一种细胞结合分子-Tubulysin 衍生物偶联物及其制备方法

技术领域

本发明涉及以含支链(侧链)连接体偶联 Tubulysin 衍生物（同系物）与细胞结合分子，产生的偶联物具有更好的药代动力学性质、从而能更精确地靶向杀死异常细胞。本发明还涉及 Tubulysin 同系物与细胞结合剂的及其所含分子的合成方法，以及使用该偶联物靶向治疗癌症、感染和自身免疫疾病的方法。

背景技术

Adcetris 治疗复发或难治性霍奇金淋巴瘤的临床成功(Okeley, N. 等 Hematol Oncol. Clin. North. Am, 2014, 28, 13-25； Gopal, A., 等, Blood 2015, 125, 1236-43)和 Kadcyla 用于治疗复发的 HER2 阳性乳腺癌的成功(Peddi, P. , Hurvitz, S., Ther. Adv. Med. Oncol. 2014, 6(5), 202–9； Lambert, J. 和 Chari, R., J. Med. Chem. 2014 , 57, 6949−64)证明了抗体药物偶联物(ADC)是一种非常有前景的癌症靶向治疗方法。ADC 成功的重要因素包括其中的三个重要组成部分，即单克隆抗体、细胞毒性分子和连接体，以及连接体-细胞毒性分子的连接位点(L. Ducry 和 B Stump, Bioconjugate Chem., 2010, 21 , 5–13； GS Hamilton, Biologicals 2015, 43, 318-32)。对于 ADC 各组分的研究已持续有三十年的历史。连接体需要满足可以和药物上特定的反应性官能团反应，在人体血液循环系统具有稳定性，并且在与抗原结合和细胞内吞后要容易释放药物，尤其重要的是连接体-细胞毒性分子一旦在血液循环中脱靶后不能损害正常组织，现有的连接技术仍然有限(Ponte, J.等, Bioconj. Chem., 2016, 27(7), 1588-98；Dovgan, I.等 Sci. Rep. 2016, 6, 30835；Ross, P. L. 和 Wolfe, J. L., J Pharm. Sci. 105(2), 391-7； Chen, T. 等 J. Pharm. Biomed. Anal., 2016, 117, 304-10)。

早期 ADC 主要用于靶向治疗液体肿瘤，使用的连接体很不稳定，游离药物在血液循环中被释放和进而出现脱靶毒性(Bander N. H.等, Clin. Adv. Hematol. Oncol., 2012, 10, 1-16)。当前一代 ADC 上的连接体更稳定，细胞毒

性剂地活性也更高 (Behrens, C. R. 和 Liu, B., mAbs, 2014. 6, 46-53)。然而，脱靶毒性目前仍然是 ADC 药物开发中的主要挑战之一(Roberts, S. A. 等, Regul. Toxicol. Pharmacol. 2013, 67, 382-91)。例如在临床实践中 T-DM1(Kadcyla®)使用了稳定的(不可切割的)MCC 连接体，它对 HER2 阳性患有转移性乳腺癌(mBC)或已经接受了相应治疗或在辅助治疗的六个月内 HER2 肿瘤复发的患者有很大益处(Peddi, P. 和 Hurvitz, S., Ther. Adv. Med. Oncol. 2014, 6(5), 202-209；Piwko C.等 , Clin Drug Investig. 2015, 35(8), 487-93；Lambert, J. 和 Chari, R., J. Med. Chem. 2014, 57, 6949-64)。但是，在临床试验中 T-DM1 作为 HER2 阳性无法切除的局部晚期或转移性乳腺癌患者的一线治疗药物已经失败，作为 HER2 阳性晚期胃癌的二线治疗药物，与其产生的毒副作用相比，它对患者的益处不大(Ellis, PA, 等, J. Clin. Oncol. 2015, 33 (2015 ASCO 会议摘要 507); Shen, K. 等, Sci Rep. 2016, 6, 23262；de Goeij, B. E. 和 Lambert, J. M. Curr Opin Immunol 2016, 40, 14-23；Barrios, C. H. 等, J Clin Oncol 2016, 34, (2016 ASCO 会议摘要 593)。

为了解决脱靶毒性的问题，ADC 化学研发的一个方向就是，将连接体-细胞毒性剂组分和偶联化学扩展，而不仅仅应用单个的细胞毒性剂，同时还解决了 ADC 的连接体-细胞毒性剂对目标疾病的活性问题(Lambert , JM Ther Deliv 2016, 7, 279-82; Zhao, RY 等, 2011, J. Med. Chem. 54, 3606-23)。许多药物的研发者和学术机构都集中力量来开发新型的可靠的特异偶联连接体，定点 ADC 偶联方法，似乎这些 ADC 的循环半衰期更长，疗效更高，能降低脱靶毒性，ADC 具有窄的体内药代动力学(PK)特性，生产工艺的批间一致性更好(Hamblett, K. J.等 Clin. Cancer Res. 2004, 10, 7063–70；Adem, Y. T. 等, Bioconjugate Chem. 2014, 25, 656–664；Boylan, N. J. Bioconjugate Chem. 2013, 24, 1008–1016；Strop, P.等, Chem. Biol. 2013, 20, 161–67；Wakankar, A. mAbs, 2011, 3, 161–172)。已见报导的这些定点偶联方法包括：抗体中引入经改造的半胱氨酸(Junutula, J. R. 等, Nat. Biotechnol. 2008, 26, 925–32；Junutula, JR, 等 2010 Clin. Cancer Res. 16 , 4769；US 专利 8,309,300; 7,855,275; 7,521,541; 7,723,485, WO2008/141044)，硒代半胱氨酸(Hofer, T. 等, Biochemistry 2009, 48, 12047–57；Li, X. 等, Methods 2014, 65, 133–8；US 专利 8,916,159)，含全氟芳香族试剂标签的半胱氨酸(Zhang, C. 等, Nat. Chem. 2015, 8, 1 –9)，硫代海藻糖(Okeley, N. M. 等, Bioconjugate Chem. 2013,

24, 1650)，非天然氨基酸(Axup, J. Y. 等， Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2012, 109, 16101-6；Zimmerman, E. S. 等, 2014, Bioconjug. Chem. 25, 351–361； Wu, P., 等, 2009 Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 3000-5； Rabuka, D., 等 , Nat. Protoc. 2012, 7, 1052–67； 美国专利 8,778,631 和 美国专利申请号. 20100184135, WO2010/081110； WO2006/069246, 2007/059312； 美国专利 7,332,571, 7,696 ,312 和 7,638,299； WO2007/130453, 美国专利 7,632,492 和 7,829,659)；分子间双硫键被还原后通过下列基团再成桥：二溴马来酰胺(Jones, MW 等. J. Am. Chem . Soc. 2012, 134, 1847–52)，双砜试剂(Badescu, G. 等. Bioconjug. Chem. 2014, 25, 1124–36； WO2013/190272, WO2014/064424)和双溴哒嗪二酮(Maruani , A. 等. Nat. Commun. 2015, 6, 6645)；半乳糖和唾液酸转移酶(Zhou, Q. 等. Bioconjug. Chem. 2014, 25, 510–520；美国专利申请号 20140294867 for Sanofi-Genzyme)，甲酰甘氨酸生成酶(FGE) (Drake, PM 等. Bioconj. Chem. 2014, 25, 1331–41； Carrico, IS 等 美国专利 7,985,783; 8,097,701; 8,349,910, 和 美国专利申请号 20140141025, 20100210543)，磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTases) (Grünewald, J. 等. Bioconjug. Chem. 2015, 26, 2554–62)，分选酶 A(Beerli, RR, 等. PLoS One 2015, 10, e0131177)，用茂原链轮丝菌转谷氨酰胺酶引入的谷氨酰胺标签 (mTG) (Strop, P., Bioconj. Chem., 2014, 25, 855–62； Strop, P., 等., Chem. Biol. 2013, 20, 161–7；美国专利 8,871,908)，或是用微生物转谷氨酰胺酶(MTGase) 引入的谷氨酰胺标签(Dennler, P., 等, 2014, Bioconjug. Chem. 25, 569–78； Siegmund, V. 等. Angew. Chemie - Int. Ed. 2015, 54, 13420–4；美国专利申请号 20130189287；美国专利 7,893,019)，通过酶或细菌在蛋白质主链外形成异肽键-肽键(Kang, HJ, 等. Science 2007, 318, 1625–8； Zakeri, B. 等. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, E690–7； Zakeri, B. & Howarth, MJ Am. Chem. Soc. 2010, 132, 4526–7)。

我们已经公开了几种偶联方法，重新桥接天然抗体链间二硫化物被还原产生的一对硫醇，例如使用溴马来酰亚胺和二溴马来酰亚胺连接体(WO2014/009774)，2,3-二取代琥珀酸/ 2-单取代/ 2,3-二取代富马酸或马来酸连接体 (WO2015/155753, WO20160596228)，乙炔二羧基连接体(WO2015/151080, WO20160596228) 或肼连接体(WO2015/151081)。相较于与抗体上的半胱氨酸或赖氨酸残基偶联的传统非选择性方法相比，用这些

连接体和偶联方法制备的ADC的治疗窗口更大。在此我们公开一种含有长支链连接体的Tubulysin偶联物。长支链连接体可以防止抗体药物偶联物被水解酶如蛋白酶或酯酶等水解，使偶联物在循环系统中更加稳定。

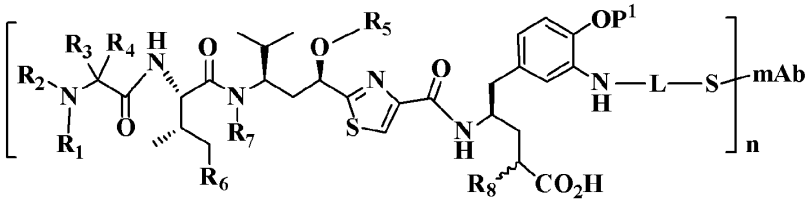
Tubulysin是一类高效的细胞毒性剂，它在本领域广为熟知，可以基于已知方法从天然产物中分离或通过有机合成的方法制备（如Balasubramanian, R., 等. J. Med. Chem., 2009, 52, 238–40； Wipf, P., 等. Org. Lett., 2004, 6, 4057–60； Pando, O., 等. J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 7692–5； Reddy, J. A., 等. Mol. Pharmaceutics, 2009, 6, 1518–25； Raghavan, B., 等. J. Med. Chem., 2008, 51, 1530–33； Patterson, A. W., 等. J. Org. Chem., 2008, 73, 4362–9； Pando, O., 等. Org. Lett., 2009, 11 (24), 5567–9； Wipf, P., 等. Org. Lett., 2007, 9 (8), 1605–7； Friestad, G. K., Org. Lett.,2004, 6, 3249–52； Peltier, H. M., 等. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 16018–9; Chanrasekhar, S., 等 J. Org. Chem., 2009, 74, 9531–4； Liu, Y., 等. Mol. Pharmaceutics, 2012, 9, 168–75； Friestad, G. K., 等. Org. Lett., 2009, 11, 1095–8； Kubicek, K., 等., Angew Chem Int Ed Engl, 2010.49: 4809-12； Chai, Y., 等., Chem Biol, 2010, 17: 296-309; Ullrich, A., 等., Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48, 4422-5; Sani, M., 等. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46, 3526-9； Domling, A., 等., Angew Chem Int Ed Engl, 2006, 45, 7235-9； Zanda, M., 等, Can. Pat. Appl. CA 2710693 (2011)； Chai, Y., 等. Eur. Pat. Appl. 2174947 (2010), WO 2010034724; Leamon, C. 等, WO2010033733, WO 2009002993; Ellman, J., 等, PCT WO2009134279； WO 2009012958； 美国专利申请 20110263650, 20110021568； Matschiner, G., 等, WO2009095447； Vlahov, I., 等, WO2009055562, WO 2008112873; Low, P., 等, WO2009026177； Richter, W., WO2008138561； Kjems, J., 等, WO 2008125116； Davis, M.; 等, WO2008076333； Diener, J.; 等, 美国专利申请 20070041901, WO2006096754； Matschiner, G., 等, WO2006056464； Vaghefi, F., 等, WO2006033913; Doemling, A., Ger. Offen. DE102004030227, WO2004005327, WO2004005326, WO2004005269； Stanton, M., 等, 美国专利申请 20040249130； Hoefle, G., 等, Ger. Offen. DE10254439, DE10241152, DE10008089; Leung, D., 等, WO2002077036; Reichenbach, H., 等, Ger. Offen. DE19638870； Wolfgang, R., US20120129779； Chen, H., 美国专利申请

20110027274。我们先前公开了用于靶向治疗癌症，感染和自身免疫疾病的Tubulysin 偶联物(PCT / IB2012 / 053554)的构建。本发明中的含有长支链连接体的 Tubulysin 偶联物在靶向传送期间半衰期增加，在血液循环中对非靶细胞、组织或器官的暴露最小，导致脱靶毒性降低。

发明内容

本发明涉及以含支链(侧链)连接体偶联 Tubulysin 同系物与细胞结合分子，产生的偶联物具有更好的药代动力学性质、从而能更精确地靶向杀死异常细胞。本发明还涉及 Tubulysin 同系物与细胞结合剂的偶联及其所含分子的合成方法，以及使用该偶联物靶向治疗癌症、感染和自身免疫疾病的方法。

在一个方面，本发明涉及一种抗体-Tubulysin B 衍生物偶联物，其特征在于，所述偶联物具有如下式(I)所示的结构：



(I)

或者以具有式 I 所示结构为母体的药学上可接受的盐、水合物或水合盐，具有式 I 所示结构的多晶型物，式 I 所示结构的光学异构体，式 I 所示结构的一个或多个氘（^{2}H）原子代替氢（^{1}H）原子，或式 I 所示结构的一个或多个 ^{13}C 原子代替 ^{12}C 原子；

其中，P^1 是 H、$COCH_3$、COH、$PO(OH)_2$、$CH_2OPO(OH)_2$、SO_2CH_3、$C_6H_{11}O_5$(糖苷)、$CONHCH_3$、$CON(CH_3)_2$、$CON(CH_2CH_2)_2NCH_3$、$CON(CH_2CH_3)_2$ 或 $CON(CH_2CH_2)_2CHN(CH_2CH_2)_2CH_2$;

R_1、R_2、R_3 和 R_4 分别独立地是 H、C_1-C_6 烷烃基、C_1-C_6 烯烃基、C_1-C_6 烷醚基(R_1OR_2)、C_1-C_6 烷羰基(R_1COR_2)、C_1-C_6 烷酯基(R_1COOR_2)、C_1-C_6 烷羧基((R_1COOH)或 C_1-C_6 烷酰胺基((R_1CONHR_2)；

或者，R_1 和 R_2 一起，R_1 和 R_3 一起，R_2 和 R_3 一起，或 R_3 和 R_4 一起构成 C_2-C_7 杂环基或 C_2-C_7 环烷基结构；

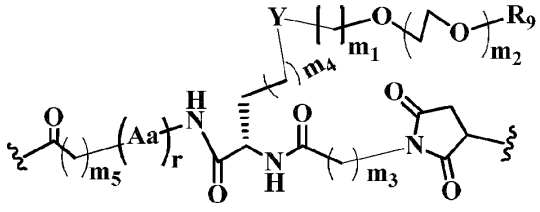
R_5 是 H、O-C_1-C_6 烷烃基、C(O)-H、C(O)-C_1-C_6（直链或支链）烷烃基、C(O)-NH-C_1-C_6（直链或支链）烷基或 C(O)-N(C_1-C_6（直链或支链）烷基)$_2$；

R_6、R_7和R_8分别独立地是H、C_1-C_6烷烃基、C_1-C_6烷醚基(R_1OR_2)、C_1-C_6烷羰基(R_1COR_2)、C_1-C_6烷酯基(R_1COOR_2)、C_1-C_6烷羧基((R_1COOH)或C_1-C_6烷酰胺基((R_1CONHR_2)；优选R_6、R_7和R_8分别独立地是H或CH_3；

mAb是抗体、抗体片段、单克隆抗体、多克隆抗体、纳米抗体、前药抗体(probody)，或者用合成分子或蛋白进行修饰过的抗体及抗体片段；

L是含有亲水支链的连接体，其主要构架是C_2-C_{100}的肽单元(1~12个天然或非天然氨基酸)、腙键基团、二硫化物基团、酯基团、肟基团、酰胺基团或硫醚键基团构成。

在一个方面，在本发明的偶联物中，L的结构为：



(Ia)，

其中Aa是L-或D-天然或非天然氨基酸；

r是0-12之间的整数；当r不是0时，$(Aa)_r$是由相同或不同的氨基酸构成的肽单元；

m_1 = 1-18之间的整数；m_2 = 1-100之间的整数；m_3 = 1-8之间的整数；m_4 = 0-8之间的整数；m_5 = 1-8之间的整数；

Y是NHC(=O)、$NHS(O_2)$、NH(SO)、$NHS(O_2)NH$、NHP(O)(OH)NH或C(O)NH；

R_9是H、$(O=)CR_1$、$(O=)CNHR_1$、R_1COOH、$R_1(COCH_2NH)_{m2}H$、$R_1(Aa)_r$或$R_1(COCH_2NCH_3)_{m2}H$，以及

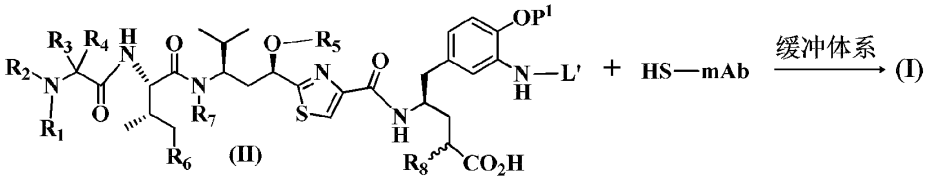
R_1、m_2和$(Aa)_r$定义如权利要求1和上述定义所述。

此外，所述细胞表面受体结合分子mAb可以为任何形式的细胞结合体，包括肽或类似肽的结构：抗体，单链抗体，可以与目标细胞结合的抗体片段，单克隆抗体，单链单克隆抗体，可以与目标细胞结合的单克隆抗体片段，嵌合抗体，可以与目标细胞结合的嵌合抗体片段，功能区抗体，可以与目标细胞结合的功能区抗体片段，仿抗体的基因工程蛋白质，纤连蛋白结合体adnectin，预设计锚蛋白重复蛋白（DARPin），淋巴因子，激素，维他命，生长因子，集落刺激因子，营养传送分子，转铁蛋白，细胞表面小分子配体，或连接有细胞结合体的白蛋白、高分子、

或树枝高分子，表面含有细胞结合分子（结合肽、蛋白、抗体或细胞表面小分子配体）的高分子材料、蛋白、脂质体、纳米颗粒、泡馕或（病毒）微囊。

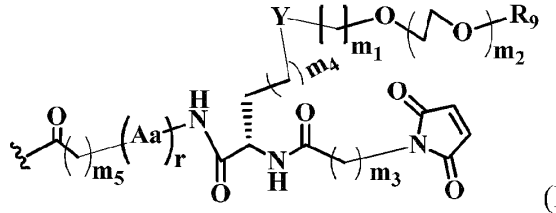
细胞结合分子-Tubulysin B 衍生物偶联物的制备

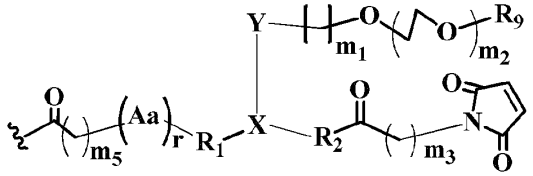
在一具体实施例中,所述细胞结合分子-Tubulysin B 衍生物偶联物的合成包括下列步骤中的一种或多种：



其中结构式(II)中的 P^1、“〰”、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7和 R_8以及 mAb 如结构式(I)中所述；

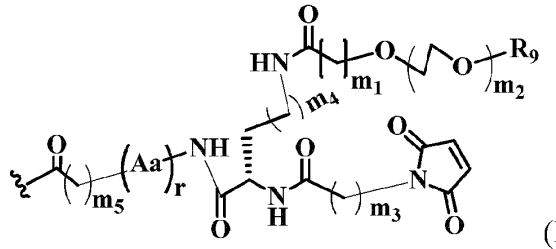
L'的结构为(II-0)和(II-00)：

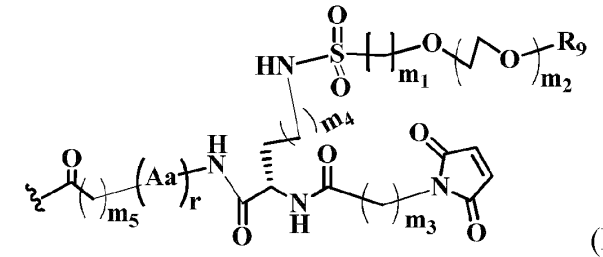

(II-0),


(II-00),

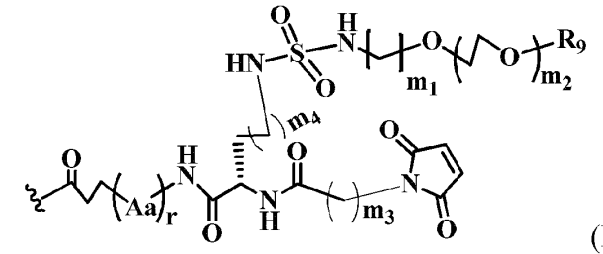
其中 m_1、m_2、m_3、m_4、m_5、Aa、r、Y 和 R_9如结构式(I)所述。

具体理想的 L'的结构是：

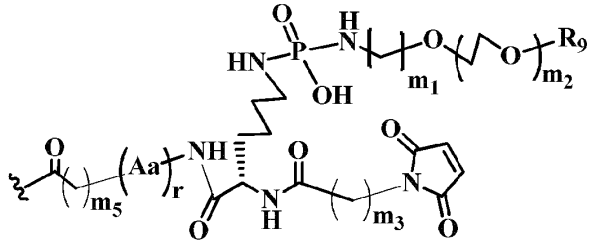

(II-1)、



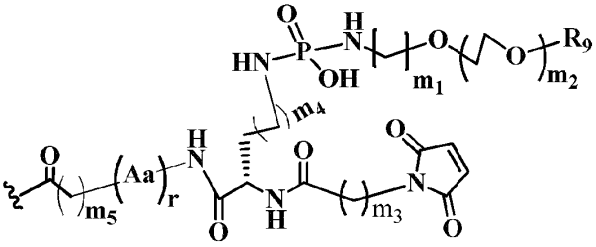
(II-2)、



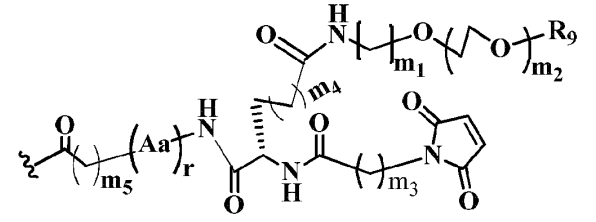
(II-3)、



(II-4)、



(II-5)或



(II-6)；

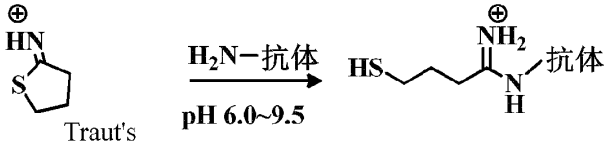
其中 m_1、m_2、m_3、m_4、m_5、Aa、r 和 R_9 如权利要求 1-2 中任一项所述。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，进行偶连的 mAb-SH 的制备方法包括以下 a)~c)中的任一个：

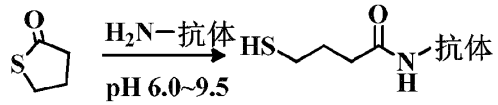
a). 由还原剂(优选，三(2-羧基乙基)膦(TCEP)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫季戊四醇(DTE)、L-谷胱甘肽(GSH)、2-巯基乙胺(β-MEA)或/和 β-巯基乙醇(β-ME，2-ME))还原抗体、抗体片段、单克隆抗体、多克隆抗体、纳米抗

体、前药抗体(probody)或用合成分子或蛋白进行修饰过的抗体及抗体片段重轻链间、重重链间或自身链间的二硫键来获取；

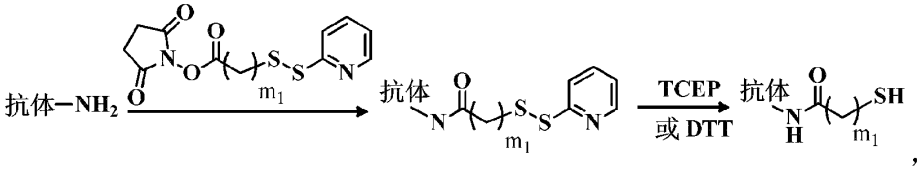
b). 通过 Traut 试剂或硫内酯与抗体分子的胺反应形成硫醇来制备：



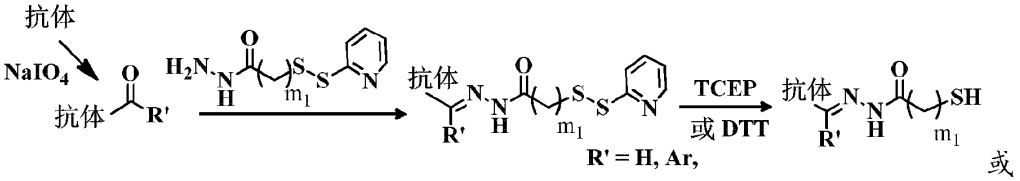
或



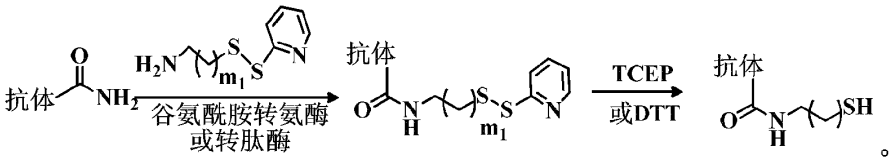
c). 在缓冲体系条件下，通过生化反应，在抗体上引入较易还原的二硫键基团，然后用 TCEP、DTT、GSH、β-MEA、β-ME 还原：



，



或



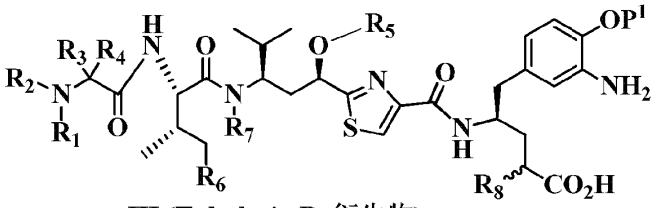
。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，偶联物的合成中使用的缓冲体系是：pH 5.0～9.5，浓度为 1 mM～1000 mM 的磷酸、醋酸、柠檬酸、硼酸、碳酸、巴比妥酸、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、苯甲酸或三乙醇胺、或它们的混合物缓冲溶液，并含有体积比为 0%～35% 的水溶性有机溶剂：甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、乙腈、丙酮、DMF、DMA 或 DMSO，偶联反应温度控制在 0 ℃～45 ℃，偶联反应是 5 分钟～96 小时。

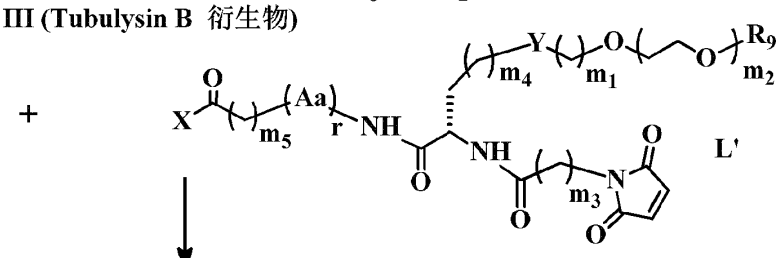
在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，在偶联反应完成后，采用超滤或柱层析法进行纯化获得结构式为(I)的偶联物。常用的柱层析包括分子筛柱、阳离子柱、阴离子柱、疏水(HIC)柱、反相柱

或者蛋白 A 或 G 亲和柱。

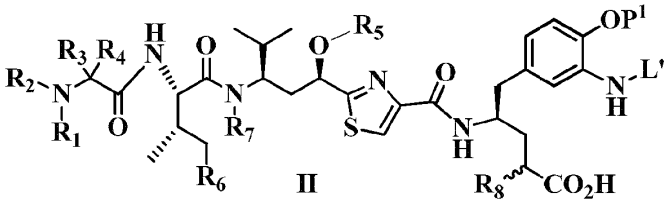
在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式为(II)的合成由结构式为(III)的 Tubulysin B 衍生物和结构式为(L')的化合物缩合反应获得：



III (Tubulysin B 衍生物)

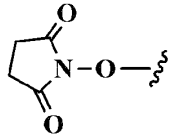
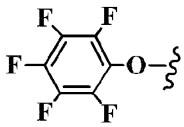
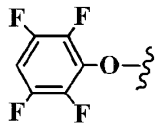
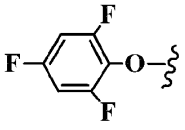
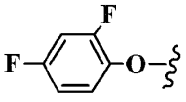
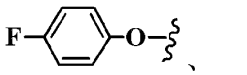
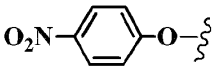
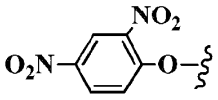
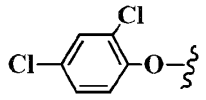
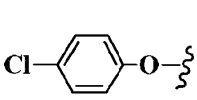
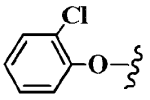
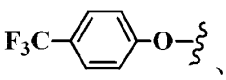
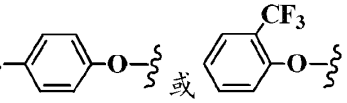


L'



II

，

其中 X 是 OH、卤素(F、Cl、Br、或 I)、苯酚、五氯酚、三氟甲基磺酸、咪唑、二氯苯酚、四氯苯酚、1-羟基苯并三氮唑、对甲苯磺酸、甲磺酸、2-乙基-5-苯基异噁唑-3'-磺酸、、、、、、、、、、、、、或、自我酸酐或与其他酸酐如乙酰酐、甲酸酐形成的酸酐；或多肽缩合反应中间体或 Mitsunobu 反应中

间体；

其中，缩合反应是在含有体积比为 1% - 100%的吡啶、三乙胺或二异丙基乙胺的有机溶剂二氯甲烷、二氯乙烷、DMF、DMA、四氢呋喃(THF)、DMSO、丙酮、异丙醇、正丁醇或乙腈中，或上面二种或三种以上溶剂的混合溶剂，或有或无惰性气体(氮气、氩气、氦气)保护下，温度控制在-20 °C – 150 °C 条件下，反应时长 5 分钟 – 120 小时完成；

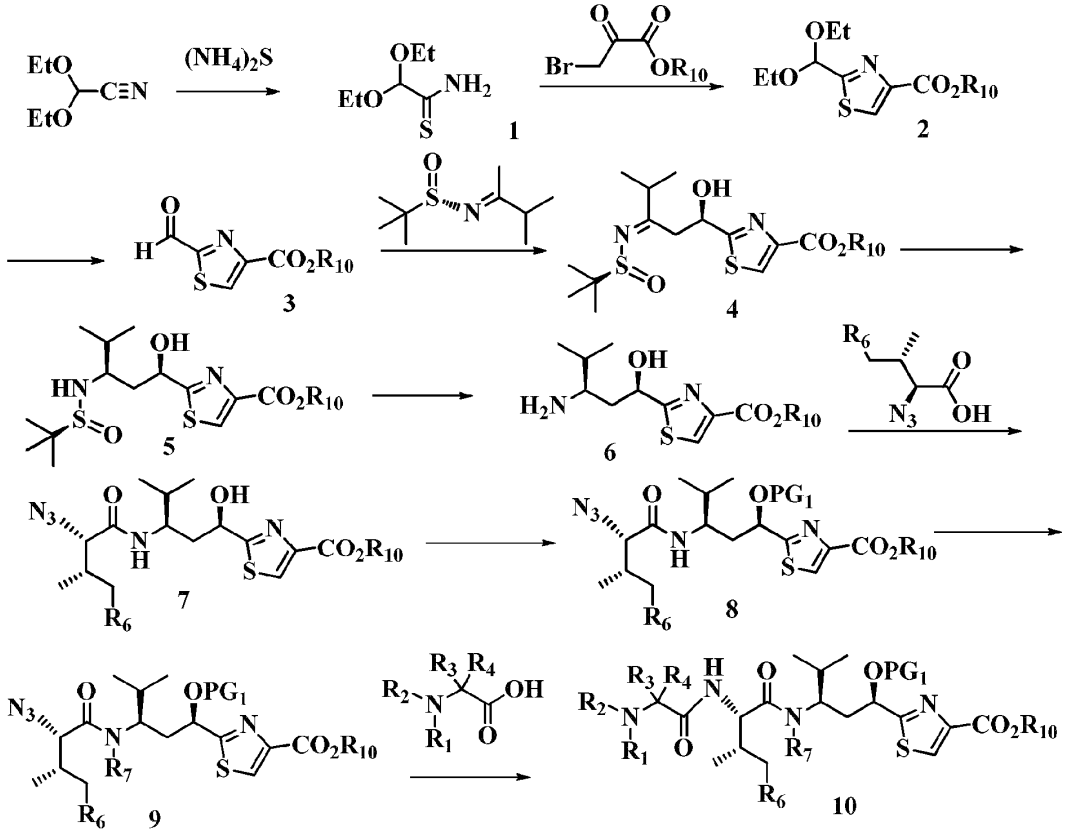
或者，缩合反应在如下缓冲体系及如下条件下进行，所述缓冲体系是：pH 5.0 ~ 9.5, 浓度为 1 mM ~ 1000 mM 的磷酸、醋酸、柠檬酸、硼酸、碳酸、巴比妥酸、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、苯甲酸或三乙醇胺、或它们的混合物缓冲溶液，并含有体积比为 0% ~ 35%的水溶性有机溶剂：甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、乙腈、丙酮、DMF、DMA 或 DMSO，偶联反应温度控制在 0 °C ~ 45 °C，偶联反应是 5 分钟~ 96 小时。

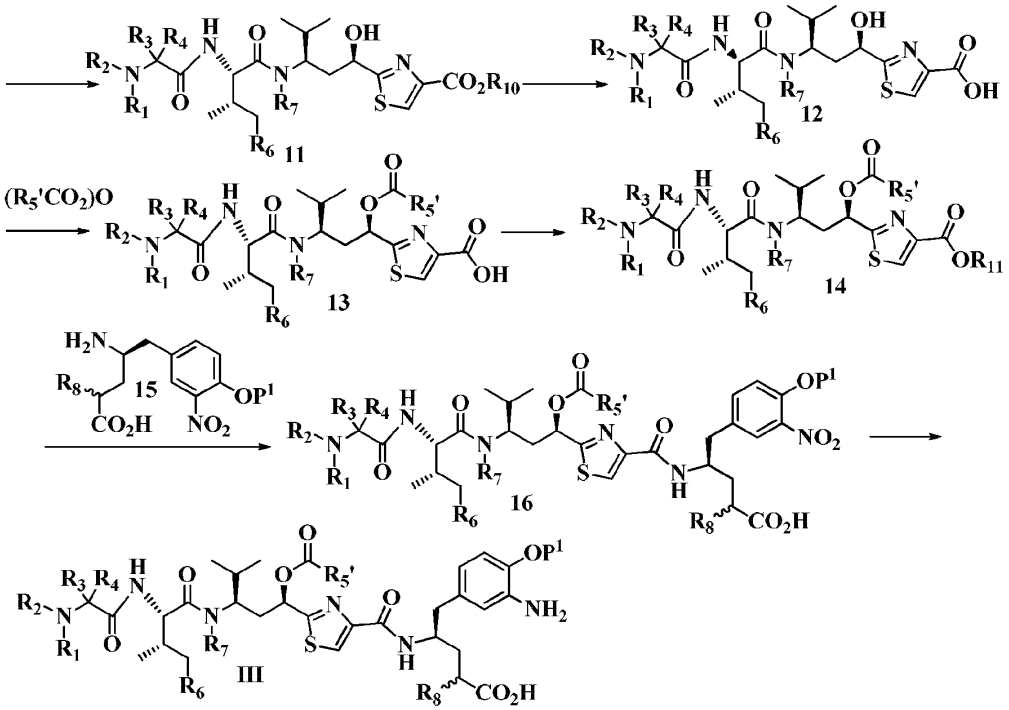
另外，结构式(III)中的 NH_2 基团理想地是以三氟乙酸盐、盐酸盐、甲酸盐、醋酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、柠檬酸盐、丁二酸盐、苯甲酸、磺酸盐形式进行缩合反应。

当 X 是 OH 时，上述缩合反应需借助缩合试剂，通常缩合试剂可选择地是：1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)，二环己基碳二亚胺(DCC)，N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(DIC)，1-环己基-2-吗啉乙基碳二亚胺对甲苯磺酸盐(CMC 或 CME-CDI)，羰基二咪唑(CDI)， O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸(TBTU)，O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)，苯并三氮唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)，六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)，焦碳酸二乙酯(DEPC)，N,N,N',N'-四甲基氯甲脒六氟磷酸盐，2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)，1-[(二甲胺)(吗啉基)亚甲基]-1 [1,2,3]三唑并[4,5-b] 1-吡啶-3-氧六氟磷酸盐(HDMA)，2-氯-1,3-二甲基咪唑鎓六氟磷酸盐(CIP)，氯代三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyCloP)，双(四亚甲基)氟代甲酰胺(BTFFH)，N,N,N',N'-四甲基-硫-(1-氧代-2-吡啶基)硫脲鎓六氟磷酸盐，2-(2-吡啶酮-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐(TPTU)，硫-(1-氧代-2-吡啶基)-N,N,N',N'-四甲基硫脲六氟磷酸盐，O-[(乙氧基羰基)氰基甲胺]-N,N,N',N'-四甲基硫脲六氟磷酸盐(HOTU)，(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基氨基氧基)二甲基氨基-吗啉-碳鎓六氟磷酸盐(COMU)，(苯并三氮唑-1-基氧基)二吡咯烷碳六氟磷酸盐

(HBPyU)，N-苄基-N'-环己基碳二亚胺(或荷载在聚合物上)，二吡咯烷基(N-琥珀酰亚氨氧基)碳鎓六氟磷酸盐(HSPyU)，1-(氯-1-吡咯烷基亚甲基)吡咯烷六氟磷酸盐(PyClU)，2-氯-1,3-二甲基咪唑四氟硼酸盐(CIB)，(苯并三氮唑-1-基氧基)二吡啶碳六氟磷酸盐(HBPipU)，6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯(TCTU)，溴化三(二甲基氨基)膦六氟磷酸(BrOP)，1-正丙基磷酸酐(PPACA，T3P®)，2-异氰基乙基吗啉(MEI)，N,N,N',N'-四甲基脲-氧-(N-琥珀酸亚胺基)六氟磷酸盐(HSTU)，2- 溴 -1 -乙基吡啶四氟硼酸盐(BEP)，氧-[(乙氧基羰基)氰基甲胺]-N,N,N',N'-四甲基硫尿四氟硼酸盐(TOTU)，4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(MMTM, DMTMM)，2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯(TSTU)，N,N,N',N'-四甲基-O-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)脲四氟硼酸盐(TDBTU)，偶氮二甲酰二哌啶(ADD)，双(4-氯苄基)偶氮二甲酸酯(DCAD)，偶氮二甲酸二叔丁酯(DBAD)，偶氮二甲酸二异丙酯 (DIAD)或偶氮二甲酸二乙酯(DEAD)。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式(III)的 Tubulysin B 衍生物的合成包括下列步骤中的一种或多种：

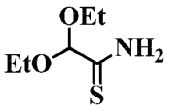




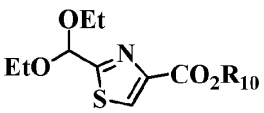
其中 R_5'是 H、C_1-C_6烷烃基、C_1-C_6烷烃基、或 C_1-C_6（直链或支链）胺烷基；其他基团的定义如前述。

理想条件下，结构式(III)的 Tubulysin B 衍生物的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 将二乙氧基乙腈与硫化铵的水溶液在室温搅拌，得到化合物 1 即 2,2-二乙氧基硫代乙酰胺；

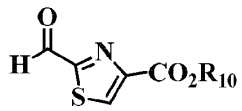


步骤 2. 将化合物 1 与溴丙酮酸酯在无水溶剂(如无水四氢呋喃、二氯甲烷、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、甲醇、异丙醇)中加热，缩合得化合物 2；



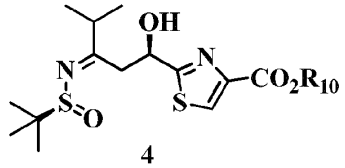
步骤 3. 将化合物 2 溶解在溶剂(如四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯、正庚烷、二氧六环、乙腈)中，用路易斯酸或质子酸(包括盐酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、甲酸、草酸、乙酸、对甲苯磺酸、对甲苯磺酸吡啶、$AlCl_3$、$FeCl_3$、

$ZnCl_2$、BF_3、BCl_3、BBr_3、$TiCl_4$、$ZnBr_2$、$LiBF_4$)水解，得到化合物 3；



3

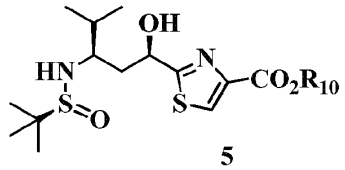
步骤 4. 不饱和亚磺酰胺在低温条件下(如-45℃至-78℃)被正丁基锂等碱脱氢，然后在路易斯酸存在的条件下与化合物 3 发生加成反应，得到化合物 4；



4

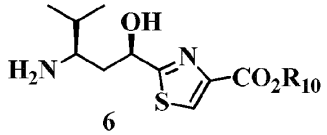
路易斯酸选择为包括盐酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、甲酸、草酸、乙酸、对甲苯磺酸、对甲苯磺酸吡啶、$AlCl_3$、$FeCl_3$、$ZnCl_2$、BF_3、BCl_3、BBr_3、$TiCl_4$、$ZnBr_2$、$LiBF_4$；

步骤 5. 化合物 4 在低温条件(如-45℃至-78℃)被下被还原剂(如$NaBH_4$、$LiBH_4$、$Na(OAc)_3BH$、$Na(CN)BH_3$等)选择性地还原，通过加入路易斯酸(如 Ti(Oet)4)，控制其立体化学，得到化合物 5；



5

步骤 6. 将化合物 5 溶解在溶剂(如甲醇、乙醇、异丙醇、四氢呋喃、乙腈)中，被盐酸、硫酸和磷酸等酸脱去叔丁基亚磺酰基，得到化合物 6；

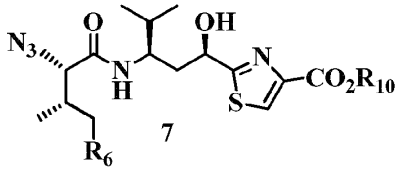


6

步骤 7. 将化合物 6 和叠氮酸溶解在溶剂(如正庚烷、四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺)中，在缩合试剂(如 DIC/HOBt、DCC/HOBt、EDC/HOBt、HATU、BOP、T3P、BrOP)存在下，或通过缩合反应路线，发生缩合反应，得到化合物 7；

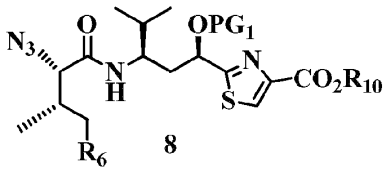
或者，叠氮酸与氯甲酸异丁酯在有机碱(如三乙胺、二异丙基乙胺、N-甲基吗啡啉等)存在时在 THF 中反应，得到混合酸酐，再和化合物 6 的盐酸盐发生缩合，得到化合物 7；

或者，叠氮酸在溶剂(如正庚烷、正己烷、二氯甲烷、四氢呋喃)中与草酰氯、三乙胺和催化剂量的 DMF 反应，被转换成酰氯，再和化合物 6 的盐酸盐发生缩合，得到化合物 7；



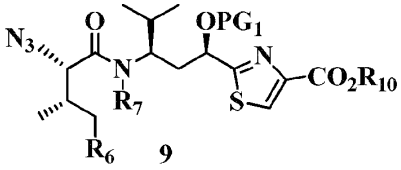
7

步骤 8. 在溶剂(如二氯甲烷、四氢呋喃、乙腈)中，化合物 7 上的羟基与羟基保护试剂(如 TESCl)，在有机碱(如咪唑、三乙胺、吡啶)的作用下得到化合物 8；



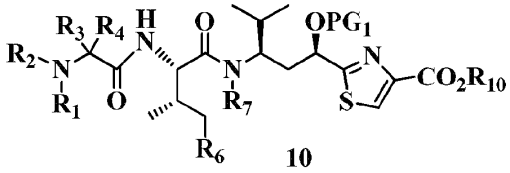
8

步骤 9. 化合物 8 被溶解在溶剂(如四氢呋喃、二氯甲烷、乙腈)中，在碱(如 KHMDS，LiHMDS，NaHMDS，KOtBu，NaH，KH)的作用下，酰胺发生去质子化，然后与碘甲烷、溴甲烷、硫酸二甲酯、三氟甲磺酸甲酯或碘乙烷等发生烷基化反应，得到化合物 9；



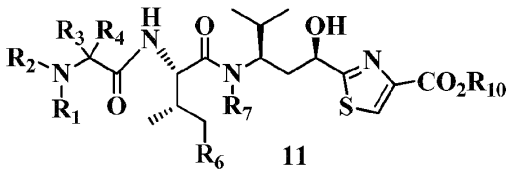
9

步骤 10. 化合物 9 被溶解在溶剂(如四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯)中，其中的叠氮基在一定的条件下，如在氢气和钯碳催化剂、三苯基膦和水(Staudinger 反应)的存在下，被还原成氨基，然后与酸或者具有反应活性的酸衍生物发生缩合，得到化合物 10；



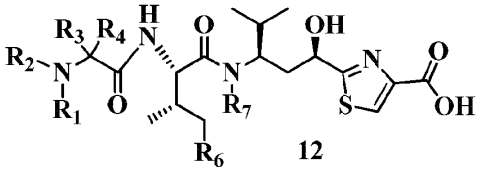
10

步骤 11. 化合物 10 中的羟基保护基 PG_1 在适当的条件(如 TES 保护基团可以在盐酸、THF/MeOH/AcOH、nBu_4NF 或吡啶氢氟酸盐的 THF 溶液中被脱保护)下被脱保护，得到化合物 11；



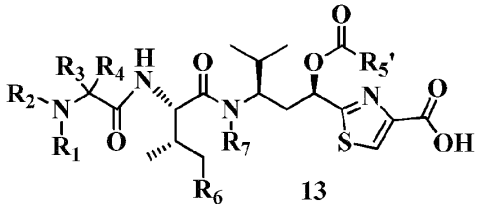
11

步骤 12. 化合物 11 中的酯基在碱(如 LiOH、NaOH、KOH)的作用下，或其他适当条件(如甲酯可以在 LiCl、LiI、Me3SiOK 等试剂的作用下被转化成羧酸)下被转化成酸化合物 12；



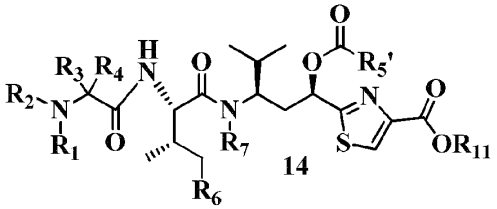
12

步骤 13. 在碱(如三乙胺、N,N-二异丙基乙胺、吡啶)和催化剂(如 DMAP)存在时，一定的温度条件(如 0℃至 23℃)下，化合物 12 与乙酸酐，丙酸酐、异丙酸酐等酸酐、乙酰卤、丙酸卤、丙酸卤、甲酰胺卤、异酰胺卤、二甲酰胺卤等酸卤作用，得到化合物 13，该反应也可不使用碱或者催化剂；



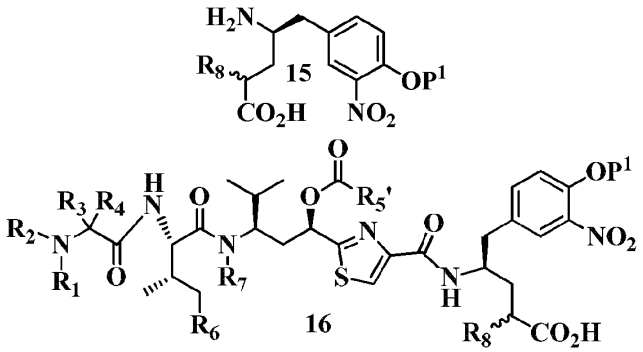
13

步骤 14. 化合物 13 与适当的含羟基的化合物如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺在缩合试剂(如 EDC、DIC、DCC、HATU、HBTU)存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酯化合物 14；

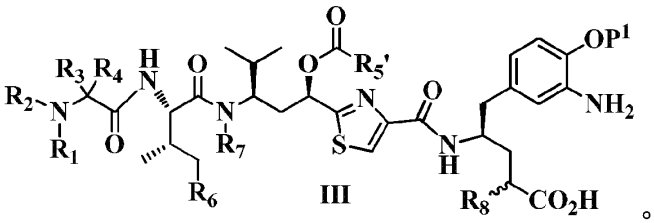


14

步骤 15. 化合物 15 与化合物 14，在水相、一定的 pH 值条件(如 pH = 5.0-8.0)下，或者有机相、存在有机碱(如 TEA、DBU、DIPEA)或无机碱(如 Na_2CO_3、Cs_2CO_3、K_2CO_3、$NaHCO_3$)时，发生缩合反应，得到化合物 16；反应也任选不使用任何碱，条件是需要控制一定的反应温度(如 0℃至 23℃)和反应时间(如 30 分钟至 18 小时)；

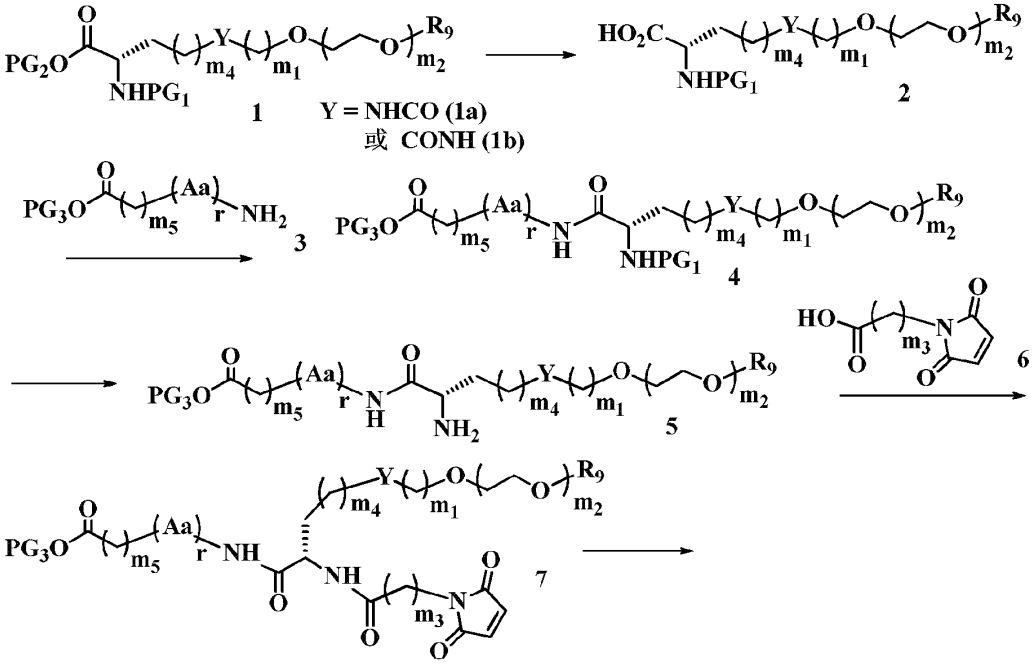


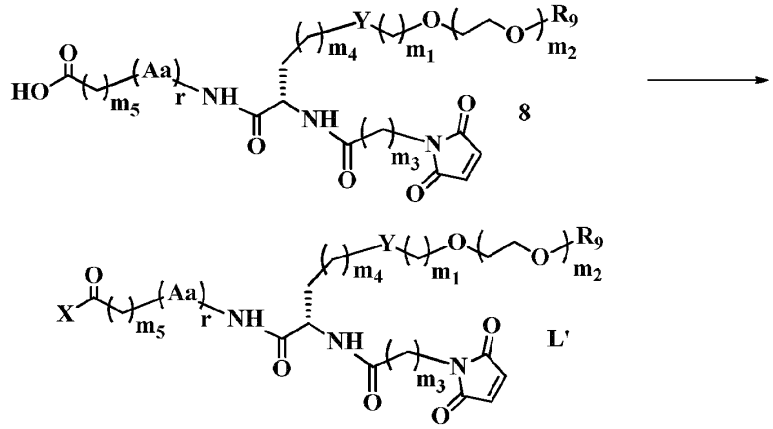
步骤 16. 化合物 16 中的硝基在还原条件下，如在氢气和钯碳催化剂、水合肼和 $FeCl_3$、铁粉和醋酸等的存在的条件下，被还原成氨基，得到化合物 III；



。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式为(L')的化合物的合成包括下列步骤中的一种或多种：

