

一种喜树碱衍生物及其偶联物

技术领域

本发明涉及作为抗肿瘤药用的喜树碱类衍生物及其抗体-药物偶联物。具体的说，本发明涉及通过一系列分子结构改造，获得更优的喜树碱类抗肿瘤药物，以更适合作为抗体偶联用药物。

背景技术

抗体-药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC) 作为新型的靶向药物，一般由三部分组成：抗体或抗体类配体，小分子药物基以及将配体和药物偶联起来的连接子。抗体-药物偶联物利用抗体对抗原的特异性识别，将药物分子运输至靶细胞附近并有效释放药物分子，达到治疗的目的。与传统的化疗药物相比，抗体-药物偶联物能精准地结合肿瘤细胞并降低对正常细胞的影响 [Mullard A, (2013) *Nature Reviews Drug Discovery*, 12:329-332; DiJoseph JF, Armellino DC, (2004) *Blood*, 103:1807-1814]。

2011 年 8 月，美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准西雅图基因公司研制的 ADC 新药 Adcetris™ 上市，用于治疗霍奇金淋巴瘤以及复发性间变性大细胞淋巴瘤 [Nat. Biotechnol (2003) 21(7):778-784; WO2004010957; WO2005001038; US7090843A; US7659241; WO2008025020]。，临床应用已经证明了此类药物的安全性和有效性。

2013 年 2 月，作为第一个被美国 FDA 批准用于治疗实体肿瘤的 ADC 药物，Kadcyla (ado-trastezumab emtansine, T-DM1)，用于治疗 HER2 阳性同时对曲妥珠单抗 (Trastuzumab, 商品名：Herceptin) 和紫杉醇有抗药性的晚期或者转移性乳腺癌患者 (WO2005037992; US8088387)。

ADC 常用毒素包括 MMAE, T-DM1, PBD 等剧毒类毒素，此类毒素毒性强，即便在形成 ADC 药物以后，治疗窗也较窄。

通过抑制拓扑异构酶 I 而具有抗肿瘤作用的喜树碱类衍生物，是一类用于抗体-药物偶联物的小分子。依喜替康作为其中代表化合物，由第一三共公司开发，该药前期作为单独化疗药物使用推进至三期临床，主要适应症为骨癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌等，因为副作用大，治疗窗窄，最终直接给药的依喜替康未能成功上市。

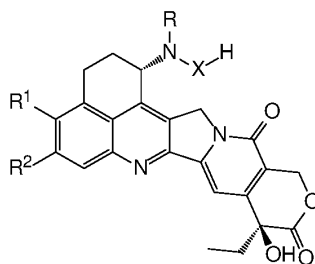
为克服依喜替康直接给药的副作用，第一三共公司将依喜替康开发作为 ADC 毒素使用，并已成功上市。第一个上市的以依喜替康为毒素的 ADC，代号 DS-8201，针对 HER2 靶点，用了单个抗体连接 8 个毒素的形式。但是，第一三共在后续临床中针对其他靶点如

Trop2 设计的以依喜替康为毒素的 ADC 药物, 因为安全性的问题, 不得已降低至抗体药物比: DAR=4。偶联药物数目的减少, 会降低 ADC 药物的治疗指数。

本发明所需要解决的技术问题, 就是探索发现更优的抗肿瘤喜树碱类衍生物, 降低化合物毒性, 提高其在 ADC 药物应用中的安全性、有效性, 得到具有优异疗效的抗肿瘤 ADC 药物。在对 ADC 类药物及喜树碱衍生物构效关系综合理解的基础上, 本发明设计合成一系列具有显著抗肿瘤活性的喜树碱类衍生物及其抗体偶联物, 所得的喜树碱类衍生物的毒性显著降低, 最终通过体内抗肿瘤活性测定, 证明其良好的抗肿瘤活性。

发明内容

本发明旨在提供一种具有更优异抗肿瘤效果的喜树碱类衍生物及其偶联物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或者其混合物形式, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中所述抗体-药物偶联物包含式 **D** 所示的抗肿瘤喜树碱类化合物。



D

其中:

R 选自氘原子、C₁₋₆ 烷基、氘代烷基、取代烷基、芳基、取代的芳基或杂芳基, 优选 C₁₋₆ 烷基或取代烷基;

R¹ 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、羧基、羧基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基;

R² 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、羧基、羧基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基;

X 选自 -C(O)-CR^aR^b-O-(CR³R⁴)_n-, -C(O)-CR^aR^b-NH-(CR³R⁴)_n-或 -C(O)-CR^aR^b-(CR³R⁴)_n-S-;

R^a 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基;

R^b 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

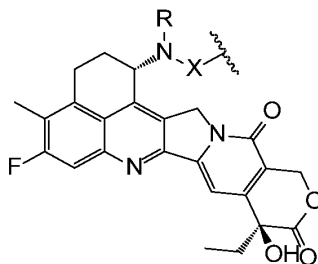
或者， R^a 、 R^b 连同其所连接碳原子构成 C_{3-6} 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

R^3 、 R^4 相同或者不同，且分别独立地为氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基或者杂环基；

或者， R^3 、 R^4 连同其所连接碳原子构成 C_{3-6} 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

n 选自 0 至 4 的整数。

本发明的一些实施方案中，提供的喜树碱类衍生物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式，或药学上可接受的盐或溶剂化物，包含具有通式 **D₁** 所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物；



D₁

其中：

R 选自氘原子、 C_{1-6} 烷基或取代烷基、芳基、取代芳基或杂芳基；

X 选自 $-C(O)-CR^aR^b-(CR^3R^4)_n-O-$ 、 $-C(O)-CR^aR^b-(CR^3R^4)_n-NH-$ 或 $-C(O)-CR^aR^b-(CR^3R^4)_n-S-$ ；

R^a 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R^b 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

或者， R^a 、 R^b 连同其所连接碳原子构成 C_{3-6} 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

R^3 、 R^4 相同或者不同，且分别独立地为氢原子、氘原子、羟基、氨基、氰基、硝基、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟烷基、环烷基或者杂环基；

或者， R^3 、 R^4 连同其所连接碳原子构成 C_{3-6} 环烷基、环烷基烷基或者杂环基；

n 选自 0 至 4 的整数；

其中，式 D_1 中的波浪线或表示氢原子，或与接头单元或与结合肿瘤靶细胞所表达抗原的抗体共价连接。

本发明的一些实施方案中，提供的喜树碱类衍生物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，结构单元-X-为 $-C(O)-CR^aR^b-(CR^3R^4)_n-O-$ 或者结构单元-X-为 $-C(O)-CR^aR^b-(CH_2)_n-O-$ ；

其中：

R^a 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R^b 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

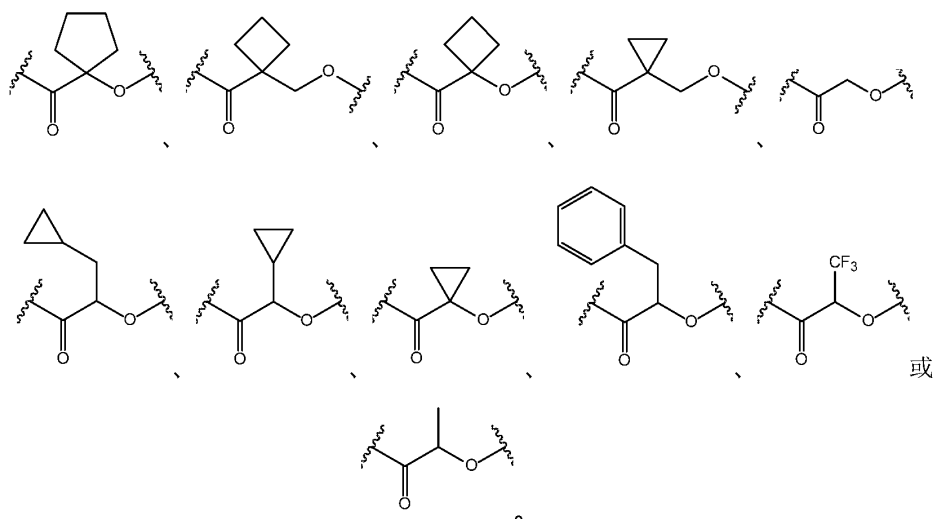
或者， R^a 、 R^b 连同其所连接碳原子构成 C_{3-6} 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

R^3 、 R^4 相同或者不同，且分别独立地为氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基或者杂环基；

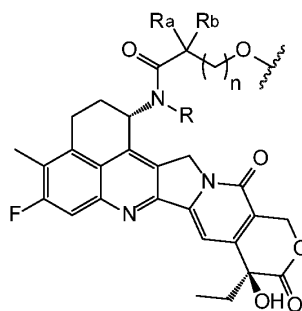
或者， R^3 、 R^4 连同其所连接碳原子构成 C_{3-6} 环烷基、环烷基烷基或者杂环基；

n 为 0 或 1。

本发明的一些实施方案中，提供的喜树碱类衍生物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中结构单元-X-的 O 端与连接单元 L 相连，结构单元-X-选自，但不限于：



本发明的一方面，提供了一种通式 (**D₂**) 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，



D₂

其中：

R 选自氘原子、C₁₋₆ 烷基或取代烷基、芳基、取代的芳基或杂芳基，优选 C₁₋₆ 烷基或取代烷基；

R^a 选自环烷基或者环烷基烷基，优选 C₃₋₆ 环烷基烷基或者 C₃₋₆ 环烷基；

R^b 选自氢原子、氘原子、烷基、卤代烷基、环烷基或者环烷基烷基，优选氢原子或者氘原子；

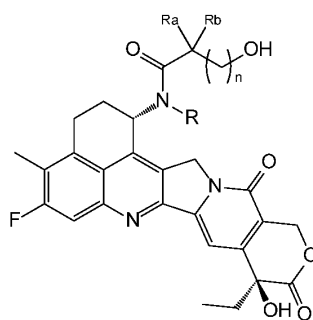
或者，**R^a**、**R^b** 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

n 为 0 或者 1；

其中，式 **D₂** 中的波浪线或表示氢原子，或与接头单元或与结合靶细胞所表达抗原的抗体共价连接。

本发明一方面的一个优选方案，提供的通式 (**D**) 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式、或其药学上接受的盐或溶剂化物，包含具有通式 (**D₃**) 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式、或其药学上接受的盐或溶剂化物：

6

**D₃**

其中：

R 选自氡原子、C₁₋₆烷基或取代烷基、芳基、取代的芳基或杂芳基；

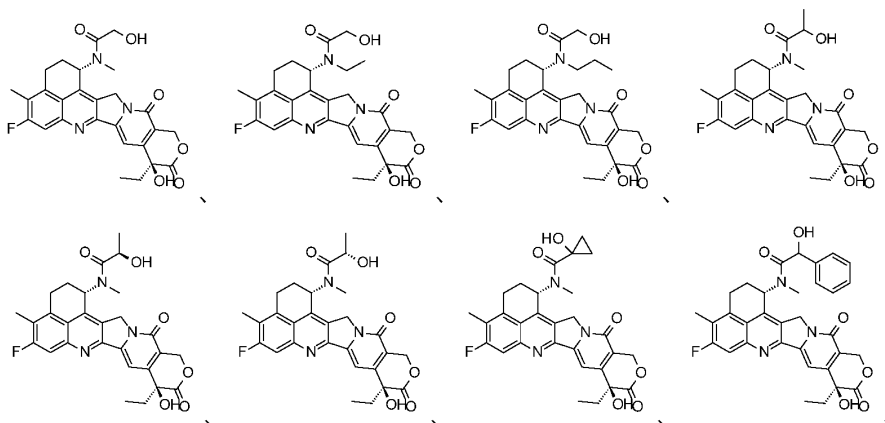
R^a 选自氢原子、氡原子、卤素、烷基、氡代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；优选 C₃₋₆ 环烷基烷基或者 C₃₋₆ 环烷基；

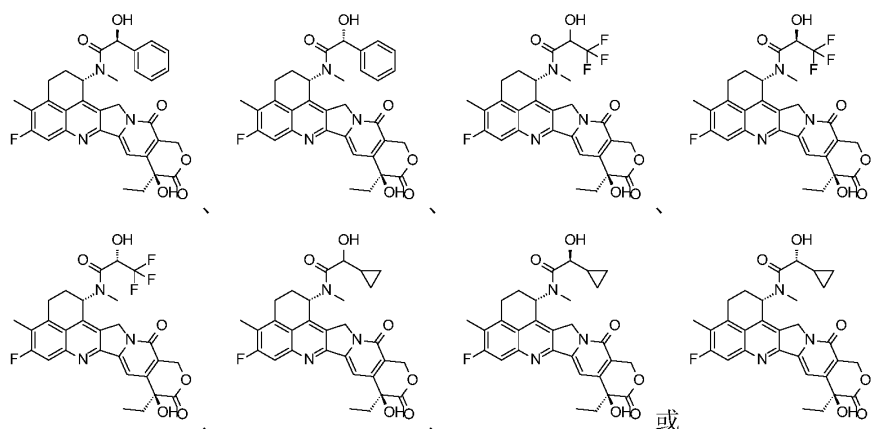
R^b 选自氢原子、氡原子、卤素、烷基、氡代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；优选 C₃₋₆ 环烷基烷基或者 C₃₋₆ 环烷基；

或者，**R^a**、**R^b** 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

n 为 0 或者 1；

本发明所示的通式 (D) 所示的化合物包括但不限于：





或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、其混合物形式或其药学上可接受的盐或溶剂化物；包括上述任一化合物的喜树碱衍生物类抗肿瘤药，非限制性地用于制备肺癌、肾癌、尿道癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、多形成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、肺癌或食道癌等实体瘤或血液肿瘤药物。

在本发明的另一个优选的实施例中，根据本发明所述的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或者溶剂化合物，其中接头单元-L-为-L₁-L₂-L₃-L₄-，其 L₁ 端与抗体相连，L₄端与 X 相连；

其中，L₁ 选自，但不局限于：-Y-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR⁵-Y-C(O)-或者-C(O)-Y-C(O)-，其中 Y 非限制性地选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-环烷基或 1-8 个原子的直链或直链-环状杂烷基，所述杂烷基包含选自 N、O 或者 S 的 1-3 个原子，所述的 C₁₋₈ 烷基、环烷基、直链或直链环状杂烷基各自独立的被选自氘代原子、卤素、羟基、氰基、硝基、氨基、烷基、杂烷基、取代烷基、羧基、烷氧基或环烷基的一个或者多个取代基所取代；

本发明的另一些实施方案中，抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中连接单元 L₁ 选自，但不局限于：-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-(CH₂)_o-C(O)-、-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH₂-环己基-C(O)-、-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-(CH₂CH₂O)_o-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR⁵-(CH₂)_o-C(O)-或者-C(O)-(CH₂)_o-C(O)-，其中 o 选自 2-8 的整数，优选为 5；

L₂ 选自 -NR⁶(CH₂CH₂O)_pCH₂CH₂C(O)-、-NR⁶(CH₂CH₂O)_pCH₂C(O)-、-S(CH₂)_pC(O)-

或者化学键，其中 p 选自 0-20 的整数；

本发明的一些实施方案中，提供的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中连接单元 L_2 选自 $-NR^6(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$ 或者化学键，其中 p 选自 0-12 的整数。

L_3 非限制性地选自由 2-7 个氨基酸构成的肽残基，其中任选氨基酸进一步被选自氧原子、卤素、羟基、氰基、氨基、硝基、烷基、取代烷基、烷氧基和环烷基或取代环烷基中的一个或多个取代基所取代；

本发明的一些实施方案中，提供的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其中所述的 L_3 的肽残基为由一个、两个或者多个选择苯丙氨酸 (F)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、赖氨酸 (K)、瓜氨酸、丝氨酸 (S)、谷氨酸 (E) 或者天冬氨酸 (D) 中的氨基酸形成的多肽残基。优选为由一个、两个或者多个选自苯丙氨酸和甘氨酸的氨基酸形成的氨基酸残基；更优选的为四肽残基；最优选的为 GGFG (甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸) 组成的四肽残基。

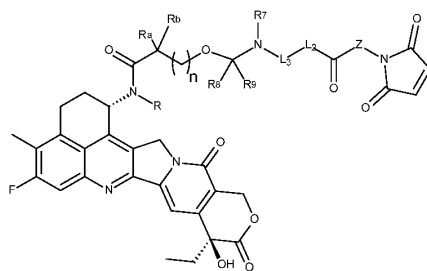
L_4 选自 $-NR^7(CR^8R^9)_q-$ 、 $-C(O)NR^7$ 、 $-C(O)NR^7(CH_2)_q-$ 或者化学键，其中 q 选自 0-6 的整数，优选为 $-NR^7(CR^8R^9)_q-$ ；

R^5 、 R^6 和 R^7 相同或者不同，且各自独立地为氢原子、氧原子、卤素、烷基、氧代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R^8 和 R^9 相同或者不同，且各自独立地为氢原子、氧原子、卤素、烷基、氧代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基。

本发明的另一些实施方案中，提供的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 L_4 选自 $-NR^7(CR^8R^9)_q-$ ， R^7 选自氢原子、氧原子或者烷基， R^8 和 R^9 相同或者不同，且各自独立地位于氢原子、氧原子或者烷基， q 为 1 或者 2； L_4 优选为 $-NR^7CR^8R^9-$ ； L_4 更优选为 $-NHCH_2-$ 。

本发明一方面的一个优选方案，提供的通式(L-X-D₂)所示的药物-连接子化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式、或其药学上接受的盐或溶剂化物，其为通式(La-X-D₂)所示的化合物或其药学上接受的盐或溶剂化物：

La-X-D₂

其中：

Z 选自，但不局限于 -Y-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR⁵-Y-C(O)-或-C(O)-Y-C(O)-，其中 Y，选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-环烷基或 1-8 个原子的直链或直链-环状杂烷基，所述杂烷基包含选自 N、O 或者 S 的 1-3 个原子，所述的 C₁₋₈ 烷基、环烷基、直链或直链环状杂烷基各自独立的被选自氘代原子、卤素、羟基、羧基、氰基、硝基、氨基、烷基、杂烷基、取代烷基、羧基、烷氧基或环烷基的一个或者多个取代基所取代；

L₂ 选自-NR⁶(CH₂CH₂O)_pCH₂CH₂C(O)-、-NR⁶(CH₂CH₂O)_pCH₂C(O)-、-S(CH₂)_pC(O)-或化学键，其中 p 优选为 0-20 的整数，优选为化学键；

L₃ 选自由 2-7 个氨基酸构成的肽残基，其中任选氨基酸进一步被选自氘原子、卤素、羟基、氰基、氨基、硝基、烷基、取代烷基、烷氧基和环烷基或者取代环烷基中的一个或多个取代基所取代；

R 选自氘原子、C₁₋₆ 烷基或取代烷基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R^a 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R^b 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

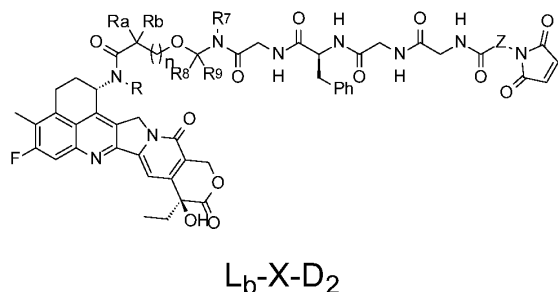
或者，R^a、R^b 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

