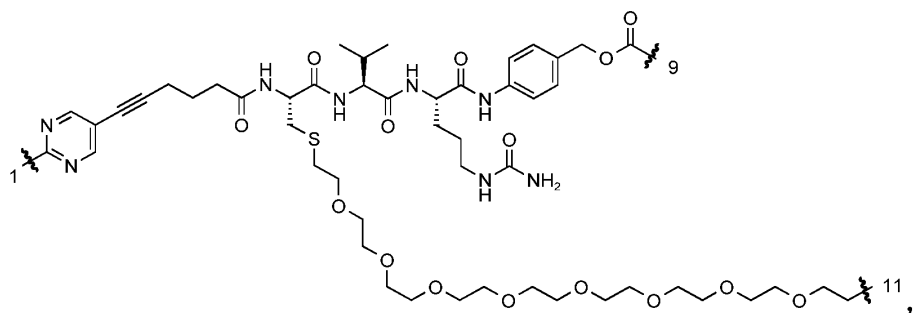






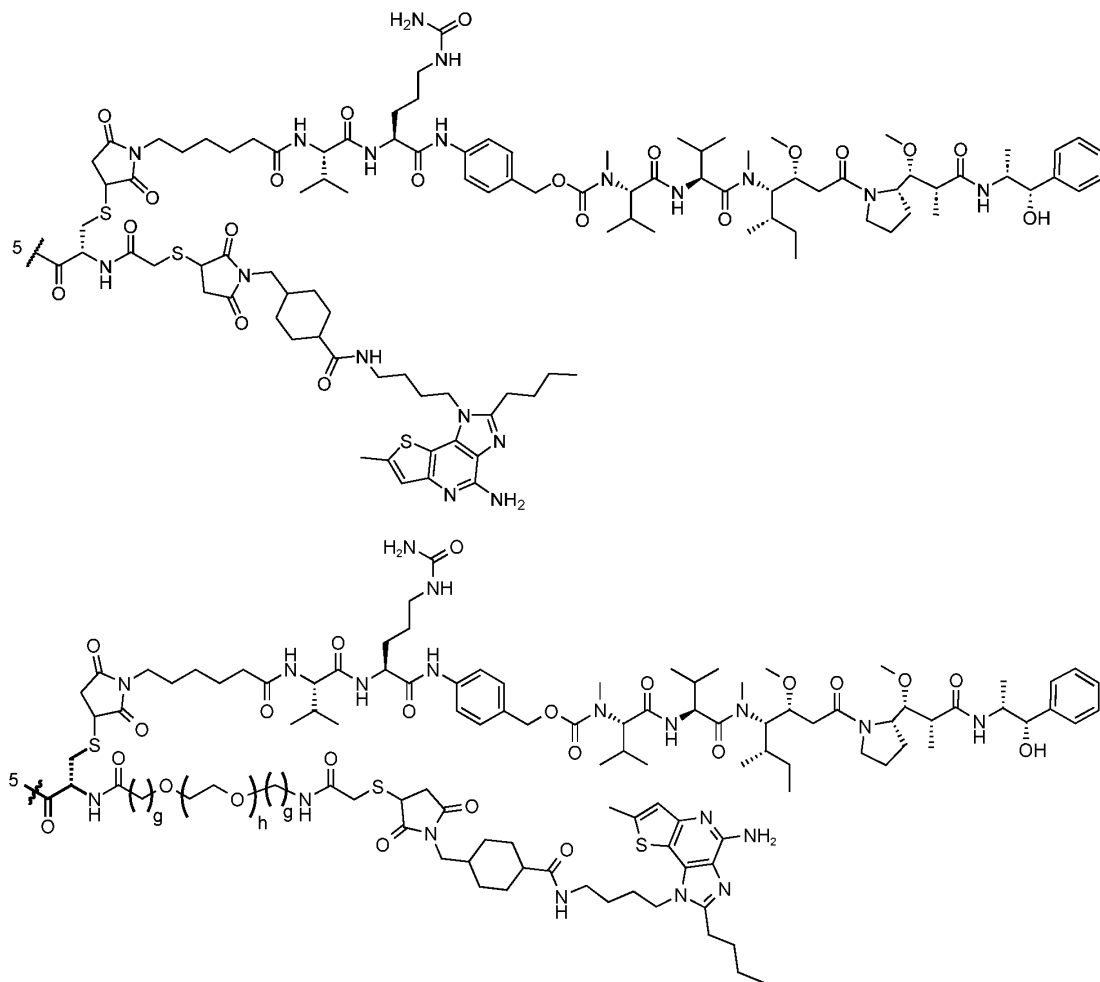
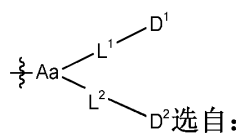


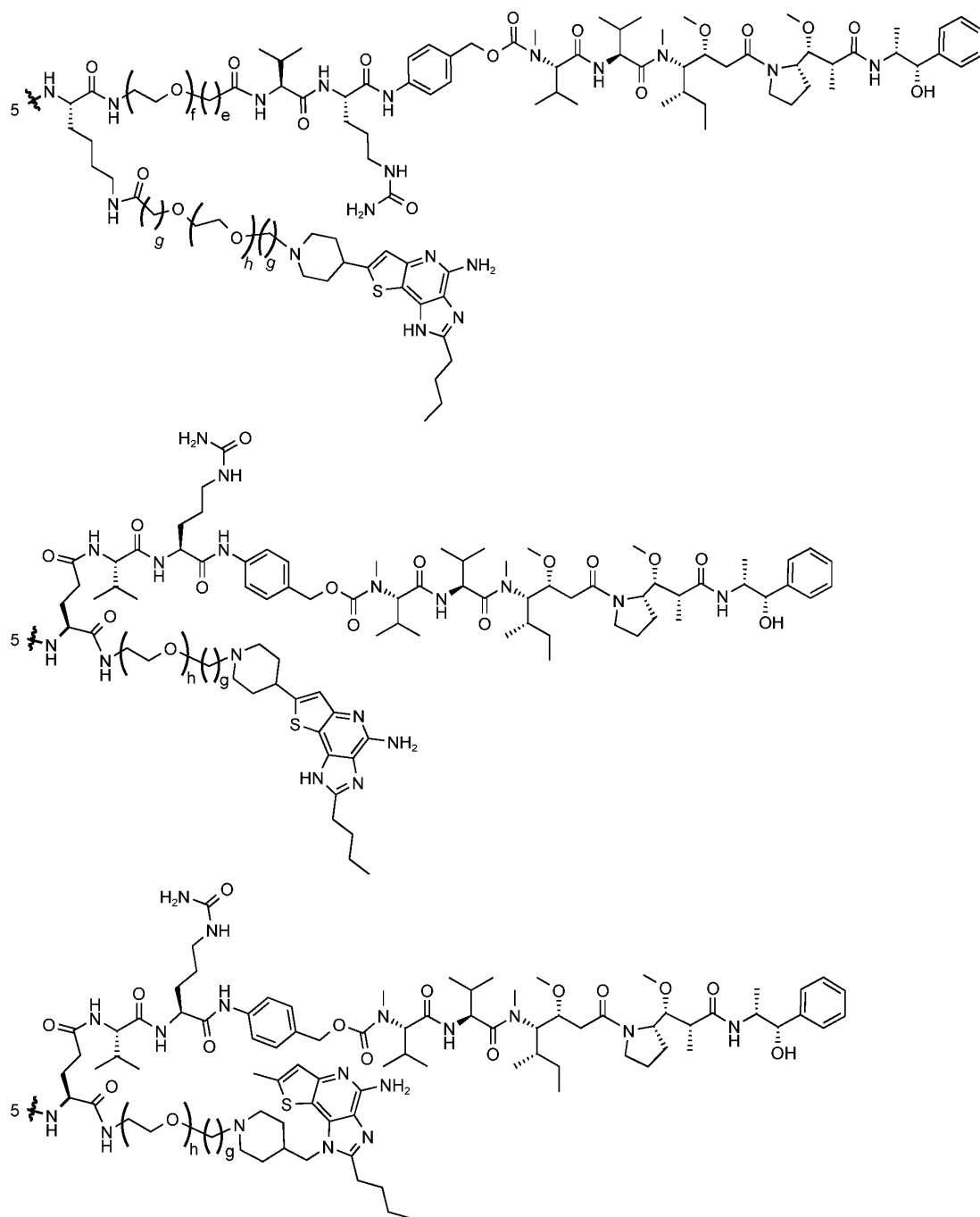


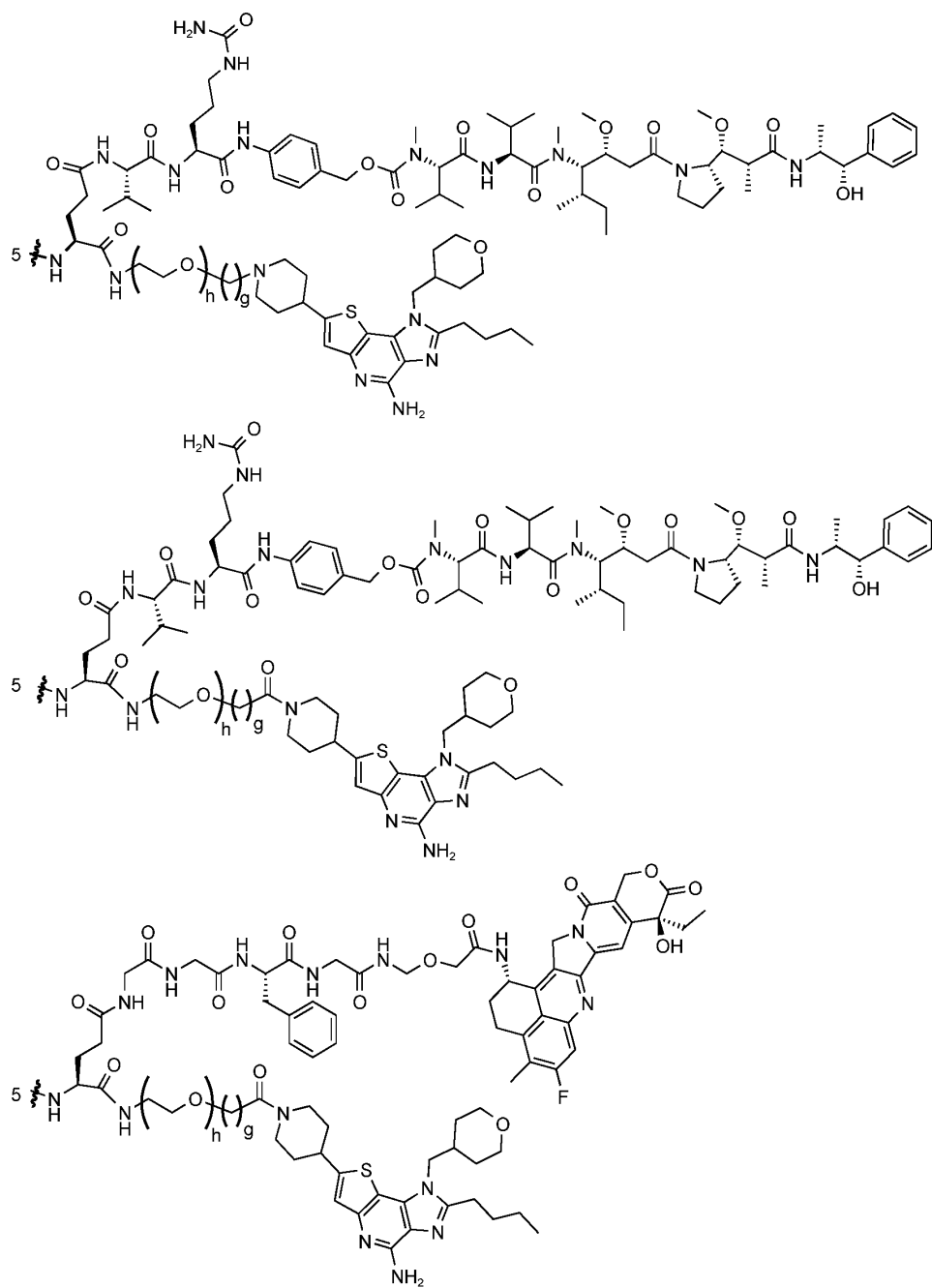


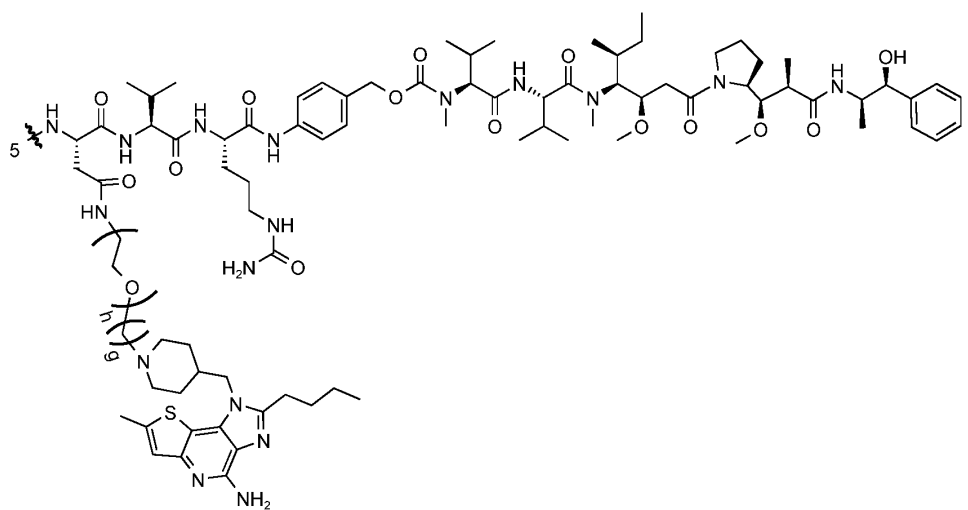
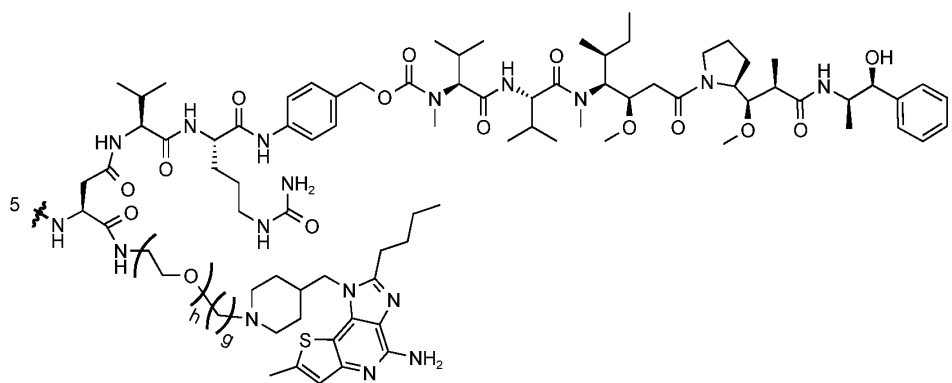
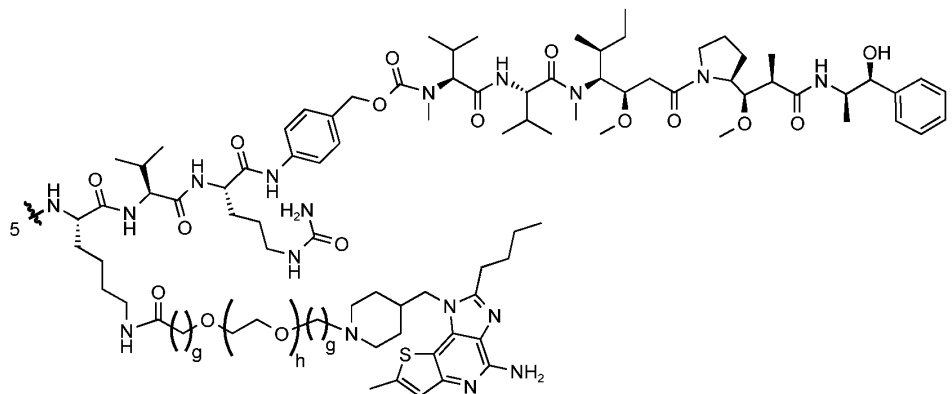
其中，1 位置与 Ab' 相连，9 位置与 D¹ 相连，11 位置与 D² 相连。

