

一类连接子药物及其抗体-药物偶联物的制备方法和应用

相关申请的交叉引用

本申请是以 CN 申请号为 202310093383.0、申请日为 2023 年 1 月 31 日的申请，以及 CN 申请号为 202310947390.2、申请日为 2023 年 7 月 28 日的申请为基础，并主张其优先权，所有申请的内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

本发明涉及药物领域，具体地，涉及连接子药物偶联物、抗体药物偶联物、其制备方法和应用。

背景技术

抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)的研究可以追溯到 1980s, 但是直到 2000 年, 首个抗体偶联药物(商品名 Mylotarg, Pfizer 研发)才被 FDA 批准用于治疗急性粒细胞白血病, 但由于偶联技术、靶向性、有效性等受限, 完整的抗体偶联药物在血液不稳定, 导致致死性毒性的产生, 于 2010 年撤市。这使得本就不明朗的 ADC 药物研究, 更蒙上了一层阴影。

但是, Seagen 通过对原有技术的改进, 利用自己的新型抗体偶联技术开发了 brentuximab vedotin (SGN-35, 商品名 Adcetris,) 新型抗体偶联药物, 并已于 2011 年被 FDA 批准用于治疗霍奇金淋巴瘤和系统性间变性大细胞淋巴瘤。2013 年抗体偶联药物再次取得突破, Genentech/ImmunoGen 联合开发的 Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1, 商品名 Kadcyla) 被 FDA 批准用于 HER2 阳性乳腺癌, 这是首个针对实体瘤的抗体偶联药物。随着这两个药物的研发成功, ADC 药物再次以火热的状态进入人们的研究视野。

近年来, ADCs 发展迅猛, 目前已有 15 个 ADC 药物被批准上市, 200 多个 ADC 进入临床试验。ADC 在肿瘤靶向治疗领域正发挥着越来越重要的作用。

抗体药物偶联物由三个部分组成: 抗体 (Ab)、连接子 (linker) 和小分子细胞毒药物 (payload/warhead, 弹头)。ADC 的抗体部分应当具有肿瘤特异性、良好的内吞效率、良好的抗原亲和力, 而且无或低免疫原性, IgG1 是最常用的抗体部分。弹头部分一般都是作用于微管、DNA 或 RNA 的细胞毒药

物，如喜树碱类、美登素类、奥瑞他汀类等，需要有足够强的毒性、足够的水溶性，而且作用靶点位于细胞内。连接抗体和小分子细胞毒药物的连接子则要求在血液循环中稳定、在细胞内快速解体，可以高效地释放毒素。

发明内容

本申请的发明人创造性地设计了一种新的连接子结构，由此提供了本发明。

连接子药物偶联物

本发明的第一方面涉及一种连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述连接子药物偶联物具有式 I 所示的结构，



式 I

其中，

M 为包含马来酰亚胺 (m) 片段或包含环辛炔及其衍生物片段(如 BCN、DIBO、DIBAC、BARAC 等)的化学结构；

X 为 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段，优选选自 Ala-Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn、Asn、Ala-Ala-Ala-Ala-(3-cyano-alanine)、Ala-Ala-Ala-(3-cyano-alanine)、Ala-Ala-(3-cyano-alanine)、Ala-(3-cyano-alanine)、3-cyano-alanine、Ala-Ala-Ala-Pro、Ala-Ala-Pro、Ala-Pro、Pro、Pro-Asn、Asn-Pro、Lys、Lys-Asn、Lys-Pro、Ala-Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Gln、Ala-Gln、Ala-Ala-Ala-Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-Ala-Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)、2-amino-4-cyanobutanoic acid、Gly-Gly-Gly-Gln、Gly-Gly-Gln、Gly-Gln、Gln 及它们的氘代化物；

D 为细胞毒素。

本发明的连接子药物偶联物中，连接子由包含马来酰亚胺(m)片段或包含环辛炔及其衍生物片段(如 BCN、DIBO、DIBAC、BARAC 等)的化学结构和 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段构成，其具有以下特点：血液循环中稳定、可以在细胞内或肿瘤微环境中快速解体，并高效释放毒素。

包含马来酰亚胺 (m) 片段的化学结构可以选自 4-(N-马来酰亚氨基甲

基)-环己烷-1-甲酰基 (MCC)、6-马来酰亚氨基己酰基(MC)、M-(PEG)_n、MC-(PEG)_n、MCC-(PEG)_n 等，各结构如下所示：

MCC	
MC	
M-(PEG) _n	
MC-(PEG) _n	
MCC-(PEG) _n	

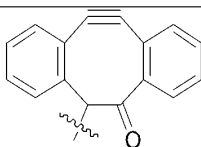
其中， n 代表 PEG 的聚合度，优选为 2-12 之间的整数。

在某些实施方案中，包含马来酰亚胺 (m) 片段的化学结构为 6-马来酰亚氨基己酰基(MC)。在某些实施方案中，包含马来酰亚胺 (m) 片段的化学结构为 MC-(PEG)_n，其中， n 选自 4、8、12。发明人发现，较低的 PEG 聚合度在一定程度上有利于降低连接子药物偶联物制备的 ADC 中的聚合物含量 (HMW%)，因此，PEG 的聚合度 n 优选为 4。

包含环辛炔片段的化学结构可以选自 BCN、DIBO、DIBAC、BARAC 等，各结构如下所示：

BCN	
DIBO	
DIBAC	

BARAC



对于大多数目前在研的 ADC，PAB 结构（对氨基苄基-氨甲酰基）作为连接子中的自释放片段，是有效释放 Payload 的必需结构。然而，PAB 结构的疏水性容易使制备 ADC 时产生较多的聚合物。因此，还需进一步研究开发新的连接子结构以克服上述问题。

为此，本申请发明人经过实验研究发现，若 D 为含有羟基（-OH）、伯胺（-NH₂）或仲胺（-NHR）基团的细胞毒素，则本申请的连接子药物偶联物包含的氨基酸片段与含有羟基（-OH）、伯胺（-NH₂）或仲胺（-NHR）结构 Payload 连接，可以在去除疏水性结构 PAB 的情况下，通过酶解反应释放 Payload，既能够降低 Linker-Drug 的疏水性，减少制备 ADC 时产生的聚合物含量，也可以表现出相应的细胞杀伤活性。

由此，在某些实施方案中，D 为含有羟基（-OH）、伯胺（-NH₂）或仲胺（-NHR）基团的细胞毒素。

在某些实施方案中，所述含有羟基（-OH）、伯胺（-NH₂）或仲胺（-NHR）基团的细胞毒素可以选自喜树碱类化合物及其衍生物（如依喜替康、14-氨基喜树碱、9-氨基喜树碱、贝洛替康等）等拓扑异构酶 I 抑制剂、阿霉素类化合物及其衍生物（如 Daunorubicin）等拓扑异构酶 II 抑制剂、美登素类化合物及其衍生物、卡里奇霉素类化合物及其衍生物、多卡米星类化合物及其衍生物（如 Duocarmycin 衍生物）和吡咯并苯二氮卓类化合物及其衍生物（如 PBD）等 DNA 烷基化试剂、金盏花素类化合物及其衍生物（如 MMAE 及其衍生物或 MMAF 及其衍生物等）微管蛋白抑制剂、Protac 类化合物和分子胶类化合物（如来那度胺等）、雷帕霉素及其衍生物等免疫抑制剂以及其他各种具有细胞杀伤活性的小分子化合物。在某些实施方案中，所述含有羟基（-OH）、伯胺（-NH₂）或仲胺（-NHR）基团的细胞毒素选自依喜替康（Exatecan）、贝洛替康（belotecan）、雷帕霉素（Rapamycin）。在某些实施方案中，所述含有羟基（-OH）基团的细胞毒素为雷帕霉素（Rapamycin）。在某些实施方案中，所述含有仲胺（-NHR）基团的细胞毒素为贝洛替康（belotecan）。在某些实施方案中，所述含有伯胺（-NH₂）基团的细胞毒素为依喜替康（Exatecan）。

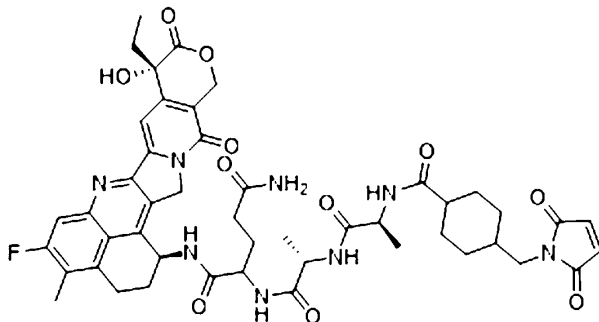
在某些实施方案中，式 I 中的所述 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段选自 Ala-Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn、Asn、Ala-Ala-Ala-Ala- (3-cyano-alanine)、Ala-Ala-Ala- (3-cyano-alanine)、Ala-Ala- (3-cyano-alanine)、Ala- (3-cyano-alanine)、3-cyano-alanine、Ala-Ala-Ala-Pro、Ala-Ala-Pro、Ala-Pro、Pro、Pro-Asn、Asn-Pro、Lys、Lys-Asn、Lys-Pro、Ala-Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Gln、Ala-Gln、Ala-Ala-Ala-Ala- (2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-Ala-Ala- (2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-Ala- (2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala- (2-amino-4-cyanobutanoic acid)、2-amino-4-cyanobutanoic acid、Gly-Gly-Gly-Gln、Gly-Gly-Gln、Gly-Gln、Gln 及它们的氘代化物。

式 I 中的氨基酸单体或其衍生物或由多个氨基酸或其衍生物组合成的片段能够被肿瘤细胞溶酶体内的酶识别，并解离该类化合物中的羧基与含有羟基 (-OH)、伯胺 (-NH₂)或仲胺 (-NHR) 的化合物形成的酯键或酰胺键 (肽键)，不需要额外的自裂解片段 (self-immolative moiety)。

在某些实施方案中，式 I 中的所述 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段选自 Ala-Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn、Asn、Ala-Ala-Ala-Ala- (3-cyano-L-alanine)、Ala-Ala-Ala- (3-cyano- L-alanine)、Ala-Ala- (3-cyano- L-alanine)、Ala- (3-cyano- L-alanine)、3-cyano-L-alanine、Ala-Ala-Ala-Pro、Ala-Ala-Pro、Ala-Pro、Pro、Pro-Asn、Asn-Pro、Lys、Lys-Asn、Lys-Pro、Ala-Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Gln、Ala-Gln、Ala-Ala-Ala-Ala- ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-Ala-Ala- ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-Ala- ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala- ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid)、(S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid、Gly-Gly-Gly-Gln、Gly-Gly-Gln、Gly-Gln、Gln。

在某些实施方案中，所述连接片段选自带有天冬酰胺 (Asn) 的连接片段，例如 Ala-Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn、Asn、Pro-Asn、Lys-Asn。在某些实施方案中，所述连接片段为 Ala-Ala-Asn (AAN)。

在某些实施方案中，本发明的连接子药物偶联物为 MCC-AAQ-Exatecan，其具有如下所示的结构：

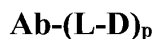


。

抗体药物偶联物

本发明的第二方面涉及一种抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述抗体药物偶联物由本发明第一方面所述的连接子药物偶联物与抗体偶联形成。