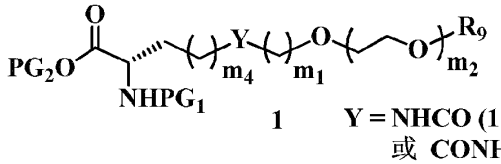




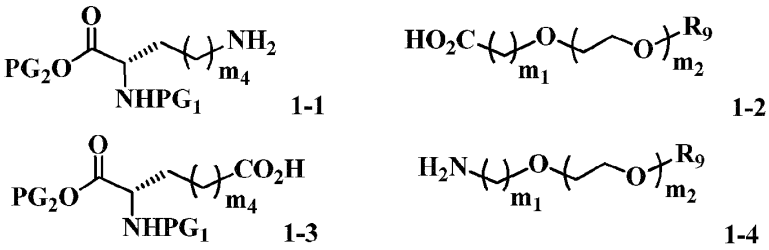
理想条件下，结构式为(L')的化合物的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 化合物 1-1 和化合物 1-2 在缩合剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)的作用下缩合，或者经过缩合反应路线发生缩合反应(如化合物 1-2 在缩合试剂如 DIC 和 EDC 的作用下与五氟苯酚、硝基苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺发生缩合反应，生产相应的活性酯，然后再与化合物 1-1 反应)，得到化合物物 1a；

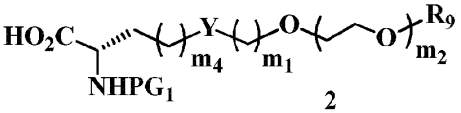
或者，化合物 1-3 和化合物 1-4 在缩合剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)的作用下，或者经过缩合反应路线发生缩合反应，得到化合物物 1b；



1 Y = NHCO (1a)
或 CONH (1b)

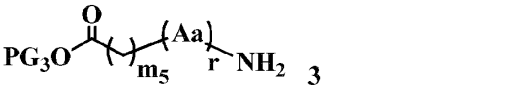


步骤 2. 化合物 1 中的羧基保护基 PG_2 在脱保护试剂作用下(如叔丁酯基在酸的作用下)，被去除，得到化合物 2；

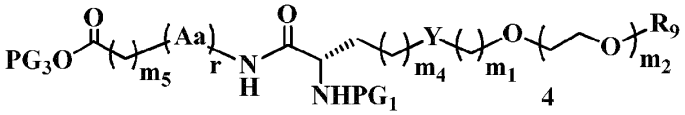


步骤 3. 含羧基的化合物 2 和含氨基的化合物 3 在缩合剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)作用下，或者经过缩合反应路线发生缩合反应，得到化

合物 4；

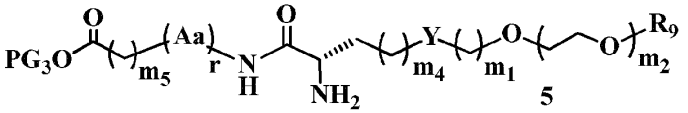


3



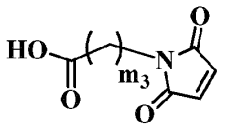
4

步骤 4. 化合物 4 上的氨基保护基团 PG_1 在去保护条件下被去除，如氨基上的 Cbz 保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除，氨基上的 Boc 保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 5；

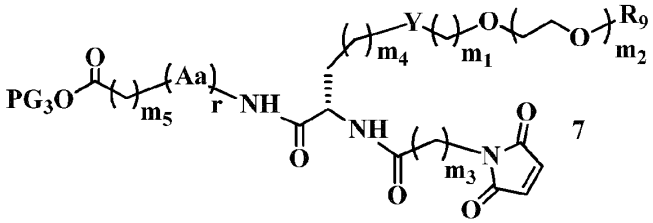


5

步骤 5. 含羧基化合物 6 和含氨基的化合物 5 在缩合剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)作用下，或者经过缩合反应路线发生缩合反应，得到化合物 7；

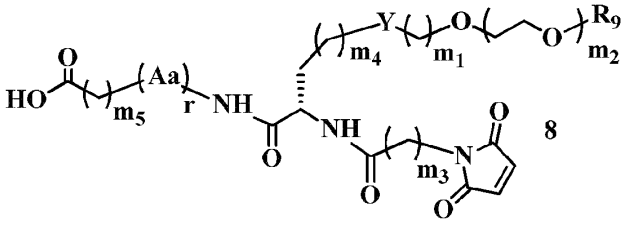


6



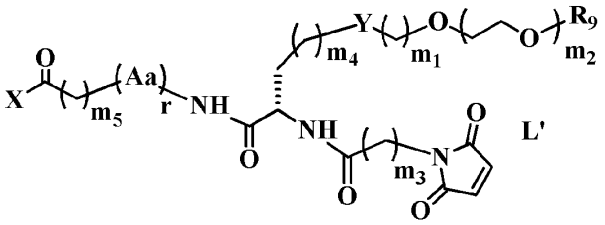
7

步骤 6. 化合物 7 上的羧基保护基团 PG_3 在去保护条件下被去除(如羧基上的叔丁基酯保护基可以在甲酸、乙酸、三氟乙酸、盐酸、磷酸等的作用下被切除)，得到化合物 8；

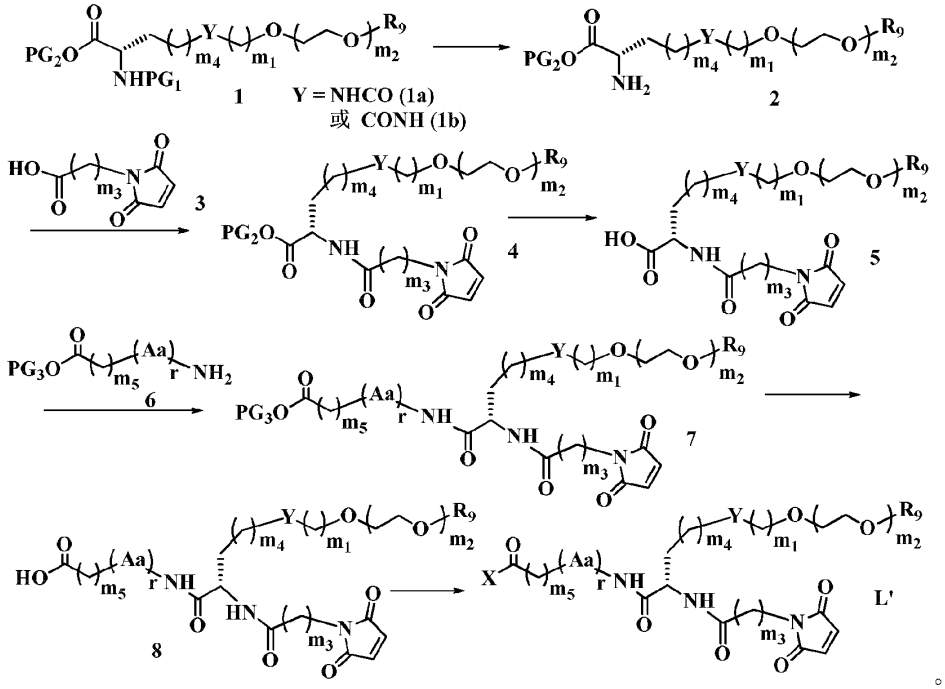


8

步骤 7. 化合物 8 与含羟基的化合物(如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酯化合物，或与其他酸活化基团反应得到具有缩合反应活性的化合物 L'；

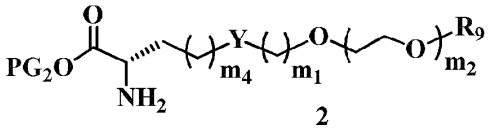


16. 如权利要求 9-13 中任一项所述的偶联物，其特征在于，结构式为(L')的化合物的合成包括下列步骤中的一种或多种：

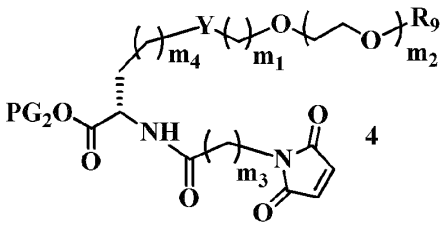


理想条件下，结构式为(L')的化合物的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 化合物 1 上的氨基保护基团 PG_1 在去保护条件下被去除，如氨基上的 Cbz 保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除，氨基上的 Boc 保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 2；

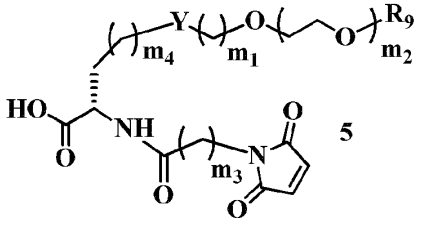


步骤 2. 含氨基的化合物 2 和含羧基的化合物 3 在缩合试剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)作用下，或者经过缩合反应路线发生缩合反应，得到化合物 4；



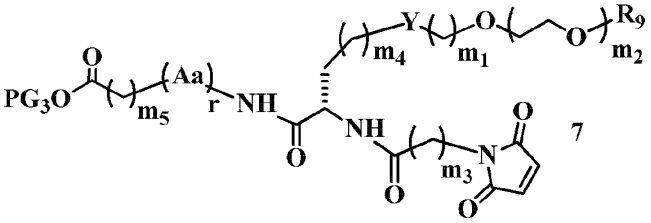
4

步骤 3. 化合物 4 上的羧基保护基团 PG_2 在去保护条件下被去除，如羧基上的叔丁基酯保护基可以在甲酸、乙酸、三氟乙酸、盐酸、磷酸等的作用下被切除，得到化合物 5；



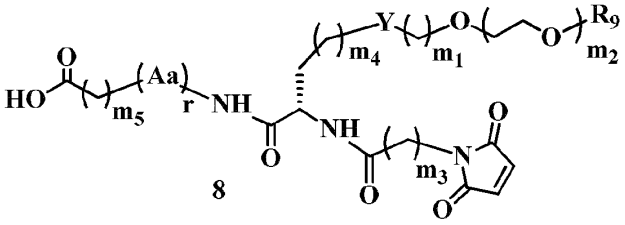
5

步骤 4. 含羧基化合物 5 和含氨基的化合物 6 在缩合剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)作用下，或者经过缩合反应路线发生缩合反应，得到化合物 7；



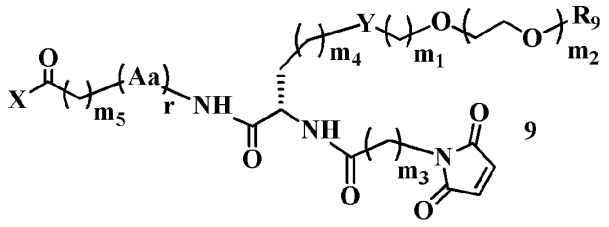
7

步骤 5. 化合物 7 上的羧基保护基团 PG_3 在去保护条件下被去除，如羧基上的叔丁基酯保护基可以在甲酸、乙酸、三氟乙酸、盐酸、磷酸等的作用下被切除，得到化合物 8；



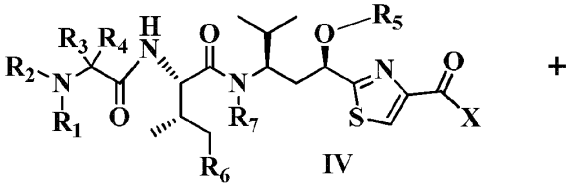
8

步骤 6. 化合物 8 与含羟基的化合物(如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酯化合物，或与其他酸活化基团反应得到具有缩合反应活性的化合物 9；



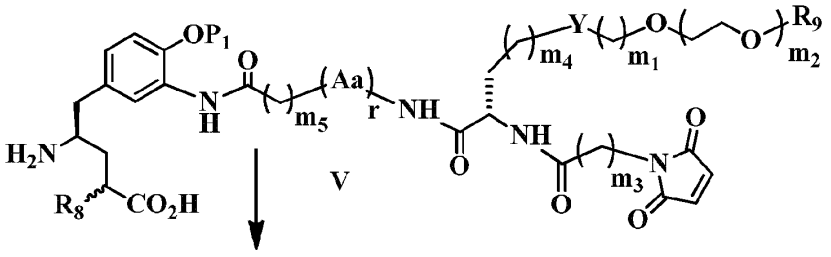
9

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式为(II)化合物的合成由结构式(IV)和结构式(V)缩合反应获得：

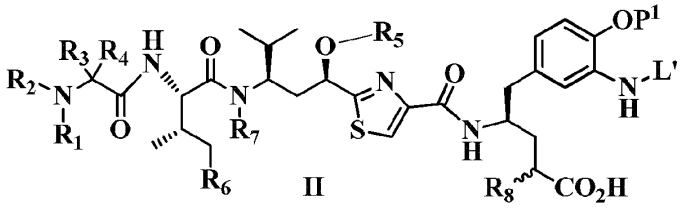


IV

+



V

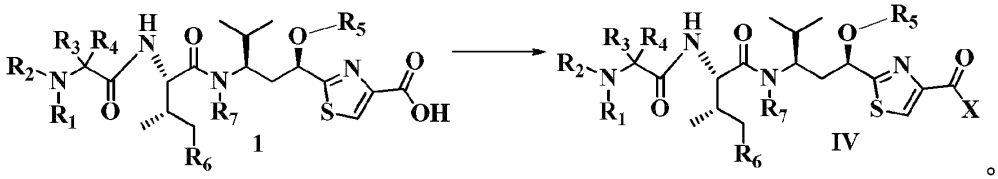


II

其中 X 定义及缩合反应条件如前面所述；

结构式(V)中的 NH_2 基团优选地是以三氟乙酸盐、盐酸盐、甲酸盐、醋酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、柠檬酸盐、丁二酸盐、苯甲酸或磺酸盐形式进行缩合反应。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式(IV)的合成包括下列步骤中的一种或多种：



1 IV

。

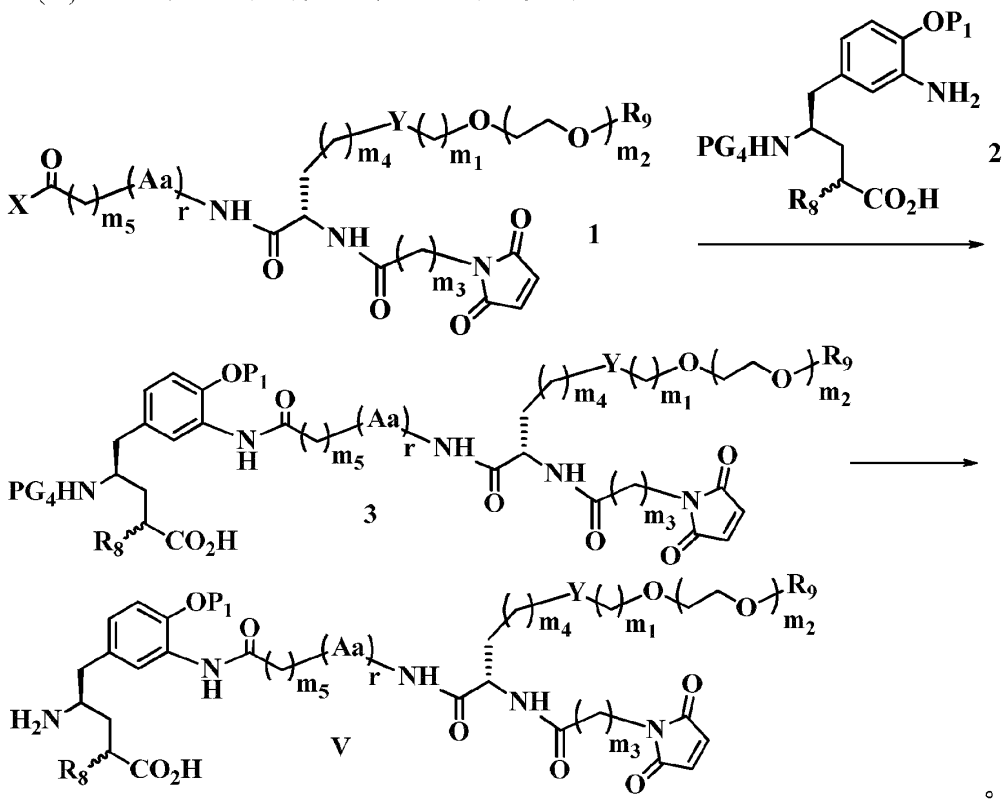
理想条件下，结构式(IV)的合成包括下列步骤中的任一种：

羧酸化合物 1 与含羟基的化合物(如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂(如 EDC、DIC、DCC、HATU、HBTU)存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酯；

或者，羧酸化合物 1 与氯甲酸乙酯、氯甲酸异丁酯等，在有机碱(如 N-甲基吗啡啉、三乙胺、二异丙基乙胺等有机碱)存在下反应，得到具有反应活性的混合酸酐；

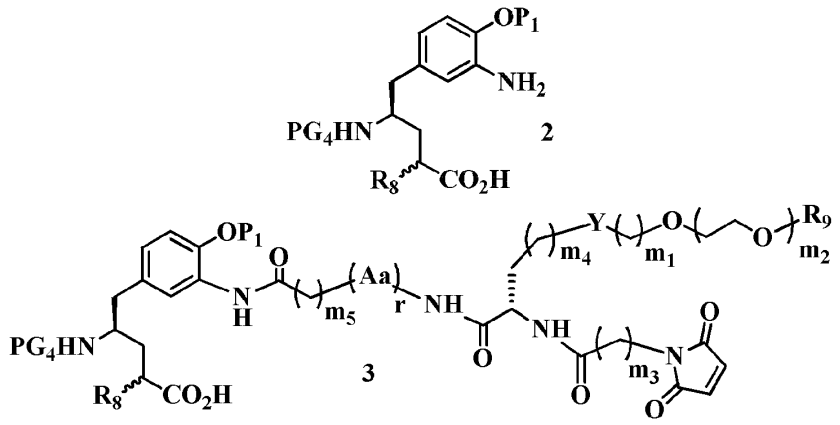
或者，羧酸化合物 1 与草酰氯，在三乙胺等有机碱和催化剂量(如 0.01 当量至 0.5 当量)的 DMF 存在条件下，反应得到酰氯。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式(V)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

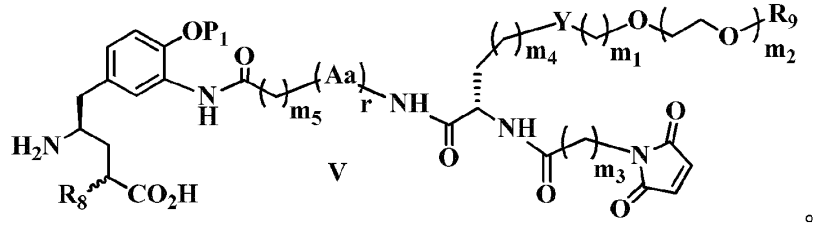


理想条件下，结构式(V)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 化合物 1 与化合物 2，在水相，一定的 pH 值条件(如 pH = 5.0-8.0)下，或者有机相，存在有机碱(如 TEA、DBU、DIPEA)或无机碱(如 Na_2CO_3、Cs_2CO_3、K_2CO_3、$NaHCO_3$)时，发生缩合反应，得到化合物 3；反应也任选不使用任何碱，但是需要控制合适的反应温度和反应时间；

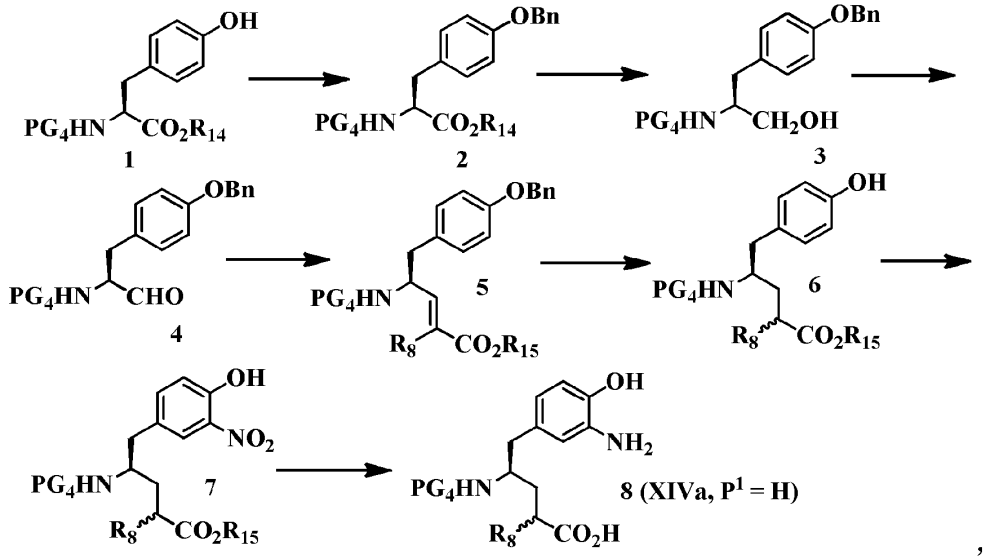


步骤2. 化合物3上的氨基保护基团PG_4在去保护条件下被去除(如氨基上的Cbz保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除)，氨基上的Boc保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物V；



。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，化合物2的合成包括下列步骤中的一种或多种：



，

其中，该合成步骤中得到的化合物8(化合物XIVa)即为所述目标化合物2；PG_4是氨基保护基团。

理想条件下，化合物 2 的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 将 L-酪氨酸的酯类衍生物 1 溶解于适当的溶剂，如丙酮、四氢呋喃、乙腈、二氯甲烷等，或者这些溶剂与水的混合溶剂，与苄基氯、苄基溴或其它苄基化合物，在 0 至 60 °C 反应，可在反应体系中加入适当的有机或无机碱，如碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠、碳酸氢钾、氢氧化钠、氢氧化钾、三乙胺、DBU、氢化钠等，也可在体系内加入适当的添加剂如碘化钠或相转移催化剂，如苄基三乙基氯化铵(TEBA)、四丁基溴化铵(TBAB)、四丁基氯化铵、四丁基硫酸氢铵、三辛基甲基氯化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十四烷基三甲基氯化铵等，得到化合物 2；

步骤 2. 将化合物 2 溶解于有机溶剂如二氯甲烷、四氢呋喃、甲醇、乙醇、乙醚等，用还原剂，如氢化铝锂、DIBAL、硼氢化钠、硼氢化锂、二氢双(2-甲氧乙氧基)铝酸钠(Red-Al)、乙硼烷等还原，可在反应体系中加入添加剂，如 I_2、三氯化铁、氯化锌、氯化镁、氯化锂、氯化钙等控制还原剂的活性，得到化合物 3；

步骤 3. 醇类化合物 3 在适当的氧化条件下，如 swern 氧化(草酰氯、DMSO、三乙胺)、Parikh-Doering 氧化(三氧化硫吡啶氧化)、Dess-Martin 氧化等，被氧化成醛 4；

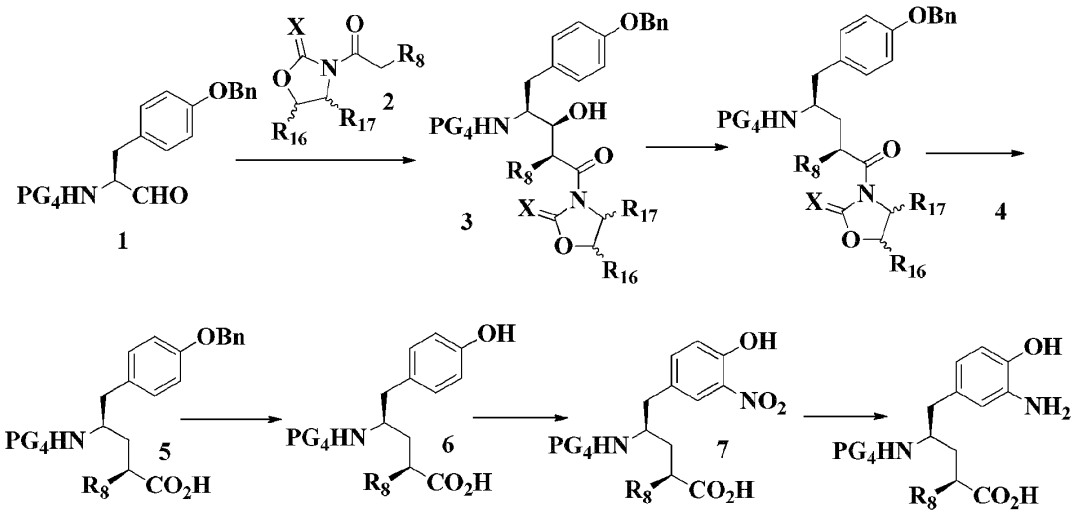
步骤 4. 醛 4 与磷酸酯反应(Horner-Wadsworth-Emmons 反应)或者磷叶立德反应(Wittig 反应)，进行碳链延长，得到化合物 5；

步骤 5. 化合物 5 中的双键在均相或两相催化剂的作用下被氢化还原，其中的苄基也同时被脱去，得到立体结构单一的手性化合物，或者两个非对映异构体的混合物；催化剂包括 Pd/C、$Pd(OH)_2/C$、$Pd/BaSO_4$、PtO_2、Pt/Al_2O_3、Ru/C、Raney 镍等两相催化剂，均相不对称氢化催化剂，如 Crabtree 催化剂、[Ru(II)-(BINAP)]类催化剂、$[(Ph3P)CuH]_6$ 催化剂等；

步骤 6. 将化合物 6 溶解在有机溶剂中，如四氢呋喃、乙腈、二氯甲烷，在硝化反应条件下被硝化，硝化试剂包括硝酸、硝酸/醋酸、硝酸钾/硫酸、亚硝基叔丁酯、硝酸/三氟乙酸酐、NO_2BF_4、硝基吡啶鎓盐等；

步骤 7. 在以下条件下化合物 7 中的硝基被还原成氨基，这些条件包括 $H_2/Pd/C$，Fe 或 Zn/HOAc，$SnCl_2/HCl$。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，化合物 2 的合成包括下列步骤中的一种或多种：



8 (XIVb, P^1 = H)

其中，该合成步骤中得到的化合物 8(化合物 XIVb)即为所述目标化合物 2。

理想条件下，化合物 2 的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 化合物 1 在-78°C 至-45°C 条件下，与 Evans 手性 N-酰基噁唑烷酮或硫酮 2，其中 X = O 或 S，R_{16} = H，甲基，苯基，R_{17} = H，甲基，异丙基、苯基、苄基等，进行 Aldol 反应，得到立体构型单一的化合物 3；

步骤 2. 化合物 3 上的羟基在以下条件下被脱去，这些条件包括 Barton–McCombie 去氧反应，即醇首先转化为硫代酰基衍生物，如烷基黄原酸盐、硫代氨甲酸苯酯、硫代羰基咪唑酯，然后用 Bu_3SnH 处理，发生自由基断裂得到脱羟基产物；自由基断键的条件包括：n-Bu_3SnH/AIBN，n-Bu_3SnH/AIBN/n-BuOH/PMHS，$(Bu_4N)_2S_2O_8$/HCO_2Na；

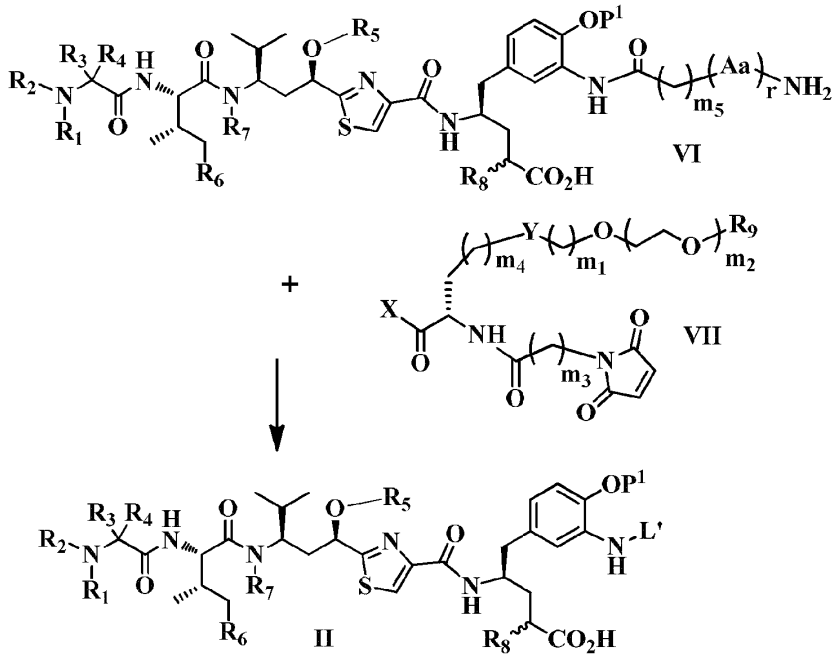
步骤 3. 将化合物 4 溶解在四氢呋喃中，Evans 手性辅基在 LiOH/H_2O_2 的条件下被切断得到相应的酸 5；

步骤 4. 化合物 5 被溶解在有机溶剂中，如乙酸乙酯、甲醇、二氯甲烷、乙醇或乙酸等，其中的苄基在钯炭催化剂存在下被催化氢解，得到化合物 6；

步骤 5. 将化合物 6 溶解在有机溶剂中，如四氢呋喃、乙腈、二氯甲烷，在硝化反应条件下被硝化，硝化试剂包括硝酸、硝酸/醋酸、硝酸钾/硫酸、亚硝基叔丁酯、硝酸/三氟乙酸酐、NO_2BF_4、硝基吡啶鎓盐等；

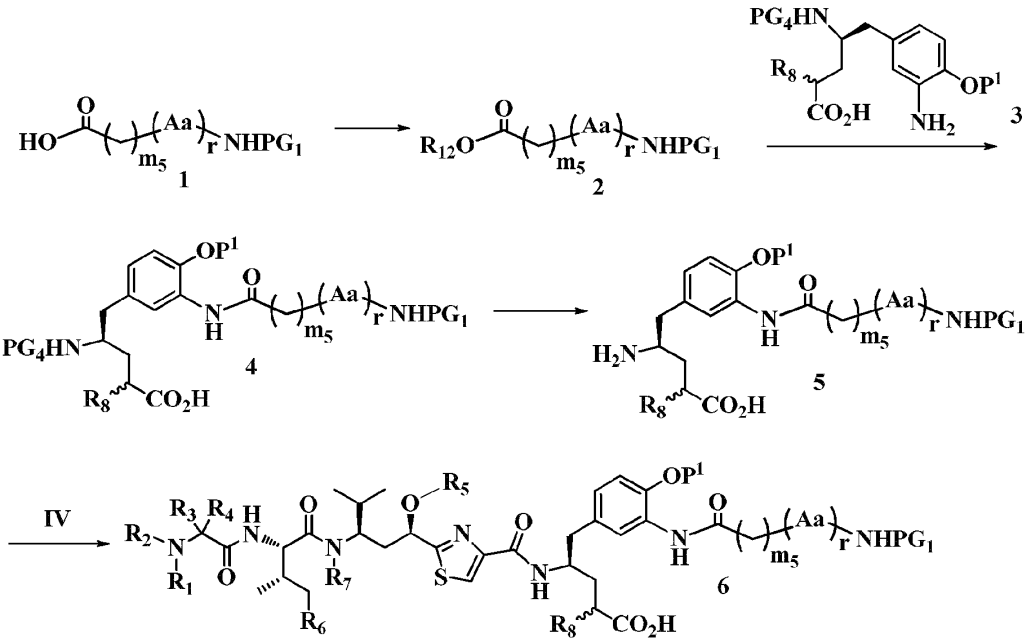
步骤 6. 在以下条件下化合物 7 中的硝基被还原成氨基，这些条件包括 H_2/Pd/C，Fe 或 Zn/HOAc，$SnCl_2$/HCl 等，得到立体构型单一的手性化合物 8。

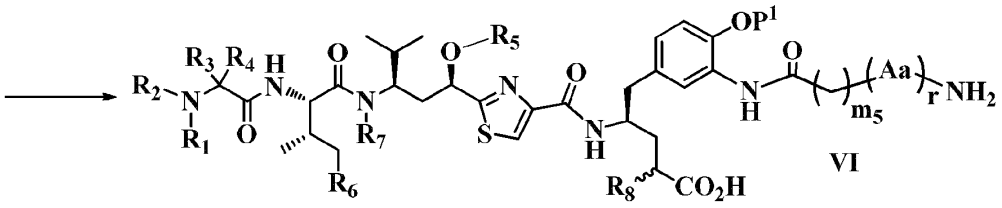
在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式为(II)的合成由结构式(VI)和结构式(VII)缩合反应获得：



其中 X 定义及缩合反应条件如权利要求 9-11 中任一项所述。

具体实施例中，结构式(VI)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

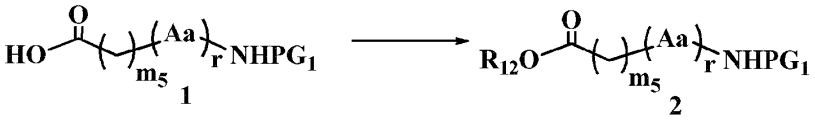




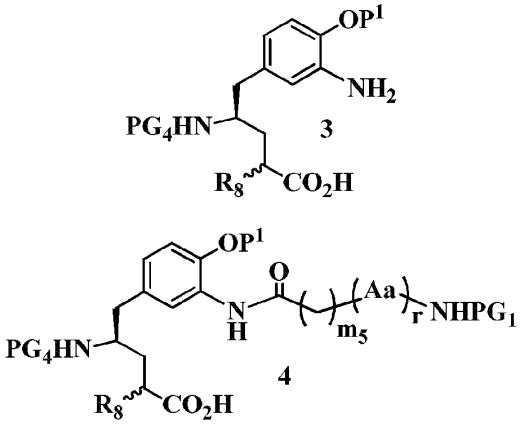
。

理想条件下，结构式(VI)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

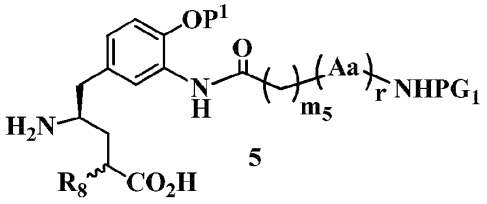
步骤 1. 化合物 1 与适当的含羟基的化合物(如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酸的衍生物化合物 2；



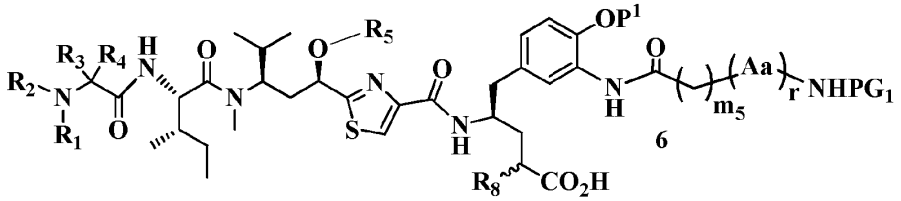
步骤 2. 化合物 2 与化合物 3，在水相，一定的 pH 值条件(如 pH = 5.0-8.0)下，或者有机相，存在有机碱(如 TEA、DBU、DIPEA)或无机碱(如 Na_2CO_3、Cs_2CO_3、K_2CO_3、$NaHCO_3$)时，发生缩合反应，得到化合物 4；反应也任选不使用任何碱，但是需要控制合适的反应温度和反应时间；



步骤 3. 化合物 4 上的氨基保护基团 PG_4 在去保护条件下被选择性地去除(如氨基上的 Cbz 保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除)，氨基上的 Boc 保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 5；

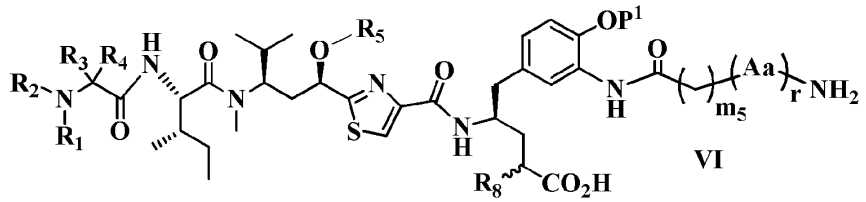


步骤 4. 化合物 5 与结构式(IV)，在水相，一定的 pH 值条件(如 pH = 5.0-8.0)下，或者有机相，存在有机碱(如 TEA、DBU、DIPEA)或无机碱(如 Na_2CO_3、Cs_2CO_3、K_2CO_3、$NaHCO_3$)时，发生缩合反应，得到化合物 6；反应也任选不使用任何碱，但是需要控制合适的反应温度和反应时间；



6

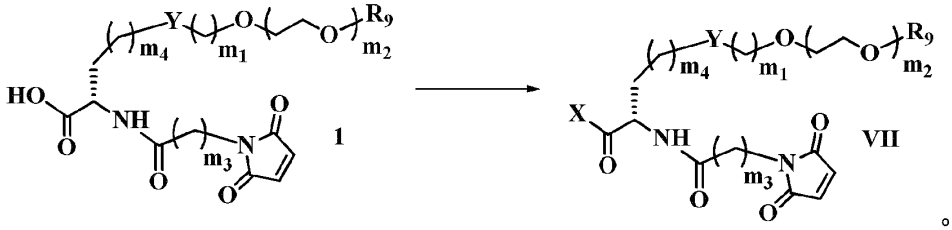
步骤 5. 化合物 6 上的氨基保护基团 PG_1 在去保护条件下被去除(如氨基上的 Cbz 保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除)，氨基上的 Boc 保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 VI；



VI

。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式(VII)的合成包括下列步骤中的一种或多种：



1 VII

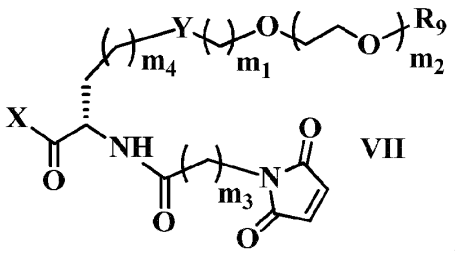
。

理想条件下，结构式(VII)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 羧酸化合物 1 与含羟基的化合物(如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酯；

或者，羧酸化合物 1 与氯甲酸乙酯、氯甲酸异丁酯等，在有机碱(如 N-甲基吗啡啉、三乙胺、二异丙基乙胺等有机碱)存在下反应，得到具有反应活性的混合酸酐；

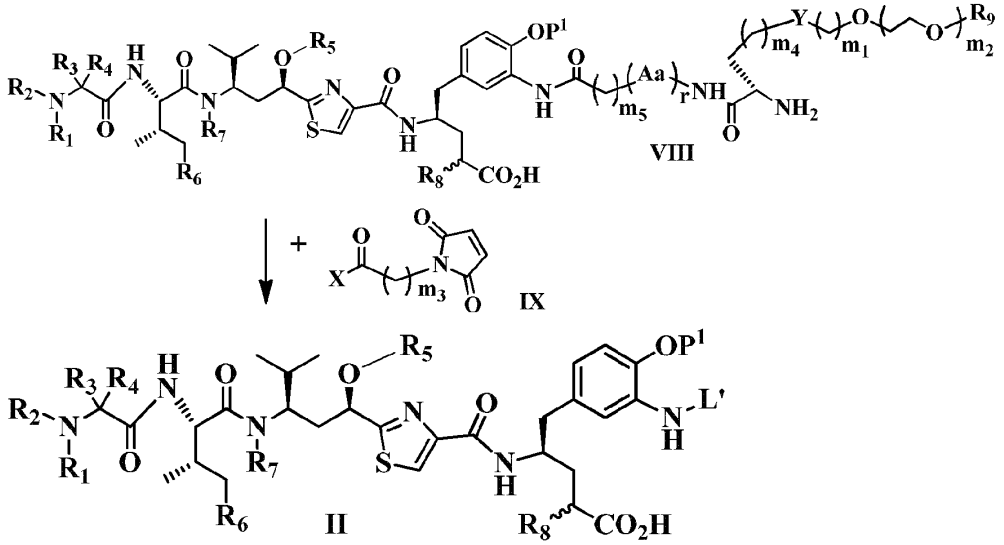
或者，羧酸化合物 1 与草酰氯，在三乙胺等有机碱和催化剂量(如 0.01 当量至 0.5 当量)的 DMF 存在条件下，反应得到酰氯；



VII

。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式为(II)的合成由结构式(VIII)和结构式(IX)缩合反应获得：



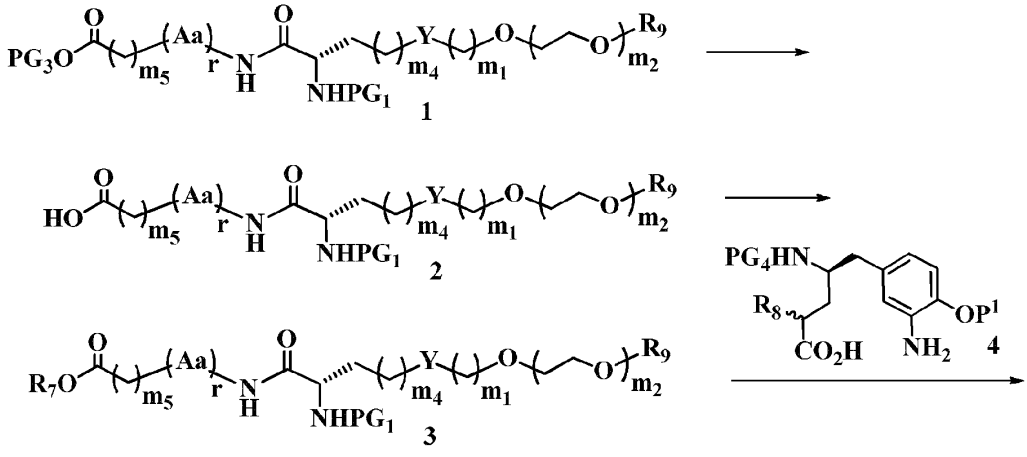
VIII

IX

II

其中 X 定义及缩合反应条件如上面所述。结构式(VIII)中的 NH_2 基团理想地是以三氟乙酸盐、盐酸盐、甲酸盐、醋酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、柠檬酸盐、丁二酸盐、苯甲酸或磺酸盐形式进行缩合反应。

具体实施条件下，结构式(VIII)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

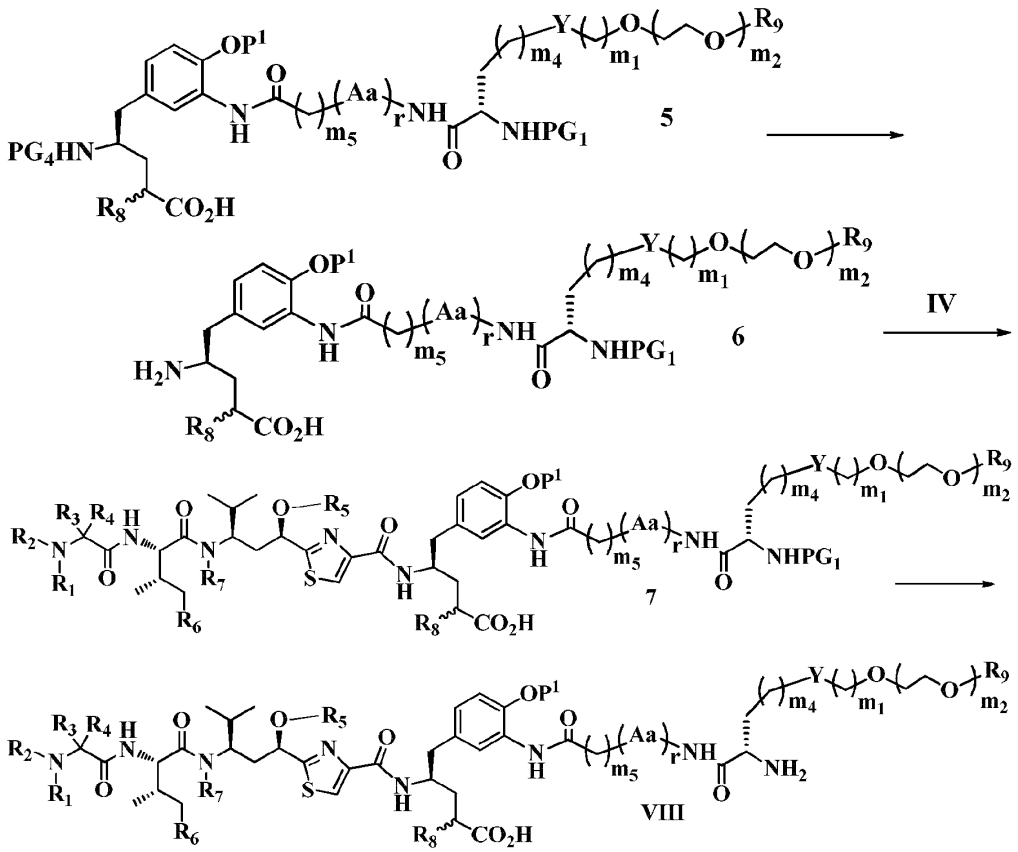


1

2

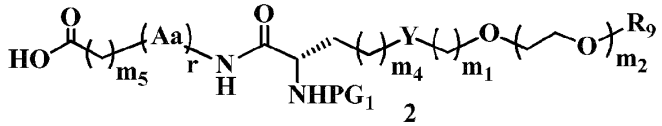
3

4

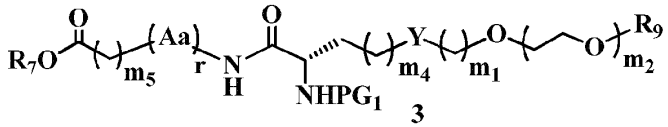


理想实施条件下，结构式(VIII)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 化合物 1 上的羧基保护基 PG_3 在去保护条件下被去除(如羧基上的叔丁基酯保护基可以在甲酸、乙酸、三氟乙酸、盐酸、磷酸等的作用下被切除)，得到化合物 2；

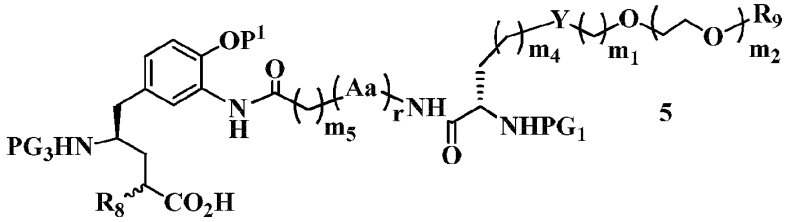


步骤 2. 化合物 2 与含羟基的化合物(如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酯化合物 3；



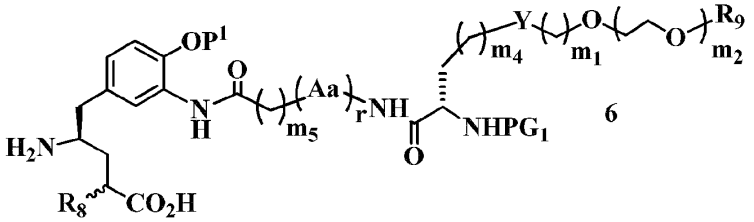
步骤 3. 化合物 3 与化合物 4，在水相，一定的 pH 值条件(如 pH = 5.0-8.0)下，或者有机相，存在有机碱(如 TEA、DBU、DIPEA)或无机碱(如 Na_2CO_3、

Cs_2CO_3、K_2CO_3、$NaHCO_3$)时，发生缩合反应，得到化合物 5；反应也任选不使用任何碱，但是需要控制合适的反应温度和反应时间；



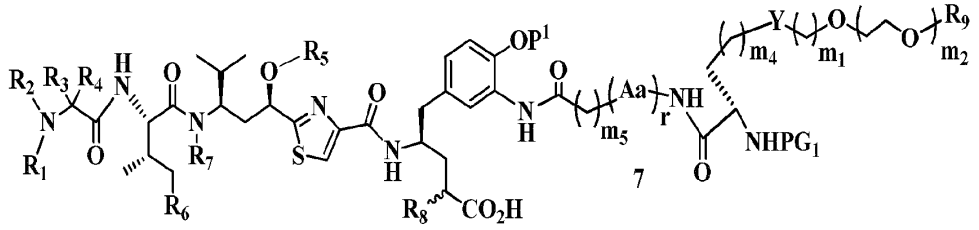
5

步骤 4. 化合物 5 上的氨基保护基团 PG_3 在去保护条件下被去除(如氨基上的 Cbz 保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除)，氨基上的 Boc 保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 6；



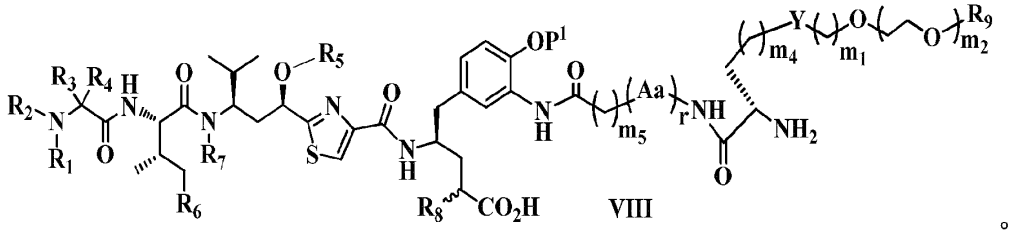
6

步骤 5. 化合物 6 与结构式(IV)，在水相，一定的 pH 值条件(如 pH = 5.0-8.0)下，或者有机相，存在有机碱(如 TEA、DBU、DIPEA)或无机碱(如 Na_2CO_3、Cs_2CO_3、K_2CO_3、$NaHCO_3$)时，发生缩合反应，得到化合物 7；反应也任选不使用任何碱，但是需要控制合适的反应温度和反应时间；



7

步骤 6. 化合物 7 上的氨基保护基团 PG_1 在去保护条件下被去除，如氨基上的 Cbz 保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除，氨基上的 Boc 保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 VIII；



VIII

。

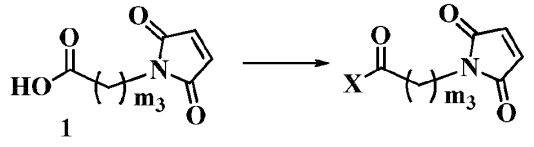
在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构

式(IX)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

羧酸化合物 1 与适当的含羟基的化合物(如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酯 IX；

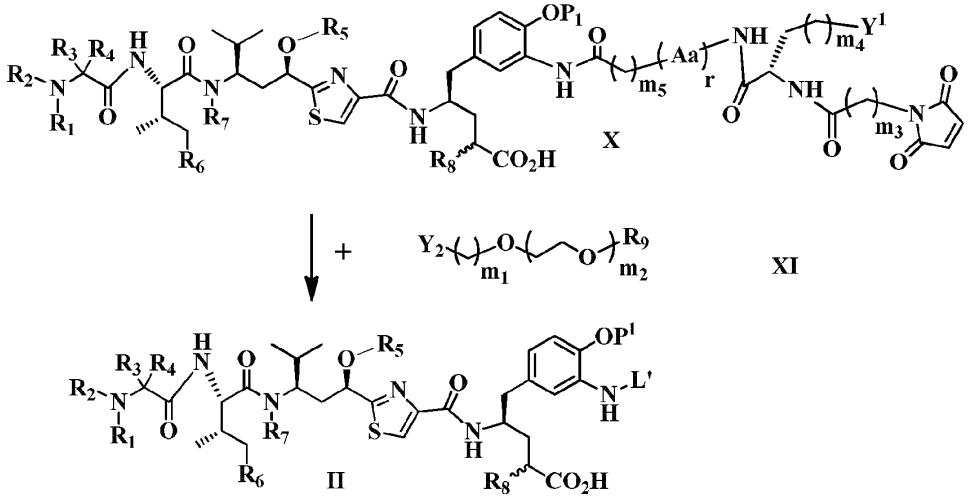
或者，羧酸化合物 1 与氯甲酸乙酯、氯甲酸异丁酯等，在有机碱(如 N-甲基吗啡啉、三乙胺、二异丙基乙胺等有机碱)存在下反应，得到具有反应活性的混合酸酐 IX；

或者，羧酸化合物 1 与草酰氯，在三乙胺等有机碱和催化剂量的 DMF 存在条件下，反应得到酰氯 IX；



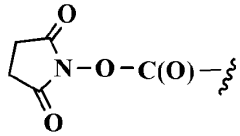
1 IX 。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式为(II)的合成由结构式(X)和结构式(XI)缩合反应获得：

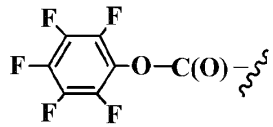


X XI II

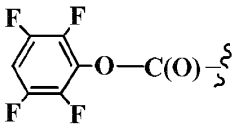
其中 Y^1 和 Y^2 基团缩合构成 Y 基团；Y^1 和 Y^2 分别是 NH_2、$-^+NH_3$、COOH、COX、SO_2Cl、$P(O)Cl_2$、NHCOX、$NHSO_2Cl$、$NHP(O)Cl_2$、NHP(O)(OH)Cl、