R⁵、R⁶ 和 R⁷ 相同或者不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R⁸ 和 R⁹ 相同或者不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基。

n 选自 0 至 4 的整数，优选为 0 或 1，更优选为 0。

本发明一方面的一个优选方案，提供的通式(L-X-D₂)所示的药物-连接子化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式、或其药学上接受的盐或溶剂化物，其为通式(Lb-X-D₂)所示的化合物或其药学上接受的盐或溶剂化物：



其中：

Z 选自，但不局限于 -Y-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR⁵-Y-C(O)-或-C(O)-Y-C(O)-，其中 Y，选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-环烷基或 1-8 个原子的直链或直链-环状杂烷基，所述杂烷基包含选自 N、O 或者 S 的 1-3 个原子，所述的 C₁₋₈ 烷基、环烷基、直链或直链环状杂烷基各自独立的被选自氘代原子、卤素、羟基、羧基、氰基、硝基、氨基、烷基、杂烷基、取代烷基、羧基、烷氧基或环烷基的一个或者多个取代基所取代；

R 选自氘原子、C₁₋₆ 烷基或取代烷基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R^a 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R^b 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

或者，R^a、R^b 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

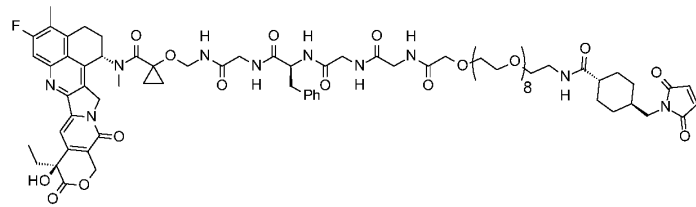
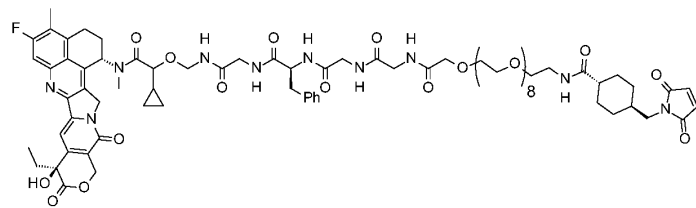
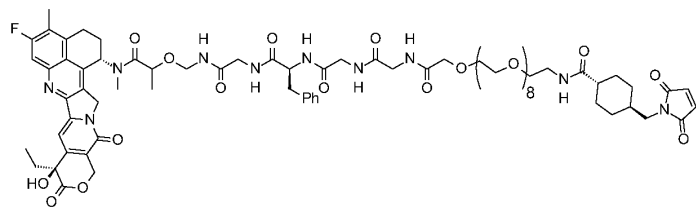
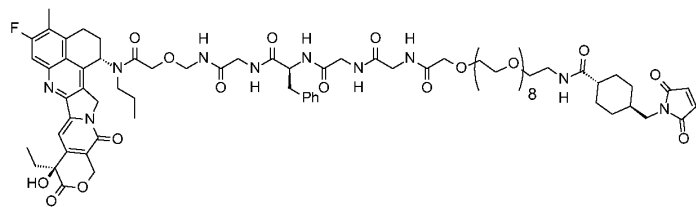
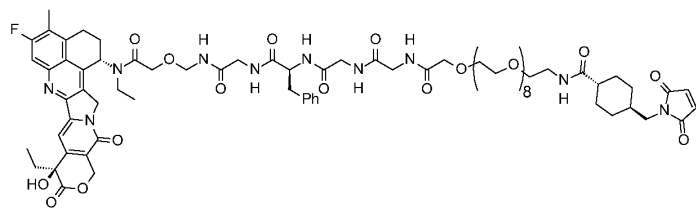
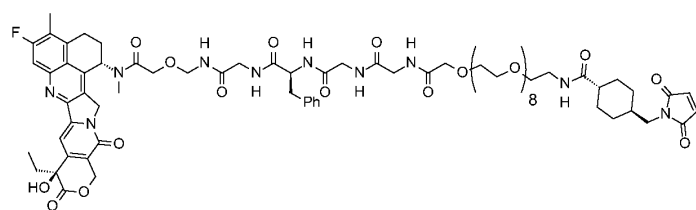
R⁷ 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

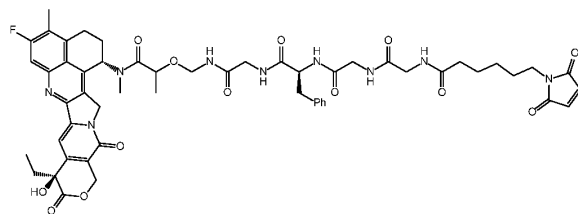
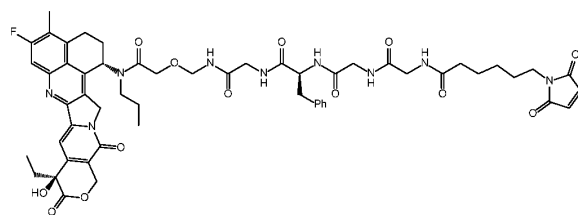
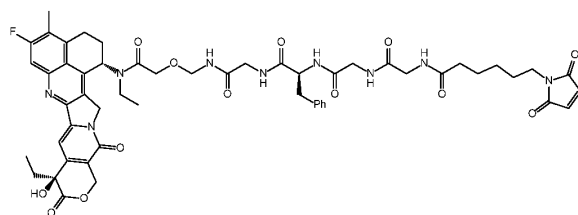
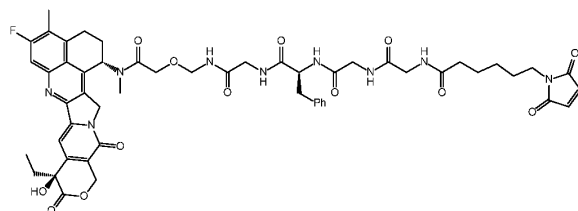
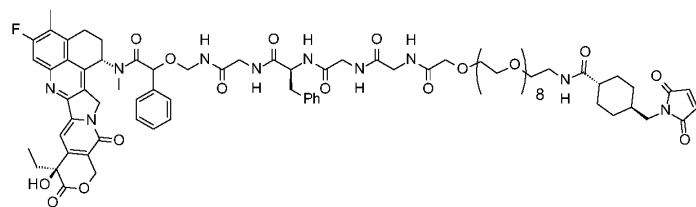
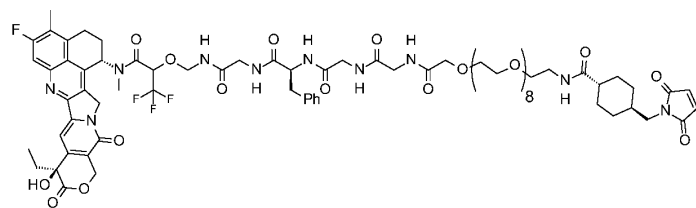
R⁸ 和 R⁹ 相同或者不同，且各自独立地氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基。

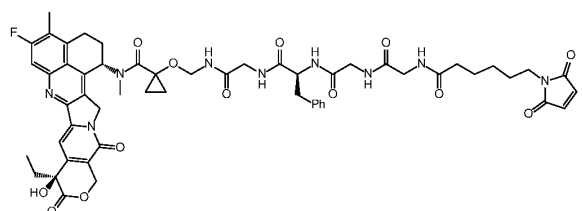
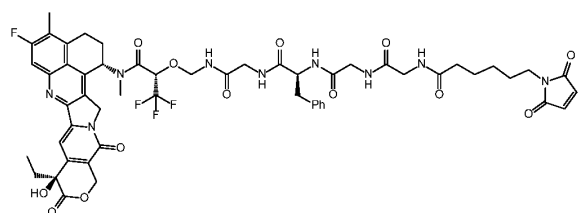
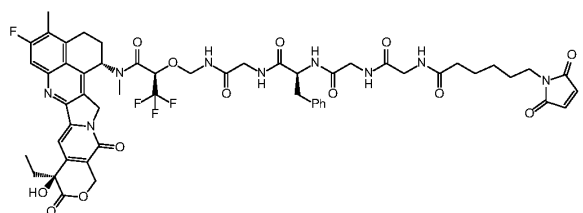
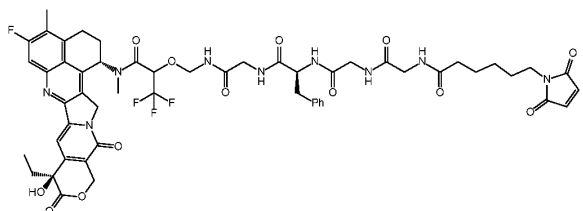
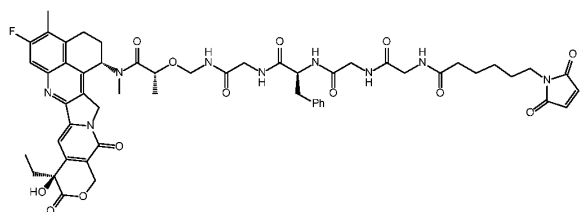
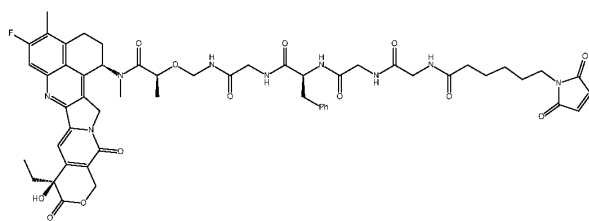
n 选自 0 至 4 的整数，优选为 0 或 1，更优选为 0。

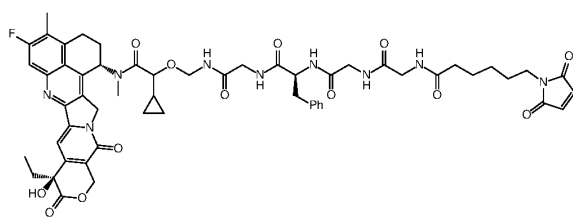
本发明的一些实施方案中，提供的抗体-药物偶联物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或者其混合物形式，或其药学上可接受的盐或者溶剂化物，其为通式 (L-X-Dr) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其选

自，但不局限于：

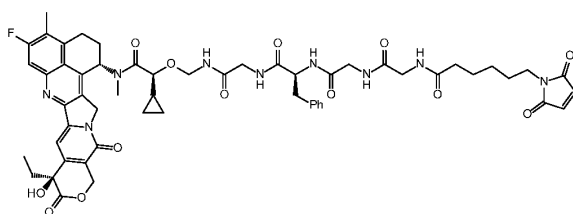




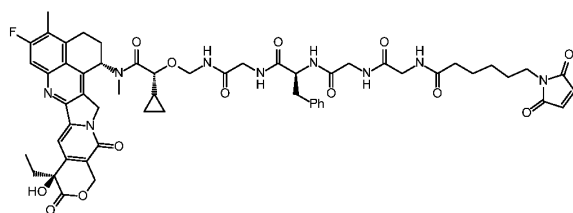




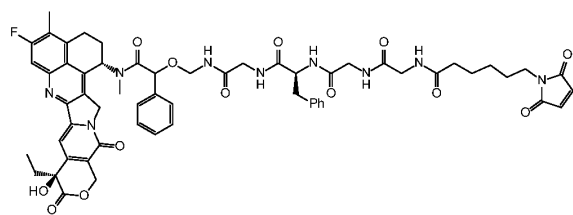
、



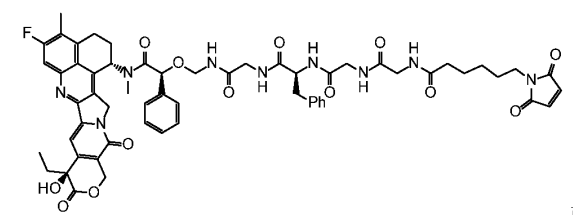
、



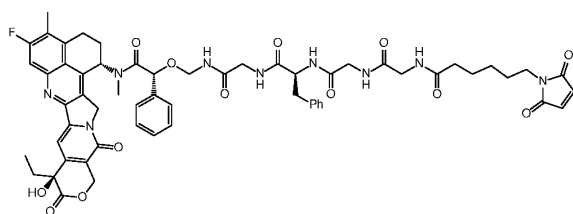
、



、

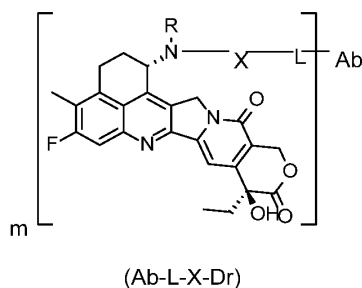


或



。

本发明的一些实施方案中，提供的抗体-药物偶联物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或者其混合物形式，或者其药学上可接受的盐或溶剂化物，其为通式（Ab-L-X-D₁）所示的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物：



其中：

R 选自氘原子、C₁₋₆ 烷基或取代烷基、芳基、取代的芳基或杂芳基；

X 选自 -C(O)-CR^aR^b-O-(CR³R⁴)_n-、-C(O)-CR^aR^b-NH-(CR³R⁴)_n-或-C(O)-CR^aR^b-(CR³R⁴)_n-S-；

R^a 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

R^b 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；

或者，R^a、R^b 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

R³、R⁴ 相同或者不同，且分别独立地为氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基或杂环基；

或者，R³、R⁴ 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基、环烷基烷基或者杂环基；

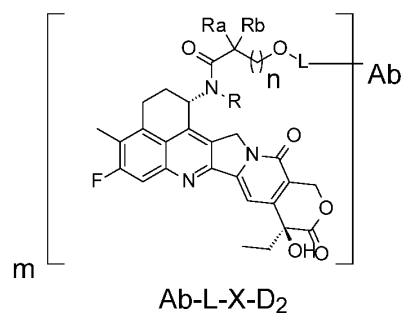
n 选自 0 至 4 的整数；

m 选自 1-10 的整数或小数；

Ab 为抗体、抗体片段或蛋白；

L 为连接单元。

本发明的另一些实施方案中，提供的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物，其为通式（Ab-L-X-D₂）所示的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物；



其中：

R 选自氘原子、C₁₋₆ 烷基或取代烷基、芳基、取代的芳基或杂芳基；

R^a 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；优选 C₃₋₆ 环烷基烷基或者 C₃₋₆ 环烷基；

R^b 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基；优选 C₃₋₆ 环烷基烷基或者 C₃₋₆ 环烷基；

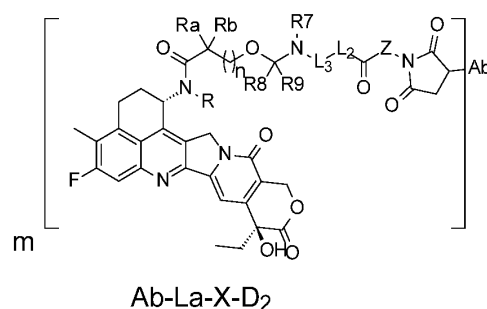
或者，R^a、R^b 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基、环烷基烷基或杂环基；

n 为 0 或者 1；

m 选自 1 至 10 的整数或小数；优选 n 为 2 至 8，可以为整数，也可以为小数；更优选 n 为 3 至 8，可以为整数，也可以为小数；

Ab 为抗体；L 为接头单元。

本发明的另一些实施方案中，提供的通式(Ab-L-X-Dr)所示的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物，其为通式(Ab-L_a-X-D₂)所示的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物；



其中：Z 选自，但不局限于 -Y-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR⁵-Y-C(O)-或-C(O)-Y-C(O)-，其中

Y, 选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-环烷基或者 1-8 个原子的直链或者直链-环状杂烷基, 所述杂烷基包含选自 N、O 或者 S 的 1-3 个原子, 所述的 C₁₋₈ 烷基、环烷基、直链或者直链环状杂烷基各自独立的被选自氘代原子、卤素、羟基、羧基、氰基、硝基、氨基、烷基、杂烷基、取代烷基、羧基、烷氧基或者环烷基的一个或者多个取代基所取代;

L₂ 非限制性地选自 -NR⁶(CH₂CH₂O)_pCH₂CH₂C(O)-、-NR⁶(CH₂CH₂O)_pCH₂C(O)-、-S(CH₂)_pC(O)-或化学键, 其中 p 优选为 0-20 的整数, 优选为化学键;

L₃ 非限制性地选自由 2-7 个氨基酸构成的肽残基, 其中任选氨基酸进一步被选自氘原子、卤素、羟基、氰基、氨基、硝基、烷基、取代烷基、烷氧基和环烷基或者取代环烷基中的一个或多个取代基所取代;

R 选自氘原子、C₁₋₆ 烷基或取代烷基、芳基、取代的芳基或杂芳基;

R^a 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基;

R^b 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基;

或者, R^a、R^b 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基、环烷基烷基或杂环基;

R³、R⁴ 相同或者不同, 且分别独立地为氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基或者杂环基;

或者, R³、R⁴ 连同其所连接碳原子构成 C₃₋₆ 环烷基或者杂环基;

R⁵、R⁶ 和 R⁷ 相同或者不同, 且各自独立地为氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基;

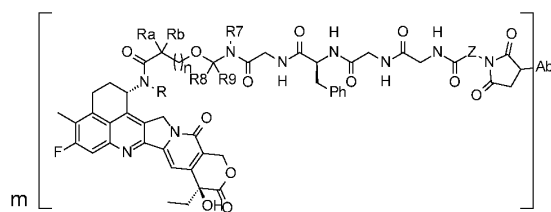
R⁸ 和 R⁹ 相同或者不同, 且各自独立地为氢原子、氘原子、卤素、烷基、氘代烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基。

n 选自 0 至 4 的整数, 优选为 0 或 1, 更优选为 0;

m 选自 1-10, 可以为整数也可以为小数;

Ab 为抗体、抗体片段或蛋白。

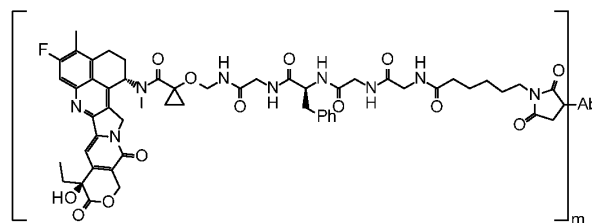
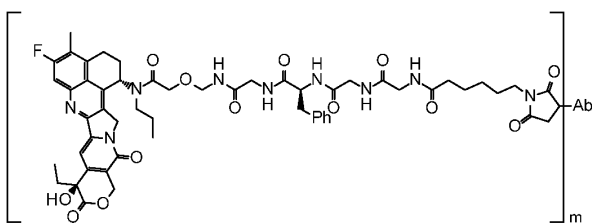
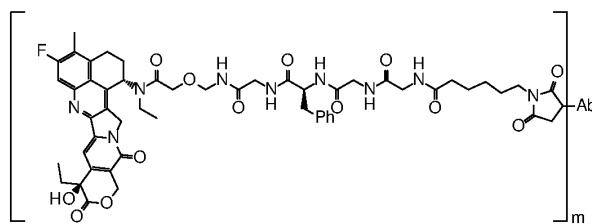
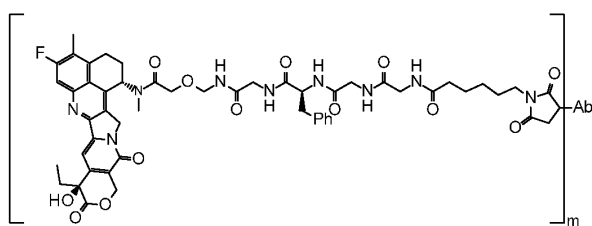
本发明的另一些实施方案中, 提供的通式(Ab-L-X-D₁)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或者溶剂化物, 其为通式(Ab-L_b-X-D₂)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物;