在某些实施方案中，所述抗体药物偶联物具有式 II 所示的结构，



式 II

其中，

Ab 为抗体；

L 为接头，其结构为 M'-X，其中，M' 与 Ab 相连，X 与 D 相连；

M' 为如上定义的 M 通过马来酰亚胺基团连接至 Ab 所形成的化学结构；

X 为如上定义的 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段；

D 为如上定义的细胞毒素；

p 为 2-8 之间的任意数值（如 2、2.5、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8，或者如 2-2.5、2.5-3、3-3.5、3.5-4、4-4.5、4.5-5、5-5.5、5.5-6、6-6.5、6.5-7、7-7.5 或 7.5-8）。

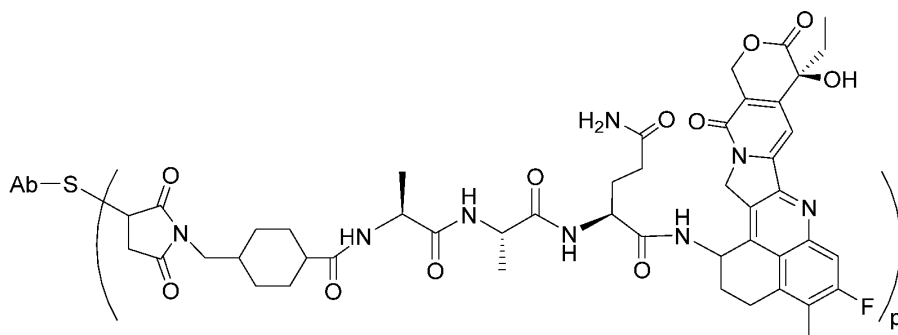
式 II 中，L-D 表示接头与细胞毒素通过共价键相连，形成 L-D 分子；Ab-(L-D)_p 表示 p 个 L-D 分子通过共价键偶联至 Ab。

本发明中，药物抗体比(DAR)是指偶联到抗体的药物分子的个数(例如，式 II 中的 p)。本文所述的抗体药物偶联物中包含的药物分子的个数可以是整数，也可以是小数。无论是整数还是小数，其指的均是每个抗体偶联的药物分子的平均数量。“p 为 2-8 之间的任意数值”，其表示，p 可以是选自 2-8 之间

的任意整数(包括端点 2 和 8),也可以是选自 2-8 之间的任意小数,例如 2.3、3.9、4.0、4.2。同时,本领域技术人员可以理解,即使采用相同的制备方法,不同的批次制备得到的抗体药物偶联物的 DAR 值也不一定完全相同,例如,可以在上下不超过 0.5 的范围内浮动。

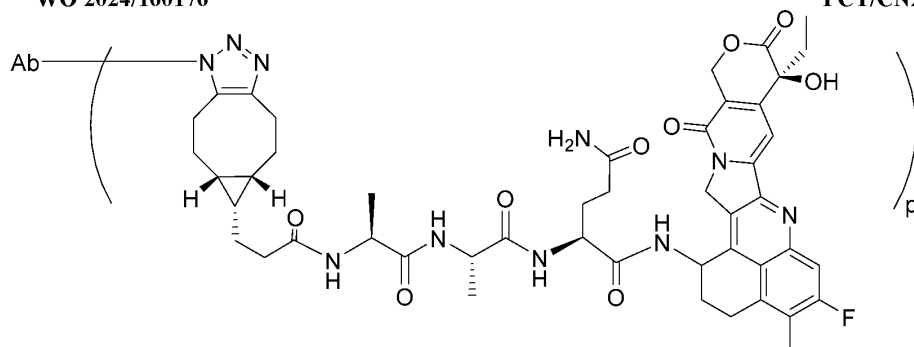
药物抗体比(DAR)可以通过常规分析手段来验证,诸如质谱、ELISA 测定法、HIC 和 HPLC。还可以测定 ADC 在 p 方面的定量分布。在有些情况中,将 p 为某数值的同质 ADC 从具有其它药物载荷的 ADC 中分离、纯化和验证可以通过诸如反相 HPLC 或电泳的手段来实现。

本发明中,连接子药物偶联物通过共价键偶联至抗体 Ab 上时,一种方式可以通过马来酰亚胺与抗体中的巯基偶联形成-S-丁二酰亚胺结构。例如 MCC-AAQ-Exatecan 通过共价键偶联至 Ab 上时,形成的 ADC 的结构式如下所示:



上述形成的马来酰亚胺接头的 ADC 中,-S-既可以通过工程化改造引入的外接巯基,也可以是抗体 Ab 被还原进而被打开二硫键后的抗体自身所含有的巯基。

另一种方式可以通过环辛炔与修饰抗体中引入的叠氮基团(-N₃)偶联形成三氮唑结构。例如 BCN-AAQ-Exatecan 通过共价键偶联至 Ab 上时,形成的 ADC 的结构式如下所示:



可用于本发明的抗体没有特别的限制，可以选自鼠源抗体、兔源抗体、噬菌体展示来源抗体、酵母展示来源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人源抗体、抗体片段、双特异性抗体及多特异性抗体。

在某些实施方案中，所述抗体为单克隆抗体，非限制性地选自：**HER2** 抗体、**EGFR** 抗体。

在某些实施方案中，所述抗体为 **HER2** 抗体。在某些实施方案中，所述抗体由轻链和重链组成，所述轻链包含 **CDR-L1**、**CDR-L2** 和 **CDR-L3**，其氨基酸序列分别如 **SEQ ID NO: 1**、**SEQ ID NO: 2**、**SEQ ID NO: 3** 所示。在某些实施方案中，所述重链包含 **CDR-H1**、**CDR-H2**、**CDR-H3**，其氨基酸序列分别如 **SEQ ID NO: 4**、**SEQ ID NO: 5**、**SEQ ID NO: 6** 所示。

在某些实施方案中，所述轻链包含氨基酸序列为 **SEQ ID NO: 7** 的轻链可变区。在某些实施方案中，所述轻链还包含氨基酸序列为 **SEQ ID NO: 8** 的轻链恒定区。在某些实施方案中，所述轻链的氨基酸序列为 **SEQ ID NO: 9**。

在某些实施方案中，所述重链包含氨基酸序列为 **SEQ ID NO: 10** 的重链可变区。在某些实施方案中，所述重链还包含氨基酸序列为 **SEQ ID NO: 11** 的重链恒定区。在某些实施方案中，所述重链的氨基酸序列为 **SEQ ID NO: 12**。

在某些实施方案中，所述抗体为 **EGFR** 抗体。在某些实施方案中，所述抗体由轻链和重链组成，所述轻链包含 **CDR-L1**、**CDR-L2** 和 **CDR-L3**，其氨基酸序列分别如 **SEQ ID NO: 13**、**SEQ ID NO: 14**、**SEQ ID NO: 15** 所示。在某些实施方案中，所述重链包含 **CDR-H1**、**CDR-H2**、**CDR-H3**，其氨基酸序列分别如 **SEQ ID NO: 16**、**SEQ ID NO: 17**、**SEQ ID NO: 18** 所示。

在某些实施方案中，所述轻链包含氨基酸序列为 **SEQ ID NO: 19** 的轻链可变区。在某些实施方案中，所述轻链还包含氨基酸序列为 **SEQ ID NO: 20**

WO 2024/160176 PCT/CN2024/074508

的轻链恒定区。在某些实施方案中，所述轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 21。

在某些实施方案中，所述重链包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 22 的重链可变区。在某些实施方案中，所述重链还包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 23 的重链恒定区。在某些实施方案中，所述重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 24。

本发明涉及的部分序列的信息提供于表 1 中。

表 1：序列的描述

SEQ ID NO:	描述	序列
HER2 抗体序列		
1	HER2 抗体的 CDR-L1 的氨基酸序列	RASQDVNTAVA
2	HER2 抗体的 CDR-L2 的氨基酸序列	SASFLYS
3	HER2 抗体的 CDR-L3 的氨基酸序列	QQHYTTPPT
4	HER2 抗体的 CDR-H1 的氨基酸序列	GFNIKDTYIH
5	HER2 抗体的 CDR-H2 的氨基酸序列	RIYPTNGYTRYADSVKG
6	HER2 抗体的 CDR-H3 的氨基酸序列	WGGDGFYAMDY
7	HER2 抗体的轻链可变区的氨基酸序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYVCQQHYTTPPTF
8	HER2 抗体的轻链恒定区的氨基酸序列	GQGTEVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
9	HER2 抗体的轻链的氨基酸序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYVCQQHYTTPPTFQGQTEVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	HER2 抗体的重链可变区的氨基酸序列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKG
11	HER2 抗体的重链恒定区的氨基酸序列	PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	HER2 抗体的重链的氨基酸序列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP

	酸序列	GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
EGFR 抗体序列		
13	EGFR 抗体的 CDR-L1 的氨基酸序列	QSIGTN
14	EGFR 抗体的 CDR-L2 的氨基酸序列	YAS
15	EGFR 抗体的 CDR-L3 的氨基酸序列	QQNNEWPTS
16	EGFR 抗体的 CDR-H1 的氨基酸序列	GFSLSNYD
17	EGFR 抗体的 CDR-H2 的氨基酸序列	IWSGGNT
18	EGFR 抗体的 CDR-H3 的氨基酸序列	ARALDYYDYEFAY
19	EGFR 抗体的轻链可变 区的氨基酸序列	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQS PKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD
20	EGFR 抗体的轻链恒定 区的氨基酸序列	GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	EGFR 抗体的轻链的氨 基酸序列	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQS PKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEADAATYY CQQNNEWPTSFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
22	EGFR 抗体的重链可变 区的氨基酸序列	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAP GKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARALDYYDYEFAYW
23	EGFR 抗体的重链恒定 区的氨基酸序列	GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK
24	EGFR 抗体的重链的氨 基酸序列	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAP GKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARALDYYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

药物组合物和制药用途

本发明的第三方面提供了药物组合物，其包含前述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，或前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

在一些实施方案中，所述药物组合物还包含用于治疗肿瘤的化疗药物、免疫治疗药物和免疫抑制剂中的至少一种。

在一些实施方案中，所述化疗药物例如为阿霉素 (Adriamycin)、环磷酰胺、紫杉烷类 (如紫杉醇 (Taxol)、多西他赛 (Taxotere))、卡培他滨 (Xeloda)、吉西他滨 (Gemzar)、长春瑞滨 (Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂 (瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康 (camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌 (Novantrone)、泼尼松、长春新碱 (Oncovin)、多柔比星、强的松等，或它们的组合。

在一些实施方案中，所述免疫治疗药物例如为 PD-1 抗体、PD-L1 抗体、EGFR 单抗、CD20 单抗、HER2 单抗 (例如曲妥珠单抗、Trastuzumab biosimilar、Trastuzumab-dkst) 等，或它们的组合。

在一些实施方案中，所述免疫抑制剂选自：(1) 糖皮质激素类，如可的松和强的松；(2) 微生物代谢产物，如环孢菌素和藤霉素等；(3) 抗代谢物，如硫唑嘌呤和 6-巯基嘌呤等；(4) 多克隆和单克隆抗淋巴细胞抗体，如抗淋巴细胞球蛋白和 OKT3 等；(5) 烷化剂类，如环磷酰胺。在一些具体的实施方案中，所述免疫抑制剂例如为甲基强的松龙、强的松、硫唑嘌呤、普乐可复、赛尼哌、舒莱、环孢菌素、他克莫司、雷帕霉素、霉酚酸酯、咪唑立宾、环磷酰胺、芬戈莫德等。