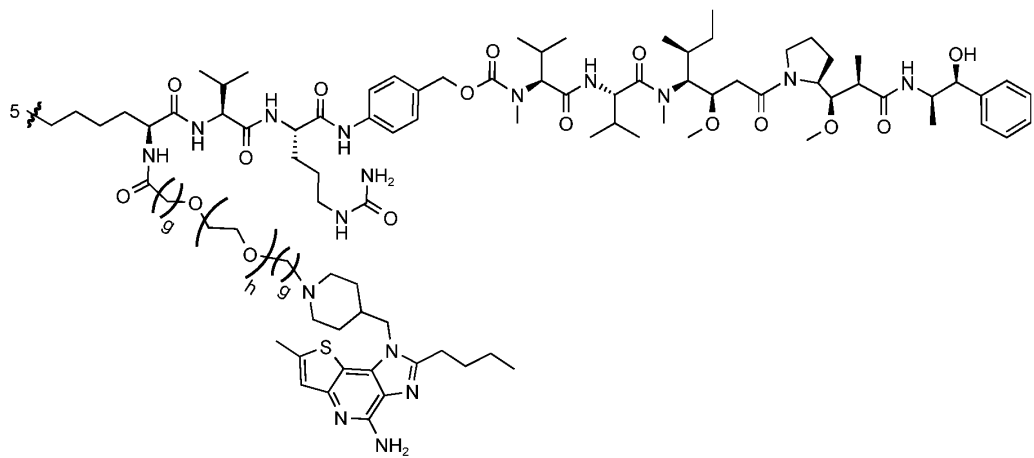
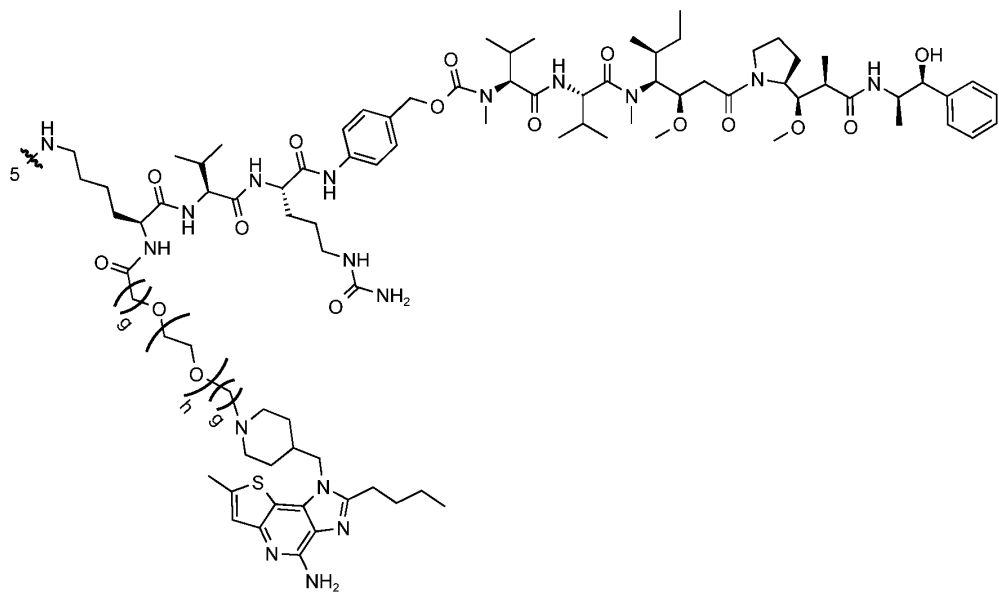
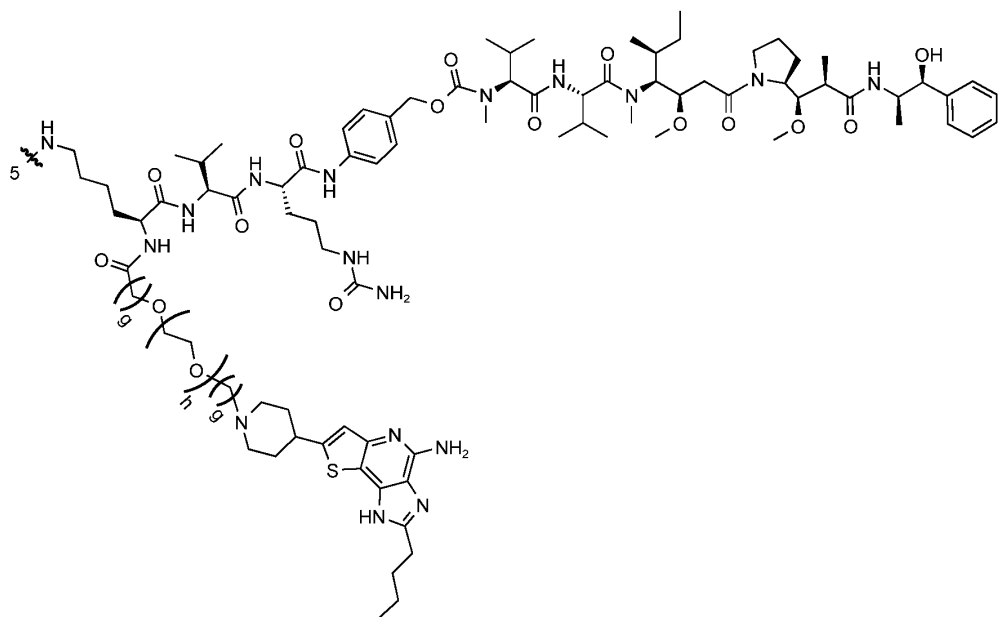
20. 权利要求 1-19 任一项所述的抗体药物偶联物，其中