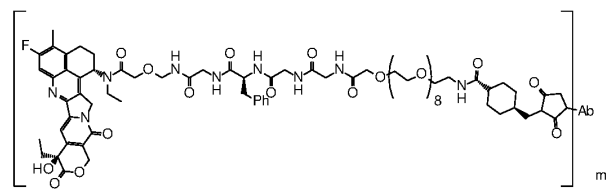
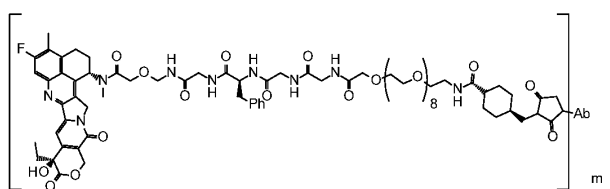
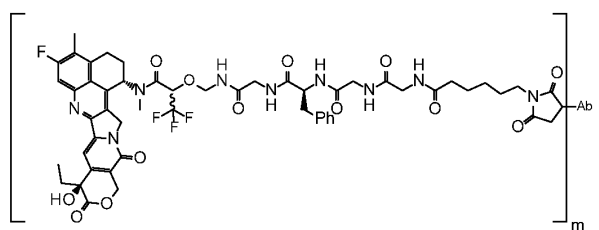
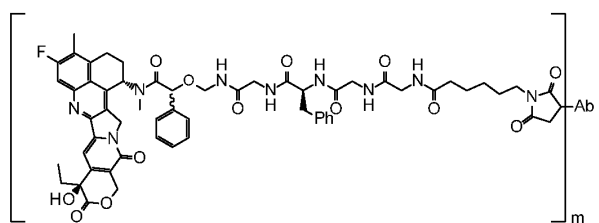
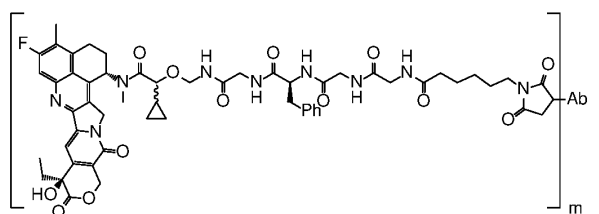
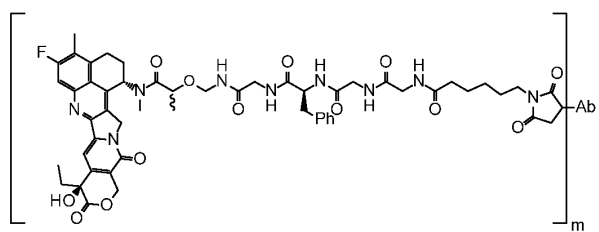
Ab-Lb-X-D₂

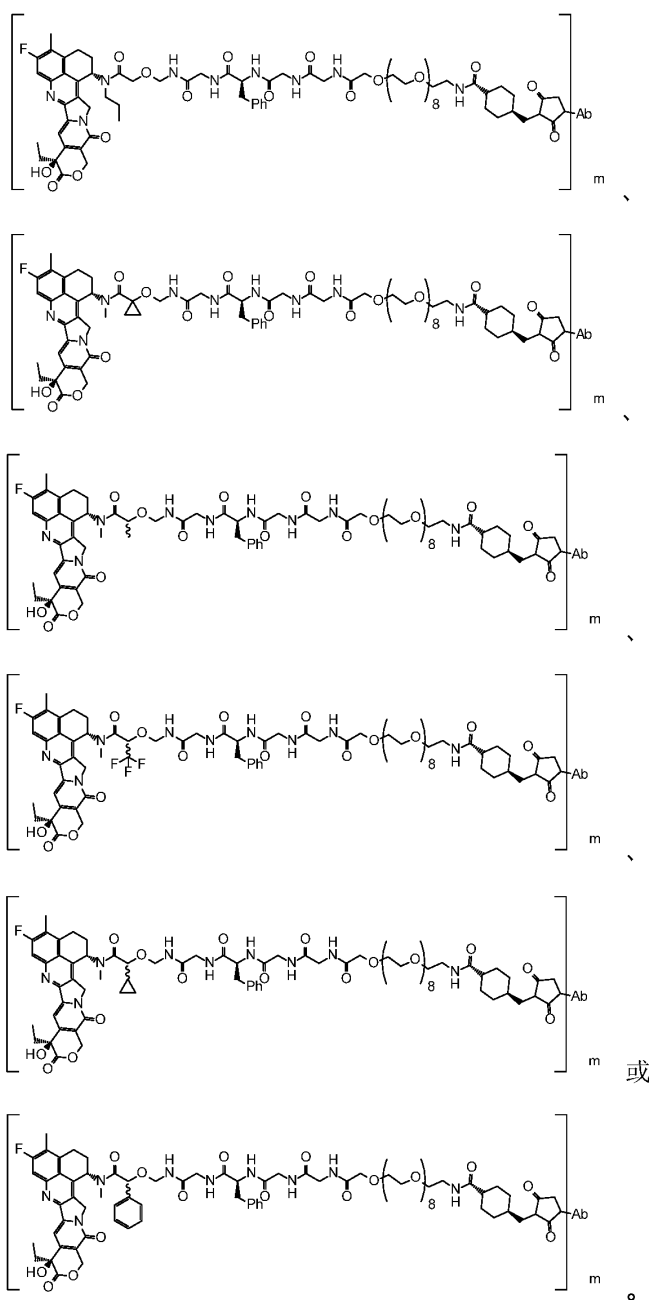
其中：

Ab、R^a、R^b、R⁷-R⁹、Z、m 和 n 如通式 (Ab-La-X-Dr) 所述。

本发明通式 (Ab-L-X-Dr) 所示的抗体-药物偶联物非限制性地选自以下结构:



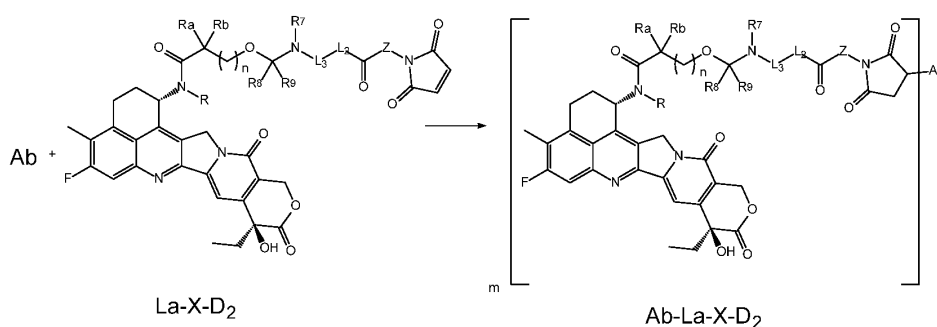




本发明的另一些实施方案中，所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述的 Ab 为抗体、抗体片段或者其抗原结合片段，所述的抗体选自嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体；优选为单克隆抗体。

本发明的另一些实施方案中，所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述的抗体、抗体片段或者其抗原结合片段非限制性地选自：抗 EGFRvIII 抗体、抗 DLL-3 抗体、抗 PSMA 抗体、抗 CD70 抗体、抗 MUC16 抗体、抗 ENPP3 抗体、抗 TDGF1 抗体、抗 ETBR 抗体、抗 MSLN 抗体、抗 TIM-1 抗体、抗 LRRC15 抗体、抗 LIV-1 抗体、抗 CanAg/AFP 抗体、抗 cladin 18.2 抗体、抗 Mesothelin 抗体、抗 HER2(ErbB2) 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 c-MET 抗体、抗 SLITRK6 抗体、抗 KIT/CD117 抗体、抗 STEAP1 抗体、抗 SLAMF7/CS1 抗体、抗 NaPi2B/SLC34A2 抗体、抗 GPNMB 抗体、抗 HER3(ErbB3) 抗体、抗 MUC1/CD227 抗体、抗 AXL 抗体、抗 CD166 抗体、抗 B7-H3(CD276) 抗体、抗 PTK7/CCK4 抗体、抗 PRLR 抗体、抗 EFNA4 抗体、抗 5T4 抗体、抗 NOTCH3 抗体、抗 Nectin 4 抗体、抗 TROP-2 抗体、抗 CD142 抗体、抗 CA6 抗体、抗 GPR20 抗体、抗 CD174 抗体、抗 CD71 抗体、抗 EphA2 抗体、抗 LYPD3 抗体、抗 FGFR2 抗体、抗 FGFR3 抗体、抗 FR α 抗体、抗 CEACAMs 抗体、抗 GCC 抗体、抗 Integrin Av 抗体、抗 CAIX 抗体、抗 P-cadherin 抗体、抗 GD3 抗体、抗 Cadherin 6 抗体、抗 LAMP1 抗体、抗 FLT3 抗体、抗 BCMA 抗体、抗 CD79b 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD74 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD37 抗体、抗 CD138 抗体、抗 CD352 抗体、抗 CD25 抗体或抗 CD123 抗体。

本发明的另一方面，提供了一种制备如通式 (Ab-L_a-X-D₂) 所示的抗体-药物偶联物或者其药学上可接受的盐或溶剂化物的方法，其包括如下步骤：



通过抗体、抗体片段或者其抗原结合片段与通式 (L_a-X-D₂) 偶联反应，得到通式 (Ab-La-X-D₂)；

其中：Ab 为抗体、抗体片段或者其抗原结合片段；

R、R^a、R^b、R⁷、R⁸、R⁹、L₂、L₃、Z 及 n 如上述通式 (Ab-La-X-D₂) 所定义。

本发明的另一方面，进一步涉及一种药物组合物，其含有根据本发明所述的通式 (D) 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本发明的另一方面，进一步涉及一种抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其包含配体和连接至配体的药物，其中所述药物选自本发明所述的通式(D)所示的化合物、通式 (L-X-Dr) 所示的化合物、或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，优选药物通过接头连接至配体，优选配体为单克隆抗体。

本发明的另一方面，进一步涉及一种抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的制备方法，包含将本发明所述的通式 (D) 所示的化合物、通式 (L-X-Dr) 所示的化合物、或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐与配体连接的步骤，优选通过接头连接，优选配体为单克隆抗体。

本发明的另一方面，进一步涉及本发明所述的抗体-药物偶联物或化合物、或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或其药物组合物，其用作药物。

本发明的另一方面，进一步涉及本发明所述的抗体-药物偶联物或化合物、或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或其药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途。

本发明的另一方面，进一步涉及本发明所述的抗体-药物偶联物或化合物、或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或药物组合物在制备治疗和/或预防癌症的药物的用途，所述癌症非限制性地选自：乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液肿瘤。

本发明的另一方面，进一步涉及一种用于治疗 and/or 预防肿瘤的方法，该方法包括向需要其的患者施用治疗有效剂量的本发明所述的抗体-药物偶联物或化合物、或其药学上可接受的盐或溶剂化物或包含其的药物组合物。

本发明的另一方面，进一步涉及一种用于治疗或预防癌症的方法，该方法包括向需要其的患者施用治疗有效剂量的本发明所述的抗体-药物偶联物或化合物、或其药学上可接受的盐或溶剂化物或包含其的药物组合物；所述癌症非限制性地选自：乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液肿瘤。

可将活性化合物制成适合于通过任何适当途径给药的形式，活性化合物优选是以单位剂量的方式，或者是以患者可以以单剂自我给药的方式。本发明化合物或组合物的单位剂量的表达方式可以是片剂、胶囊、扁囊剂、瓶装药水、药粉、颗粒剂、锭剂、栓剂、再生药粉或液体制剂。

本发明治疗方法中所用化合物或组合物的剂量通常将随疾病的严重性、患者的体重和化合物的相对功效而改变。不过，作为一般性指导，合适的单位剂量可以是 0.1-1000mg。

本发明的药物组合物除活性化合物外，可含有一种或多种辅料，所述辅料非限制性地选自以下成分：填充剂（稀释剂）、粘合剂、润湿剂、崩解剂或赋形剂等。根据给药方法的不同，组合物可含有 0.1 至 99 重量%的活性化合物。

含活性成分的药物组合物可以是适用于口服的形式，例如片剂、糖锭剂、锭剂、水或油混悬液、可分散粉末或颗粒、乳液、硬或软胶囊，或糖浆剂或酏剂。可按照本领域任何已知制备药用组合物的方法制备口服组合物，此类组合物可有粘合剂、填充剂、润滑剂、崩解剂或药学上可接受的润湿剂等，此类组合物还可以含有一种或多种选自以下的成分：甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂，以提供悦目和可口的药用制剂。

水悬浮液含有活性物质和用于混合的适宜制备水悬浮液的赋形剂。水混悬液也可以含有一种或多种防腐剂、一种或多种着色剂、一种或多种矫味剂和一种或多种甜味剂。

油混悬液可通过使活性成分悬浮于植物油中配制而成。油悬浮液可含有增稠剂。可加入上述的甜味剂和矫味剂，以提供可口的制剂。

药物组合物还可以是用于制备水混悬液的可分散粉末和颗粒提供活性成分，通过加入水混合分散剂、湿润剂、悬浮剂或防腐剂中的一种或多种。也可加入其他赋形剂例如甜味剂、矫味剂和着色剂。通过加入抗氧化剂例如抗坏血酸保存这些组合物。

本发明的药物组合物也可以是水包油乳剂的形式。

药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可以使用的可接受的溶媒或溶剂有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入患者的血流中。或者，最好按可保持本发明化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的实例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在肠胃外可接受的无毒稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。

可按用于直肠给药的栓剂形式给予本发明化合物。可通过将药物与在普通温度下为固体但在直肠中为液体，因而在直肠中会溶化而释放药物的适宜的无刺激性赋形剂混合来制备这些药物组合物。此类物质包括可可脂、甘油明胶、氢化植物油、各种分子量的聚乙二醇和聚乙二醇的脂肪酸酯的混合物。

如本领域技术人员所熟知的，药物的给药剂量依赖于多种因素，包括但并非限定于以下因素：所用具体化合物的活性、患者的年龄、患者的体重、患者的健康状况、患者的行

为、患者的饮食、给药时间、给药方式、排泄的速率、药物的组合等；另外，最佳的治疗方式如治疗的模式、通式化合物的日用量或可药用的盐的种类可以根据传统的治疗方案来验证。

附图说明

图 1 为 ADC 对 A431 荷瘤小鼠模型的体内药效；

图 2 为 本发明化合物 **6**、**12**、**14** 和 **16** 对 Fadu 细胞的体外活性数据图；

图 3 为 本发明化合物 **6**、**12**、**14** 和 **16** 对 A431 细胞的体外活性数据图；

图 4 为 本发明化合物 **6**、**12**、**14** 和 **16** 对 Bxpc-3 细胞的体外活性数据图；

图 5 为 本发明化合物 **6**、**12**、**14** 和 **16** 对 SW620 细胞的体外活性数据图。

具体实施方式

除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本发明，但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本发明时，依据以下定义使用下列术语。

当本发明中使用商品名时，申请人旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有相同的下述含义。

术语“抗体”是能识别和结合目标细胞相关的抗原或受体的大分子化合物。抗体的作用是将药物呈递给与抗体结合的目标细胞群，这些抗体包括但不限于蛋白类激素、凝集素、生长因子、抗体或其他能与细胞结合的分子。在本发明实施方式中，抗体表示为 **Ab**，抗体可通过其杂原子与连接单元形成连接键，优选为抗体或其抗原结合片段，所述抗体选自嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或鼠源抗体；优选为单克隆抗体。

术语“药物”是指细胞毒性药物，药物表示为 **D**，能在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。该术语包括毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，放射性同位素（例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素），毒性药物，化疗药物，抗生素和核溶酶，优选为毒性药物。

术语“接头单元”或“连接片段”或“连接单元”是指一端与配体连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键，也可以连接其他接头后再与药物相连。本发明的优选方案表示为 **L**

和 L₁-L₄, 其中 L₁端与配体相连, L₄端与结构单元 X 相连后与药物 (D) 相连。

连接头, 包括延伸物、间隔物和氨基酸单元, 可以通过本领域已知方法合成, 诸如 US2005-0238649A1 中所记载的。连接头可以是便于在细胞中释放药物的“可断裂接头”。例如, 可使用酸不稳定接头 (例如脲)、蛋白酶敏感 (例如肽酶敏感) 接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头 (Chari 等 *Cancer Research* 52: 127-131, 1992); 美国专利 No. 5, 208, 020)。

术语“抗体-药物偶联物”, 指抗体通过稳定的连接单元与具有生物活性的药物相连。在本发明中优选为抗体-药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC), 指把单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的连接单元与具有生物活性的毒性药物相连。

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

术语“抗体”指免疫球蛋白, 是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同, 故其抗原性也不同。据此, 可将免疫球蛋白分为五类, 或称为免疫球蛋白的同种型, 即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE, 其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别, 又可分为不同的亚类, 如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。本发明所述的抗体优选为针对靶细胞上细胞表面抗原的特异性抗体, 非限制性实施例为以下抗体: 抗 EGFRvIII 抗体、抗 DLL-3 抗体、抗 PSMA 抗体、抗 CD70 抗体、抗 MUC16 抗体、抗 ENPP3 抗体、抗 TDGF1 抗体、抗 ETBR 抗体、抗 MSLN 抗体、抗 TIM-1 抗体、抗 LRRC15 抗体、抗 LIV-1 抗体、抗 CanAg/AFP 抗体、抗 cladin 18.2 抗体、抗 Mesothelin 抗体、抗 HER2(ErbB2) 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 c-MET 抗体、抗 SLITRK6 抗体、抗 KIT/CD117 抗体、抗 STEAP1 抗体、抗 SLAMF7/CS1 抗体、抗 NaPi2B/SLC34A2 抗体、抗 GPNMB 抗体、抗 HER3(ErbB3) 抗体、抗 MUC1/CD227 抗体、抗 AXL 抗体、抗 CD166 抗体、抗 B7-H3(CD276) 抗体、抗 PTK7/CCK4 抗体、抗 PRLR 抗体、抗 EFNA4 抗体、抗 5T4 抗体、抗 NOTCH3 抗体、抗 Nectin 4 抗体、抗 TROP-2 抗体、抗 CD142 抗体、抗 CA6 抗体、抗 GPR20 抗体、抗 CD174 抗体、抗 CD71 抗体、抗 EphA2 抗体、抗 LYPD3 抗体、抗 FGFR2 抗体、抗 FGFR3 抗体、抗 FR α 抗体、抗 CEACAMs 抗体、抗 GCC 抗体、抗 Integrin α_v 抗体、抗 CAIX 抗体、抗 P-cadherin 抗体、抗 GD3 抗体、抗 Cadherin 6 抗体、抗 LAMP1 抗体、抗 FLT3 抗体、抗 BCMA 抗体、抗 CD79b 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD33 抗体、抗