在一些实施方案中，所述药物组合物还包含至少一种药用辅料。

本发明的第四方面提供了前述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，或前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗肿瘤。

本发明的第五方面提供了治疗和/或预防肿瘤的方法，其包括：给予有需要的受试者治疗和/或预防有效量的前述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，或前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

本发明中所述的“肿瘤”是指器官或组织局部细胞过度增生后形成的病变，包括血液肿瘤和实体瘤，包括良性肿瘤和恶性肿瘤。在某些实施方案中，所述肿瘤选自以下标志物阳性或高表达的肿瘤：**HER2、EGFR**。

在某些实施方案中，所述肿瘤选自：乳腺癌、黑色素瘤、脑膜瘤、软组织肉瘤、唾液腺肿瘤、原发性肝癌、椎管内肿瘤、纵隔肿瘤、脑癌、骨癌、阴茎癌、骨肉瘤、颅内肿瘤、舌癌、上颌窦癌、甲状腺癌、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脑垂体腺瘤、睾丸肿瘤、非何杰金氏淋巴瘤、膀胱癌、白血病、胃癌、鼻咽癌、喉癌、口腔癌、食管癌、肺癌（例如非小细胞肺癌和小细胞肺癌）、肾癌、宫颈癌、绒毛膜癌、外阴癌、皮肤癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、大肠癌、卡波西肉瘤、非黑色素瘤皮肤癌(包括鳞状细胞癌和基底细胞癌)、血管瘤、神经胶质瘤、脑胶质瘤。

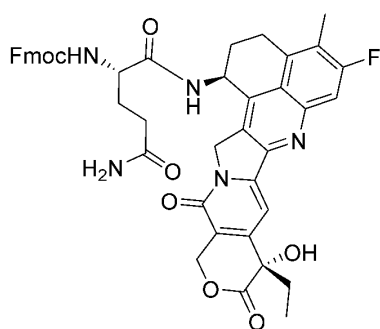
制备方法

本发明的第六方面提供了前述连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物的制备方法，所述方法包括以下步骤：

1. 制备由 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段 X；
2. 将 X 与包含马来酰亚胺 (m) 片段或环辛炔片段的化学结构 M 连接，得到 M-X；
3. 将细胞毒素 D 与 M-X 连接，得到连接子药物偶联物 M-X-D。

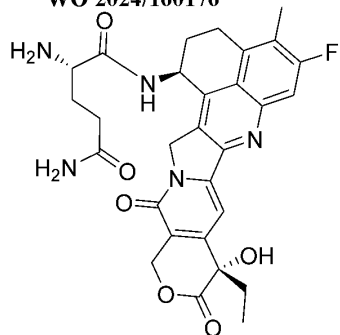
以下以 MCC-AAQ-Exatecan 为例进一步对上述制备方法进行说明。
MCC-AAQ-Exatecan 的示例性的制备过程如下：

1. 将 Fmoc-Gln 与 Exatecan 反应得到中间体一，其中中间体一结构式如下：



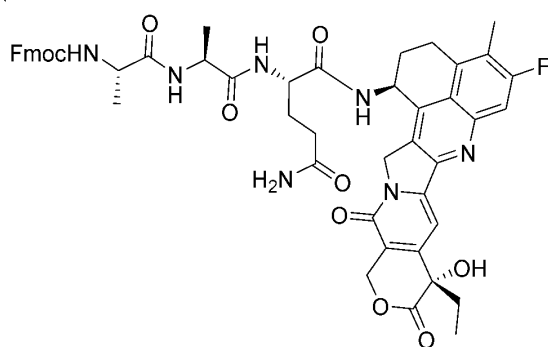
Fmoc-Gln-Exatecan

2. 将中间体一经 DEA 脱 Fmoc 保护基，到中间体二，其中中间体二结构式如下：



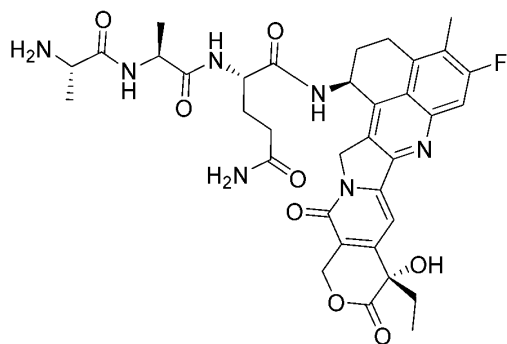
Gln-Exatecan

3. 将中间体二与 **Fmoc-Ala-Ala** 反应得到中间体三, 其中中间体三结构式如下:



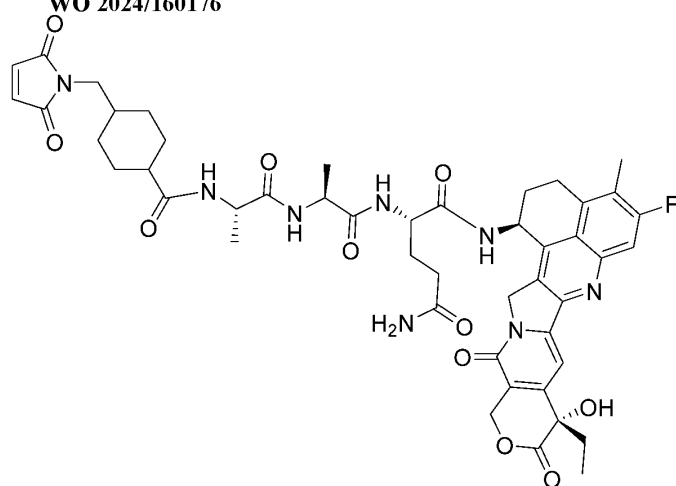
Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

4. 将中间体三脱 **Fmoc** 保护基得到中间体四, 其中中间体四结构式如下:



Ala-Ala-Gln-Exatecan

5. 将中间体四与 **MCC** 缩合得到产品, 其中产品结构式如下:



mcc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

本发明的第七方面提供了前述抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物的制备方法，所述方法包括以下步骤：

1. 取一定重量的单抗，用 PBS buffer 稀释并调节抗体 pH 至 7.5 左右；检测蛋白浓度，并称量抗体溶液净重，计算蛋白总量；向抗体中加入的 TCEP 溶液，室温下反应，连续摇匀；

2. 向还原后的抗体溶液加入过量的细胞毒药物溶液，混匀后在室温下反应，连续混匀；反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液，室温下反应，连续混匀；

3. 使用超滤离心管将偶联产物进行纯化，并置换到储存液中，然后用除菌过滤器进行过滤，即得到抗体药物偶联物。

另外，本发明同时还提供了以下技术方案：

连接子药物偶联物

本发明的第八方面涉及一种连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述连接子药物偶联物具有式 I 所示的结构，

M-X-D

式 I

其中，

M 为包含马来酰亚胺 (m) 片段或包含环辛炔及其衍生物片段(如 BCN、DIBO、DIBAC、BARAC 等)的化学结构；

X 为 1~4 个氨基酸组成的连接片段,选自 Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asn、

Ala-Asn、Asn、Ala-Ala-Ala-Pro、Ala-Ala-Pro、Ala-Pro、Pro、Pro-Asn、Asn-Pro、Lys、Lys-Asn、Lys-Pro、Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Gln、Ala-Gln、Gly-Gly-Gly-Gln、Gly-Gly-Gln、Gly-Gln、Gln；

D 为含有伯胺 (-NH₂) 基团的细胞毒素。

本发明的连接子药物偶联物中，连接子由包含马来酰亚胺(m)片段或包含环辛炔及其衍生物片段（如 BCN、DIBO、DIBAC、BARAC 等）的化学结构和 1~4 个氨基酸组成的连接片段构成，其具有以下特点：血液循环中稳定、可以在细胞内或肿瘤微环境中快速解体，并高效释放毒素。

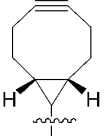
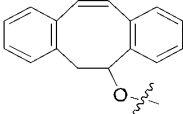
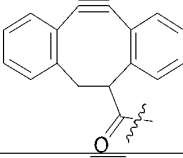
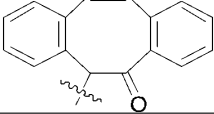
包含马来酰亚胺 (m) 片段的化学结构可以选自 4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-甲酰基 (mcc)、6-马来酰亚氨基己酰基(mc)、m-(PEG)_n、mc-(PEG)_n、mcc-(PEG)_n 等，各结构如下所示：

mcc	
mc	
m-(PEG) _n	
mc-(PEG) _n	
mcc-(PEG) _n	

其中，n 代表 PEG 的聚合度，优选为 2-12 之间的整数。

在某些实施方案中，包含马来酰亚胺 (m) 片段的化学结构为 6-马来酰亚氨基己酰基(mc)。在某些实施方案中，包含马来酰亚胺 (m) 片段的化学结构为 mc-(PEG)_n，其中，n 选自 4、8、12。发明人发现，较低的 PEG 聚合度在一定程度上有利于降低连接子药物偶联物制备的 ADC 中的聚合物含量 (HMW%)，因此，PEG 的聚合度 n 优选为 4。

包含环辛炔片段的化学结构可以选自 BCN、DIBO、DIBAC、BARAC 等，各结构如下所示：

BCN	
DIBO	
DIBAC	
BARAC	

。

式 I 中的所述 1~4 个氨基酸组成的连接片段选自 Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn、Asn、Ala-Ala-Ala-Pro、Ala-Ala-Pro、Ala-Pro、Pro、Pro-Asn、Asn-Pro、Lys、Lys-Asn、Lys-Pro、Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Gln、Ala-Gln、Gly-Gly-Gly-Gln、Gly-Gly-Gln、Gly-Gln、Gln。上述氨基酸单体或由多个氨基酸组合成的片段能够被肿瘤细胞溶酶体内特定的酶识别，并解离该类化合物中的羧基与含有伯胺的化合物形成的酰胺键（肽键），不需要额外的自裂解片段（self-immolative moiety）。

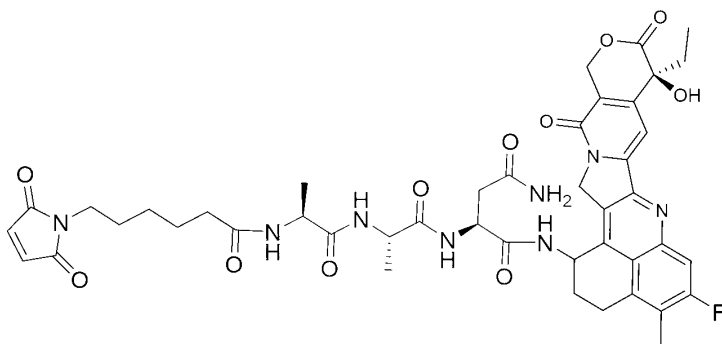
在某些实施方案中，所述连接片段选自带有天冬酰胺（Asn）的连接片段，例如 Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn、Asn、Pro-Asn、Lys-Asn。天冬酰胺（Asn）可被莱古酶（Legumain）识别，莱古酶除了存在于肿瘤细胞的溶酶体内，还大量分布于肿瘤细胞外，因此能够胞外释放小分子，发挥 bystander 效应，对低内吞靶点细胞具有良好的杀伤作用。在某些实施方案中，所述连接片段为 Ala-Ala-Asn（AAN）。