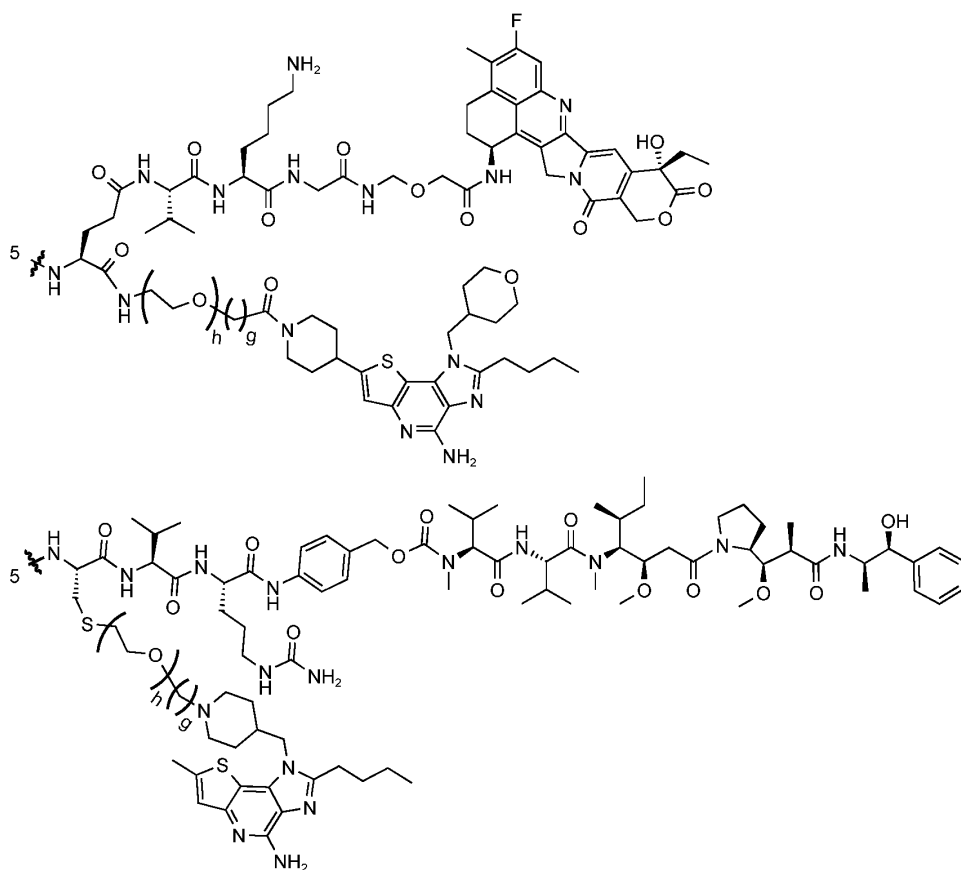






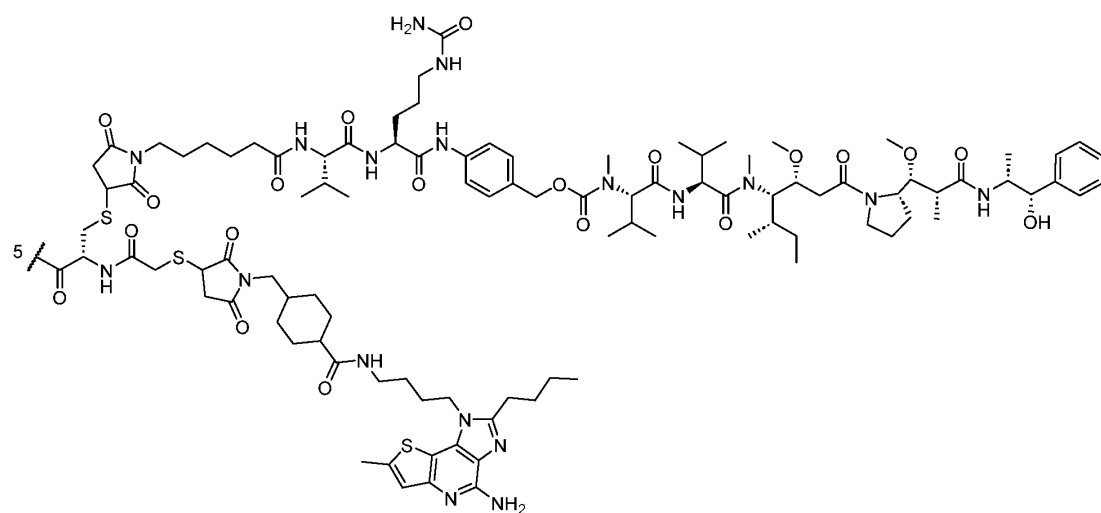


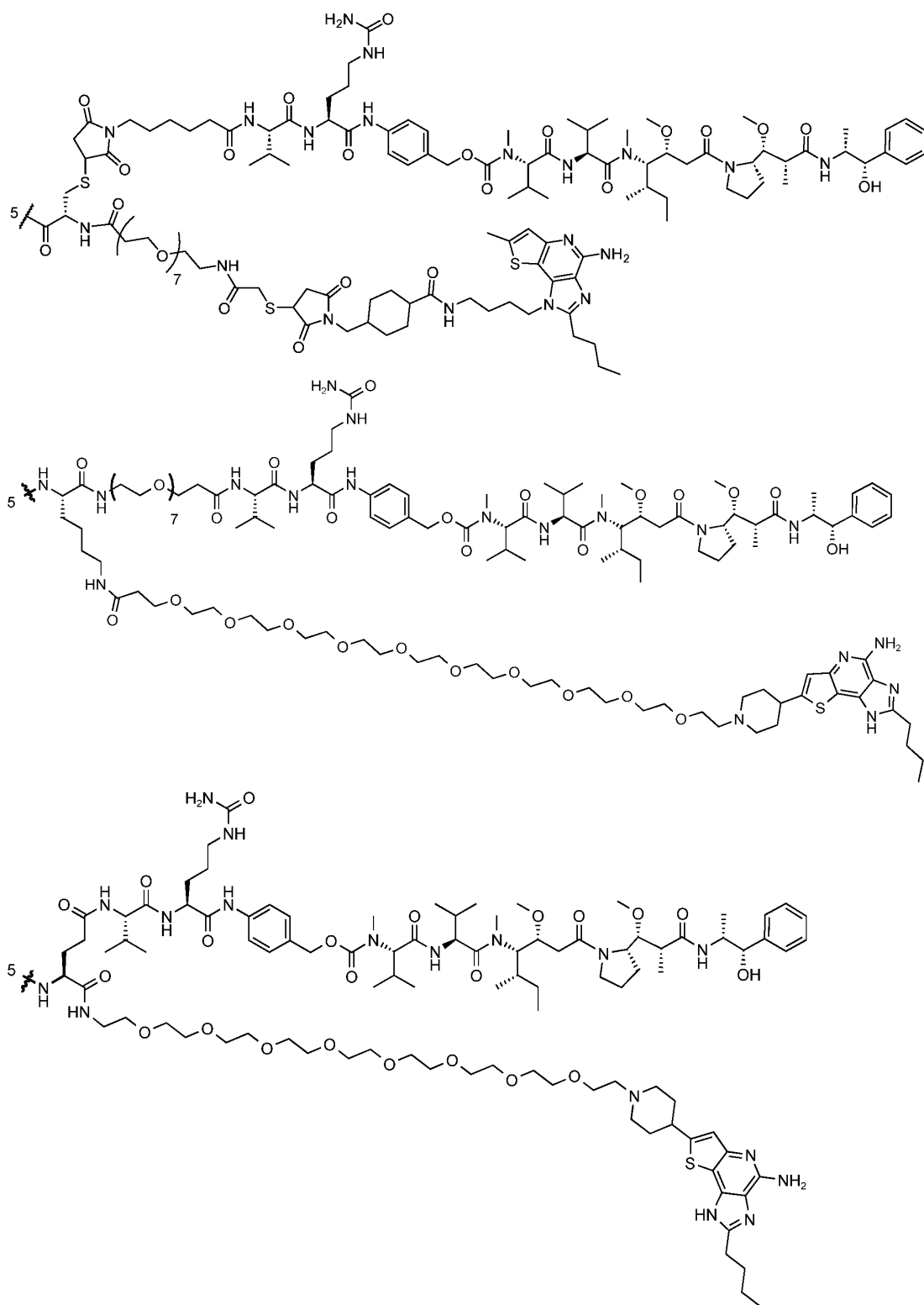


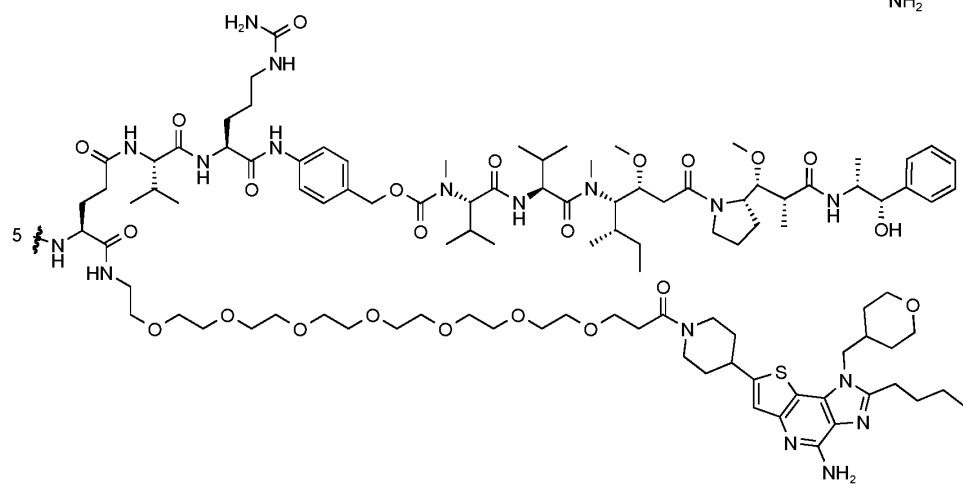


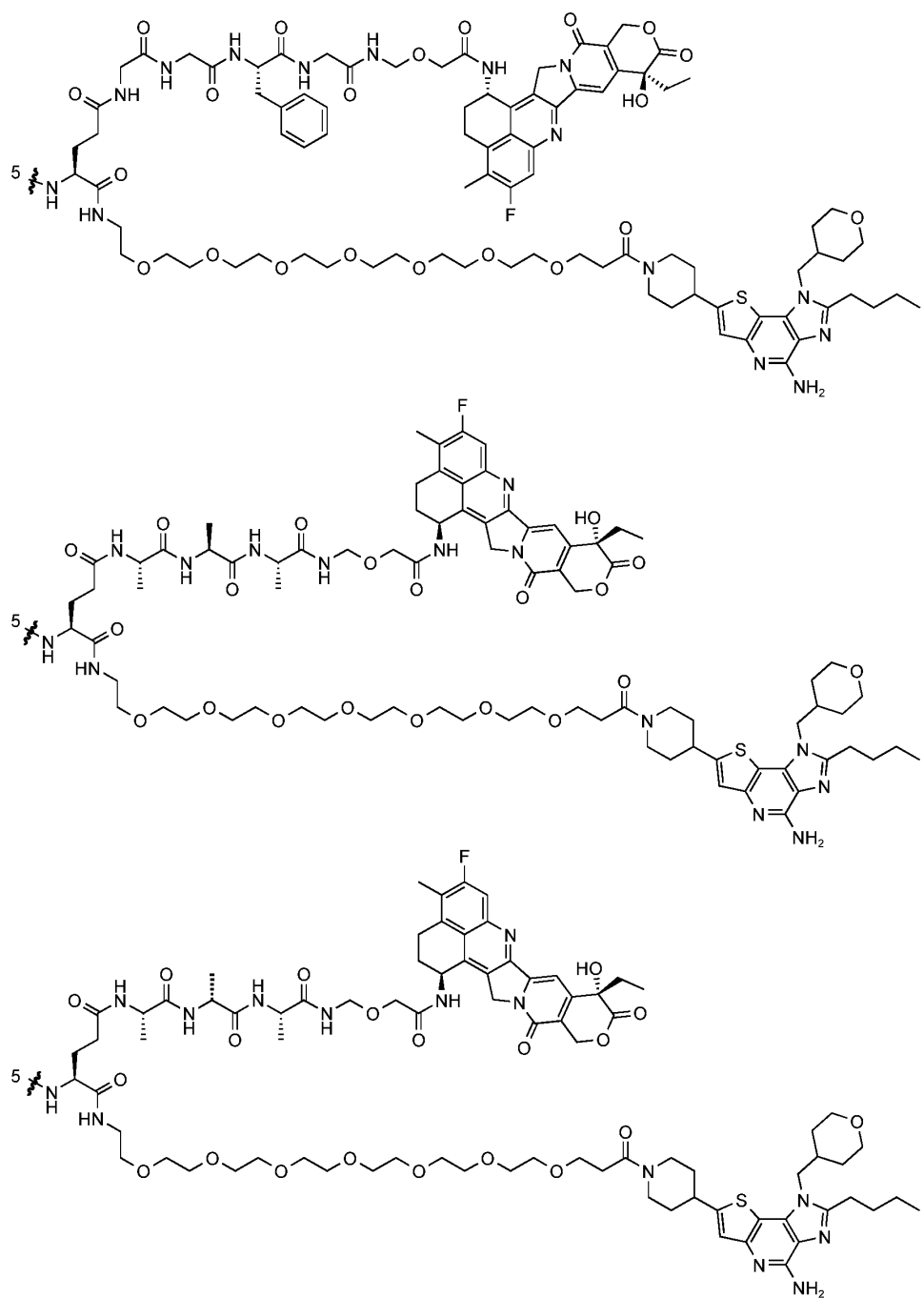
其中，各 g 独立地选自 0-6 的整数，各 h 独立地选自 1-10 的整数；

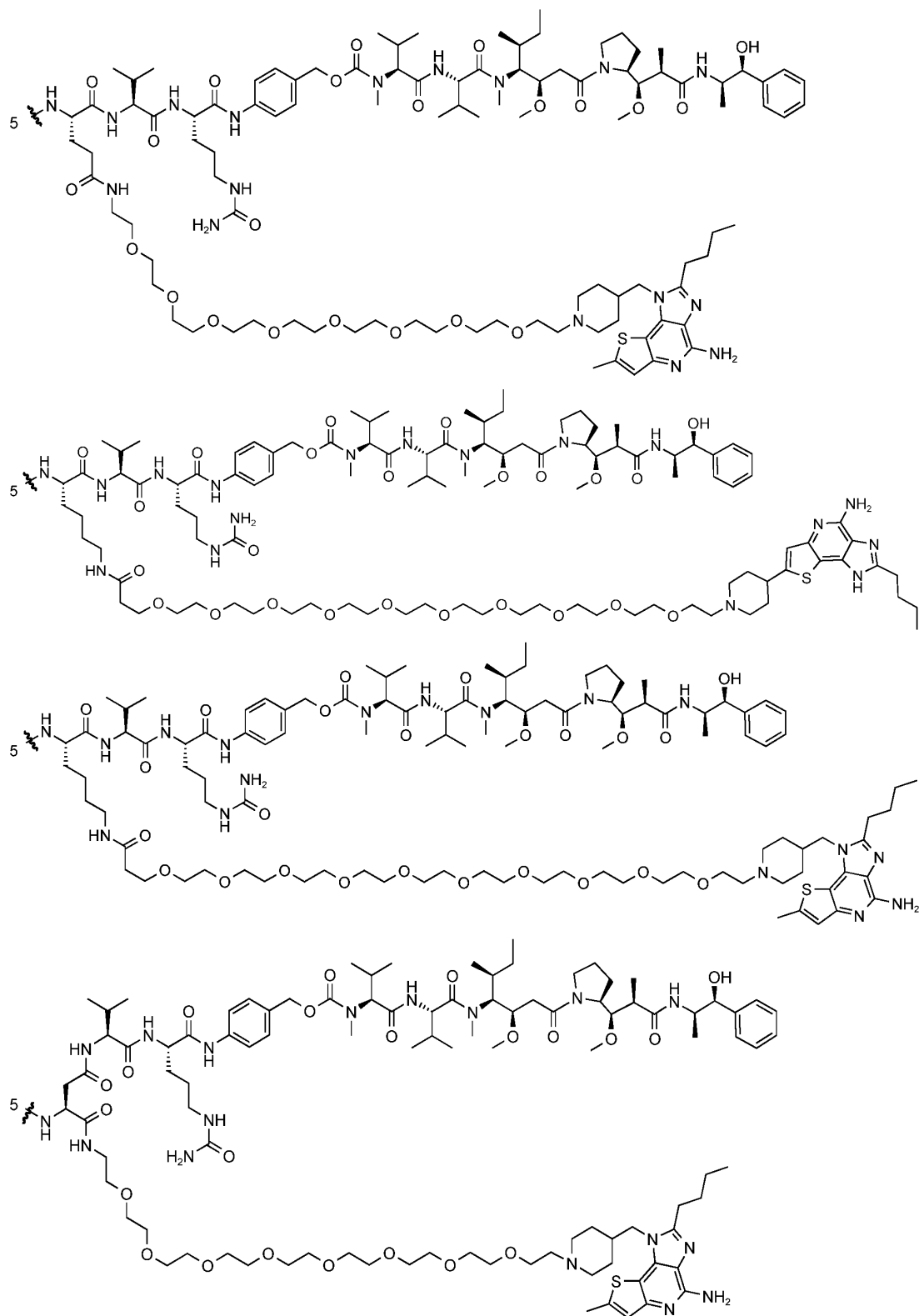
优选地， $\sum Aa$ $\begin{matrix} L^1 \\ L^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} D^1 \\ D^2 \end{matrix}$ 选自：