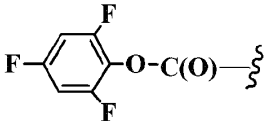
(NHS)、



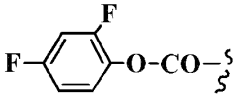
(PFP)、



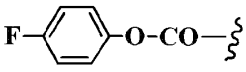
、



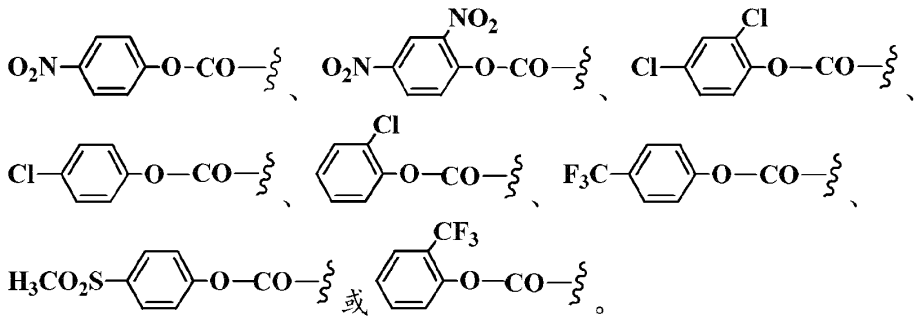
、



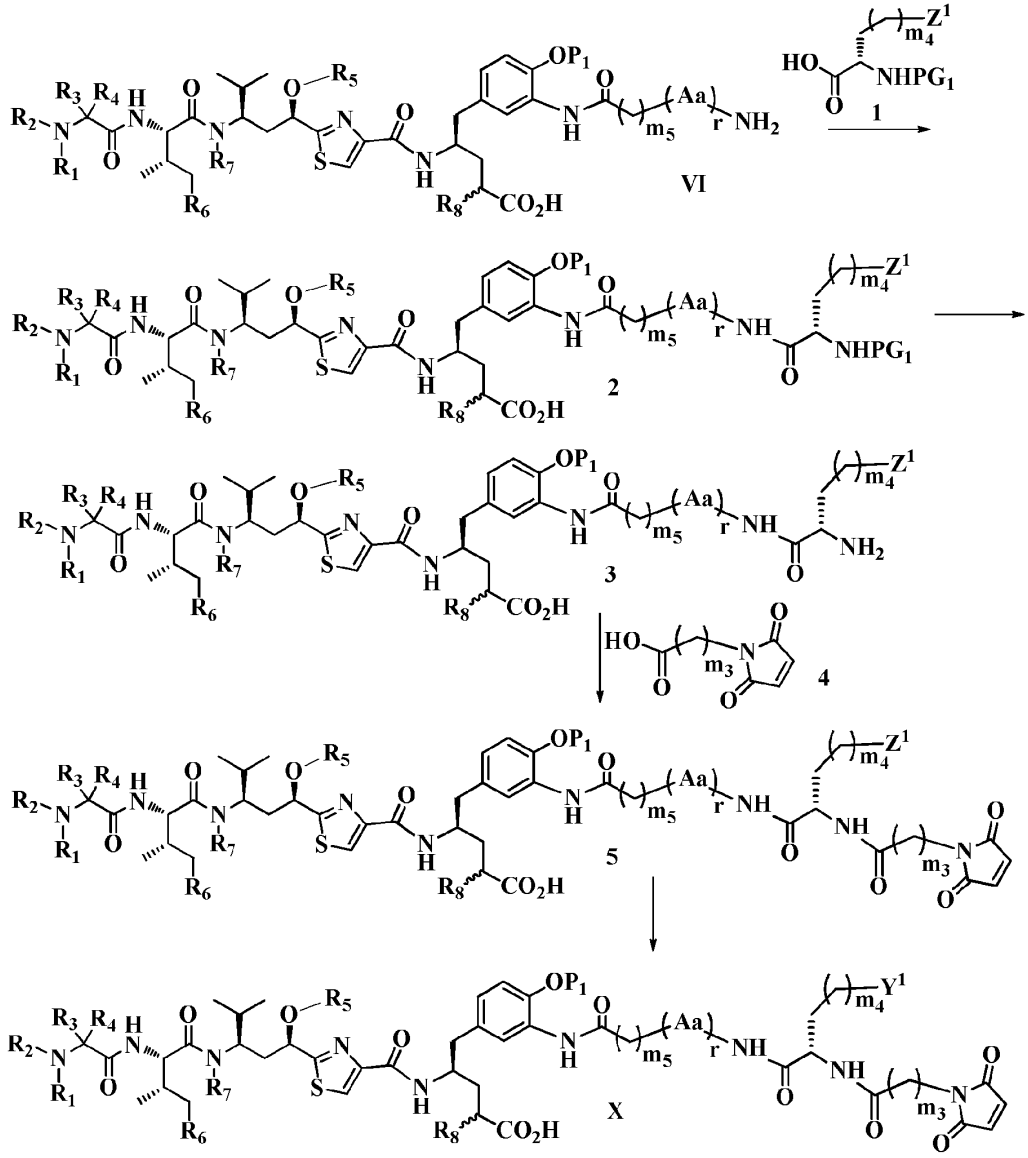
、



、



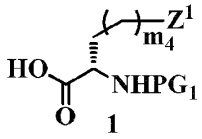
在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，结构式(X)的合成包括下列步骤中的一种或多种：



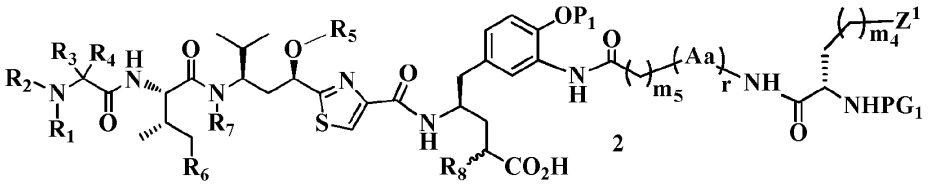
。

理想条件下，结构式(X)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 含羧基的化合物 1 和化合物 VI 在缩合剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)作用下，或者经过缩合反应路线，发生缩合反应，得到化合物 2；其中 Z^1 为 Y^1 的前体，如经过适当基团保护的氨基、羧基、酰胺基、磷酰胺基和磺酰胺基、羧酸酯、磷酸酯、膦酸酯等；

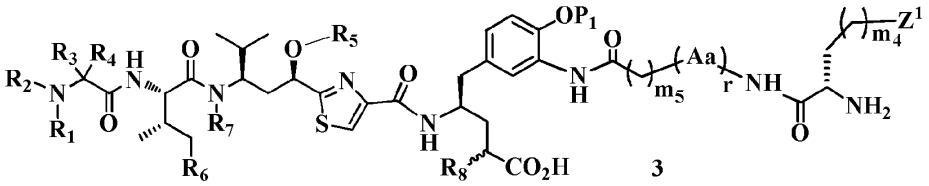


1



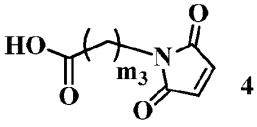
2

步骤 2. 化合物 2 上的氨基保护基团 PG_1 在去保护条件下被去除，如氨基上的 Cbz 保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除，氨基上的 Boc 保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 3；

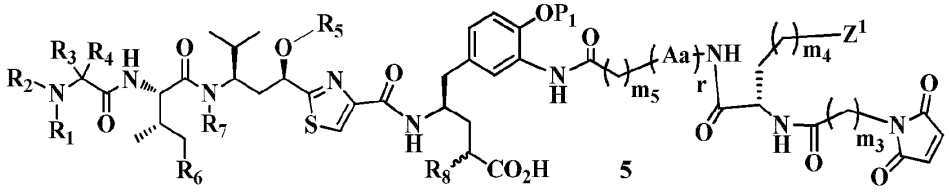


3

步骤 3. 含羧基化合物 4 和含氨基的化合物 3 在缩合剂作用下，或者经过缩合反应路线发生缩合反应，得到化合物 5；

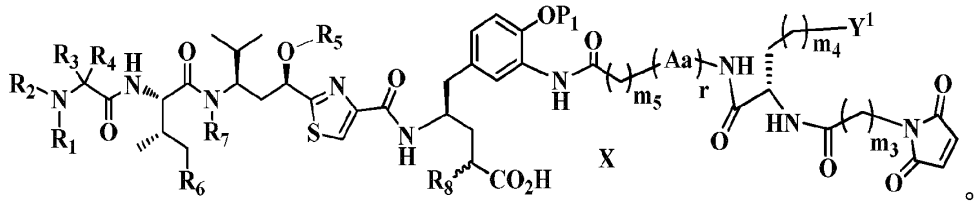


4



5

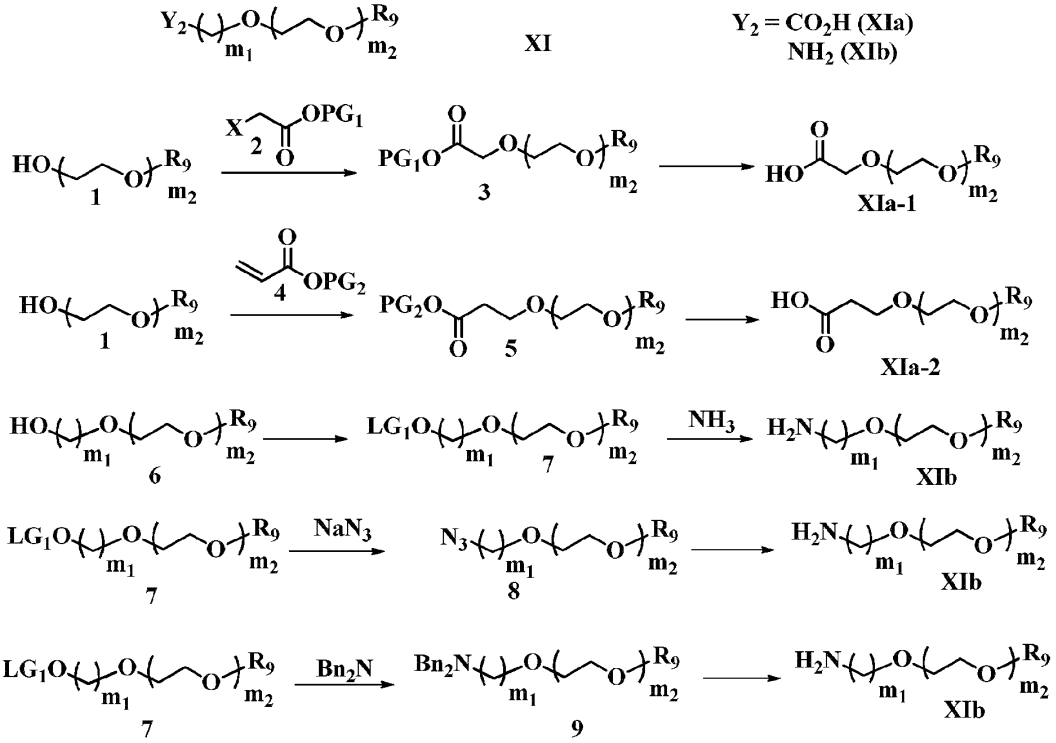
步骤 4. 化合物 5 中的官能团 Z^1 经过适当的化学转换，如羧基和氨基的脱保护等操作，生成官能团 Y^1，得到化合物 X；



X

。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式(XI)的合成包括下列步骤中的一种或多种：



XI

$Y_2 = CO_2H$ (XIa)
NH_2 (XIb)

理想条件下，结构式(XI)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 将化合物 1 溶解在有机溶剂，如四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜中，用碱，如氢化钠、钠、氢氧化钠等拔氢，然后与化合物 2(其中 X 为氯、溴、碘等卤素或者其他离去基团)在一定的温度下搅拌，反应得到化合物 3；

步骤 2. 化合物 3 上的羧基保护基团 PG1 在去保护条件下被去除，如叔丁基酯保护基可以在甲酸、乙酸、三氟乙酸、盐酸、磷酸等的作用下被切除，得到化合物 XIa-1；

步骤 3. 将化合物 1 溶解在有机溶剂，如四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜中，用碱，如氢化钠、钠、氢氧化钠等拔氢，然后

与化合物 4(在一定的温度下搅拌，反应得到化合物 5；

步骤 4. 化合物 5 上的羧基保护基团 PG_1 在去保护条件下被去除，如叔丁基酯保护基可以在甲酸、乙酸、三氟乙酸、盐酸、磷酸等的作用下被切除，得到化合物 XIa-2；

步骤 5. 将化合物 6 溶解在有机溶剂中，如四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜等，加入适当的有机碱，如三乙胺、N,N-二异丙基乙胺、吡啶等，与甲基磺酰氯、4-甲苯磺酰氯等在 0-5°C 反应，得到化合物 7；

步骤 6. 化合物 7 与氨水在水相或有机溶剂中，如甲醇、乙醇、乙腈、四氢呋喃、环氧六环等，发生反应，反应可适当加热，得到化合物 XIb。

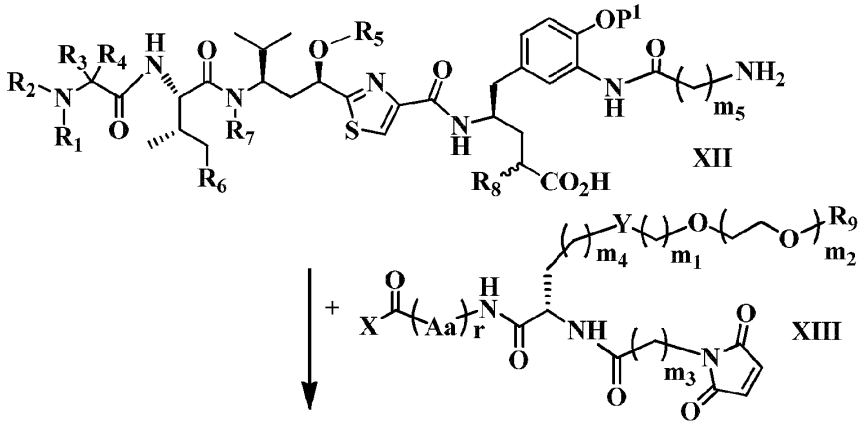
步骤 7. 化合物 7 与叠氮化钠在有机溶剂中，如四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜等，发生反应，得到化合物 8；

步骤 8. 叠氮化合物 8 在钯碳催化剂存在的条件下被氢化还原，或者三苯基膦和水的作用下被还原，得到化合物 XIb；

步骤 9. 化合物 7 与二苄胺在有机溶剂中，如四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜等，优选 N,N-二甲基甲酰胺，在 100°C 发生反应，得到化合物 9；

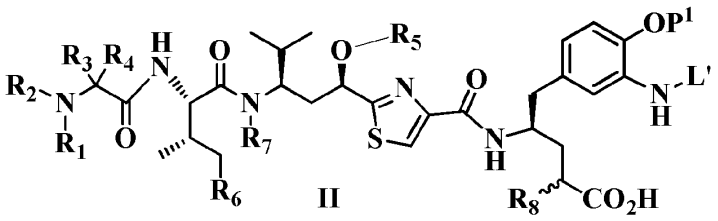
步骤 10. 将化合物 9 溶解在溶剂中，如乙酸乙酯、甲醇、乙醇、乙酸、四氢呋喃等，在一定的氢气压力下，在钯碳催化剂上被还原，反应可适当加热至 45°C，得到化合物 XIb。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式为(II)的合成由结构式(XII)和结构式(XIII)缩合反应获得：



XII

XIII

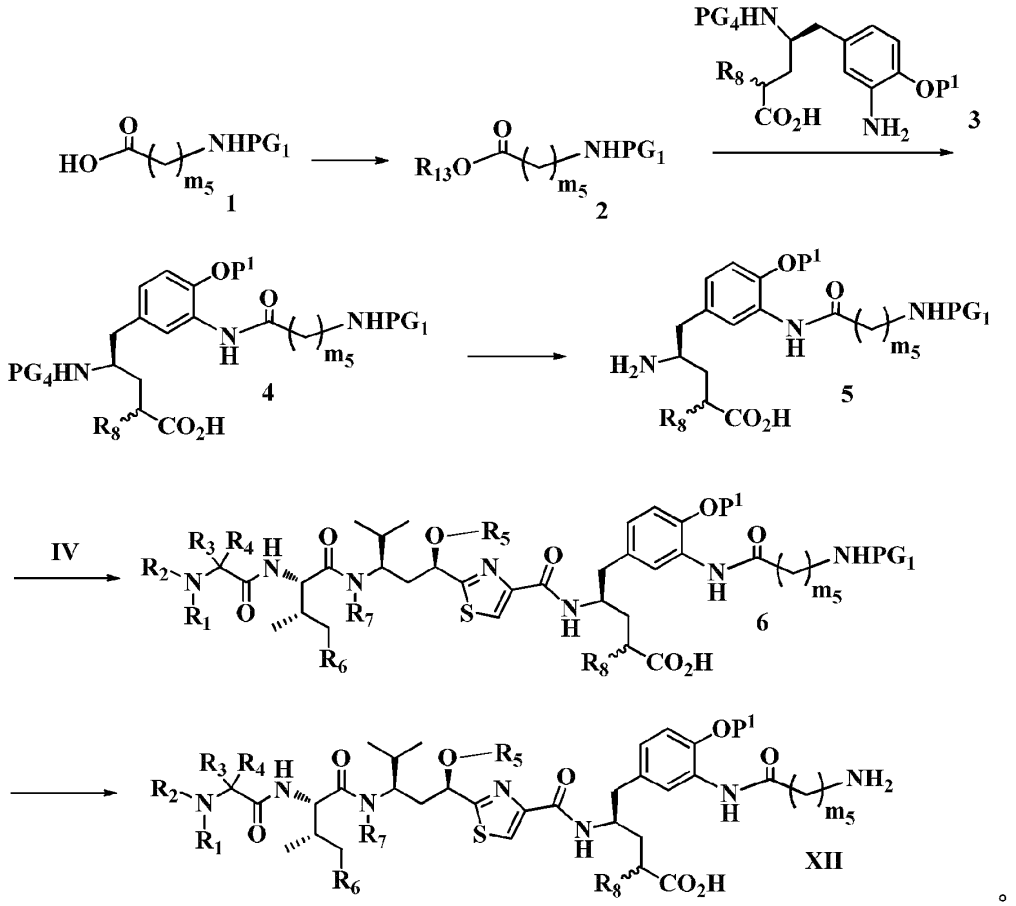


II

其中 X 定义及缩合反应条件如前面所述。

理想条件下，结构式(XII)中的 NH_2 基团是以三氟乙酸盐、盐酸盐、甲酸盐、醋酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、柠檬酸盐、丁二酸盐、苯甲酸或磺酸盐形式进行缩合反应。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式(XII)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

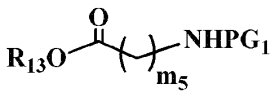


。

理想条件下，结构式(XII)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

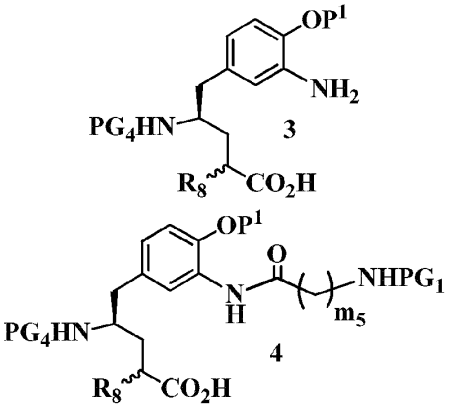
步骤 1. 化合物 1 与适当的含羟基的化合物(如五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酸的衍生

物化合物 2；



2

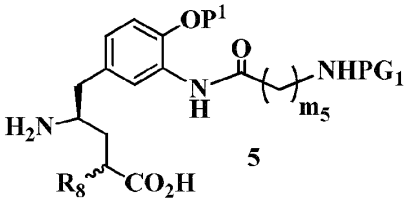
步骤 2. 化合物 2 与化合物 3，在水相，一定的 pH 值条件(如 pH = 5.0-8.0)下，或者有机相，存在有机碱(如 TEA、DBU、DIPEA)或无机碱(如 Na_2CO_3、Cs_2CO_3、K_2CO_3、$NaHCO_3$)时，发生缩合反应，得到化合物 4；反应也任选不使用任何碱，但是需要控制合适的反应温度和反应时间；



3

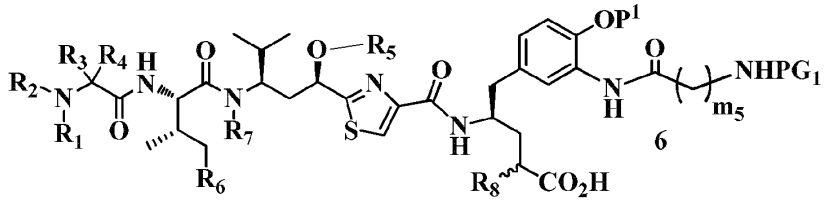
4

步骤 3. 化合物 4 上的氨基保护基团 PG_4 在去保护条件下被选择性地去除(如氨基上的 Cbz 保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除)，氨基上的 Boc 保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 5；



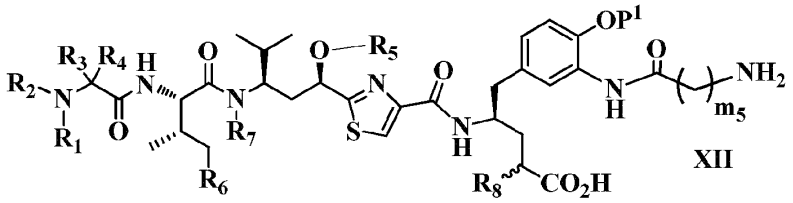
5

步骤 4. 化合物 5 与结构式(IV)(即权利要求 18-21 中任一项所述的结构式(IV))，在水相，一定的 pH 值条件(如 pH = 5.0-8.0)下，或者有机相，存在有机碱(如 TEA、DBU、DIPEA)或无机碱(如 Na_2CO_3、Cs_2CO_3、K_2CO_3、$NaHCO_3$)时，发生缩合反应，得到化合物 6；反应也任选不使用任何碱，但是需要控制合适的反应温度和反应时间；



6

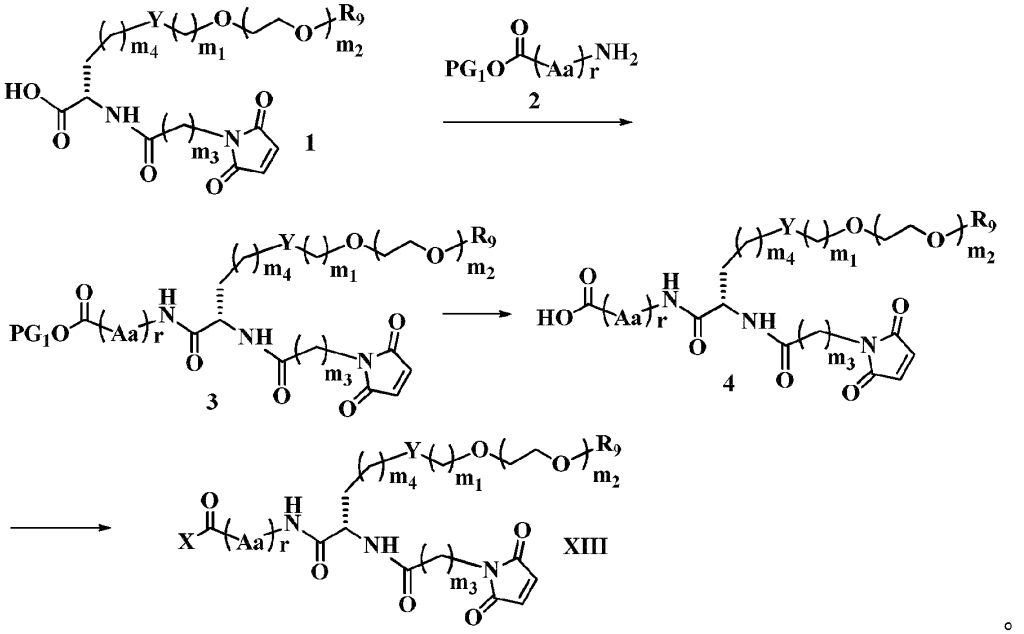
步骤 5. 化合物 6 上的氨基保护基团 PG1 在去保护条件下被去除(如氨基上的Cbz保护基可以在氢气和钯炭催化剂的作用下被切除),氨基上的Boc保护基可以在酸性条件下被切除，得到化合物 XII;



XII

。

在另一具体实施例制备上面所述的偶联物的过程中，其特征在于，结构式(XIII)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

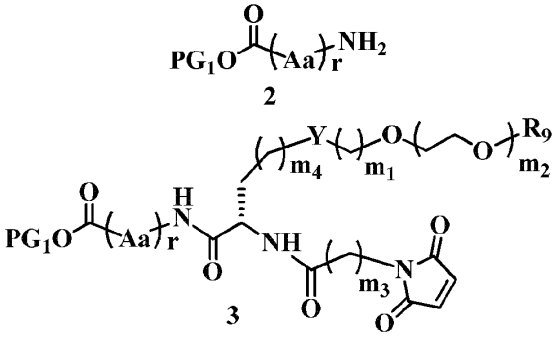


XIII

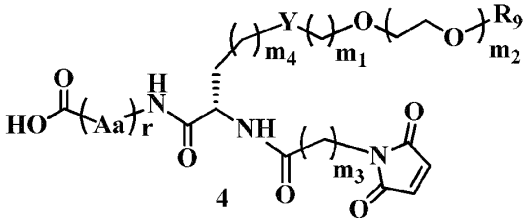
。

优选条件下，结构式(XIII)的合成包括下列步骤中的一种或多种：

步骤 1. 含羧基化合物 1 和含氨基的化合物 2 在缩合剂(如 EDC、HATU、DIC、DCC)作用下，或者经过缩合反应路线发生缩合反应，得到化合物 3;



步骤2. 化合物3上的羧基保护基团PG_1在去保护条件下被去除(如羧基上的叔丁基酯保护基可以在甲酸、乙酸、三氟乙酸、盐酸、磷酸等的作用下被切除)，得到化合物4；

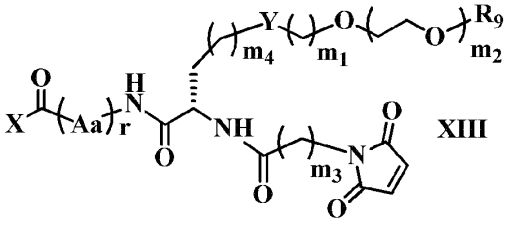


4

步骤3. 羧酸化合物4与含羟基的化合物(如五氟苯酚或N-羟基琥珀酰亚胺)在缩合试剂存在时，发生缩合反应，得到具有反应活性的酯结构式(XIII)；

或者，羧酸化合物4与氯甲酸乙酯、氯甲酸异丁酯等，在有机碱如N-甲基吗啡啉、三乙胺、二异丙基乙胺等有机碱存在下反应，得到具有反应活性的混合酸酐结构式(XIII)；

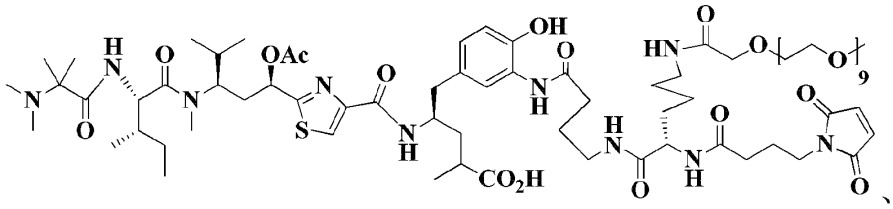
或者，羧酸化合物4与草酰氯，在三乙胺等有机碱和催化剂量的DMF存在条件下，反应得到酰氯结构式(XIII)，



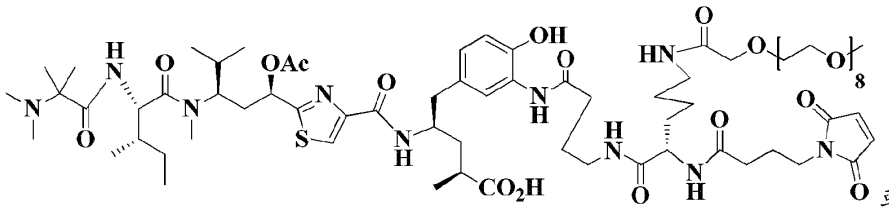
XIII

。

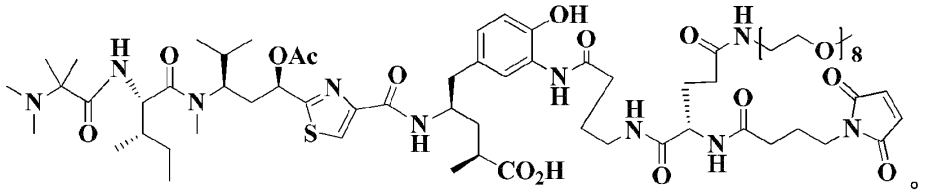
所述式(II)化合物的优选结构如下：



、



或



在另一具体实施例中，一种药物组合物，其包含上述任一项所述的偶联物或以上面所述含有链接体的化合物同细胞结合分子反应构成的偶联物，以及药学上可接受的辅料。上面任一项所述的偶联物在用于制备治疗癌症、感染或自身免疫疾病的药物中用途。

附图说明

图 1. 显示合成 Tubulysin 衍生物片段 13 和 18。

图 2. 显示合成 Tubulysin 衍生物片段 34。

图 3. 显示合成 Tubulysin 衍生物片段 37，38 和 45。

图 4. 显示合成 Tubulysin 衍生物片段 57。

图 5. 显示合成 Tubulysin 衍生物片段 71。

图 6. 显示合成可偶联 Tubulysin 衍生物 72。

图 7. 显示偶连物在荷载 NCI-N87 异种移植肿瘤的 BALB / c 裸鼠上的体内抗肿瘤活性.

图 8. 显示 Tubulysin 衍生物的 Her2 抗体偶联物的毒性研究（与 T-DM1 对照）

相关术语解释：

烷基指含有 1 至 8 个碳原子的线性或者环状直链或者支链脂肪烃。支链指在线性的烷基上有一个或者多个低级烷基，比如甲基，乙基或者丙基相连接。烷基实施例包括甲基，乙基，正丙基，异丙基，正丁基，叔丁基，正戊烷基，3-戊烷基，辛烷基，壬烷基，癸烷基，环戊烷基，环己烷基， 2,2-二甲基丁基，2,3-二甲基丁基，2,2-二甲基戊基，2,3-二甲基戊基，3,3-二甲基戊基，2,3,4-三甲基戊基，3-甲基己基， 2,2-二甲基己基，2,4-二甲基己基， 2,5-二甲基己基， 3,5-二甲基己基， 2,4-二甲基戊基，2-甲基庚基，3-甲基庚基，正庚基，异庚基，正辛烷基和异辛烷基。C_1-C_8 烷基既可以未被取代也可以被以下但不限于以下的一个或者多个基团取代：C_1-C_8 烷基，C_1-C_8 烷氧基，芳基，酰基，酰氧基，酯基，-C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$,

-NHC(O)R', -$S(O)_2$R', -S(O)R', -OH, 卤素（-F, -Cl, -Br, -I），$-N^3$, $-NH^2$, -NHR',-$N(R')_2$ 及-CN；其中 R'指 C_1-C_8烷基或者芳基。

C_3-C_8碳环指含 3,4,5,6,7,或 8 个碳原子的饱和或不饱和的非芳烃环状化合物。典型的 C_3-C_8碳环包括但不限于环丙基，环丁基，环戊基，环戊二烯基，环己基，环己烯基， 1,3-环己二烯基，1,4-环己二烯基，环庚基，1,3-环庚二烯基， 1,3,5-环庚三烯基，环辛基及环辛二烯基。C_3-C_8碳环既可以未被取代,也可以被以下但不限于以下的一个或者多个基团取代：C_1-C_8烷基，C_1-C_8烷氧基，芳基，酰基，酰氧基，酯基，-C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)$N(R')_2$, -NHC(O)R', -$S(O)_2$R', -S(O)R', -OH, 卤素(-F, -Cl, -Br, -I)，$-N_3$, $-NH_2$, -NHR',-$N(R')_2$ 及-CN；其中 R'是 C_1-C_8烷基或者芳基。

C_3-C_8碳环基指上述 C_3-C_8碳环上的一个氢原子被化学键所取代而产生的基团。

烯烃基指含有一个碳碳双键的直链或者支链脂肪烃，碳链上有 2 至 8 个碳原子。烯烃基的实施例包括乙烯基，丙烯基，正丁烯基，异丁烯基，3-甲基-2-丁烯基，正戊烯基，己烯基，庚烯基和辛烯基。

炔烃基指含有一个碳碳三键的直链或者支链脂肪烃，碳链上有 2 至 8 个碳原子。炔烃基的实施例包括乙炔基，丙炔基，正丁炔基，2-丁炔基， 3-甲基丁炔基，正戊炔基，己炔基，庚炔基和辛炔基。

杂烷基指含 2 至 8 个碳原子而且有 1 至 4 个碳原子被 O，S 或者 N 所取代的烷基。

芳基或者芳香基指含有一个或者多个环的由 3 至 14 个碳原子（多数的情形是 6 至 10 个碳原子）组成的芳香烃或者杂芳香烃基团。杂芳香烃基团指有一个或多个碳原子（多数的情形是 1，2，3 或 4 个碳原子）被 O, N, Si, Se, P 或者 S （最好是 O, S, N）所取代所产生的芳香烃基团。 芳基或者芳香基也指一个或多个氢原子被取代的芳香烃基团，这些取代基团有：R^{13}, F, Cl, Br, I, OR^{13}, SR^{13}, $NR^{13}R^{14}$, N=NR^{13}, N=R^{13}, $NR^{13}R^{14}$, NO_2, $SOR^{13}R^{14}$, SO_2R^{13}, SO_3R^{13}, OSO_3R^{13}, $PR^{13}R^{14}$, $POR^{13}R^{14}$, $PO_2R^{13}R^{14}$, $OPO_3R^{13}R^{14}$或者 $PO_3R^{13}R^{14}$。其中 R^{13}和 R^{14}分别为 H，烷基，烯烃基， 炔烃基，杂烷基，芳基，芳烷基，羰基或者可以药用的盐。

卤素原子指氟，氯，溴，碘原子，最好是氟和氯。

杂环指含 2 至 8 个碳原子的芳香，非芳香性环或杂环的环上有 1 至 4 个碳原子被杂元素所取代。这些杂元素为 O, N, S, Se 和 P，最好为 O, N 和 S。可用的杂环亦可参见《The Handbook of Chemistry and Physics》，第 78 版, CRC Press, 1997-1998, 第 225 至 226 页。适合的非杂芳基包括但不限于环氧基，环氮乙烷基，环硫乙烷基，吡咯烷基，吡唑烷基，咪唑烷基，环氧乙烷基，四氢呋喃基，二氧戊环基，四氢吡喃基，二氧杂环己烷基，哌啶基，哌嗪基，吗啉基，吡喃基，咪唑啉基，吡咯啉基，吡唑啉基，噻唑烷基，四氢硫吡喃基，二噻烷基，硫吗啉基，二氢吡喃基，四氢吡喃基，四氢吡啶基，二氢吡啶基，四氢嘧啶基，二氢硫吡喃基，氮杂环庚烷基以及它们与苯基生成的稠环。

杂芳基指含 3 至 14 个（最好为 5 至 10 个）原子的芳香性杂单环，二环或多环结构。例如吡咯基，吡啶基，吡唑基，噻吩基，嘧啶基，吡嗪基，四氮唑基，吲哚基，喹啉基，嘌呤基，咪唑基，噻吩基，噻唑基，苯并噻唑基，呋喃基，苯并呋喃基，1,2,4-噻二唑基，异噻唑基，三氮唑基，四氮唑基，异喹啉基，苯并噻吩基，异苯并呋喃基，吡唑基，咔唑基，苯并咪唑基，异恶唑基，N-氧吡啶基以及他们与苯基生成的稠环。

烷基，环烷基，烯烃基，炔烃基，芳基，杂芳基和杂环基等术语也指由相应的烃失去两个氢原子生成的亚烷基，环亚烷基，亚烯基，亚炔基，亚芳基，杂亚芳基和杂亚环等。

“芳烷基”指的是一个非环状的烷基自由基的一个氢原子连接的碳原子，通常是一个终端或 sp3 杂化的碳原子由一个芳基取代。典型的芳基烷基包括苄基，2-苯乙烷基，2-苯乙烯基，萘甲基，2-萘乙烷基，2-萘乙烯基，萘苄基，2-萘苯乙烷基等。

“杂芳烷基”指非环型烷基自由基的一个氢原子链接到一个碳原子上，通常是一个终端或 sp3 杂化的碳原子由一个杂芳基取代。杂芳烷基代表如 2-苯并咪唑甲基，2-呋喃乙基。

“羟基保护集团”是指，甲基氧甲基醚（MOM），2-甲基氧乙基氧甲基醚（2-MOEOM），四氢吡喃醚，苄醚，对甲基氧苄醚，三甲基*矽*醚，三乙基*矽*醚，三异丙基*矽*醚，叔丁基二甲基硅醚，三苯基甲基硅醚，乙酸乙酯，含取代基的乙酸乙酯，苯甲酸酯，甲酸苄酯，氯代乙酸酯，甲氧基乙酸酯，

苯氧基乙酸酯，特戊酸酯(*pivaloate*)，金刚烷酸酯，三甲基苯甲酸酯(mesitoate)，甲基磺酸酯和甲苯磺酸盐。

氨基酸可以是天然的和/或非自然的氨基酸,通常是L型或D型，优选是α氨基酸。天然氨基酸是由基因编码的编排，它们是丙氨酸、精氨酸、天门冬酰胺、天门冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸和缬氨酸。非天然氨基酸是蛋白氨基酸衍生的形式。例如羟脯氨酸、羊毛硫氨酸;、2-氨基异丁酸，脱氢丙氨酸、γ-氨基丁酸（神经传递分子）、鸟氨酸、瓜氨酸、β-丙氨酸（3-胺基丙酸）、γ-羧基谷氨酸盐，硒代半胱氨酸（目前在许多非真核生物以及大多数真核生物中，而不是直接由DNA编码构成）、吡咯赖氨酸（仅在一些古细菌和细菌中发现的），N-甲酰甲硫氨酸（它是细菌，线粒体和叶绿体蛋白最初的氨基酸），5-羟基色氨酸，L-二羟基苯丙氨酸、三碘甲腺原氨酸、L-3,4-二羟基苯丙氨酸（DOPA），和O-磷酸丝氨酸。氨基酸的术语还包括氨基酸类似物和近似物。类似物具有相同的$H_2N(R)CHCO_2H$天然氨基酸的结构，但R基团在天然氨基酸未发现。例如类似物包括类丝氨酸、己氨酸、蛋氨酸亚砜，和蛋氨酸甲基锍盐。优选地，类氨基酸具有与α氨基酸的常规化学结构不同的结构，但其功能类似。术语“非天然氨基酸”以“D”的立体形态、天然氨基酸的以“L” 立体形态。在本专利申请中使用1～12个氨基酸时，氨基酸序列最好能被蛋白酶的识别和裂解。许多识别和切割氨基酸序列已被熟知（如 Matayoshi et al. Science 247: 954 (1990); Dunn et al. Meth. Enzymol. 241: 254 (1994); Seidah et al. Meth. Enzymol. 244: 175 (1994); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615 (1994); Weber et al. Meth. Enzymol. 244: 595 (1994); Smith et al. Meth. Enzymol. 244: 412 (1994); and Bouvier et al. Meth. Enzymol. 248: 614 (1995)，其中文献中还含带引述文献），特别是，氨基酸序列选择为 Val-Cit, Ala-Val, Ala-Lys, Gly-Lys, Ala-Ala, Val-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Asp-Lys, Glu-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser, 和 Glu 的分子。

“肽”是由两个或多个氨基酸通过一个氨基酸的氨基与另一个氨基酸的羧基以肽键（即酰胺键）结合而成。两个氨基酸以肽键相连的化合物称为二肽；三个氨基酸以肽键相连的化合物称为三肽，以此类推，三十个氨基

酸以肽键相连的化合物称为三十肽。完全以天然α氨基酸构成的肽为天然肽（天然蛋白）。含有一个或多个非天然氨基酸或氨基酸类似物的肽为非天然肽（类肽化合物）。两个或以上氨基酸的肽为一个肽单元。

“糖苷”是通过其糖基键将糖基团通过其端基异构体碳键连接到另一基团的分子。糖苷可以通过O-（O-糖苷），N-（糖胺），S-（硫代糖苷）或C-（C-糖苷）糖苷键连接。其核心是经验公式为$C_m(H_2O)_n$（其中m可以不同于n，m和n是<36），本文中的糖苷包括葡萄糖（葡萄糖），果糖（levulose）阿洛糖，阿卓糖，甘露糖，古洛糖，艾杜糖，半乳糖，托洛糖，半乳糖胺，葡糖胺，唾液酸，N-乙酰葡糖胺，磺基喹诺酮（6-脱氧-6-磺基-D-吡喃葡萄糖），核糖，阿拉伯糖，木糖，溶血糖，山梨醇，甘露醇，蔗糖，乳糖，麦芽糖，海藻糖，麦芽糖糊精，棉子糖，葡萄糖醛酸（葡糖苷酸）和水苏糖。糖苷可以是D型式或L型式，5个原子环状呋喃糖形式，6个原子环状吡喃糖形式，或非环形式，α-异构体（Haworth投影的碳原子下方的端基异碳的-OH）或β-异构体（在Haworth投影平面上方的端基异构碳的-OH）。其在本文中常用糖苷是单糖，二糖，多元醇或寡糖（含有3-6个糖单元）。

“抗体”，这里所用的是用在最广泛的意义上，具体涵盖完整的单克隆抗体，多克隆抗体，特异性抗体，多特异性抗体（例如，双特异性抗体和抗体片段），具有理想的生物活性，抗体片段的药物结合位点的必要数量的链接。一种抗体的原生形态是一个四聚体，由两个相同的免疫球蛋白链对，每对有一个轻链和重链。在每一对中，轻链和重链可变区（VL和VH）共同负责与抗原结合。轻链和重链可变区由一个框架区三高变区中断，也被称为“互补决定区”或“服务”。不断的区域可能是公认的，与免疫系统的相互作用。一种抗体可以是任何类型（如IgG、IgE、IgM、IgD、和IgA）、大类（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2）或子类。抗体可以从任何合适的物种中获得。在某些方面，抗体是人或鼠的起源。抗体可以是人的，人源化的或嵌合的。

术语“特异结合”和“特异结合”意味着抗体或抗体衍生物会以高度选择性的方式与其相应的靶抗原结合，而不是与许多其他抗原结合。通常情况下，抗体或抗体具有至少约$1x10^{-7}$M的亲和性衍生物结合。最好是$1x10^{-8}$M

到 10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M 或 10^{-12}M 结合。预定抗原的亲和力至少是两倍大于结合的非特异性抗原的亲和性（如牛血清白蛋白，酪蛋白）。

“药用”或“可以药用”指相应的化合物或化合物组成在动物或人体上不产生有害的，过敏性的或其他不良反应。

药学上可接受的辅料包括所有载体，稀释剂，助剂或者成形剂，比如防腐剂，抗氧化剂，填料，崩解剂，润湿剂，乳化剂，悬浮剂，溶剂，分散介质，涂层，抗菌剂，抗真菌剂，等渗和吸收延缓剂等等。在医药领域，在具有活性的药物成分中加入这些辅料是十分常见的做法。可以说，除非辅料与药物活性组分并不相容，在药物成分中加入辅料并不是没有道理。为取得好的结果，具有活性的辅助组分也可以被加入药物成分中。

在本发明中，可以药用的盐指本发明化合物的盐类衍生物。经过适当的修饰，本发明化合物可以形成相应的酸盐或碱盐。可以药用的盐包括常见的没有毒性的盐或季铵盐，这些盐可以用本发明化合物和相应的没有毒性的无机酸或有机酸制成。例如，用无机酸包括盐酸，氢溴酸，硫酸，氨基磺酸，磷酸以及硝酸等和有机酸包括乙酸，丙酸，丁二酸，酒石酸，柠檬酸，甲磺酸，苯磺酸，葡萄糖醛酸，谷氨酸，苯甲酸，水杨酸，甲苯磺酸，草酸，富马酸以及乳酸等都可以做成药用盐。其它的盐包括氨基丁三醇，氨基三乙醇,甲葡胺，吡咯乙醇等铵盐以及钠，钾，钙，锌，镁等金属盐。

本发明可以药用的盐可以用常规的化学方法制成。一般地说，这些盐可以通过在本发明化合物的游离酸或碱的水溶液或有机溶液或两者的混合溶液中加入其它适当的等当量的碱或酸而形成。非水相的反应介质一般为乙醚，乙酸乙酯，乙醇，异丙醇或者乙腈。可以适用盐的列表可参见《Remington’s Pharmaceutical Sciences》，第 17 版. Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, 第 1418 页.

术语“药学上可接受的盐”是指配体药物偶联物或接头药物缀合物的药学上可接受的有机或无机盐。缀合物可以含有至少一个氨基，因此可以与氨基形成酸加成盐。硝酸盐，硫酸氢盐，磷酸盐，酸式磷酸盐，异烟酸盐，乳酸盐，水杨酸盐，酸式柠檬酸盐，酒石酸盐，油酸盐，鞣酸盐，泛酸盐，酒石酸盐，抗坏血酸盐，琥珀酸盐，马来酸盐，龙胆酸盐，富马酸盐，葡萄糖酸盐，葡糖醛酸盐，糖酸盐，甲酸盐，苯甲酸盐，谷氨酸盐，甲磺酸

盐，乙磺酸盐，苯磺酸盐，对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐（即 1,1'-亚甲基双-（2-羟基萘甲酸盐））。药学上可接受的盐可以包括另外的分子，例如乙酸根离子，琥珀酸根离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外，药学上可接受的盐在其结构中可以具有多于一个的带电原子。多个带电原子是药学上可接受的盐的一部分的实施例可以具有多个抗衡离子。因此，药学上可接受的盐可以具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

短语“药学上可接受的溶剂合物”或“溶剂合物”是指一种或多种溶剂分子和配体药物偶联物或接头药物缀合物的缔合。形成药学上可接受的溶剂合物的溶剂的实施例包括但不限于水，异丙醇，乙醇，丁醇，叔丁醇，丙酮、甘油，DMSO，乙酸乙酯，甲酸，乙酸，三乙醇胺和乙醇胺。

水合物（Hydrate）指的是含有水的化合物。其中水可以以配位键与其他部分相连，如金属离子水合配体形成络合物，也可以是以共价键相结合，如水合三氯乙醛。也可以指是某些化合物与水分在一定温度、压力条件下形成的晶体或液体分子。水合物中的水是以确定的量存在的，例如无水硫酸钠 Na_2SO_4 的水合物的组成为 $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$。水合物中的水有几种不同的结合方式：一种是作为配体，配位在金属离子上，称为配位结晶水；另一种则结合在阴离子上，称为阴离子结晶水。水也可以不直接与阳离子或阴离子结合而依一定比例存在于晶体内，在晶格中占据一定的部位。这种结合形式的水称为晶格水，一般含有 12 个水分子。有些晶形化合物也含水，但无一定比例。水合物的盐是指在此水合物基础上形成的药学上可接受的盐。

旋光异构体又称对映异构体，对掌异构物、光学异构物、镜像异构物、对映异构体或手性异构体，不能与彼此立体异构体镜像完全重叠的分子。含有一个物质含一个手性碳原子时，有两个旋光异构体，它们具有互为实物和镜像的关系，故也称对映体。对映异构体具有相等的旋光能力，但旋转方向相反，其物理和化学性质极可能相似。含有两个相同属性碳原子的分子，有 3 个旋光异构体。分子中当含有几个不同的手性原子时，其旋光异构体的数目为 2^n，n 为不同手性原子的个数。等量互为旋光异构体的两种物质均匀混合，旋光性互相抵消，就组成了外消旋体。

“患者”或“受试者”的实施例包括但不限于人，大鼠，小鼠，豚鼠，猴，猪，山羊，牛，马，狗，猫，鸟和家禽。在示例性实施例中，患者或受试者是人。

“给药”是指将药物或其他药剂转移，输送，引入或运送给受试者的任何方式，包括口服，局部接触，静脉内，腹膜内，肌肉内，病灶内，鼻内，皮下或 鞘内给药本发明也考虑了使用装置或器械来施用药剂，这种装置可以利用主动或被动的运输，并且可以是缓释或快速释放递送装置。

本文可以使用以下缩写，并具有指定的定义：Boc，叔丁氧基羰基；BroP，溴代三吡咯烷鏻六氟磷酸盐；CDI，1,1'-羰基二咪唑；DCC，二环己基碳二亚胺；DCE，二氯乙烷；DCM，二氯甲烷；DIAD，偶氮二羧酸二异丙酯；DIBAL-H，二异丁基氢化铝；DIPEA，二异丙基乙胺；DEPC，二氰基磷酸二乙酯；DMA，N，N-二甲基乙酰胺；DMAP，4-（N，N-二甲基氨基）吡啶；DMF，N，N-二甲基甲酰胺；DMSO，二甲亚砜； DTT，二硫苏糖醇；EDC，1-（3-二甲基氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺盐酸盐；ESI-MS，电喷雾质谱；HATU，O-（7-氮杂苯并三唑-1-基）-N，N，N'，N'-四甲基脲六氟磷酸盐；HOBt，1-羟基苯并三唑；HPLC，高压液相色谱；NHS，N-羟基琥珀酰亚胺；MMP，4-甲基吗啉；PAB，对氨基苄基；PBS，磷酸盐缓冲盐水（pH 7.0～7.5）；PEG，聚乙二醇；SEC，大小排阻色谱法；TCEP，三（2-羧乙基）膦；TFA，三氟乙酸；THF，四氢呋喃；Val，缬氨酸。

具体实施方式

下面将参照附图更详细地描述本发明的具体实施例。虽然附图和后面实施例中显示了本发明的具体实施例子，然而应当理解，可以以各种形式实现本发明而不应被这里阐述的实施例所限制。相反，提供这些实施例是为了能够更透彻地理解本发明，并且能够将本发明的范围完整的传达给本领域的技术人员。

本公开主题可以以许多不同的形式来体现，并且不应该被解释为限于本文阐述的实施方案。实际上，对于本公开主题所属领域的技术人员来说，将会想到具有本文所包括的描述中给出的教导的益处的本公开主题的许多修改和其他实施方案。因此，应该理解的是，本公开主题不限于所公开的具体实施方案，并且修改和其他实施方案意在被包括在所公开的主题的范围内。

尽管本文使用了特定的术语，但它们仅用于一般性和描述性的意义，而不是为了限制的目的。除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开描述的主题所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

使用标准命名法来描述化合物。除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。

术语“一”不表示数量的限制，而是表示存在至少一个所引用的项目。数值范围的叙述仅仅意在作为单独提及落入该范围内的每个单独值的速记方法，除非本文另有指出，并且每个单独值被合并到说明书中，就好像其在本文中单独列举一样。所有范围的终点都包括在范围内并且可以独立组合。本文描述的所有方法可以以合适的顺序执行，除非本文另有指示或者与上下文明显矛盾。除非另有声明，否则实例或示例性语言(如“例如”)的使用仅意在更好地说明本发明，并且不构成对本发明范围的限制。

本发明包括具有至少一个期望的原子同位素取代，其量高于同位素的天然丰度(即富集)的式(I)化合物以及化合物的用途。同位素是具有相同原子序数但不同质量数，即相同数量的质子但不同数量的中子的原子。同位素取代，例如氘取代，可以是部分的或完全的。部分氘取代是指至少一个氢被氘取代。在某些实施方案中，同位素在感兴趣的任何位置富集 90%、95%或 99%或更多。在一个实施方案中，氘在所需位置富集 90%、95%或 99%。

需要说明的是，在说明书及权利要求当中使用了某些词汇来指称特定组件。本领域技术人员应可以理解，技术人员可能会用不同名词来称呼同一个组件。本说明书及权利要求并不以名词的差异来作为区分组件的方式，而是以组件在功能上的差异来作为区分的准则。如在通篇说明书及权利要求当中所提及的“包含”或“包括”为一开放式用语，故应解释成“包含但不限定于”。说明书后续描述为实施本发明的较佳实施方式，然所述描述乃以说明书的一般原则为目的，并非用以限定本发明的范围。本发明的保护范围当视所附权利要求所界定者为准。

术语“C_1-C_6”表示含 1~6 个碳的基团。

术语“含有亲水支链的连接体”表示主要构架是 C_2-C_{100} 的肽单元(1~12 个天然或非天然氨基酸)、脲键基团、二硫化物基团、酯基团、肟基团、酰

胺基团或硫醚键基团构成。

术语“药学上可接受的盐”意味着适用于药物制剂的化合物的盐。在化合物具有一个或多个碱性基团的情况下，盐可以是酸加成盐，例如硫酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、乙酸盐，扑酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、盐酸盐、乳酸盐、甲基硫酸盐、富马酸盐、苯甲酸盐、琥珀酸盐、甲磺酸盐、乳糖酸盐、辛二酸盐、甲苯磺酸盐等等。在化合物具有一个或多个酸性基团的情况下，盐可以是下列盐，诸如钙盐、钾盐、镁盐、葡甲胺盐、铵盐、锌盐、哌嗪盐、氨基丁三醇盐、锂盐、胆碱盐、二乙胺盐、4-苯基环己胺盐、苄星(benzathine)盐、钠盐、四甲基铵盐等等。多晶型结晶形式和溶剂化物也包含在本发明的范围内。

本发明药学上可接受的盐可以用常规的化学方法制成。一般地说，这些盐可以通过在本发明化合物的游离酸或碱的水溶液或有机溶液或两者的混合溶液中加入其它适当的等当量的碱或酸而形成。非水相的反应介质一般为乙醚，乙酸乙酯，乙醇，异丙醇或者乙腈。可以适用盐的列表可参见《Remington's Pharmaceutical Sciences》，第 17 版. Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, 第 1418 页。

药学上可接受的辅料包括所有载体，稀释剂，助剂或者成形剂，比如防腐剂，抗氧化剂，填料，崩解剂，润湿剂，乳化剂，悬浮剂，溶剂，分散介质，涂层，抗菌剂，抗真菌剂，等渗和吸收延缓剂等等。在医药领域，在具有活性的药物成分中加入这些辅料是十分常见的做法。可以说，除非辅料与药物活性组分并不相容，在药物成分中加入辅料并不是没有道理。为取得好的结果，具有活性的辅助组分也可以被加入药物成分中。