所述含有伯胺（-NH₂）基团的细胞毒素可以选自喜树碱类化合物及其衍生物（如依喜替康、14-氨基喜树碱、9-氨基喜树碱等）等拓扑异构酶 I 抑制剂、阿霉素类化合物及其衍生物（如 Daunorubicin）等拓扑异构酶 II 抑制剂、美登素类化合物及其衍生物、卡里奇霉素类化合物及其衍生物、多卡米星类化合物及其衍生物（如 Duocarmycin 衍生物）和吡咯并苯二氮卓类化合物及其衍生物（如 PBD）等 DNA 烷基化试剂、金盏花素类化合物及其衍生物（如去

甲基 MMAE 或去甲基 MMAF 等) 微管蛋白抑制剂、Protac 类化合物和分子胶类化合物(如来那度胺等)等各种具有细胞杀伤活性的小分子化合物。在某些实施方案中,所述含有伯胺 (-NH₂) 基团的细胞毒素为依喜替康(Exatecan)。

在某些实施方案中,所述含有伯胺 (-NH₂) 基团的细胞毒素选自 Exatecan (依喜替康)、14-氨基喜树碱(14-AC)、9-氨基喜树碱(9-AC)、去甲基 MMAE、去甲基 MMAF、Daunorubicin、来那度胺。

在某些实施方案中,本发明的连接子药物偶联物为 mc-AAN-Exatecan, 其具有如下所示的结构:

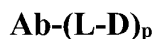


。

抗体药物偶联物

本发明的第九方面涉及一种抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物,所述抗体药物偶联物由本发明第八方面所述的连接子药物偶联物与抗体偶联形成。

在某些实施方案中,所述抗体药物偶联物具有式 II 所示的结构,



式 II

其中,

Ab 为抗体;

L 为接头,其结构为 M'-X,其中,M'与 Ab 相连,X 与 D 相连;

M'为如上定义的 M 通过马来酰亚胺基团连接至 Ab 所形成的化学结构;

X 为如上定义的 1~4 个氨基酸组成的连接片段;

D 为如上定义的含有伯胺 (-NH₂) 基团的细胞毒素;

p 为 2-8 之间的任意数值(如 2、2.5、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、

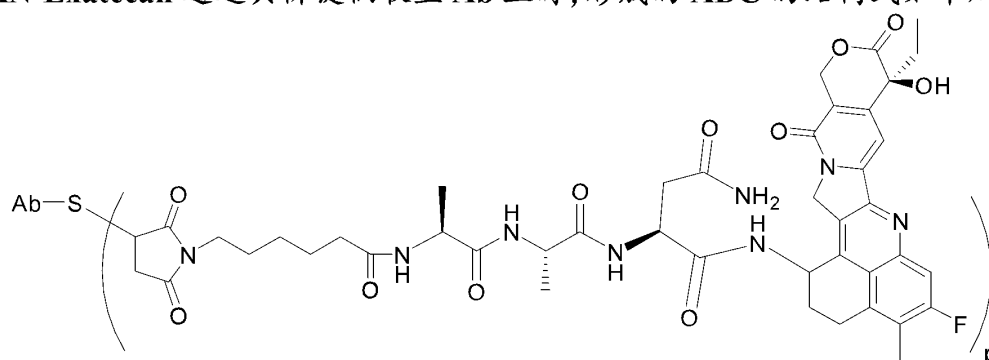
5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8，或者如 2-2.5、2.5-3、3-3.5、3.5-4、4-4.5、4.5-5、5-5.5、5.5-6、6-6.5、6.5-7、7-7.5 或 7.5-8)。

式 II 中，L-D 表示接头与细胞毒素通过共价键相连，形成 L-D 分子；Ab-(L-D)_p 表示 p 个 L-D 分子通过共价键偶联至 Ab。

本发明中，药物抗体比(DAR)是指偶联到抗体的药物分子的个数(例如，式 I 中的 p)。本文所述的抗体药物偶联物中包含的药物分子的个数可以是整数，也可以是小数。无论是整数还是小数，其指的均是每个抗体偶联的药物分子的平均数量。“p 为 2-8 之间的任意数值”，其表示，p 可以是选自 2-8 之间的任意整数(包括端点 2 和 8)，也可以是选自 2-8 之间的任意小数，例如 2.3、3.9、4.0、4.2。同时，本领域技术人员可以理解，即使采用相同的制备方法，不同的批次制备得到的抗体药物偶联物的 DAR 值也不一定完全相同，例如，可以在上下不超过 0.5 的范围内浮动。

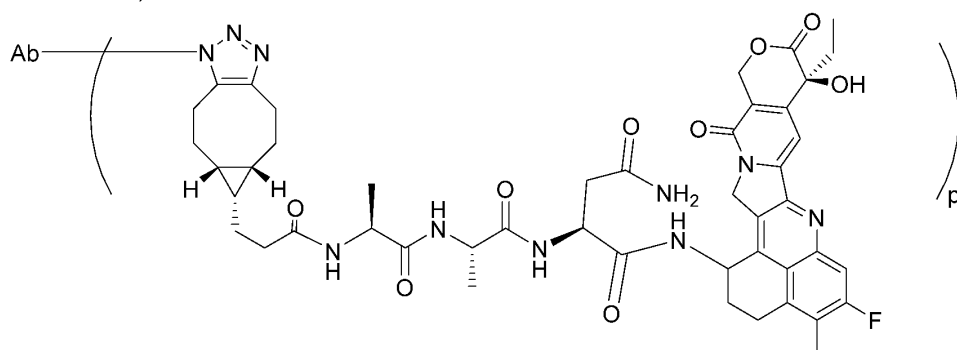
药物抗体比(DAR)可以通过常规分析手段来验证，诸如质谱、ELISA 测定法、HIC 和 HPLC。还可以测定 ADC 在 p 方面的定量分布。在有些情况中，将 p 为某数值的同质 ADC 从具有其它药物载荷的 ADC 中分离、纯化和验证可以通过诸如反相 HPLC 或电泳的手段来实现。

本发明中，连接子药物偶联物通过共价键偶联至抗体 Ab 上时，一种方式可以通过马来酰亚胺与抗体中的巯基偶联形成-S-丁二酰亚胺结构。例如 mc-AAN-Exatecan 通过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



上述形成的马来酰亚胺接头的 ADC 中，-S-既可以通过工程化改造引入的外接巯基，也可以是抗体 Ab 被还原进而被打开二硫键后的抗体自身所含有的巯基。

另一种方式可以通过环辛炔及其衍生物片段(如 BCN、DIBO、DIBAC、BARAC 等)的化学结构与抗体链接,其中环辛炔与修饰抗体中引入的叠氮基团(-N₃)偶联形成三氮唑结构结构。例如 BCN-AAN-Exatecan 通过共价键偶联至 Ab 上时,形成的 ADC 的结构式如下所示:



可用于本发明的抗体没有特别的限制,可以选自鼠源抗体、兔源抗体、噬菌体展示来源抗体、酵母展示来源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人源抗体、抗体片段、双特异性抗体及多特异性抗体。

在某些实施方案中,所述抗体为单克隆抗体,非限制性地选自:HER2 抗体、EGFR 抗体。

在某些实施方案中,所述抗体为 HER2 抗体。在某些实施方案中,所述抗体由轻链和重链组成,所述轻链包含 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3,其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 所示。在某些实施方案中,所述重链包含 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3,其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 所示。

在某些实施方案中,所述轻链包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7 的轻链可变区。在某些实施方案中,所述轻链还包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 的轻链恒定区。在某些实施方案中,所述轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 9。

在某些实施方案中,所述重链包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 的重链可变区。在某些实施方案中,所述重链还包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 11 的重链恒定区。在某些实施方案中,所述重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12。

在某些实施方案中,所述抗体为 EGFR 抗体。在某些实施方案中,所述抗体由轻链和重链组成,所述轻链包含 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3,其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 所示。

在某些实施方案中，所述重链包含 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3，其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 所示。

在某些实施方案中，所述轻链包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 19 的轻链可变区。在某些实施方案中，所述轻链还包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 的轻链恒定区。在某些实施方案中，所述轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 21。

在某些实施方案中，所述重链包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 22 的重链可变区。在某些实施方案中，所述重链还包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 23 的重链恒定区。在某些实施方案中，所述重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 24。

本发明涉及的部分序列的信息提供于上表 1 中。

药物组合物和制药用途

本发明的第十方面提供了药物组合物，其包含前述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，或前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

在一些实施方案中，所述药物组合物还包含用于治疗肿瘤的化疗药物、免疫治疗药物和免疫抑制剂中的至少一种。

在一些实施方案中，所述化疗药物例如为阿霉素 (Adriamycin)、环磷酰胺、紫杉烷类(如紫杉醇 (Taxol)、多西他赛 (Taxotere))、卡培他滨 (Xeloda)、吉西他滨 (Gemzar)、长春瑞滨 (Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂 (瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康 (camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌 (Novantrone)、泼尼松、长春新碱 (Oncovin)、多柔比星、强的松等，或它们的组合。

在一些实施方案中，所述免疫治疗药物例如为 PD-1 抗体、PD-L1 抗体、EGFR 单抗、CD20 单抗、HER2 单抗(例如曲妥珠单抗、Trastuzumab biosimilar、Trastuzumab-dkst) 等，或它们的组合。

在一些实施方案中，所述免疫抑制剂选自：(1) 糖皮质激素类，如可的松和强的松；(2) 微生物代谢产物，如环孢菌素和藤霉素等；(3) 抗代谢物，如巯唑嘌呤和 6-巯基嘌呤等；(4) 多克隆和单克隆抗淋巴细胞抗体，如抗淋巴细胞球蛋白和 OKT3 等；(5) 烷化剂类，如环磷酰胺。在一些具体的实施方案

中,所述免疫抑制剂例如为甲基强的松龙、强的松、硫唑嘌呤、普乐可复、赛尼哌、舒莱、环孢菌素、他克莫司、雷帕霉素、霉酚酸酯、咪唑立宾、环磷酰胺、芬戈莫德等。

在一些实施方案中,所述药物组合物还包含至少一种药用辅料。

本发明的第十一方面提供了前述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物,或前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗肿瘤。

本发明的第十二方面提供了治疗和/或预防肿瘤的方法,其包括:给予有需要的受试者治疗和/或预防有效量的前述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物,或前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

本发明中所述的“肿瘤”是指器官或组织局部细胞过度增生后形成的病变,包括血液肿瘤和实体瘤,包括良性肿瘤和恶性肿瘤。在某些实施方案中,所述肿瘤选自以下标志物阳性或高表达的肿瘤:HER2、EGFR。

在某些实施方案中,所述肿瘤选自:乳腺癌、黑色素瘤、脑膜瘤、软组织肉瘤、唾液腺肿瘤、原发性肝癌、椎管内肿瘤、纵隔肿瘤、脑癌、骨癌、阴茎癌、骨肉瘤、颅内肿瘤、舌癌、上颌窦癌、甲状腺癌、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脑垂体腺瘤、睾丸肿瘤、非何杰金氏淋巴瘤、膀胱癌、白血病、胃癌、鼻咽癌、喉癌、口腔癌、食管癌、肺癌(例如非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、肾癌、宫颈癌、绒毛膜癌、外阴癌、皮肤癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、大肠癌、卡波西肉瘤、非黑色素瘤皮肤癌(包括鳞状细胞癌和基底细胞癌)、血管瘤、神经胶质瘤、脑胶质瘤。