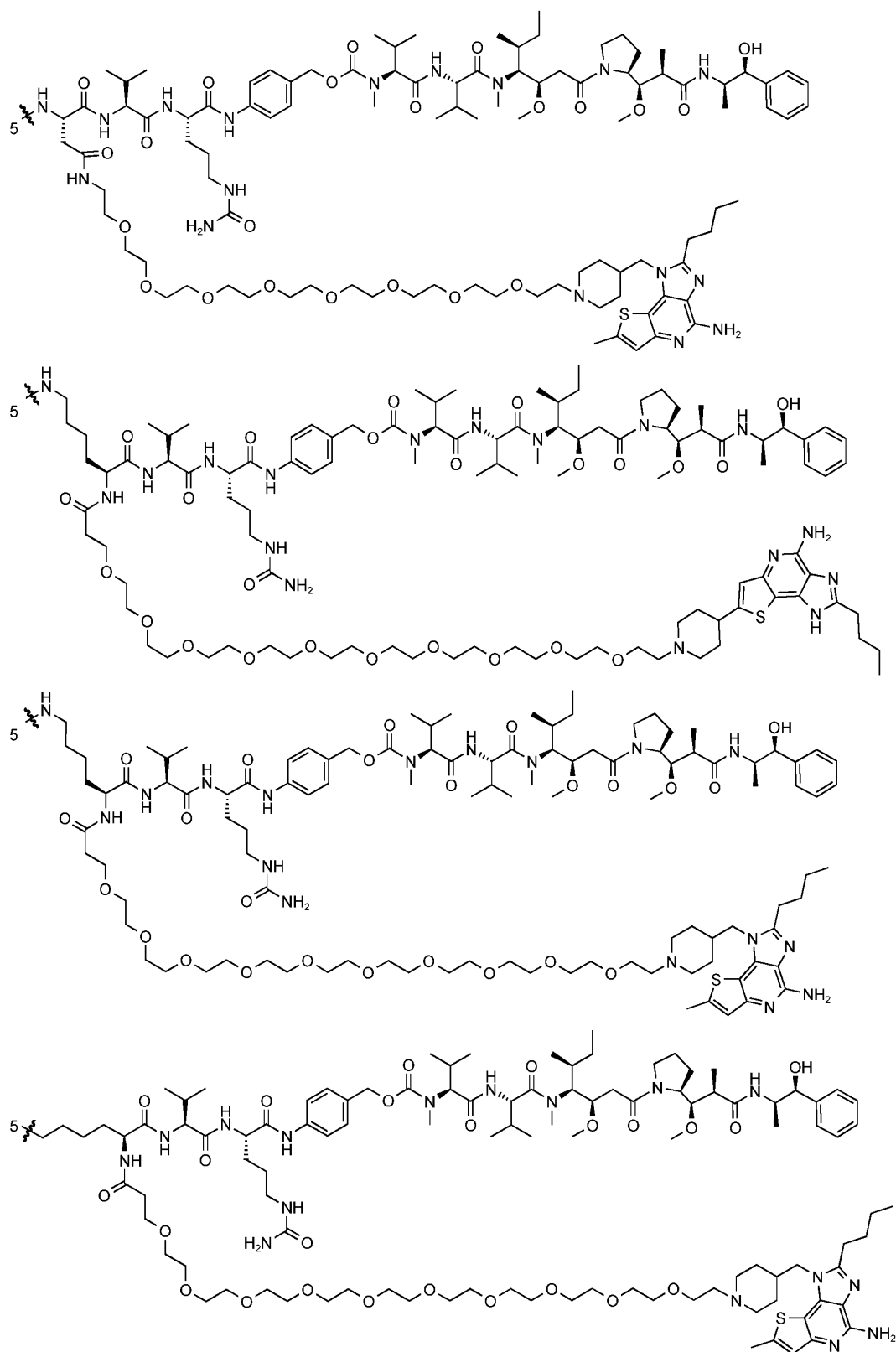


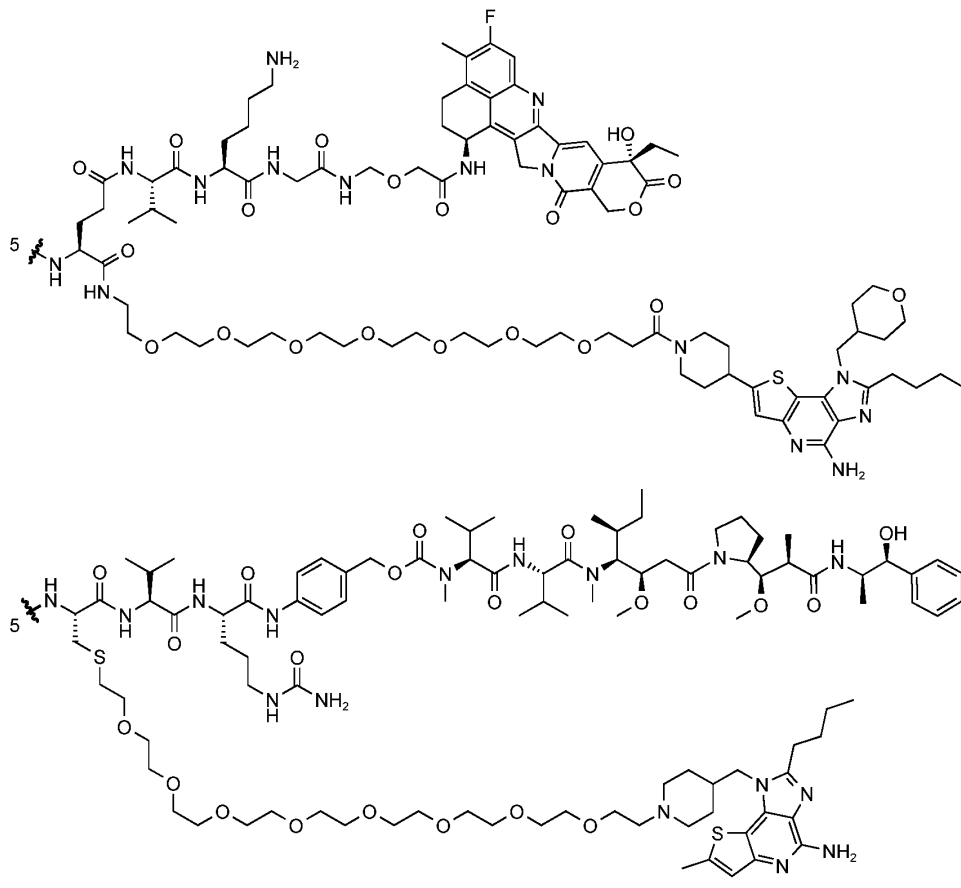






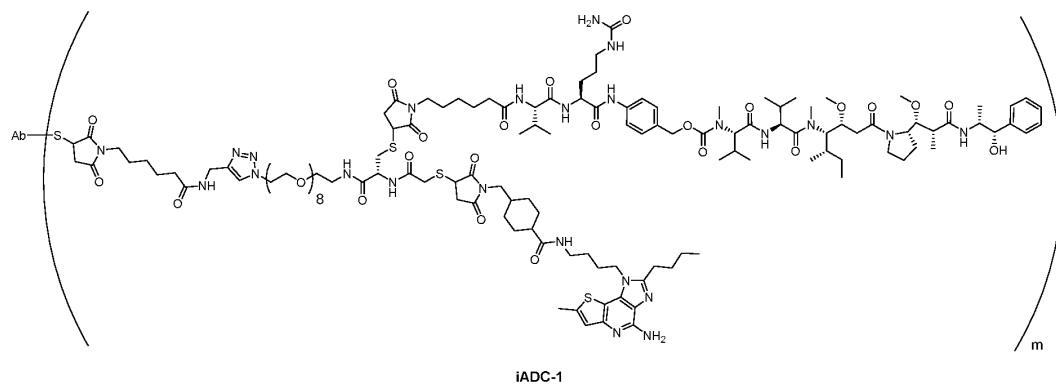


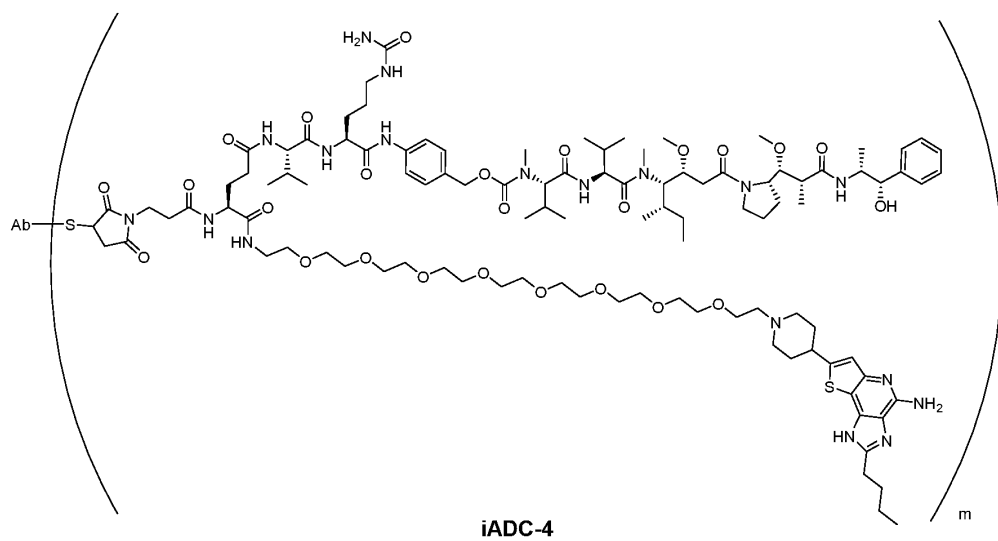
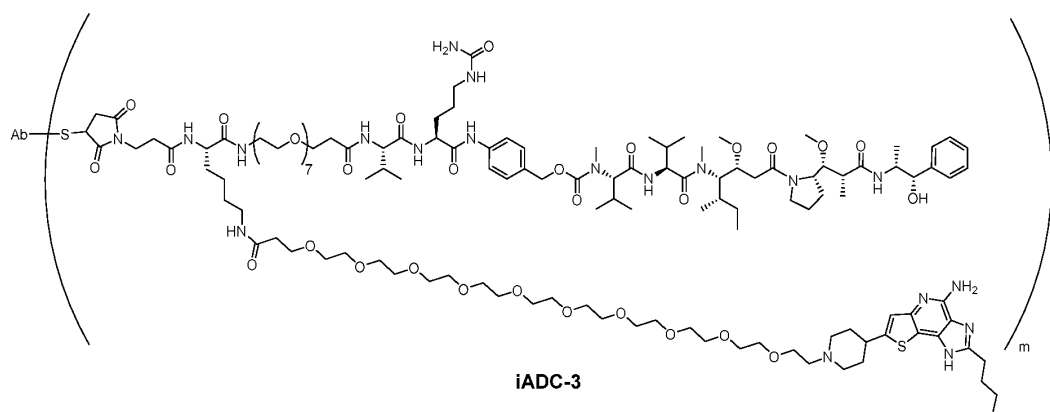
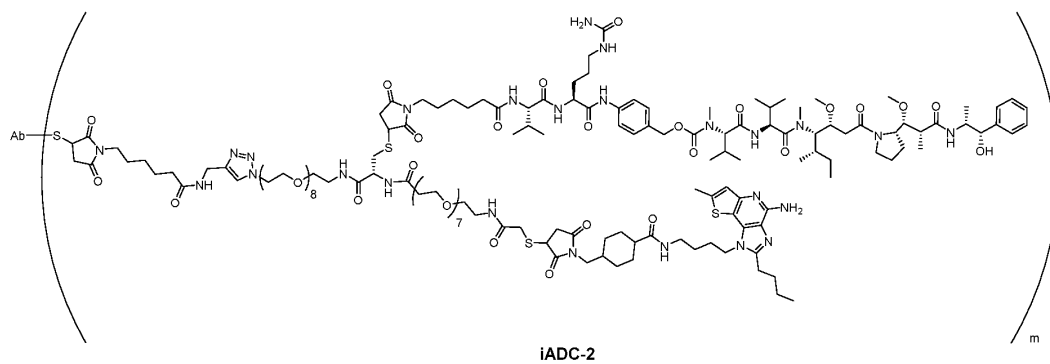


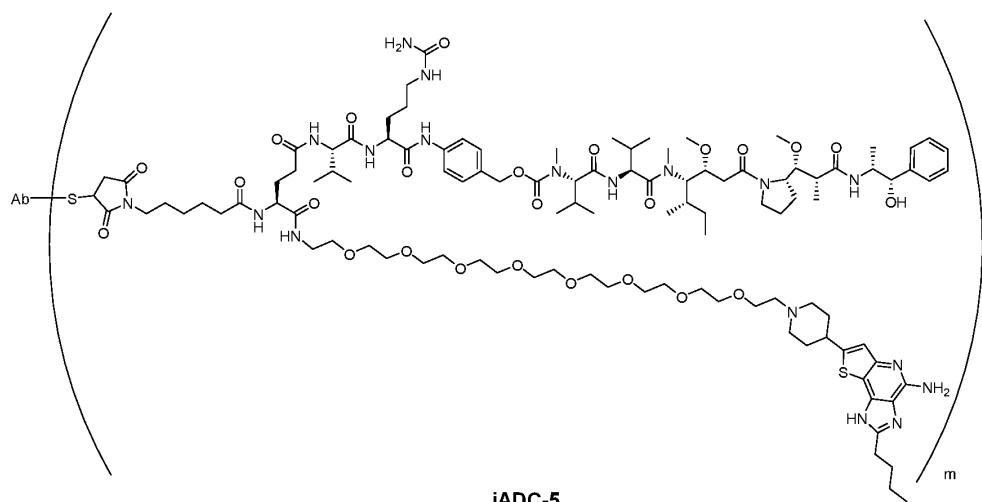


其中 5 位置与 X 相连。

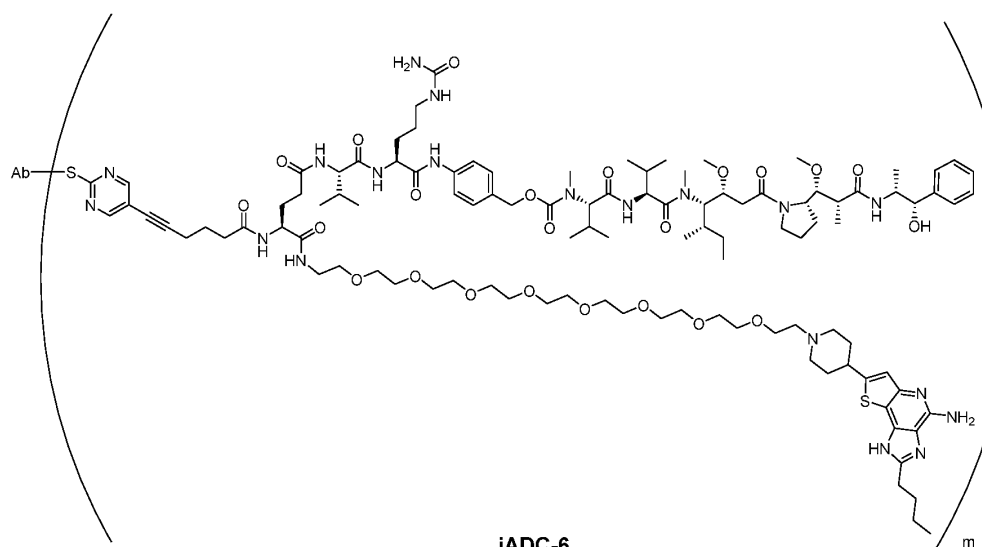
21. 权利要求 1-20 任一项所述的抗体药物偶联物，其具有选自以下的结构：



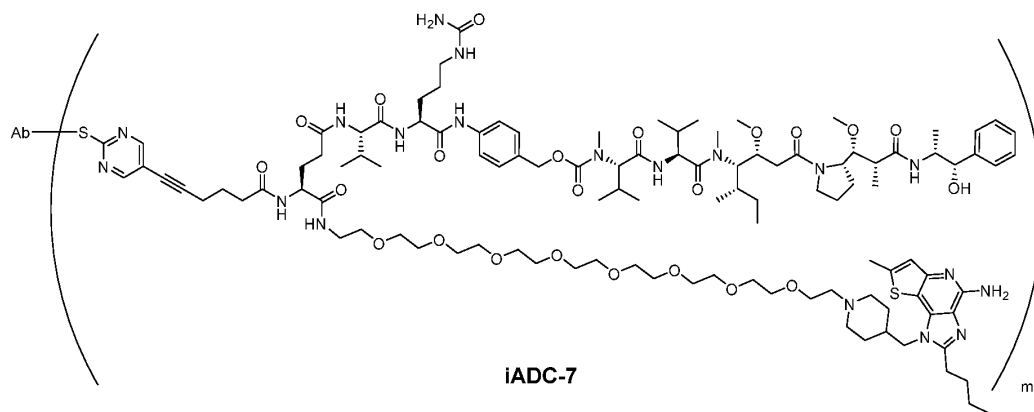




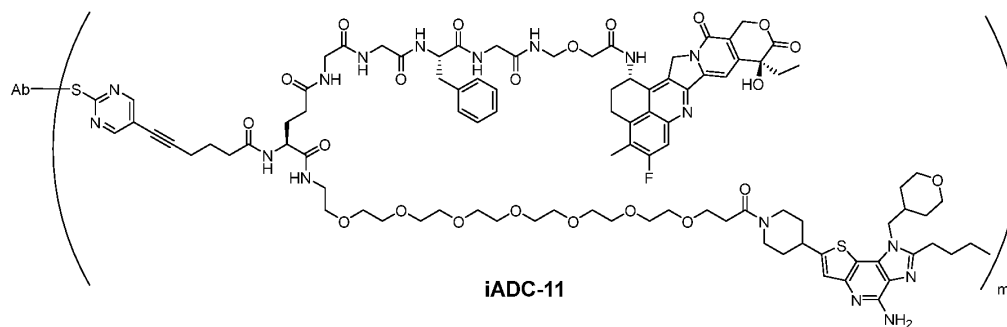
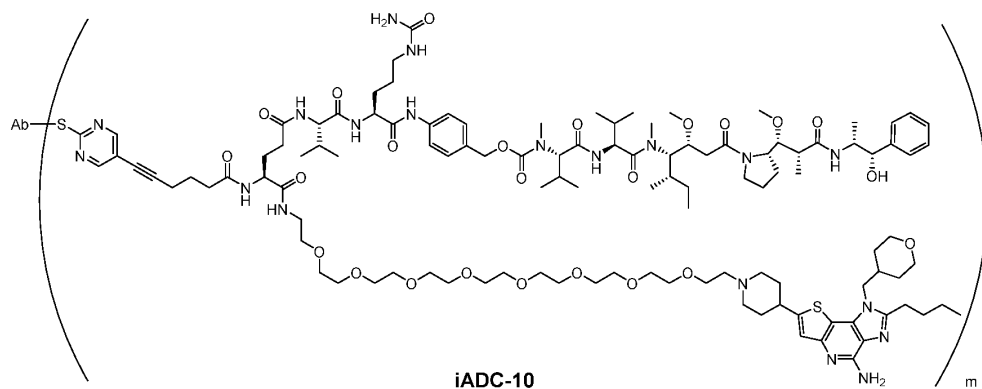
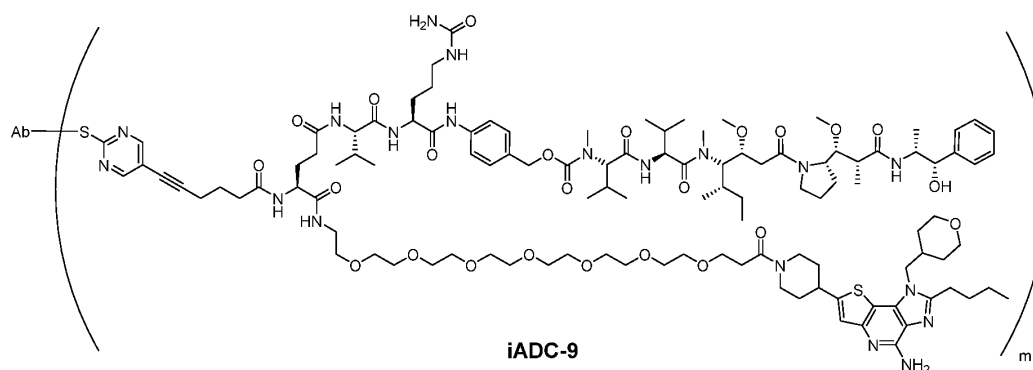
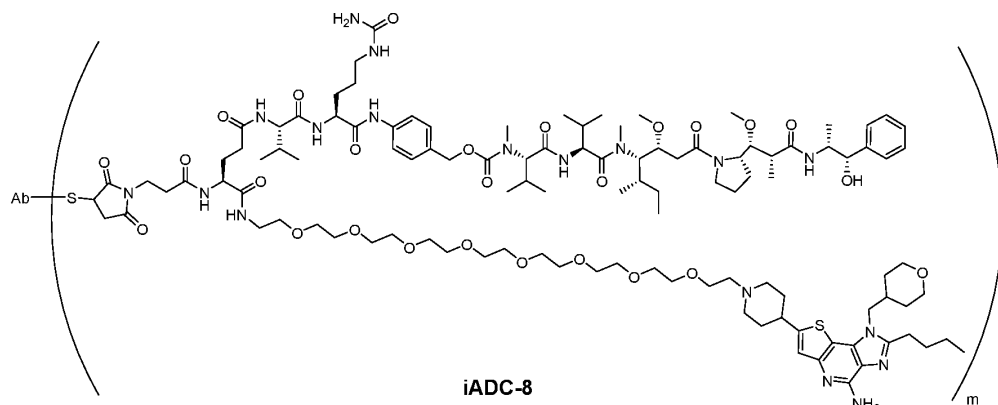
iADC-5