在本文中，式(I)中的“〰”表示手性碳原子位点，可选择为纯 R，纯 S 或 R/S 不同比例的混合结构。

除非特别指出特定的立体异构体(例如，通过结构式中相关立构中心处的粗或虚线键、通过描述结构式中的双键为具有 E 或 Z 构型、或通过使用立体化学指定命名法)，所有立体异构体都作为纯化合物及其混合物包括在本发明的范围内。除非另有说明，个别的对映异构体、非对映异构体、几何异构体及其组合和混合物都被本发明包含。

本领域技术人员将理解，化合物可具有互变异构形式(例如，酮和烯醇形式)、共振形式和两性离子形式，其等同于本文中使用的结构式中所描绘

的那些，并且该结构式包括这种互变异构、共振或两性离子形式。

本发明的另一方面内容是抗体的生产制备。其中包括其在生物体内、体外的产生过程或者组合过程。抗受体肽段的的多克隆抗体的生产方法已是众所周知，如美国专利编号 4,493,795(Nestor 等)。制备单克隆抗体的经典方法是采用特定抗原免疫小鼠，分离得到的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合(Kohler, G; Milstein, C. 1975. Nature 256:495-497)。详细的操作步骤见 antibodies-A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., cold spring harbor laboratory press, new York(1988)，此方法移收入本文所引用的文献。特别地，可通过运用目的抗原免疫小鼠，大鼠，仓鼠或者其他哺乳动物的方法来获得特殊的单克隆抗体。其中目的抗原包括：完整的细胞，从细胞中分离得到的抗原，完整的病毒，弱化的完整病毒以及病毒蛋白。采用 PEG6000 将脾细胞与骨髓瘤细胞融合。融合后得到的杂交瘤，利用其对 HAT 的敏感性，对其进行筛选。杂交瘤细胞产生的单克隆抗体通过其与特定的靶细胞受体发生免疫反应或者抑制受体活性，这在实施这项发明中起作用。

融合后得到的单克隆杂交瘤细胞可分泌针对特定抗原的单克隆抗体。目前，发明中使用的单克隆抗体，正是通过在营养丰富的培养基中培养单克隆杂交瘤细胞从而富集抗体。培养条件需确保杂交瘤细胞有足够的时间将产生的抗体分泌进入培养基中。将含抗体的培养上清收集后，通过人们所熟知的技术对抗体进行纯化。分离方法包括：蛋白 A 亲和层析法；阴离子交换层析法，阳离子交换层析法，疏水层析法以及分子筛层析法(特别是运用抗原交联蛋白 A 的亲和层析法以及分子筛层析法运用较为广泛)；离心法；沉淀法或其它标准的纯化方法

杂交瘤培养所需有效培养基以及人工合成培养基可以通过技术合成或者商业途径获取。其中，典型的人工合成培养基：DMEM(Dulbecco 等 Virol 8：396(1959))加入 4.5mg/L 葡萄糖，20mM 谷氨酰胺，20%胎牛血清以及消泡剂，如：聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物。

除细胞融合技术外，构建生产抗体的细胞系还可以通过其它方法，如：直接将肿瘤原性 DNA 转染 B 淋巴细胞，或者将致癌病毒基因(如：EBV 又称 HHV-4 或 KSHV)导入 B 淋巴细胞，详见美国专利编号. 4341761; 4399121; 4427783; 4444887; 4451570; 4466917; 4472500; 4491632; 4493890. 单克隆抗体还可以通过抗受体多肽或者含羧基末端的多肽来制备。详见 Niman 等

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953(1983); Geysen 等 Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 82:178-182(1985); Lei 等 Biochemistry 34(20):6675-6688(1995)。通常，抗受体多肽或者多肽类似物可以单独使用或者交联免疫原性载体来作为免疫原制备抗受体多肽的单克隆抗体。

发明中作为结合分子的抗体还有其它成熟的生产方法。其中特别受关注的是生产全人源抗体的工艺方法。噬菌体展示技术通过亲和筛选从全人源抗体文库中获得与已知抗原特异性结合的全人源抗体。噬菌体展示技术本身，载体构建以及文库筛选都在文献中有详尽的记录。详见 Dente 等 Gene. 148(1):7-13(1994); Little 等 Biotechnol Adv. 12(3): 539-55(1994); Clackson 等 Nature 352:264-628(1991); Huse 等 Science 246：1275-1281(1989)。

运用杂交瘤技术通过其它种属(如：小鼠)获得的单克隆抗体需对其进行人源化改造。经过改造的抗体可以大大减少异源抗体对人类机体造成的免疫副反应。其中，抗体的人源化较为常见的方法是互补决定域的移植与重塑。详见：美国专利编号 5859205 及 6797492；Liu 等,Immunol Rev. 222:9-27(2008); Almagro 等，Front Biosci. 1;13:1619-33(2008); Lazar 等 Mol Immunol. 44(8):1986-98(2007); Li 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103(10):3557-62(2006)上述文章作为参考文献并入本文。全人源抗体也可以通过抗原免疫携带大量人免疫球蛋白轻链及重链的转基因小鼠，兔子，猴子等其它哺乳动物来制备。以小鼠为例：Xenomouse(Abgenix，Inc.), HuMab-Mouse (Medarex/BMS), VelociMouse(Regeneron), 详见：美国专利编号: 6596541, 6207418, 6150584, 6111166, 6075181, 5922545, 5661016, 5545806, 5436149 以及 5569825。人类治疗过程中，将鼠源抗体可变区基因与人源抗体恒定区基因整合构建的嵌合抗体在人体中所产生的免疫源性反应要大大低于鼠抗(Kipriyanov 等， Mol Biotechnol. 26:39-60(2004); Houdebine, Curr Opin Biotechnol. 13:625-9(2002)上述文章作为参考文献并入本文.此外，对抗体可变区的部分位点进行定点突变可以有效提高抗体的亲和力和特异性(Brannigan 等， Nat Rev Mol Cell Biol. 3:964-70(2002); Adams 等，J Immunol Methods. 231:249-60(1999))。对抗体恒定区进行部分替换也可以有效增进其与免疫效应因子的亲和力从而增强细胞毒性作用。

对恶性细胞抗原有免疫特异性的抗体，可以通过商业途径或者一些成熟的技术方法来获得，如：化学合成或者重组表达技术。这类抗体的编码

基因同样可以通过一些商业途径，如 GenBank 数据库或者其它类似的数据库，出版文献，或者常规的克隆测序方法来获得。

除抗体以外，多肽或者蛋白也同样可以作为结合分子来结合，阻断、进攻或通过其它方式与靶细胞表面相对应的受体或者表位相互作用。只要这些多肽或者蛋白能特异结合特定表位或其对应受体，那么它们不一定要属于免疫球蛋白家族。这些多肽也可以通过类似噬菌体展示抗体的技术来进行分离(Szardenings, J Recept Signal Transduct Res. 2003;23(4):307-49)。从随机的多肽文库获取的肽段与抗体及抗体片段的应用相似。多肽或蛋白分子可通过其结合分子与一些大分子或介质连接来保持其抗原结合的特异性。这些大分子及介质包括：白蛋白、聚合物、脂质体、纳米颗粒或者树状聚合物。

在癌症、自身免疫性疾病和感染性疾病的治疗中，用于偶联的抗体举例如下(但不限于此):3F8 (抗 GD2 抗体)，阿巴伏单抗(抗 CA-125 抗体)，阿昔单抗(抗 CD41 抗体(整合素 α-IIB)，阿达木单抗(抗-TNF-α 抗体)，阿德木单抗(抗-EpCAM 抗体, CD326)，阿非莫单抗(抗-TNF -α)；阿夫土珠(抗-CD20 抗体)，Alacizumab pegol (抗 VEGFR2 抗体)，ALD518(抗-IL -6 抗体)，阿仑单抗(别名：Campath，MabCampath，坎帕斯，抗 CD52 抗体)，阿妥莫单抗(抗 CEA 抗体)，Anatumomab (抗-TAG -72 抗体)，Anrukinzumab (别名：IMA- 638 ，抗-IL -13 抗体)，阿泊珠单抗(抗-HLA- DR 抗体)，阿西莫单抗(抗 CEA 抗体)，阿塞珠单抗 (抗- L-选择素(CD62L)抗体，Atlizumab (别名：托珠单抗，Actemra，RoActemra，抗-IL -6 受体抗体)，Atorolimumab (抗恒河猴因子抗体)，bapineuzumab (抗 β-淀粉样蛋白抗体)，巴利昔单抗(舒莱，antiCD25(IL-2 受体的 α 链)抗体，巴维昔单抗(抗磷脂酰丝氨酸抗体)，贝妥莫单抗(别名：LymphoScan ，抗-CD22 抗体)，贝利木单抗(别名：Benlysta ，LymphoStat -B ，抗 BAFF 抗体)，Benralizumab (抗 CD125 抗体)，柏替木单抗(抗 CCL11 (嗜酸性粒细胞趋化因子-1)抗体)，贝索单抗 (别名：Scintimun ，抗 CEA -相关抗原抗体)，贝伐单抗(别名：阿瓦斯丁，抗 VEGF- A 抗体)比西单抗(别名：FibriScint ，抗血纤维蛋白II β 链抗体)，Bivatuzumab (抗 CD44 v6 抗体)，blinatumomab (别名：BiTE，抗 CD19 抗体)，Brentuximab (CAC10 ，抗-CD30 TNFRSF8 抗体)，Briakinumab (抗-IL- 12，IL- 23 抗体)，康纳单抗(别名：Ilaris ，

抗-IL-1抗体)，Cantuzumab(别名：C242，抗CanAg抗体)，卡罗单抗，卡妥索单抗(别名：removab，抗EpCAM，抗-CD3抗体)，CC49(抗-TAG-72抗体)，Cedelizumab(抗CD4抗体)，赛妥珠单抗(别名Cimzia 抗TNF-α抗体)，西妥昔单抗(别名：爱必妥，IMC-C225，抗-EGFR抗体)，西他土珠(抗-EpCAM抗体)，Cixutumumab(抗-IGF-1抗体)，克立昔单抗(抗CD4抗体)，Clivatuzumab(抗MUC1抗体)，Conatumumab(抗-TRAIL-R2抗体)，CR6261(抗A型流感血凝素抗体)，Dacetuzumab(抗-CD40抗体)，达利珠单抗(别名：赛尼哌，抗CD25(IL-2受体的α链)抗体)，Daratumumab(抗-CD38(环化ADP核糖水解酶)抗体)，狄诺塞麦(别名：Prolia，抗RANKL抗体)，地莫单抗(抗B-淋巴瘤细胞抗体)，阿托度单抗，Dorlixizumab，Ecromeximab(抗-GD3神经节苷脂抗体)，依库丽单抗(别名：Soliris，抗-C5抗体)，埃巴单抗(抗内毒素抗体)，依决洛单抗(别名：Panorex，MAb17-1A，抗-EpCAM抗体)，依法利珠单抗(别名：Raptiva，抗LFA-1(CD11a)抗体)，依芬古单抗(别名：Mycograb，抗Hsp90抗体)，Elotuzumab(抗SLAMF7抗体)，伊斯利莫(抗IL-6抗体)，恩莫单抗(抗ICAM-1(CD54)抗体)，Epitumomab(抗episialin抗体)，依帕珠单抗(抗-CD22抗体)，Erlizumab(抗ITGB2(CD18)抗体)，Ertumaxomab(别名：Rexomun，抗HER2/neu，CD3抗体)，伊瑞西珠(别名：Abegrin，抗整合素αvβ3抗体)，艾韦单抗(抗乙型肝炎表面抗原抗体)，Fanolesomab(别名：NeutroSpec，抗CD15抗体)，法拉莫单抗(抗干扰素受体抗体)，Farletuzumab(抗叶酸受体1抗体)，Felvizumab(抗呼吸道合胞病毒抗体)，Fezakinumab(抗IL-22抗体)，Figitumumab(抗IGF-1受体抗体)，Fontolizumab(抗IFN-γ抗体)，夫瑞韦如(抗狂犬病毒糖蛋白抗体)，Fresolimumab(抗TGF-β抗体)，加利昔单抗(抗CD80抗体)，Gantenerumab(抗-β淀粉样蛋白抗体)，Gavilimomab(抗-CD147(basigin)抗体)，吉妥单抗(抗CD33抗体)，Girentuximab(抗碳酸酐酶9抗体)，Glembatumumab(别名：CR011，抗GPNMB抗体)，戈利木单抗(别名：SIMPONI，抗TNF-α抗体)，Gomiliximab(抗CD23(IgE受体)抗体)，Ibalizumab(抗CD4抗体)，替伊莫单抗(抗CD20抗体)，伊戈伏单抗(别名：Indimacis-125，抗CA-125抗体)，英西单抗(别名：Myoscint，抗心肌肌球蛋白抗体)，英夫利昔单抗(别名：英利昔单抗，抗TNF-α抗体)，Intetumumab

(抗 CD51 抗体)， 伊诺莫单抗 (抗 CD25 (IL-2 受体 α 链)抗体)， Inotuzumab (抗 CD22 抗体)， 易普利姆玛(抗 CD152 抗体)， Iratumumab (抗 CD30(TNFRSF8)抗体)， Keliximab (抗 CD4 抗体)， Labetuzumab (别名: CEA- Cide，抗 CEA 抗体)， Lebrikizumab (抗 IL -13 抗体), Lemalesomab (抗 NCA- 90 (粒细胞抗原)抗体)， 乐德木单抗(抗 TGF β- 2 抗体)， 来沙木单抗 (抗 TRAIL -R2 抗体)，利韦单抗 (抗乙型肝炎表面抗原抗体)，林妥珠单抗(抗 CD33 抗体)， Lucatumumab (抗 CD40 抗体)，鲁昔单抗 (抗 CD23 (IgE 受体)抗体)， Mapatumumab (抗 TRAIL-R1 抗体)， 马司莫单抗 (抗 T-细胞受体抗体)，马妥珠单抗(抗-EGFR 抗体)，美泊利单抗(别名: Bosatria ，抗 IL-5 抗体)， Metelimumab (抗 TGFβ-1 抗体)， Milatuzumab (抗 CD74 抗体)， Minretumomab (抗 TAG -72 抗体)，米妥莫单抗(别名 BEC- 2，抗-GD3 神经节苷脂抗体)， Morolimumab (抗恒河猴因子抗体)， 莫维珠单抗 (别名: NUMAX ，抗呼吸道合胞病毒抗体)，莫罗单抗- CD3(别名: OKT3 ORTHOCLONE ，抗 CD3 抗体)，他那可单抗 (抗 C242 抗体)， 他那莫单抗 (抗 5T4 抗体)，那他珠单抗 (别名: Tysabri，抗整合素 α4 抗体)， 奈巴库单抗 (抗内毒素抗体)， Necitumumab (抗 EGFR 抗体)， Nerelimomab (抗 TNF- α 抗体)，尼妥珠单抗(别名: Theracim ， Theraloc ，抗 EGFR 抗体)， Nofetumomab ，ocrelizumab (抗 CD20 抗体)， 奥度莫单抗 (别名: Afolimomab ，抗 LFA -1(CD11A)抗体)，木单抗 (别名: Arzerra ，抗 CD20 抗体)， Olaratumab (抗 PDGF-R α 抗体)，奥马珠单抗(别名: 索雷尔，抗 IgE Fc 区抗体)， Oportuzumab (抗 EpCAM 抗体)，奥戈伏单抗 (别名:OvaRex ，抗 CA -125 抗体)， Otelixizumab (抗 CD3 抗体)， 帕吉昔单抗(抗脂磷壁酸抗体)，帕利珠单抗(别名: Synagis， Abbosynagis ，抗呼吸道合胞病毒抗体)，帕尼单抗(别名: 维克替比， ABX- EGF，抗-EGFR 抗体)， Panobacumab (抗绿脓杆菌抗体)， Pascolizumab (抗 IL-4 抗体)， Pemtumomab (别名: Theragyn ，抗 MUC1 抗体)，帕妥珠单抗(别名: OMNITARG ， 2C4 ，抗 HER2/neu 抗体)，培克珠单抗(抗 C5 抗体)， Pintumomab (抗腺癌抗原抗体)， 普立昔单抗 (抗 CD4 抗体)， 普托木单抗 (抗波形蛋白抗体)，PRO140 (抗 CCR5 抗体)， Racotumomab (别名: 1E10 ，抗 -(N-羟乙酰神经氨酸(NeuGc ， NGNA)- 神经节苷脂 GM3)抗体)， 瑞非韦鲁 (抗狂

犬病毒糖蛋白抗体)， Ramucirumab (抗 VEGFR2 抗体)，雷珠单抗(别名：Lucentis，抗 VEGF - A 抗体)，瑞西巴库(抗炭疽毒素，保护性抗原抗体)，瑞加韦单抗(抗巨细胞病毒的糖蛋白 B 抗体)， Reslizumab (抗 IL-5 抗体)，Rilotumumab (抗 HGF 抗体)，利妥昔单抗(别名：美罗华， Rituxanmab ，抗 CD20 抗体)， Robatumumab (抗 IGF-1 受体抗体)， Rontalizumab (抗 IFN- α 抗体)， Rovelizumab (别名： LeukArrest ，抗 CD11 ，CD18 抗体)，Ruplizumab (别名：Antova ，抗 CD154 (CD40L)抗体)， 沙妥莫单抗 (抗 TAG-72 抗体)，司韦单抗(抗巨细胞病毒抗体)， Sibrotuzumab (抗 FAP 抗体)，Sifalimumab (抗 IFN-α 抗体)，Siltuximab(抗 IL-6 抗体)， Siplizumab (抗 CD2 抗体)，(Smart) MI95 (抗 CD33 抗体)， Solanezumab (抗 β-淀粉样蛋白抗体)， Sonepcizumab (抗神经鞘氨醇-1-磷酸抗体)， 索土珠单抗 (抗 episialin 抗体)， 司他莫鲁(抗肌肉生长抑制素抗体)， 硫索单抗(别名：LeukoScan，(抗-NCA-90 (粒细胞抗原)抗体)))， Tacatuzumab (抗 α-甲胎蛋白抗体)，他度珠单抗 (抗整合素 αIIbβ3 抗体)，他利珠单抗(抗 IgE 抗体)，他尼珠 (抗 NGF 抗体)，Taplitumomab (抗 CD19 抗体)，Tefibazumab (别名：Aurexis ， 抗聚集因子 A 抗体)， 阿替莫单抗 ， Tenatumomab (抗固生蛋白 C 抗体)， 替奈昔单抗 (抗 CD40 抗体)， Teplizumab (抗 CD3 抗体)， TGN1412 (抗 CD28 抗体)， Ticilimumab (别名：Tremelimumab (抗 CTLA-4 抗体)， Tigatuzumab (抗 TRAIL-R2 抗体)，TNX-650(抗 IL-13 抗体)，托珠单抗(别名 Atlizumab，Actemra ， RoActemra ， (抗 IL-6 受体抗体)， Toralizumab (抗 CD154 (CD40L)抗体)，托西莫单抗(抗 CD20 抗体)，曲妥珠单抗(赫赛汀， (抗 HER2/neu 蛋白抗体)，Tremelimumab(抗 CTLA-4 抗体)，Tucotuzumab celmoleukin (抗 EpCAM 抗体)，妥韦单抗(抗 B 型肝炎病毒抗体)， Urtoxazumab (抗大肠杆菌抗体)，优斯它单抗(别名：Stelara，抗 IL-12，IL-23 抗体)， 伐利昔单抗(抗 AOC3(VAP -1)抗体) ，Vedolizumab ， (抗整合素 α4β7 抗体)，Veltuzumab (抗 CD20 抗体)， 维帕莫单抗(抗 AOC3(VAP-1)抗体，Visilizumab (别名：Nuvion ，抗 CD3 抗体)，Vitaxin (抗血管整合素 avb3 抗体)， Volociximab (抗整合素 α5β1)， 伏妥莫单抗 (别名：HumaSPECT ，抗肿瘤抗原 CTAA16.88 抗体)，扎妥木单抗(别名：HUMAX-EGFR，(抗 EGFR 抗体)， Zanolimumab (别名：HUMAX-CD4 ，抗 CD4 抗体)，Ziralimumab (抗 CD147 (基础免疫球蛋白)

抗体），阿佐莫单抗（抗 CD5 抗体），依那西普（ENBREL®），阿法赛特（AMEVIVE®），阿巴西普（ORENCIA®），利纳西普（ARCALYST），14F7 [抗 IRP-2（铁离子调节蛋白 2）抗体]，14G2a（抗 GD2 神经节苷脂抗体，治疗黑色素瘤和实体瘤，from nat.cancer inst.），J591（抗 PSMA 抗体，治疗前列腺癌，威尔康乃尔医学院），225.28S [抗 HMW-MAA（高分子量黑色素瘤相关抗原）抗体，索林 Radiofarmaci SRL（意大利米兰）治疗黑色素瘤]，COL-1（抗 CEACAM3 抗体，CGM1，nat.cancer inst.。治疗大肠癌和胃癌），CYT-356（Oncoltad®，治疗前列腺癌），HNK20（OraVax 公司，用于治疗呼吸道合胞病毒），ImmuRAIT（来自 IMMUNOMEDICS 治疗非霍奇金淋巴瘤），Lym-1（抗 HLA-DR10 抗体，百富勤医药，用于癌症），MAK-195F [抗 TNF 抗体（又称：肿瘤坏死因子；TNFA，肿瘤坏死因子-α；TNFSF2），阿伯特/诺尔，用于治疗败血症中毒性休克]，MEDI-500 [别名：T10B9，抗 CD3 抗体，TRαβ（T 细胞受体 α/β），复合物，MedImmune 公司用于治疗移植物抗宿主病]，RING SCAN [抗 TAG72（肿瘤相关糖蛋白 72 抗体），Neoprobe 集团，用于治疗 乳腺癌、结肠癌和直肠癌。Avicidin（抗-EpCAM 抗体（上皮细胞粘附分子），抗 TACSTD1 抗体（肿瘤相关钙信号转导 1），抗 GA733-2（胃肠肿瘤相关蛋白 2），抗 EGP-2 抗体（上皮糖蛋白 2）；抗 KSA 抗体；KS1/4 抗原；M4S；肿瘤抗原 17-1A；CD326，来自 NeoRx 公司用于治疗结肠癌，卵巢癌，前列腺癌和非霍奇金淋巴瘤；LymphoCide（IMMUNOMEDICS 公司，NJ），smart ID10（Protein Design Labs），Oncolym（Techniclone 公司，加利福尼亚州），Allomune（BioTransplant，CA），抗 VEGF 抗体（Genentech 公司，CA）；CEAcide（IMMUNOMEDICS 公司，NJ），IMC-1C11（ImClone，NJ）和西妥昔单抗（ImClone 公司，新泽西州）。

用于结合抗原的其它抗体包括（但不仅限于此）：氨肽酶 N（CD13），膜联蛋白 A1，B7-H3（CD276，各种癌症），CA125，CA15-3（癌），CA19-9（癌），L6（癌），Lewis Y（癌），Lewis X（癌），甲胎蛋白（癌），CA242，胎盘碱性磷酸酶（癌），前列腺特异性抗原（前列腺癌），前列腺酸性磷酸酶（前列腺），表皮生长因子（癌），CD2（霍奇金病，非霍奇金淋巴瘤的淋巴瘤，多发性骨髓瘤），CD3 的 ε（T 细胞淋巴瘤，肺癌，乳腺癌，胃癌，卵巢癌，自身免疫性疾病，恶性腹水），CD19（B 细胞恶性肿瘤），CD20（非霍奇金

淋巴瘤)， CD22(白血病，淋巴瘤，多发性骨髓瘤，系统性红斑狼疮) ，CD30，CD33， CD37, CD38 (多发性骨髓瘤) ， CD40 (淋巴瘤，多发性骨髓瘤，白血病)， CD51 (转移性黑素瘤，肉瘤) ，CD52 ，CD56 (小细胞肺癌癌，卵巢癌， Merkel 细胞癌，以及液体肿瘤，多发性骨髓瘤) ， CD66e (癌症) ，CD70 (转移性肾细胞癌和非霍奇金淋巴瘤) ，CD74 (多发性骨髓瘤) ，CD79, CD80 (淋巴瘤)， CD98 (癌症) ，粘蛋白(癌) ， CD221 (实体瘤) ， CD227 (乳腺癌，卵巢癌) ， CD262 (非小细胞肺癌和其他癌) ， CD309 (卵巢癌) ，CD326 (实体瘤) ， CEACAM3 (大肠癌，胃癌) ， CEACAM5 (癌胚抗原; CEA， CD66e)(乳腺癌，结肠直肠癌和肺癌) ， DLL4 (Δ 状-4)， EGFR (表皮生长因子受体，各种癌症) ， CTLA4 (黑色素瘤) ， CXCR4 (CD184 ，血红素肿瘤，实体肿瘤) ，内皮糖蛋白(CD105，实体瘤) ， EPCAM (上皮细胞粘附分子，膀胱癌，头，颈，结肠，前列腺非霍奇金淋巴瘤，和卵巢癌) ， ERBB2 (表皮生长因子受体 2 ;肺癌，乳腺癌，前列腺癌) ， FCGR1 (自身免疫性疾病) ， FOLR (叶酸受体，卵巢癌) ， GD2 神经节苷脂(癌症)，G -28(一种细胞表面抗原 glyvolipid ，黑素瘤) ，独特型 GD3 (癌症) ，热休克蛋白(癌症) ， HER1 (肺，胃癌) ，HER2 (乳腺癌，肺癌和卵巢癌) ，HLA-DR10 (NHL) ，HLA- DRB (非霍奇金淋巴瘤， B 细胞白血病)，人绒毛膜促性腺激素(癌)，IGF1R (胰岛素样生长因子 1 受体，实体瘤，血液癌症) ，IL-2 受体(白细胞介素 2 受体， T-细胞白血病和淋巴瘤)，IL-6R (白细胞介素 6 受体，多发性骨髓瘤，类风湿性关节炎， Castleman 病， IL6 依赖性肿瘤) ，整合素(素 αvβ3 ， α5β1 ， α6β4 ， αllβ3 ， α5β5 ， αvβ5 细胞附着因子，对各种癌症)，MAGE- 1 (癌) ， MAGE- 2 (癌) ， MAGE- 3(癌)，MAGE 4 (癌)，抗转铁蛋白受体(癌) ， P97 (黑色素瘤) ， MS4A1 (跨膜域 4 亚科 A 成员 1 ，非霍奇金 B 细胞淋巴瘤，白血病)， MUC1 或 MUC1 -KLH (乳腺癌，卵巢癌，子宫颈癌，支气管和胃肠道癌症)，MUC16 (CA125) (卵巢癌) ， CEA (大肠) ， GP100 (黑色素瘤)，MART1 (黑色素瘤) MPG (黑色素瘤), MS4A1 (跨膜域 4 蛋白 A ，小细胞肺癌，非霍奇金淋巴瘤) ，核仁，神经癌基因产物(癌),P21 (癌) ，抗 (N-羟乙酰神经氨酸，乳腺癌，黑色素瘤的癌症) ， PLAP 样睾丸碱性磷酸酶(卵巢癌，睾丸癌), PSMA(前列腺肿瘤)，PSA(前列腺)， ROBO4 ，TAG 72 (肿瘤相关糖蛋白 72 ，白血病，胃癌，结肠直肠癌，卵巢癌)中，T 细胞的跨膜蛋白(癌症) ，Tie(CD202b)，

TNFRSF10B (肿瘤坏死因子受体超家族成员 10B ，癌症) ， TNFRSF13B (肿瘤坏死因子受体超家族成员 13B ， 多发性骨髓瘤，非霍奇金淋巴瘤，以及其他癌症，类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮) ， TPBG (滋养层糖蛋白，肾细胞癌) ， TRAIL-R1 (肿瘤坏死凋亡诱导配体受体 1 ，淋巴瘤，非霍奇金淋巴瘤，大肠癌，肺癌) ，VCAM- 1(CD106 ，黑色素瘤) ，血管内皮生长因子，血管内皮生长因子- A，VEGF - 2 (CD309) (各种癌症) 。通过抗体识别的一些其他的肿瘤相关抗原已审阅(Gerber 等，mAbs 1:3 ， 247-253 (2009) ; Novellino 等，cancer immunol immunother. 54 (3) , 187 -207 (2005)Franke 等，cancer biother radiopharm. 2000 ， 15 ， 459 - 76) 。还有许多其他的抗原是：其他不同的集群(CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD12w, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD32a, CD32b, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49b, CD49c, CD49c, CD49d, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD76, CD77, CD78, CD79, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD85a, CD85b, CD85c, CD85d, CD85e, CD85f, CD85g, CD85g, CD85i, CD85j, CD85k, CD85m, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD123a, CD124, CD125, CD126, CD127, CD128, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154,

CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD156d, CD157, CD158, CD158a, CD158b1, CD158b2, CD158c, CD158d, CD158e1, CD158e2, CD158f2, CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD159, CD159a, CD159b, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CDw186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CD199, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202, CD202(a, b), CD203, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD213, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218, CD218a, CD218, CD21b9, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240, CD240ce, CD240d, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CD293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300, CD300a, CD300b, CD300c, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD307f, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD341, CD342, CD343, CD344, CD345, CD346, CD347, CD348, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD356, CD357, CD358, CD359, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370, CD371, CD372, CD373, CD374, CD375, CD376, CD377, CD378,

CD379, CD381, CD382, CD383, CD384, CD385, CD386, CD387, CD388, CD389, CRIPTO, CR, CR1, CRGF, CRIPTO, CXCR5, LY64, TDGF1, 4-1BB, APO2, ASLG659, BMPR1B, 4-1BB, 5AC, 5T4)，APO2，ASLG659，BMPR1B (骨形态发生蛋白受体)，CRIPTO，膜联蛋白 A1，核仁，内皮糖蛋白(CD105)，ROBO4，氨基肽酶 N，Δ-样 3(DLL3)，Δ-样 4(DLL4)，VEGFR-2(CD309)，CXCR4 9CD184)，Tie2，B7-H3，WT1，MUC1，LMP2，HPV E6 E7，EGFRvIII，HER-2/neu，个体基因型，MAGE A3，P53 nonmutant，NY-ESO-1，GD2，CEA，MelanA/MART1，Napi3b(NAPI-3B，NPTIIb，SLC34A2，溶质载体家族 34，成员 2，II 型钠依赖的磷转运 3b)，Ras 突变，gp100，p53 突变体，Proteinase3(PR1)，BCR-abl，Tetratocarcinoma 衍生的生长因子)，EphA 受体，EphB 受体，EGFR，EGFRvIII，ETBR(内皮素)，HER2/neu，HER3，HLA-DOB(MHC II 类分子 IA 抗原)，整合素，IRTA2，MPF(MPF，MSLN，SMR，巨核细胞强化因子，间皮素)，CRIPTO，Sema 5b(FLJ10372，KIAA1445，Mm42015，SEMA5B，5EMAG，semaphoring 5 bHlog，sdema 域，七个血小板重复序列，胞浆区)，PSCA，STEAP1(6 个跨膜上皮前列腺抗原)，和 STEAP2(HGNC 8639，IPCA-1，PCANP1，STAMP1，STEAP2，STMP，前列腺)，酪氨酸酶，生存素，hTERT，肉瘤易位断点，EphA2，PAP，ML-IAP，AFP，EpCAM，ERG(TMPRSS2 ETS 融合基因)，NA17，PAX3，ALK，雄激素受体，细胞周期素 B1，聚唾液酸，MYCN，RhoC，TRP-2，GD3，岩藻糖神经节苷脂，间皮素，PSMA，MAGE A1，sLe(a)，CYP1B1，PLAC1，GM3，BORIS，Tn，GloboH，ETV6-AML，NY-BR-1，RGS5，SART3，STn，碳酸酐酶 IX，PAX5，OY-TES1，精子蛋白 17，LCK，HMWMAA，AKAP-4，SSX2，XAGE 1，B7H3，豆荚蛋白，Tie 2，Trop2, Page4，VEGFR2，MAD-CT-1，FAP，PDGFR-β，MAD-CT-2，Fos 蛋白相关抗原 1。

本发明的偶联物适用于癌症治疗。这些癌症包含，并不限于，肾上腺皮质癌，直肠癌，膀胱癌，脑肿瘤(成人：脑干胶质瘤，儿童，小脑星形细胞瘤，星形细胞瘤，室管膜瘤，髓母细胞瘤，幕上原始神经外胚层肿瘤，松果体，视觉通路和下丘脑胶质瘤)，乳腺癌，类癌肿瘤，胃肠道，未知原

发癌，宫颈癌，结肠癌，子宫内膜癌，食管癌，肝外胆管癌，尤文家族肿瘤(PNET)，颅外恶性生殖细胞肿瘤，眼癌，眼内黑色素瘤，胆囊癌，胃癌(胃)，生殖细胞肿瘤，性腺外，妊娠滋养细胞肿瘤，头颈部肿瘤，下咽癌，胰岛细胞癌，肾癌(肾细胞癌)，喉癌，白血病(急性淋巴细胞，急性髓细胞，慢性淋巴细胞，慢性髓细胞，多毛细胞)，唇和口腔癌，肝癌，肺癌(非小细胞，小细胞，淋巴瘤(爱滋病相关，中枢神经系统，皮肤 T 细胞，霍奇金病，非霍奇金病，恶性间皮瘤，黑色素瘤，默克尔细胞癌， 原发性隐匿性鳞状颈部转移癌， 多发性骨髓瘤和其他浆细胞肿瘤，蕈样肉芽肿，骨髓增生异常综合征，骨髓增殖性疾病，鼻咽癌，神经母细胞瘤，口腔癌，口咽癌，骨肉瘤，卵巢癌(上皮细胞，生殖细胞瘤，低度恶性潜能肿瘤)，胰腺癌(外分泌，胰岛细胞癌)，鼻窦和鼻腔癌，甲状旁腺癌，阴茎癌，嗜铬细胞瘤癌，垂体肿瘤，浆细胞肿瘤，前列腺癌横纹肌肉瘤，直肠癌，肾细胞癌(肾癌)，肾盂和输尿管(移行细胞)，涎腺癌，塞扎综合症，皮肤癌，皮肤癌(皮样 T 细胞淋巴瘤，卡波西氏肉瘤，黑色素瘤)，小肠癌，软组织肉瘤，胃癌，睾丸癌，胸腺瘤(恶性)，甲状腺癌，尿道癌，子宫癌(肉瘤)，儿童异常肿瘤，阴道癌，外阴癌，肾母细胞瘤。

本发明的偶联物适用于自身免疫疾病的预防和治疗。自身免疫疾病包括，但不限于，胃酸缺乏自身免疫性慢性活动性肝炎，急性播散性脑脊髓炎，急性出血性脑白质炎，阿狄森氏病，丙种球蛋白血症，斑秃，肌萎缩性侧索硬化症，强直性脊柱炎，抗肾小球基底膜/肾小管基底膜肾炎，抗磷脂综合征，抗合成酶综合征，关节炎，异位性过敏症，过敏性皮炎，自身免疫性再生障碍性贫血，自身免疫性心肌病，自身免疫性溶血性贫血，自身免疫性肝炎，自身免疫性内耳病，自身免疫性淋巴组织增生综合征，自身免疫性周围神经系统疾病，自身免疫性胰腺炎自体免疫多内分泌症 I, II, III 型，自身免疫性孕酮皮炎，自身免疫性血小板减少性紫癜，自身免疫性色素层炎，巴洛病/巴洛同心性硬化，黑奇特综合征，Berger 病，Bickerstaff 脑干脑炎，Blau 综合征，大苞性类天苞疮，巨淋巴结增生，美洲锥虫病，慢性疲劳免疫功能紊乱综合征，慢性炎症性脱髓鞘性多发神经病，慢性复发性多病灶性骨髓炎，慢性莱姆病，慢性阻塞性肺疾病，变应性肉芽肿性血管炎，瘢痕性类天疱疮，腹部疾病，耳蜗前庭综合征，冷凝集素病，补体 C2 缺乏症，颅动脉炎，肢端硬皮综合征，克隆氏病(一种特发性炎症性

肠病)，柯兴氏症，皮肤白细胞碎裂性血管炎，恶性萎缩性丘疹病，痛性肥胖病，疱疹样皮炎，皮肌炎，1 型糖尿病，弥漫性皮肤硬皮病，心肌梗塞后综合征，盘状红斑狼疮，湿疹，子宫内膜异位症，幼年特发性关节炎，嗜酸细胞性筋膜炎，嗜酸细胞性筋膜炎，结节性红斑，特发性混合性冷球蛋白血症，埃文斯综合征，渐进性骨化性纤维组织结构不良，纤维肌痛 ，纤维肌炎，纤维性肺泡炎，胃炎，胃肠类天疱疮，巨细胞动脉炎，肾小球肾炎，肺出血肾炎综合征，格雷夫斯氏病，格林-巴利神经根炎，桥本脑炎，淋巴瘤性甲状腺肿，溶血性贫血，过敏性紫癜多，妊娠期疱疹，化脓性汗腺炎，休斯综合症(抗磷脂抗体综合征)，低丙球蛋白血症，特发性炎性脱髓鞘疾病，特发性肺纤维化，特发性血小板减少性紫癜(自身免疫性血小板减少性紫癜)，IgA 肾病(Berger 病)，包涵体肌炎，发炎性脱髓鞘病变，间质性膀胱炎，肠易激综合征，幼年特发性关节炎，幼儿型类风湿性关节炎，皮肤粘膜淋巴结综合征，兰伯特肌无力综合征，白细胞分裂性血管炎，扁平苔藓，硬化性苔藓，线状 IgA 病(LAD)，肌萎缩性侧索硬化症，狼疮样肝炎，红斑狼疮，马吉德综合征，美尼尔氏综合症，显微镜下多血管炎，米勒·费希尔综合征，混合性结缔组织病，硬斑病，穆哈二氏病，韦尔斯综合征，多发性骨髓瘤，多发性硬化症，重症肌无力，肌炎，发作性睡病，视神经脊髓炎(德维克病)，神经性肌强直，眼部瘢痕性类天疱疮，眼阵挛-肌阵挛综合征，奥德氏甲状腺炎，复发性风湿病，熊猫症候群(合并链球菌感染的儿童自体免疫神经精神异常)，类肿瘤性小脑变性，阵发性睡眠性血红蛋白尿症，进行性一侧面萎缩，巴-特二氏综合征，睫状体扁平部炎，天疱疮，寻常型天疱疮，恶性贫血，静脉周围炎，POEMS 综合征，结节性多动脉炎，风湿性多肌痛，多发性肌炎，原发性胆汁性肝硬化，原发性硬化性胆管炎，进行性炎性神经病变，银屑病，银屑病关节炎，坏疽性脓皮，纯红细胞再生障碍性贫血，罗斯默森氏脑炎，雷诺病，复发性多软骨炎，莱特尔综合征，腿多动综合征，腹膜后纤维化，类风湿关节炎，类风湿发热，结节病，精神分裂症，施密特综合征，施尼茨勒综合征，巩膜炎，硬皮病，干燥综合征，脊椎关节病，粘血综合征，斯蒂尔病，僵人综合征，亚急性细菌性心内膜炎， Susac 氏综合征，急性热性嗜中性皮肤病，西德纳姆舞蹈病，交感性眼炎，高安氏动脉炎，颞动脉炎(巨细胞动脉炎) ，痛性眼肌麻痹综合征，横贯性脊髓炎，溃疡性结肠炎(一种特发性炎症性肠疾病) ，未分化

的结缔组织病，未分化脊柱关节病，血管炎，白癜风，韦格纳氏肉芽肿病，威尔逊氏综合征，威斯科特-奥尔德里奇综合征。

在另一具体实施方案中，用于治疗或预防自身免疫疾病的用于偶联的抗原结合分子包括，但不限于：抗弹性蛋白抗体； Abys 抗上皮细胞抗体；抗基底膜 IV 型胶原蛋白抗体；抗核抗体；抗双链 DNA 抗体；抗单链 DNA 抗体 ，抗心肌磷脂抗体 IgM， IgG；抗 celiac (anti-celiac antibody)抗体；抗磷脂抗体 IgK ， IgG；抗核糖蛋白抗体；抗线粒体抗体；甲状腺抗体；微粒体抗体，T-细胞抗体；甲状腺球蛋白抗体，抗硬皮病-70 抗体(anti-SCL-70)；人抗 Jo 抗体(anti-jo) ；抗系统性红斑狼疮患者自身抗体；抗干燥综合症抗体(Anti-La/SSB) ；抗系统性红斑狼疮抗体；抗壁细胞抗体；抗组蛋白抗体；抗核糖核蛋白抗体(anti-RNP) ；中性粒细胞胞质抗体(C- ANCA)； 细胞核周围抗中性粒细胞抗体(P- ANCA)；抗着丝粒抗体；抗核纤维蛋白抗体，以及抗肾小球基底膜抗体(GBM)抗体，抗神经节苷脂(Anti-ganglioside)抗体；抗桥粒芯糖蛋白 3 抗体(anti-Desmogein 3)；抗人 P62 抗体；抗人 sp100 抗体 ；抗线粒体 M2 抗体；类风湿因子抗体；抗突变型瓜氨酸波形蛋白抗体 (anti-MCV)；抗拓扑异构酶抗体；抗中性粒细胞胞浆(CANCA)抗体。

在某些优选的实施方案中，本发明中用于共轭偶联的结合分子，可以与自身免疫性疾病相关的活化淋巴细胞表达的受体或受体复合物结合。包括免疫球蛋白基因超家族成员(如 CD2，CD3， CD4，CD8， CD19，CD20，CD22 ，CD28， CD30, CD33, CD37, CD38, CD70, CD79 ，CD79b,CD90，CD123, CD125, CD138, CD152/CTLA-4 ， PD- 1 ，或 ICOS) ， TNF 受体超家族成员(如 CD27 ， CD40 ， CD95/Fas ， CD134/OX40 ，CD137/4-1BB ， INF -R1 ， TNFR - 2 ，RANK，TACI ， BCMA ，骨保护素， Apo2/TRAIL-R1 ， TRAIL-R2 ， TRAIL-R3 ， TRAIL- R4, Trop2 和 30 APO- 3)，整联蛋白，细胞因子受体，趋化因子受体，主要组织相容性蛋白，凝集素(C 型，S 型或 I 型)或补体调控蛋白。

在另一具体实施方案中，对病毒性或细菌性抗原具有免疫特异性的有用的结合体是人源的或人单克隆抗体。如本文所用术语“病毒性抗原”包括，但不限于：任何能诱发免疫反应的病毒肽段，多肽蛋白 (例如， HIVgp120 ，HIV nef ， RSV F 糖蛋白，流感病毒神经氨酸酶 ，流感病毒血凝素，人类 T 淋巴细胞病毒感染 调节因子 tax，单疱疹病毒糖蛋白(例如， gB， gC ，

gD 和 gE)和乙型肝炎表面抗原)。如本文所用的术语“细菌性抗原 ”包括,但不限于:任何能诱发免疫反应的微生物肽段，多肽蛋白，糖类，多糖，脂质分子(例如，细菌，真菌，致病性原生动物，酵母多肽包括，例如，脂多糖和荚膜多糖 5/8)。可用于治疗病毒性或细菌性感染的有用 I 型抗体包括，但不限于：帕利珠单抗，一种用于治疗 RSV 感染的人源的抗呼吸道合胞体病毒单克隆抗体 ； PRO542，一种用于治疗 HIV 感染的 CD4 融合抗体；Ostavir ，一种治疗乙肝病毒人源性抗体； PROTVIR，一种用于治疗巨细胞病毒人源化抗体 IgG.sub.1，还有抗脂多糖(anti-LPS)抗体。

本发明的偶联物可以用于治疗感染性疾病。这些传染病包括，但不限于：不动杆菌感染，放线菌病，非洲昏睡病(非洲锥虫病) ，艾滋病(获得性免疫缺陷综合症) ，阿米巴病，微粒孢子虫病，炭疽，溶血隐秘杆菌感染，阿根廷出血热，蛔虫病，曲霉菌病，星状病毒感染，巴贝虫病，蜡样芽胞杆菌感染，细菌性肺炎，细菌性阴道病，类杆菌感染，小袋虫病，贝利蛔线虫感染， BK 病毒感染，黑色发结节病，人芽囊原虫感染，芽生菌，玻利维亚出血热，疏螺旋体感染，肉毒中毒(和婴儿肉毒中毒) ，巴西出血热，布氏杆菌病，伯霍尔德杆菌感染，布鲁里溃疡，感染杯状病毒(诺罗病毒和札幌病毒) ，弯曲菌病，念珠菌感染(念珠菌病，鹅口疮) ，猫抓病，蜂窝组织炎，查格斯病(美洲锥虫病) ，软下疳，水痘，衣原体，肺炎衣原体感染，霍乱，着色真菌病，肝吸虫病，难辨梭状芽孢杆菌感染，球孢子菌病，科罗拉多蜱热，普通感冒(急性病毒鼻咽炎;急性鼻炎) ，克雅氏病，克里米亚 - 刚果出血热，隐球菌病，隐孢子虫病，皮肤幼虫移行症，环孢子虫感染，囊虫病，巨细胞病毒感染，登革热，双核阿米巴病，白喉，裂头绦虫，龙线虫病，埃博拉出血热，包虫病，埃里希体病，蛲虫病(蛲虫感染) ，肠球菌感染，肠病毒感染，流行性斑疹伤寒，传染性红斑(第五病) ，幼儿急疹，姜片虫病，家族致命性失眠症，丝虫病，产气荚膜梭菌引起的食物中毒，非寄生阿米巴感染，梭杆菌感染，气性坏疽(梭菌性肌坏死) ，地丝菌病，吉斯特曼-施特劳斯综合征，贾第虫病，马鼻疽，腭口线虫病，淋病，腹股沟肉芽肿，A 组链球菌感染， B 组链球菌感染，流感嗜血杆菌感染，手足口病(HFMD) ，汉坦病毒肺综合征，幽门螺杆菌感染，溶血性尿毒综合征，出血热肾病综合征， 甲型肝炎，乙型肝炎，丙型肝炎，丁型肝炎，戊型肝炎，单纯疱疹，组织胞浆菌病，钩虫感染，人鲍坎病毒感染，人埃

文氏埃立克体病，人粒细胞无形体病，人类偏肺病毒感染，人体单核细胞埃立克体病，人乳头状瘤病毒感染，人副流感病毒感染，膜壳绦虫病 ，爱泼斯坦 - 巴尔病毒传染性单核细胞增多症(单一) ，流感，等孢子球虫病，川崎病，角膜炎，金氏金氏杆菌感染，库鲁病，拉沙热，军团杆菌病(退伍军人协会会员病) ，军团杆菌病(庞蒂亚克热) ，利什曼病，麻风病，钩端螺旋体病，李氏杆菌病，莱姆病(莱姆疏螺旋体病) ，淋巴丝虫病(象皮肿) ，淋巴细胞性脉络丛脑膜炎，疟疾，马尔堡出血热，麻疹，类鼻疽(惠特莫尔氏病) ，脑膜炎，脑膜炎球菌病，后殖吸虫病，微孢子虫病，传染性软疣，流行性腮腺炎，斑疹伤寒(地方性斑疹伤寒) ，支原体肺炎，足菌肿，蝇蛆病，新生儿结膜炎(新生儿眼炎) ，克—亚综合征(vCJD ， nvCJD) ，诺卡氏菌病，盘尾丝虫病(河盲症) ，副球孢子菌病 (南美芽生菌病) ，肺吸虫病，巴氏杆菌病，头虱病(头虱) ，体虱病(体虱) ，阴虱病(阴虱) ，盆腔炎，百日咳，鼠疫，肺炎球菌感染，肺孢子虫性肺炎，肺炎，脊髓灰质炎，普氏菌感染，原发性阿米巴脑膜脑炎，进行性多病灶脑白质病，鹦鹉热， Q 热，狂犬病，鼠咬热，呼吸道合胞病毒感染，鼻孢子菌病 ，鼻病毒感染，立克次体感染，立克次氏体，裂谷热，洛矶山斑疹热，轮状病毒感染，风疹，沙门氏菌病， SARS(严重急性呼吸系统综合症) ，疥疮，血吸虫病，败血症，痢疾(菌痢) ，带状疱疹(带状疱疹) ，天花(天花) ，孢子丝菌病，葡萄球菌食物中毒，葡萄球菌感染，线虫，梅毒，绦虫病，破伤风(牙关紧闭症) ，须癣，头癣，体癣，股癣，手癣，黑糠疹，足癣，甲癣，花斑癣，弓蛔虫病(眼幼虫移行症) ，弓蛔虫病(内脏幼虫移行症)，弓形体病，旋毛虫病，滴虫病，鞭虫病(鞭虫感染)，肺结核，兔热病，尿素分解尿素支原体感染，委内瑞拉马脑炎，委内瑞拉出血热，病毒性肺炎，西尼罗热，白色毛结节菌病(白色毛结节菌病) ，假结核菌感染，耶尔森菌病，黄热病，接合菌病。

本篇专利先前描述的抗体的结合分子可用于抗致病菌株，包括，但不限于：鲍曼不动杆菌，以色列放线菌 ，戈氏放线菌和丙酸丙酸盐杆菌，布氏锥虫， HIV(人类免疫缺陷病毒) ，溶组织内阿米巴，无形体属，炭疽杆菌，溶血隐秘杆菌，胡宁病毒，蛔虫，曲霉属， 星状病毒家庭，巴贝斯虫属，蜡样芽胞杆菌，多杆菌，类杆菌属，结肠小袋纤毛虫，贝利蛔线虫属，BK 病毒，何德毛结节菌，人芽囊原虫，皮炎芽生菌，沙粒病毒，疏螺旋体属，肉毒梭菌，清风藤，布鲁菌属，通常洋葱伯克霍尔德菌和其他伯克霍

尔德杆菌种，溃疡分枝杆菌，杯状病毒科家族，弯曲杆菌属，通常是白色念珠菌和其他念珠菌属，巴尔通体， A 组链球菌和葡萄球菌，克氏锥虫，杜克雷嗜血杆菌，水痘带状疱疹病毒(VZV) ，沙眼衣原体，肺炎衣原体，霍乱弧菌，裴氏着色霉，华支睾吸虫 ，难辨梭状芽孢杆菌，粗球孢子菌和 Coccidioides posadasii，科罗拉多蜱热病毒，鼻病毒，冠状病毒，朊病毒克雅氏病，克里米亚 - 刚果出血热病毒，新型隐球菌，隐孢子虫属，猫钩虫；multiple parasites,，环孢子，猪带绦虫，巨细胞病毒，登革热病毒(DEN - 1 ，DEN- 2 ， DEN- 3 和 DEN - 4) 虫媒病毒，脆弱双核阿米巴，白喉棒状杆菌，裂头属，麦地那龙线虫，埃博拉病毒，棘球属，埃立克体属，蛲虫，肠球菌属，肠道病毒属，普氏立克次体，细小病毒 B19 ，人类疱疹病毒 6 型和人类疱疹病毒 7 型，布氏姜片吸虫，肝片吸虫和大片吸虫， FFI 朊病毒， 丝虫目超家族，产气荚膜杆菌，梭杆菌属，产气荚膜梭菌，其他梭菌属，白地霉， GSS 朊病毒，肠贾第鞭毛虫，鼻疽伯克霍尔德氏菌，棘颚口线虫和刚棘颚口虫，淋病奈瑟菌，肉芽肿杆菌，化脓性链球菌，无乳链球菌，流感嗜血杆菌，肠道病毒，大多数柯萨奇 A 病毒和肠病毒 71 型，辛诺瓦病毒，幽门螺旋杆菌，大肠杆菌 O157 ： H7 ，布尼亚病毒科家族，甲型肝炎病毒，乙型肝炎病毒，丙型肝炎病毒，丁型肝炎病毒，戊型肝炎病毒，单纯疱疹病毒 1 型，单纯疱疹病毒 2 型，组织胞浆菌，十二指肠钩虫和美洲板口线虫，流感嗜血杆菌，人类博卡病毒，埃文氏埃立克体，无形体科，人类偏肺病毒，沙费埃里希体，人乳头瘤病毒，人副流感病毒，微小膜壳绦虫和缩小包膜绦虫 ， EB 病毒，正粘病毒科，贝利等孢球虫，金氏金氏杆菌，肺炎克雷伯菌 ，Klebsiella ozaenas ，库鲁病朊病毒，拉沙病毒，嗜肺军团菌，嗜肺军团菌，利什曼原虫属，麻风分枝杆菌和弥漫型痲疯分枝杆菌，钩端螺旋体属，李斯特菌，博氏包柔螺旋体和其他疏螺旋体属，班氏丝虫和马来丝虫，淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV) ，疟原虫属，马尔堡病毒，麻疹病毒，类鼻疽伯克氏菌，脑膜炎奈瑟菌，横川后殖吸虫，微孢子虫门，传染性软疣病毒(MCV) ，腮腺炎病毒，立克次体杆菌，肺炎支原体，多种细菌(马杜拉分枝菌病)和真菌(马杜拉分枝菌病)，寄生双翅目蝇蛆，沙眼衣原体和淋球菌， vCJD 朊病毒，星状诺卡氏菌和其他诺卡氏菌属物种，旋盘尾丝虫，巴西芽生菌，卫氏并殖吸虫和其他并殖吸虫属，巴斯德氏菌属，虱头癣，体虱，阴虱，百日咳博德特氏菌，鼠疫