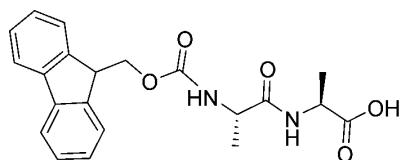
制备方法

本发明的第十三方面提供了前述连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

1. 制备由1~4个氨基酸组成的连接片段X;
2. 将X与包含马来酰亚胺(m)片段或环辛炔片段的化学结构M连接,得到M-X;
3. 将含有伯胺(-NH₂)基团的细胞毒素D与M-X连接,得到连接子药物偶联物M-X-D。

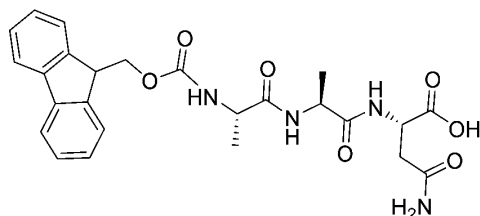
以下以 **mc-AAN-Exatecan** 为例进一步对上述制备方法进行说明。**mc-AAN-Exatecan** 的示例性的制备过程如下：

1. 将 **Fmoc-Ala-OH** 经 **HOSu** 活化后，与 **L-Ala** 反应得到中间体一，其中中间体一结构式如下：



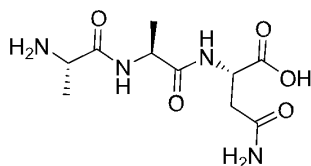
Fmoc-Ala-Ala-OH

2. 将中间体一经 **HOSu** 活化后，与 **L-Asn** 反应得到中间体二，其中中间体二结构式如下：



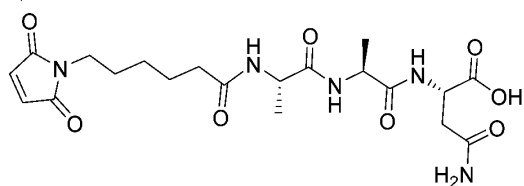
Fmoc-Ala-Ala-Asn-OH

3. 将中间体二进行脱 **Fmoc** 反应得到中间体三，其中中间体三结构式如下：



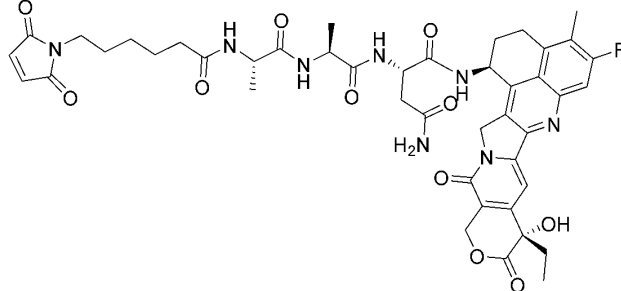
Ala-Ala-Asn-OH

4. 将中间体三与 **6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯** 反应得到中间体四，其中中间体四结构式如下：



MC-Ala-Ala-Asn-OH

5. 将中间体四与依喜替康 (**Exatecan**) 缩合得到产品，其中产品结构式如下：



MC-Ala--Ala-Asn-Exatecan

。

本发明的第十四方面提供了前述抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物的制备方法，所述方法包括以下步骤：

1. 取一定重量的单抗，用 PBS buffer 稀释并调节抗体 pH 至 7.5 左右；检测蛋白浓度，并称量抗体溶液净重，计算蛋白总量；向抗体中加入的 TCEP 溶液，室温下反应，连续摇匀；

2. 向还原后的抗体溶液加入过量的细胞毒药物溶液，混匀后在室温下反应，连续混匀；反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液，室温下反应，连续混匀；

3. 使用超滤离心管将偶联产物进行纯化，并置换到储存液中，然后用除菌过滤器进行过滤，即得到抗体药物偶联物。

有益效果

在某些实施方案中，本发明提供的连接子可以在去除疏水性结构 PAB 的情况下，通过酶解反应释放 Payload，既能够降低 Linker-Drug 的疏水性，减少制备 ADC 时产生的聚合物含量，也可以表现出相应的细胞杀伤活性。

术语定义

具体实施方式

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

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本

领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

在本发明中，除非另有说明，否则任何数值范围应理解为包括范围内的任何值或任何子范围。

在本发明中，术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体的轻链可分为 κ 和 λ 两类。重链可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 五种，依据重链的不同可将抗体分为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE 五类。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区（V_H）和重链恒定区（C_H）组成。重链恒定区由 3 个结构域（C_{H1}、C_{H2} 和 C_{H3}）组成。各轻链由轻链可变区

（V_L）和轻链恒定区（C_L）组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和补体系统的组分 C1q 的结合。V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域（称为互补决定区（CDR）），其间散布有较保守的称为骨架区（FR）的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区（V_H 和 V_L）分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

在某些实施方案中，在偶联反应中少于理论最大值的药物模块偶联至抗体。一般而言，抗体不包含许多游离的和反应性的半胱氨酸硫醇基，其可连接药物模块；事实上，抗体中的大多数半胱氨酸硫醇基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中，可以在部分或完全还原性条件下用还原剂诸如二硫苏糖醇（DTT）或三羧基乙基膦（TCEP）还原抗体以产生反应性半胱氨酸硫醇基。

本发明中，术语“药学上可接受的盐”是指，(i) 本发明所提供的偶联物中

存在的酸性官能团与适当的无机或者有机阳离子（碱）形成的盐，并且包括但不限于，碱金属盐，如钠盐、钾盐、锂盐等；碱土金属盐，如钙盐、镁盐等；其他金属盐，如铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等；无机碱盐，如铵盐；有机碱盐，如叔辛基胺盐、二苄基胺盐、吗啉盐、葡糖胺盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己基胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基-苯乙基胺盐、哌嗪盐、四甲基胺盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐。以及，(ii) 本发明所提供的偶联物中存在的碱性官能团与适当的无机或者有机阴离子（酸）形成的盐，并且包括但不限于，氢卤酸盐，如氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐等；无机酸盐，如硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等；低级烷磺酸盐，如甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐等；芳基磺酸盐，如苯磺酸盐、对苯磺酸盐等；有机酸盐，如醋酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等；氨基酸盐，如甘氨酸盐、三甲基甘氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐等。

药学上可接受的盐可使用本领域熟知的标准程序获得，例如，通过将足量的碱性物质和提供药学上可以接受的阴离子的合适的酸反应，或者，通过将足量的酸性物质和提供药学上可以接受的阳离子的合适的碱反应。

在本发明中，溶剂合物表示这些形式的本发明的抗体药物偶联物：所述抗体药物偶联物通过与溶剂分子配位而形成的固态或液态形式的复合物。水合物是溶剂合物的一种具体形式，其具有配位的水分子。在本发明中，水合物是优选的溶剂合物。

制备各种含有一定量的活性成分的药物组合物的方法是已知的，或根据本发明的公开内容对于本领域技术人员是显而易见的。如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995) 所述，制备所述药物组合物的方法包括掺入适当的药学赋形剂、载体、稀释剂等，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。

本发明中，所述药用辅料是指生产药品和调配处方时，使用的赋形剂和附加剂，是指除活性成分外，在安全性方面已进行了合理的评估，并且包含在药物制剂中的物质。药用辅料除了赋型、充当载体、提高稳定性外，还具

有增溶、助溶、缓控释等重要功能，是可能会影响到药品的质量、安全性和有效性的重要成分。根据其来源可分为天然物、半合成物和全合成物。根据其作用与用途可分为：溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、黏合剂、崩解剂、填充剂、润滑剂、湿润剂、渗透压调节剂、稳定剂、助流剂、矫味剂、防腐剂、助悬剂、包衣材料、芳香剂、抗黏着剂、抗氧剂、螯合剂、渗透促进剂、pH 调节剂、缓冲剂、增塑剂、表面活性剂、发泡剂、消泡剂、增稠剂、包合剂、保湿剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂与反絮凝剂、助滤剂、释放阻滞剂等；根据其给药途径可分为口服、注射、黏膜、经皮或局部给药、经鼻或口腔吸入给药和眼部给药等。同一药用辅料可用于不同给药途径的药物制剂，且有不同的作用和用途。

本发明中，所述药物组合物可根据给药途径制成各种适宜的剂型。例如片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服溶液剂、口服混悬剂、口服乳剂、散剂、酏剂、糖浆剂、注射剂、栓剂、软膏剂、乳膏剂、糊剂、眼用制剂、丸剂、植入剂、气雾剂、粉雾剂、喷雾剂等。其中，所述的药物组合物或适宜的剂型可以含有 0.01 mg 至 1000 mg 的本发明的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

本文使用的术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：(a)预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状；(b)抑制疾病的症状，即阻止其发展；或(c)缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

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

在本发明中，“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。本发明的物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还涵盖该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受

试者的, 因此预防有效量会低于治疗有效量。在癌症的情况中, 药物的治疗有效量可减少癌细胞数; 缩小肿瘤体积; 抑制 (即一定程度的减缓, 优选停止) 癌细胞浸润到周围器官中; 抑制 (即一定程度的减缓, 优选停止) 肿瘤转移; 一定程度的抑制肿瘤生长; 和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。

在本发明中, 20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见 Immunology-A Synthesis (第 2 版, E.S. Golub 和 D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其通过引用合并入本文。

在本发明中, 若 X 为 Ala-Ala-Gln, 则表示 X 为由 Ala、Ala 和 Gln 依次连接形成肽键后组成的连接片段, 且本领域技术人员可以理解, 其并不限定 Ala、Ala 和 Gln 具体的立体构型, 如 L 型或 D 型。类似地, 若 X 为 Ala-Ala-(3-cyano-alanine), 则表示 X 为由 Ala、Ala、(3-cyano-alanine) 依次连接形成肽键后组成的连接片段, 且本领域技术人员同样可以理解, 其并不限定 Ala、Ala、(3-cyano-alanine) 具体的立体构型, 如 L 型或 D 型, 或者 S 型或 R 型。本发明中 X 其他类似的限定请参照前述内容进行理解。

在本发明中, 若 X 选自 Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-(3-cyano-alanine) 及它们的氘代化物, 其表示, X 可以为 Ala-Ala-Gln, 也可以为 Ala-Ala-(3-cyano-alanine), 也可以为 Ala-Ala-Gln 的氘代化物, 还可以为 Ala-Ala-(3-cyano-alanine) 的氘代化物。

术语“氘代化物”表示某个化合物中的一个或多个 (如 2 个、3 个、4 个或更多个) 氢原子 (氢原子的位置不做具体限定, 可以是烷基上的氢原子, 也可以是氨基上的氢原子等等) 被氘原子替代后所形成的化合物。

术语“嵌合抗体”是指这样的抗体, 其中可变区序列源自一个物种, 恒定区序列源自另一物种, 如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

“人源化”抗体是指非人 (例如小鼠) 抗体形式, 其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段 (如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或者抗体的其它抗原结合亚序列), 含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地, 人源化抗体是人免疫球蛋白 (接受者抗体), 其中接受者抗体的互补决定区

(CDR) 的残基由来自具有希望的特异性、亲和性和能力的非人物种 (供体抗体) 如小鼠、大鼠或者兔的 CDR 残基置换。

此外，在人源化中，还可能对 VH 和/或 VL 的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基进行突变，由此改善抗体的一或多种结合特性（例如亲和性）。可进行例如 PCR 介导的突变引入突变，其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常，引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外，CDR 内的突变通常不超过一个或两个。