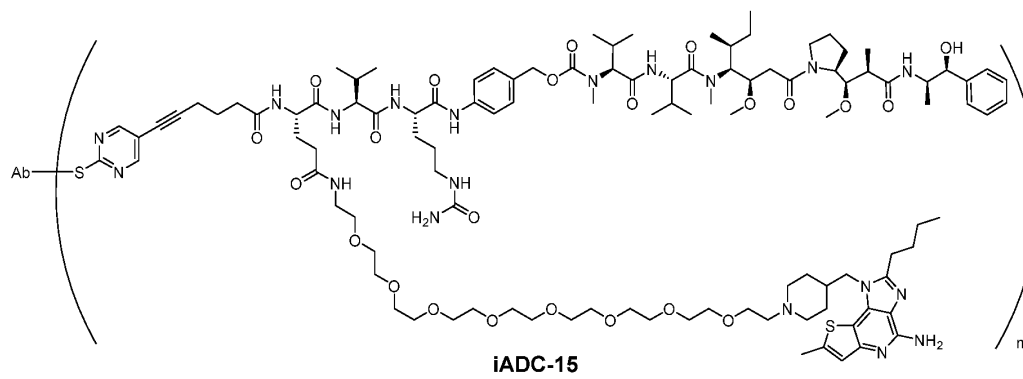
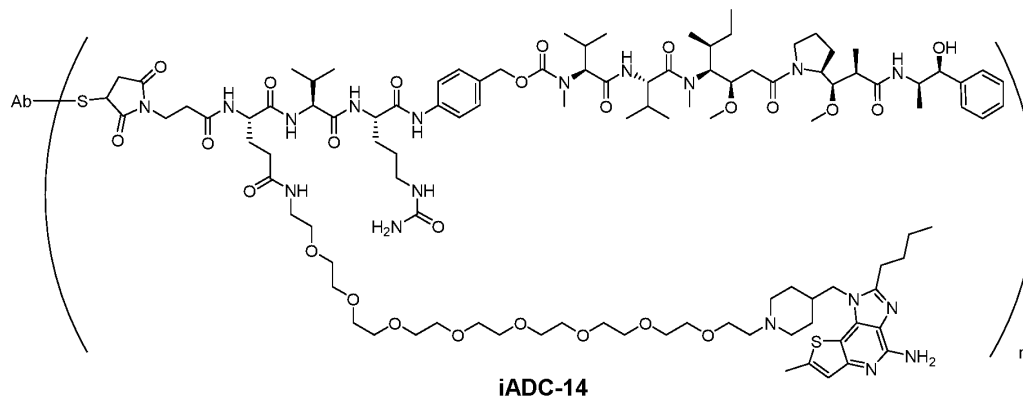
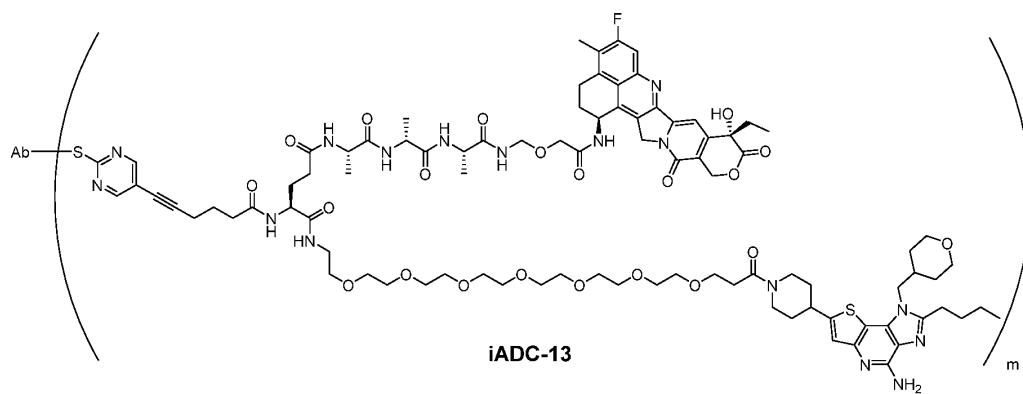
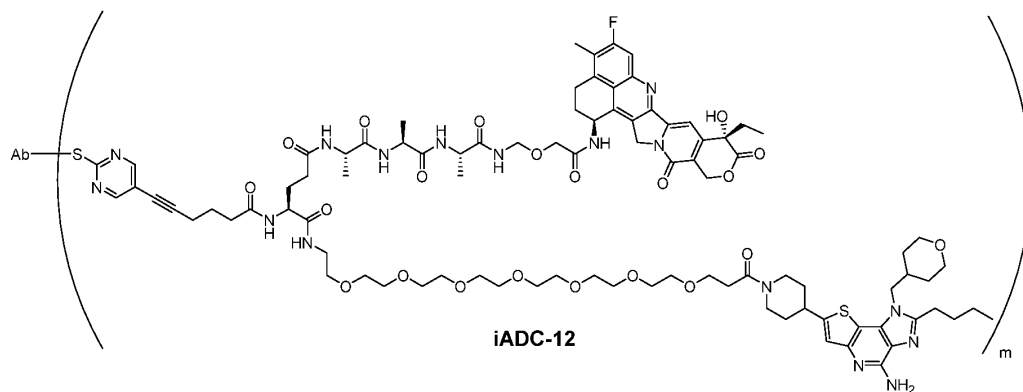


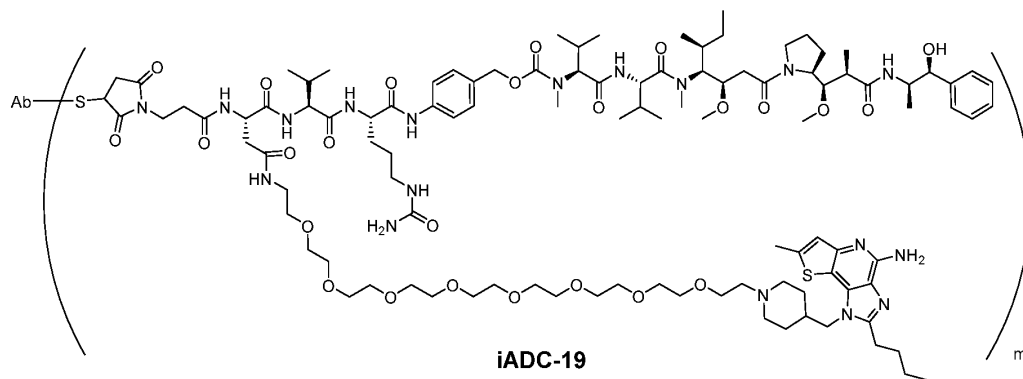
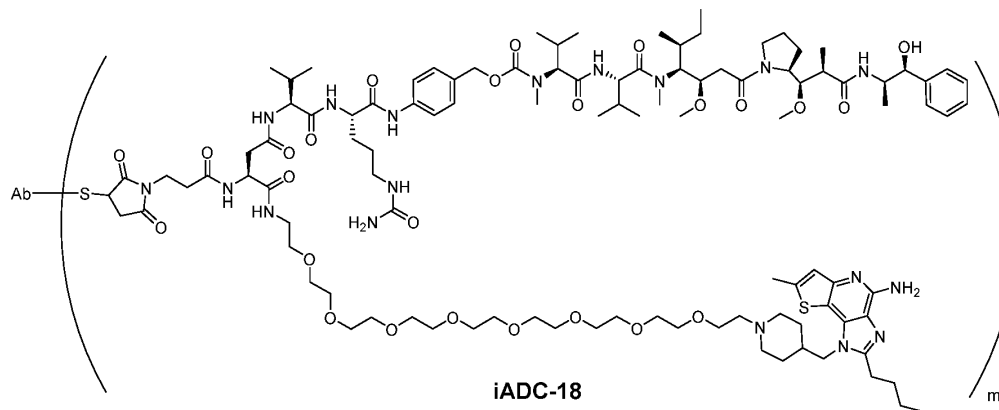
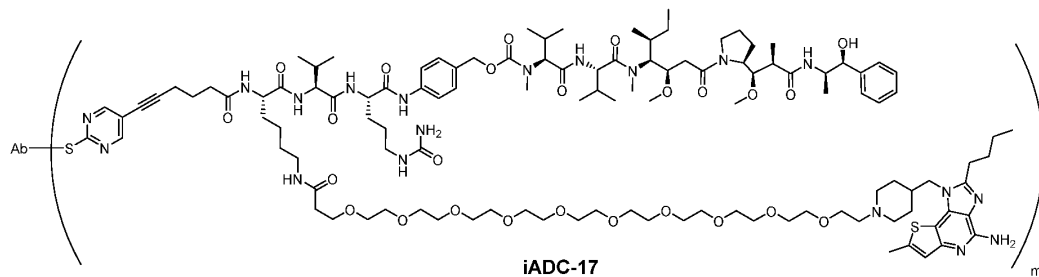
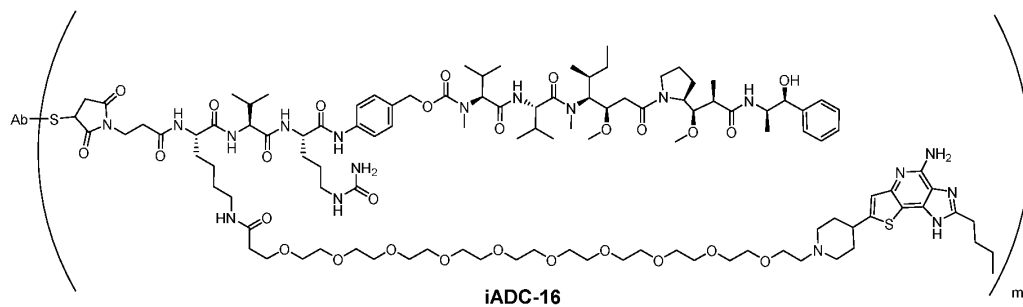
iADC-6

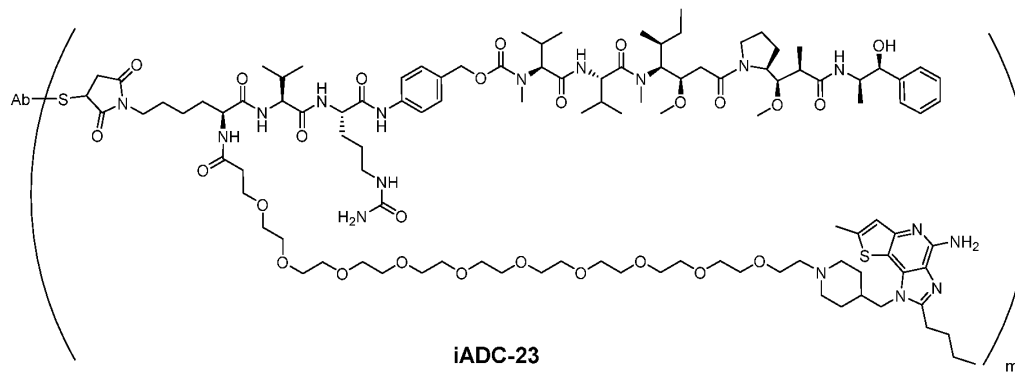
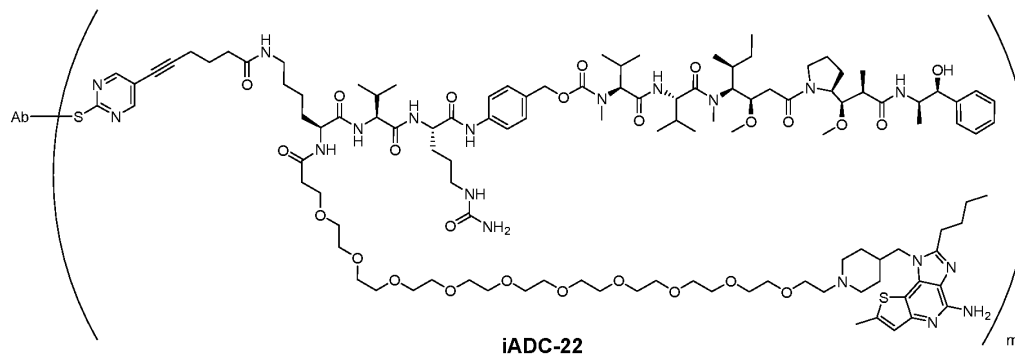
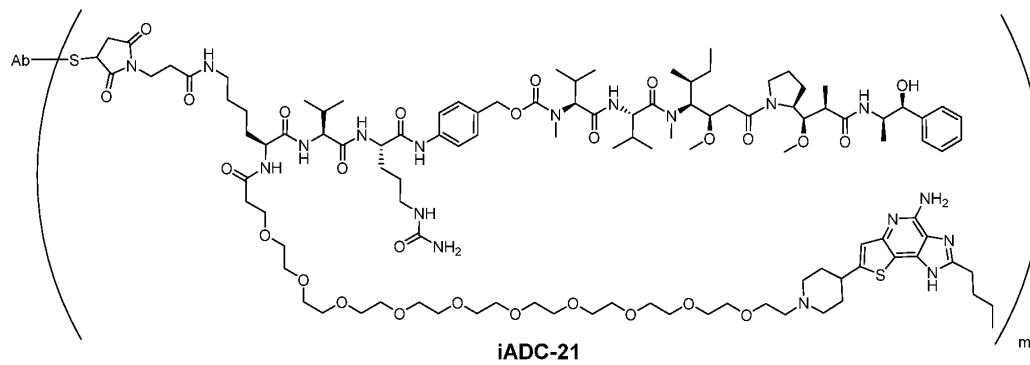
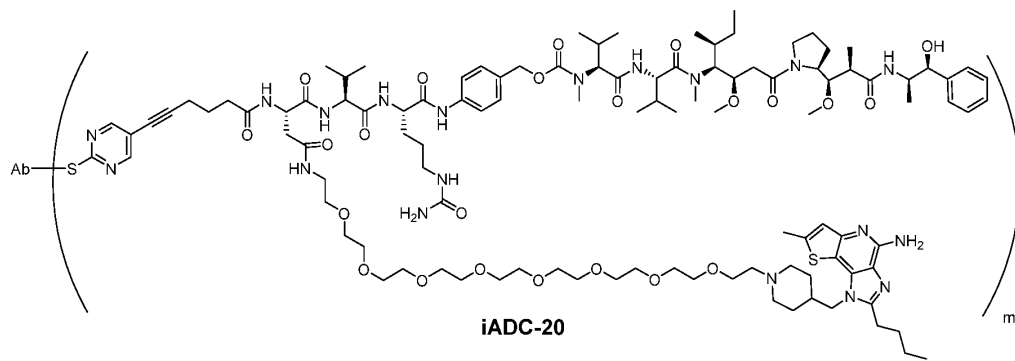


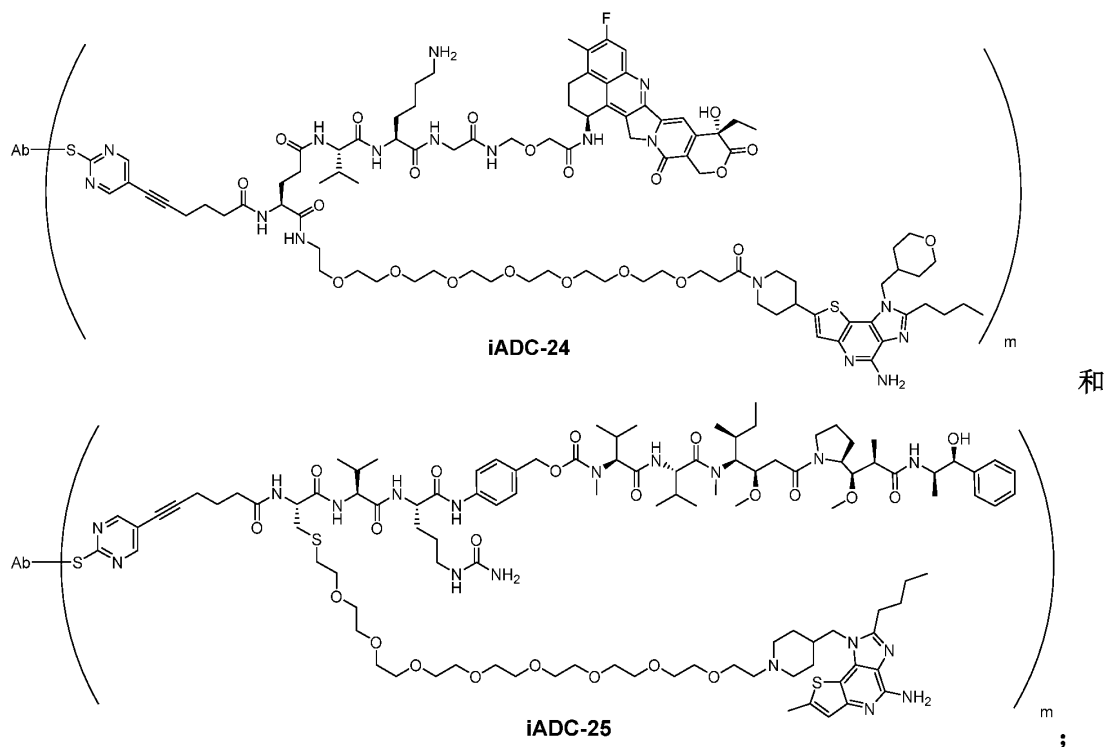
iADC-7











各 m 独立地选自 1-10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10; Ab-(S-为如权利要求 1-20 任一项所定义的抗体或其抗原结合片段;