耶尔森氏菌，肺炎链球菌，卡氏肺囊虫，脊髓灰质炎病毒，普雷沃氏菌属，福氏耐格里阿米巴， JC 病毒，鹦鹉热衣原体，立克次体，狂犬病毒，念珠状链杆菌和鼠咬热螺旋体，呼吸道合胞病毒，西伯鼻孢子虫，鼻病毒，立克次体属，蜱立克次体 ，立夫特山谷热病毒，立氏立克次体，轮状病毒，风疹病毒，沙门氏菌属，非典型肺炎冠状病毒，疥螨，血吸虫属，志贺氏菌属，水痘带状疱疹病毒，重型天花或类天花，申克孢子丝菌，葡萄球菌属，金黄色葡萄球菌，化脓性链球菌，粪类圆线虫，梅毒螺旋体，绦虫属，破伤风梭菌，毛癣菌属，断发毛癣菌 ，发癣菌属，絮状表皮癣菌，红色毛癣菌和须癣毛癣菌，威尼克外瓶霉，毛癣菌属，马拉色菌属，犬弓首蛔虫或猫弓蛔虫，弓形虫，旋毛虫，阴道毛滴虫，鞭虫，结核杆菌，土拉热弗朗西丝菌，解脲支原体，委内瑞拉马脑炎病毒，霍乱弧菌，瓜纳瑞托病毒，西尼罗病毒，白色毛孢子菌 ，假结核耶尔森菌，小肠结肠炎耶尔森菌，黄热病毒，毛霉目(毛霉菌病)和虫霉目(虫霉菌病)，铜绿假单胞菌，胎儿弯曲杆菌(弧菌)，嗜水气单胞菌，迟缓爱德华氏菌，耶尔森菌，志贺痢疾杆菌，福氏痢疾杆菌，宋内志贺氏菌，鼠伤寒沙门氏菌，雅司螺旋体，Treponema carateneum，奋森疏螺旋体，博氏包柔螺旋体，出血性黄疸钩端螺旋体， 卡氏肺囊虫，布鲁氏菌，猪布鲁氏菌，布氏杆菌，支原体属，斑疹伤寒病原体，Rickettsia tsutsugumushi，披衣菌属;病原真菌(曲霉，白色念珠菌，荚膜组织胞浆菌);原生动物(溶组织内阿米巴，阴道毛滴虫，人毛滴虫，Tryoanosoma gambiense，罗得西亚锥虫，杜氏利什曼原虫，热带利什曼原虫，巴西利什曼原虫，肺囊虫肺炎，间日疟原虫，恶性疟原虫，恶性疟疾);或蠕虫(日本血吸虫，曼氏血吸虫，埃及血吸虫和钩虫)

其他抗体作为本发明结合配体用于治疗病毒性疾病包括，但不限于：抗体作用于病原病毒的抗原包括以下例子但不限于：天花病毒，疱疹病毒，腺病毒，乳多空病毒科，肠道病毒科，细小 RNA 病毒科，细小病毒科，呼肠孤病毒，逆转录病毒科，流感病毒，副流感病毒，腮腺炎，麻疹，呼吸道合胞病毒，风疹，虫媒病毒，弹状病毒，沙粒病毒科， Non-A/Non-B 肝炎病毒，鼻病毒，冠状病毒，轮状病毒科，肿瘤病毒[例如，乙型肝炎病毒(肝细胞癌) ，人乳头状瘤病毒(宫颈癌，肛门癌) ，卡波西肉瘤相关疱疹病毒(卡波济氏肉瘤)， EB 病毒(鼻咽癌，伯基特淋巴瘤，原发性中枢神经系统淋巴瘤) ， MCPyV (梅克尔细胞癌) ， SV40 (猿猴病毒 40) ，丙型肝炎病毒(肝

癌)，人类嗜T淋巴细胞病毒1型 (成人T细胞白血病/淋巴瘤)，免疫失调引起病毒：[如人类免疫缺陷病毒(艾滋病)];中枢神经系统病毒：[如，JCV(进行性多病灶脑白质病)，MeV(亚急性硬化性全脑炎)，LCV(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎)，虫媒病毒性脑炎，正粘病毒科(可能的)(昏睡性脑炎)，RV(狂犬病)，水疱性口炎-印度病毒属，疹病毒性脑膜炎，拉姆齐·亨特综合征II型;脊髓灰质炎(小儿麻痹症，后小儿麻痹症候群)，人类嗜T淋巴细胞病毒1型(热带痉挛性截瘫)];巨细胞病毒(巨细胞病毒性视网膜炎，HSV(疱疹性角膜炎))];心血管病病毒[如柯萨奇病毒(心包炎，心肌炎)];呼吸系统/急性鼻咽炎病毒/病毒性肺炎：[非洲淋巴细胞瘤病毒(疱疹病毒4型感染/传染性单核细胞增多)，巨细胞病毒;SARS冠状病毒(严重急性呼吸器官综合征)正粘病毒：流感病毒A/B/C(流感/禽流感)，副粘病毒：人类副流感病毒(副流感)，呼吸道合胞病毒(人类呼吸道合胞病毒)，肺病毒];消化系统病毒[MUV(腮腺炎)，巨细胞病毒(巨细胞病毒性食管炎);腺病毒(腺病毒感染);轮状病毒，诺如病毒，星状病毒，冠状病毒;HBV(乙肝病毒)，柯萨奇病毒，甲型肝炎(甲肝病毒)，HCV(丙型肝炎病毒)，HDV(丁型肝炎病毒)，HEV(戊型肝炎病毒)，HGV(庚型肝炎病毒)];泌尿生殖系统的病毒[如，BK病毒，MUV(腮腺炎)]。

按照更进一步的目标，本发明还包括上述偶联物成分结合其它可行的药物载体作为癌症和自身免疫疾病的治疗药物。本发明治疗癌症和自身免疫疾病的方法包括体外，体内或间接体内疗法。体外疗法应用实例，包括药物处理体外培养细胞，杀死除了没有表达目标抗原的细胞以外的所有细胞；或者杀死表达非想要的抗原的细胞。作为间接体内疗法的治疗方法的一个示例：在体外处理造血干细胞，杀死患病或恶性细胞后输回原患者体内。例如，临床上先通过间接体内治疗除去骨髓中的肿瘤细胞或淋巴细胞然后输回原患者来治疗癌症和自体免疫疾病，或者在移植前去除骨髓中的T细胞和其它淋巴细胞以防止移植物的免疫拮抗反应。实施方法如下：从病人或其他个体获取骨髓细胞，然后在加入本发明偶联物的含血清培养基中37℃培养，药物浓度范围为1pM到0.1mM，培养时间为30分钟左右到48小时左右。药物具体浓度和培养时间由经验丰富的临床医生决定。培养结束后，骨髓细胞用含血清培养基洗涤后通过静脉注射输回人体内。如果病人在获取骨髓细胞和回输处理前需要接受其它治疗，比如烧蚀化疗或全身

放射疗法的情况下，处理后的骨髓细胞可以保存在合格的液氮医疗设备中。

用于体内临床应用时，本发明的偶联物将以溶液或能被无菌水溶解后注射的冻干固体的形式提供。合适的偶联物给药方法事例如下：偶联物每星期通过静脉注射一次，持续 4~12 星期。单次剂量通过溶解于 50 到 500 毫升的生理盐水，生理盐水可以加入人血清白蛋白(例如，0.5 到 1 毫升的 100mg/ml 的浓缩人血清白蛋白)。药物剂量大概在 50μg 到 20mg 每千克体重每星期，静脉注射(每次注射 10ug 到 200mg/kg 体重)。4~12 周的治疗结束后，病人可以再接受新一轮的治疗。详细的治疗方法包括给药途径，赋形剂，稀释剂，药物剂量，治疗时间等等可以由有经验的外科医生决定。

可以通过体内或间接体内的方法选择性杀死细胞群来治疗疾病的例子包括任何种类的恶性肿瘤，自体免疫疾病，移植排斥和感染(包括病毒，细菌或寄生虫)。

达到理想的生物学效果而需要的偶联物的量，将因多个因素而各异，这些因素包括化合物的性质特点，疗效和偶联物的生物利用度，疾病的类型，病人的种族，病人患病的状态，给药的途径，所有这些因素共同决定给药时间表和给药方式。

概括的说，本发明中的偶联物可以通过以 0.1 到 10%质量体积比溶解在生理缓冲液中用于非肠道给药。典型的药物剂量范围从 1ug 到 0.1g 每千克体重每天；推荐的药物剂量范围从 0.01mg 到 20mg 每千克体重每天或者等效剂量的儿童用量。推荐的给药量取决于多个变量，包括疾病或功能紊乱的类型，病人个体的整体的健康状态，偶联药物的相对生物学活性，化合物的剂型，给药的方式(静脉注射，肌肉注射，或其它)，在选中给药方式下的药物动力学特性，以及给药的速度(单次注射或者连续滴注)和给药的时间表(在一定时间内的给药次数)。

本发明的偶联物同样可以以单位剂量的形式给药，这里的“单位剂量”是指一个病人一次给药的剂量，单位剂量的药物可以简单方便的包装和使用，单位剂量的药物是保持物理和化学稳定的活性偶联物本身，或者是像后面介绍的药学上可接受的混合物。典型的一天的剂量范围从 0.01 到 100mg 每千克体重。一般而言，人每天的单位剂量范围从 1 到 3000mg。推荐的单位剂量是 1mg 到 500mg， 每天给药四次，或者 10mg 到 500mg，每天一次。本发明的偶联物可以通过加入一种或多种药学上可接受的辅料，制成

药物制剂。此单位剂量的药物可以用于口服给药，比如是片剂，简单的胶囊或软胶囊；或鼻内给药，比如粉末状，滴鼻剂，或喷雾剂；或者通过皮肤给药，比如软膏剂，乳膏剂，洗液，凝胶剂或喷雾剂或皮肤贴片。药剂可以方便的以单位剂量的形式给药，且以任何已知的制药方法制得，比如 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005 年.中所述的方法。

包含本发明的化合物的药物剂型包括药物组合物首选口服或非肠道给药方式。对于口服给药剂型，如片剂，粉剂，胶囊剂，片剂(锭剂)等等可以包含一种或多种以下原料或有类似性质的其它化合物：粘合剂，比如微晶纤维素或黄耆胶；稀释剂，比如淀粉或乳糖；分散剂，比如淀粉和纤维素衍生物；润滑剂，比如硬脂酸镁；助流剂，比如二氧化硅胶体；甜味剂，比如蔗糖或糖精；增味剂，比如薄荷或水杨酸甲酯。胶囊可以是硬胶囊或软胶囊的形式，一般由明胶混合物选择性的与塑化剂混合，淀粉胶囊也是如此。另外，单位剂量的物理形式可以通过加入多种不同的原料而改变，例如，糖衣，虫胶或肠溶剂。其它的口服剂型如糖浆或酏剂可以含有甜味剂，防腐剂，颜料，着色剂和调味剂。另外，活性化合物可以通过不同的处理和配方，使其成为可快速溶解的剂型，缓慢释放剂型或缓释剂，其中的缓释剂是较好的剂型。片剂首选包含乳糖，玉米淀粉，硅酸镁，交联羧甲基纤维素钠，聚乙烯吡咯酮，硬脂酸镁，滑石等组合的剂型中。

非肠道给药的液体药剂包括无菌的水溶液或非水溶液，悬浮液和乳剂。液体药剂也可以含有粘合剂，缓冲液，防腐剂，螯合剂，甜味剂，调味剂和着色剂等等。非水溶剂包括乙醇，丙二醇，聚乙二醇，植物油比如橄榄油和有机脂类，比如油酸乙酯。水性溶剂包括了水，乙醇，缓冲试剂和盐的混合物，特别是，生物相容性的，可降解的丙交酯聚合物，丙交酯/乙交酯聚合物或者聚乙二醇/聚丙三醇共聚物可作为控制活性药物释放的辅料。静脉注射中的赋形剂可以包括液体和营养补充物，电解质补充物，以及基于林格氏葡萄糖的辅料，以及类似的辅料。对于本发明的活性药物其它可行的非肠道给药系统包括乙烯-醋酸乙烯酯共聚物微粒，植入式渗透泵和脂质体。

其它可行的给药方式包括吸入剂，吸入剂包括干粉剂，气雾剂和水滴剂。吸入剂可以是含有如聚氧乙烯-9-月桂醚，甘胆酸盐，脱氧胆酸盐或油

质的溶液，可以通过滴鼻剂，鼻内胶体的形式给药。口含药剂包括如锭剂，糖果锭剂等，可含有调味剂如蔗糖，阿拉伯胶以及其它辅料如甘胆酸盐等。栓剂适合于单位剂量的形式，以固体如可可油为载体，也可以加入水杨酸。皮肤局部用药剂型，以膏药，乳剂，洗液，贴片，凝胶，喷雾剂，气雾剂或油剂为首选。凡士林，羊毛脂，聚乙二醇，醇类以及它们的混合物可以作为药物载剂。皮肤给药的剂型可以是贴片，乳剂，缓冲溶液，溶解或分散在聚合物或粘合剂中。

特别地，本发明的偶联物可以与其它的已知或未知的治疗药物，如化疗药物，放射疗法，免疫疗法药物，自身免疫疾病药物，抗感染药物或其它抗体药物偶联物共同作用，达到协同效果。协同药物或放射治疗可以在本发明的偶联物给药之前或之后给药或施行。可以是在服用本发明的偶联物之前或之后 1 小时，12 小时，一天，一星期，一个月，也可以是几个月。

在其它的实施方式中，起协同作用的药物包括但不限于:

1). 化疗药物: a). 烷基化试剂：比如 [氮芥: (苯丁酸氮芥，环磷酰胺，异环磷酰胺，氮芥，美法仑，氯乙环磷酰胺); 亚硝基脲: (卡莫司汀，洛莫司汀); 烷基磺酸盐: (白消安, 苏消安); 三氮烯类: (达卡巴嗪); 含铂化合物: (卡铂，顺铂，奥沙利铂)]; b). 植物生物碱: 比如 [长春花生物碱: (长春碱，长春新碱，长春地辛，长春瑞滨); 紫杉烷类化合物: (紫杉醇，泰素帝)]; c). DNA 拓扑异构酶抑制剂: 比如 [表鬼臼树脂: (9-氨基喜树碱, 喜树碱，克立那托，足叶乙甙，磷酸依托泊苷，伊立替康，替尼泊甙，拓扑替康,); 丝裂霉素：(丝裂霉素 C)]; d).抗代谢药物：如{ [抗叶酸：二氢叶酸还原酶抑制剂：(甲氨蝶呤，三甲曲沙)；IMP 脱氢酶抑制剂(霉酚酸，甲酰胺基噻唑，利巴韦林，EICAR)；核糖核苷酸还原酶抑制剂(羟基脲，去铁胺)]；[嘧啶类似物：尿嘧啶类似物：(5-氟尿嘧啶，去氧氟尿苷，雷替曲塞(拓优得))；胞嘧啶类似物：(阿糖胞苷，阿糖胞苷，氟达拉滨)；嘌呤类似物：(硫唑嘌呤，巯基嘌呤，鸟嘌呤)]}; e). 激素类：如{受体拮抗剂：[抗雌激素：(甲地孕酮，雷洛昔芬，他莫昔芬)；LHRH 激动剂：(戈舍瑞林，醋酸亮丙瑞林)；抗雄激素：(比卡鲁胺，氟他胺)]；维甲酸/三角肌：[维生素 D3 类似物(CB 1093，EB 1089 KH 1060，胆钙化醇，维生素 D2)；光动力疗法：(对此，酞菁光敏剂，PC4，去甲氧甲素)；细胞因子：(干扰素-α，干扰素-γ，肿瘤坏死因子(肿瘤坏死因子)，人类的蛋白质含 TNF 域)]} f). 激酶抑制剂，如 bibw 2992(抗

EGFR / Erb2)，伊马替尼，吉非替尼，哌加他尼，索拉非尼，达沙替尼，舒尼替尼，厄洛替尼，尼罗替尼，拉帕替尼，阿西替尼，帕唑帕尼，颇纳替尼，凡德他尼，氟马替尼，e7080(抗 VEGFR2)，莫立替尼，美迪替尼，普纳替尼(ap24534)，HQP1351，巴非替尼(INNO-406)，波舒替尼(SKI-606)，苏尼替尼，卡博替尼，沃利替尼，维莫德吉，Iniparib，鲁索利替尼，CYT387，阿西替尼，tivozanib，贝伐单抗，索拉非尼，曲妥珠单抗，西妥昔单抗，兰尼单抗，帕尼单抗，ispinesib；g).其它类：如吉西他滨，epoxomicins(例如来那度胺)，硼替佐米沙利度胺，来那度胺，，泊马度胺，托舍多特，zybrestat，PLX4032，sta-9090，Stimuvax，allovectin-7，xegeva，Provenge，Yervoy，异戊二烯化抑制剂(如洛伐他汀)，多巴胺能神经毒素(如 1-甲基-4-苯基吡啶离子)，细胞周期抑制剂(如星形孢菌素)，放线菌素(如放线菌素 D，更生霉素)，平阳霉素(如博莱霉素博莱霉素 A2，B2，培洛霉素)，蒽环类抗生素(如红霉素，阿霉素(阿霉素)，伊达比星，表阿霉素，吡柔比星，佐柔比星，米托蒽醌，MDR 抑制剂(如维拉帕米)，Ca^{2+} ATP 酶抑制剂(如毒胡萝卜素)，组蛋白去乙酰化酶抑制剂(伏立诺他，罗米地辛，帕比司他，丙戊酸，莫提诺他(MGCD0103)，belinostat，PCI-24781，恩替诺特，SB939，resminostat，givinostat，AR-42，一种，萝卜硫素，曲古抑菌素 A)；毒胡萝卜素，塞来昔布，格列酮类，表没食子儿茶素没食子酸酯，5 双硫仑，salinosporamide A.

2). 抗自身免疫病剂包括，但不限于:环孢素，环孢素 A，硫唑嘌呤，氨基己酸，溴隐亭，苯丁酸氮芥，氯喹，环磷酰胺，糖皮质激素(如激素类药，倍他米松，布地奈德，氟尼缩松，氟替卡松丙酸酯，氢化可的松，地塞米松，氟可龙丹那唑，曲安奈德，丙酸倍氯米松)，脱氢表雄酮，依那西普，羟氯喹，英夫利昔单抗，美洛昔康，甲氨蝶呤，霉酚酸酯，西罗莫司，他克莫司，强的松

3). 抗传染病剂包括，但不限于：a).氨基糖苷类：丁胺卡那霉素，武夷霉素，庆大霉素(奈替米星，西索米星，异帕米星)，潮霉素，卡那霉素(丁胺卡那霉素，阿贝卡星，氨基去氧卡那霉素，地贝卡星，妥布霉素)新霉素(新霉素 B，巴龙霉素，核糖霉素)，奈替米星，,大观霉素，链霉素，妥布霉素，甲基妥苏霉素；b). 酰胺醇类：叠氮氯霉素，氯霉素，氟甲砜霉素，甲砜霉素; c). 安沙霉素类：格尔德霉素，除莠霉素; d). 碳青霉烯类：比阿培南，多尼培南，厄他培南，亚胺培南/西司他丁，美罗培南，帕尼培南; e). 头孢

类：碳头孢烯(氯碳头孢)，头孢乙腈，头孢克洛，头孢拉定，头孢羟氨苄，头孢罗宁，头孢噻啶，头孢噻吩或头孢菌素，头孢氨苄，头孢来星，头孢孟多，头孢匹林，头孢三嗪，头孢氮氟，头孢西酮，头孢唑啉，头孢拉宗，头孢卡品，头孢达肟，头孢吡肟，头孢米诺，头孢西丁，头孢丙烯，头孢沙定，头孢替唑，头孢呋辛，头孢克肟，头孢地尼头孢妥仑，头孢吡肟，头孢他美，头孢甲肟，头孢地嗪，头孢尼西，头孢哌酮，头孢雷特，头孢噻肟，头孢替安，头孢唑兰，头孢氨苄，头孢咪唑，头孢匹胺，头孢匹罗，头孢泊肟，头孢丙烯，头孢喹肟，头孢磺啶，头孢他啶，头孢特仑，头孢布烯，头孢噻林，头孢唑肟，头孢，头孢曲松，头孢呋辛，头孢唑喃，头霉素(头孢西丁，头孢替坦，头孢美唑)氧头孢烯(氟氧头孢，拉氧头孢)；f). 糖肽：博来霉素，万古霉素(奥利万星，特拉万星)，替考拉宁(达巴万星) 雷莫拉宁，达托霉素；g). 甘氨酰：如替加环素；h). β-内酰胺酶抑制剂：青霉烷(舒巴坦，他唑巴坦)，克拉维烷(克拉维酸)；i). 林可酰胺类：克林霉素，林可霉素；j). 脂肽：达托霉素，A54145，钙依赖性抗生素(CDA)；k). 大环内酯类：阿奇霉素，喹红霉素喹红霉素喹红霉素，克拉霉素，地红霉素，红霉素，氟红霉素，交沙霉素，酮内酯类(泰利霉素，喹红霉素喹红霉素喹红霉素喹红霉素)麦迪霉素，美奥卡霉素，竹桃霉素，利福霉素(利福平，利福平，利福布汀，利福喷丁)，罗他霉素，罗红霉素，壮观霉素，螺旋霉素，他克莫司(FK506)，醋竹桃霉素，泰利霉素；l).单环 β-内酰胺抗生素：氨曲南，替吉莫南；m). 唑烷酮类：利奈唑胺；n). 青霉素类：阿莫西林，氨苄西林(匹氨西林，海他西林，巴氨西林，美坦西林，酞氨西林)叠氮西林，阿洛西林，青霉素，苄星青霉素，苯氧基苄星青霉素，氯甲西林，普鲁卡因青霉素，羧苄青霉素(卡茚西林)，邻氯青霉素，双氯青霉素，先锋霉素，氟氯西林，美西林(氮卓脒青霉素双酯)，美洛西林，甲氧西林，萘夫西林，苯唑西林，醋甲西林，青霉素，奈西林，青霉素，哌拉西林，苯丙西林，磺苄西林，替莫西林，替卡西林；o). 多肽：杆菌肽，多粘菌素 E，多粘菌素 B；p). 喹诺酮类药物：阿拉沙星，巴洛沙星，环丙沙星，克林沙星，达氟沙星，二氟沙星，依诺沙星，恩诺沙星，Floxin，加雷沙星，加替沙星，吉米沙星，格帕沙星，曲伐沙星卡诺，左氧氟沙星，洛美沙星，麻保沙星，莫西沙星，那氟沙星，诺氟沙星，奥比沙星，氧氟沙星，培氟沙星，曲伐沙星，格帕沙星，西他沙星，司帕沙星，替马沙星，妥舒沙星，曲伐沙星；q). 菌素：

普那霉素，奎奴普丁/达福普汀); r). 磺胺类药物：磺胺米隆，百浪多息，磺胺醋酰，磺胺甲，磺胺，柳氮磺胺吡啶，磺胺异噁唑，甲氧苄氨嘧啶，甲氧苄啶 - 磺胺甲基异噁唑(复方新诺明); s). 类固醇抗菌药物：如夫西地酸; t). 四环素类：强力霉素，金霉素，氯羟四环素，地美环素，赖甲环素，氯甲烯土霉素，美他环素，米诺环素，土霉素，青呗四环素，罗利环素，四环素，甘氨酰(如替加环素); u). 其他类型的抗生素：番荔枝科，肿凡纳明，细菌萜醇抑制剂(杆菌肽)，Dadal/ AR 抑制剂(环丝氨酸)，dictyostatin，海绵内酯，艾榴塞洛素，埃博霉素，乙胺丁醇，依托泊苷，法罗培南，夫西地酸，痢特灵，异烟肼，laulimalide，甲硝唑，莫匹罗星，mycolactones，NAM 合成抑制剂(如磷霉素)，呋喃妥因，紫杉醇，平板霉素，吡嗪酰胺，奎奴普丁/达福普汀，利福平(利福平)，他唑巴坦替硝唑，番荔枝内酯;

4). 抗病毒的药物: a). 进入/融合抑制剂：aplaviroc，马拉韦罗，维立韦罗，gp41 的(恩夫韦)，PRO140，CD4(Ibalizumab); b). 整合酶抑制剂：拉替拉韦，埃替拉韦，globoidnan A; c). 成熟抑制剂：贝韦立马，vivecon; d). 神经氨酸酶抑制剂：奥司他韦，扎那米韦，帕拉米韦; e). 核苷和核苷酸：阿巴卡韦，阿昔洛韦，阿德福韦，氨多索韦，apricitabine，溴夫定，西多福韦克拉夫定，右艾夫他滨，去羟肌苷(DDI)，艾夫他滨，恩曲他滨(FTC)，恩替卡韦，泛昔洛韦，氟脲嘧啶(5-FU)，3'-氟取代的 2'，3'-二脱氧核苷类似物(例如，3'-氟-2'，3'-二脱氧胸苷(FLT)和 3'-氟-2'，3'-双脱氧(FLG)福米韦生，更昔洛韦，碘苷，拉米夫定(3TC)，L-核苷(如 β-L-胸苷，β-L-2'-脱氧胞苷)，喷昔洛韦，Racivir，利巴韦林，stampidine，司他夫定(d4T 的)，他利韦林(伟拉咪定)，替比夫定，替诺福韦，伐昔洛韦三氟胸苷，缬更昔洛韦，扎西他滨(DDC)，齐多夫定(AZT); f). 非核苷类：金刚烷胺，ateviridine，卡普韦林，二芳基嘧啶 (依曲韦林，利匹韦林)，地拉韦啶，二十二烷醇，乙米韦林，依法韦仑，膦甲酸(磷酰基甲酸)，咪喹莫特，干扰素 α，洛韦胺，洛德腺苷，他巴唑，奈韦拉平，NOV-205，聚乙二醇干扰素 α，鬼白毒素，利福平，金刚乙胺，瑞喹莫德(R-848)，醋胺金刚烷; g). 蛋白酶抑制剂：安普那韦，阿扎那韦，博赛泼维，达芦那韦，福沙那韦，茚地那韦，洛匹那韦，奈非那韦，pleconaril，利托那韦，沙奎那韦，特拉匹韦(VX-950)替拉那韦; h). 其他类型的抗病毒的药物：抗体酶，阿比朵尔，calanolides A，浅蓝菌素，蓝藻-N，二芳基嘧啶，表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)，膦甲酸钠，格瑞

弗森，他利韦林(伟拉咪定)，羟基脲，KP-1461，米替福新，普来可那立，合成抑制剂，利巴韦林，seliciclib；

5). 其它免疫治疗药物：如咪喹莫特，干扰素(如α，β)，粒细胞集落刺激因子，细胞因子，白细胞介素(IL-1～IL-35)，抗体(例如曲妥单抗，帕妥珠单抗，贝伐单抗，西妥昔单抗，帕尼单抗，英夫利昔单抗，阿达木单抗，巴利昔单抗，达克珠单抗，奥马珠单抗)，蛋白结合药物 (例如，Abraxane)，一种抗体结合药物选自卡奇霉素衍生物，美登素衍生物(DM1 and DM4)，CC-1065 和多卡霉素小沟剂，有效的紫杉醇衍生物，阿霉素，阿里他汀抗有丝分裂药物(如曲妥珠单抗-DM1，Inotuzumab 单抗，brentuximab vedotin，Glembatumumab vedotin，lorvotuzumab mertansine，AN-152 LMB2，TP-38，VB4-845，Cantuzumabmertansine，AVE9633，SAR3419，CAT-8015(抗-CD22)，IMGN388，IMGN529，IMGN853，milatuzumab-阿霉素，SGN-75(抗 CD70)，抗-CD22-MCC-DM1)。

作为本发明更进一步的目标，本发明还涉及其中的抗体药物共轭体的制备过程。本发明的共轭体可以用多种该领域的熟知方法制备，例如，本发明共轭体中的抗有丝分裂剂可以按照下述方法或改进的下述方法合成。对于该领域的专业人士来说，这些改进方法都是很容易从科技文献中获得的、人所共知的、很明显的方法。特别是，这些方法在《Comprehensive Organic Transformations》(R.C. Larock 著，1999，Wiley-VCH 出版，第 2 版)一书中有很多的介绍。

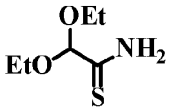
在本文描述的反应过程中，有时会有必要保护可能参与反应的活性官能团，例如羟基、氨基、亚氨基、巯基和羧基，以避免副反应的发生。常规保护官能团的常见使用方法可参考 P. G. Wuts 和 T.W. Greene 所著的《Greene's Protective Groups in Organic Synthesis》(2006 年，Wiley-Interscience 出版，第 4 版)。有的反应可以在适当的含有酸或碱的溶液中进行。这类反应的酸、碱和溶剂并没有特别的限制，只要没有不利的影响，任何常规的酸、碱以及溶剂都可以在这里使用。而且，这些反应可以在广泛的温度范围内进行。不过，总的来说，比较容易操作的反应温度通常在-80°C to 150°C 之间(在室温与 100°C 之间更好)。反应所需的时间同样可以有很大的变化范围，当然，这取决于多种因素，尤其是反应温度和所用溶剂的性质。一般地说，对于比较理想的反应来说，3 至 20 小时的反应时间比较合适。

反应结束后的操作处理可以按常规方法进行。例如，可以通过把溶剂从反应体系中蒸掉的方式回收反应产物。或者，如果必要的话，在把溶剂蒸出后，可以先把剩余物倒入水中，再用与水不互溶的有机溶剂萃取。最后，在把萃取溶剂蒸走以后，就可以获得反应产物。此外，如果有更高纯度的需要，还可通过各种常见的方法进一步纯化，例如重结晶、沉降或各种色谱层析的方法。一般地说，柱层析和制备薄板层析的方法更为常用。

实施例

本发明用下面的实施例进一步地说明，这些实施例的内容并不旨在限制本发明的范围。在实施例中细胞系，除了特殊说明之外，均是依据美国标准培养物保藏中心(ATCC)、德国菌种保藏中心(DSMZ)或中国科学院上海细胞培养中心规范的条件保存。除了特殊说明外，细胞培养试剂来自于 Invitrogen 公司。所有的无水试剂均由商业途径获得，并储存于 Sure-Seal 密封瓶中。其他的试剂和溶剂均按照最高规格购买，使用时未经进一步的处理。用 Varain PreStar HPLC 进行制备 HPLC 分离。NMR 谱在 Bruker 500MHz 仪器上获得，化学位移以 ppm 为单位，四甲基硅烷为参考(0 ppm)，耦合常数(J)的单位是 Hz。质谱数据在 Waters Xevo Q Tof 质谱仪(连接 Waters Acquity UPLC 高效液相色谱仪和 TUV 检测器)上获得。

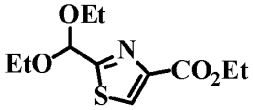
实施例 **1** 化合物 **1** 的合成



1

在 10-L 反应釜中将二乙氧基乙腈(1.00 k g， 7.74 mol)溶解于甲醇(6.0 L)，在室温下加入$(NH_4)_2S$ (48% 水溶液， 1.41 k g， 9.29 mol)。釜内温度升至 33 °C 而后又降回室温。搅拌过夜后，浓缩反应液。向残留物中加入乙酸乙酯 (5 L)，用饱和 $NaHCO_3$ 溶液 (4 × 1.0 L)洗，水相用乙酸乙酯 (5 × 1.0 L)反萃。合并有机相，用饱和食盐水(3 L)洗，之后用无水硫酸钠干燥，过滤后减压浓缩。粗品用石油醚打浆，真空抽滤，收集固体并用石油醚洗涤。滤液浓缩后再用石油醚打浆，合并收集所得固体，总共得到 1.1 k g (87% 产率)目标产物，为白色或亮黄色固体。^{1}H NMR (500 MHz， $CDCl_3$) δ 7.81 (d， J = 71.1 Hz， 2H)， 5.03 (s， 1H)， 3.73 (dq， J = 9.4， 7.1 Hz， 2H)， 3.64 (dq， J = 9.4， 7.0 Hz， 2H)， 1.25 (t， J = 7.1 Hz， 6H)。

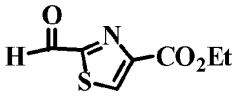
实施例 **2** 化合物 **2** 的合成



2

在 5-L 三颈圆底瓶上装备一个回流冷凝管和一个恒压滴液漏斗。在其中加入分子筛(3Å， 500 g)和硫酰胺 2 (350 g， 2.14 mol)的乙醇溶液(3 L)，30 分钟内滴入 3-溴丙酮酸乙酯 (纯度 80%， 404 mL， 2.57 mol)。滴加过程中内温稍有上升，随后将反应液加热至回流并搅拌 30 分钟。将反应液冷却至室温后用硅藻土过滤除去不溶物，并用乙酸乙酯洗滤饼。滤液浓缩后的粗产物和硅胶(1.5 k g)混合拌匀，通过硅胶柱(10 k g)柱层析(10-20%乙酸乙酯/石油醚梯度洗脱)纯化，得到棕色油状物，为目标化合物(509 g， 92%产率)。

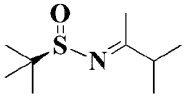
实施例 **3** 化合物 **3** 的合成



3

将缩醛 (300 g， 1.16 mol) 的丙酮 (3.0 L) 溶液加热至回流，在 1.0 小时内滴加 4N HCl 溶液(250 mL)。TLC 显示起始原料反应完全。反应液减压浓缩后分离两相。有机相加入乙酸乙酯稀释(1.5 L)，并依次用饱和 $NaHCO_3$ 水溶液 (1.0 L)、水 (1.0 L) 和食盐水 (1.0 L)洗， 然后用无水硫酸钠干燥。合并所有的水相并用乙酸乙酯反萃，并用无水硫酸钠干燥有机相。滤出干燥剂后浓缩有机相，所得粗产品用石油醚/乙酸乙酯(5：1) 溶液打浆，析出的固体经真空过滤收集，并用石油醚/乙酸乙酯(10：1) 溶液洗。滤液浓缩用柱层析纯化(0-15%乙酸乙酯/石油醚)，所有固体合并，得目标产物 40 g (43% 产率)，为白色或亮黄色固体。^{1}H NMR (500 MHz， $CDCl_3$) δ 10.08 – 10.06 (m， 1H)， 8.53 – 8.50 (m， 1H)， 4.49 (q， J = 7.1 Hz， 2H)， 1.44 (t， J = 7.1 Hz， 3H)。 MS ESI m/z $C_7H_8NO_3S$ $[M+H]^+$ ：计算值 186.01，实测值 186.01。

实施例 **4** 化合物 **4** 的合成

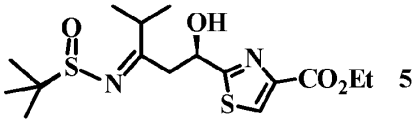


4

在 N_2 保护下室温下向(S)- 叔丁基亚磺酸胺(100 g，0.825 mol)的四氢呋喃(1 L) 溶液中加入 $Ti(OEt)_4$ (345 mL， 1.82 mol)和 3-甲基-2-丁酮 (81 mL，

0.825 mol)。加热反应液，回流 16 小时后冷却至室温，然后倒入冰水(1L)。过滤并且用乙酸乙酯洗滤饼。分离滤液中的有机相，无水硫酸钠干燥后减压浓缩，其残留物减压蒸馏(15-20 torr，95 °C)得目标产物 **4** (141 g，90% 产率)，为黄色油状物。^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3) δ 2.54 – 2.44 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 1.17 (s, 9H), 1.06 (dd, J = 6.9, 5.1 Hz, 6H)。MS ESI m/z $C_9H_{19}NaNOS$ $[M+Na]^+$：计算值 212.12，实测值 212.11。

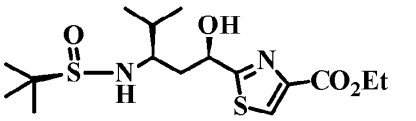
实施例 **5** 化合物 **5** 的合成



5

在 N_2 保护下，于-78 °C 下向二异丙胺 (264 mL, 1.87 mol)的四氢呋喃溶液中加入正丁基锂溶液(2.5 M, 681 mL, 1.70 mol)。反应在 30 分钟内升温至 0 °C 然后重新冷却至-78 °C，向其中加入化合物 10 (258 g，1.36mol)并用四氢呋喃 (50 mL)冲洗。搅拌 1 小时后滴加 $ClTi(O^iPr)_3$ (834 g，3.17 mol)的四氢呋喃 (1.0 L) 溶液。滴加完成 1 小时后再缓慢滴入化合物 **4** (210 g，1.13 mol)的四氢呋喃 (500 mL)溶液，耗时 1 小时。所得溶液在-78 °C 继续搅拌 3 小时。TLC 监测反应进行完全后，用乙酸和四氢呋喃(体积比 1：1，300 mL)的混合液淬灭反应，而后将反应液倒入盐水(2 L)，用乙酸乙酯萃取(8 × 1L)。有机相用水和食盐水洗，无水硫酸钠 干燥，过滤并浓缩。残留物经柱层析纯化(二氯甲烷/乙酸乙酯/石油醚 2:1:2)，得化合物 **5** (298 g，74% 产率)，为无色油状物。^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ 8.13 (s, 1H), 6.63 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.20 – 5.11 (m, 1H), 4.43 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.42 – 3.28 (m, 2H), 2.89 (dt, J = 13.1, 6.5 Hz, 1H), 1.42 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.33 (s, 9H), 1.25 – 1.22 (m, 6H)。MS ESI m/z $C_{16}H_{26}NaN_2O_4S_2$ $[M+Na]^+$：计算值 397.13，实测值 397.11。

实施例 **6** 化合物 **6** 的合成

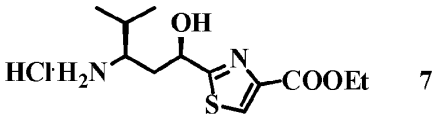


6

将化合物 **5** (509 g, 1.35 mol) 溶于四氢呋喃 (200 mL), 冷却至 -78 °C，向其中缓慢加入 $Ti(OEt)_4$ (570 mL, 2.72 mol)，加完后搅拌 1 小时。然后在 90 分钟内分批加入 $NaBH_4$ (51.3 g, 1.36 mol)，反应在-78 °C 搅拌 3

小时。TLC 监测发现起始原料仍有剩余。缓慢加入乙醇 (50 mL)，继续搅拌 1.5 小时后将反应液倒入饱和食盐水 (2 L，含 250 mL 乙酸)，升至室温。经过硅藻土过滤，分离有机相。水洗、饱和食盐水洗、无水硫酸钠干燥有机相、过滤并浓缩。残留物经柱层析 (乙酸乙酯/石油醚 1：1)纯化得化合物 **6** (364 g，71% 产率)，为白色固体。^{1}H NMR (500 MHz，$CDCl_3$) δ 8.10 (s，1H)，5.51 (d，J = 5.8 Hz，1H)，5.23 – 5.15 (m，1H)，4.41 (q，J = 7.0 Hz，2H)，3.48 – 3.40 (m，1H)，3.37 (d，J = 8.3 Hz，1H)，2.29 (t，J = 13.0 Hz，1H)，1.95 – 1.87 (m，1H)，1.73 – 1.67 (m，1H)，1.40 (t，J = 7.1 Hz，3H)，1.29 (s，9H)，0.93 (d，J = 7.3 Hz，3H)，0.90 (d，J = 7.2 Hz，3H)。MS ESI m/z ：计算值 $C_{16}H_{28}NaN_2O_4S_2$ $[M+Na]^+$ ：399.15，实测值 399.14。

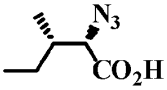
实施例 **7**　　化合物 **7** 的合成



7

在 0 °C 下于化合物 **6** (600 g，1.60 mol)的乙醇(590 mL)溶液中加入 4 N HCl 的 1，4-二氧六环(590 mL)溶液。反应逐渐升至室温后搅拌 2.5 小时。过滤收集析出的白色固体并用乙酸乙酯洗。滤液浓缩后用乙酸乙酯打浆。合并两次获得的白色固体，共 446 g (90% 产率)。

实施例 **8**　　化合物 **8** 的合成

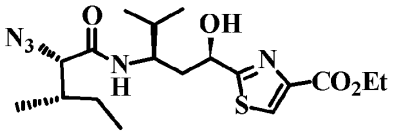


8

将叠氮化钠(740 g，11.4 mol)溶于水(2.0 L)后加入二氯甲烷 (2.0 L)并冷却至 0 °C，向该溶液中加入 Tf_2O(700 mL，4.10 mol)，历时 1.5 小时。加完后在 0 °C 下继续搅拌 3 小时。分离出有机相，水相用二氯甲烷萃取(2 × 500 mL)。合并有机相，用饱和 $NaHCO_3$ (3 × 1.0 L)洗。室温下将此二氯甲烷溶液加入到 (L)-异亮氨酸 (300 g，2.28 mol)，碳酸钾(472 g，3.42 mol)，五水硫酸铜(5.7 g，22.8 mmol)的混合甲醇/水(1：1 v/v，6.0 L)溶液中。加料过程中反应体系内温度会稍微升高。混合液在室温下搅拌 16 小时，减压蒸去溶剂，水相用浓盐酸(大约 280 mL)酸化至 pH 6-6.5 (约 280 mL)，然后用磷酸盐缓冲液稀释(0.25 M，pH 6.2，6.0 L)，用乙酸乙酯 (6 × 2.0 L)洗去磺酸胺副产物。水相用浓盐酸(大约 400 mL)酸化至 pH 3 后用乙酸乙酯

(4 × 2.0 L)萃取。合并有机相，饱和食盐水洗(2.0 L)，无水硫酸钠干燥，过滤浓缩得产物 **8** (320 g，89% 产率)，为亮黄色油状物。^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 12.01 (s, 1H), 3.82 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 2.00 (ddd, J = 10.6, 8.6, 5.5 Hz, 1H), 1.54 (dqd, J = 14.8, 7.5, 4.4 Hz, 1H), 1.36 – 1.24 (m, 1H), 1.08 – 0.99 (m, 3H), 0.97 – 0.87 (m, 3H)。

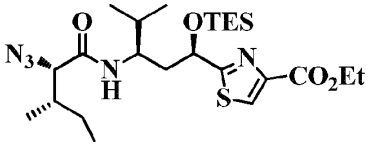
实施例 **9** 化合物 **9** 的合成



9

将 Azido-Ile-OH (**8**, 153 g, 0.97 mol) 溶于四氢呋喃 (1.5 L) 并冷却至 0 °C, 依次加入 NMM (214 mL, 1.94 mol) 和氯甲酸异丁酯(95 mL, 0.73 mol)。在 0 °C 搅拌 1 小时后分批加入化合物 **7** (150 g, 0.49 mmol) 。在 0 °C 搅拌 30 分钟后，逐渐升至室温并继续搅拌 2 小时。反应在 0 °C 下加冰水淬灭并用乙酸乙酯萃取三遍。合并有机相用 1N HCl 洗, 饱和 $NaHCO_3$ 洗和食盐水洗，无水硫酸钠干燥。过滤浓缩，残留物经柱层析(0-30% 乙酸乙酯/石油醚) 纯化得到白色固体(140 g, 70% 产率)。 ^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3) δ 8.14 (s, 1H), 6.57 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.91 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 4.44 (dd, J = 13.2, 6.3 Hz , 2H), 4.08 – 3.95 (m, 2H), 2.21 (dd, J = 24.4, 11.5 Hz, 2H), 1.90 – 1.79 (m, 3H), 1.42 (t, J = 6.6 Hz, 3H), 1.37 – 1.27 (m, 2H), 1.11 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.01 – 0.94 (m, 9H)。MS ESI m/z $C_{18}H_{30}N_5O_4S$ $[M+H]^+$ ：计算值 412.19, 实测值 412.19。

实施例 **10** 化合物 **10** 的合成

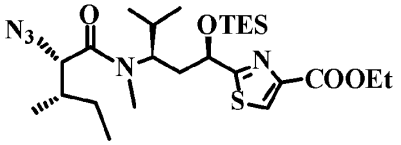


10

在 0 °C 下依次向化合物 **9** (436 g, 1.05 mol)的 二氯甲烷 (50 mL) 溶液中加入咪唑(94 g, 1.37 mmol)和三乙基氯硅烷(222 mL, 1.32 mol) 。反应液历时 1 小时升至室温后，继续搅拌 1 小时。加入饱和食盐水淬灭，分出有机相，水相用乙酸乙酯萃取。合并后的有机相经干燥、过滤、浓缩后用柱层析(15-35% 乙酸乙酯 / 石油醚)纯化得产物 **10**(557.4 g , 95% 产率)，为无色油状物。^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.12 (s, 1H), 6.75 (d,

J = 8.0 Hz, 1H), 5.20 – 5.12 (m, 1H), 4.44 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 4.06 – 3.97 (m, 1H), 3.87 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 2.14 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 2.01 – 1.91 (m, 3H), 1.42 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.34 – 1.25 (m, 2H), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.00 – 0.93 (m, 18H), 0.88 (dd, J = 19.1, 6.8 Hz, 6H)。MS ESI m/z $C_{24}H_{44}N_5O_4SSi$ $[M+H]^+$：计算值 526.28，实测值 526.28。

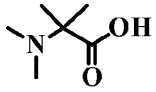
实施例 **11** 化合物 **11** 的合成



11

在 0 °C 下向化合物 **10** (408 g, 0.77 mol)和碘甲烷(145 mL, 2.32 mol)的四氢呋喃 (4 L)溶液中加入氢化钠(60%, 62.2 g, 1.55 mol)。将所得的反应液在 0 °C 搅拌过夜，而后倒入激烈搅拌的冰水饱和氯化铵(5 L)溶液中。用乙酸乙酯 (3 × 500 mL) 萃取。合并后的有机相经干燥、过滤、浓缩后用柱层析(15-35% 乙酸乙酯 / 石油醚)纯化得产物 **11** (388 g, 93% 产率)，为亮黄色油状物。^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09 (s, 1H), 4.95 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 4.41 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.56 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.27 – 2.06 (m, 4H), 1.83 – 1.70 (m, 2H), 1.41 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.29 (ddd, J = 8.9, 6.8, 1.6 Hz, 3H), 1.01 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.96 (dt, J = 8.0, 2.9 Hz, 15H), 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.7 Hz, 3H)。MS ESI m/z $C_{25}H_{46}N_5O_4SSi$ $[M+H]^+$ ：计算值 540.30，实测值 540.30。

实施例 **12** 化合物 **12** 的合成

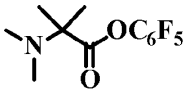


12

将 2-甲基丙氨酸(500 g, 4.85 mol), 甲醛 (37%水溶液, 1.0 L, 12.1 mol)和甲酸(1.0 L)的混合液加热至回流 (80 °C)。搅拌 3.0 小时后冷却至室温，加入 6 N HCl (850 mL)，而后浓缩反应液。过滤收集所得的固体并用乙酸乙酯洗三遍 (1.0 L)。将固体溶于水 (1.5 L) 并用 4N NaOH (约 1.0 L)中和至 pH 7。浓缩并用乙醇(2.0 L)共沸以除水。残留物用甲醇 (2.0 L)溶解，过滤除去 NaCl 固体，乙酸乙酯洗。滤液浓缩后得白色固体 639.2 g, 包含有

少量 NaCl，可直接使用不用进一步纯化。

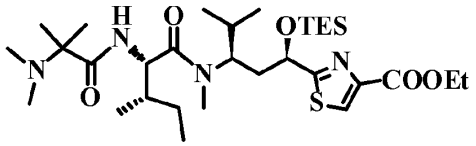
实施例 **13** 化合物 **13** 的合成



13

向化合物 **12** (97 g， 0.74 mol)的乙酸乙酯 (1 L)溶液中加入五氟苯酚 (163 g， 0.88 mol)和 DIC (126 mL， 0.81 mol)。反应室温搅拌 24 小时后用硅藻土过滤，用 10 mL 乙酸乙酯洗。滤液不经进一步纯化直接使用。

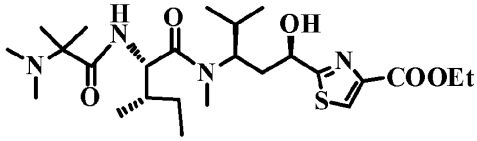
实施例 **14** 化合物 **14** 的合成



14

向上述五氟苯基酯 **13** 的乙酸乙酯溶液中加入化合物 **11** (200 g， 0.37 mol)和干的 Pd/C (10 wt%， 10 g)。反应液在氢气(1 atm)环境中搅拌 27 小时。硅藻土过滤，乙酸乙酯洗。合并的有机相浓缩后经柱层析(0-5% 甲醇/乙酸乙酯)纯化得化合物 **14** (184 g， 79% 产率)。MS ESI m/z $C_{31}H_{58}N_4O_5SSi$ $[M+H]^+$ ：计算值 627.39， 实测值 627.39。

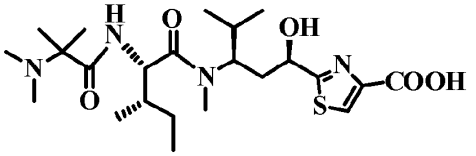
实施例 **15** 化合物 **15** 的合成



15

将化合物 **14** (200 g， 0.32 mmol) 溶于乙酸/水/四氢呋喃 (v/v/v 3：1：1， 638 mL)混合溶液中，室温搅拌 4 天。反应液浓缩后用甲苯共沸带干，此步骤重复两遍后得化合物 **15**， 直接用于下一步反应。MS ESI m/z $C_{25}H_{45}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ ：计算值 513.30， 实测值 513.30。

实施例 **16** 化合物 **16** 的合成

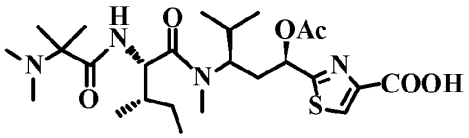


16

在 0 °C 下将氢氧化锂(0.4 N， 600 mL， 2.55 mol)的水溶液加入化合物 **15**(160 g， 0.319 mol， 1.0 eq.)的甲醇 (1.2 L) 溶液中。反应在室温搅拌 2 小时后浓缩。经柱层析 (100%二氯甲烷至 80：20：1 二氯甲烷/甲醇/氨水)得化合物 **16**(140 g，两步产率 91%) 为无定形白色固体。MS ESI m/z

$C_{23}H_{40}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ ：计算值 485.27， 实测值 485.27。

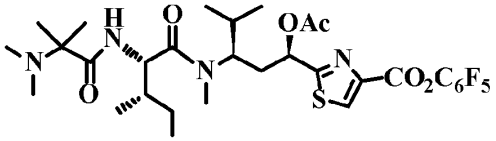
实施例 **17** 化合物 **17** 的合成



17

将化合物 **16** (143 g， 0.30 mol)和 DMAP (0.36 g， 2.95 mmol)溶于无水四氢呋喃 (1.4 L)与无水 DMF (75 mL)的混合溶液中。冷却至 0 °C，加入三乙胺 (82.2 mL， 0.59 mmol)和乙酸酐(56 mL， 0.59 mmol)。反应逐渐升至室温并搅拌 24 小时。浓缩后经柱层析(5-50% 甲醇/二氯甲烷) 纯化得化合物 **17** (147 g， 95%产率)，为无定形白色固体。^{1}H NMR (500 MHz， DMSO) δ 8.37 (s， 1H)， 7.63 (d， J = 9.5 Hz， 1H)， 5.54 (dd， J = 11.2， 2.5 Hz， 1H)， 4.64 (dd， J = 9.4， 7.2 Hz， 1H)， 4.34 (s， 1H)， 2.95 (s， 3H)， 2.27-2.19 (m， 1H)， 2.19-2.12 (m， 1H)， 2.11 (s， 6H)， 2.08 (s， 3H)， 1.82-1.66 (m， 2H)， 1.54-1.42 (m， 1H)， 1.10 (s， 3H)， 1.06 – 0.95 (m， 1H)， 0.99 (s， 3H)， 0.91 (d， J = 6.5 Hz， 3H)， 0.88 (d， J = 6.7 Hz， 3H)， 0.83 (t， J = 7.4 Hz， 3H)， 0.65 (d， J = 6.6 Hz， 3H)。^{13}C NMR (126 MHz， DMSO) δ 175.35， 172.78， 169.70， 169.58， 162.23， 148.03， 128.29， 69.51， 63.00， 55.10， 52.37， 38.86， 36.46， 33.83， 29.25， 28.82， 23.64， 21.09， 20.60， 19.96， 19.40， 18.38， 15.65， 10.77。MS ESI m/z $C_{25}H_{44}N_4O_6S$ $[M+H]^+$ ：计算值 527.3， 实测值 527.4。

实施例 **18** 化合物 **18** 的合成

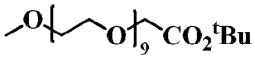


18

在室温下，向化合物 **17**(41.0 g，77.9 mmol，1.0 eq)的无水二氯甲烷(600 mL)溶液中加入 EDC·HCl(44.8 g，233 mmol，3.0 eq)和五氟苯酚(35.9 g，194 mmol，2.5 eq)。将混合物在室温下搅拌 2 小时，用盐水(300 mL)洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤、浓缩，并通过硅胶柱层析法(25-100% 乙酸乙酯/正己烷洗脱)纯化，得到白色固体(43.0 g，产率 80%)。^{1}H NMR (500 MHz， DMSO) δ 9.06 (s， 1H)， 7.65 (d， J = 9.4 Hz， 1H)， 5.60 (dd， J = 11.0， 2.8 Hz， 1H)， 4.64 (dd， J = 9.4， 7.2 Hz， 1H)， 4.35 (s， 1H)， 2.97 (s，