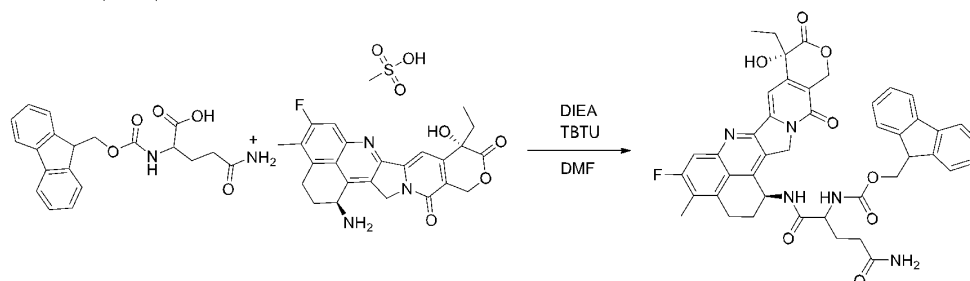
下面结合具体实施例对本发明进行进一步的解释说明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

实施例一、连接子药物 MCC-AAQ-Exatecan 的制备

1. 中间体一的合成 Fmoc-Gln-Exatecan

将 Fmoc-Gln-OH（N-苄氧羰基-L-谷氨酰胺）（76.3mg 1.1eq.）、Exatecan（100mg 1.0eq.）加入反应瓶中，加入 DMF（1ml），DIEA（29mg 1.5eq.）加入 TBTU（72.5mg 1.1eq.），室温反应 2 小时，HPLC 监控，无原料剩余。反应结束后，中压过柱纯化（DCM/MeOH）。收集产品，浓缩，得到中间体一。

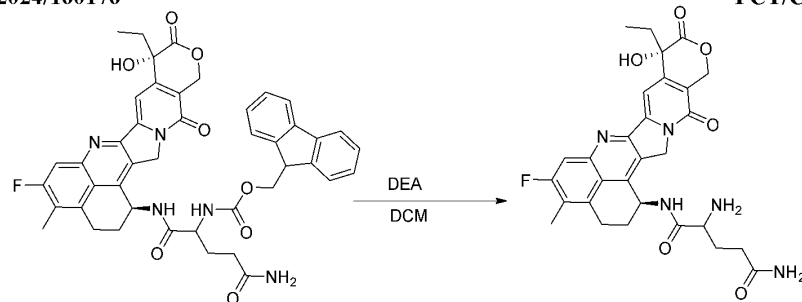
反应式如下：



2. 中间体二的合成 Gln-Exatecan

将中间体一 Fmoc-Gln-Exatecan（130mg 1.0eq.）加入反应瓶中，加入 DCM（2ml），室温搅拌。加入 DEA（0.5ml），室温反应。4 小时后，HPLC 监控，无原料剩余。停止反应，缓慢加入 MTBE（10ml），析出大量固体，搅拌 30min。过滤，MTBE 洗涤，得到灰白色固体，干燥，得到 95mg 中间体二。

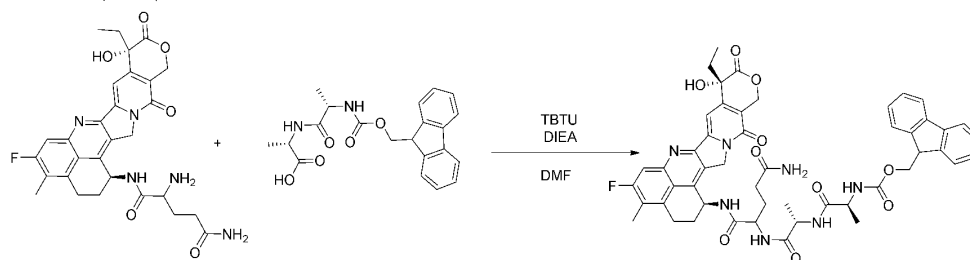
反应式如下：



3. 中间体三的合成 Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体二 Gln-Exatecan (100mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, DMF (1mL), Fmoc-Ala-Ala-OH (67.8mg 1.0eq.), TBTU (68.4mg 1.2eq.), DIEA (34.4mg 1.5eq.), 室温反应 3 小时, HPLC 监控, 反应结束。中压过柱纯化 (DCM/MeOH), 收集产品得到中间体三。

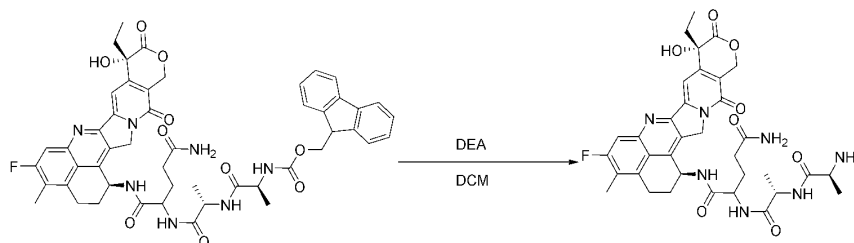
反应式如下:



4. 中间体四的合成 Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体三 Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan (140mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, 加入 DCM (2ml), 室温搅拌。加入 DEA (0.5ml), 室温反应, 4 小时后, HPLC 监控, 反应结束。缓慢加入 MTBE (10ml), 析出大量固体, 搅拌 30min。过滤, MTBE 洗涤, 得到灰白色固体, 干燥, 得到中间体四。

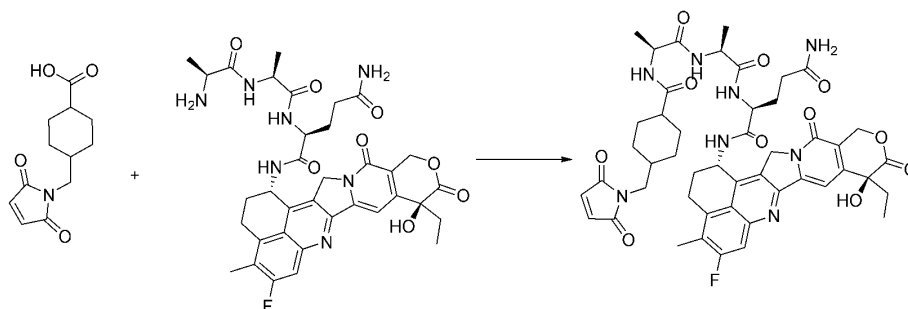
反应式如下:



5. 产品合成 MCC-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体四 Ala-Ala-Gln-Exatecan (50mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, DMF (1mL), 再加入 MCC (18mg 1.1eq), HATU (80.8 mg, 3.0 eq), DIEA (36.6 mg, 4.0 eq.), 室温反应 2 小时后, HPLC 监控, 至中间体四无剩余, 停止反应。Prep-HPLC 制备纯化, 收集产品, 浓缩干, 得到产品 (核磁如下)。

反应式



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.17-8.26 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.83-7.91 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 7.65-7.74 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 7.21-7.28 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.98-7.04 (m, 2H), 5.43-5.50 (m, 1H), 5.36-5.43 (m, 2H), 5.15-5.24 (m, 1H), 5.01-5.11 (m, 1H), 4.14-4.24 (m, 1H), 3.97-4.08 (m, 1H), 3.47-3.57 (m, 1H), 3.20-3.27 (m, 1H), 3.05-3.16 (m, 2H), 2.30-2.36 (m, 2H), 2.00-2.15 (m, 4H), 1.77-1.92 (m, 3H), 1.65-2.00 (m, 5H), 1.45-1.64 (m, 4H), 1.09-1.24 (m, 5H), 0.95-1.07 (m, 4H), 0.79-0.94 (m, 5H).

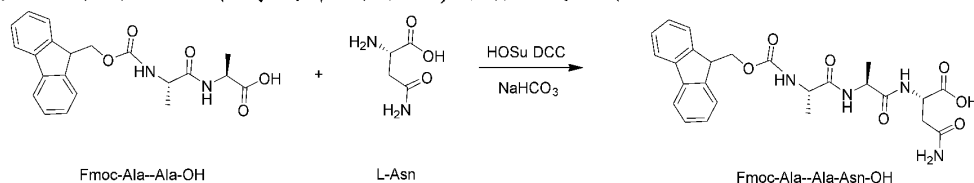
实施例二、连接子药物 MCC-Ala-Ala-Asn-Exatecan 的制备

1. 中间体一的合成

将 Fmoc-Ala-Ala-OH (N-[芴甲氧羰基]-L-丙氨酰基-L-丙氨酸) 经 HOSu (N-羟基丁二酰亚胺) 活化后, 与 L-Asn (L-天冬酰胺) 反应得到中间体一。

具体的步骤是: 室温下反应瓶中加入 Fmoc-Ala-Ala-OH (1.0eq), HOSu (1.3eq), THF (10v/w), 控制温度在室温, 搅拌条件下缓慢加入 DCC (1.3eq), 室温进行反应, 用 HPLC 检测, 至 Fmoc-Ala-Ala-OH 残留较少 (面积归一法), 将反应液过滤, 滤饼用 THF (2.5v/w) 淋洗。滤液中加入纯化水 (11.5v/w), 加入 L-Asn (1.1eq), 碳酸氢钠固体 (1.0eq), 室温搅拌反应, 用 HPLC 检测至 Fmoc-Ala-Ala-OSu 残留较少, 然后加入一水合柠檬酸 (1.0eq) 搅拌, 浓缩反应液除去大部分溶剂, 加入 DMF (4v/w) 溶解产品, 过滤后通过制备液相进行反相制备, 浓缩制备液至无明显液滴流出后, 用乙酸乙酯萃取 4 次, 将

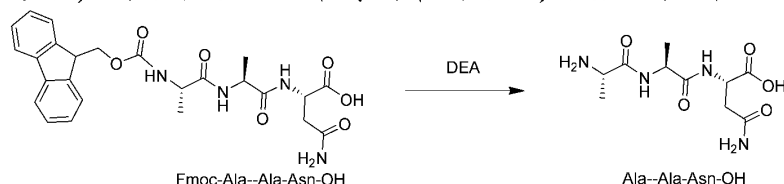
乙酸乙酯相浓缩至干得到中间体一，反应式如下：



2. 中间体二的合成

将中间体一加 DEA（二乙胺）脱 Fmoc 后，得到中间体二。

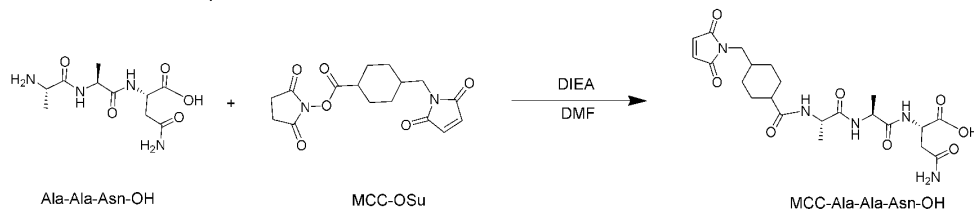
具体的步骤是：室温下反应瓶中加入中间体一（1.0eq），加入 DMF（15v/w），控制温度在室温，滴加 DEA（3v/w），室温进行反应，用 HPLC 检测，至中间体一无残留，浓缩除去 DMF，加入 DCM（40v/w），纯化水（40v/w），搅拌后分液，将水相浓缩至干得到中间体二，反应式如下：