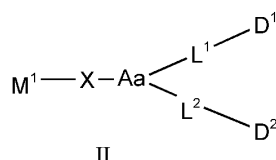
优选地, 各抗体药物偶联物中的 Ab-(S-代表包含如 SEQ ID NO:23 所示的 VH 或 SEQ ID NO:1 所示的 VH 和如 SEQ ID NO:2 所示的 VL 的抗体或其抗原结合片段, 例如为 Ab-01 (其包含: SEQ ID NO:22 所示的重链, 和 SEQ ID NO:21 所示的轻链), 例如为 Ab-02 (其包含: SEQ ID NO:20 所示的重链, 和 SEQ ID NO:21 所示的轻链); 可选地, 所述重链或重链可变区和/或轻链或轻链可变区的 N 端谷氨酰胺经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐, 和/或, 所述重链或重链恒定区 (CH) 或其变体不存在 C-末端赖氨酸。

22. 一种组合物, 其包括如权利要求 1-21 任一项所述的抗体药物偶联物, 其中所述组合物的 DAR 值为 1.0~10.0, 优选为 1.0~5.0, 例如, 1.0~1.5, 1.0~2.0, 1.0~2.5, 1.0~3.0, 1.0~3.5, 1.0~4.0, 1.0~4.5, 1.0~5.0, 2.0~2.5, 2.0~3.0, 2.0~3.5, 2.0~4.0, 2.0~4.5, 2.0~5.0, 2.5~3.0, 2.5~3.5, 2.5~4.0, 2.5~4.5, 2.5~5.0, 3.0~3.5, 3.0~4.0, 3.0~4.5, 3.0~5.0, 3.5~4.0, 3.5~4.5, 3.5~5.0, 4.0~4.5, 4.0~5.0, 4.5~5.0, 例如约 1.0、约 1.01、约 1.02、约 1.03、约 1.04、约 1.05、约 1.06、约 1.07、约 1.08、约 1.09、约 1.1、约 1.11、约 1.12、约 1.13、约 1.14、约 1.15、约 1.16、约 1.17、约 1.18、约 1.19、约 1.2、约 1.21、约 1.22、

约 1.23、约 1.24、约 1.25、约 1.26、约 1.27、约 1.28、约 1.29、约 1.3、约 1.31、约 1.32、约 1.33、约 1.34、约 1.35、约 1.36、约 1.37、约 1.38、约 1.39、约 1.4、约 1.41、约 1.42、约 1.43、约 1.44、约 1.45、约 1.46、约 1.47、约 1.48、约 1.49、约 1.5、约 1.51、约 1.52、约 1.53、约 1.54、约 1.55、约 1.56、约 1.57、约 1.58、约 1.59、约 1.6、约 1.61、约 1.62、约 1.63、约 1.64、约 1.65、约 1.66、约 1.67、约 1.68、约 1.69、约 1.7、约 1.71、约 1.72、约 1.73、约 1.74、约 1.75、约 1.76、约 1.77、约 1.78、约 1.79、约 1.8、约 1.81、约 1.82、约 1.83、约 1.84、约 1.85、约 1.86、约 1.87、约 1.88、约 1.89、约 1.9、约 1.91、约 1.92、约 1.93、约 1.94、约 1.95、约 1.96、约 1.97、约 1.98、约 1.99、约 2.0、约 2.01、约 2.02、约 2.03、约 2.04、约 2.05、约 2.06、约 2.07、约 2.08、约 2.09、约 2.1、约 2.11、约 2.12、约 2.13、约 2.14、约 2.15、约 2.16、约 2.17、约 2.18、约 2.19、约 2.2、约 2.21、约 2.22、约 2.23、约 2.24、约 2.25、约 2.26、约 2.27、约 2.28、约 2.29、约 2.3、约 2.31、约 2.32、约 2.33、约 2.34、约 2.35、约 2.36、约 2.37、约 2.38、约 2.39、约 2.4、约 2.41、约 2.42、约 2.43、约 2.44、约 2.45、约 2.46、约 2.47、约 2.48、约 2.49、约 2.5、约 2.51、约 2.52、约 2.53、约 2.54、约 2.55、约 2.56、约 2.57、约 2.58、约 2.59、约 2.6、约 2.61、约 2.62、约 2.63、约 2.64、约 2.65、约 2.66、约 2.67、约 2.68、约 2.69、约 2.7、约 2.71、约 2.72、约 2.73、约 2.74、约 2.75、约 2.76、约 2.77、约 2.78、约 2.79、约 2.8、约 2.81、约 2.82、约 2.83、约 2.84、约 2.85、约 2.86、约 2.87、约 2.88、约 2.89、约 2.9、约 2.91、约 2.92、约 2.93、约 2.94、约 2.95、约 2.96、约 2.97、约 2.98、约 2.99、约 3.0、约 3.01、约 3.02、约 3.03、约 3.04、约 3.05、约 3.06、约 3.07、约 3.08、约 3.09、约 3.1、约 3.11、约 3.12、约 3.13、约 3.14、约 3.15、约 3.16、约 3.17、约 3.18、约 3.19、约 3.2、约 3.21、约 3.22、约 3.23、约 3.24、约 3.25、约 3.26、约 3.27、约 3.28、约 3.29、约 3.3、约 3.31、约 3.32、约 3.33、约 3.34、约 3.35、约 3.36、约 3.37、约 3.38、约 3.39、约 3.4、约 3.41、约 3.42、约 3.43、约 3.44、约 3.45、约 3.46、约 3.47、约 3.48、约 3.49、约 3.5、约 3.51、约 3.52、约 3.53、约 3.54、约 3.55、约 3.56、约 3.57、约 3.58、约 3.59、约 3.6、约 3.61、约 3.62、约 3.63、约 3.64、约 3.65、约 3.66、约 3.67、约 3.68、约 3.69、约 3.7、约 3.71、约 3.72、约 3.73、约 3.74、约 3.75、约 3.76、约 3.77、约 3.78、约 3.79、约 3.8、约 3.81、约 3.82、约 3.83、约 3.84、约 3.85、约 3.86、约 3.87、约 3.88、约 3.89、约 3.9、约 3.91、约 3.92、约 3.93、约 3.94、约 3.95、约 3.96、约 3.97、约 3.98、约 3.99、约 4.0、约 4.01、约 4.02、约 4.03、约 4.04、约 4.05、约 4.06、约 4.07、

约 4.08、约 4.09、约 4.1、约 4.11、约 4.12、约 4.13、约 4.14、约 4.15、约 4.16、约 4.17、约 4.18、约 4.19、约 4.2、约 4.21、约 4.22、约 4.23、约 4.24、约 4.25、约 4.26、约 4.27、约 4.28、约 4.29、约 4.3、约 4.31、约 4.32、约 4.33、约 4.34、约 4.35、约 4.36、约 4.37、约 4.38、约 4.39、约 4.4、约 4.41、约 4.42、约 4.43、约 4.44、约 4.45、约 4.46、约 4.47、约 4.48、约 4.49、约 4.5、约 4.51、约 4.52、约 4.53、约 4.54、约 4.55、约 4.56、约 4.57、约 4.58、约 4.59、约 4.6、约 4.61、约 4.62、约 4.63、约 4.64、约 4.65、约 4.66、约 4.67、约 4.68、约 4.69、约 4.7、约 4.71、约 4.72、约 4.73、约 4.74、约 4.75、约 4.76、约 4.77、约 4.78、约 4.79、约 4.8、约 4.81、约 4.82、约 4.83、约 4.84、约 4.85、约 4.86、约 4.87、约 4.88、约 4.89、约 4.9、约 4.91、约 4.92、约 4.93、约 4.94、约 4.95、约 4.96、约 4.97、约 4.98、约 4.99、约 5.0。

23. 一种如式(II)所示的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



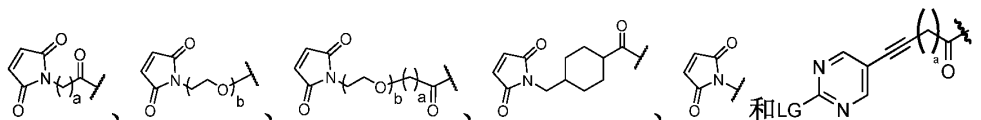
其中，

X、Aa、L¹、L²、D¹和 D²如权利要求 1-21 中任一项所定义，

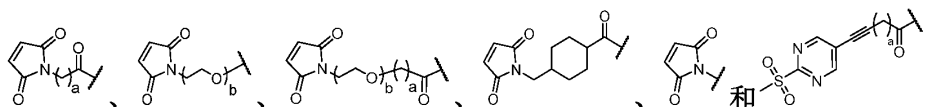
M¹为和抗体或其抗原结合片段连接的接头部位的前体；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段如权利要求 1-21 中任一项所定义；

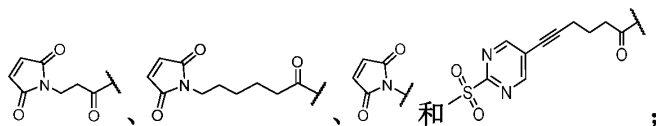
优选地，M¹选自以下结构：



更优选地，M¹选自以下结构：



更优选地, M^1 选自以下结构:



其中, 各 a 独立地选自 0-6 的整数, b 选自 1-10 的整数;

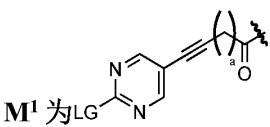
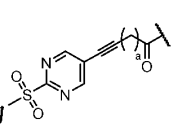
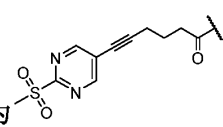
LG 代表离去基团,

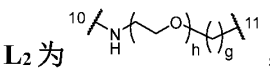
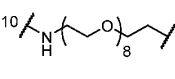
优选地, LG 各自独立地选自卤素 (例如 F、Cl、Br、I)、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、卤代 C_{1-6} 烷基磺酰基、卤代磺酰基、 C_{1-6} 烷基磺酸酯基、卤代 C_{1-6} 烷基磺酸酯基、 C_{1-6} 烷基亚磺酸酯基、 C_{1-6} 烷基亚磺基、卤代苯氧基、羟基、巯基、氨基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段, 所述的卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、卤代 C_{1-6} 烷基磺酰基、卤代磺酰基、 C_{1-6} 烷基磺酸酯基、卤代 C_{1-6} 烷基磺酸酯基、 C_{1-6} 烷基亚磺酸酯基、 C_{1-6} 烷基亚磺基、卤代苯氧基、烯基、炔基及含炔基的结构片段任选地被一个或多个合适的取代基所取代;

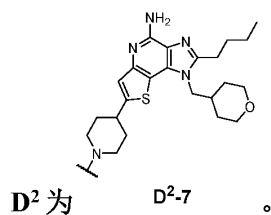
优选地, LG 各自独立地选自卤素 (例如 F、Cl、Br、I)、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、卤代 C_{1-6} 烷基磺酰基、卤代磺酰基、 C_{1-6} 烷基磺酸酯基、卤代 C_{1-6} 烷基磺酸酯基、 C_{1-6} 烷基亚磺酸酯基、 C_{1-6} 烷基亚磺基、卤代苯氧基、羟基、巯基、氨基、硝基、叠氮基、氰基、烯基、炔基及含炔基的结构片段;

更优选地, LG 为 C_{1-6} 烷基磺酰基, 例如为甲磺酰基。

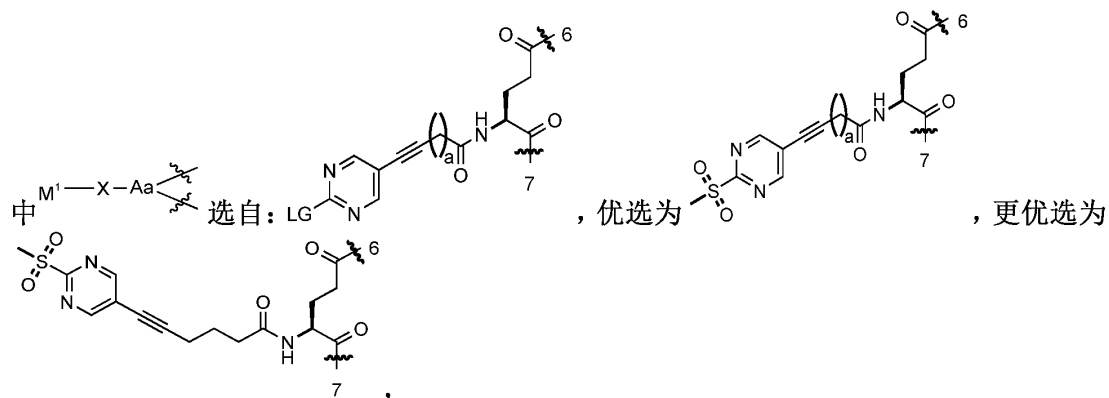
24. 如权利要求 23 所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、 N -氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药, 其中,

M^1 为 , 优选为 , 更优选为 , a 选自 0-6 的整数;

L^2 为 , 优选为 , 其中, g 选自 0-6 的整数, h 选自 1-10 的整数, 并且, L^2 的 10 位置同 Aa 相连, 11 位置同 D^2 相连;