3H)，2.34 – 2.16 (m，2H)，2.12 (s，6H)，2.11 (s，3H)，1.88 – 1.65 (m，2H)，1.57 – 1.37 (m，1H)，1.11 (s，3H)，1.06 – 0.96 (m，1H)，1.00(s，3H)，0.92 (d，J = 6.5 Hz，3H)，0.88 (d，J = 6.7 Hz，3H)，0.83 (t，J = 7.4 Hz，3H)，0.66 (d，J = 6.6 Hz，3H)。^{13}C NMR (126 MHz，DMSO) δ 175.24，172.78，171.75，169.81，156.32，141.69，141.56，139.71，138.59，136.60，134.68，69.49，63.11，55.16，52.41，38.83，36.40，33.64，29.42，28.82，23.62，21.01，20.55，19.93，19.39，18.35，15.62，10.73。MS ESI m/z $C_{31}H_{42}F_5N_4O_6S$ $[M+H]^+$：计算值 693.3，实测值 693.3。

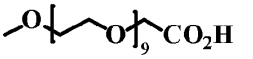
实施例 **19** 化合物 **19** 的合成



19

在室温下将钠氢(60%，8 g，200 mmol)加入 HO-PEG_9-OMe(42.8 g，100 mmol)的四氢呋喃(1L)的溶液中。搅拌 30 分钟后，将溴乙酸叔丁酯(48.8 g，250 mmol)加入，在室温下搅拌 1 小时，然后倒入冰水中，用二氯甲烷萃取，有机层用饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥。硅胶柱层析纯化(0-5%甲醇/二氯甲烷)得到化合物 **19**，为黄色油状物状物(32 g，59%产率)。

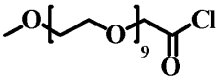
实施例 **20** 化合物 **20** 的合成



20

将化合物 **432**(40 g，73.8 mmol)溶解在二氯甲烷(400 mL)中，然后加入甲酸(600 mL)，25 °C 搅拌过夜。减压蒸馏除去所有的挥发物，得到黄色油状物(36 g，约 100%产率)。ESI m/z $C_{21}H_{43}O_{12}$ $[M+H]^+$：计算值 487.27，实测值 487.24。

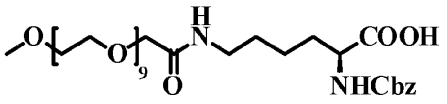
实施例 **21** 化合物 **21** 的合成



21

将化合物 **20**(36 g，73.8 mmol)溶解在二氯甲烷(640 mL)中，依次加入草酰氯(100 mL)和 DMF(52 g, 0.74 mmol)。将得到的溶液在室温下搅拌 4 小时，减压蒸馏除去所有的挥发物，得到黄色油状物。

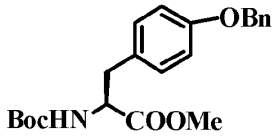
实施例 **22** 化合物 **22** 的合成



22

将 Z-L-Lys-OH(41.4 g，147.6 mmol)、碳酸钠(23.4 g，221.4 mmol)和 NaOH(5.9 g，147.6 mmol)溶解于水(720 mL)中，冷却至 0 °C，然后加入化合物 **21**(37.2 g，73.8 mmol)的四氢呋喃溶液(20 mL)。得到的混合物在室温下搅拌 1 小时，减压蒸馏除去 THF，在冰浴下用浓盐酸调节至 pH 3。溶液用二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，得到黄色油状物(55 g，99%产率)。ESI m/z $C_{35}H_{60}N_2O_{15}$ $[M+H]^+$：计算值 749.40， 实测值 749.39。

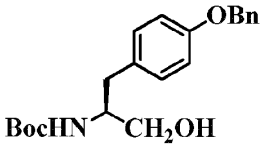
实施例 **23** 化合物 **23** 的合成



23

向 Boc-L-酪氨酸甲酯 (2.2 kg， 7.45 mol)， 碳酸钾(1.54 kg， 11.2 mol)和碘化钾 (48 g， 0.29 mol)的乙腈(8.8 L)溶液中缓慢加入苄基溴 (1.33 kg，7.78 mol)。室温搅拌过夜，加入水 (8 L)溶解固体，用乙酸乙酯 (2×4 L) 萃取。合并后的有机相用水(4 L)洗，饱和食盐水(4 L)洗，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩后用石油醚(20 L)打浆，得白色固体 **98** (2.73 kg， 95%产率)。^{1}H NMR (500 MHz， $CDCl_3$) δ 7.43 (d， J = 7.0 Hz， 2H)， 7.38 (t， J = 7.4 Hz，2H)， 7.32 (t， J = 7.2 Hz， 1H)， 7.04 (d， J = 8.5 Hz， 2H)， 6.91 (d，J = 8.6 Hz， 2H)， 5.04 (s， 2H)， 4.55 (d， J = 6.9 Hz， 1H)， 3.71 (s，3H)， 3.03 (qd， J = 14.0， 5.8 Hz， 2H)， 1.43 (s， 9H)。 MS ESI m/z $C_{22}H_{28}NO_5$ $[M+H]^+$：计算值 386.19， 实测值 386.19。

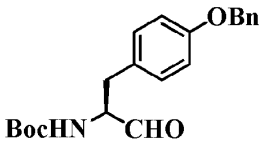
实施例 **24** 化合物 **24** 的合成



24

向 2.4 L 的乙醇和 2.4 L 的二氯甲烷的混合溶剂中加入 $NaBH_4$ (122 g，3.2 mol)和 LiCl (136 g， 3.2 mol)，冷却至 0 °C。加入化合物 **23** (616 g， 1.6 mol)的二氯甲烷(2.4 L)溶液，加毕，向反应液再加入 2.4 L 的二氯甲烷，自然升至室温，有大量气泡产生，搅拌过夜。将反应液用水(6 L)稀释，搅拌 30 分钟后，水相用二氯甲烷 (2 L × 2)萃取，合并有机相，用水(2 L)洗、盐水(2 L)洗，干燥过滤，浓缩得白色固体 542 g(产率 95%)。

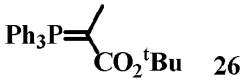
实施例 **25** 化合物 **25** 的合成



25

将草酰氯(1.02 kg，8.0 mol)溶解在二氯甲烷(4 L)中，冷却至-75 °C，滴加 DMSO(1.25 kg，16 mol)的二氯甲烷(400 mL)溶液，维持温度在-65 °C 以下，滴加完成后搅拌 30 分钟，再滴加化合物 **24**(1.90 kg，5.33 mol)的二氯甲烷(8 L)溶液，滴加完成后溶液温度升高至约-65 °C，搅拌 30 分钟后，继续滴加三乙胺(1.62 kg，16 mol)，维持温度在-50 °C 以下，滴加完成后搅拌 15 分钟。让反应缓慢升温，持续搅拌约 1 小时，反应液升温至约-30 °C，TLC 监测显示反应完成。向反应液中加入水(6 L)，搅拌后分层，将水层用二氯甲烷(2 L)洗，合并有机层，用 10%的 HCl(4 L)和盐水(2L)各洗一次，干燥，过滤浓缩。将浓缩液用 5:1 石油醚/乙酸乙酯打浆，真空抽滤，得淡黄色固体 1.36 kg(72%产率)。

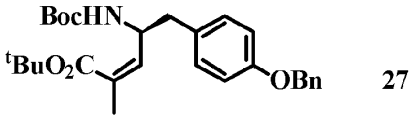
实施例 **26** 化合物 **26** 的合成



26

将 2-溴丙酸叔丁酯 (255 g， 1.22 mol)和三苯基膦 (320 g， 1.22 mol)的干燥乙腈 (1L) 溶液在室温搅拌 18 小时。减压旋去乙腈后加入甲苯使白色固体析出。倾倒出甲苯后将白色固体溶于二氯甲烷 (1L)并转移至分液漏斗。加入 10% NaOH 水溶液 (1L)，摇晃后有机相很快变黄。分出有机相，水相用二氯甲烷 (1L)反萃一次。合并二氯甲烷相，饱和食盐水 (400 mL)洗，无水硫酸钠干燥，过滤后浓缩得叶立德 **26**(280 g， 58%)，为一黄色固体。

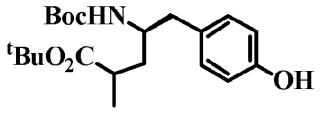
实施例 **27** 化合物 **27** 的合成



27

向化合物 **25** (450 g， 1.27 mol)的干燥二氯甲烷 (3L)溶液中加入叶立德 **26** (546 g， 1.40 mmol)。室温搅拌过夜。TLC 监测反应完全后，经柱层析(10-50% 乙酸乙酯/石油醚)纯化得化合物 **27** (444 g，75% 产率)， 为一白色固体。ESI m/z $C_{28}H_{38}NO_5$ $[M+H]^+$：计算值 468.27，实测值 468.22。

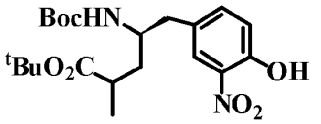
实施例 **28** 化合物 **28** 的合成



28

将化合物 **27** (63 g，0.13mol) 溶于甲醇 (315 mL)，加入 Pd/C (10 wt%，6.3 g)，在氢气 (1 atm)环境下室温搅拌过夜。过滤除去催化剂后，浓缩滤液得化合物 **28** (45.8 g，93% 产率)。

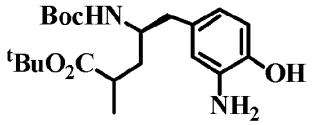
实施例 **29** 化合物 **29** 的合成



29

在室温下向化合物 **28** (390 g，1.03 mol)的四氢呋喃 (4 L)溶液中加入亚硝酸叔丁酯(1.06 k g，10.3 mol)。搅拌过夜后减压浓缩除去四氢呋喃，残留物经柱层析 (10-50% 乙酸乙酯/石油醚)纯化得化合物 **29** (314 g，72% 产率)，为一亮黄色固体。

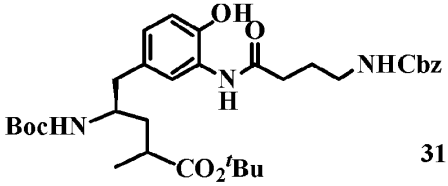
实施例 **30** 化合物 **30** 的合成



30

在氮气保护下向化合物 **30** (166 g，0.392 mol)的乙酸乙酯 (500 mL)溶液中加入 Pd/C (10 wt%，16 g)。通入氢气，真空置换三次。反应液在氢气 (1 atm)环境中于室温搅拌 16 小时。硅藻土过滤，浓缩得化合物 **30** (146 g，97% 产率)，为一黄色泡沫状固体。^{1}H NMR (400 MHz，$CDCl_3$) δ 6.62 (d，J = 7.9 Hz，1H)，6.55 (s，1H)，6.43 (d，J = 7.3 Hz，1H)，4.39 (dd，J = 53.0，44.2 Hz，1H)，3.77 (s，4H)，2.72 – 2.29 (m，3H)，1.83 – 1.58 (m，1H)，1.40 (d，J = 7.6 Hz，18H)，1.24 (s，1H)，1.06 (t，J = 5.7 Hz，3H)。MS ESI m/z $C_{21}H_{35}N_2O_5$ $[M+H]^+$ ：计算值 394.25，实测值 395.25。

实施例 **31** 化合物 **31** 的合成

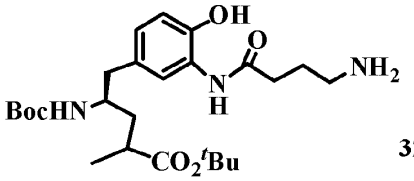


31

将 HATU(39.9 g，105 mmol)加入到 4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁酸(26.1 g，

110 mmol)的 DMF(300 mL)溶液。在室温下搅拌 30 分钟后，将该反应混合物加入到化合物 **30**(39.4 g，100 mmol)和三乙胺(20.2 g，200 mmol)的 DMF(300 mL)溶液。反应在室温搅拌 2 小时，用水稀释，经乙酸乙酯萃取，有机层用饱和食盐水洗，硫酸钠干燥。浓缩后通过硅胶柱层析纯化(20-70% 乙酸乙酯/石油醚)，得到白色固体(45 g，产率 73%)。ESI m/z $C_{33}H_{48}N_3O_8$ $[M+H]^+$：计算值 614.34，实测值 614.15。

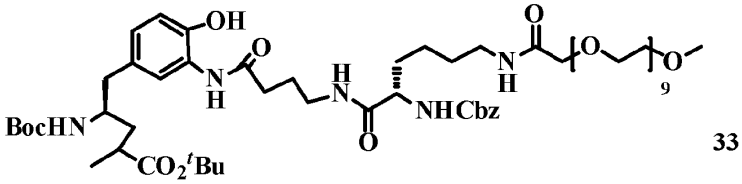
实施例 **32** 化合物 **32** 的合成



32

将化合物 **31**(100 g，163 mmol)溶解在甲醇(500 mL)中，加入 Pd/C 催化剂(10 wt%，10 g)，在室温氢化反应(1 atm H_2)过夜。将催化剂过滤掉后，滤液减压浓缩，得到棕色泡沫状固体 **32**(75.8 g，产率 97%)。^{1}H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.11 (s，1H)，6.83 (d，J = 10.3 Hz，2H)，5.04 – 4.52 (m，6H)，3.90 – 3.56 (m，1H)，2.81 (d，J = 5.3 Hz，2H)，2.63 (dd，J = 12.5，6.1 Hz，2H)，2.54-2.26 (dd，J = 14.0，7.6 Hz，4H)，1.94-1.64 (m，3H)，1.44 – 1.36 (m，18H)，1.08 (d，J = 6.9 Hz，3H)。ESI m/z $C_{25}H_{42}N_3O_6$ $[M+H]^+$：计算值 480.30，实测值 480.59。

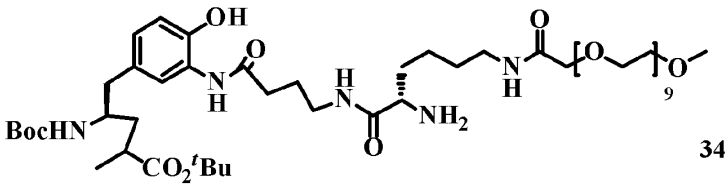
实施例 **33** 化合物 **33** 的合成



33

在 0°C，向化合物 **22**(130 g，174 mmol)的 DMF(500 mL)溶液中加入三乙胺(66 mL，474 mmol)和 HATU(72 g，190 mmol)，然后将反应混合物升温至室温，搅拌 2 小时。将化合物 **32**(75.8 g，158 mmol)的 DMF(500 mL)溶液在 0°C 下加入到上述溶液中，反应在室温下搅拌 1 小时。将反应液倒入水(4L)中，用乙酸乙酯萃取(3 × 500 mL)，合并有机层，用饱和食盐水洗(2 L)，硫酸钠干燥，过滤浓缩后粗品 **33**(190 g)直接用于下一步反应。ESI m/z $C_{60}H_{100}N_5O_{20}$ $[M+H]^+$：计算值 1210.69，实测值 1210.69。

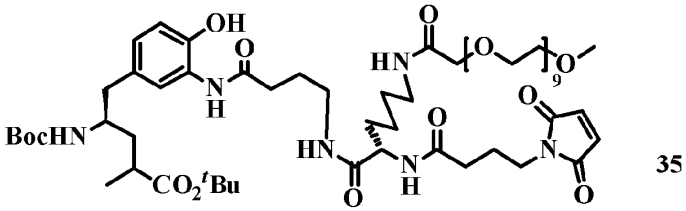
实施例 **34** 化合物 **34** 的合成



34

将上一步反应得到的粗品 **33**(190 g)溶解在甲醇(900 mL)中，加入 Pd/C 催化剂(10 wt%，19 g)，和在室温氢化(1 atm H_2)反应过夜。滤除催化剂，将滤液减压浓缩，用硅胶柱纯化(0-10%甲醇/二氯甲烷)得到一棕色油状物(105 g，两步产率 62%)。ESI m/z $C_{52}H_{95}N_5O_{18}$ $[M+H]^+$：计算值 1077.65， 实测值 1077.65。

实施例 **35** 化合物 **35** 的合成

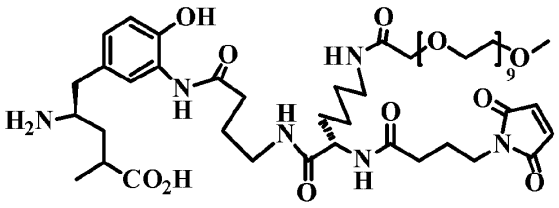


35

室温下在化合物 **34**(105 g，97.1 mmol)的 EtOH(5.3 L)溶液中，加入化合物 4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯(54.4 g，194.2 mmol)和 0.1 N 磷酸二氢钠溶液(1.1 L)，反应在室温下搅拌过夜。减压蒸馏除去 EtOH，残留水溶液倒入水(3 L)中，然后用乙酸乙酯萃取(4 × 500 mL)，合并有机相，用饱和食盐水洗(2 L)，硫酸钠干燥、浓缩，粗产品用硅胶柱纯化(0-10%甲醇/二氯甲烷)得到一黄色油状物(100 g，83%产率)。^{1}H NMR (500 MHz， DMSO) δ 9.53 (s， 0.7H)， 9.52 (s， 0.3H)， 9.22 (s， 0.7H)， 9.21 (s， 0.3H)， 7.95-7.87 (m， 2H)， 7.65 (t， J = 5.9 Hz， 1H)， 7.51-7.44 (m， 1H)， 6.99 (s， 2H)， 6.77 – 6.66 (m， 2H)， 6.65-6.57 (m， 1H)， 4.13 (dt， J = 5.4， 8.1 Hz， 1H)， 3.84 (s， 2H)， 3.55 (s， 2H)， 3.52 (s， 2H)， 3.51 – 3.45 (m， 30H)， 3.42 (dd， J = 5.8， 3.7 Hz， 2H)， 3.38 (t， J = 6.9 Hz， 2H)， 3.23 (s， 3H)， 3.14 – 3.01 (m， 4H)， 2.64 – 2.44 (m， 1H)， 2.41 – 2.22 (m， 4H)， 2.16 – 2.04 (m， 2H)， 1.76 – 1.64 (m， 4H)， 1.64 – 1.52 (m， 2H)， 1.52 – 1.35 (m， 2H)， 1.37 (s， 3H)， 1.35 (s， 6H)， 1.31 (s， 9H)， 0.97 (t， J = 8.5 Hz， 3H)。^{13}C NMR (126 MHz， DMSO) δ 175.35(次要)， 174.88，171.69，171.42，171.29，171.10，169.04，155.19(次要)，155.05，145.97， 134.47， 129.36， 126.00， 125.20， 122.92， 115.69， 79.32(次

要)，79.17，77.35(次要)，77.27，71.29，70.25，69.95，69.79，69.60，69.53，58.06，52.57，50.13，49.55(次要)，41.25，38.12，37.94，37.45，36.84，36.80(次要)，33.38，32.37，31.86，28.96，28.28，28.23，27.69，27.57，25.42，24.19，22.86，18.04，16.49(次要)。ESI m/z $C_{60}H_{101}N_6O_{21}$ $[M+H]^+$：计算值 1241.7，实测值 1241.8。

实施例 **36** 化合物 **36** 的合成

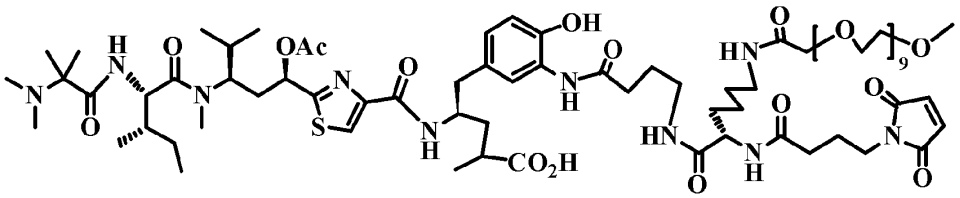


36

将化合物 **35**(31.5 g，25.4 mmol)溶解在二氯甲烷(125 mL)中，加入三氟乙酸(125 mL)，加毕，室温反应 3 小时。反应结束，将反应液在旋转蒸发仪上浓缩至无溶剂蒸出。再在真空油泵上真空浓缩至重量基本不变，得粗品。于粗品中加入乙醚(200 mL)萃洗，分出产物层，减压浓缩至无溶剂蒸出。再在真空油泵上真空浓缩，直至其重量基本不变，得到化合物 **36** (36.0 g，含溶剂)。^{1}H NMR (500 MHz，DMSO) δ 9.18 (s，1H)，7.97-7.87 (m，2H)，7.79 (s，2H)，7.71 – 7.61 (m，2H)，7.00 (s，2H)，6.85-6.73 (d，*J* = 5.4 Hz，2H)，4.17 – 4.07 (m，1H)，3.84 (s，2H)，3.55 (s，2H)，3.52 (s，2H)，3.50 (s，30H)，3.42 (dd，*J* = 5.8，3.7 Hz，2H)，3.39 (t，*J* = 7.0 Hz，2H)，3.32-3.23 (m，1H)，3.23 (s，3H)，3.14 – 3.01 (m，4H)，2.82-2.71 (m，1H)，2.71 – 2.61 (m，1H)，2.58 – 2.50 (m，1H)，2.38 (t，*J* = 7.3 Hz，2H)，2.11 (dt，*J* = 7.8，3.0 Hz，2H)，1.88 – 1.77 (m，1H)，1.76 – 1.64 (m，4H)，1.59 (dt，*J* = 15.1，5.8 Hz，1H)，1.53 – 1.32 (m，4H)，1.31 – 1.11 (m，2H)，1.05 (d，*J* = 7.0 Hz，2.1H)，1.00 (d，*J* = 6.9 Hz，0.9H)。^{13}C NMR (126 MHz，DMSO) δ 176.78(次要)，176.55，171.74，171.42，171.34，171.12，169.07，146.63(次要)，146.57，134.49，126.51，126.31，125.19，122.85，115.80，71.31，70.27，69.96，69.81，69.61，69.55，58.07，54.93 (次要)，52.64，50.72，50.13(次要)，38.30(次要)，38.14，37.95，36.85，35.75，35.38(次要)，34.87，34.81(次要)，33.46，32.38，31.83，28.98，25.40，24.21，22.89，17.49，16.74(次要)。ESI m/z $C_{51}H_{85}N_6O_{19}$ $[M+H]^+$：计算值 1085.6，实测值

1085.4。

实施例 **37** 化合物 **37** 的合成

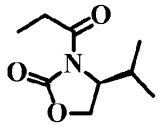


37

向反应瓶中投加化合物**36**(36.0 g,以25.4 mmol计)的DMF(60 mL)溶液，冰水浴冷却至5°C。加入化合物 **18** (19.3 g， 27.9 mmol)的DMF(150 mL)溶液，然后滴加DIPEA (25 mL， 139 mmol)。滴加完毕，撤冰水浴，升至室温，搅拌18 小时。反应结束后，将反应液真空油泵减压浓缩至无溶剂蒸出，浓缩完毕，将浓缩液用二氯甲烷稀释，冰水浴冷却至5 °C，缓慢滴加甲酸，调pH至3.0-4.0。之后，浓缩至无溶剂蒸出，将残留物转移至硅胶柱上，用正己烷/乙酸乙酯/甲酸和二氯甲烷/甲醇/甲酸洗脱，浓缩得到纯化粗品。用水/甲醇/甲酸溶解纯化粗品，用制备HPLC进一步纯化，水/乙腈/甲酸洗脱，收集合适的洗脱液，浓缩后，用水稀释浓缩液，平均分配至冻干瓶中冻干，得淡黄色泡沫状固体(24 g， 60% 产率)。^{1}H NMR (500 MHz， DMSO) δ 9.60 (bs， 1H)， 9.20 (s， 1H)， 8.19 (s， 0.33H)， 8.17 (s， 0.67H)， 8.02 (d， J = 9.0 Hz， 0.33H)， 7.98 (d， J = 9.0 Hz， 0.67H)， 7.94 – 7.83 (m， 2H)， 7.65 (t， J = 5.8 Hz， 1H)， 7.63 (s， 1H)， 7.56 (s， 0.33H)， 7.55 (s， 0.67H)， 6.99 (s， 2H)， 6.82 – 6.74 (m， 1H)， 6.74 – 6.67 (m， 1H)， 5.62 – 5.54 (m， 1H)， 4.69 – 4.59 (m， 1H)， 4.39 (s， 1H)， 4.25 – 4.05 (m， 2H)， 3.85 (s， 2H)， 3.55 (s， 2H)， 3.52 (s， 2H)， 3.50 (s， 30H)， 3.44-3.36 (m， 4H)， 3.23 (s， 3H)， 3.14 – 3.02 (m， 4H)， 2.96 (s， 3H)， 2.83 – 2.71 (m， 1H)， 2.71 – 2.57 (m， 1H)， 2.44 – 2.32 (m， 3H)， 2.32 – 2.14 (m， 2H)， 2.14 – 2.05 (m， 2H)， 2.12 (s， 6H)， 2.09 (s， 3H)， 1.99 – 1.65 (m， 7H)， 1.64 – 1.53 (m， 2H)， 1.53 – 1.32 (m， 5H)， 1.31 – 1.14 (m， 2H)， 1.11 (s， 3H)， 1.05 (d， J = 7.2 Hz， 2H)， 1.03 (d， J = 6.9 Hz， 1H)， 0.99 (s， 3H)， 0.93 (d， J = 6.4 Hz， 3H)， 0.86 (d， J = 6.7 Hz， 3H)， 0.82 (t， J = 7.3 Hz， 3H)， 0.67 (d， J = 6.4 Hz， 3H)。^{13}C NMR (126 MHz， DMSO) δ 177.52(次要)， 177.01， 175.44， 172.75， 171.69， 171.43， 171.29， 171.09， 169.74， 169.55(次要)， 169.46， 169.04，

159.92(次要)，159.88，149.86，149.74(次要)，146.07，134.46，129.13(次要)，129.08，126.12(次要)，126.07，125.18，124.28(次要)，124.11，122.95，122.86(次要)，115.67，71.30，70.26，69.96，69.80，69.60，69.54，69.48，63.01，58.06，55.09，52.58，52.39，49.03，47.96(次要)，40.35，38.89，38.11，37.94，37.39，36.84，36.53，36.02，35.78(次要)，33.87，33.38，32.38，31.86，29.02，28.97，25.37，24.19，23.60，22.86，21.15，20.62，19.99，19.41，18.34，18.11，16.17(次要)，15.69，10.81。ESI m/z $C_{76}H_{125}N_{10}O_{24}S$ $[M+H]^+$：计算值 1593.9，实测值 1593.8。

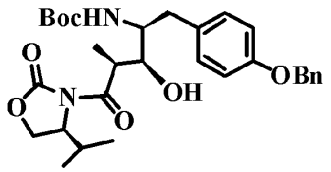
实施例 **38** 化合物 **38** 的合成



38

在在氮气保护下，将(S)-4-异丙基噁唑烷-2-酮(400 g，3.09 mol)溶于无水四氢呋喃(8 L)中，降温至-70 °C 左右，将正丁基锂(2.5 M 正己烷溶液，1.36 L，3.4 moL)滴加进反应釜中，滴加完成后在-70 °C 下反应 1 小时。然后滴加丙酰氯 (315 g，3.4 mol)，滴加完毕后，在-70 °C 下反应 1 小时，缓慢升温至室温，将反应液倒入冰的饱和食盐水溶液(7 L)中，乙酸乙酯萃取(3 × 2 L)，合并有机相，用水(2 L)洗涤一次，饱和食盐水溶液 (2 L)洗涤一次，无水硫酸钠干燥，过滤，旋干，用硅胶柱纯化(纯石油醚至 5：1 石油醚/ 乙酸乙酯)，得到无色油状物 500 g，产率 87%。MS ESI m/z $C_9H_{16}NO_3$ $[M+H]^+$：计算值 186.10，实测值 186.10。^{1}H NMR (400 MHz，$CDCl_3$) δ 4.48 – 4.39 (m，1H)，4.27 (t，J = 8.7 Hz，1H)，4.21 (dd，J = 9.1，3.1 Hz，1H)，3.06 – 2.82 (m，2H)，2.38 (dtd，J = 14.0，7.0，4.0 Hz，1H)，1.17 (t，J = 7.4 Hz，3H)，0.90 (dd，J = 17.0，7.0 Hz，6H)。

实施例 **39** 化合物 **39** 的合成

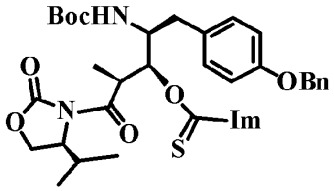


39

在氮气保护下，将化合物 **38** (92.6 g，0.50 mol)溶于无水二氯甲烷(1.5 L)中，降温至-10 °C，将二异丙基乙基胺 (70.5 g，0.54 mol)和 *n*-Bu_2BOTf (1.0 M 二氯甲烷溶液，500 mL，0.50 mol)滴加进反应瓶中，0 °C 下反应 1 小时，

再降温至-78 °C，将化合物 **25** (161 g， 0.45 mol)的二氯甲烷(1 L)溶液滴加进反应瓶中，溶液温度不超过-70 °C，滴加完毕反应 2 小时，然后缓慢升温至室温，并反应过夜。次日，将磷酸盐缓冲液 (0.1 N， pH 7.0， 2 L)加进反应瓶中，分液，水相用二氯甲烷(2 × 500 mL)萃取，合并有机相，用饱和食盐水溶液 (200 mL)洗涤一次，无水硫酸钠干燥，过滤浓缩。将粗品溶于甲醇(2 L)中，降温至 0 °C，将 H_2O_2(30% 水溶液， 500 mL)滴入，5 °C 下反应 1 小时，加水(3 L)，用二氯甲烷萃取(3 × 800 mL)，合并有机相，水(500 mL)洗，饱和 $NaHCO_3$ 溶液 (500 mL)洗，饱和食盐水(500 mL)洗一次，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，硅胶柱纯化(纯石油醚至 5：1 石油醚/乙酸乙酯)，得到白色固体 150 g， 产率 60%。^{1}H NMR (400 MHz， $CDCl_3$) δ 7.36 (ddd, J = 24.2， 14.2， 7.1 Hz， 5H)， 7.12 (d， J = 8.4 Hz， 2H)， 6.90 (d， J = 8.5 Hz， 2H)， 5.02 (s， 2H)， 4.69 (d， J = 9.0 Hz， 1H)， 4.45 (d， J = 4.1 Hz， 1H)， 4.33 (t， J = 8.4 Hz， 1H)， 4.15 (d， J = 8.6 Hz， 1H)， 3.90 (dd， J = 16.6， 8.0 Hz， 1H)， 3.85 – 3.77 (m， 2H)， 2.81 (d， J = 7.6 Hz， 2H)， 2.27 (dd， J = 11.4， 6.7 Hz， 1H)， 1.35 (s， 9H)， 0.89 (dd， J = 14.3， 6.9 Hz， 6H)。MS ESI m/z $C_{30}H_{41}N_2O_7$ $[M+H]^+$ ：计算值 541.28， 实测值 541.30。

实施例 **40** 化合物 **40** 的合成

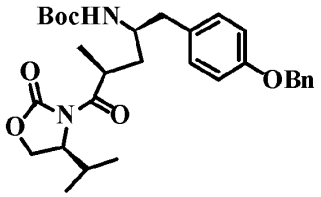


40

在氮气保护下，将化合物 **39** (200 g， 0.37 mol)溶于无水四氢呋喃(3.5 L)中，加入二硫羰基咪唑(198 g， 1.11 mol)，回流反应 8 小时，补加二硫羰基咪唑(65 g， 0.37 mol)，反应过夜。次日冷却反应至室温，减压浓缩除去溶剂，硅胶柱纯化(纯石油醚至 5：1 石油醚/乙酸乙酯)，得到油状液体(170 g，产率 83%)。^{1}H NMR (400 MHz， $CDCl_3$) δ 8.41 (s， 1H)， 7.67 (s， 1H)， 7.36 (dt， J = 16.0， 6.9 Hz， 6H)， 7.09 (s， 1H)， 7.05 (d， J = 8.4 Hz， 2H)， 6.86 (d， J = 8.4 Hz， 2H)， 6.32 (d， J = 9.5 Hz， 1H)， 5.01 (s， 2H)， 4.56 – 4.43 (m， 2H)， 4.32 (ddd， J = 16.2， 15.6， 7.8 Hz， 3H)， 4.19 (d， J = 8.7 Hz， 1H)， 2.96 (dd， J = 14.6， 4.4 Hz， 1H)， 2.49 (dd，

J = 14.5， 10.5 Hz， 1H)， 2.29 (td， J = 13.4， 6.7 Hz， 1H)， 1.73 (s， 1H)， 1.29 (s， 9H)， 0.91 (dd， J = 13.9， 6.9 Hz， 6H)。 MS ESI m/z $C_{34}H_{43}N_4O_7S[M+H]^+$ ：计算值 651.27， 实测值 651.39。

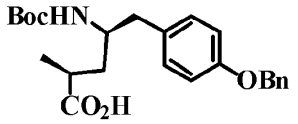
实施例 **41** 化合物 **41** 的合成



41

在氮气保护下，将化合物 **40** (210 g， 323 mmol)溶于无水甲苯(3 L)中，在氮气保护下加入三正丁基锡烷(182 g， 646 mmol)和偶氮二异丁腈(0.5 g，3.23 mmol)，回流反应 2 小时，冷却至室温，旋干，硅胶柱纯化(纯石油醚至 5：1 石油醚/乙酸乙酯)，得到油状物(141 g，83%产率)。^{1}H NMR (400 MHz，$CDCl_3$) δ 7.36 (ddd， J = 24.5， 14.5， 7.1 Hz， 5H)， 7.08 (d， J = 8.5 Hz，2H)， 6.90 (d， J = 8.5 Hz， 2H)， 5.04 (d， J = 5.1 Hz， 2H)， 4.48 (d，J = 4.2 Hz， 1H)， 4.33 (t， J = 8.4 Hz， 1H)， 4.22 (d， J = 9.7 Hz， 1H)，4.15 (d， J = 8.8 Hz， 1H)， 3.81 (s， 2H)， 2.73 (dd， J = 14.1， 5.9 Hz，1H)， 2.61 (dd， J = 14.0， 7.2 Hz， 1H)， 2.29 (dq， J = 13.5， 6.8 Hz，1H)， 2.11 – 2.00 (m， 1H)， 1.60 (dd， J = 15.2， 6.2 Hz， 2H)， 1.35 (s，9H)， 1.20 (d， J = 6.9 Hz， 3H)， 0.89 (dd， J = 14.0， 6.9 Hz， 6H)。 MS ESI m/z $C_{30}H_{41}N_2O_6$ $[M+H]^+$ ：计算值 525.28， 实测值 525.37。

实施例 **42** 化合物 **42** 的合成

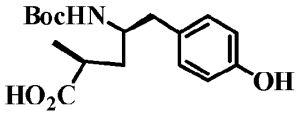


42

将化合物 **41** (208 g， 390 mmol)溶于四氢呋喃(2.1 L)和水(0.7 L)的混合液中，冰浴下滴加 LiOH (23.7 g，0.99 mol)的 H_2O_2 (30% 水溶液，336 mL，2.97 mol)溶液，控制温度不超过 5 °C，反应 3 小时后，滴加入亚硫酸钠(1.5 M， 2 L)溶液，用 2N HCl 调节 pH 至 4，乙酸乙酯萃取(3 × 800 mL)，合并有机相，水洗(500 mL)和饱和食盐水(500 mL)洗一次，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，硅胶柱纯化(纯石油醚至 3：1 石油醚/乙酸乙酯)，得到油状物(158 g， 产率 96%)。^{1}H NMR (400 MHz， $CDCl_3$) δ 7.46 – 7.28 (m， 5H)， 7.07 (d， J = 7.7 Hz， 2H)， 6.91 (d， J = 7.8 Hz， 2H)， 5.04 (s， 2H)， 4.52

(d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.87 (d, J = 41.8 Hz, 1H), 2.82 – 2.43 (m, 3H), 1.85 (t, J = 12.2 Hz, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.17 (d, J = 6.9 Hz, 3H)。MS ESI m/z $C_{24}H_{32}NO_5$ $[M+H]^+$ ：计算值 414.22, 实测值 414.21。

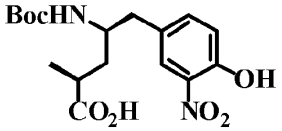
实施例 **43** 化合物 **43** 的合成



43

将化合物 **42** (158 g, 0.38 mmol)溶于甲醇(1.5 L)中，加入 Pd/C (10 wt%, 15 g)，催化加氢(1 atm H_2)反应 16 小时，过滤，浓缩滤液得到油状物(123 g, 产率 100%)。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.00 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 6.80 (s, 2H), 4.51 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.88 (s, 1H), 2.66 (dd, J = 65.6, 22.6 Hz, 4H), 1.88 (t, J = 12.2 Hz, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.14 (d, J = 6.6 Hz, 3H)。MS ESI m/z $C_{17}H_{26}NO_5$ $[M+H]^+$：计算值 324.17, 实测值 324.16。

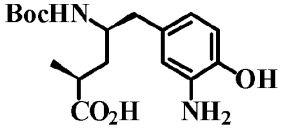
实施例 **44** 化合物 **44** 的合成



44

将化合物 **43** (113 g, 0.35 mol)溶于无水四氢呋喃(1.5 L)中，滴加亚硝酸叔丁酯(360 g, 3.5 mol)，室温反应 3 小时，反应完成后，浓缩反应液，硅胶柱纯化(纯石油醚至 2：1 石油醚/乙酸乙酯)得到黄色固体(85 g, 产率 61%)。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.00 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 3.56 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 2.67 (dd, J = 13.5, 5.1 Hz, 1H), 2.41 (dd, J = 13.8, 6.6 Hz, 1H), 1.78 – 1.65 (m, 1H), 1.27 (s, 9H), 1.18 (s, 1H), 1.05 (d, J = 7.1 Hz, 3H)。MS ESI m/z $C_{17}H_{25}N_2O_7$ $[M+H]^+$ ：计算值 369.15, 实测值 369.14。

实施例 **45** 化合物 **45** 的合成

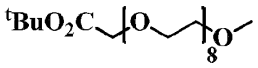


45

将化合物 **44** (80 g, 217 mmol)溶于甲醇(500 mL)中，加入 Pd/C (10 wt%,

2.0 g)，催化加氢(1 atm H_2)反应 1 小时，过滤，旋干得到白色固体(73 g， 产率 93%)。MS ESI m/z $C_{17}H_{27}N_2O_5$ $[M+H]^+$ ：计算值 339.18， 实测值 339.17。^1H NMR (400 MHz， MeOD) δ 6.60 (d， J = 7.9 Hz， 2H)， 6.44 (d， J = 7.3 Hz， 1H)， 3.71 (d， J = 6.3 Hz， 1H)， 2.62 – 2.37 (m， 3H)， 1.83 (ddd， J = 13.7， 9.9， 3.7 Hz， 1H)， 1.39 (s， 9H)， 1.13 (d， J = 7.1 Hz， 3H)。

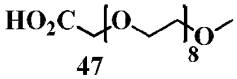
实施例 **46** 化合物 **46** 的合成



46

将八甘醇单甲醚(115.2 g， 0.3 mol)溶解于干燥的四氢呋喃(3 L)中。室温下投入氢化钠(60 wt%，24 g，0.6 mol)，搅拌反应 1 小时后加入溴乙酸叔丁酯(146.3 g， 0.75 mol)。室温反应 1 小时，将反应液加至 4L 二氯甲烷中，搅拌下加入碎冰 2 k g，分出水相，用 1 L 二氯甲烷萃取，合并有机相，水洗，浓缩，柱层析纯化(20%乙酸乙酯/石油醚，然后 0 至 5%甲醇/二氯甲烷)得产物 108 g(产率 72%)。

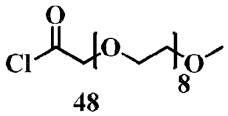
实施例 **47** 化合物 **47** 的合成



47

向无水甲酸(1L)和二氯甲烷(500 mL)的混合溶剂中投加化合物 **46**(210 g， 0.422 mol)。室温搅拌过夜，浓缩得到产物 200 g(产率 100%)。

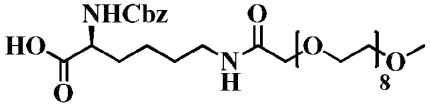
实施例 **48** 化合物 **48** 的合成



48

将化合物 **48**(198 g， 0.422 mol)溶解于 2.6 L 二氯甲烷中。室温下滴入 0.5 mL 的 DMF 和草酰氯(275 mL)。搅拌反应 3 小时，浓缩得到产物 210 g。

实施例 **49** 化合物 **49** 的合成

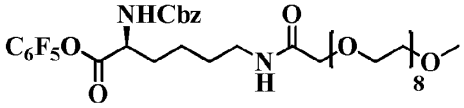


49

将化合物 Cbz-L-赖氨酸(236.3 g，0.844 mol)，碳酸钠(89.5 g，0.844 mol)和氢氧化钠(33.8 g， 0.844 mol)在 1.6 L 水中混合。冰盐浴降温至零度，滴加化合物 **48**(210 g， 粗品，以 0.422mol 计)的四氢呋喃(160 mL)溶液。加完，室温反应 1 小时，加乙酸乙酯 1L，搅拌后分出水相，浓盐酸调 pH 至 3 至 4，二氯甲烷萃取，有机相用饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥。过滤，浓缩得

产物 290 g(产率 97%)。

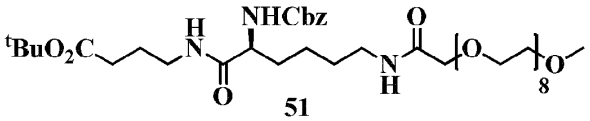
实施例 **50** 化合物 **50** 的合成



50

将化合物 **49**(182.5 g， 0.26 mol)溶于 2 L 二氯甲烷中。室温下加入五氟苯酚(95.4 g， 0.52 mol)和 DIC(131 g， 1.04 mol)。搅拌反应 1 小时，浓缩得到产物粗品 430 g。

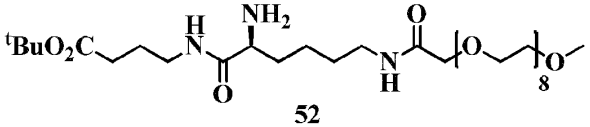
实施例 **51** 化合物 **51** 的合成



51

将 4-氨基丁酸叔丁酯(62 g，0.39 mol)溶于 1.5 L 的 DMF 中。冰水降温，加入 DIPEA(134.2 g，1.04 mol)，保持 10 度至 20 度下慢慢加入化合物 **50**(430 g， 粗品，以 0.26 mol 计)。室温反应 1 小时，浓缩，加二氯甲烷稀释，水洗，水相用二氯甲烷萃取。合并有机相并用 0.2N 盐酸洗，饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。柱层析纯化(25%-100%乙酸乙酯/石油醚，再 0 至 5%甲醇/二氯甲烷)得到产物 180 g，产率 82%。

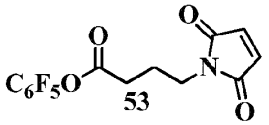
实施例 **52** 化合物 **52** 的合成



52

将化合物 **51**(78 g， 92.3 mmol)，钯碳(10 wt%，13 g)混合于 500 mL 甲醇中。室温下在氢气球下反应过夜。过滤，浓缩滤液，柱层析纯化(0 至 20%甲醇/二氯甲烷)，得产物 70.2 g(产率 92%)。

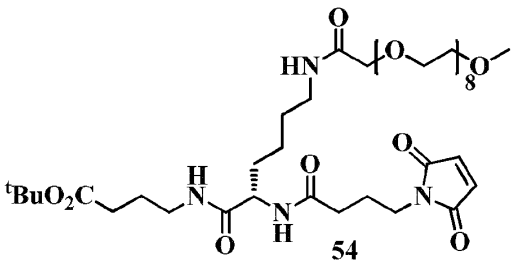
实施例 **53** 化合物 **53** 的合成



53

将化合物 **52**(17.3 g， 94.2 mmol)溶解于 500 mL 二氯甲烷中。室温下依次加入五氟苯酚(34.7 g， 188.5 mmol)和 DIC(47.5 g， 377 mmol)。搅拌反应 1 小时，浓缩得到粗产物 105 g。

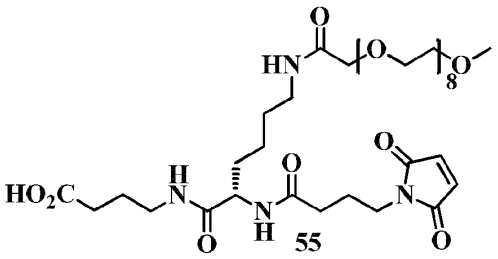
实施例 **54** 化合物 **54** 的合成



54

将化合物 **52**(67 g， 94.2 mmol)溶于 0.75 L 的 DMF 中，冰水降温，加入 DIPEA(48.6 g， 376.8 mmol)，保持反应液在 10 度至 20 度，慢慢加入化合物 **53**(105 g， 粗品，以 94.2 mmol 计)。室温反应 1 小时，浓缩，加二氯甲烷稀释，水洗，水相用二氯甲烷萃取。合并有机相，用 0.2 N 盐酸洗，饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。柱层析纯化(50%-100%乙酸乙酯/石油醚，再 10%甲醇/二氯甲烷)得到产物 80.5 g，产率 98%。

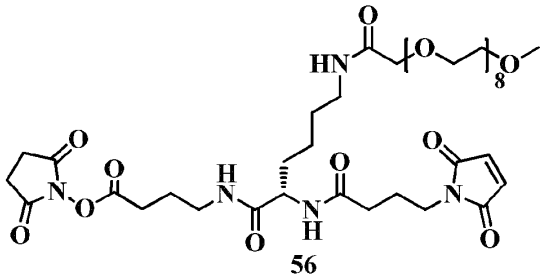
实施例 **55** 化合物 **55** 的合成



55

向无水甲酸(400 mL)和二氯甲烷(200 mL)的混合溶剂中投加化合物 **54** (80.5 g， 91.9 mmol)。室温反应过夜，浓缩，加二氯甲烷稀释，饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤，柱层析纯化(0%至 20%甲醇/二氯甲烷)，得到产物 70 g(产率 93%)。

实施例 **56** 化合物 **56** 的合成

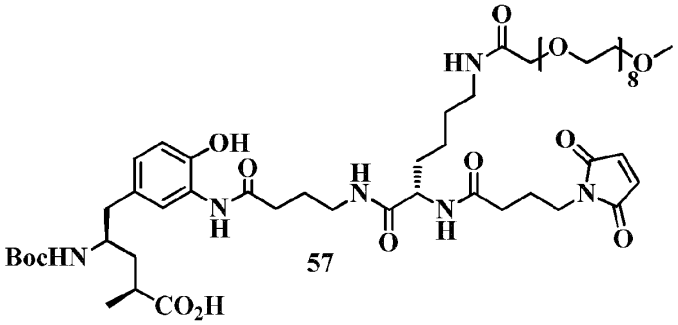


56

将化合物 **55**(104 g， 0.127 mol)溶于二氯甲烷(1000 mL)中，在室温下，依次加入 N-羟基琥珀酰亚胺(16 g， 0.14 mol)和 EDC·HCl(37 g， 0.2 mol)。室温下反应 1 小时，将反应液用饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤，

浓缩得到产物 120 g(产率 100%)。

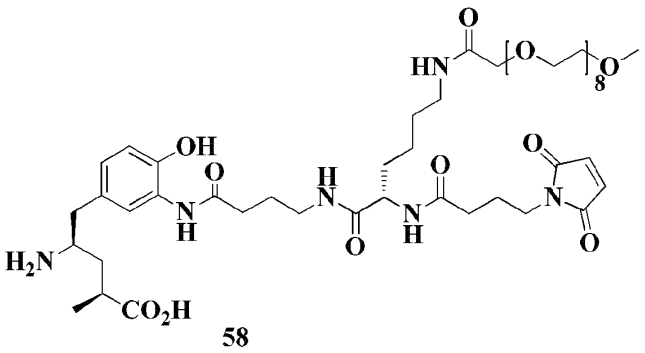
实施例 **57** 化合物 **57** 的合成



57

将化合物 **56**(120 g, 127 mmol)和化合物 **45**(45.0 g, 133 mmol)在 1 L 四氢呋喃中混合。升温至回流，过夜后浓缩，加二氯甲烷 2 L 稀释，用饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。在粗品中加水 1.5 L，乙酸乙酯 1.5 L，搅拌半小时，分出水相，乙酸乙酯层再用水萃取两次(600 mL × 2)，合并水相，再用乙酸乙酯(700 mL)洗去杂质。水相中加氯化钠至饱和，用二氯甲烷萃取(1 L × 2)，合并二氯甲烷，用无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。柱层析纯化(0%至 20%甲醇/二氯甲烷)，得产物 83.6 g(产率 58%)。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.51 (bs, 1H), 9.23 (s, 1H), 7.97 – 7.83 (m, 1H), 7.64 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.61 (d, J = 8.7 Hz, 0H), 4.14 (dt, J = 5.4, 8.3 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.52 (s, 2H), 3.51 – 3.46 (m, 26H), 3.42 (dd, J = 5.7, 3.8 Hz, 2H), 3.39 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.23 (s, 3H), 3.14 – 3.01 (m, 4H), 2.54 (dd, J = 13.5, 7.0 Hz, 1H), 2.45 (dd, J = 13.5, 7.0 Hz, 1H), 2.41 – 2.32 (m, 3H), 2.11 (td, J = 7.1, 1.9 Hz, 2H), 1.75 – 1.64 (m, 4H), 1.64 – 1.54 (m, 1H), 1.52 – 1.43 (m, 1H), 1.43 – 1.35 (m, 2H), 1.32 (s, 9H), 1.32 – 1.15 (m, 4H), 1.02 (d, J = 7.1 Hz, 3H)。^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 177.18, 171.68, 171.43, 171.28, 171.08, 169.02, 155.15, 145.99, 134.45, 129.41, 125.91, 125.30, 123.04, 115.71, 77.29, 71.29, 70.25, 69.95, 69.79, 69.59, 69.53, 58.05, 52.57, 50.33, 40.71, 38.12, 37.93, 37.64, 36.83, 35.92, 33.35, 32.37, 31.85, 28.95, 28.26, 27.86 (次要), 25.39, 24.18, 22.85, 18.10。ESI m/z $C_{54}H_{89}N_6O_{20}$ $[M+H]^+$：计算值 1141.6，实测值 1141.9。

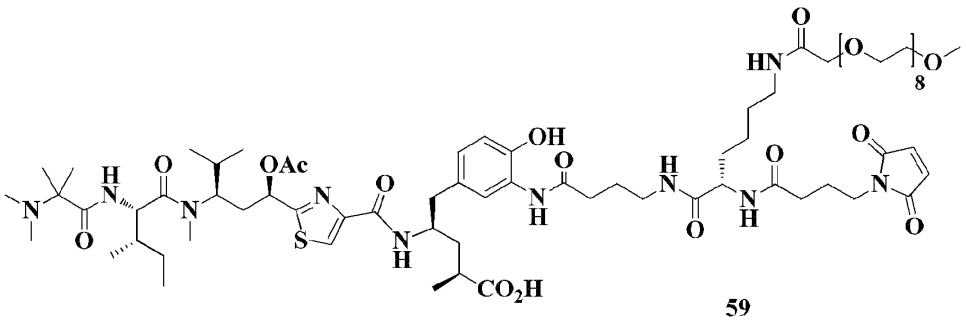
实施例 **58** 化合物 **58** 的合成



58

将化合物 **57**(59.0 g，51.7 mmol)溶解在二氯甲烷(345 mL)中，加入三氟乙酸(172 mL)，加毕，室温反应 2 小时。反应结束，将反应液在旋转蒸发仪上浓缩至无溶剂蒸出。再在真空油泵上真空浓缩至重量基本不变，得粗品。于粗品中加入乙醚(600 mL)萃洗，分出产物层，减压浓缩至无溶剂蒸出。再在真空油泵上真空浓缩，直至其重量基本不变，得到化合物 **58** (75.5 g，含溶剂)。^{1}H NMR (600 MHz，DMSO) δ 9.82 (s，1H)，9.18 (s，1H)，7.95 - 7.88 (m，2H)，7.83 (s，2H)，7.67 (s，1H)，7.66 (t，*J* = 6.1 Hz，1H)，6.99 (s，2H)，6.84 - 6.78 (m，2H)，4.16 – 4.09 (m，1H)，3.84 (s，2H)，3.55 (s，2H)，3.52 (s，2H)，3.52 – 3.44 (m，26H)，3.42 (dd，*J* = 5.6，3.9 Hz，2H)，3.39 (t，*J* = 7.0 Hz，2H)，3.33 – 3.25 (m，1H)，3.23 (s，3H)，3.14 – 3.02 (m，4H)，2.76 (dd，*J* = 13.9，6.1 Hz，1H)，2.65 (dd，*J* = 13.9，6.1 Hz，1H)，2.55 (dq，*J* = 14.0，7.0 Hz，1H)，2.38 (t，*J* = 7.3 Hz，2H)，2.14 – 2.08 (m，2H)，1.82 (ddd，*J* = 14.1，8.7，5.5 Hz，1H)，1.74 – 1.65 (m，4H)，1.64 – 1.55 (m，1H)，1.52 – 1.43 (m，2H)，1.43 – 1.34 (m，2H)，1.30 – 1.13 (m，2H)，1.05 (d，*J* = 7.0 Hz，3H)。^{13}C NMR (151 MHz，DMSO) δ 176.54，171.73，171.43，171.34，171.11，169.07，146.59，134.48，126.50，126.33，125.19，122.85，115.84，71.30，70.27，69.96，69.81，69.61，69.55，58.06，52.65，50.72，38.31，38.13，37.95，36.85，35.75，34.88，33.45，32.38，31.82，28.97，25.40，24.20，22.88，17.48。ESI m/z $C_{49}H_{81}N_6O_{18}[M+H]^+$：计算值 1041.6，实测值 1041.7。