3. 中间体三的合成

将中间体二与 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸-N-琥珀酰亚胺酯反应得到中间体三。

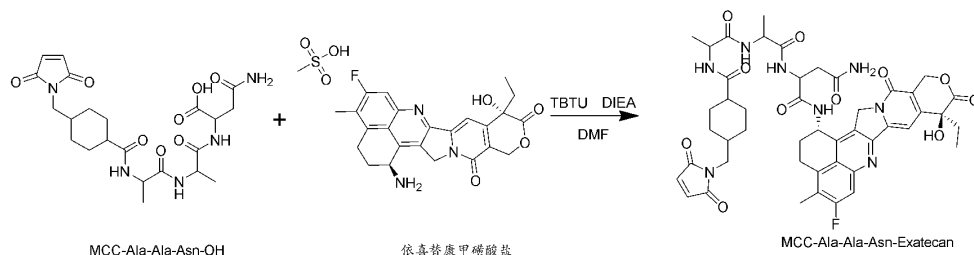
具体的步骤是：室温下反应瓶中加入中间体二（1.0eq），4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸-N-琥珀酰亚胺酯（1.1eq），加入 DMF（22v/w），水（9.5v/w），DIPEA（1.0eq），后室温进行反应，至中间体二残留较少（QDA 检测），待反应完成，浓缩除去大部分溶剂，加入水（50v/w），EA（50v/w），加入 1.0eq DIEA 搅拌溶清后静置分液，水相用 EA（50v/w*2）萃取两次，将水相浓缩至干，得到中间体三，反应式如下：



4. 产品的合成

将中间体三与依喜替康甲磺酸盐 (CAS 号: 169869-90-3) 经 HATU 经缩合反应得到中间体四。

具体的步骤是: 室温条件下, 反应瓶中加入中间体三 (1.2eq), 加入 DMF (15v/w), 依次加入依喜替康甲磺酸盐 (1.0eq), TBTU (1.4eq), DIPEA (4.5eq), 后室温进行反应, HPLC 中控检测, 反应完成后, 通过 prep-HPLC 纯化, 浓缩制备液, DCM 萃取制备液, 浓缩, 得到产品 (核磁如下), 反应式如下:



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.15-8.25 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.85-8.0 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.7-7.85(d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.33-7.4 (d, $J=8.0$ Hz,1H), 7.28-7.32 (m,1H), 6.98-7.05(d, $J=8.0$ Hz,2H), 6.85-6.95(m,1H), 6.45-6.57(m,1H), 5.45-5.55(m,1H), 5.40-5.45(m,1H), 5.20-5.27(m,1H), 4.40-4.50(m,1H), 3.95-4.05(m,1H), 3.20-3.27(m,2H), 3.10-3.18(m,2H), 2.86-2.97(m,2H), 2.36-2.43(m,3H), 2.15-2.25(m,1H), 1.95-2.10(m,3H), 1.80-1.93(m,3H), 1.73-1.78(m,1H), 1.55-1.70(m,3H), 1.45-1.55(m,3H), 1.0-1.3(m,10H), 0.80-0.95(m,5H).

实施例三、连接子药物 MCC-Ala-Ala- (3-cyano-L-alanine) -Exatecan 的制备

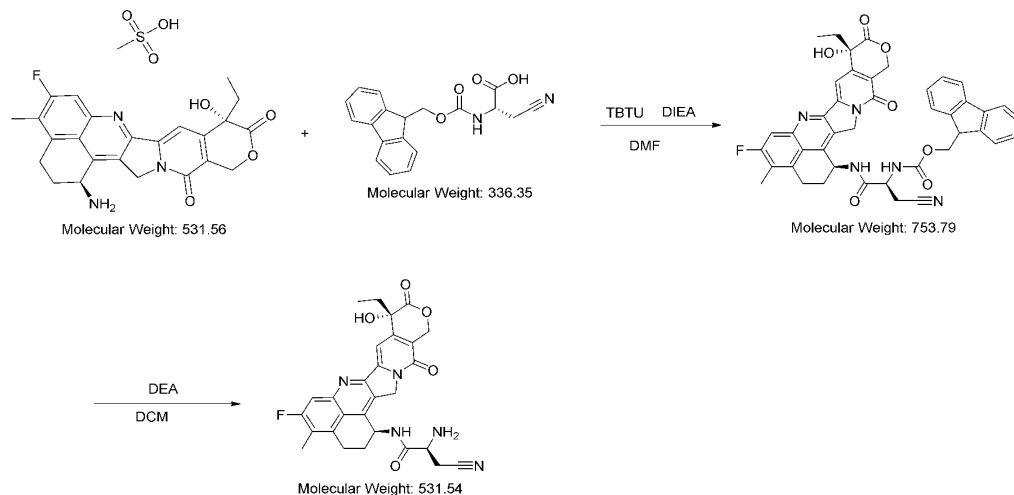
1. 中间体一的合成 (3-cyano-L-alanine) -Exatecan

将 Fmoc-Asn-OH (40mg 1.2eq) 加入反应瓶中, 加入 DMF (1.5ml), TBTU(45mg, 1.5eq), DIEA(60mg 2.5eq) 搅拌, 溶解完全。搅拌 30min 后, 再加入伊喜替康甲磺酸盐(50mg 1.0eq), 搅拌 4hrs, HPLC 检测不反应。补加 TBTU(45mg, 1.5eq), DIEA(60mg 2.5eq) 继续室温反应。HPLC 监控, 原料 Exatecan 无剩余, Fmoc- (3-cyano-L-alanine) -Exatecan 占比约 70%。停止反应, 中压制备纯化。收集产品。30°C 减压浓缩干, 得到产品。

将上述产品加入反应瓶中, 再加入 DCM (4ml) 搅拌。加入 DEA (1ml),

室温搅拌，溶解完全。HPLC 监测，无原料剩余。加入 MTBE 10ml，室温搅拌，有大量固体析出。过滤，得到灰白色固体。MTBE 洗涤滤饼，干燥得到 35mg 固体，即中间体一。

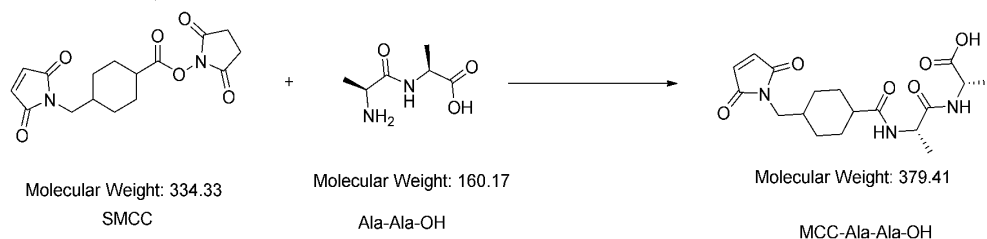
反应式如下：



2. 中间体二的合成 MCC-Ala-Ala-OH

将 SMCC (460mg, 1.1eq) 加入反应瓶中，再加入 NH₂-Ala-Ala-OH (200mg, 1.0eq)，加入 DMF (4ml, 20V)，搅拌，再加入 DIPEA (161.4mg, 1.0eq)。加热至 60°C 反应。随反应进行反应液逐渐溶清。反应至少 8 小时。取样 LC-MS 检测，反应结束，降温至室温。35°C 减压浓缩除去 DMF，再加入纯化水 (4ml, 20V)，DIPEA (161.4mg, 1.0eq)。加入 EA (4ml, 20V)，搅拌洗涤。有机相弃去。再加入 EA (2ml, 10V) 萃取两次。有机相弃去。水相保留，用 2M 盐酸调节酸性至 pH 为 1~2，析出大量白色固体。搅拌一小时。过滤，得到白色固体。纯化水洗涤固体。干燥。得到白色固体 320mg，即中间体二。

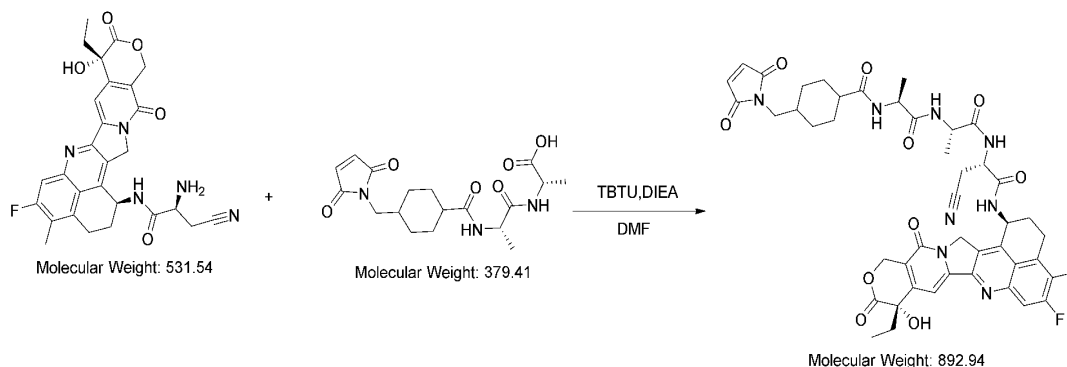
反应式如下：



3. 产品合成 MCC-Ala-Ala- (3-cyano-L-alanine) -Exatecan

将中间体一 (3-cyano-L-alanine) -Exatecan (35mg 1.0eq) 加入反应瓶中, DMF (1mL), 再加入中间体二 MCC-Ala-Ala-OH (28mg, 1.1eq), TBTU (25.3mg, 1.2eq), DIPEA (12.8mg, 1.5eq) 室温反应 2 小时后, HPLC 监控, 中间体一无剩余, 停止反应。Prep-HPLC 纯化, 收集产品。浓缩干。得到黄色玻璃状固体即产品 (核磁如下)。

反应式如下:



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.45-8.55 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.23-8.29 (d, $J=2$ Hz, 2H), 7.95-8.03(d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.84-7.92 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.76-7.84 (m, 1H), 7.27-7.33(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.98-7.02(m, 1H), 5.47-5.56(m, 1H), 5.40-5.45(m, 1H), 5.26-5.36(m, 1H), 5.1-5.2(m, 1H), 4.44-4.55(m, 1H), 4.07-4.19(m, 1H), 3.88-4.0(m, 2H), 3.19-3.26(m, 2H), 3.13-3.18(m, 1H), 2.90-3.0(m, 2H), 2.76-2.88(m, 2H), 2.36-2.43(m, 3H), 2.00-2.12(m, 2H), 1.80-1.93(m, 3H), 1.80-1.92(m, 2H), 1.55-1.70(m, 3H), 1.13-1.26(m, 5H), 1.05-1.12(m, 3H), 0.80-0.95(m, 5H).