CD56 抗体、抗 CD74 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD37 抗体、抗 CD138 抗体、抗 CD352 抗体、抗 CD25 抗体或抗 CD123 抗体。

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区（Fv 区）；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括 3 个高变区 (HVR) 和 4 个序列相对保守的骨架区 (FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区 (CDR)。每条轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR) 由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体，优选人源化抗体和全人源抗体。

术语“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能用鼠制备抗体。制备时用特定抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交

术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。

术语“人源化抗体 (humanized antibody) 也称为 CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody)，是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（在因特网 www.mrccpe.com/ac.uk/vbase 可获得），以及在 Kabat, E. A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。本发明的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。进一步描述参与人源化可使用小鼠抗体的方法的文献包括，例如 Queen 等, Proc., Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869, 1991 和 Winter 及其同事的方法 [Jones., Nature, 321, 522, (1986)], Riechmann, 等[Nature, 332, 323-327, 1988], Verhoeyen, 等, Science, 239, 1534(1988)]。

术语“全人源抗体”、“全人抗体”或“完全人源抗体”，也称“全人源单克隆抗体”，其抗体

的可变区和恒定区都是人源的，去除免疫原性和毒副作用。单克隆抗体的发展经历了四个阶段，分别为：鼠源性单克隆抗体、嵌合性单克隆抗体、人源化单克隆抗体和全人源单克隆抗体。本发明为全人源单克隆抗体。全人抗体制备的相关技术主要有：人杂交瘤技术、EBV 转化 B 淋巴细胞技术、噬菌体显示技术(phage display)、转基因小鼠抗体制备技术(transgenic mouse)和单个 B 细胞抗体制备技术等。

术语“抗原结合片段”是指抗体的保持特异性结合抗原的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii)F(ab')₂ 片段，包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段，(iii)由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv)由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段；(v)单结构域或 dAb 片段(Ward 等人, (1989)Nature341 : 544-546)，其由 VH 结构域组成；和(vi)分离的互补决定区 (CDR)或(vii)可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的 CDR 的组合。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码，但可使用重组方法，通过合成的接头连接它们，从而使得其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链（称为单链 Fv(scFv);参见，例如，Bird 等人 (1988)Science242 : 423-426 和 Huston 等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA85: 5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

Fab 是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶（切割 H 链的 224 位的氨基酸残基）处理 IgG 抗体分子所获得的片段中的具有约 50,000 的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，其中 H 链 N 端侧的约一半和整个 L 链通过二硫键结合在一起。

F(ab')₂ 是通过用酶胃蛋白酶消化 IgG 铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约 100,000 并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个 Fab 区的抗体片段。

Fab'是通过切割上述 F(ab')₂ 的铰链区的二硫键而获得的分子量为约 50,000 并具有抗原结合活性的抗体片段。

此外，可以通过将编码抗体的 Fab'片段的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 Fab'来生产所述 Fab'。

术语“单链抗体”、“单链 Fv ”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域

(或区域; (H)和抗体轻链可变结构域(或区域; VL)的分子。此类 scFv 分子可具有一般结构: $\text{NH}_2\text{-VL-接头-VH-COOH}$ 或 $\text{NH}_2\text{-VH-接头-VL-COOH}$ 。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成, 例如使用 1-4 个重复的变体(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. Immuno* 1. 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。

术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。所述 6 个 CDR 的最常用的定义之一由 Kabat E. A. 等人, (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication91-3242) 提供。如本文中使用的, CDR 的 Kabat 定义只应用于轻链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3(CDR L1、CDRL2、CDRL3 或 L1、L2、L3), 以及重链可变结构域的 CDR2 和 CDR3(CDR H2、CDR H3 或 H2、H3)。

术语“抗体框架”, 是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分, 其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲, 其是不具有 CDR 的可变结构。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸。参见, 例如, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, 第 66 卷, G. E. Morris, 等. (1996)。

术语“特异性结合”“选择性结合”“选择性地结合”和“特异地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常, 抗体以大约小于 10^{-7} M, 例如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力(KD)结合。

术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的, 但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时, 核酸是“有效连接的”。例如, 如果启动子或增强子影响编码序列的转录, 那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中, 载体是“质粒”, 其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中, 载体是病毒载体, 其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本文中发明的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如, 具有细菌的复制起点的细菌载

体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组,从而随宿主基因组一起复制(例如,非附加型哺乳动物载体)。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个个人源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件,从1mMunoGeneTics(MGT)的网站<http://imgt.cines.fr>得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001ISBN012441351上获得。

术语“宿主细胞”是指已经向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(*enterobacteriaceae*)的成员,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)的菌株;芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌(*Pneumococcus*);链球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)和NS0细胞。

本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,编码重链和轻链的cDNA序列,可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,特别是在Fc区的高度保守N端位点。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如,用含调整过的缓冲液的A或G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用PH梯度法洗脱结合的抗体,用SDS-PAGE检测抗体片段,收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

术语“肽”是指介于氨基酸和蛋白质之间的化合物片段,由2个或2个以上氨基酸分子通过肽键相互连接而成,是蛋白质的结构与功能片段,如激素、酶类等本质上都是肽。

术语“糖”是指由C、H、O三种元素组成的生物大分子,可分为单糖、二糖和多糖等。

术语“荧光探针”是指在紫外-可见-近红外区有特征荧光,并且其荧光性质(激发和发射波长、强度、寿命和偏振等)可随所处环境的性质,如极性、折射率、粘度等改变而灵敏地改变的一类荧光性分子,其与核酸(DNA或RNA)、蛋白质或其他大分子结构非共价相互作用而使一种或几种荧光性质发生改变,可用于研究大分子物质的性质和行为。

术语“毒性药物”是指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。包括毒

素和其他能用于肿瘤治疗的化合物。

术语“毒素”是指能够对细胞的生长或增殖产生有害效果的任何物质，可以是来自细菌、真菌、植物或动物的小分子毒素及其衍生物，包括喜树碱类衍生物如伊沙替康，美登木素生物碱及其衍生物（CN101573384）如 DM1、DM3、DM4，auristatin F（AF）及其衍生物，如 MMAF、MMAE、3024（WO 2016/ 127790 A1），白喉毒素、外毒素、蓖麻毒蛋白（ricin）A 链、相思豆毒蛋白（abrin）A 链、modeccin、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(Aleutites fordii)毒蛋白、香石竹(dianthin) 毒蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)毒蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(Momordica charantia)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(saponaria officinalis)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin) 局限曲霉素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。

术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1, 1-二甲基丙基、1, 2-二甲基丙基、2, 2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1, 1, 2-三甲基丙基、1, 1-二甲基丁基、1, 2-二甲基丁基、2, 2-二甲基丁基、1, 3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2, 3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2, 3-二甲基戊基、2, 4-二甲基戊基、2, 2-二甲基戊基、3, 3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2, 3-二甲基己基、2, 4-二甲基己基、2, 5-二甲基己基、2, 2-二甲基己基、3, 3-二甲基己基、4, 4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2, 2-二乙基戊基、正癸基、3, 3-二乙基己基、2, 2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1, 1-二甲基丙基、1, 2-二甲基丙基、2, 2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1, 1, 2-三甲基丙基、1, 1-二甲基丁基、1, 2-二甲基丁基、2, 2-二甲基丁基、1, 3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2, 3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、

卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“杂烷基”指含有一个或多个选自 N、O 或 S 的杂原子的烷基，其中烷基如上所定义。

术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基，其具有 2 个从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子，更优选含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性实例包括但不限于亚甲基(-CH₂-)、1, 1-亚乙基[-CH(CH₃)-]、1, 2-亚乙基(-CH₂CH₂-)、1, 1-亚丙基[-CH(CH₂CH₃)-]、1, 2-亚丙基 [-CH₂CH(CH₃)-]、1, 3-亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1, 4-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)和 1, 5-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基所取代。

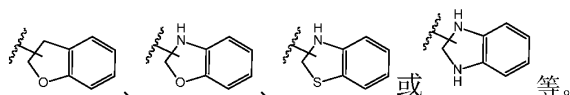
术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基)，其中烷基或环烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 12 个碳原子，更优选包含 3 至 10 个碳原子，最优选包含 3 至 8 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至 20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 S(O)_u（其中 u 是整数 0 至 2）的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子，其中 1~4 个是杂原子；更优选环烷基环包含 3 至 10 个环原子。单环杂环基的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和

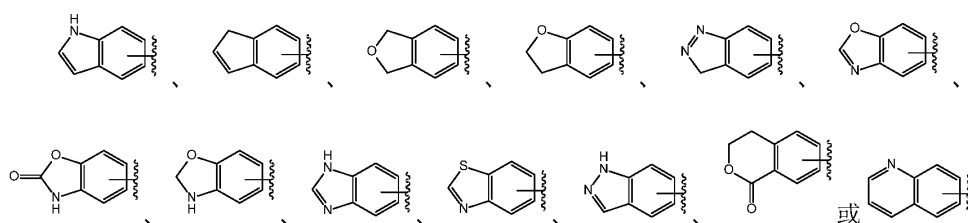
桥环的杂环基。

所述杂环基环可以耦合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂环基，其非限制性实例包括：



杂环基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

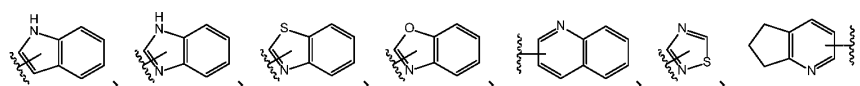
术语“芳基”指具有共轭的π电子体系的 6 至 14 元全碳单环或耦合多环（也就是共享毗邻碳原子对的环）基团，优选为 6 至 10 元，例如苯基和萘基，优选苯基。所述芳基环可以耦合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性实例包括：

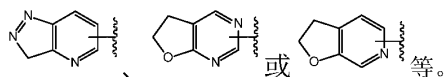


等。

芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为 5 至 10 元，更优选为 5 元或 6 元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、*N*-烷基吡咯基、噻唑基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以耦合于芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性实例包括：





杂芳基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“氨基保护基”是为了使分子其它部位进行反应时氨基保持不变，用易于脱去的基团对氨基进行保护。非限制性实施例包含 9-苄甲氧羰基、叔丁氧羰基、乙酰基、苄基、烯丙基和对甲氧苄基等。这些基团可任选地被选自卤素、烷氧基或硝基中的 1-3 个取代基所取代。所述氨基保护基优选为 9-苄甲氧羰基。

术语“环烷基烷基”指烷基被一个或多个环烷基取代，优选被一个环烷基取代，其中烷基如上所定义，其中环烷基如上所定义。

术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代，其中烷基如上所定义。

术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代，其中烷基如上所定义。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“氨基”指-NH₂。术语“硝基”指-NO₂。

术语“酰胺基”指-C(O)N-（烷基）或（环烷基），其中烷基、环烷基如上所定义。

术语“羧酸酯基”指-C(O)O-（烷基）或（环烷基），其中烷基、环烷基如上所定义。

本发明还包括各种氘化形式的式（D）化合物。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式（D）化合物。在制备氘代形式的式（D）化合物时可使用市售的氘代起始物质，或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成，氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

“取代”或“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多 5 个，更优选为 1-3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻，取代基仅处在它们的可能的化学位置，本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定（通过实验或理论）可能或

不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和（如烯属）键的碳原子结合时可能是不稳定的。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本发明抗体-药物偶联物的盐，或本发明中所述的化合物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性，本发明抗体-药物偶联化合物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐，药学上可接受的盐的非限制性实例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

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

术语“载药量”是分子中每个抗体上加载的细胞毒性药物平均数量，也可以表示为药物量和抗体量的比值，药物载量的范围可以是每个抗体(Ab)连接 0-12 个，优选 1-10 个细胞毒性药物(D)。在本发明的实施方式中，载药量表示为 m ，示例性的可以为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 的均值。可用常规方法如 UV/可见光光谱法，质谱，ELISA 试验和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个 ADC 分子的药物品均数量。

本发明的一个实施方式中，细胞毒性药物通过连接单元偶联在配体的 N 端氨基和/或赖氨酸残基的 ϵ -氨基上，一般地，偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量，包括：

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

常规的药物组合物的制备见中国药典。

术语“载体”用于本发明的药物，是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药

物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的实例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的黏合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入患者的血流中。或者，最好按可保持本发明化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的实例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液，例如 1, 3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的，可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

本发明涉及一类可裂解的特定结构的连接子和特定结构的药物，及由连接子、药物与抗体组成的抗体药物偶联物(ADC)。此类 ADC 是经由间隔物将一种毒性物质连于抗体而形成的复合物。该抗体偶联药物(ADC)在体内经降解而释放出活性分子，从而起到相应的作用。

本发明的合成方法

缩写和定义

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

术语“烷基”是指具有 1-20 个碳原子的饱和烃基团。亚烷基基团的实施例包括但不限于甲基 ($-\text{CH}_3$)、乙基 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_3$)、正丙基、正丁基、正戊基和正己基。

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

“酸性氨基酸”指氨基酸的等电点小于 7，酸性氨基酸分子中往往带有 1 个或多个羧基等酸性基团，在结构中可有效电离为负离子形式而增加亲水性。酸性氨基酸可以为天然的，也可为非天然的氨基酸。

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

“非天然氨基酸”指通过合成手段所获得的氨基酸。

配体单元是与靶标部分特异性结合的靶向剂。所述配体能够特异性结合至细胞组分或结合至细胞组分或结合至其他感兴趣的靶标分子。靶标部分或靶标通常在细胞表面上。在一些方面中，配体单元的作用是将药物单元递送至配体单元与之相互作用的特定靶细胞群。配体包括但不限于蛋白质、多肽和肽，以及非蛋白质如糖。合适的配体单元包括，例如，抗体，例如全长（完整）抗体及其抗原结合片段。在配体单元是非抗体靶向试剂的实施方式中，其可以是肽或多肽，或非蛋白质分子。这类靶向试剂的示例包括干扰素、淋巴因子、激素、生长因子和集落刺激因子、维生素、营养转运分子、或任何其他细胞结合分子或物

质。在一些实施方式中，连接子共价连接至配体的硫原子。在一些方面中，硫原子是半胱氨酸残基的硫原子，其形成抗体的链间二硫键。在另一方面中，硫原子是已经导入配体单元的半胱氨酸残基的硫原子，其形成抗体的链间二硫键。在另一方面中，硫原子是已经导入配体单元的半胱氨酸残基的硫原子（例如，通过定点诱变或化学反应）。在其他方面中，连接子结合的硫原子选自形成抗体的链间二硫键的半胱氨酸残基或已经引入配体单元的额外半胱氨酸残基（例如，通过定点诱变或化学反应）。在一些实施方式中，按照 Kabat（Kabat E.A 等，（1991））《免疫学感兴趣的蛋白质序列》（Sequences of proteins of Immunological Interest），第五版，NIH 出版物 91-3242）中的 EU 索引编号系统。

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

本发明中组成抗体药物偶联物的抗体最好保持其原有野生状态时的抗原结合能力。因此，本发明中的抗体能够，最好专一性的与抗原结合。涉及的抗原包括，例如，肿瘤相关抗原（TAA），细胞表面受体蛋白和其他细胞表面分子，细胞存活调节因子，细胞增殖调节因子，与组织生长与分化相关的分子（如已知或预知的具有功能性的），淋巴因子，细胞因子，参与细胞循环调节的分子，参与血管生成的分子，以及与血管生成有关的分子（如已知或预知的具有功能性的）。肿瘤相关因子可以是簇分化因子（如 CD 蛋白）。与本发明中所述

应用在抗体药物偶联物中的抗体包括，但不局限于，针对细胞表面受体和肿瘤相关抗原的抗体。这样的肿瘤相关抗原是业内所熟知的，可以通过业内熟知的抗体制备方法和信息来制备。为了开发可用于癌症诊断与治疗的有效的细胞水平目标物，研究人员力图找寻跨膜或其他肿瘤相关多肽。这些目标物能够特异性的表达在一种或多种癌细胞表面，而在一种或多种非癌细胞表面表达很少或不表达。通常，相对于非癌细胞表面而言，这样的肿瘤相关多肽在癌细胞表面更加过度表达。确认这样的肿瘤相关因子，可大大提高基于抗体治疗癌症的专一靶向特性。

肿瘤相关抗原包括，但不局限于以下列出的肿瘤相关抗原（1）-（36）。为方便起见，为业内所熟知的抗原相关信息标示如下，包括名称，其他名称，基因库登录号。与肿瘤相关抗原对应的核酸和蛋白序列可参见公开数据库，例如 Genbank。抗体靶向对应的肿瘤相关抗原包括所有的氨基酸序列变种和同种，与参考文献中确认的序列具有至少 70%，80%，

85%，90%，或者 95%的同源性，或者具备与引用文献中的肿瘤相关抗原序列具有完全一致的生物性质和特征。

术语“抑制”或“的抑制”指，减少了可检测的量，或完全阻止。

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

术语“自身免疫疾病”是源自针对个体自身的组织或蛋白质的疾病或紊乱。

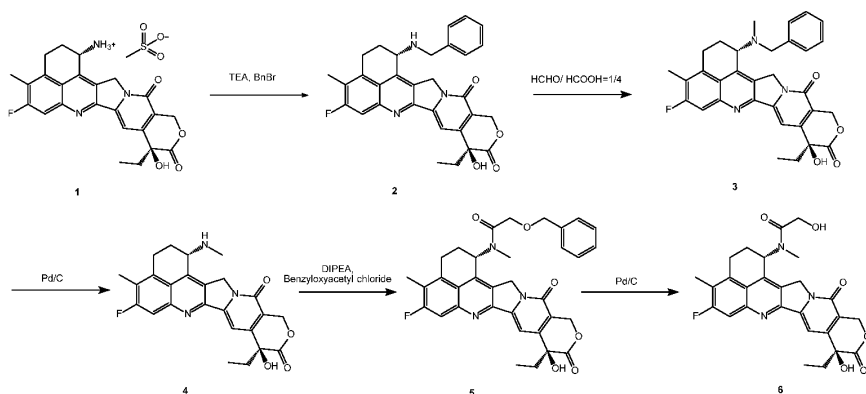
本文中所用的短语“药学上可接受的盐”指的是，化合物（例如，药物，药物-接头或配体-接头-药物偶联物）的药学上可接受的有机或无机盐。该化合物可含有至少一个氨基或羧基，并且因此可与相应的酸或碱形成加成盐。示例性的盐包括但不限于：硫酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、单宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、甲酸盐、本甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐，钾盐、钠盐等。另外，药学上可接受的盐在结构中具有超过一个的带点原子。其中多个带电原子是药学上可接受的盐的一部分的示例能有多于一个抗衡例子。例如，药学上可接受的盐具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡原子。