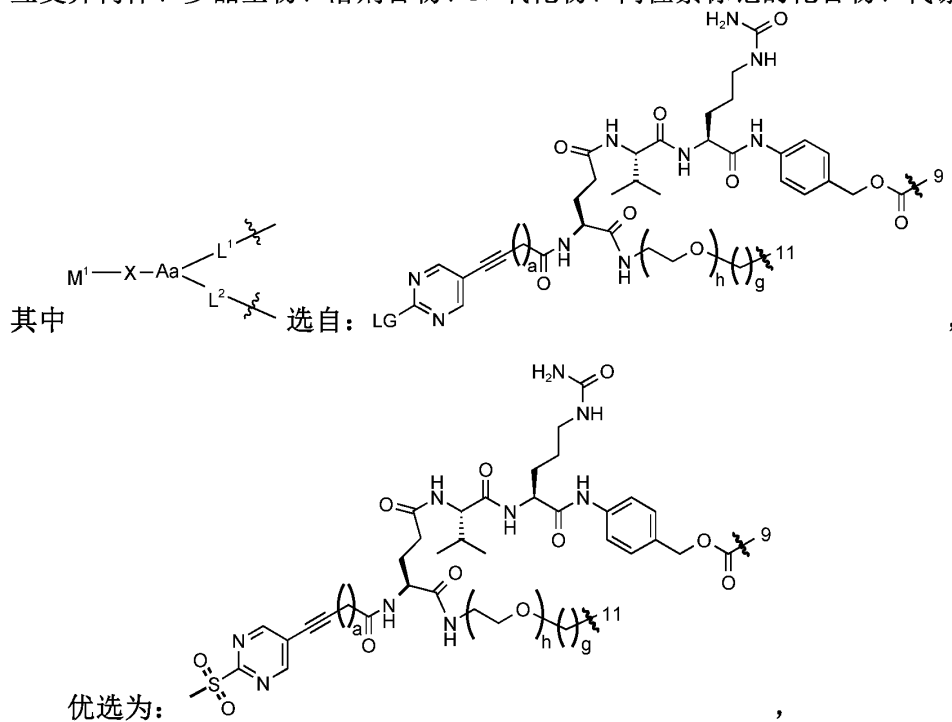


25.如权利要求 23 或 24 所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，其

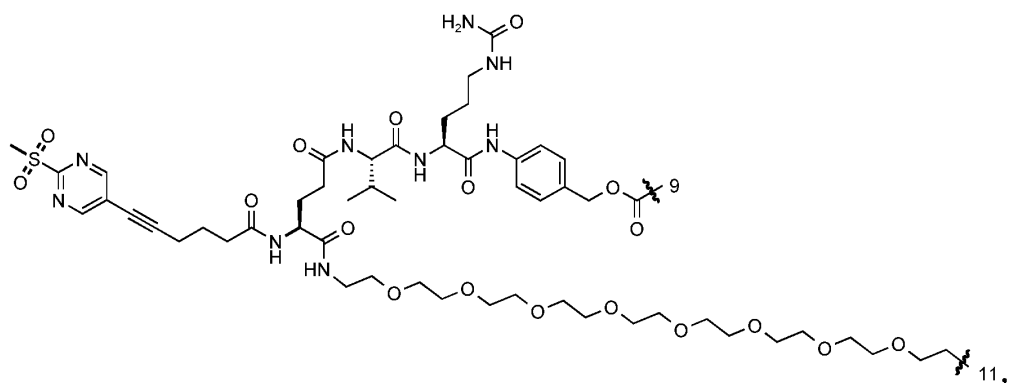


其中 a 选自 0-6 的整数；6 位置与 L^1 相连，7 位置与 L^2 相连。

26.如权利要求 23-25 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，

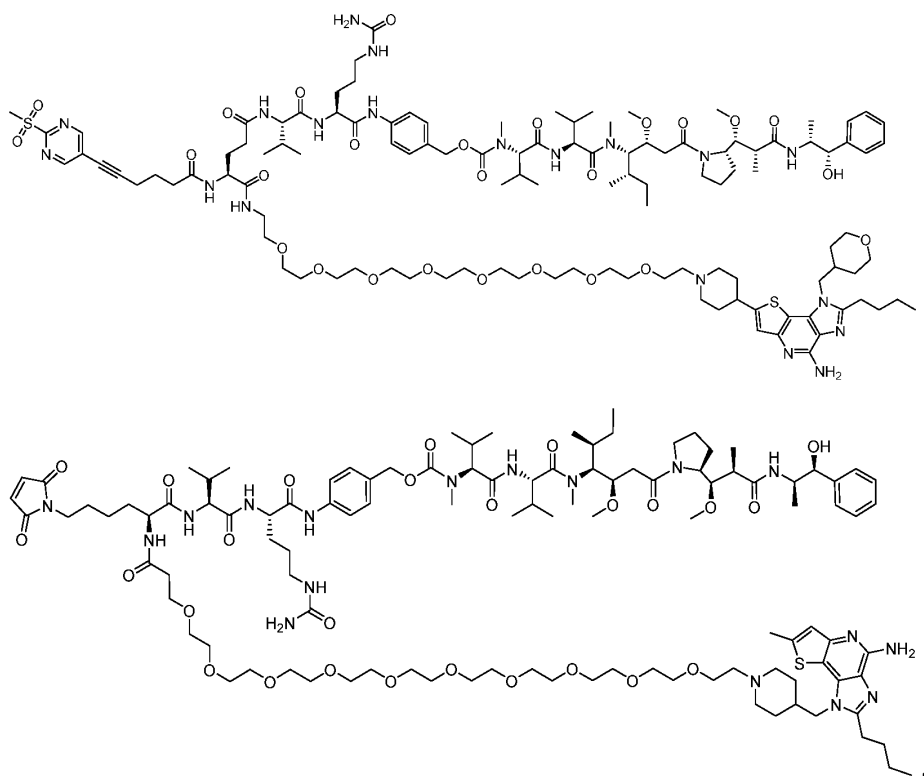


更优选为：



其中 a 选自 0-6 的整数, g 选自 0-6 的整数, h 选自 1-10 的整数; 9 位置与 D¹ 相连, 11 位置与 D² 相连。

27. 如权利要求 23-26 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药, 其中所述化合物选自以下结构:



28. 一种特异性结合 B7H3 的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合

片段包含：

(1) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 11 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 12 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；

(2) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 14 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 15 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；

(3) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 8 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 9 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 10 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 3 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 4 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；或

(4) 下述重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)：

包含如下 3 个 CDR 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 16 或其变体的 CDR-H1，序列为 SEQ ID NO: 17 或其变体的 CDR-H2，序列为 SEQ ID NO: 13 或其变体的 CDR-H3；和/或，包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 6 或其变体的 CDR-L1，序列为 SEQ ID NO: 7 或其变体的 CDR-L2，序列为 SEQ ID NO: 5 或其变体的 CDR-L3；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO: 23 或 1 所示的 VH 或其变

体，和/或，SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO: 23 或 1 所示的 VH 或其变体和 SEQ ID NO: 18 所示的重链恒定区（CH）或其变体的重链，和/或，SEQ ID NO: 2 所示的 VL 或其变体和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链恒定区（CL）或其变体的轻链；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 或 20 所示，所述抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示；

可选地，所述重链或重链可变区和/或轻链或轻链可变区的 N 端谷氨酰胺经历环化形成焦谷氨酸或焦谷氨酸盐；和/或，所述重链或重链恒定区（CH）或其变体不存在 C-末端赖氨酸；

优选地，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性，或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）；优选地，所述的置换是保守置换。

29. 一种药物组合物，其含有权利要求1-21任一项所述的抗体药物偶联物、权利要求22所述的组合物、权利要求23-27任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药或权利要求28所述的抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药用辅料。

30. 权利要求23-27任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药或权利要求28所述的抗体或其抗原结合片段在制备抗体药物偶联物（例如，权利要求1-21任一项所述的抗体药物偶联物）中的用途。

31. 权利要求 1-21 任一项所述的抗体药物偶联物、权利要求 22 所述的组合物、权利要求 23-27 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、权利要求 28 所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 29 所述的药物组合物在制备药物中的用途，特别是治疗和/或预防癌症（例如与 B7H3 表达相关的癌症）的药物中的用途；

优选地，所述癌症为 **B7H3** 阳性癌症；

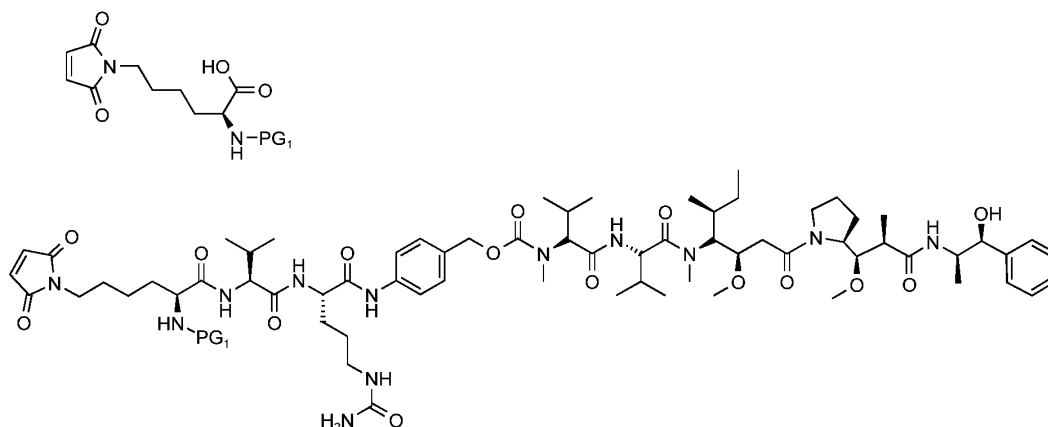
优选地，所述癌症选自乳腺癌（例如，乳腺导管癌）、胃癌、肺癌（例如，肺腺癌）和结肠癌。

32. 一种治疗和/或预防癌症（例如与 **B7H3** 表达相关的癌症）的方法，包括向有此需要的受试者施用治疗和/或预防有效量的权利要求 **1-21** 任一项所述的抗体药物偶联物、权利要求 **22** 所述的组合物、权利要求 **23-27** 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药、权利要求 **28** 所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 **29** 所述的药物组合物；

优选地，所述癌症为 **B7H3** 阳性癌症；

优选地，所述癌症选自乳腺癌（例如，乳腺导管癌）、胃癌、肺癌（例如，肺腺癌）和结肠癌。

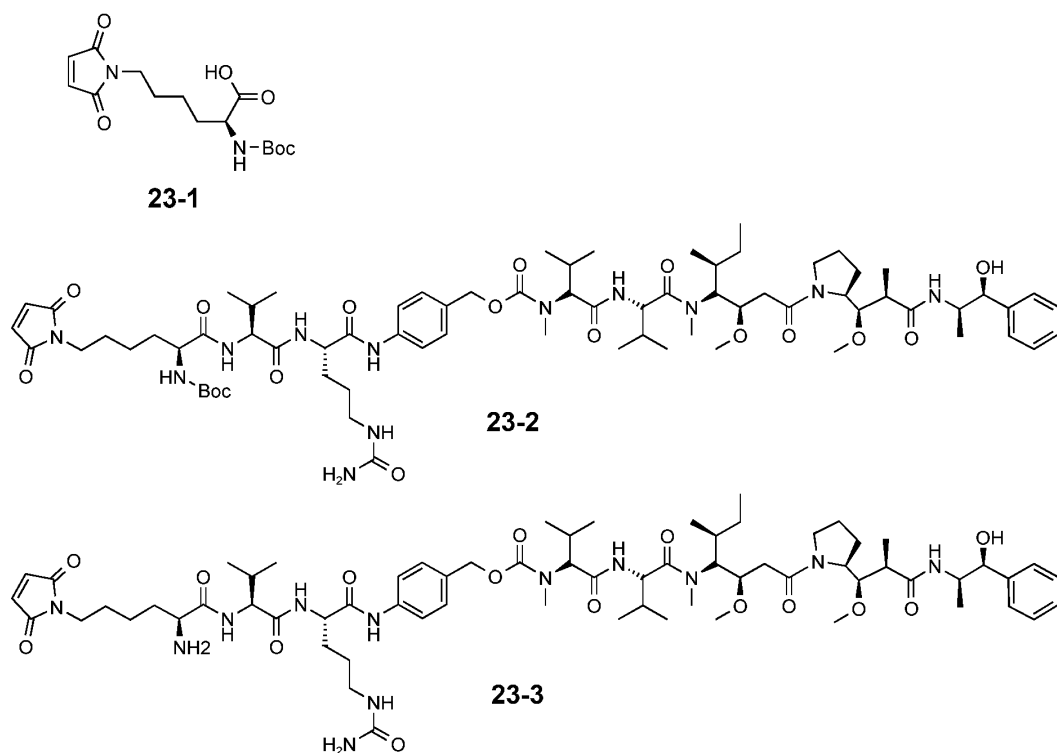
33. 一种如下所示的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



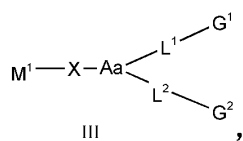
其中，**PG₁** 各自独立地为 **H** 或氨基保护基，所述氨基保护基优选为烷氧羰基类氨基保护基，例如苄氧羰基(**Cbz**)、叔丁氧羰基(**Boc**)、苄基氧羰基(**Fmoc**)、烯丙氧羰基(**Alloc**)、三甲基硅乙氧羰基(**Teoc**)、甲(或乙)氧羰基；酰基类氨基保护基，例如邻苯二甲酰基(**Pht**)、对甲苯磺酰基(**Tos**)、三氟乙酰基(**Tfa**)、邻(对)硝基苯磺酰基(**Ns**)、特戊酰基、苯甲酰基、叔丁氧羰基、9-苄基氧羰基、烯丙氧羰基、三氯乙氧羰基、三甲基硅乙氧羰基、苄氧

羰基、对甲基苯磺酰基、对硝基苯磺酰基、三氟乙酰基、甲氧羰基、或乙氧羰基；烷基类氨基保护基，例如三苯甲基(Trt)、2,4-二甲氧基苄基(Dmb)、4-甲氧基苄基(PMB)、苄基(Bn)。