实施例 **59**　　化合物 **59** 的合成

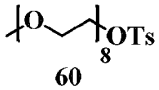


59

向反应瓶中投加化合物**58**(75.5 g, 以51.7 mmol计)的DMF(160 mL)溶液，冰水浴冷却至5°C。加入化合物 **18** (35.8 g， 51.7 mmol)的 DMF(240 mL)溶液，然后滴加 DIPEA (36.8 g， 285 mmol)。滴加完毕，撤冰水浴，升至室温，搅拌 10 小时。反应结束后，将反应液真空油泵减压浓缩至无溶剂蒸出，浓缩完毕，将浓缩液用二氯甲烷稀释，冰水浴冷却至 5 °C，缓慢滴加甲酸，调 pH 至 3.0-4.0。之后，在旋转蒸发仪上浓缩至无溶剂蒸出，将残留物转移至硅胶柱上，用正己烷/乙酸乙酯/甲酸和二氯甲烷/甲醇/甲酸洗脱，浓缩得到纯化粗品。用水/甲醇/甲酸溶解纯化粗品，用制备 HPLC 进一步纯化，水/乙腈/甲酸洗脱，收集合适的洗脱液，浓缩后，用水稀释浓缩液，平均分配至冻干瓶中冻干，得淡黄色泡沫状固体(48 g， 60% 产率)。^{1}H NMR (600 MHz， DMSO) δ9.20 (s， 1H)， 8.17 (s， 1H)， 8.03-7.95 (m， 1H)， 7.95 – 7.86 (m， 2H)， 7.77-7.61 (m， 2H)， 7.55 (s， 1H)， 6.98 (s， 2H)， 6.77 (d， J = 8.1 Hz， 1H)， 6.71 (d， J = 8.1 Hz， 1H)， 5.58 (d， J = 10.7 Hz， 1H)， 4.65 (dd， J = 9.3， 7.1 Hz， 1H)， 4.40 (s， 1H)， 4.18 – 4.08 (m， 2H)， 3.85 (s， 2H)， 3.55 (s， 2H)， 3.52 (s， 2H)， 3.51 - 3.47 (m， 26H)， 3.44 – 3.36 (m， 4H)， 3.23 (s， 3H)， 3.14 – 3.02 (m， 4H)， 2.96 (s， 3H)， 2.75 (dd， J = 13.5， 6.7 Hz， 1H)， 2.63 (dd， J = 13.5， 6.7 Hz， 1H)， 2.43 – 2.32 (m， 3H)， 2.31 – 2.23 (m， 1H)， 2.23 – 2.09 (m， 3H)， 2.13 (s， 6H)， 2.09 (s， 3H)， 1.88 – 1.73 (m， 3H)， 1.75 – 1.65 (m， 4H)， 1.65 – 1.53 (m， 2H)， 1.53 – 1.44 (m， 3H)， 1.44 – 1.34 (m， 2H)， 1.31 – 1.15 (m， 2H)， 1.12 (s， 3H)， 1.05 (d， J = 6.9 Hz， 3H)， 1.01 (s， 3H)， 0.93 (d， J = 6.4 Hz， 3H)， 0.86 (d， J = 6.6 Hz， 3H)， 0.82 (t， J = 7.3 Hz， 3H)， 0.67 (d， J = 6.1 Hz， 3H)。^{13}C NMR (151 MHz， DMSO) δ 177.05， 175.28， 172.76， 171.74， 171.47， 171.34， 171.11， 169.78， 169.49， 169.09， 159.91， 149.88， 146.10， 134.47， 129.10， 126.11， 125.23，

124.12，122.97，115.72，71.33，70.30，69.99，69.83，69.63，69.57，69.52，63.21，58.08，55.05，52.63，52.49，49.07，40.37，38.89，38.14，37.97，37.43，36.87，36.50，36.06，33.91，33.41，32.41，31.87，29.06，28.99，25.40，24.22，23.66，22.88，21.08，20.63，20.00，19.43，18.41，18.13，15.68，10.81。ESI m/z $C_{74}H_{121}N_{10}O_{23}S[M+H]^+$：计算值 1549.8，实测值 1550.2。

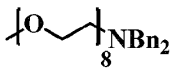
实施例 **60** 化合物 **60** 的合成



60

将八甘醇单甲醚(10 g，26 mmol，1.0 eq)溶于 100 mL 无水二氯甲烷，加入 DMAP(32 mg，0.26 mmol，0.01 eq)，冰浴下滴加三乙胺(10.5 g，104 mmol，4.0 eq)和 TsCl(14.9 g，78 mmol，3.0 eq)固体，完毕，反应 10 min，升温至室温反应过夜。次日，将反应液用 1N HCl 洗涤(100 mL)，水洗(100 mL)，盐水洗(100 mL)，无水硫酸钠干燥，旋干，用少量二氯甲烷溶解，上样过柱，洗脱液为 5%-100% 石油醚/乙酸乙酯和 1%-3%甲醇/二氯甲烷，得到 11.6 g 黄色油状物，产率 83%。ESI m/z $C_{24}H_{43}O_{11}S$ $[M+H]^+$：计算值 539.2，实测值 539.2。

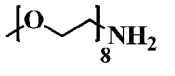
实施例 **61** 化合物 **61** 的合成



61

将化合物 **60**(11.6 g，21.5 mmol，1.0 eq)溶于 20 mL 无水 DMF 中，加入二苄胺(5.5 g，27.8 mmol，1.5 eq)，100 °C 反应过夜。次日，用 300 mL 二氯甲烷稀释，水洗(300 mL × 3)，盐水洗(300 mL)，无水硫酸钠干燥，旋干，用少量二氯甲烷溶解，上样过柱，洗脱液为 5%-100% 石油醚/乙酸乙酯，得到 8.2 g 浅黄色油状物，产率 66%。ESI m/z $C_{31}H_{50}NO_8$ $[M+H]^+$：计算值 564.3，实测值 564.3。

实施例 **62** 化合物 **62** 的合成

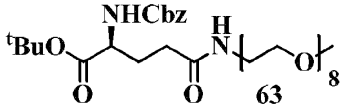


62

将化合物 **61**(8.6 g，15.2 mmol，1.0 eq)溶于 100 mL 无水甲醇中，加入干钯碳催化剂(0.9 g，10 wt%)，加热至回流回流，反应过夜。次日，过滤反应液，用甲醇洗涤，旋干，得到 5.3 g 无色油状物，产率 90%。ESI m/z

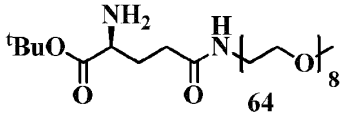
$C_{17}H_{38}NO_8$ [M+H]$^+$：计算值 384.3，实测值 384.3。

实施例 **63** 化合物 **63** 的合成



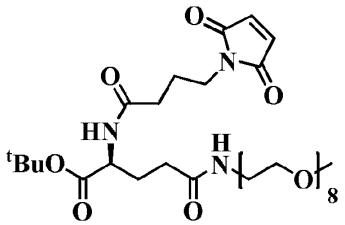
将 Z-L-谷氨酸叔丁酯(0.96 g，2.86 mmol)和化合物 **62**(1.1 g，2.86 mmol)溶于 DMF(20 mL)中，0 °C 下加入 HATU(1.2 g，3.15 mmol)和 DIPEA(1 mL，6.3 mmol)，加完慢慢升至室温反应 1 小时。将反应液倒入冰水中，用二氯甲烷萃取(3 × 50 mL)，合并有机相，水洗(30 mL)、饱和碳酸氢钠洗(30 mL)、饱和食盐水洗(30 mL)，硫酸钠干燥，过滤浓缩，用硅胶柱纯化(流动相为甲醇/二氯甲烷)得到产品 **63**(1.5 g，产率 75%)。ESI m/z $C_{34}H_{59}N_2O_{13}$ [M+H]$^+$：计算值 703.4，实测值 703.4。

实施例 **64** 化合物 **64** 的合成



将化合物 **63**(0.66 g，0.93 mmol)溶于甲醇(10 mL)中，加入 Pd/C(10 wt%，60 mg)，氢气球下反应 2 小时。过滤浓缩得到化合物 **64**(450 mg，85% 产率)。ESI m/z $C_{26}H_{53}N_2O_{11}$ [M+H]$^+$：计算值 569.4，实测值 569.4。

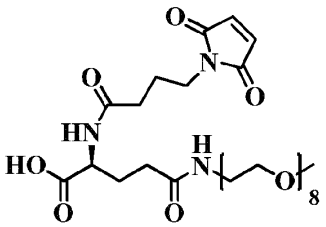
实施例 **65** 化合物 **65** 的合成



65

将化合物 **64**(0.45 g，0.79 mmol)和 4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯(0.33 g，1.18 mmol)溶于乙醇(5 mL)中，加入 NaH_2PO_4(0.1 N，1 mL)，室温反应过夜。减压浓缩除去大部分乙醇后加水(20 mL)，用二氯甲烷萃取(3 × 30 mL)，合并有机相，水洗(20 mL)、盐水洗(20 mL)、硫酸钠干燥、过滤浓缩，粗品用硅胶柱纯化(流动相为甲醇/二氯甲烷)得到化合物 **65**(380 mg，65% 产率)。ESI m/z $C_{34}H_{60}N_3O_{14}$ [M+H]$^+$：计算值 734.4，实测值 734.4。

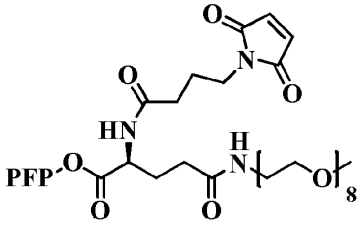
实施例 **66** 化合物 **66** 的合成



66

将化合物 **65**(230 mg， 0.31 mmol)溶于二氯甲烷(2 mL)中，加入三氟乙酸(2 mL)，室温反应 1 小时。浓缩后再用二氯甲烷带 3 次，并用油泵抽干，得到化合物 **66**(208 mg， 100%产率)。ESI m/z $C_{30}H_{52}N_3O_{14}$ $[M+H]^+$： 计算值 678.3， 实测值 678.3。

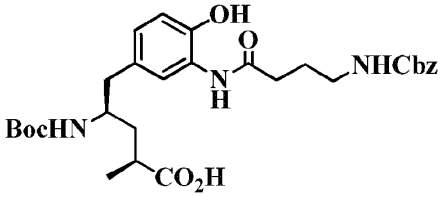
实施例 **67** 化合物 **67** 的合成



67

将化合物 **66**(208 mg， 0.3 mmol)溶于二氯甲烷(5 mL)中，加入五氟苯酚(113 mg， 0.6 mmol)和 EDC·HCl(117 mg， 0.6 mmol)，加完后在室温反应过夜。用二氯甲烷(20 mL)稀释，水洗(5 mL)、硫酸钠干燥、过滤浓缩得到化合物 **67**(252 mg， 100% 产率)。ESI m/z $C_{36}H_{51}F_5N_3O_{14}$ $[M+H]^+$： 计算值 844.3， 实测值 844.3。

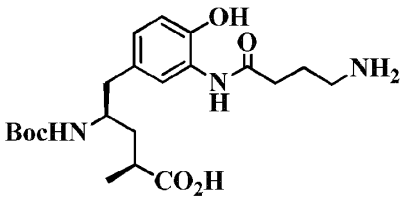
实施例 **68** 化合物 **68** 的合成



68

将化合物 **45**(7.3 g, 21.7 mmol)和 N-Boc-丙氨酸羟基琥珀酰亚胺酯(7.2 g, 21.7 mmol)溶于乙醇(300 mL)中，加入 0.1 N NaH_2PO_4(150 mL)，室温反应过夜。将反应液浓缩，加水(100 mL)，乙酸乙酯(3 × 50 mL)萃取，合并有机相，盐水洗(50 mL)、硫酸钠干燥、过滤浓缩，用硅胶柱纯化(流动相为乙酸乙酯/石油醚)，得到化合物 **68**(6.7 g, 55% 产率)。ESI m/z $C_{29}H_{40}N_3O_8$ $[M+H]^+$： 计算值 558.3， 实测值 558.3。

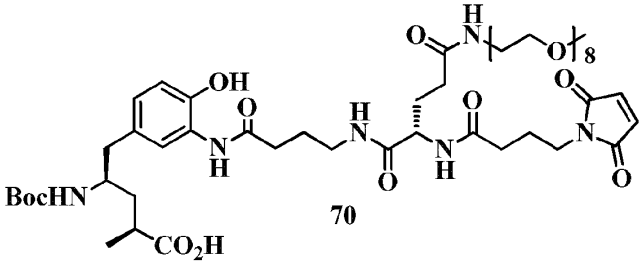
实施例 **69** 化合物 **69** 的合成



69

将化合物 **68**(6.7 g, 12 mmol)溶于甲醇(100 mL)中，加入 Pd/C(10 wt%, 0.67 g)，在氢气球下反应 2 小时。过滤，浓缩滤液得到化合物 **69**(5 g, 100% 产率)。ESI m/z $C_{21}H_{34}N_3O_6$ $[M+H]^+$： 计算值 424.2， 实测值 424.2。

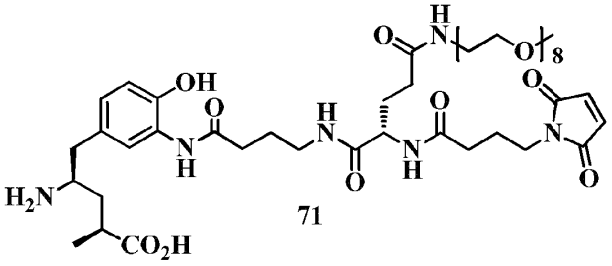
实施例 **70** 化合物 **70** 的合成



70

将化合物 **67**(252 mg， 0.3 mmol)和化合物 **69**(190 mg， 0.45 mmol)溶于 DMF(5 mL)中，冷却至 0 °C，加入 DIPEA(0.13 mL， 0.75 mmol)，加完后慢慢升到室温，反应 1 小时。加水(20 mL)稀释，用二氯甲烷萃取(3 × 10 mL)，合并有机相，水洗(10 mL)、1 N HCl 洗(10 mL)、盐水洗(10 mL)、硫酸钠干燥、过滤浓缩，粗品用硅胶柱(流动相为甲醇/二氯甲烷)纯化，得到化合物 **70**(180 mg， 55% 产率)。ESI m/z $C_{51}H_{83}N_6O_{19}$ $[M+H]^+$：计算值 1083.6，实测值 1083.6。

实施例 **71** 化合物 **71** 的合成

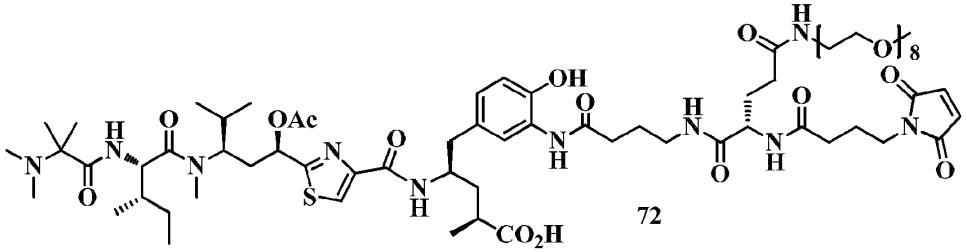


71

将化合物 **70**(8.2 g, 7.6 mmol)溶于二氯甲烷(56.8 mL)，加入三氟乙酸(18.9 mL)，室温反应 2 小时，浓缩，并用二氯甲烷共浓缩两遍，油泵抽干。向残留液体中加入乙醚(100 mL)，剧烈搅拌 1 小时，静置，弃去上清液，再重复操作两次，将下层液体在旋转蒸发仪上浓缩，并用油泵抽干，得化合物 **71** (9.2 g， >100%产率)。ESI m/z $C_{46}H_{75}N_6O_{17}$ $[M+H]^+$：计算值 983.51，

实测值 983.37。

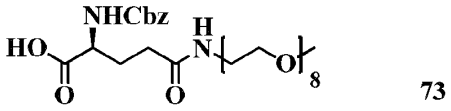
实施例 **72** 化合物 **72** 的合成



72

将化合物 **71**(8.2 g, 7.6 mmol)溶于 DMF(80mL)溶液，用冰水浴冷却反应瓶至 0-5 °C, 加入 **18**(5.2 g, 7.6 mmol)的 DMF 溶液(20 mL), 慢慢滴加 DIPEA(4 mL, 22.8 mmol)至反应瓶中。控制滴加速度，使整个滴加过程中反应液温度保持在 5-10°C 之间，滴加完成后，撤除冰水浴，让反应升温至室温，搅拌 1.5 小时。浓缩，并加二氯甲烷(100 mL)，冰浴下加入甲酸调节 pH 为 3-4，浓缩，硅胶柱纯化，洗脱液为 20-100%乙酸乙酯/正己烷和 0-20%甲醇/二氯甲烷(各含 0.1%甲酸)，将硅胶柱纯化所得的粗产品(11.44 g)再用制备 HPLC 纯化，洗脱液为 20-30%乙腈/水(各含 0.1%甲酸)，浓缩冻干得到化合物 **72**(6.8 g，收率 60%)。ESI m/z $C_{71}H_{115}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$：计算值 1491.78， 实测值 1492.01。

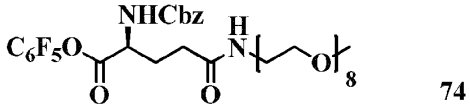
实施例 **73** 化合物 **73** 的合成



73

向无水甲酸(500 mL)和二氯甲烷(250 mL)的混合溶剂中投加化合物 **63**(22.4 g， 0.03 mol)。室温搅拌过夜，浓缩得到产物 19 g(产率 100%)。

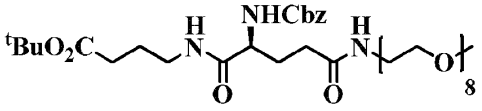
实施例 **74** 化合物 **74** 的合成



74

将化合物 **73**(19.0 g， 0.03 mol)溶于二氯甲烷(200 mL)中。室温下加入五氟苯酚(11.0 g， 0.06 mol)和 DIC(15.1 g， 0.12 mol)。搅拌反应 1 小时，浓缩得到产物粗品 45 g。

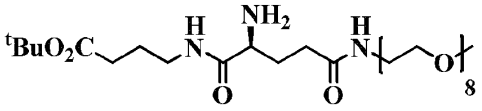
实施例 **75** 化合物 **75** 的合成



75

将 4-氨基丁酸叔丁酯(6.40 g， 0.04 mol)溶于 500 mL 的 DMF 中。冰水降温，加入 DIPEA(15.5 g， 0.12 mol)，保持 10 度至 20 度下慢慢加入化合物 **74**(45 g， 粗品，以 0.03 mol 计)。室温反应 1 小时，浓缩，加二氯甲烷稀释，水洗，水相用二氯甲烷萃取。合并有机相并用 0.2N 盐酸洗，饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。柱层析纯化(25%-100%乙酸乙酯/石油醚，再 0-5%甲醇/二氯甲烷)得到产物 19.5 g，产率 83%。

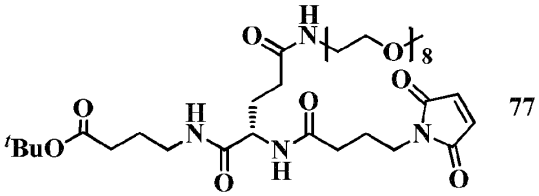
实施例 **76** 化合物 **76** 的合成



76

将化合物 **75**(19.5 g， 24.8 mmol)，钯碳(10 wt%，5 g)混合于 200 mL 甲醇中。室温下在氢气球下反应过夜。过滤，浓缩滤液，得产物 16.7 g(产率 100%)。

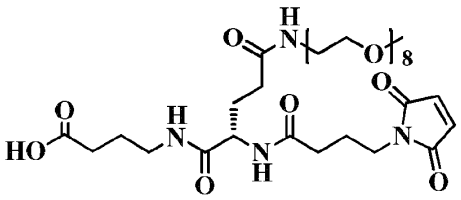
实施例 **77** 化合物 **77** 的合成



77

将化合物 **76** (16.7 g， 24.8 mmol)溶于 200 mL 的 DMF 中，冰水降温，加入 DIPEA (12.9 g， 0.10 mol)，保持反应液在 10 度至 20 度，慢慢加入化合物 **53**(30 g， 粗品，以 24.8 mmol 计)。室温反应 1 小时，浓缩，加二氯甲烷稀释，水洗，水相用二氯甲烷萃取。合并有机相，用 0.2 N 盐酸洗，饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。柱层析纯化(50%-100%乙酸乙酯/石油醚，再 10%甲醇/二氯甲烷)得到产物 20 g，产率 98%。

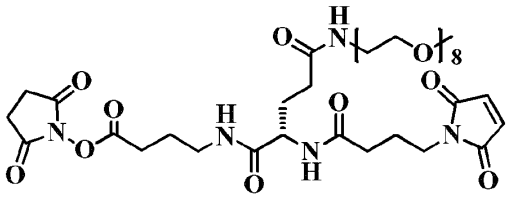
实施例 **78** 化合物 **78** 的合成



78

将化合物 **77** (16.8 g, 20.5 mmol)溶于二氯甲烷(60 mL)中，加入无水甲酸(120 mL)。室温反应过夜，浓缩，加乙酸乙酯(150 mL)稀释，用水(300 mL)萃取，弃去有机相，水相加固体氯化钠至饱和,然后用二氯甲烷(200ml×2)萃取，收集有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，柱层析纯化(0-20%甲醇/二氯甲烷)，得到化合物 **78** (16.4 g，收率>100%，含有部分甲酸)。ESI m/z $C_{34}H_{59}O_{15}N_4$ $[M+H]^+$： 计算值 763.39， 实测值 763.29。

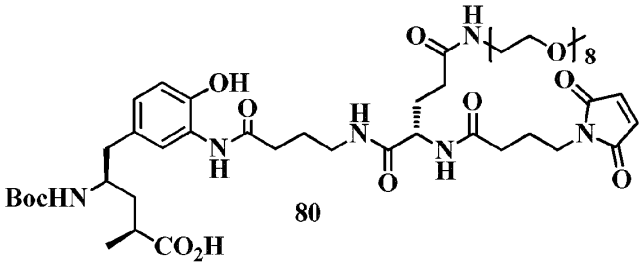
实施例 **79** 化合物 **79** 的合成



79

将化合物 **78**(15.6 g, 20.5 mol)溶于二氯甲烷(200 mL)中,室温下，依次加入 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 3.7 g, 32.3 mol)和 EDC·HCl(8.3 g, 43 mol)。室温反应 30 分钟，盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩得到化合物 **79** (17.6 g，收率 100%)。ESI m/z $C_{38}H_{62}O_{17}N_5$ $[M+H]^+$： 计算值 860.41， 实测值 860.29。

实施例 **80** 化合物 **80** 的合成



80

方法一：

将化合物 **79** (8.8 g, 10.2 mmol)和化合物 **45**(3.5 g, 10.2 mmol)溶于 200 mL 四氢呋喃中。加热至回流，搅拌过夜，浓缩，向粗品中加水(300 mL)和乙酸乙酯(100 mL)，搅拌，分出水相。向水相中加氯化钠至饱和，用二氯甲烷(2 × 150 mL)萃取，合并二氯甲烷，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。柱层析纯(0-20%甲醇/二氯甲烷)，得化合物 **80**(4.0 g，收率 36%)。ESI m/z $C_{51}H_{83}O_{19}N_6$ $[M+H]^+$：计算值 1083.56， 实测值 1083.47。

方法二：

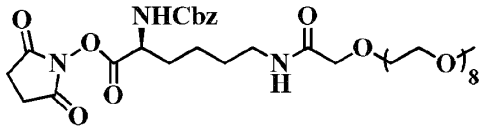
将化合物 **79** (4.4 g, 5.12 mmol)和化合物 **45**(1.73 g, 5.12 mmol)溶于 100

mL EtOH 中。然后加入 0.1N NaH_2PO_4 溶液(20 mL)，搅拌过夜。浓缩，粗品中加水(200 mL)和乙酸乙酯(100 mL)，搅拌，分出水相。向水相中加氯化钠至饱和，用二氯甲烷(2 × 100 mL)萃取，合并二氯甲烷，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。柱层析纯化(0-20%甲醇/二氯甲烷)，得化合物 **80**(2.0 g，收率 36%)。

方法三：

将化合物 **79** (4.4 g, 5.12 mmol)和化合物 **45**(1.73 g, 5.12 mmol)溶于 100 mL 乙腈中。然后加入 0.1N NaH_2PO_4 溶液(20 mL)，搅拌过夜。浓缩，粗品中加水(200 mL)和乙酸乙酯(100 mL)，搅拌，分出水相。向水相中加氯化钠至饱和，用二氯甲烷(2 × 100 mL)萃取，合并二氯甲烷，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩。柱层析纯化(0-20%甲醇/二氯甲烷)，得化合物 **80**(2.2 g，收率 40%)。

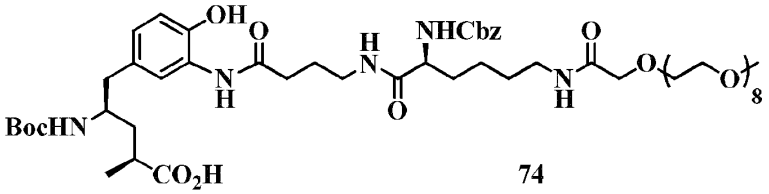
实施例 **81** 化合物 **73** 的合成



73

将化合物 **49**（20 g，28.4 mmol，1.0 eq.）溶解在 350 mL 无水二氯甲烷中，并在冰水浴上冷却。依次加入 NHS（3.9 g，34.1 mmol，1.2 eq.）和 EDC（27 g，142.0 mmol，5.0 eq.）。在室温下搅拌反应物过夜，然后用水（200 mL×2），盐水（200 mL×1）洗涤，用无水硫酸钠干燥，浓缩。将残余物溶于少量二氯甲烷中，并加载到硅胶柱上，用 2:49:49 至 4:48:48 甲醇/乙酸乙酯/二氯甲烷 洗脱。得到产物为黄色油状物（14.2 g，62%收率）。ESI m/z $C_{37}H_{60}N_3O_{16}$ $[M+H]^+$：计算值 802.4，实测值：802.4.

实施例 **82** 化合物 **74** 的合成.

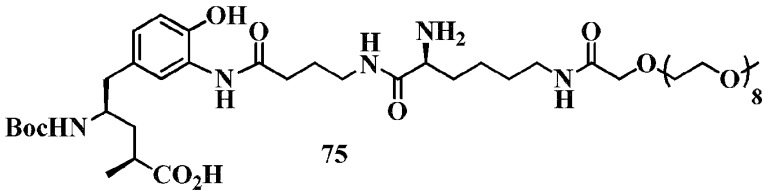


74

向化合物 **69**（6.4 g，15.1 mmol，1.0 eq）在 40 mL 乙醇和 10 mL 0.1M NaH_2PO_4 的混合物中加入化合物 **73**（12.7 g，15.9 mmol，1.05 eq）。将反应混合物搅拌过夜，浓缩并溶解在二氯甲烷中，经无水硫酸钠干燥，过滤，浓

缩，并通过硅胶柱（3-5%甲醇 / 二氯甲烷）纯化，得到白色泡沫（11.7 g，70%收率））。 ESI m/z $C_{54}H_{88}N_5O_{19}$ $[M+H]^+$： 计算值，实测值：1110.6，实测值：1110.6。

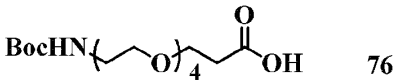
实施例 **83** 化合物 **75** 的合成.



75

将化合物 **74**（4.2 g，3.79 mmol，1.0 eq.）和钯碳（0.4 g，10 wt%）混合于 5 mL 甲醇中。室温下在氢气球下搅拌过夜，滤除催化剂并用甲醇洗涤，将滤液浓缩，得到 0.32 g 粗产物，将其直接用于下一步骤（产率 87%）。ESI m/z $C_{46}H_{82}N_5O_{17}$ $[M+H]^+$: 计算值 1997.1， 实测值：1997.1。

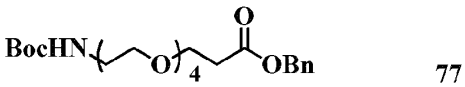
实施例 **84** 化合物 **76** 的合成.



76

在 500 mL 烧瓶中，将 H_2N-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（3.0 g，11.3 mmol，1.0 eq.）和 K_2CO_3（4.7 g，33.93 mmol，3.0 eq.）溶解在 50 mL 水中，并在冰水浴上冷却。 逐滴加入 Boc_2O（3.2 g，14.7 mmol，1.3）的 50 mL 四氢呋喃溶液。将反应温热至室温，然后搅拌过夜。 用 1N $KHSO_4$ 将反应混合物调节至 pH4-5，用二氯甲烷（200 mL×1,100 mL×3）萃取，用水（500 mL×1）和盐水（500 mL×1）洗涤，用无水硫酸钠干燥并且集中。 将残余物溶于少量二氯甲烷中，然后加载到硅胶柱上，用 2-4%甲醇 / 二氯甲烷洗脱，合并各组分并浓缩，得到 3.8 g 无色油状物（收率 93%）。ESI m/z $C_{16}H_{32}NO_8$ $[M+H]^+$计算值：366.2，实测值：366.2。

实施例 **85** 化合物 **77** 的合成

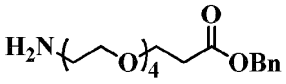


77

在 50 mL 单颈烧瓶中，混合 BocHN-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（0.81 g，2.22 mmol，1.0 eq.），K_2CO_3（0.92 g，6.66 mmol，3.0 eq.）和 NaI（0.033 g，0.222 mmol，0.1 eq.） 在 10 mL DMF 中，用冰水浴冷却，滴加 BnBr（0.57 g，3.33 mmol，1.5 eq.），将混合物温热至室温 并搅拌过夜。将反应混合物用 100 mL

水稀释，用二氯甲烷（100 mL×2）萃取，用水（200 mL×1）和盐水（200 mL×1）洗涤，用无水硫酸钠干燥，并浓缩。 将残余物溶于少量二氯甲烷中，加载到硅胶柱上，用 70-90％乙酸乙酯 / 石油醚洗脱，得到 0.69 g 无色油状物（69％收率）。ESI m/z $C_{23}H_{38}NO_8$ $[M+H]^+$计算值： 446.3，实测值：446.3。

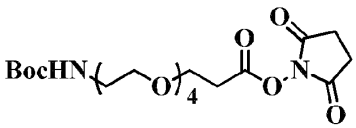
实施例 **86** 化合物 **78** 的合成



78

将 BocHN-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2Bn$（0.69 g，1.5 mmol，1.0 eq.）的 6 mL 二氯甲烷和 3 mL TFA 溶液在室温下搅拌 30 分钟。 除去溶剂，将残余物与二氯甲烷共浓缩三次，置于高真空泵上粗产物直接用于下一反应。ESI m/z $C_{18}H_{30}NO_6$ $[M+H]^+$：计算值 356.2，实测值 356.2。

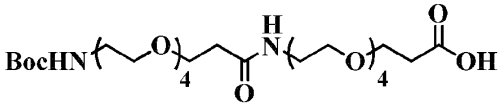
实施例 **87** 化合物 **79** 的合成



79

向 BocHN-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（3.8 g，10.4 mmol，1.0 eq.）在 50 mL 无水二氯甲烷中的溶液中加入 NHS（1.4 g，12.5 mmol，1.2 eq.）和 EDC（10.0 g，52.0 mmol，5.0 eq.），在室温下搅拌过夜，然后用水（50 mL×2），盐水（100 mL×1）洗涤，用无水硫酸钠干燥，浓缩。 粗产物直接用于下一步骤。ESI m/z$C_{20}H_{35}N_2O_{10}$$[M+H]^+$ ： 计算值 463.2,，实测值 463.2.。

实施例 **88** 化合物 **80** 的合成

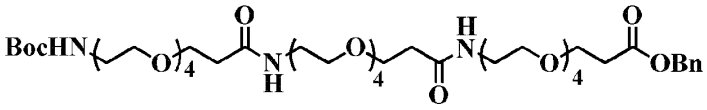


80

在 300 mL 烧瓶中，将 H_2N-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（2.8 g，10.4 mmol，1.0 eq.）和 K_2CO_3（4.3 g，31.2 mmol，3.0 eq.）溶解在 40 mL 水中，在冰水浴上冷却，并且逐滴加入化合物 **79** 的四氢呋喃（40 mL）溶液（3.8 g，10.4 mmol，1.0 eq.）并将混合物温热至室温并搅拌过夜。 使用 1N $KHSO_4$ 将反应混合物调节至 pH4-5，用二氯甲烷（150 mL×1,100 mL×2）萃取，用水（200 mL×1）和盐水（200 mL×1）洗涤，干燥 无水硫酸钠，浓缩。 将残余物溶于少量二氯甲烷中，并加载到硅胶柱上，用 4-6％甲醇 / 二氯甲烷洗脱，得到无色油状物

（5.18 g，81%收率）。ESI m/z $C_{27}H_{53}N_2O_{13}$ $[M+H]^+$：计算值 613.3,，实测值 613.3。

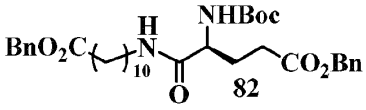
实施例 **89** 化合物 **81** 的合成



81

将 H_2N-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2Bn$（来自前一步骤的粗产物）溶解在 3 mL DMF 中，在冰/水浴上冷却，滴加 DIPEA（0.78 g，6.0 mmol，4.0 eq.），然后加入化合物 **80**（0.93 g，1.5 mmol，1.0 eq.）的 DMF（7 mL）溶液和 HATU（1.72 g，4.5 mmol，3.0 eq.）。 将反应物在冰浴上搅拌 2 小时，并用 100 mL 水稀释，用二氯甲烷（100 mL×3）萃取，用 1N $KHSO_4$（200 mL×1），饱和碳酸氢钠（200 mL×1）和盐水（200 mL×1）洗涤，用无水硫酸钠干燥，浓缩。 将残余物溶于少量二氯甲烷中，加载到硅胶柱上，并用 0-5%甲醇 / 二氯甲烷洗脱。 合并浓缩，得到 1.0 g 淡黄色油状物（71%收率）。ESI m/z $C_{45}H_{80}N_3O_{18}$ $[M+H]^+$：计算值 950.5，实测值 950.5.

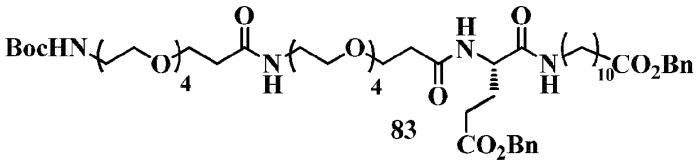
实施例 **90** 化合物 **82** 的合成



82

在 11-氨基十一酸苄酯（2.91 g，10.0 mmol）和 Boc- Glu（OBzl）-OH（3.37 g，10.0 mmol）的 DMF（50 mL）溶液中，加入 EDC（1.91 g，12.0 mmol）和三乙胺（3.5 mL，25.0 mmol）。 在室温下搅拌 8 小时，用水（100 mL）稀释，用乙酸乙酯（3×100 mL）萃取。 将合并的有机相用 100 mL 盐水洗涤一次，然后经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。 通过硅胶柱色谱（乙酸乙酯 / 二氯甲烷，1：15）纯化残余物，得到标题化合物，为无色油状物（5.37 g，88%收率）。

实施例 **91** 化合物 **83** 的合成

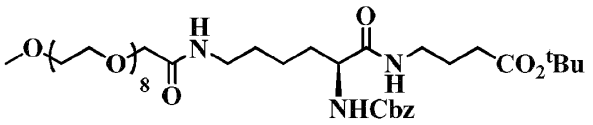


83

在室温下，将化合物 **82**（0.64 g，1.05 mmol，1.0 eq.）在 5 mL 二氯甲烷和 2 mL TFA 的混合溶液中搅拌 2 小时，然后浓缩。将残余物与二氯甲烷共

浓缩三次并置于高真空泵下。将上述粗产物重新溶解在 3 mL DMF 中，并在冰水浴上冷却。向其中加入化合物 **80**（0.64 g，1.05 mmol，1.0 eq.）的 DMF（7 mL）溶液中，然后加入 DIPEA（0.54 g，4.20 mmol，4.0 eq.）和 HATU（1.2 g，3.15 mmol，3.0 eq.）。将反应物在冰浴上搅拌 1 小时，然后加入 100 mL 水，并用二氯甲烷（150 mL×1,100 mL×1）萃取。将有机相用 1N $KHSO_4$（200 mL×1），饱和碳酸氢钠（200 mL×1）和盐水（200 mL×1）洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。将粗产物溶于少量二氯甲烷中，并加载到硅胶柱上，然后用 0-10％甲醇 / 二氯甲烷洗脱。合并组分并浓缩，得到 0.94 g 淡黄色油状物（81％收率）。 ESI m / z $C_{57}H_{92}N_4O_{17}$ $[M+H]^+$ ：计算值 1104.6，实测值：1104.6。

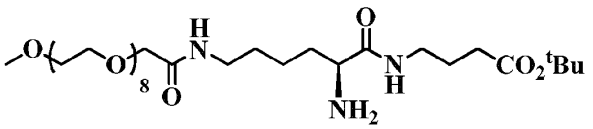
实施例 **92** 化合物 **84** 的合成



84

在 0℃下，向 4-氨基丁酸叔丁酯（1.03 g，6.12 mmol）和化合物 **49**（3.91 g，5.56 mmol）的 DMF（18 mL）溶液中，加入 HATU（2.32 g，6.12 mmol）和 TEA（1.2 mL，8.34 mmol）。 将反应搅拌 1 小时，然后用水（300 mL）稀释，并用乙酸乙酯（3×250 mL）萃取。 将有机溶液用盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩并通过硅胶柱色谱法（32：1 二氯甲烷/甲醇）纯化，得到标题化合物 (5.10 g, 99%产率). ESI MS m/z 846.50 ($[M+H]^+$)

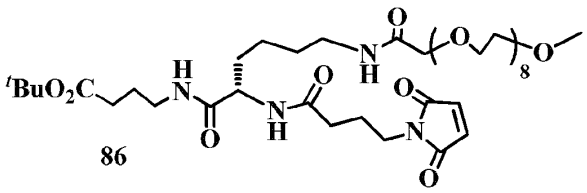
实施例 **93** 化合物 **85** 的合成



85

将化合物 **84**（1.0 g，1.18 mmol）和 Pd / C（10wt%，0.10 g）加入到含有甲醇（50 mL）的氢化瓶中。 将混合物振荡 2 小时，通过硅藻土（助滤剂）过滤，浓缩滤液，得到化合物 **85**(0.93 g,产率＞100%). ESI MS m/z 712.50 ($[M+H]^+$).

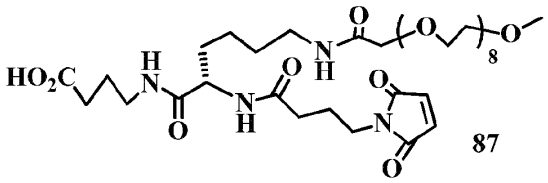
实施例 **94** 化合物 **86** 的合成



86

将化合物 **85** 溶解在 95%EtOH(50 mL)和 NaH_2PO_4 溶液(0.1M, pH 5.0,10 mL）中，加入 N-琥珀酰亚胺基 4-马来酰亚胺基丁酸酯（0.50 g，1.77 mmol，1.5 eq)，将混合物搅拌过夜，然后浓缩，用水（50 mL）稀释，用二氯甲烷（80 mL×3）萃取，经无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，并通过硅胶柱色谱法（25：1 二氯甲烷/甲醇）纯化。 得到标题化合物，为浅黄色油状物（0.82 g，80%)。

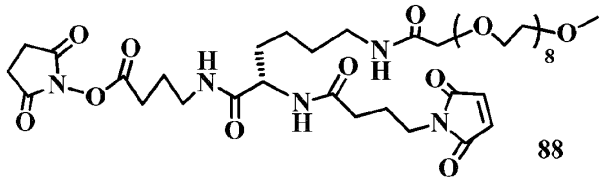
实施例 **95** 化合物 **87** 的合成。



87

将化合物 **86**（0.82 g，0.94 mmol）溶解在 HCOOH（50 mL）中并在室温下搅拌 1 小时。 浓缩反应混合物并与甲苯共浓缩两次，将残余物置于真空泵上，得到化合物 **87**（0.80 g，粗产物)。ESI MS m/z ($[M+H]^+$)值： 820.45。

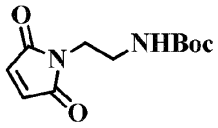
实施例 **96** 化合物 **88** 的合成



88

向化合物 **87**（0.80 g，粗品，0.94 mmol）的 DMA（5.0 mL）溶液中加入 NHS（0.12 g，1.03 mmol）和 EDC·HCl（0.27 g，1.41 mmol)，并将反应混合物搅拌 2 小时，然后用水（15 mL）稀释，并用乙酸乙酯（3×10 mL）萃取。 将合并的有机相用盐水（10 mL）洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。 通过硅胶柱（10-50%乙酸乙酯/石油醚）纯化残余物，得到无色油状化合物（0.67 g，78%产率)。ESI MS m/z ($[M+H]^+$) 值：918.55

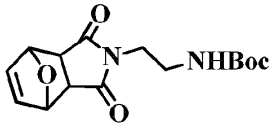
实施例 **97** 化合物 **89** 的合成



89

将 N-Boc-乙二胺（5.6 mL，35.4 mmol，1.1 eq.）和饱和 $NaHCO_3$（60 mL）的混合物冷却至 0℃，向其中分批添加加入 N-甲氧基羰基马来酰亚胺（5.00 g，32.2 mmol，1.0 eq.）。在 0℃下搅拌 30 分钟后，将反应温热至室温， 搅拌 1 小时。 过滤收集沉淀物，用冷水洗涤，然后溶于乙酸乙酯中，用盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥，浓缩，得到白色固体（6.69 g，87％收率）。ESI MS m/z ($[M+H]^+$) 值：241.12。

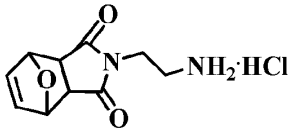
实施例 **98** 化合物 **90** 的合成



90

在高压管中，将化合物 **89**（6.00 g，25.0 mmol），呋喃（18.0 mL）的甲苯（120 mL）溶液加热至回流并搅拌 16 小时。 无色溶液在反应过程中变黄，然后将混合物冷却至室温并且浓缩。 将得到的白色固体用乙醚打浆，得到化合物 **90**（6.5 g，84％收率）。ESI MS m/z ($[M+H]^+$)值：309.13。

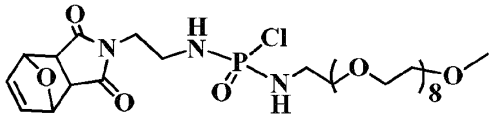
实施例 **99** 化合物 **91** 的合成



91

在室温下，将化合物 **90**（9.93 g，32.2 mmol）的二恶烷（15 mL）溶液与浓 HCl（15 mL）反应 3 小时，过滤收集所得固体，用乙酸乙酯洗涤滤饼。将固体在烘箱（50℃）中干燥过夜，得到化合物 **91**（6.94 g，88％收率）。ESI MS m/z ([M+H]+) 值：206.05。

实施例 **100** 化合物 **92** 的合成

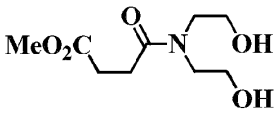


92

在-10℃下，向化合物 **91**（1.22 g，5 mmol）的四氢呋喃（10 mL）溶液中加入 $POCl_3$（0.47 mL，5 mmol）。 搅拌 10 分钟后，加入

2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧二十八烷-28-胺（2.14 g，5 mmol），然后加入DIPEA（0.87 mL，5 mmol）。将反应温热至0℃并搅拌3小时，然后浓缩。将残余物用二氯甲烷（10 mL）稀释，用硅藻土过滤，将滤液直接用于下一步骤。ESI MS m/z ([M+H]$^+$) 值：716.29。

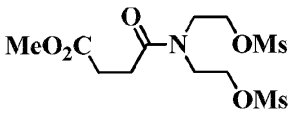
实施例 **101** 化合物 **93** 的合成



93

将琥珀酸二甲酯（20.0 g，136.9 mmol）和二羟乙胺（7.20 g，68.7 mmol）的无水甲苯（500 mL）和吡啶（50 mL）的混合物在150℃加热28小时。浓缩混合物，在硅胶柱上纯化，用5-25%乙酸乙酯/二氯甲烷洗脱，得到标题化合物（12.5 g，83%收率）。ESI MS m/z （[M+Na]$^+$）值：242.42。

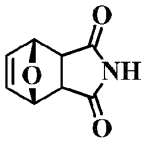
实施例 **102** 化合物 **94** 的合成



94

向化合物 **93**（12.0 g，49.56 mmol）的无水吡啶（350 mL）溶液中加入甲磺酰氯（20.0 g，175.4 mmol）。搅拌过夜后，浓缩混合物，用乙酸乙酯（350 mL）稀释，用冷的1M NaH_2PO_4（2×300 mL）洗涤，经 $MgSO_4$ 干燥，过滤并浓缩，得到粗产物（18.8 g，>100%产率））。粗产物无需进一步纯化即可用于下一步骤。ESI MS m/z ([M+H]$^+$)值：376.06

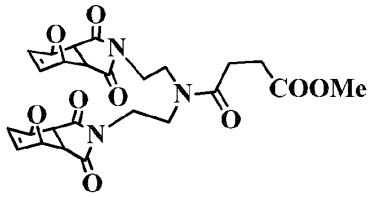
实施例 **103** 化合物 **95** 的合成



95

向马来酰亚胺（10.0 g，103.0 mmol）的甲苯（200 mL）溶液中加入呋喃（10.0 mL，137.4 mmol）。将混合物在100℃下加热8小时，冷却至室温，浓缩并在乙酸乙酯/己烷中结晶，用甲醇洗涤固体，得到16.7 g（99%）标题化合物。^{1}H NMR (CDC_{l3}): 11.12 (s, 1H), 6.68~6.64 (m, 2H), 5.18~5.13 (m, 2H), 2.97 ~2.92 (m, 2H)。ESI MS m/z （[M+Na]$^+$）值：188.04。

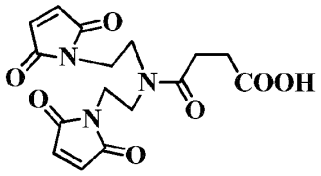
实施例 **104** 化合物 **96** 的合成



96

向化合物 **94**（新鲜制备，90%纯，8.5 g，约 20 mmol）的 DMA（350 mL）溶液中， 加入化合物 **95**（10.2 g，61.8 mmol），碳酸钠（8.0 g，75.5 mmol）和碘化钠（0.3 g，2.0 mmol）。 将混合物在室温下搅拌过夜，浓缩，用乙酸乙酯（350 mL）稀释，用饱和 $NaHCO_3$ 溶液（300 mL），饱和 NaCl 溶液（300 mL）和 1M NaH_2PO_4（300 mL）洗涤。 用硫酸钠干燥有机层，过滤，浓缩，上样于硅胶柱上，用 10-30%乙酸乙酯/正己烷洗脱，得到标题化合物（7.9 g，77%收率。ESI MS m/z（$[M + Na]^+$） 值：536.4。

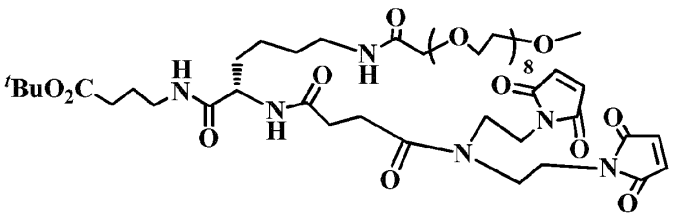
实施例 **105** 化合物 **97** 的合成



97

将化合物 **96**（3.0 g，5.8 mmol）和三甲基甲锡烷醇（4.8 g，26.4 mmol）的 1,2-二氯乙烷（150 mL）溶液在 80°C下回流 8 小时，然后冷却至室温，并使残余物通过短硅胶柱，用二氯甲烷/甲醇洗脱，除去过量的三甲基氢氧化锡。合并组分，浓缩后用 DMA 和甲苯稀释，加热至 120°C并搅拌过夜。 将反应混合物上样到硅胶柱，用 5-10%甲醇/二氯甲烷洗脱，得到标题化合物（1.62 g，76%收率）。ESI MS m/z （$[M + Na]^+$）值：386.2。

实施例 **106** 化合物 **98** 的合成

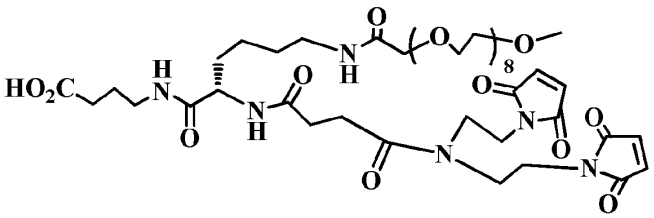


98

向化合物 **97**（1.62 g，4.20 mmol）和化合物 **85**（2.71 g，3.82 mmol）的 DMA（20 mL）溶液中加入 EDC·HCl（0.81 g，4.20 mmol）。 在室温下搅拌反应。 过夜，然后倒入水（50 mL）中并用乙酸乙酯（3×40 mL）萃取。 将

合并的有机相用盐水（40 mL）洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。 通过柱色谱（10-50％乙酸乙酯/石油醚）纯化残余物，得到无色油状物（3.20 g，80％收率）。ESI MS m/z ([M+H]$^+$) 值：1057.85。

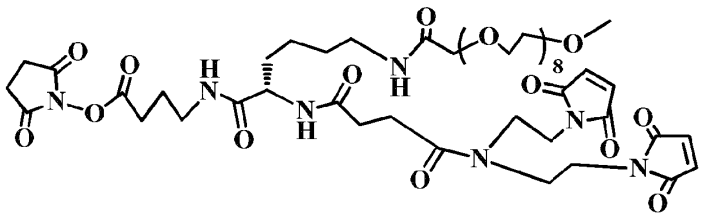
实施例 **107** 化合物 **99** 的合成



99

将化合物 **98**（3.20 g，3.03 mmol）的甲酸（10 mL）溶液在室温下搅拌过夜。 然后将溶液浓缩并与甲苯共浓缩三次，得到无色油状物（3.00 g，粗品），其无需进一步纯化即可使用。ESI MS m/z ([M+H]$^+$) 值：1001.50。

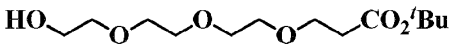
实施例 **108** 化合物 **100** 的合成



100

向化合物 **99**（3.00 g，粗产物，3.03 mmol）的 DMA（15.0 mL）溶液中加入 NHS（0.38 g，3.33 mmol）和 EDC·HCl（0.87 g，4.55 mmol），并将反应混合物室温搅拌 2 小时，然后用水（50 mL）稀释，并用乙酸乙酯（3×30 mL）萃取。 将合并的有机相用盐水（30 mL）洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。 通过硅胶柱（10-50％乙酸乙酯/石油醚）纯化残余物，得到无色油状物（2.90 g，90％收率）。ESI MS m/z ([M+H]$^+$)值：1098.50。

实施例 **109** 化合物 **101** 的合成

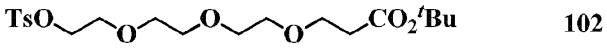


101

向 2,2' -（乙烷-1,2-二基双（氧基））二乙醇（55.0 mL，410.75 mmol，3.0 eq.）的无水四氢呋喃（200 mL）溶液中加入钠（0.1 g） 搅拌混合物直至 Na 消失，然后滴加丙烯酸叔丁酯（20.0 mL，137.79 mmol，1.0 eq.）。 将混合物搅拌过夜，然后在 0℃下用 HCl 溶液（20.0 mL，1N）淬灭。 通过旋转浓缩除去四氢呋喃，加入盐水（300 mL），用乙酸乙酯（3×100 mL）萃取。

将有机层用盐水（3×300 mL）洗涤有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，得到无色油状物（30.20 g，79.0%产率），其不经进一步纯化而使用。MS ESI m/z ([M+H]$^+$)值： 278.17。

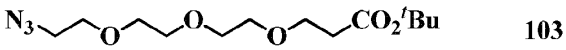
实施例 **110** 化合物 **102** 的合成



102

在 0℃下，向 3-（2-（2-（2-羟基乙氧基）乙氧基）乙氧基）丙酸叔丁酯（30.20 g，108.5 mmol，1.0 eq.）无水二氯甲烷（220 mL）溶液中，加入 TsCl（41.37 g，217.0 mmol，2.0 eq.）和 TEA（30.0 mL，217.0 mmol，2.0 eq.）。将混合物在室温下搅拌过夜，然后用水（3×300 mL）和盐水（300 mL）洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩并通过硅胶柱色谱法（3：1 己烷/乙基）纯化。 得到无色油状物（39.4 g，收率 84.0%）。MS ESI m/z ([M+H]$^+$)值：433.28。.