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

对于含有不可断裂连接子的抗体药物偶联物，其药物释放机制为：偶联物与抗原结合并被细胞内吞后，抗体在溶酶体中被酶解，释放出由小分子药物，连接子，和抗体氨基酸残基共同组成的活性分子。由此带来的药物分子结构改变并不减弱其细胞毒性，但由于活性分子是带电荷的（氨基酸残基），从而导致其不能渗入邻近细胞。因此，此类活性药物不能杀死邻近不表达靶向抗原（抗原阴性细胞）的肿瘤细胞（旁观者效应，bystander effect）（Ducry 等，2010，Bioconjugate Chem.21:5-13）。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不是用于限制本发明的范围。除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

实施例 1:



化合物 **2** 的合成:

向伊喜替康甲磺酸盐 **1** (150.0 mg, 282.4 μmol , 采用专利申请“EP0737683A1”所公开的方法制备) 中加入 8 mL DMF, 冰水浴冷却至 0°C, 滴加 5 滴三乙胺, 调节 pH 至 7-8, 冰水浴下滴加 2 滴溴化苄, 升温至室温 (25°C) 下反应 1 小时, TLC 监测反应完全, 反应液减压浓缩, 所得粗产品经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **2** 约 110 mg, 黄色固体, 收率约 74%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 526.3。

化合物 **3** 的合成:

室温下, 于 25 mL 单口瓶中依次加入化合物 **2** (110 mg, 209.4 μmol), 4 mL 甲酸溶解, 向所得亮黄色溶液中加入 1 mL 甲醛 (40%水溶液), 升温至 50°C 下反应 1 小时后, TLC 监测反应完全, 冷却至室温, 反应液经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **3** 约 45 mg, 黄色粉末状固体, 收率约 40%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 540.6。

化合物 **4** 的合成:

室温下, 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **3** (23 mg, 42.7 μmol), 加入 2 mL DMF 溶解, 向所得亮黄色溶液中加入 23 mg 5% Pd/C, 氢气气球置换体系内气氛, 维持室温下反应 1.5 小时后, HPLC 监测反应完全, 过滤除去 Pd/C, 所得反应液浓缩后, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **4** 约 10 mg, 黄色粉末状固体, 收率约 52%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 450.5。

化合物 **5** 的合成:

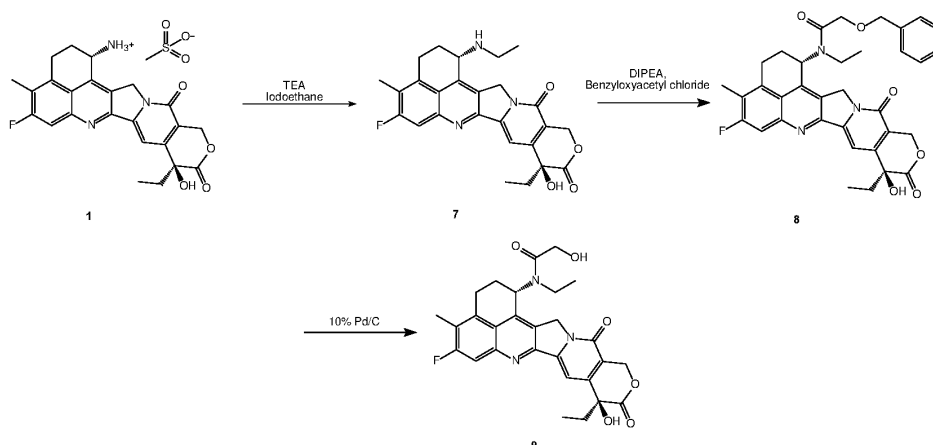
室温下, 于 5 mL 瓶中加入化合物 **4** (10 mg, 22.3 μmol), 加入 2 mL DMF 溶解, 向所得溶液中依次加入 DIPEA (7.8 μL , 2 eq), 苄氧基乙酰氯 (8.2 mg, 2 eq), 维持室温下反应

0.5 小时, TLC 监测反应完全, 所得反应液浓缩后, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **5** 约 11 mg, 黄色粉末状固体, 收率约 83%, MS m/z : $[M+H]^+$ 598.3。

化合物 **6** 的合成:

室温下, 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **5** (11 mg, 18.4 μmol), 加入 1 mL DMF 溶解, 向所得溶液中加入 11 mg 10% Pd/C, 氢气气球置换体系内气氛, 维持室温下反应 1 小时, TLC 监测反应完全, 过滤除去 Pd/C, 所得反应液浓缩后, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **6** 约 2.6 mg, 黄色粉末状固体, 收率约 28%, MS m/z : $[M+H]^+$ 508.2。

实施例 2:



化合物 **7** 的合成:

向伊喜替康甲磺酸盐 **1** (100.0 mg, 188.3 μmol , 采用专利申请 “EP0737683A1” 所公开的方法制备) 中加入 4 mL DMF, 冰水浴冷却至 0°C, 滴加三乙胺 (105 μL , 4eq), 冰水浴下滴加碘乙烷 (34 μL , 1.5 eq), 升温至室温 (25°C) 下反应 4 小时后, 反应液减压浓缩, 所得粗产品经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **7** 约 11 mg, 黄色固体, 收率约 13%, MS m/z : $[M+H]^+$ 464.2。

化合物 **8** 的合成:

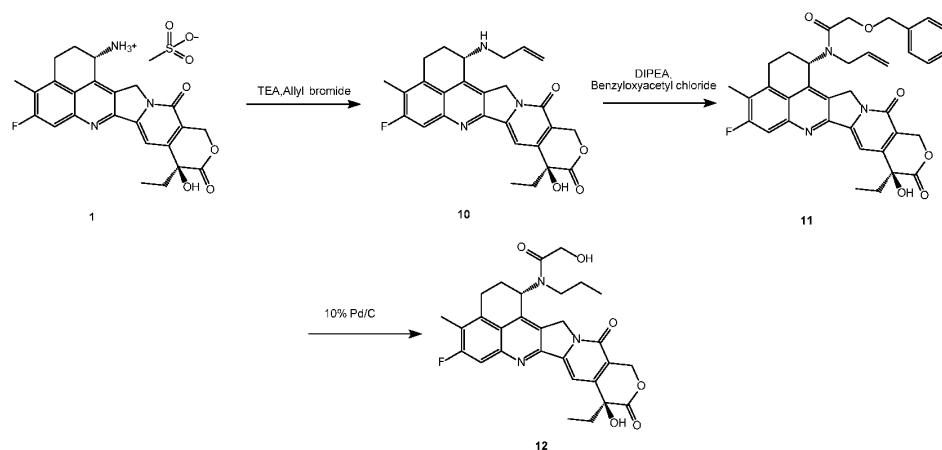
室温下, 于 25 mL 瓶中加入化合物 **7** (10 mg, 22 μmol), 加入 2 mL DMF 溶解, 向所得溶液中依次加入 DIPEA (8 μL , 2 eq), 苄氧基乙酰氯 (8 mg, 2 eq), 维持室温下反应 0.5 小时, TLC 监测反应完全, 所得反应液浓缩后, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯

水体系)，收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **8** 约 8 mg，黄色固体，收率约 60%，MS m/z : $[M+H]^+$ 612.7。

化合物 **9** 的合成：

室温下，于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **8** (8 mg, 13.1 μmol)，加入 2 mL DMF 溶解，向所得溶液中加入 8 mg 10% Pd/C，氢气气球置换体系内气氛，维持室温下反应 3 小时后，过滤除去 Pd/C，TLC 监测反应完全，所得反应液浓缩后，经制备级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **9** 约 3.5 mg，黄色固体，收率约 51%，MS m/z : $[M+H]^+$ 522.2。

实施例 3：



化合物 **10** 的合成：

向伊喜替康甲磺酸盐 **1** (100.0 mg, 188.3 μmol ，采用专利申请“EP0737683A1”所公开的方法制备) 中加入 4 mL DMF，冰水浴冷却至 0°C，滴加三乙胺 (105 μL , 4eq)，冰水浴下滴加烯丙基溴 (24.4 μL , 1.5 eq)，升温至室温 (25°C) 下反应 4 小时，反应液减压浓缩，所得粗产品经制备级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **10** 约 13 mg，黄色固体，收率约 15%，MS m/z : $[M+H]^+$ 476.2。

化合物 **11** 的合成：

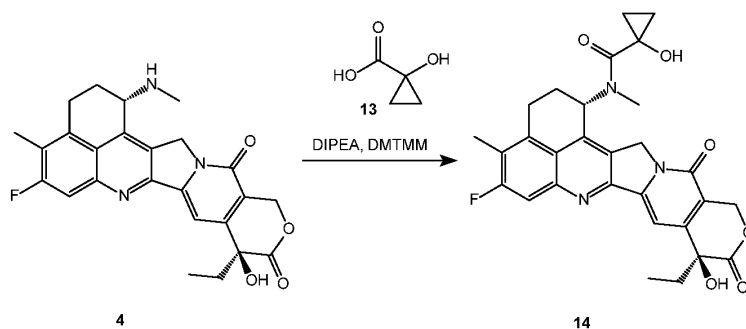
室温下，于 25 mL 瓶中加入化合物 **10** (10 mg, 21 μmol)，加入 2 mL DMF 溶解，向所得溶液中依次加入 DIPEA (8 μL , 2 eq)，苄氧基乙酰氯 (8 mg, 2 eq)，维持室温下反应 0.5 小时，HPLC 监测反应完全，所得反应液浓缩后，经制备级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯

水体系)，收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **11** 约 7 mg，黄色固体，收率约 53%，MS m/z : $[M+H]^+$ 624.6。

化合物 **12** 的合成：

室温下，于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **11** (6 mg, 10 μ mol)，加入 2 mL DMF 溶解，向所得溶液中加入 6 mg 10% Pd/C，氢气气球置换体系内气氛，维持室温下反应 3 小时后，过滤除去 Pd/C，TLC 监测反应完全，所得反应液浓缩后，经制备级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **12** 约 2.7 mg，黄色固体，收率约 50%，MS m/z : $[M+H]^+$ 536.2。

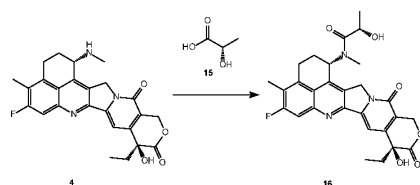
实施例 4：



化合物 **14** 的合成：

室温下，于 10 mL 瓶中加入化合物 **4** (3 mg, 6.7 μ mol)，加入 2 mL DMF 溶解，冰水浴冷却至 0℃，向所得溶液中依次加入 DIPEA (2.2 μ L, 2 eq)，1-羟基环丙基甲酸 **13** (1.4 mg, 2 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 4 mg, 2 eq)，维持 0℃ 下反应 2 小时，TLC 监测反应完全，0℃ 下向所得反应液中加入 5 mL 饱和 NaCl 水溶液淬灭反应，水相经乙酸乙酯 (10 mL $\times$ 3) 萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液经减压浓缩，经制备级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **14** 约 1.6 mg，黄色固体，收率约 45%，MS m/z : $[M+H]^+$ 534.2。

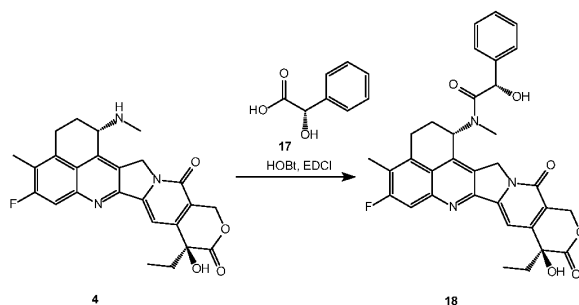
实施例 5：



化合物 **16** 的合成:

室温下, 于 10 mL 瓶中加入化合物 **4** (3 mg, 6.7 μmol), 加入 1 mL 无水乙醇、0.2 mL DMF 以及 0.15 mL NMM 溶解, 冰水浴冷却至 0°C, 向所得溶液中依次加入 *L*-(+)-乳酸 (2.4 mg, 4 eq), 1-羟基苯并三唑 HOBt (3.7 mg, 4 eq) 以及 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺基盐酸盐 EDCI (5.1 mg, 4 eq), 自然升温至室温后反应 2 小时, HPLC 监测反应结束, 直接将反应液减压浓缩, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **16** 约 2 mg, 黄色固体, 收率约 60%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 522.2。

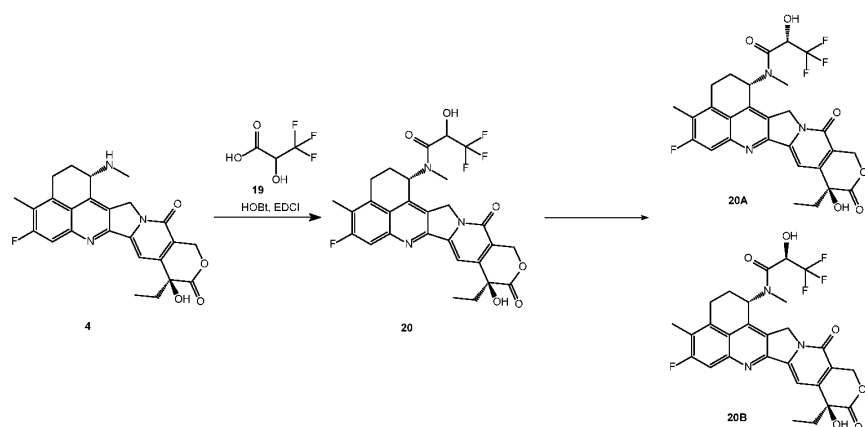
实施例 6:



化合物 **18** 的合成:

室温下, 于 10 mL 瓶中加入化合物 **4** (3 mg, 6.7 μmol), 加入 1 mL 无水乙醇、0.2 mL DMF 以及 0.15 mL NMM 溶解, 冰水浴冷却至 0°C, 向所得溶液中依次加入 *L*-扁桃酸 (4.1 mg, 4 eq), 1-羟基苯并三唑 HOBt (3.7 mg, 4 eq) 以及 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺基盐酸盐 EDCI (5.1 mg, 4 eq), 自然升温至室温后反应 4 小时, TLC 检测反应结束, 直接将反应液减压浓缩, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **18** 约 2.4 mg, 黄色粉末状固体, 收率约 61%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 584.1。

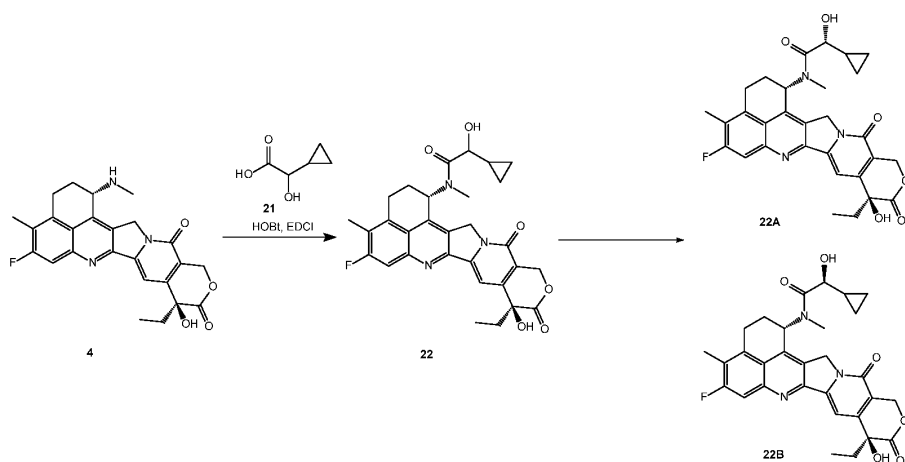
实施例 7:



化合物 **20** 的合成:

室温下, 于 10 mL 瓶中加入化合物 **4** (3 mg, 6.7 μmol), 加入 1 mL 无水乙醇、0.2 mL DMF 以及 0.15 mL NMM 溶解, 冰水浴冷却至 0°C , 向所得溶液中依次加入三氟乳酸 (3.9 mg, 4 eq), 1-羟基苯并三唑 HOBt (3.7 mg, 4 eq) 以及 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺基盐酸盐 EDCI (5.1 mg, 4 eq), 自然升温至室温后反应 1 小时, 直接将反应液减压浓缩, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **20A** 约 1.2 mg, 黄色粉末状固体, 化合物 **20B** 约 1.2 mg, 黄色粉末状固体, 收率约 61%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 576.4。

实施例 8:

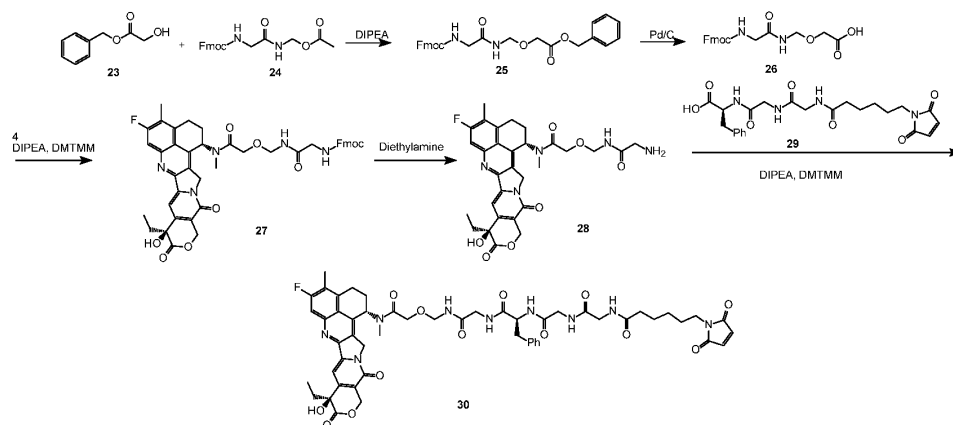


化合物 **22** 的合成:

室温下, 于 10 mL 瓶中加入化合物 **4** (4 mg, 8.9 μmol), 加入 1 mL 无水乙醇、0.2 mL DMF 以及 0.15 mL NMM 溶解, 冰水浴冷却至 0°C , 向所得溶液中依次加入化合物 **21** (4.1 mg, 4 eq 采用专利申请 “WO2013106717” 公开的方法制备), 1-羟基苯并三唑 HOBt (3.7 mg,

4 eq) 以及 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺基盐酸盐 EDCI (5.1 mg, 4 eq), 自然升温至室温后反应 2 小时, TLC 监测反应结束, 直接将反应液减压浓缩, 经制备级高效液相色谱法纯化(乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **22A** 约 1.5 mg, 黄色固体, 化合物 **22B** 约 1.5 mg, 黄色固体, 收率约 59%, MS m/z : $[M+H]^+$ 576.1。

实施例 9:



化合物 **25** 的合成:

0℃下, 于 50 mL 单口瓶中加入化合物 **23** (800 mg, 4.8 mmol), 加入 50 mL DMF 向所得溶液中加入 DIPEA (0.8 mL, 1 eq), 以及化合物 **24** (1767.0 mg, 1 eq), 自然升温至室温后反应 2 小时, 直接将反应液减压浓缩, 经制备级高效液相色谱法纯化(乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **25** 约 727 mg, 黄色固体, 收率约 32%, MS m/z : $[M+H]^+$ 475.5。