34. 一种如下所示的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



35. 一种式(III)所示的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



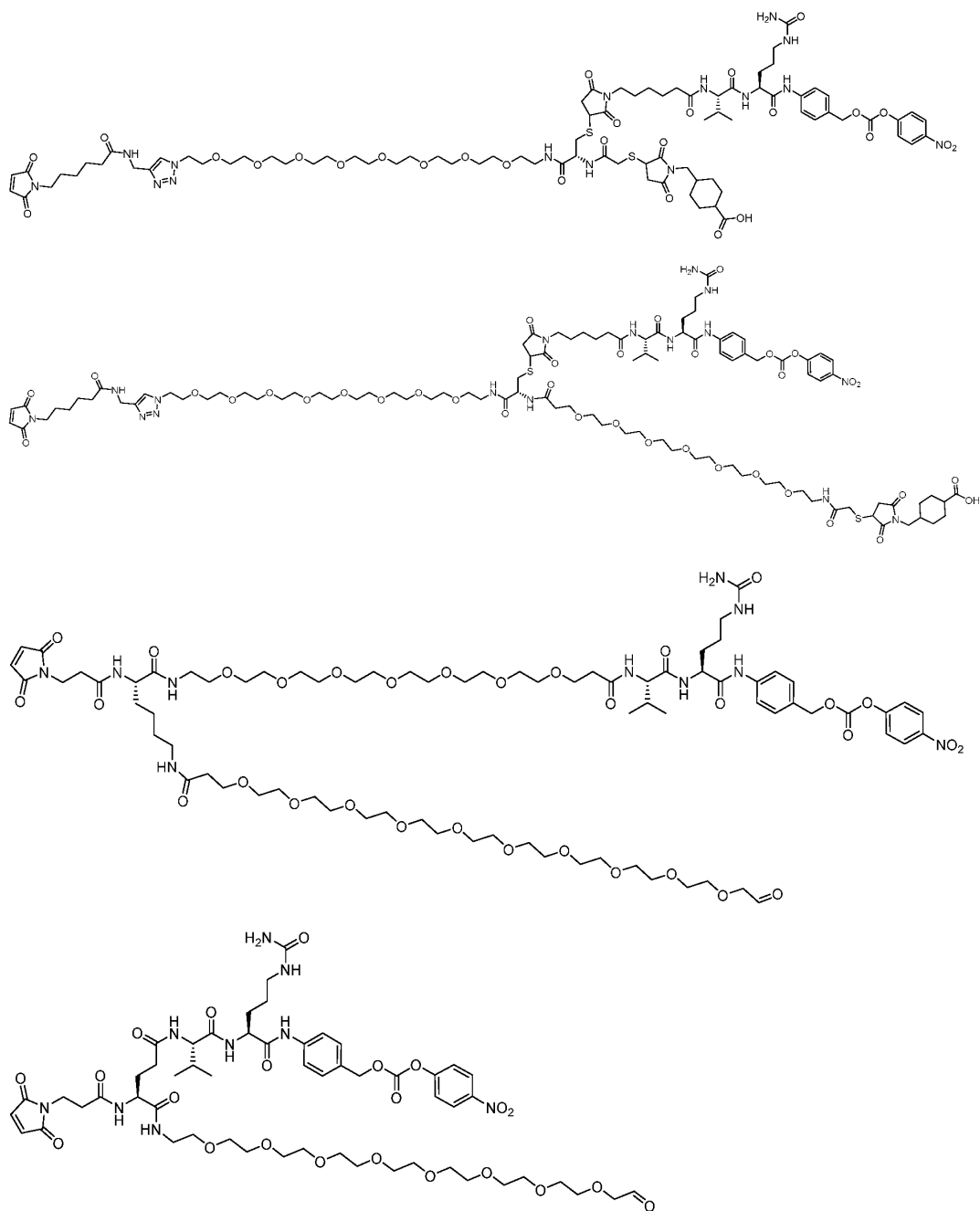
其中，

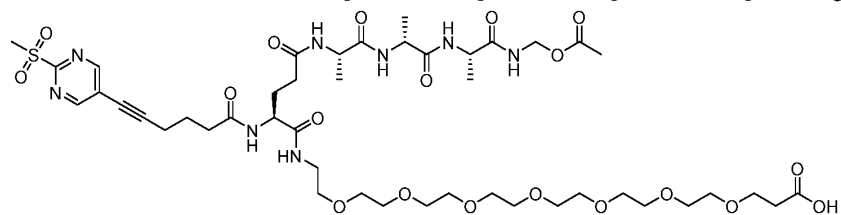
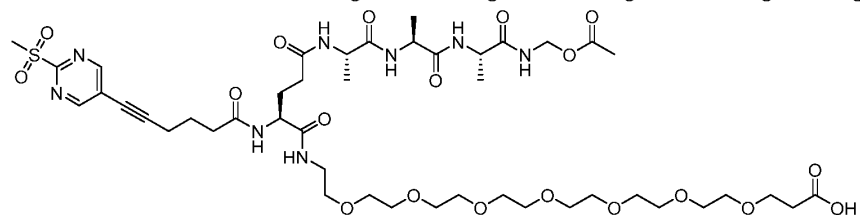
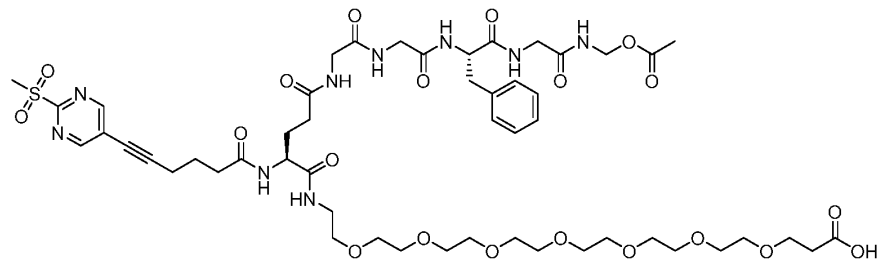
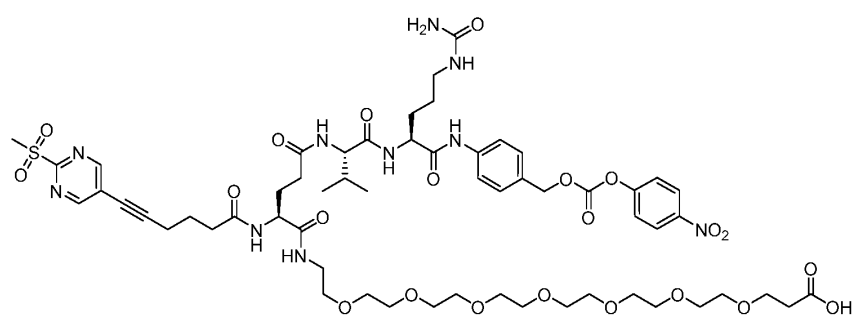
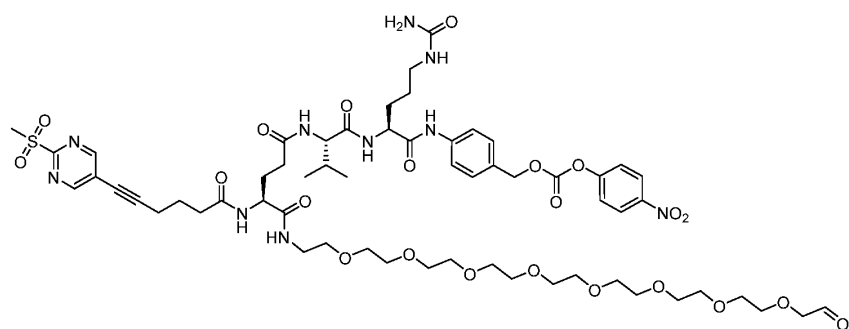
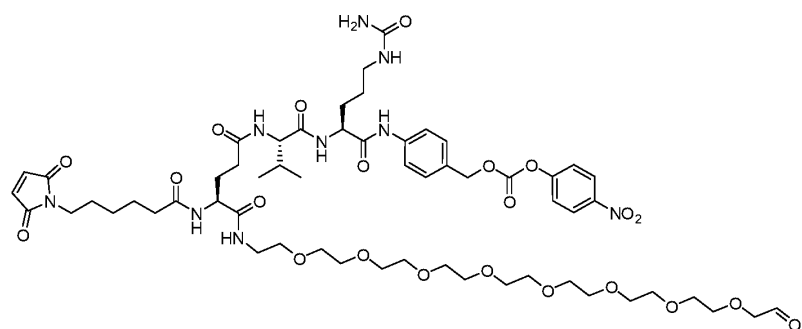
X、Aa、L¹、L²、M¹如权利要求 23-27 任一项所定义，

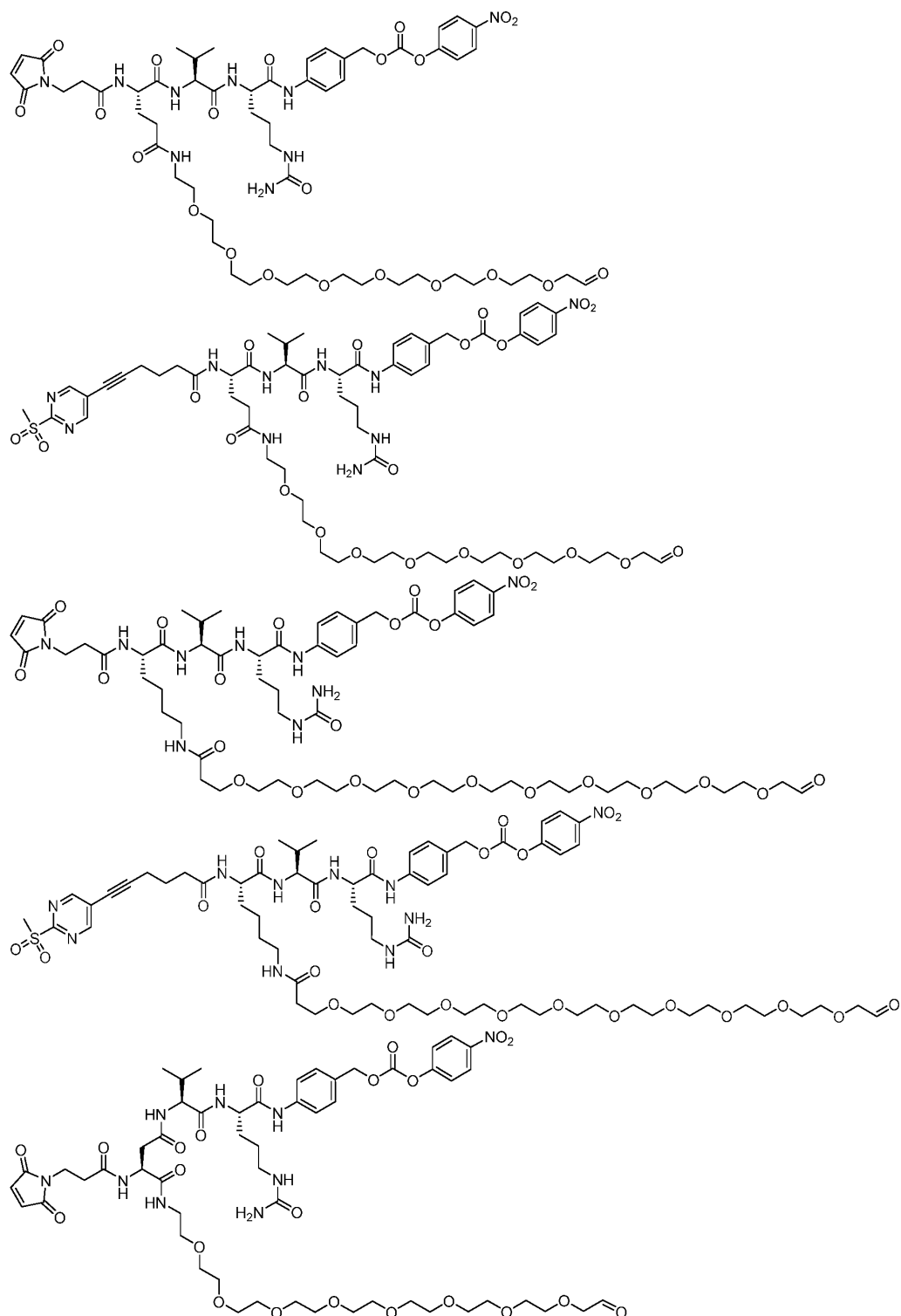
G¹ 为对硝基苯氧基或 C₁₋₆ 烷酰氧基；

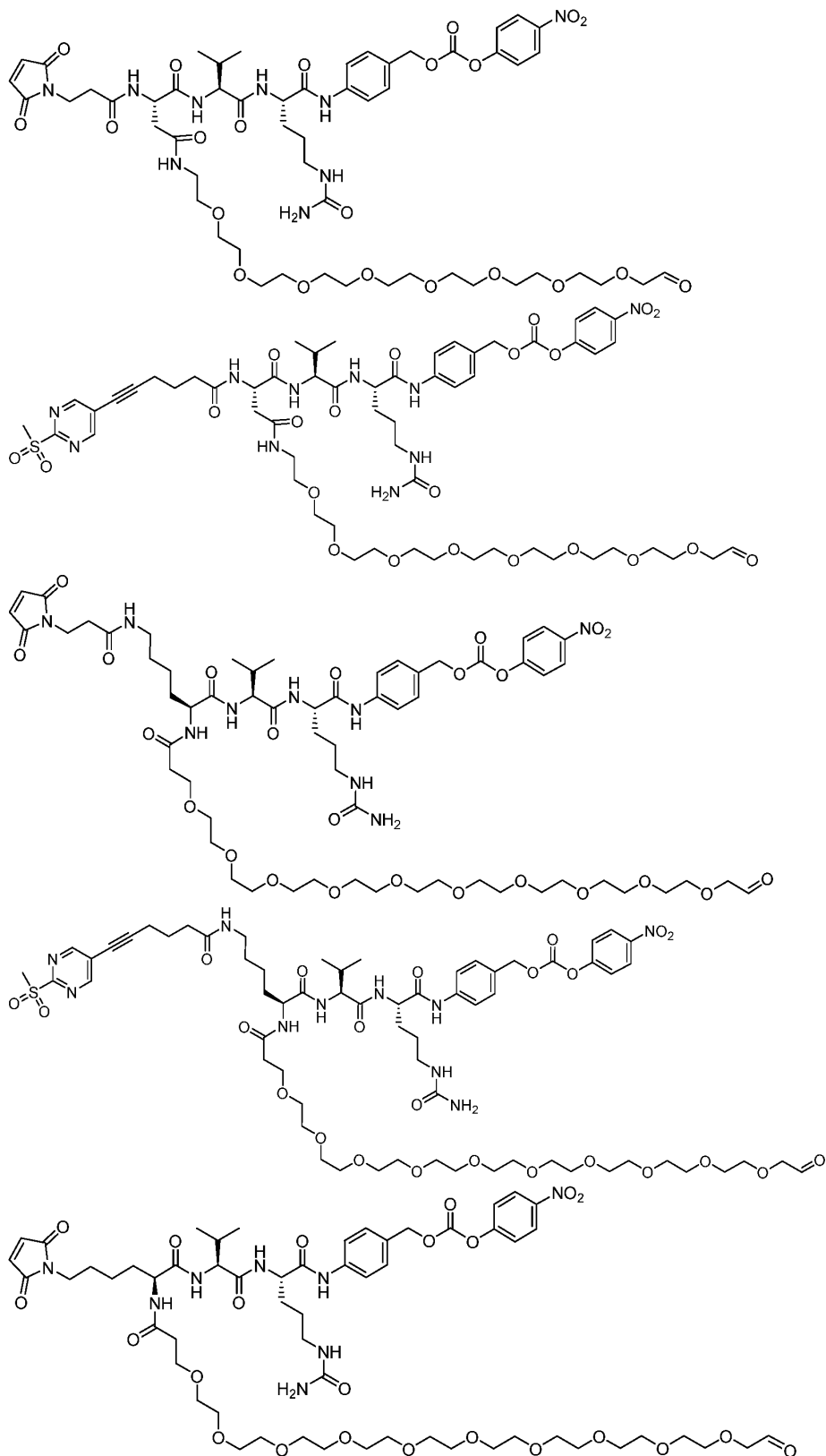
G² 为羟基或氧代基；

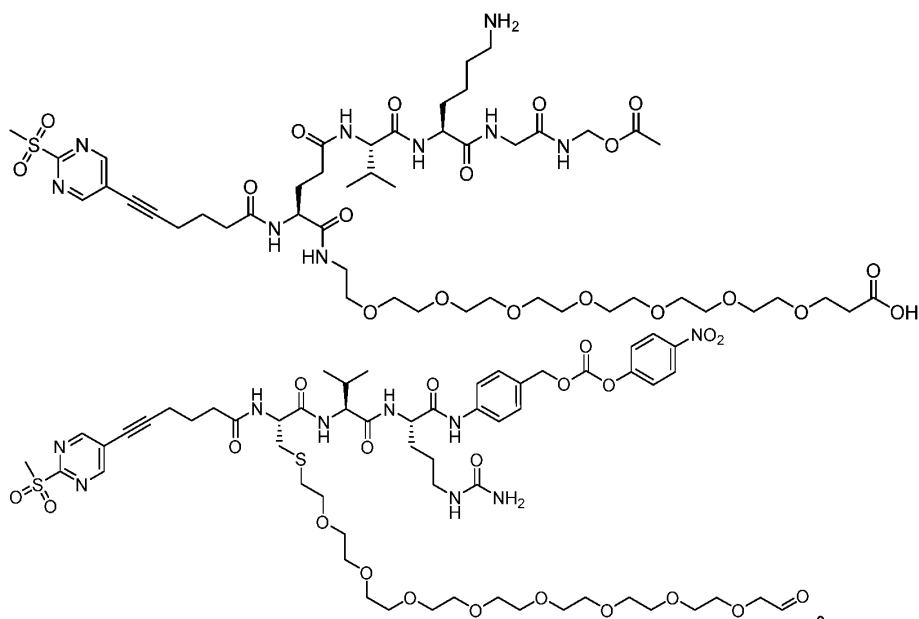
优选地，所述化合物选自：



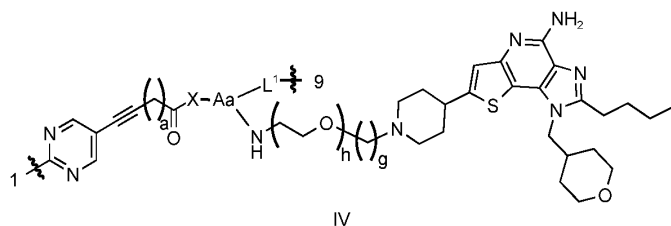








36. 一种连接单元，其为具有式(IV)所示结构的化合物或其盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药：



其中 X、Aa、L¹、a、g 和 h 如权利要求 1-21 中任一项所定义。

37. 一种化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，其包含权利要求 36 所述的连接单元以及 LG 或 D¹ 中的至少一个，所述的连接单元与 LG 或 D¹ 连接，其中 D¹ 与连接单元的位置 9 进行连接；LG 与连接单元的位置 1 进行连接；其中 D¹ 如权利要求 1-21 任一项所定义，LG 如权利要求 23-27 任一项所定义。

38. 一种抗体药物偶联物，其包括权利要求 23-27 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、*N*-氧化物、同位素标记的化合物、代谢物或前药，和/或权利要求 28 所述的抗体或其抗原结合片段。