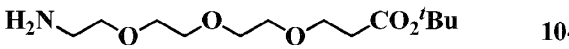
实施例 **111** 化合物 **103** 的合成



103

向 3-（2-（2-（2-（甲苯磺酰氧基）乙氧基）乙氧基）乙氧基）丙酸叔丁酯（39.4 g，91.1 mmol，1.0 eq.）无水 DMF（100 mL）溶液中加入 NaN_3（20.67 g，316.6 mmol，3.5 eq.）。 将混合物在室温下搅拌过夜。 加入水（500 mL）并用乙酸乙酯（3×300 mL）萃取。 将合并的有机层用水（3×900 mL）和盐水（900 mL）洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩并通过硅胶柱色谱法（5：1 己烷/乙酸乙酯）纯化，得到无色黄色油状物（23.8 g，收率 85.53%）。MS ESI m/z ([M + Na]$^+$) 值：326.2。

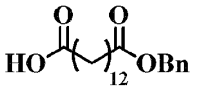
实施例 **112** 化合物 **104** 的合成



104

将 Raney-Ni（7.5 g，悬浮在水中）用水（三次）和异丙醇（三次）洗涤，并与化合物 **103**（5.0 g，16.5 mmol）在异丙醇中混合。 将混合物在氢气球下室温下搅拌 16 小时，然后用硅藻土垫过滤，用异丙醇洗涤垫并浓缩滤液，通过柱色谱（5-25%甲醇/二氯甲烷）纯化，得到浅黄色油状物（2.60 g，57%收率）。MS ESI m/z ([M+H]$^+$) 值：279.19。

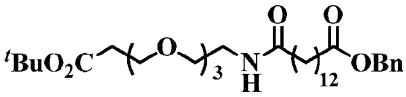
实施例 **113** 化合物 **105** 的合成



105

向十四烷二酸（2.06 g，8 mmol）的 DMF（30 mL）溶液中加入 K_2CO_3（1.1 g，8 mmol）和苄基溴（1.36 g，8 mmol）。 将混合物在室温下搅拌过夜，然后浓缩并通过柱色谱（乙酸乙酯/石油醚）纯化，得到标题化合物 **105**（1.2 g，45%收率）。ESI MS m/z ($[M+H]^+$)值：349.23。

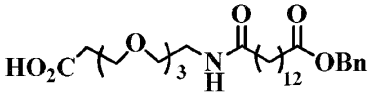
实施例 **114** 化合物 **106** 的合成



106

向化合物 **104**（2.60 g，9.35 mmol）和化合物 **105**（3.91 g，11.2 mmol）的二氯甲烷（50 mL）溶液中加入 EDC·HCl（2.15 g，11.2 mmol）和 DIPEA（3.6 mL，20.6 mmol）。将反应混合物在室温下搅拌 1 小时，然后用 50 mL 二氯甲烷稀释，倒入含有 50 mL 水的分液漏斗中。 分离有机相，用盐水（50 mL）洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。 通过柱色谱（0-10%甲醇/二氯甲烷）纯化残余物，得到标题化合物（4.94 g，87%产率）。ESI m/z ($[M+H]^+$)值：608.40。

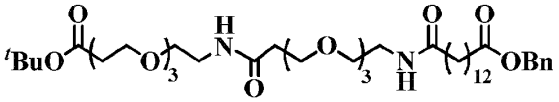
实施例 **115** 化合物 **107** 的合成



107

向化合物 **106**（4.94 g，8.14 mmol）的二氯甲烷（20 mL）溶液中加入 TFA（20 mL）。 将反应物在室温下搅拌 1 小时，然后浓缩至干燥并与二氯甲烷共浓缩两次，并将残余物置于泵上，得到化合物 **107**（4.50 g，粗产物）。ESI MS m/z ($[M+H]^+$) 值：552.35。

化合物 **116** 化合物 **108** 的合成

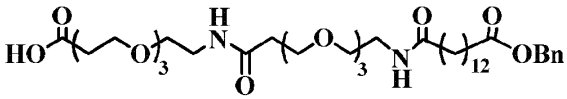


108

向化合物 **107**（4.50 g，粗产物，8.14 mmol）和化合物 **104**（1.95 g，7.00 mmol）的二氯甲烷（50 mL）溶液中加 EDC·HCl（1.56 g，8.14 mmol）和 DIPEA（2.7 mL，15.4 mmol）。 将反应混合物在室温下搅拌 1 小时，然后用

50 mL 二氯甲烷稀释，倒入含有 50 mL 水的分液漏斗中。 分离有机相，用盐水（50 mL）洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。 通过柱色谱（0-10％甲醇/二氯甲烷）纯化残余物，得到标题化合物 **108**（5.22 g，92％收率）。 ESI m/z ([M+H]$^+$)值： 811.52。

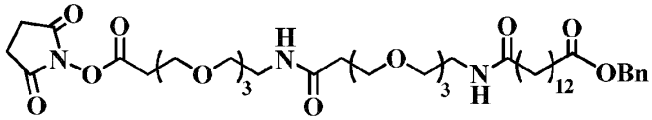
化合物 **117** 化合物 **109** 的合成



109

向化合物 **108**（5.22 g，6.44 mmol）的二氯甲烷（20 mL）溶液中加入 TFA（5 mL）。 将反应物在室温下搅拌 1 小时，然后浓缩至干燥并与二氯甲烷共浓缩两次，并将残余物置于泵上，得到化合物 **109**（4.90 g，粗产物。 ESI MS m/z ([M+H]$^+$) 值 755.46。

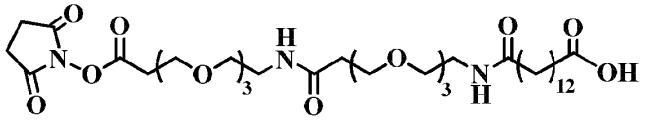
实施例 **118** 化合物 **110** 的合成



110

向化合物 **109**（4.90 g，粗产物，6.44 mmol）的二氯甲烷（30 mL）溶液中添加 NHS（0.81 g，7.08 mmol），EDC·HCl（1.85 g，9.66 mmol）和 DIPEA（2.8 mL，16.1 mmol）。 将反应混合物在室温下搅拌 2 小时，然后用水（50 mL）稀释，并用乙酸乙酯（3×30 mL）萃取。 将合并的有机相用盐水（30 mL）洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。 通过硅胶柱（10-50％乙酸乙酯/石油醚）纯化残余物，得到无色油 236（4.90 g，90％收率）。ESI MS m/z ([M+H]$^+$) 值：852.48。

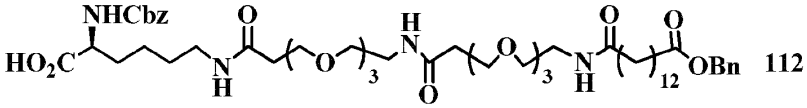
实施例 **119** 化合物 **111** 的合成



111

在氢化瓶中，向化合物 **110**（4.90 g，5.75 mmol）的四氢呋喃（20 mL）溶液中加入 Pd / C（10wt％，0.20 g）。 将混合物在 1atm 氢气下搅拌过夜，通过硅藻土（助滤剂）过滤，并将过滤的溶液浓缩，得到化合物 **111**（4.50 g，> 100％产率）。 ESI MS m/z ([M+H]$^+$)值：762.44。

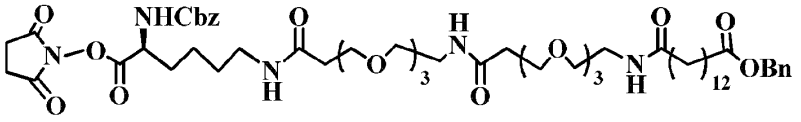
实施例 **120** 化合物 **112** 的合成



112

在0℃下，向化合物**111**（1.00 g，1.32 mmol）的二氯甲烷（10 mL）溶液中加入HATU（0.50 g，1.32 mmol）和三乙胺（0.06 mL，1.32 mmol）。将反应在0℃下搅拌30分钟，然后加入Z-Lys-OH（0.40 g，1.43 mmol），在室温下搅拌1小时，然后用水（20 mL）稀释，并用乙酸乙酯（3×20 mL）萃取。将合并的有机相用盐水（30 mL）洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。通过硅胶柱（0-10%甲醇/二氯甲烷）纯化残余物，得到无色油状物**112**（1.28 g，95%收率）。ESI MS m/z ([M+H]$^+$)值：1017.60。

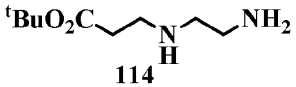
实施例**121** 化合物**113**的合成



113

向化合物**112**（1.28 g，1.26 mmol）的二氯甲烷（10 mL）溶液中加入NHS（0.17 g，1.51 mmol）和EDC·HCl（0.29 g，1.51 mmol），然后加入三乙胺（0.38 mL， 2.77 mmol）。在室温下搅拌反应2小时，然后用水（20 mL）稀释，并用乙酸乙酯（3×15 mL）萃取。将合并的有机相用盐水（30 mL）洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。通过硅胶柱（0-10%甲醇/二氯甲烷)纯化残余物,得到无色油状物**113**(1.28 g,91%收率)。ESI MS m/z([M+H]$^+$)值：1114.62。

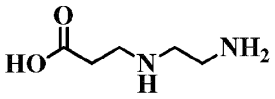
实施例**122** 化合物**114**的合成



114

将丙烯酸叔丁酯(12.81 g, 0.10 mmol)和乙基-1,2-二胺(24.3 g, 0.40mol)的四氢呋喃（150 mL）溶液在45℃下搅拌24小时。将混合物浓缩并在Al_2O_3凝胶柱上纯化，用甲醇 /二氯甲烷（三乙胺）(5%：15%：80%）洗脱，得到标题化合物（17.50 g，92%收率）。ESI MS m/z ([M+H]$^+$) ：值189.20。

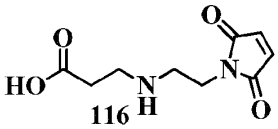
实施例**123** 化合物**115**的合成



115

将 3 -（(2-氨基乙基）氨基）丙酸叔丁酯（17.00 g，90.33 mmol）的 1,4-二恶烷（50 mL）溶液与浓盐酸（15 毫升）在室温下搅拌 30 分钟，浓缩并用纯水（150 mL）和乙酸乙酯 /己烷（40 mL，1：5）稀释。 分离混合物，用水（2×10 mL）萃取有机层。 浓缩水层并经真空泵干燥，得到标题化合物（18.70 g，100％收率，通过 LC-MS 纯度为 96％）。ESI MS m/z ([M+H]$^+$)值：133.20。

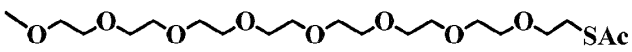
实施例 **124** 化合物 **116** 的合成



116

在 0℃下，向 3 -（(2-氨基乙基）氨基）丙酸（18.70 g，90.33 mmol）的四氢呋喃（150 mL）溶液中加入马来酸酐（8.85 g，90.33 mmol）。将混合物在 0-4℃下搅拌 4 小时，浓缩，得到（Z）-4 - （2 -（(2-羧乙基）氨基）乙基）氨基）-4-氧代丁-2-烯酸，然后向混合物中加入甲苯（150 mL）和 DMA（50 mL），在 90℃下搅拌，用 Dean-Stark 分水器回流。在捕集器中收集 30 mL 溶剂后，加入 HMDS（六甲基二硅氮烷，9.0 mL，43.15 mmol）和 $ZnCl_2$（16 mL，1.0M 的乙醚溶液）。将混合物加热至 115-125℃，并通过 Dean-Stark 分水器收集甲苯。将反应混合物在 120℃下加热 6 小时。在此期间，加入 2×40 mL 无水甲苯以保持混合物体积约 50 mL。然后冷却混合物并加入 1 mL 1:10 HCl（浓）/ 甲醇。浓缩混合物，在硅胶柱上纯化，用水/乙腈（1:15）洗脱，浓缩，真空泵干燥，得到标题化合物 14.75 g（收率 77.0％）。 ESI MS m/z ([M+H]$^+$)值： 213.10。

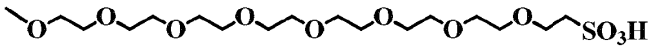
实施例 **125** 化合物 **117** 的合成



117

在四氢呋喃（300 mL），DIPEA（50 mL）和 HSAc（10.0 g，0.131mol）的混合物中加入化合物 **60**（57.30 g，0.106mol）。将混合物搅拌过夜，浓缩并在硅胶柱上纯化，用乙酸乙酯 / 二氯甲烷（1：2 至 4：1）洗脱，浓缩，并经真空泵干燥，得到标题化合物 40.51 g（86％收率）。ESI MS m/z ([M+H]$^+$)值：443.35。

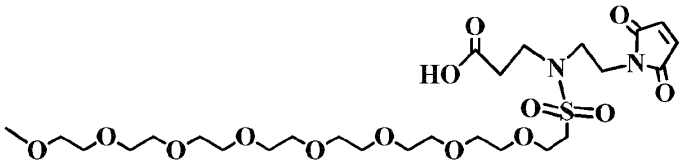
实施例 **126** 化合物 **118** 的合成



118

在乙酸（200 mL）和 30%H_2O_2（100 mL）的混合物中加入化合物 **117**（40.40 g, 0.091mol）。在 35°C下搅拌过夜。浓缩混合物，用纯水（200 mL）和甲苯（150 mL）稀释，分离，有机层用水（2×25 mL）萃取。合并水溶液，浓缩并经真空泵干燥，得到标题化合物 40.50 g（收率 99%，LC-MS 纯度 95%） ESI MS m/z ($[M+H]^+$)值： 449.30

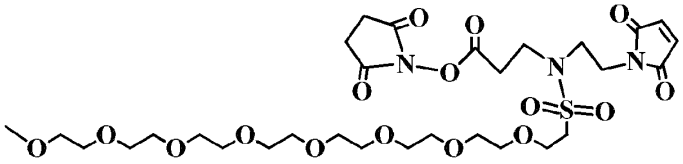
实施例 **127** 化合物 **119** 的合成



119

向化合物 **118**（20.0 g，44.62 mmol）的四氢呋喃（100 mL）和二氯甲烷（100 mL)的混合物中依次加入草酰氯(25.21 g, 200.19 mmol)和 DMF(0.015 mL)。将混合物在室温下搅拌 2 小时，浓缩，与二氯甲烷 /甲苯（1：1,2×50 mL）共浓缩，然后再溶于四氢呋喃（50 mL）中。加入化合物 **116**（7.50 g，35.36 mmol）的四氢呋喃（100 mL）溶液。将混合物搅拌过夜，真空浓缩并在硅胶柱上纯化，用甲醇 / 二氯甲烷（1：6 至 1：5）洗脱，并经真空泵干燥，得到标题化合物 14.76 g（65%收率）。ESI MS m/z ($[M+H]^+$)值：643.35。

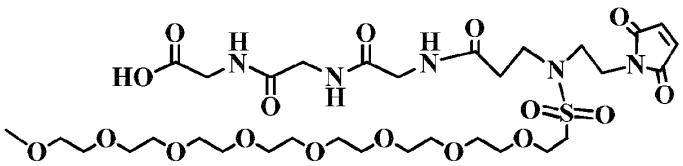
实施例 **128** 化合物 **120** 的合成



120

将化合物 **119**（7.50 g，11.67 mmol），N-羟基琥珀酰亚胺（1.50 g，13.04 mmol）和 EDC（10.10 g，52.60 mmol）的四氢呋喃（100 mL）溶液搅拌过夜，真空浓缩并在硅胶柱上纯化，用乙酸乙酯/ 二氯甲烷（1：4 至 2：1）洗脱，并经真空泵干燥，得到标题化合物 6.30 g（73%收率）。ESI MS m/z ($[M+H]^+$)值：740.40

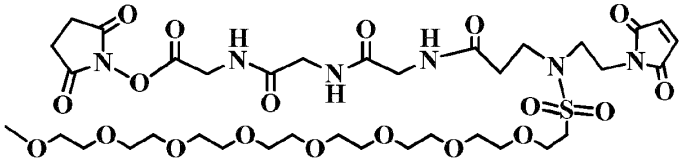
实施例 **129** 化合物 **121** 的合成



121

在 0°C下，向 2-（2-（2-（2-氨基乙酰氨基）乙酰氨基）乙酰氨基）乙酸（ gly- gly- gly）（0.50 g，2.03 mmol）和化合物 **120**（1.65 g，2.22 mmol）的 DMF（15 mL）溶液中加入 DIPEA（3 mL）。 将反应混合物在 0°C下搅拌 0.5 小时，然后在室温下搅拌 4 小时。 然后浓缩反应混合物，并通过硅胶色谱法（流动相：乙腈/水= 95：5，含有 0.1％甲酸）纯化，得到标题化合物 **121**（1.04 g，63％收率）。MS-ESI m/z $C_{32}H_{56}N_5O_{17}S$ $[M+H]^+$ 计算值 14.33，实测值 814.46。

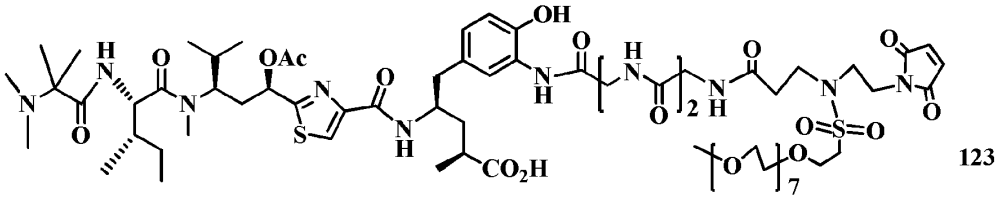
实施例 **130** 化合物 **122** 的合成



122

将化合物 **121**（0.70 g，0.86 mmol），N-羟基琥珀酰亚胺（0.20 g，1.73 mmol）和 EDC（1.21 g，6.36 mmol）的四氢呋喃（20 mL）溶液，室温搅拌过夜，真空浓缩并在硅胶柱上纯化。 用乙酸乙酯 / 二氯甲烷（1：4 至 2：1）洗脱，并经真空泵干燥，得到标题化合物 0.540 g（69％收率）。 MS-ESI m/z $C_{36}H_{59}N_6O19S[M+H]^+$：计算值 911.34，实测值 911.42。

实施例 **131** 化合物 **123** 的合成

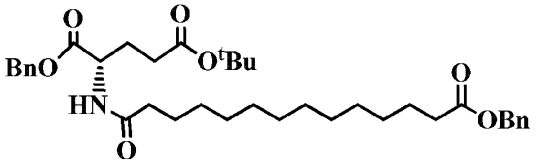


123

在 0°C下，（2S，4R）-5-（3-氨基-4-羟基苯基）-4-（2 - （（6S，9R，11R）-6 -（（S） - 仲丁基）-9-异丙基的溶液 -2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三氧-12-氧杂-2,5,8-三氮杂十一烷-11-基）噻唑-4-甲酰胺基）-2-甲基戊酸(Tub-039, R. Zhao, et al, PCT/CN2017/120454; R. Zhao, et al, 14th PEGS Boston, Boston, MA, USA, 3rd May 2018)（83 mg，0.106 mmol）和化合物 **122**（122 mg，0.134 mmol）的 DMF（8 mL）溶液中加入 DIPEA（2 mL）。 将反应混合物

在0℃下搅拌0.5小时，然后在室温下搅拌4小时。 然后浓缩反应混合物，并通过制备型HPLC（流动相：乙腈/水= 10％至80％，含有0.1％甲酸）纯化，得到化合物 **123**（95.5 mg，58％收率）。MS-ESI m/z $C_{69}H_{112}N_{11}O_{24}S[M+H]^+$：计算值1542.72，实测值1542.76。

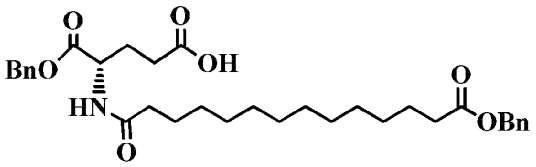
实施例 **132** 化合物 **124** 的合成



124

将（S）-1-苄基-5-叔丁基2-氨基戊二酸盐酸盐（8.70 g，26.39 mmol），14-（苄氧基）-14-氧代十四烷酸（9.19 mmol），DIPEA（8.0 mL，46.0 mmol）和EDC（15.3 g，80.50 mmol）的二氯甲烷（200 mL）溶液在室温下搅拌6小时。 将混合物用水（100 mL）稀释并分离。 用二氯甲烷（100 mL）萃取水相。 合并有机相，用盐水洗涤，用硫酸钠干燥，过滤，浓缩并在硅胶柱上纯化（二氯甲烷/ 乙酸乙酯 =20:1至5:1），得到标题化合物314。MS-ESI m/z $C_{37}H_{54}NO_7[M+H]^+$ ：计算值624.38，实测值624.38。

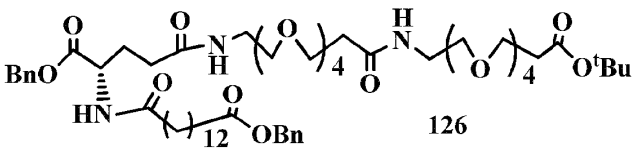
实施例 **133** 化合物 **125** 的合成



125

在4℃下将化合物 **124**（12.50 g，20.05 mmol）溶解在二恶烷（30 mL）中，并与盐酸（10 mL，36％）搅拌0.5小时。 将反应混合物用甲苯（20 mL）和DMF（20 mL）稀释，在15℃浓缩，得到标题化合物（11.26 g，99％收率）。MS-ESI m/z $C_{33}H_{46}NO_7[M+H]^+$：计算值 568.32，实测值 568.34。

实施例 **134** 化合物 **126** 的合成

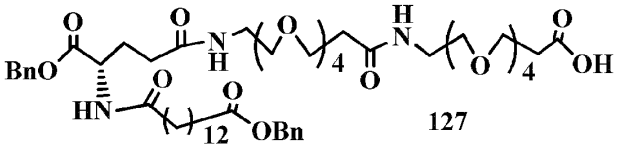


126

将化合物 **125**（10.70 g，18.86 mmol），1-氨基-15-氧代-3,6,9,12,19,22,25,28-辛氧基-16-氮杂三十烷-31-叔丁基酯盐酸盐（11.45 g，

18.93 mmol)，EDC（9.51 g，50.01 mmol）和 DIPEA（4.00 mL，23.00mol）的二氯甲烷（200 mL）溶液室温搅拌过夜，用盐水（100 mL）稀释并分离。用二氯甲烷（100 mL）萃取水相。 合并有机相，用盐水洗涤，用硫酸钠干燥，过滤，浓缩并在硅胶柱上纯化（二氯甲烷/ 乙酸乙酯 =10：1 至 4：1），得到标题化合物（18.15 g，86%收率）。MS-ESI m/z $C_{59}H_{96}N_3O_{17}[M+H]^+$：计算值 1118.67，实测值 1118.80。

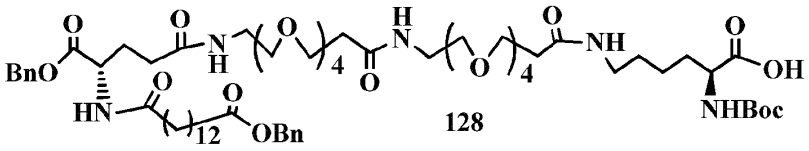
实施例 **135** 化合物 **127** 的合成



127

在 4℃下将化合物 **126**（10.50 g，9.39 mmol）溶解在二恶烷（45 mL）中，并与盐酸（15 mL，36%）搅拌 0.5 小时。 将反应混合物用甲苯（20 mL）和 DMF（20 mL）稀释，在 15℃浓缩，并在硅胶柱上纯化（二氯甲烷/ 甲醇 =10：1 至 6：1），得到标题化合物（8.67 g，87%收率）。MS-ESI m/z $C_{55}H_{88}N_3O_{17}[M+H]^+$：计算值 1062.60，实测值 1062.68。

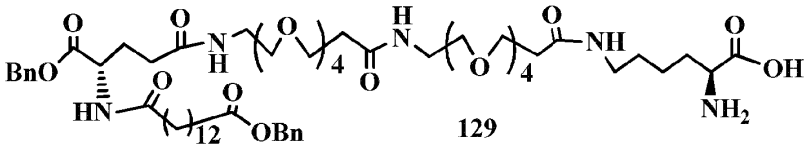
实施例 **136** 化合物 **128** 的合成



128

将化合物 **127**（8.50 g，8.01 mmol），N-羟基琥珀酰亚胺（3.20 g，27.82 mmol），EDC（10.28 g，54.10 mmol）和 DIPEA（6.00 mL，34.51 mmol）的四氢呋喃（150 mL）溶液室温搅拌 6 小时后，真空浓缩，得到 NHS 酯，无需纯化即可用于下一步骤。向（S）-6-氨基-2 -（（叔丁氧基羰基）氨基）己酸盐酸盐（2.75 g，9.73 mmol）的 DMF（100 mL）和 1.0M Na_2PO_4（pH 7.5,55 mL）的混合溶液中，在 1 小时内分四份加入上面制备的 N-琥珀酰亚胺酯。将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。 浓缩后，将残余物在硅胶柱上纯化（二氯甲烷/ 甲醇 =10：1 至 4：1），得到标题化合物（8.16 g，79%收率）。MS-ESI m/z $C_{66}H_{108}N_5O_{20}[M+H]^+$：计算值 1289.75，实测值 1289.90。

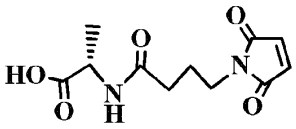
实施例 **137** 化合物 **129** 的合成



129

在 4℃下将化合物 **128**（8.10 g，6.28 mmol）溶解在二恶烷（40 mL）中，并与盐酸（15 mL，36%）搅拌 0.5 小时。 将反应混合物用甲苯（20 mL）和 DMF（20 mL）稀释，在 15℃浓缩，得到标题化合物（7.71 g，100%收率），其不经进一步纯化用于下一步。 MS-ESI m/z $C_{61}H_{88}N_3O_{17}$, [M+H]+：计算值 1190.70，实测值 1190.78。

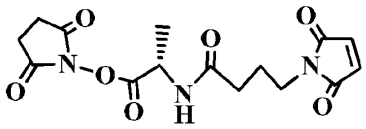
实施例 **138** 化合物 **130** 的合成



130

在 0℃下，向 4-马来酰亚胺-N-琥珀酰胺酯（7.10 g，25.35 mmol）和丙氨酸（3.01 g，33.80 mmol）的 DMF（50 mL）溶液中加入 DIPEA（10 mL）。将反应混合物在 0℃下搅拌 0.5 小时，然后在室温下搅拌 1 小时。 然后将反应混合物浓缩并在硅胶柱（流动相：二氯甲烷 / 甲醇 =10：1，含有 0.1%甲酸）上纯化，得到化合物 **130**（5.21 g，81%收率）。 MS-ESI m/z $C_{11}H_{14}N_2O_5$ $[M+H]^+$：计算值 255.09，实测值 255.15。

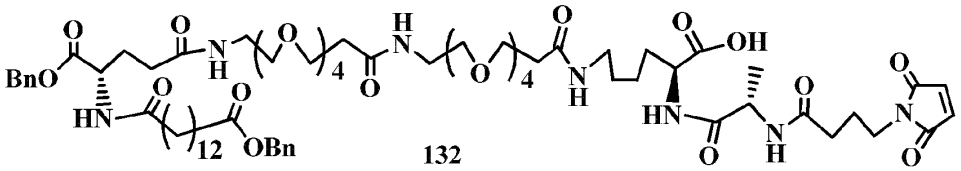
实施例 **139** 化合物 **131** 的合成



131

将化合物 **130**（5.15 g，20.26 mmol），N-羟基琥珀酰亚胺（2.80 g，24.34 mmol），EDC（10.28 g，54.10 mmol）和 DIPEA（5.50 mL，31.63 mmol）的二氯甲烷（70 mL）溶液室温搅拌 6 小时，真空浓缩，在硅胶柱上纯化（流动相：二氯甲烷 / 乙酸乙酯 =10：1），得到化合物 **131**（5.83 g，82%收率）。 MS-ESI m/z $C_{15}H_{17}N_3O_7$ $[M+H]^+$：计算值 351.11，实测值 351.20。

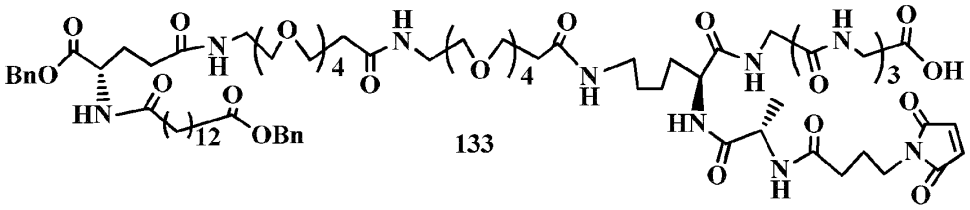
实施例 **140** 化合物 **132** 的合成



132

在 0°C下，向化合物 **129**（7.61 g，6.39 mmol）和化合物 **131**（2.90 g，8.280 mmol）的 DMF（40 mL）溶液中加入 DIPEA（7 mL）。 将反应混合物在 0°C 下搅拌 0.5 小时，然后在室温下搅拌 1 小时。 然后将反应混合物浓缩并在硅胶柱上纯化（流动相：二氯甲烷 / 甲醇 = 10：1，含有 0.1%甲酸），得到化合物 **132**（7.10 g，78%收率）。 MS-ESI m/z $C_{11}H_{14}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 计算值 1426.7782，实测值 1426.7820。

实施例 **141** 化合物 **133** 的合成

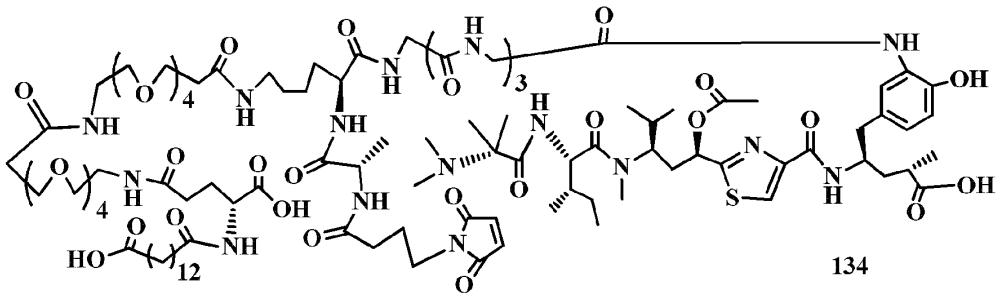


133

将化合物 **132**（7.05 g，4.94 mmol），N-羟基琥珀酰亚胺（0.92 g，8.00 mmol），EDC（3.01 g，15.84 mmol）和 DIPEA（1.00 mL，5.75 mmol）的四氢呋喃（50 mL）溶液室温搅拌 6 小时后，真空浓缩，得到 NHS 酯，无需纯化即可用于下一步骤。

向 2-（2-（2-氨基乙酰氨基）乙酰氨基）乙酸（ gly- gly- gly） 盐酸盐（1.67 g，7.40 mmol）的 DMF（40 mL）和 1.0M Na_2PO_4（pH 7.5,15 mL）的混合溶液中，在 1 小时内分四份加入上述化合物。 将反应混合物在室温下搅拌 3 小时。 浓缩后，将残余物在硅胶柱上纯化（二氯甲烷/ 甲醇 = 10：1 至 7：1），得到标题化合物（8.16 g，79%收率）。MS-ESI m/z $C_{11}H_{14}N_2O_5$ $[M+H]^+$：计算值 597.84，实测值 1597.84。

实施例 **142** 化合物 **134** 的合成

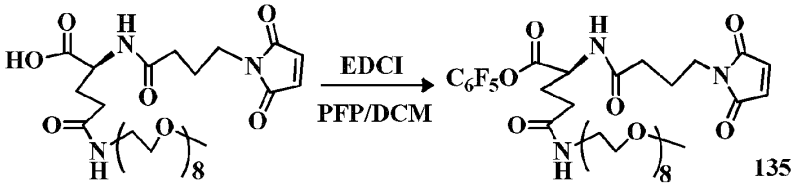


134

向化合物 **133**（150.3 mg，0.0935 mmol），Tub-039（60.2 mg，0.0769 mmol）和 DIPEA（0.030 mL，0.172 mmol）在 DMA（5 mL）中的溶液，加入 EDC（100 mg，0.526 mmol）。 将反应混合物在室温下搅拌 6 小时，真空浓缩，再溶于甲醇 / 二氯甲烷（0.5 mL：3 mL）中，并通过短硅胶柱，甲醇 / 二氯甲烷（1：3）洗脱， 真空浓缩，得到粗化合物，用于下一步骤。MS-ESI m/z 值：2326.25。

将上述化合物的二氯甲烷（1 mL）溶液与 TFA（3 mL）搅拌 1 小时。 将反应混合物用甲苯（3 mL）和 DMF（3 mL）稀释，浓缩，并通过制备型 HPLC（流动相：含有 0.1％甲酸的 2％至 50％乙腈水溶液）纯化，得到化合物 **134**（ 69.0 mg，72％收率）。MS-ESI m/z $C_{11}H_{14}N_2O_5$ $[M+H]^+$：计算值 2146.1497，实测值 2146.1588。

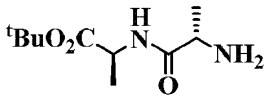
实施例 **143** 化合物 **135** 的合成



135

向（S）-30-（4-（2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基）丁酰胺基）-27-氧代-2,5,8,11,14,17, 20,23-八氧杂-26-氮杂三十烷-31-酸（20 mg，0.029 mmol）的二氯甲烷（5 mL）溶液中加入 EDC（11 mg，0.059 mmol）和五氟苯酚（10.8 mg，0.059 mmol）。 将反应混合物在室温下搅拌 2 小时，浓缩并在硅胶柱上纯化，用乙酸乙酯 / 二氯甲烷（1：4）洗脱，得到标题化合物（24 mg，100％收率）。MS-ESI m/z $C_{36}H_{50}F_5N_3O_{14}$ $[M+H]^+$： 计算值 844.32，实测值 844.32。

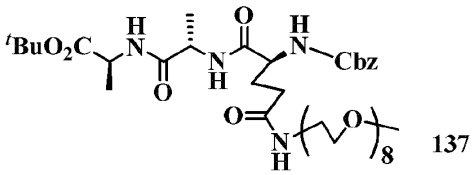
实施例 **144** 化合物 **136** 的合成



136

将（S）-2-（((S）-2-（((（苄氧基）羰基）氨基）丙酰胺基）丙酸叔丁酯（10 g，0.028mol）的甲醇溶液（100 mL）和10％钯碳（1.0 g）在氢气（5psi）下搅拌3小时。 滤出固体，浓缩过滤的溶液，得到无色油状产物（6.1 g，100％收率）。ESI m/z $C_{10}H_{20}N_2O_3$ $[M+H]^+$：计算值217.15，实测值 217.15.

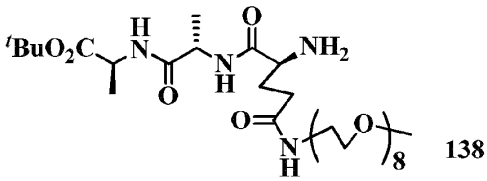
实施例 **145** 化合物 **137** 的合成



137

向（S）-30 - (((（苄氧基）羰基）氨基）-27-氧代-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-26-氮杂三十烷-31-酸（100 mg，0.154 mmol）的二氯甲烷（5 mL）溶液中加入EDC（59 mg，0.309 mmol）和五氟苯酚（PFP）（57 mg，0.309 mmol），将混合物在室温下搅拌2小时，用二氯甲烷（20 mL）稀释，用水（5 mL）洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并浓缩。 将残余物重新溶解在DMF（5 mL）中，然后加入化合物 **136**（49 mg，0.23 mmol）和DIPEA（90 mg，0.69 mmol）。将混合物在室温下搅拌1小时，浓缩，并在短硅胶柱上纯化，用甲醇 / 二氯甲烷（1:10）洗脱，得到标题化合物 **137**（80 mg，61％收率）。ESI m/z $C_{40}H_{68}N_4O_{15}$ $[M+H]^+$： 计算值845.47，实测值 845.47。

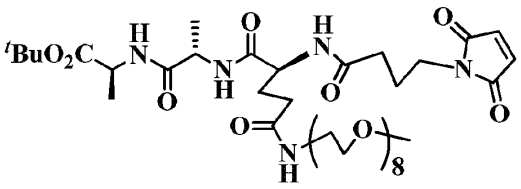
实施例 **146** 化合物 **138** 的合成



138

将化合物 **137**（80 mg，0.094 mmol）的甲醇（5 mL）溶液和10％钯碳（10 mg）在氢气（5psi）下搅拌2小时。 滤出固体，浓缩滤液，得到无色油状产物（66 mg，100％收率），其不经进一步纯化用于下一步。MS-ESI m/z $C_{32}H_{62}N_4O_{13}$ $[M+H]^+$ ：计算值711.43，实测值 711.43。

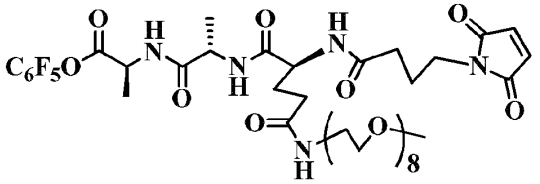
实施例 **147** 化合物 **139** 的合成



139

向化合物 **138**（66 mg，0.094 mmol）中加入乙醇（5 mL），2,5-二氧代吡咯烷-1-基 4-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丁酸酯(39 mg, 0.141 mmol)和 PBS（0.1M，pH 7.5,1.0 mL）。 将反应混合物搅拌过夜，浓缩并在硅胶柱上纯化（二氯甲烷/ 甲醇 =100：0 至 10：1），得到标题化合物 **139**（37 mg，45％收率）。ESI m/z $C_{40}H_{69}N_5O$= $[M+H]^+$ ：计算值 876.47，实测值 876.47。

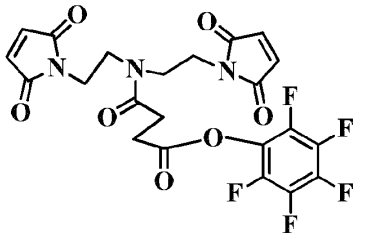
实施例 **148** 化合物 **140** 的合成



140

将化合物 **139**（50 mg，0.057 mmol）的二氯甲烷（3 mL）溶液在室温下与 TFA（1 mL）搅拌 2 小时。 将反应混合物浓缩至干，然后重新溶解在二氯甲烷（5 mL）中，向其中加入 EDC（16 mg，0.084 mmol）和五氟苯酚（15 mg，0.084 mmol）。 将混合物在室温下搅拌 4 小时，浓缩，并在硅胶柱上纯化（二氯甲烷/ 乙酸乙酯 =100：10 至 3：1），得到标题化合物 **140**（41 mg，73％收率）。ESI m/z $C_{42}H_{60}F_5N_5O_{16}[M+H]^+$计算值：986.40，实测值 986.42。

实施例 **149** 化合物 **141** 的合成



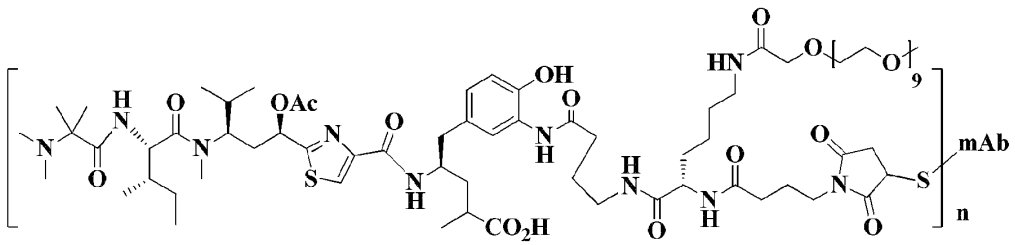
141

向 4-（双（2-（2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基）乙基）氨基）-4-氧代丁酸（100 mg，0.27 mmol）的二氯甲烷溶液中加入（5 mL）EDC（210 mg，1.10 mmol）和五氟苯酚（101 mg，0.55 mmol）。 将混合物在室温下搅拌 3 小时，浓缩并在硅胶柱上纯化（二氯甲烷/ 乙酸乙酯= 20：1 至 5：1），得到

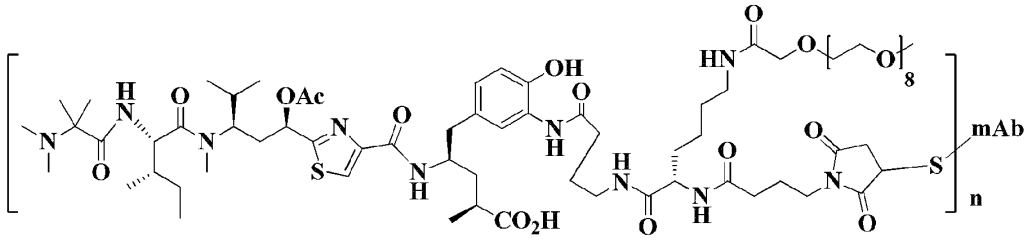
标题化合物 **141**（114 mg，80％收率）。 MS-ESI m/z $C_{22}H_{16}F_5N_3O_7[M+H]^+$ 计算值：530.0，实测值 530.09。

实施例 **150**. 通过还原抗体二硫键同 Tubulysin 衍生物偶连而制备的偶连物的一般制备方法。

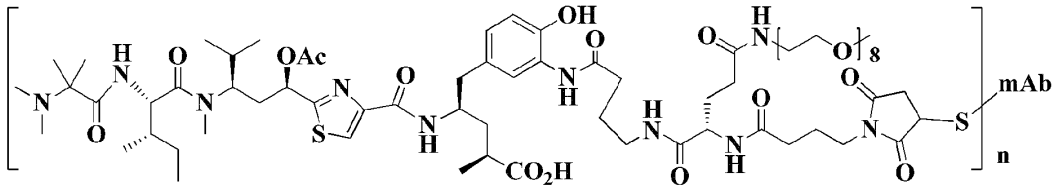
在 2.0 毫升 10 毫克/毫升 pH 值为 6.0～8.0 的 HER2 抗体的溶液中，加入 0.70 ml～2.0 ml，100 mM 磷酸(PBS)，pH 值为 6.5～8.5 缓冲液，TCEP（16-20μl，20mM 的水溶液），室温下~37.5°C 孵育 0.5～4 小时，加入同当量的叠氮化合物（叠氮苯甲酸，或 2-（2-（2-羟基乙氧基）乙氧基）乙氧基叠氮化合物）室温~37.5°C 下孵育 1～4 小时，随后加入含能同巯基基团反应的 Tubulysin 衍生物分子（28-32μl，20mM 的 DMA 溶液）（如化合物 39, 57, 72, 123,或 134）。混合物在室温~37.5°C 下孵育 2～18 小时，然后 DHAA（135μl，50 毫米）加入。在 RT 隔夜连续培养后，混合物经 G-25 柱或阳离子层析柱或阴离子层析柱，用 10~100 mM 磷酸，或柠檬酸，50~200 mM NaCl pH 6~ 7.5 的缓冲溶液纯化得到共轭体化合物（75%～99%收率）。该纯化步骤也可以用渗析过滤方式，用 10~100 mM 磷酸，或柠檬酸，50~200 mM NaCl pH 6~ 7.5 的缓冲溶液，以（3 -30 倍的被渗析液体积），纯化得到共轭体化合物（75%～99%收率）。通过液相色谱-质谱法质谱测定药物/抗体比率（DAR）是 3.1～4.9，HPLC 分析为 95～99%单体（Tosoh Bioscience，Tskgel G3000SW 柱子,内径 7.8 毫米 x 30 厘米，0.5 毫升/分钟，100 分钟）。用化合物 39, 57, 72, 123,或 134 制备的抗体偶连物的结构分别如下：



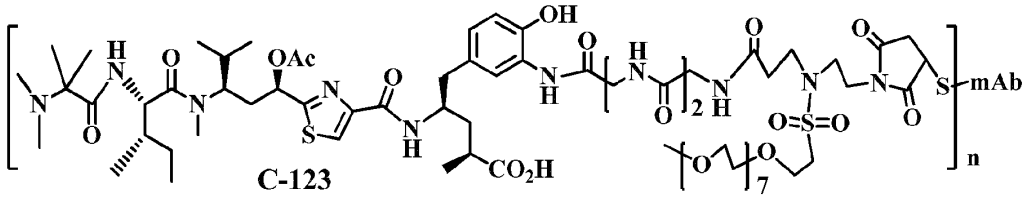
C-37、



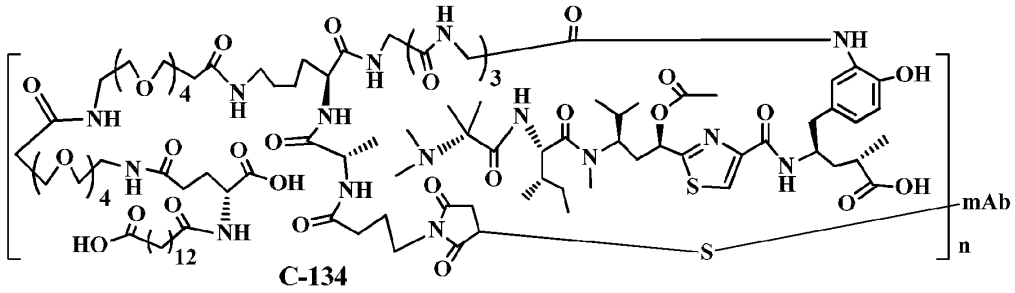
C-59 或



C-72



C-123



C-134

实施例**151**. 偶联物另外制备方法。

细胞结合分子，（抗体）可通过酰胺、 硫醚或二硫键与本专利的化合物进行偶联。用含50mM 硼酸钠的PBS缓冲液（pH8.0）稀释抗体（>5 mg/mL），加入二硫苏糖醇（终浓度为10mM），35°C处理30分钟，抗体可释放自由巯基。用G-25柱凝胶过滤层析（PBS缓冲液中添加1mM EDTA）后，通过Ellman试剂[5,5'-二硫代双（2 -硝基苯甲酸）]测定，每个抗体上大约偶联8个巯基。抗体与Traut's 试剂(2-亚氨基噻吩) (Jue, R., et al. Biochem. 1978, 17 (25): 5399-5405)也可释放巯基，或在pH7~8条件下，与SATP (N-琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代丙酸盐)或N-琥珀酰亚胺-S-乙酰基（硫代四乙二酸）（SAT(PEG)4 ）等不同的连接物反应，后经羟胺作用，形成巯基 (Duncan, R, et al, Anal. Biochem. 1983, **132**, 68-73, Fuji, N. et al, Chem. Pharm. Bull. 1985, **33**, 362-367)。基本上，每个抗体分子上连接5~9个巯基分子。

4°C条件下，向冰冷的含有自由巯基的抗体的二甲基乙酰胺（DMA）(2~20% v/v)中加入含有马来酰亚胺或溴乙酰胺基团(需0.5M的硼酸钠溶液

（pH 9）促成抗体与溴乙酰胺的烷基化)的药物 (连接的药物与巯基的摩尔比应为1.2~ 1.5：1)。1~2小时后，添加过量半胱氨酸使反应终止；通过超滤、凝胶层析（G-25，缓冲液为PBS）、无菌过滤后得到浓缩的偶联产物。通过测定280nm和252nm处的吸光度测定蛋白浓度和每个抗体所连接的药物个数。分子排阻HPLC可用来测定连接物的单体形式所占的比重，而低于0.5%的未结合的药物可用RP-HPLC用来测定。对于硫醚键连接形成的单体药物而言，每个抗体分子平均会连接3.2-4.8个tubulysin衍生物。

连接接头的种类可分为二甲基(苯基)甲硅烷基(DMPS), SMDP, 4-琥珀酰亚胺基氧羰基-甲基-α(2-吡啶基二硫)甲苯(SMPT), N-琥珀酰亚胺-4-（2-吡啶硫）戊酸酯 （SPP）, N-琥珀酰亚胺-4-（2-吡啶硫）丙酸酯（SPDP）, N-琥珀酰亚胺-4-（2-吡啶硫）丁酸酯（SPDB）, 琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧化酯（SMCC）, N-羟基琥珀酰亚胺-(聚乙二醇)n - 马来酰亚胺(SM(PEG)n)等。抗体(>5 mg/mL)稀释于缓冲液(pH 6.5~7.5, 5 mM PBS, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) 中，与链接反应 2 小时，而链接体与抗体的摩尔比为 6~10 倍以上。反应混合物可通过 Sephadex G25 凝胶层析分离，其分子量较低的分子会被除去。该纯化步骤也可以用阳离子层析柱或阴离子层析柱，用 10~100 mM 磷酸，或柠檬酸，50~200 mM NaCl pH 6~ 7.5 的缓冲溶液纯化得到共轭体化合物（75%～99%收率）。该纯化步骤也可以用渗析过滤方式，用 10~100 mM 磷酸，或柠檬酸，50~200 mM NaCl pH 6~ 7.5 的缓冲溶液，以（3 -30 倍的被渗析液体积），纯化得到共轭体化合物（75%～99%收率）。抗体的浓度通过分光光度法测定，连接物包含吡啶硫基。抗体在 280nm 处的消光系数为 2067550 M^{-1} cm^{-1}。修饰的抗体用过量的二硫苏糖醇 (20 倍以上当量)处理后，测定释放的 2-硫吡啶基团，在 343、280nm 处的消光系数分别为 8080 和 5100 M^{-1} cm^{-1}）。向修饰抗体中加入 1.2～1.5 当量带有巯基基团的 Tubulysin 衍生物分子。该反应在是室温下进行 5~18 小时。反应混合物通过 Sephadex G25 凝胶层析， 除去未连接的药物或其他低分子量的物质。再通过测定 280 nm 和 252 nm 处的吸光度来测定连接产物的浓度。连接产物是单体形式，平均每个抗体分子连接 3.2~4.8 个药物分子。

实施例 **152**. Her2 抗体偶联物 **C-37**、**C-59**、**C-72**、**C-123** 和 **C-134** 的体外细胞毒性评价（与 T-DM1 对照）：

用于细胞毒性测定的细胞系是人胃癌细胞系NCI-N87；细胞在含有10％FBS的RPMI-1640中生长。测定时，将细胞（180 μL，6000 个细胞）加入到96孔板的每个孔中，并在37 ℃，5％CO_2下温育24小时。接下来，在合适的细胞培养基（总体积，0.2 mL）中，用不同浓度的测试化合物（20 μL）处理细胞，对照孔含有细胞和培养基但不含测试化合物。将平板在37 ℃和5％CO_2下温育120小时，然后向孔中加入MTT（5 mg / ml，20 μL），并将孔板在37℃下孵育1.5小时。 小心去除培养基，然后加入DMSO（180 μL）。震荡15分钟，在490 nm和570 nm测量吸光度，620 nm为参考。依照以下公式计算抑制率：抑制率％ = [1-(分析值-空白对照值)/（控制值-空白对照值)]×100。化合物细胞毒性结果总结如表1。

表1 本发明申请中的Her-amatoxin类似物偶联物的细胞毒性

化合物	DAR（药物/抗体比）	NCI-N87 细胞 IC_{50}（nM）
C-37	3.9	0.22
C-59	4.0	0.11
C-72	3.8	0.10
C-123	7.8	0.15
C-134	3.9	0.25
T-DM1	3.5	0.32

实施例**153** 在荷载NCI-N87异种移植肿瘤的BALB / c裸鼠上的体内抗肿瘤活性研究。

在人胃癌N-87细胞系肿瘤异种移植模型中评估偶联物**C-37, C-49, C-72, C-123, C-134**和T-DM1的体内疗效。五周龄的雌性BALB / c裸鼠（66只动物）在右肩下区域用0.1 mL无血清培养基里的N-87癌细胞（5×10^6个细胞/小鼠）进行皮下接种。肿瘤生长8天后长至平均大小140 mm^3。然后将动物随机分成10组（每组6只动物）。第一组小鼠用作对照组，并用以磷酸盐缓冲的盐水注射。剩余的6组分别用偶联物**C-37, C-49, C-72, C-123, C-134**和T-DM1以 6 mg / kg的剂量静

脉内注射。每3或者4天测量肿瘤的三维尺寸，并使用公式：肿瘤体积= 1/2（长×宽×高）计算肿瘤体积，同时还测量动物的体重。当满足下列任何一项标准时，处死小鼠：（1）体重减少超过注射前体重的20%，（2）肿瘤体积大于1500 mm^3，（3）病态严重至无法进食和进水或（4）皮肤坏死。如果肿瘤是未可感知的，则认为小鼠是无肿瘤的。

结果绘制在图 7 中。在 6.0 mg/kg 剂量，所有 6 种偶联物都未导致动物体重减轻。对照 PBS 溶液，所有偶联物均显示抗肿瘤活性。所有测试 Tubulysin 偶联物均显示比 T-DM1 优异的抗肿瘤活性。

实施例 **154**. Tubulysin B 衍生物的 Her2 抗体偶联物的毒性研究（与 T-DM1 对照）。

动物的体重变化（通常是减小）是其对药物的毒性的宏观反映。将 56 只 6-7 周龄的雌性 ICR 小鼠分为 7 组，每组包含 8 只动物，分别静脉注射给予 150 mg/kg 剂量的药物 **C-37, C-49, C-72, C-123, C-134** 和 T-DM1。控制组（8 只动物）给予 PBS 缓冲的生理盐水。如图 8 显示，在 12 天的实验中，对照组和 T-DM1 之外的所有偶联物组中的小鼠的体重均未降低超过 5%。相反，T-DM1 组中动物体重持续下降，最大减少给药前的 24%，并且在研究结束时没有观察到恢复趋势。体重变化结果表明，动物对这些含有支链连接体的 Tubulysin B 衍生物的 Her2 抗体偶联物，耐受性高于具有常规单连接体的 T-DM1。

前面仅仅示出了本发明的原理，应理解，本发明的范围不预期限制在本文所述的示例性方面，而应包括所有当前已知的和未来开发的等同物。另外，应当指出，在不脱离本发明技术原理的前提下，还可以作出若干改进和修改，这些改进和修改也应被视为本发明的范围。