化合物 **26** 的合成:

室温下, 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **25** (727 mg, 1.5 mmol), 加入 15 mL DMF 溶解, 向所得溶液中加入 750 mg 5% Pd/C, 氢气球置换体系内气氛, 维持室温下反应 3 小时, TLC 监测反应完成后, 过滤除去 Pd/C, 所得反应液浓缩后, 直接用于下一步反应。

化合物 **27** 的合成:

室温下, 于 25 mL 瓶中加入化合物 **26**, 加入 15 mL DMF 溶解, 冰水浴冷却至 0℃, 向所得溶液中依次加入 DIPEA (47 uL, 2 eq), 化合物 **4** (1343.3 mg, 2 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 884 mg, 2 eq), 维持 0℃下反应 2 小时, HPLC 监测反应结束, 向所得反应液中加入 5 mL 饱和 NaCl 水溶液淬灭反应, 水相经乙酸乙酯 (10 mL X 3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液经减压浓缩, 经制备

级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **27** 约 311 mg，黄色固体，两步收率约 25%，MS m/z : $[M+H]^+$ 816.9。

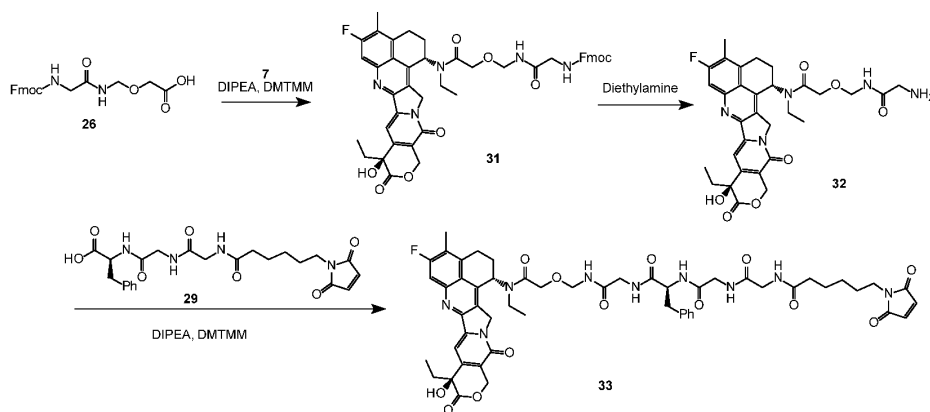
化合物 **28** 的合成：

0℃下，于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **27** (310 mg, 0.38 mmol)，加入 5 mL DMF 溶解，向所得溶液中加入 Diethylamine (80 μ L, 0.76 mmol)，自然升温至室温，维持室温下反应 3 小时后，所得反应液浓缩后，直接用于下一步反应。

化合物 **30** 的合成：

室温下，于 10 mL 单口瓶中加入化合物 **28**，加入 5 mL DMF 溶解，冰水浴冷却至 0℃，向所得溶液中依次加入 DIPEA (126 μ L, 2 eq)，化合物 **29** (178 mg, 1 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 224 mg, 2 eq)，维持 0℃下反应 2 小时，TLC 监测反应完成，向所得反应液中加入 10 mL 饱和 NaCl 水溶液淬灭反应，水相经乙酸乙酯 (20 mL X 3) 萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液经减压浓缩，经制备级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **30** 约 15 mg，黄色固体，两步收率约 1.4%，MS m/z : $[M+H]^+$ 1048.1。

实施例 10：



化合物 **31** 的合成：

室温下，于 25mL 瓶中加入化合物 **26** (50 mg, 0.13 mmol)，加入 5 mL DMF 溶解，冰水浴冷却至 0℃，向所得溶液中依次加入 DIPEA (43 μ L, 2 eq)，化合物 **7** (60 mg, 1 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 77 mg, 2 eq)，维持 0℃下反应 4 小时，TLC 监测反应结束，向所得反应液中加入 15 mL 水淬灭反应，水相经乙酸乙酯 (20 mL X 3) 萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液经减压浓缩，经制备

级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **31** 约 36 mg，黄色固体，收率约 33%，MS m/z : $[M+NH_4]^+$ 847.4。

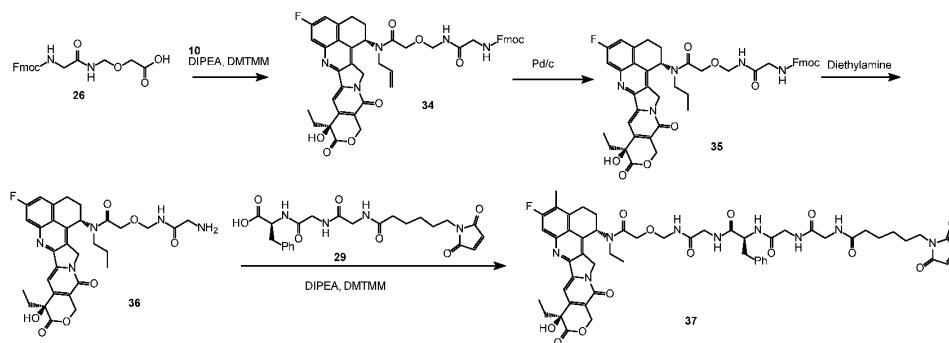
化合物 **32** 的合成：

0℃下，于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **31**（36 mg, 43 μ mol），加入 5 mL DMF 溶解，向所得溶液中加入 Diethylamine（9 μ L, 87 μ mol），自然升温至室温，维持室温下反应 2 小时后，所得反应液浓缩后，直接用于下一步反应。

化合物 **33** 的合成：

室温下，于 10 mL 单口瓶中加入化合物 **32**，加入 2 mL DMF 溶解，冰水浴冷却至 0℃，向所得溶液中依次加入 DIPEA（7 μ L, 2 eq），化合物 **29**（30 mg, 1.5 eq）以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐（DMTMM, 25 mg, 2 eq），维持 0℃下反应 3 小时，TLC 监测反应结束，向所得反应液中加入 5 mL 饱和 NaCl 水溶液淬灭反应，水相经乙酸乙酯（10 mL X 3）萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液经减压浓缩，经制备级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **33** 约 6 mg，黄色固体，两步收率约 8.4%，MS m/z : $[M+H]^+$ 1662.4。

实施例 11：



化合物 **34** 的合成：

参照化合物 **27** 的合成，化合物 **26** 投料 48 mg，得到黄色固体化合物 **34**，23 mg，收率 22%，MS m/z : $[M+H]^+$ 828.4。

化合物 **35** 的合成：

室温下，于 25mL 瓶中加入化合物 **34**（23 mg, 28 μ mol），加入 5 mL DMF 溶解，向所得溶液中加入 10%Pd/C（23 mg），H₂ 气球置换反应瓶中气氛三次，HPLC 监测反应完全后，

过滤除去 Pd/C，所得滤液经油泵减压浓缩后，经制备级高效液相色谱法纯化（乙腈/纯水体系），收集目标峰，减压除去乙腈以后，冻干，得到化合物 **35** 约 11 mg，黄色固体，收率约 47%，MS m/z : $[M+H]^+$ 830.6。

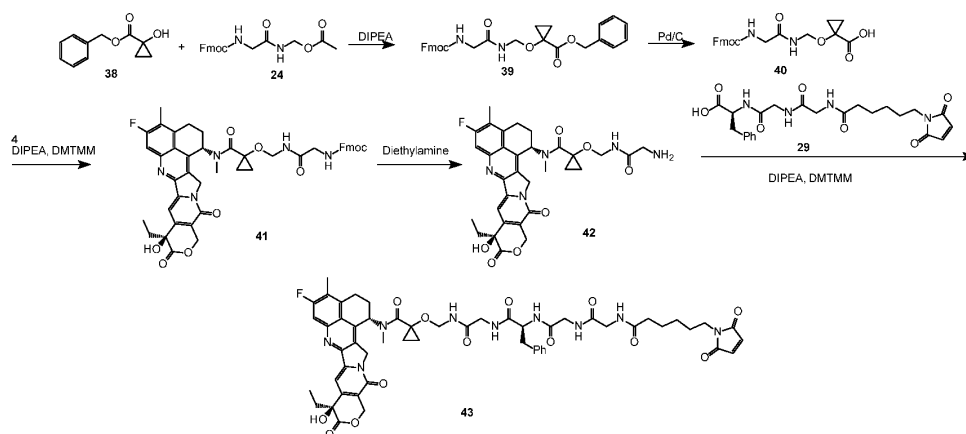
化合物 **36** 的合成：

参照化合物 **28** 的合成，化合物 **35** 投料 11 mg，得到黄色固体化合物 **36**，黄色固体约 6 mg，收率 74%，MS m/z : $[M+H]^+$ 608.5。

化合物 **37** 的合成：

参照化合物 **30** 的合成，投料量 6 mg，得到 2.6 mg 黄色固体化合物 **37**，收率约 25%，MS m/z : $[M+H]^+$ 1062.6。

实施例 12：



化合物 **39** 的合成：

参照化合物 **25** 的合成，投料化合物 **38** (31 mg, 161 μ mol)，得到化合物 **39**，52 mg，收率 65%，MS m/z : $[M+H]^+$ 501.4。

化合物 **40** 的合成：

参照化合物 **26** 的合成，投料化合物 **39** (51 mg, 100 μ mol)，得到化合物 **40**，未经纯化直接用于下一步反应。

化合物 **41** 的合成：

参照化合物 **27** 的合成，化合物 **40**（按化合物 **39** 计量），得到化合物 **41**，21 mg，两步收率 25%，MS m/z : $[M+H]^+$ 842.4。

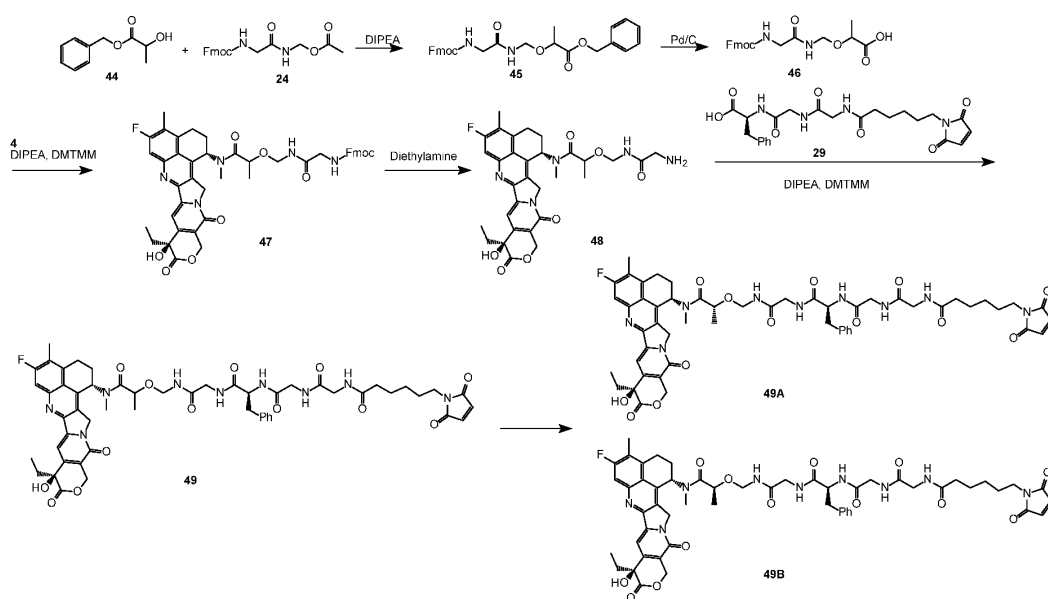
化合物 **42** 的合成:

参照化合物 **28** 的合成, 投料化合物 **41** (21 mg, 25 μmol), 得到黄色固体化合物 **42**, 约 9 mg, 收率 58%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 620.2。

化合物 **43** 的合成:

参照化合物 **30** 的合成, 投料量 5 mg, 得到 1.4 mg 黄色固体化合物 **43**, 收率约 16%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1074.5。

实施例 13:



化合物 **45** 的合成:

参照化合物 **25** 的合成, 投料化合物 **44** (25 mg, 139 μmol), 得到黄色固体化合物 **45**, 50 mg, 收率 74%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 488.3。

化合物 **46** 的合成:

参照化合物 **26** 的合成, 投料化合物 **45** (50 mg, 100 μmol), 得到黄色固体化合物 **46**, 未经纯化直接用于下一步反应。

化合物 **47** 的合成:

参照化合物 **27** 的合成, 化合物 **46** 投料按化合物 **45** 计量, 得到黄色固体化合物 **47**, 28 mg, 两步收率 33%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 830.4。

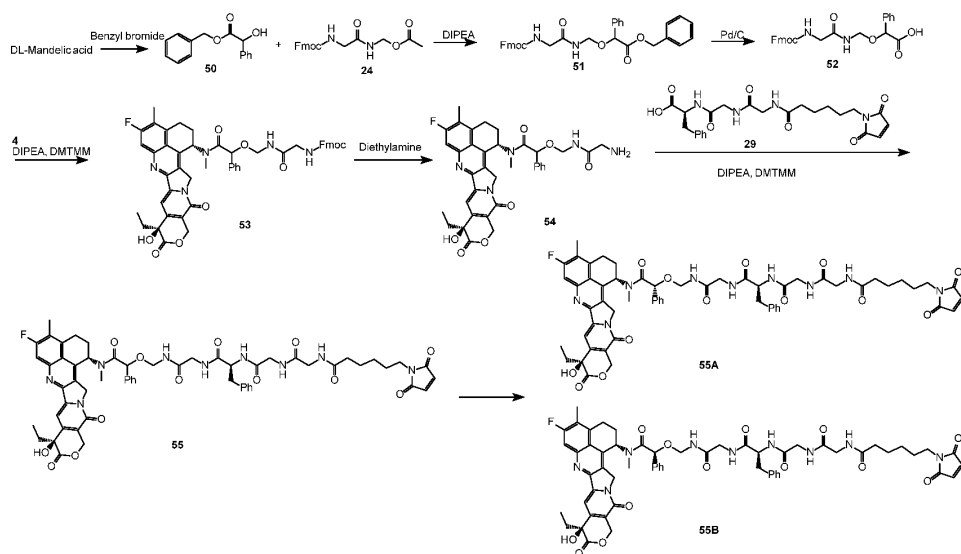
化合物 **48** 的合成:

参照化合物 **28** 的合成, 化合物 **47** 投料 27 mg, 得到黄色固体化合物 **48**, 约 11 mg, 收率 56%, MS m/z : $[M+H]^+$ 608.5。

化合物 **49** 的合成:

参照化合物 **30** 的合成, 化合物 **48** 投料量 10 mg, 得到 2.6 mg 黄色固体化合物 **49**, 收率约 15%, MS m/z : $[M+H]^+$ 1062.4。

实施例 14:



化合物 **50** 的合成:

参照已知文献 “*Organic Letters*, **2012**, 14(18), 4910-4913.” 的合成方法制备。

化合物 **51** 的合成:

参照化合物 **25** 的合成, 投料化合物 **50**(30 mg, 124 μ mol), 得到黄色油状化合物 **51**, 47 mg, 收率 82%, MS m/z : $[M+H]^+$ 461.1。

化合物 **52** 的合成:

参照化合物 **26** 的合成, 投料化合物 **51**(46 mg, 100 μ mol), 未经纯化直接用于下一步反应。

化合物 **53** 的合成:

参照化合物 **27** 的合成, 化合物 **52** 投料按化合物 **51** 计量, 得到黄色固体化合物 **53**, 35 mg, 两步收率 39%, MS m/z : $[M+H]^+$ 892.1。

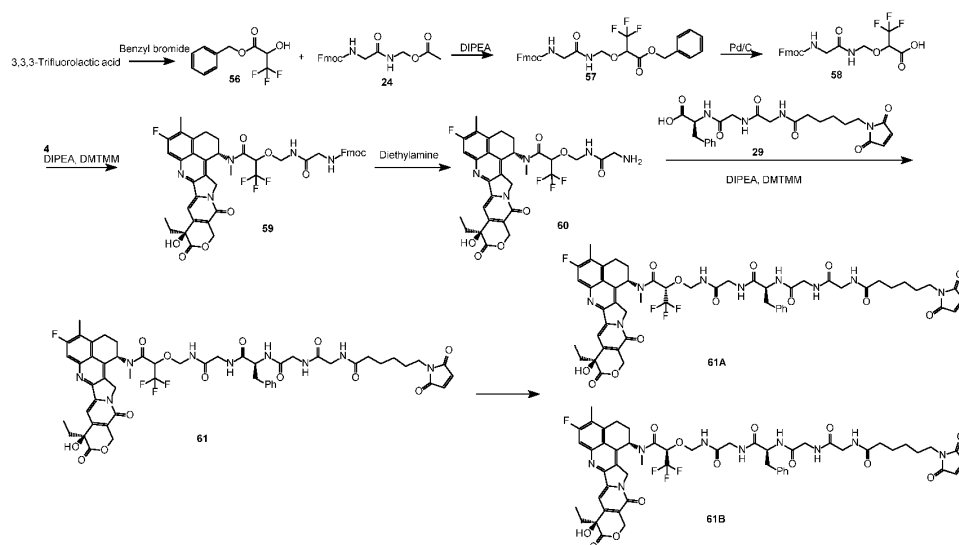
化合物 **54** 的合成:

参照化合物 **28** 的合成, 化合物 **53** 投料 10 mg, 得到黄色固体化合物 **54**, 约 4 mg, 收率 54%, MS m/z : $[M+H]^+$ 670.0。

化合物 **55** 的合成:

参照化合物 **30** 的合成, 化合物 **54** 投料量 4 mg, 得到 1.8 mg 黄色固体化合物 **55**, 收率约 27%, MS m/z : $[M+H]^+$ 1124.4。

实施例 15:



化合物 **56** 的合成:

参照已知方法“Patent No: WO 2020063673”的合成方法制备。

化合物 **57** 的合成:

参照化合物 **25** 的合成, 投料化合物 **56**(50 mg, 214 μ mol), 得到黄色油状化合物 **57**, 收率 21%, MS m/z : $[M+H]^+$ 543.1。

化合物 **58** 的合成:

参照化合物 **26** 的合成, 投料化合物 **57**(24 mg, 44 μ mol), 未经纯化直接用于下一步反应。

化合物 **59** 的合成:

参照化合物 **27** 的合成, 化合物 **58** 投料按化合物 **57** 计量, 得到 15 mg 化合物 **59**, 两步收率 39%, MS m/z : $[M+H]^+$ 884.3。

化合物 **60** 的合成:

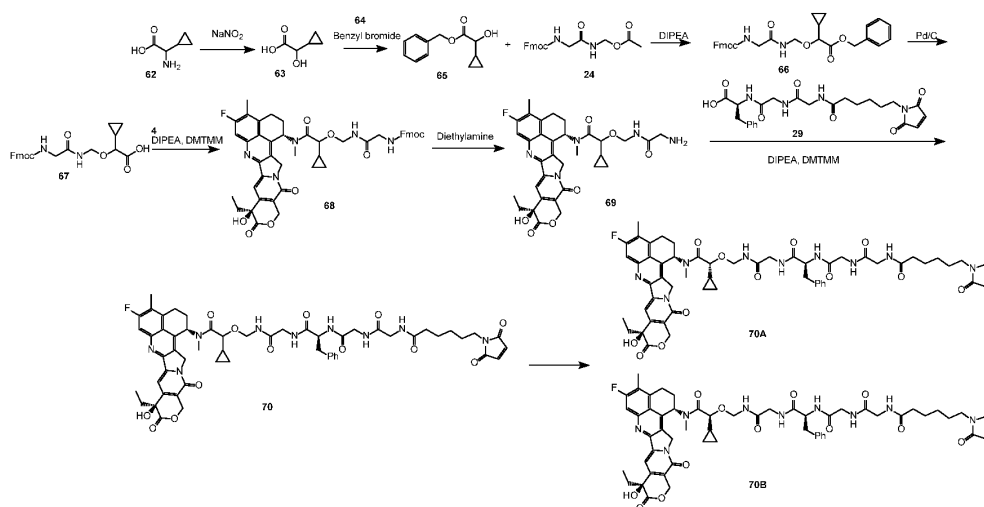
参照化合物 **28** 的合成, 化合物 **59** 投料 15 mg, 得到化合物 **60**, 约 4 mg, 收率 36%,

MS m/z : $[M+H]^+$ 662.7。

化合物 **61** 的合成:

参照化合物 **30** 的合成, 化合物 **60** 投料量 4 mg, 得到 2.2 mg 黄色固体化合物 **61**, 收率约 33%, MS m/z : $[M+H]^+$ 1116.7。

实施例 16:



化合物 **65** 的合成:

参照已知方法“Patent No: WO 2020063673”的合成方法制备。

化合物 **66** 的合成:

参照化合物 **25** 的合成, 投料化合物 **65** (30 mg, 146 μ mol), 得到黄色油状化合物 27 mg, 收率 36%, MS m/z : $[M+H]^+$ 515.2。

化合物 **67** 的合成:

参照化合物 **26** 的合成, 投料化合物 **66** (27 mg, 53 μ mol), 未经纯化直接用于下一步反应。

化合物 **68** 的合成:

参照化合物 **27** 的合成, 化合物 **67** 投料按化合物 **66** 计量, 得到 9 mg 化合物 **68**, 两步收率 20%, MS m/z : $[M+H]^+$ 856.7。

化合物 **69** 的合成:

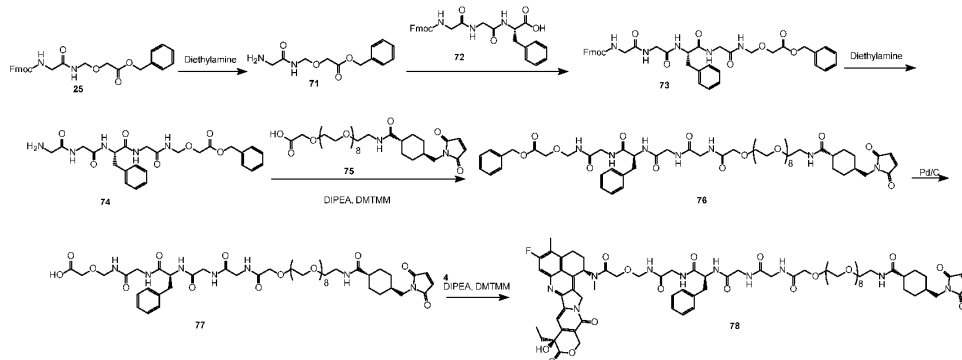
参照化合物 **28** 的合成, 化合物 **68** 投料 9 mg, 得到化合物 **69**, 约 2.5 mg, 收率 38%,

MS m/z : $[M+H]^+$ 634.2。

化合物 **70** 的合成:

参照化合物 **30** 的合成, 化合物 **69** 投料量 2.5 mg, 得到 1.2 mg 黄色固体化合物 **61**, 收率约 28%, MS m/z : $[M+H]^+$ 1088.5。

实施例 17:



化合物 **71** 的合成:

0℃下, 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **25** (40 mg, 84 μmol), 加入 5 mL DMF, 滴加 Diethylamine (13 μL , 1.5 eq), 自然升温至室温后反应 2 小时, 直接将反应液减压浓缩, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **71** 约 17 mg, 收率约 80%, MS m/z : $[M+H]^+$ 253.1。

化合物 **73** 的合成:

室温下, 于 25mL 瓶中加入化合物 **71**(17 mg, 67 μmol), 加入 5 mL DMF 溶解, 冰水浴冷却至 0℃, 向所得溶液中依次加入 DIPEA (22 μL , 2 eq), 化合物 **72** (67 mg, 2 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 40 mg, 2 eq), 维持 0℃下反应 4 小时, 向所得反应液中加入 5 mL 饱和 NaCl 水溶液淬灭反应, 水相经乙酸乙酯 (10 mL X 3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液经减压浓缩, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **73** 约 21 mg, 收率约 43%, MS m/z : $[M+H]^+$ 736.4。

化合物 **74** 的合成:

0℃下, 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **73** (21 mg, 29 μmol), 加入 5 mL DMF 溶解, 向所得溶液中加入 Diethylamine (6 μL , 58 μmol), 自然升温至室温, 维持室温下反应 5 小

时后, 所得反应液浓缩后, 直接用于下一步反应。

化合物 **76** 的合成:

室温下, 于 5 mL 单口瓶中加入化合物 **74**, 按化合物 **73** 计量, 加入 1.5 mL DMF 溶解, 冰水浴冷却至 0°C, 向所得溶液中依次加入 DIPEA (10 uL, 2 eq), 化合物 **75** (17 mg, 1.5 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 17 mg, 2 eq), 维持 0°C 下反应 1 小时, 升温至室温反应 3 小时后, 直接经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **76** 约 11 mg, 黄色固体, 两步收率约 43%, MS m/z : [M+H]⁺ 878.4。

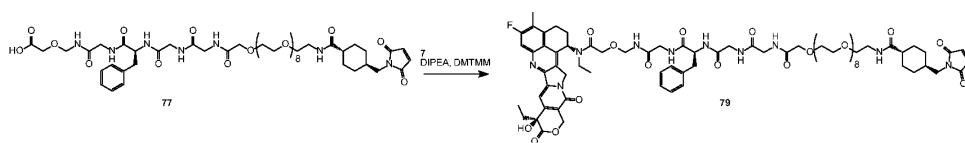
化合物 **77** 的合成:

室温下, 于 5 mL 单口瓶中加入化合物 **76** (11 mg, 13 umol), 加入 1 mL DMF 溶解, 向所得溶液中加入 11 mg 10% Pd/C, 氢气气球置换体系内气氛, 维持室温下反应 1 小时后, 过滤除去 Pd/C, 所得反应液浓缩后, 直接用于下一步反应。

化合物 **78** 的合成:

室温下, 于 5 mL 单口瓶中加入化合物 **77** (按化合物 **76** 计量), 加入 1 mL DMF 溶解, 冰水浴冷却至 0°C, 向所得溶液中依次加入 DIPEA (5 uL, 2 eq), 化合物 **4** (6 mg, 1 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 8 mg, 2 eq), 维持 0°C 下反应 1 小时, 反应液直接经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **78** 约 1.5 mg, 两步收率约 9%, MS m/z : [M+H]⁺ 1219.6。

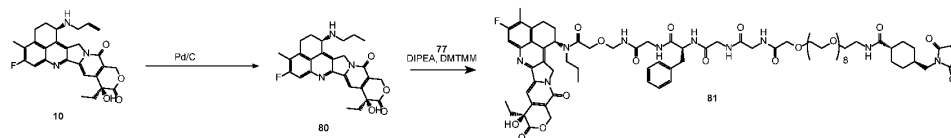
实施例 18:



化合物 **79** 的合成:

室温下, 于 5 mL 单口瓶中加入化合物 **77** (4 mg, 5 umol), 加入 1 mL DMF 溶解, 冰水浴冷却至 0°C, 向所得溶液中依次加入 DIPEA (1.7 uL, 2 eq), 化合物 **7** (2.3 mg, 1 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 2.9 mg, 2 eq), 维持 0°C 下反应 2 小时, 反应液直接经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **79** 约 1.3 mg, 收率约 16%, MS m/z : [M+H]⁺ 1233.5。

实施例 19:

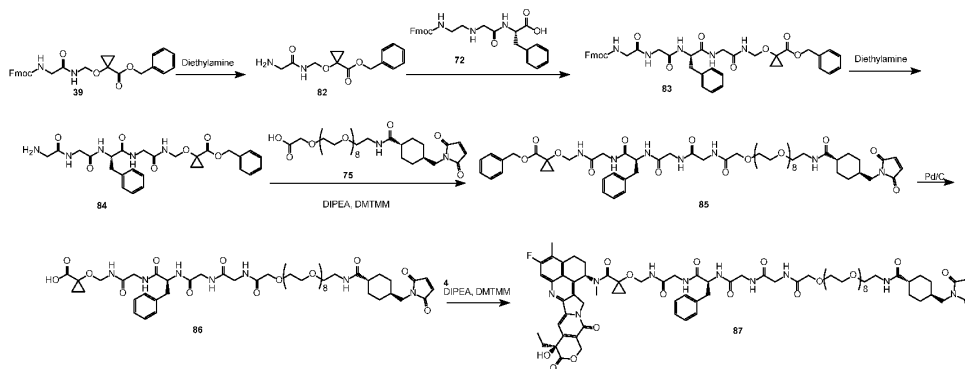
化合物 **80** 的合成:

室温下, 于 5 mL 单口瓶中加入化合物 **10** (12 mg, 25 μmol), 加入 2 mL DMF 溶解, 向所得溶液中加入 12 mg 10% Pd/C, 氢气气球置换体系内气氛, 维持室温下反应 2 小时后, 过滤除去 Pd/C, 所得反应液浓缩后, 直接用于下一步反应。

化合物 **81** 的合成:

室温下, 于 5 mL 单口瓶中加入化合物 **80** (按化合物 **10** 计量), 加入 2 mL DMF 溶解, 冰水浴冷却至 0°C, 向所得溶液中依次加入 DIPEA (9 μL , 2 eq), 化合物 **77** (20 mg, 1 eq) 以及 4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (DMTMM, 15 mg, 2 eq), 维持 0°C 下反应 2 小时, 反应液直接经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **81** 约 3.3 mg, 两步收率约 11%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1247.6。

实施例 20:

化合物 **82** 的合成:

参照化合物 **71** 的合成, 化合物 **39** 投料 (200 mg, 400 μmol), 得到目标化合物 28 mg, 收率 25%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 279.0。

化合物 **83** 的合成:

参照化合物 **73** 的合成, 化合物 **82** 投料 (28 mg, 100 μmol), 得到目标化合物 19 mg, 收率 25%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 762.4。

化合物 **84** 的合成:

参照化合物 **74** 的合成, 化合物 **83** 投料 (19 mg, 25 μmol), 得到目标化合物 8 mg, 收率 59%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 540.2。

化合物 **85** 的合成:

参照化合物 **76** 的合成, 化合物 **84** 投料 (8 mg, 15 μmol), 得到目标化合物 6 mg, 收率 45%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 904.4。

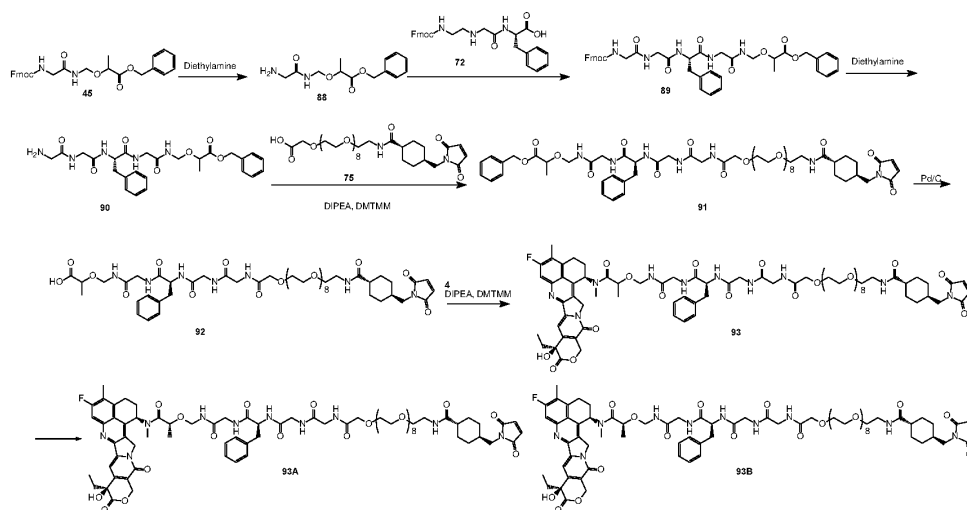
化合物 **86** 的合成:

参照化合物 **77** 的合成, 化合物 **85** 投料 (6 mg, 6.7 μmol), 所得反应液经浓缩后直接用于下一步反应。

化合物 **87** 的合成:

参照化合物 **78** 的合成, 化合物 **86** 投料 (按化合物 **85** 计量), 得到目标化合物 0.9 mg, 两步收率约 11%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1245.5。

实施例 21:



化合物 **88** 的合成:

参照化合物 **71** 的合成, 化合物 **45** 投料 (250 mg, 512 μmol), 得到目标化合物 34 mg, 收率 14%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 489.4。

化合物 **89** 的合成:

参照化合物 **73** 的合成, 化合物 **88** 投料 (34 mg, 70 μmol), 得到目标化合物 45 mg, 收率 86%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 750.9。

化合物 **90** 的合成:

参照化合物 **74** 的合成, 化合物 **89** 投料 (45 mg, 60 μmol), 得到目标化合物 18 mg, 收率 57%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 528.1。

化合物 **91** 的合成:

参照化合物 **76** 的合成, 化合物 **90** 投料 (18 mg, 34 μmol), 得到目标化合物 11 mg, 收率 36%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 892.8。

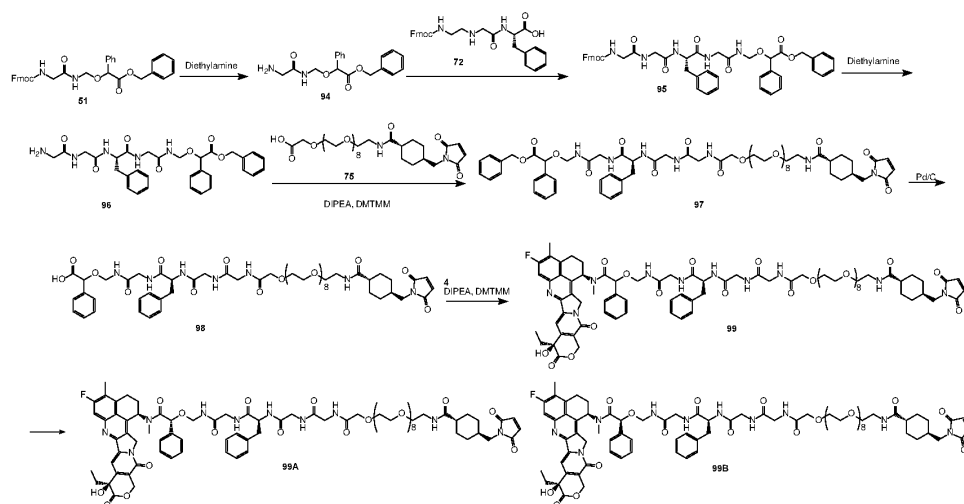
化合物 **92** 的合成:

参照化合物 **77** 的合成, 化合物 **91** 投料 (11 mg, 12 μmol), 所得反应液经浓缩后直接用于下一步反应。

化合物 **93** 的合成:

参照化合物 **78** 的合成, 化合物 **92** 投料 (按化合物 **91** 计量), 得到目标化合物 2.8 mg, 两步收率约 19%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1233.5。

实施例 22:



化合物 **94** 的合成:

参照化合物 **71** 的合成, 化合物 **51** 投料 (210 mg, 382 μmol), 得到目标化合物 30 mg, 收率 24%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 329.0。

化合物 **95** 的合成:

参照化合物 **73** 的合成, 化合物 **94** 投料 (30 mg, 91 μmol), 得到目标化合物 27 mg, 收率 36%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 812.3。

化合物 **96** 的合成:

参照化合物 **74** 的合成, 化合物 **95** 投料 (30 mg, 33 μmol), 得到目标化合物 10 mg,

收率 51%, MS m/z : $[M+H]^+$ 590.3。

化合物 **97** 的合成:

参照化合物 **76** 的合成, 化合物 **96** 投料 (10 mg, 17 μ mol), 得到目标化合物 6 mg, 收率 37%, MS m/z : $[M+H]^+$ 954.0。

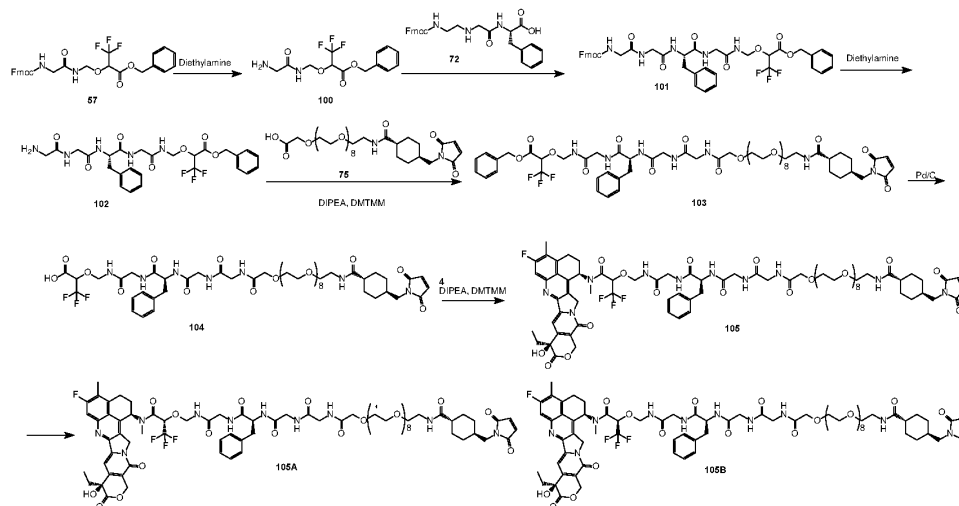
化合物 **98** 的合成:

参照化合物 **77** 的合成, 化合物 **97** 投料 (6 mg, 6.3 μ mol), 所得反应液经浓缩后直接用于下一步反应。

化合物 **99** 的合成:

参照化合物 **78** 的合成, 化合物 **98** 投料 (按化合物 **97** 计量), 得到目标化合物 1.8 mg, 两步收率约 22%, MS m/z : $[M+H]^+$ 1295.4。

实施例 23:



化合物 **100** 的合成:

参照化合物 **71** 的合成, 化合物 **57** 投料 (200 mg, 369 μ mol), 得到目标化合物 36 mg, 收率 30%, MS m/z : $[M+H]^+$ 321.1。

化合物 **101** 的合成:

参照化合物 **73** 的合成, 化合物 **100** 投料 (36 mg, 112 μ mol), 得到目标化合物 25 mg, 收率 28%, MS m/z : $[M+H]^+$ 804.8。

化合物 **102** 的合成:

参照化合物 **74** 的合成, 化合物 **101** 投料 (25 mg, 31 μ mol), 得到目标化合物 12 mg, 收率 67%, MS m/z : $[M+H]^+$ 582.5。

化合物 **103** 的合成:

参照化合物 **76** 的合成, 化合物 **102** 投料 (12 mg, 21 μmol), 得到目标化合物 9 mg, 收率 45%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 946.9。

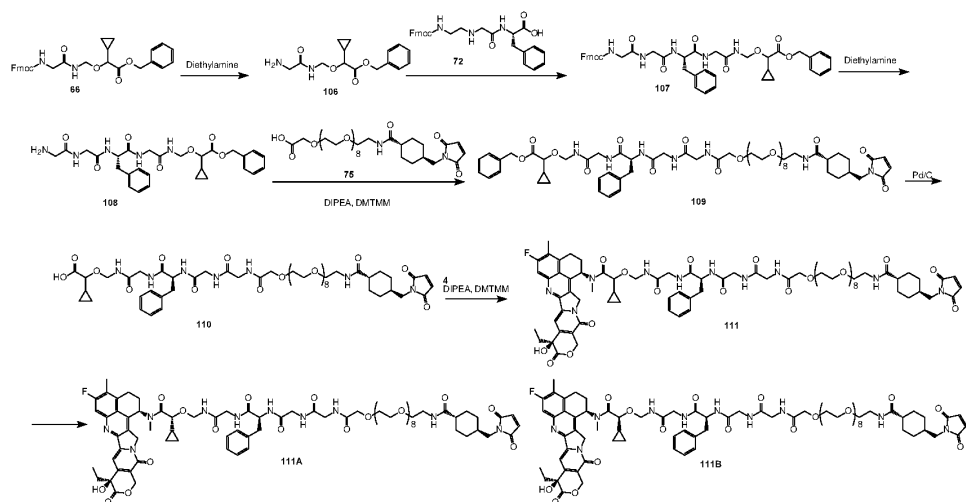
化合物 **104** 的合成:

参照化合物 **77** 的合成, 化合物 **103** 投料 (9 mg, 10 μmol), 所得反应液经浓缩后直接用于下一步反应。

化合物 **105** 的合成:

参照化合物 **78** 的合成, 化合物 **86** 投料 (按化合物 **85** 计量), 得到目标化合物 3.2 mg, 两步收率约 25%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1287.3。

实施例 24:



化合物 **106** 的合成:

参照化合物 **71** 的合成, 化合物 **66** 投料 (300 mg, 583 μmol), 得到目标化合物 41 mg, 收率 24%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 293.1。

化合物 **107** 的合成:

参照化合物 **73** 的合成, 化合物 **106** 投料 (41 mg, 140 μmol), 得到目标化合物 29 mg, 收率 27%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 776.1。

化合物 **108** 的合成:

参照化合物 **74** 的合成, 化合物 **107** 投料 (29 mg, 37 μmol), 得到目标化合物 7 mg, 收率 34%, MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 554.4。

化合物 **109** 的合成:

参照化合物 **76** 的合成，化合物 **108** 投料（7 mg, 13 μmol ），得到目标化合物 6 mg，收率 50%，MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 918.2。

化合物 **110** 的合成：

参照化合物 **77** 的合成，化合物 **109** 投料（6 mg, 6.5 μmol ），所得反应液经浓缩后直接用于下一步反应。

化合物 **111** 的合成：

参照化合物 **78** 的合成，化合物 **110** 投料（按化合物 **109** 计量），得到目标化合物 1.1 mg，两步收率约 13%，MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1259.8。

1) 通用偶联方法：

将通过初步的纯化后单体率大于 95% 的抗体分子，使用超滤离心管换液至含有 EDTA 的磷酸盐缓冲液中，浓度 10 mg/mL。加入 10 倍于抗体摩尔分子数的 TCEP，室温下反应 2 h。使用超滤离心管换液至 pH 6.5 的磷酸缓冲液中，再加入 10 倍于抗体摩尔分子数的 DHAA，室温下反应 2 h。然后加入 15 倍于抗体摩尔分子数的 payload，室温下反应 4 h。反应结束后，使用截留分子量为 30 KDa 的超滤离心管换液至 PBS 中，并去除未偶联的 payload。

2) 抗体-药物偶联 DAR 的检测：

单体率检测条件：

样品 14000 rpm 离心 5 分钟，取上清液进样分析。

仪器：Waters e2695（2489UV/Vis）；

色谱柱：TSKgel G3000SWXL（7.8×300 mm，5 μm ）；

流动相：A：50 mM PB，300 mM NaCl，200 mM Arg，5%IPA，pH6.5；

流动相 A 等度洗脱 30min，流速：0.714 mL/min，柱温 25℃，检测波长：280 nm。

DAR 检测条件：

样品 14000 rpm 离心 5 分钟，取上清液进样分析。

仪器：Waters H-class（TUV）；

色谱柱：Proteomix HIC Butyl-NP5（4.6×35 mm，5 μm ）；

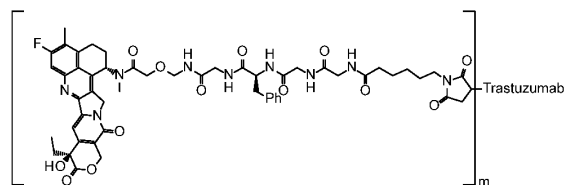
流动相：A：1.5 M 硫酸铵，0.025 M 无水磷酸钠，pH 7.0；

B: 0.025 M 无水磷酸钠, 25% IPA, pH7.0;

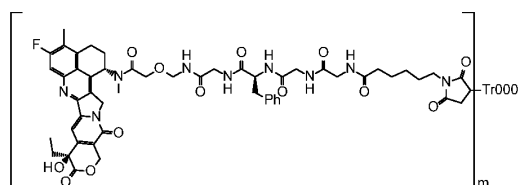
流动相 A 平衡色谱柱, 流动相 A 和 B 梯度洗脱, 流速 0.8 mL/min; 柱温 25℃, 检测

波长: 214 nm。

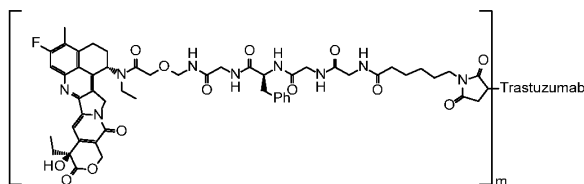
实施例 25: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-6



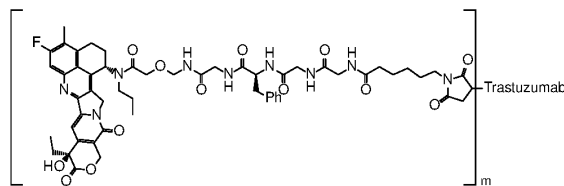
实施例 26: 按通用偶联方法制备, 以 Tr000 为抗体, 得 ADC: Tr000-6



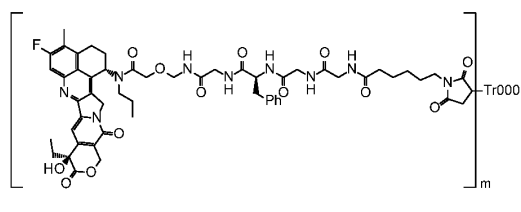
实施例 27: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-9



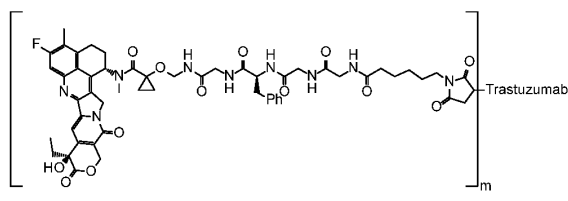
实施例 28: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-12



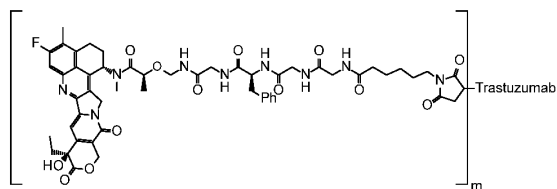
实施例 29: 按通用偶联方法制备, 以 Tr000 为抗体, 得 ADC: Tr000-12



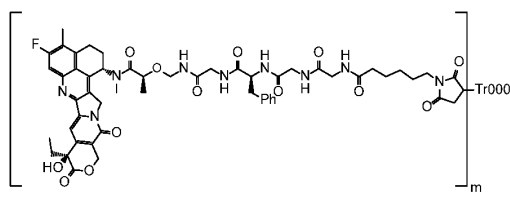
实施例 30: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-14



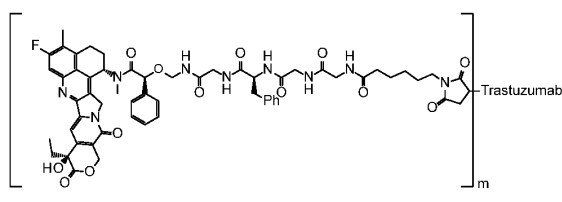
实施例 31: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-16



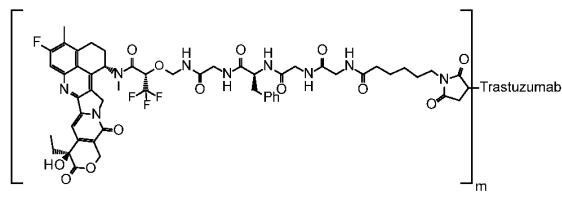
实施例 32: 按通用偶联方法制备, 以 Tr000 为抗体, 得 ADC: Tr000-16



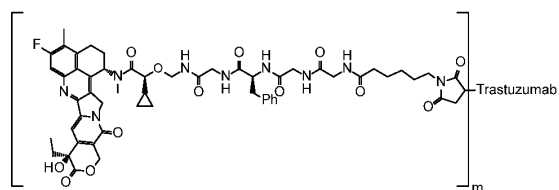
实施例 33: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-18



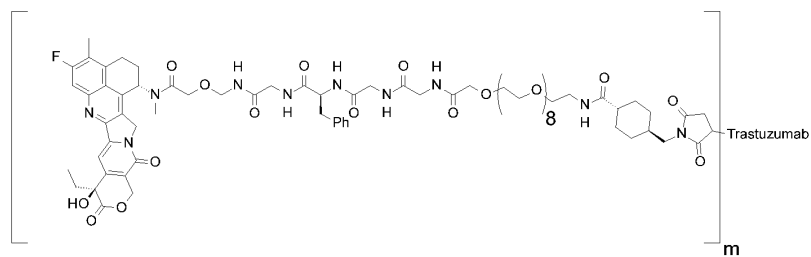
实施例 34: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-20A



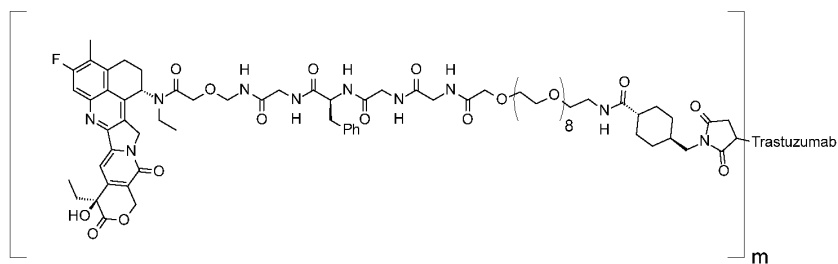
实施例 35: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-22B



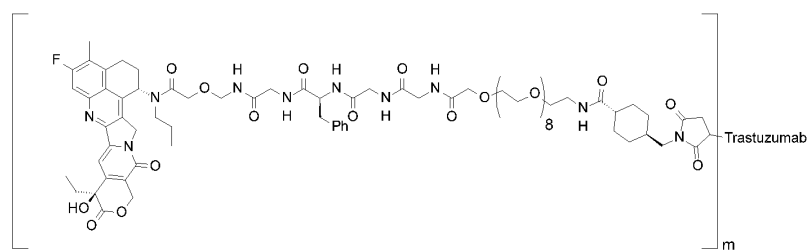
实施例 36: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-PEG-6



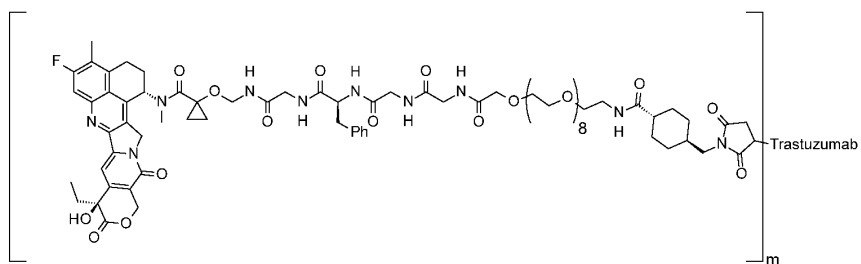
实施例 37: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-PEG-9



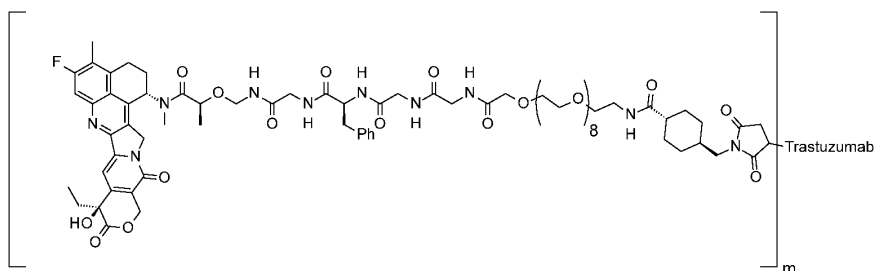
实施例 38: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-PEG-12



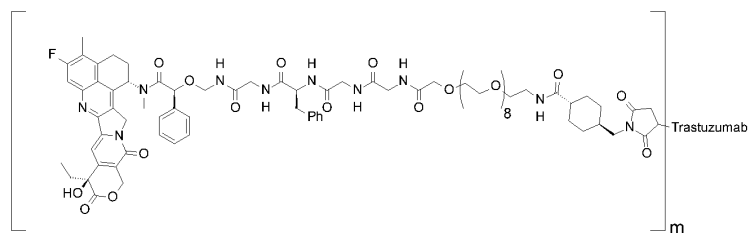
实施例 39: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-PEG-14



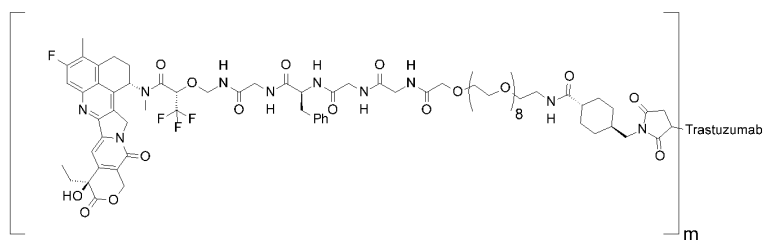
实施例 40: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-PEG-16



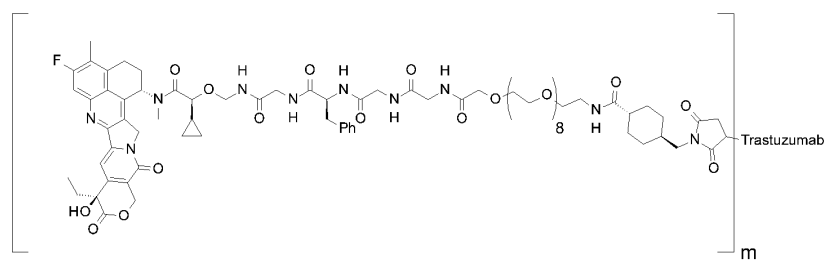
实施例 41: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-PEG-18



实施例 42: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-PEG-20A



实施例 43: 按通用偶联方法制备, 以 Trastuzumab 为抗体, 得 ADC: Tras-PEG-22B



体外活性测试

1)实验材料

细胞: A431, SW620, BXP3, Fadu 来源于中国科学院细胞库

细胞培养基 DMEM: Gibco

FBS: BOWEST

2)培养基的配制

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

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

3)操作

提前 30 min 开启生物安全柜紫外灯照射, 然后后开通风 3 min。将生长培养基、检测培养基、D-PBS 和胰酶放入 37 °C 恒温水浴锅里预热, 之后用酒精对表面进行消毒, 放入生物安全柜中。将汇合率在 80% 左右的细胞放于生物安全柜中, 吸掉旧培养基, 用 D-PBS 润洗, 吸弃, 用胰酶消化 2~3 min, 后加入生长培养基中和, 离心 1200 rpm, 3 min。吸去离心上清, 用 4 mL 检测培养基混匀, 取 100 uL 计数(其中取出 50 uL 细胞液, 加入 50 uL Trypan Blue Stain 并混匀, 混匀后计数)。按照预先优化好的细胞铺板密度铺板, 80ul/孔铺于 96 孔板中, 孔 E11、F11 只加 80 uL 检测培养基, 边缘孔加入 150 uL 的 DPBS。铺板 24 h 后加入稀释抗体, 每孔 20 uL 和设置对照, 第 11 列只加入 20 uL 的检测培养基, 每个浓度设置 2 个复孔, 加入后于细胞涡旋震荡器上混匀, 550 rpm, 3 min。

抗体溶液的稀释: 用检测培养基在 V 型 96 孔板第一列中配制起始浓度为 5 uM, 300 uL 的供试品品溶液, 后面第 2 到 10 列分别加入 240 uL 的检测培养基, 从混匀的

第一列中取 60 uL 加入到第二列，用排枪上下混匀 10 次，弃枪头，后面 7 个浓度依次操作。

4) 检测

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

5) 结果

表 1 喜树碱类衍生物对靶标细胞的体外增殖抑制的 IC₅₀ 值：

化合物编号	IC50 (nM)			
	A431	Fadu	Bxpc-3	SW620
6	3.63	1.64	13.07	17.72
12	1.10	0.13	1.6-8	200-1000
14	93.29	52.99	152.76	200-1000
16 (对照)	0.03	0.0014	0.00256-0.0128	0.064-0.32

细胞实验结果表明，本发明所述的喜树碱衍生物具有明显的体外抗肿瘤活性（纳摩尔水平），相比于第一三共所用毒素（对照化合物 16）毒性明显降低，因此，本发明设计合成的喜树碱类衍生物有望成为更安全的抗肿瘤 ADC 药物。

ADC 体内药效测试

本发明中建立了 A431 荷瘤小鼠模型，以评价毒素 ADC 偶联药物的体内药效。即以 1×10⁶A431 细胞通过皮下注射到 4~6 周鼠龄的 BALB/c 裸鼠右侧，待小鼠肿瘤平均大小生长至 180-200mm³，随机分组，每组 5 只，在第 0, 7, 14, 21 天分别给与空白对照（缓冲溶液空白）、抗体药物偶联物 Tr000-6，均以 10mg/kg 剂量进行静脉给药。肿瘤体积测量数据显示为测量时肿瘤平均体积±SE。