实施例四、连接子药物 MCC-Ala-Ala- ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid) -Exatecan 的合成路线

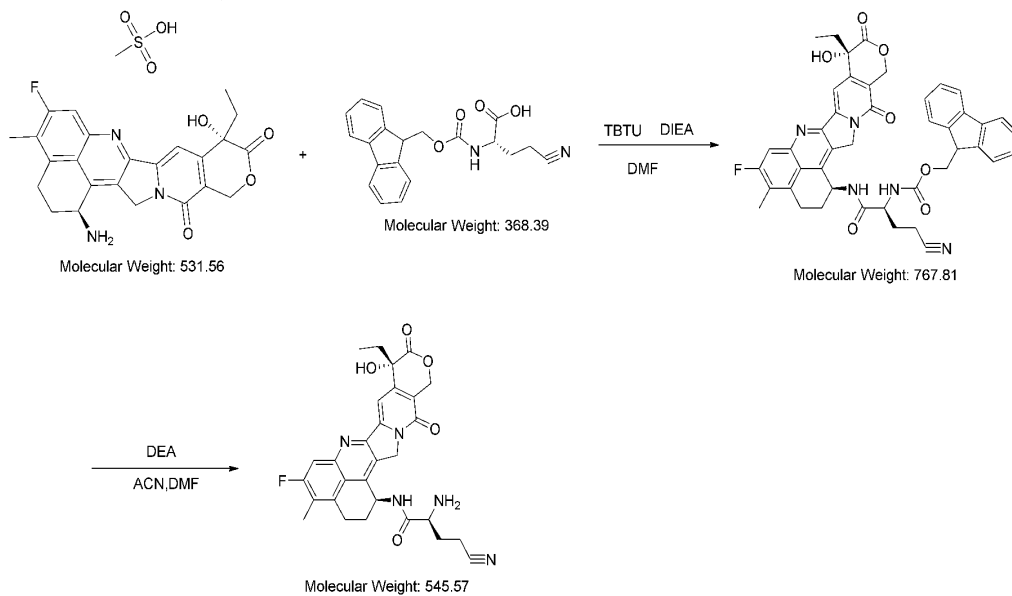
1. 中间体一的合成 ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid) -Exatecan

将(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氰基丁酸(79.8 mg 1.1eq)、伊喜替康甲磺酸盐(110mg 1.0eq)加入反应瓶中, 加入 DMF (1.5ml), TBTU(79.73 mg, 1.5eq), DIEA(80mg 2.5eq), 室温反应 3 小时, HPLC 监控。反应结束后, 加入 ACN 9 ml, 室温搅拌。再加入 DEA 1.0 ml, 继续室温反应 1 小时。取样监测, 无原料剩余。加入 MTBE 10 ml。搅拌, 无明显固体析出。

搅拌 1 小时，无明显变化。

30°C 减压浓缩除去溶剂。浓缩过程中析出大量固体，此时溶剂仅除去少量，约 3ml。停止浓缩，继续室温搅拌 1 小时。过滤，再用 MTBE 洗涤固体。干燥，得到灰白色固体即中间体一。

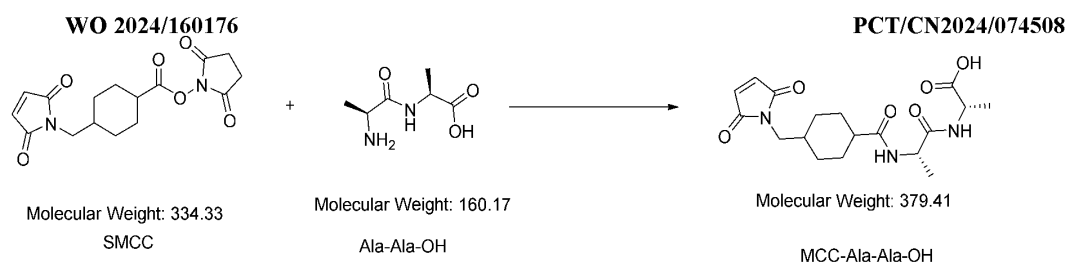
反应式如下：



2. 中间体二的合成 MCC-Ala-Ala-OH

将 SMCC (460mg, 1.1eq) 加入反应瓶中，再加入 $\text{NH}_2\text{-Ala-Ala-OH}$ (200mg, 1.0eq)，DMF (4ml, 20V)，搅拌，再加入 DIPEA (161.4mg, 1.0eq)。加热至 60°C 反应 8 小时取样 LC-MS 检测，反应结束，降温至室温。35°C 减压浓缩除去 DMF，再加入纯化水 (4ml, 20 V)，DIPEA (161.4mg, 1.0eq)。加入 EA (4ml, 20V)，搅拌洗涤。有机相弃去。再加入 EA (2ml, 10V) 洗涤两次。有机相弃去。水相保留，用 2M 盐酸调节酸性至 pH 为 1~2，析出大量白色固体。搅拌一小时。过滤，得到白色固体。纯化水洗涤固体。干燥。得到白色固体 320mg 即中间体二。

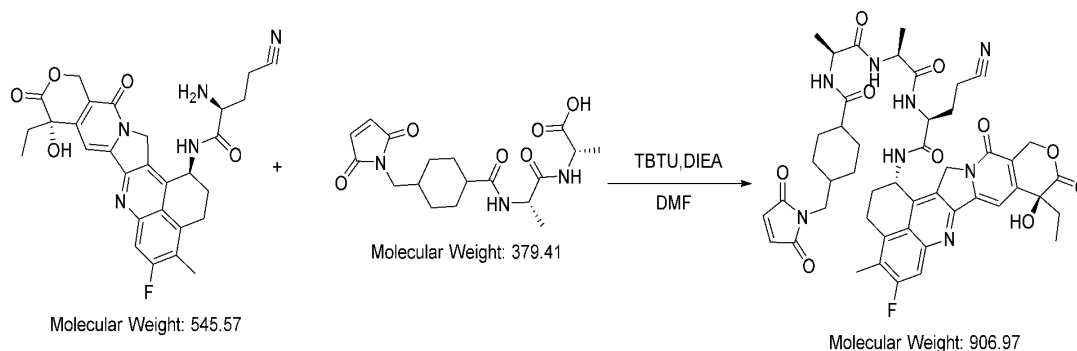
反应式如下：



3. 产品合成 MCC-Ala-Ala- ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid) - Exatecan

将中间体一 ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid) -Exatecan (25mg 1.0eq) 加入反应瓶中，DMF (1mL)，再加入中间体二 MCC-Ala-Ala-OH (19mg,1.1eq), TBTU (17.7 mg,1.2eq), DIPEA (8.88 mg, 1.5eq) 室温反应 2 小时后，HPLC 监控，反应结束。Prep-HPLC 制备纯化，收集产品。浓缩除去大部分乙腈。冻干，得到黄色固体即产品（核磁如下）。

反应式如下：



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30-8.37 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.87-7.96 (d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.75-7.86(d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.27-7.33(d, *J*=8.0 Hz,1H), 6.98-7.02(m,2H), 5.45-5.54(m,1H), 5.40-5.45(m,2H), 5.23-5.32(m,1H), 5.04-5.13(m,1H), 4.25-4.37(m,1H), 3.97-4.09(m,1H), 3.56-3.66(m,4H), 3.10-3.26(m,4H), 2.35-2.46(m,4H), 2.00-2.13(m,3H), 1.77-1.92(m,3H), 1.66-1.75(m,2H), 1.56-1.64(m,3H), 1.45-1.53(m,1H), 1.12-1.26(m,4H), 1.01-1.13(m,4H), 0.80-0.94(m,4H).

实施例五、连接子药物 MCC-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-Exatecan 的合成路线

1. 中间体一的合成 MCC-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-OH

将 H-Gln(Trt)-OH 2-CTC resin (1.0 g, 0.5 mmol, 0.5 mmol/g) 加入固相反应器中, 加入 DCM (20 mL), 在振荡器中振荡 20 min 充分溶胀树脂。过滤, 用 DMF 洗涤树脂 3 次。加入含 Fmoc-Ala-OH (3.0 eq, 467 mg, 1.5 mmol), HBTU (3.0 eq, 569 mg, 1.5 mmol) 及 HOBT (3.0 eq, 202 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 用 DMF 洗涤树脂 6 次。加入 20%哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, 过滤, 并再次加入 20%哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, Kaiser 检测树脂颜色为阳性, 用 DMF 洗涤树脂 6 次, 得到 H-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin。

向含 H-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin 的反应管内, 加入含 Fmoc-Ala-OH (3.0 eq, 467 mg, 1.5 mmol), HBTU (3.0 eq, 569 mg, 1.5 mmol) 及 HOBT (3.0 eq, 202 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 用 DMF 洗涤树脂 6 次。加入 20%哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, 过滤, 并再次加入 20%哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, Kaiser 检测树脂颜色为阳性, 用 DMF 洗涤树脂 6 次, 得到 H-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin。

向含 H-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin 的反应管内, 加入含 Fmoc-Ala-OH (3.0 eq, 467 mg, 1.5 mmol), HBTU (3.0 eq, 569 mg, 1.5 mmol) 及 HOBT (3.0 eq, 202 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 用 DMF 洗涤树脂 6 次。加入 20%哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, 过滤, 并再次加入 20%哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, Kaiser 检测树脂颜色为阳性, 用 DMF 洗涤树脂 6 次, 得到 H-Ala-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin。

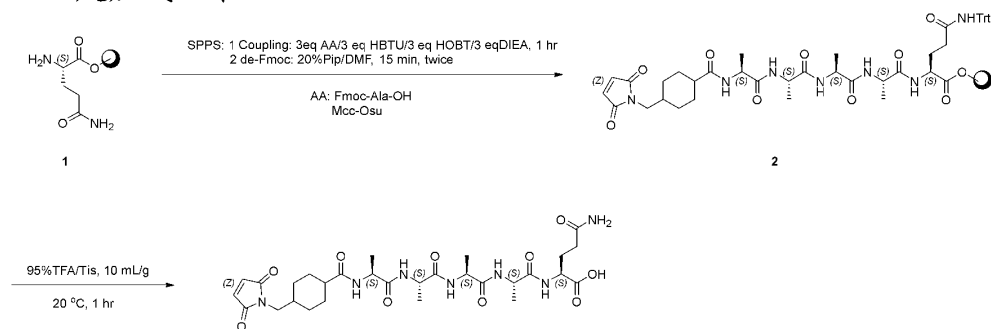
向含 H-Ala-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin 的反应管内, 加入含 Fmoc-Ala-OH (3.0 eq, 467 mg, 1.5 mmol), HBTU (3.0 eq, 569 mg, 1.5 mmol) 及 HOBT (3.0 eq, 202 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 用 DMF 洗涤树脂 6 次。加入 20%哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, 过滤, 并再次加入 20%哌啶/DMF 溶液 20 mL,

在振荡器中反应 15 min, Kaiser 检测树脂颜色为阳性, 用 DMF 洗涤树脂 6 次, 得到 H-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin。

向含 H-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin 的反应管内, 加入含 SMCC (3.0 eq, 501 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 依次用 DMF 洗涤树脂 6 次, MeOH 洗涤树脂 3 次, MTBE 洗涤 3 次。真空干燥箱 30°C 干燥 1 hr, 得到 MCC-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln(Trt)-2-CTC-树脂 (1.42 g, 0.5 mmol)。

向上述得到的树脂转移至 50 mL 离心管中, 加入 冷的 95%TFA/Tis 溶液 (15 mL), 在振荡器中反应 1 hr。过滤, 并将滤液缓慢加入到冷的 MTBE 溶液中 (150 mL), 静置 1 hr, 析出白色沉淀物, 离心并用冷的 MTBE 溶液洗涤沉淀 3 次。收集洗涤后的沉淀, 真空干燥箱 30°C 干燥 4 hr, 得到白色固体即中间体一 MCC-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-OH。

反应式如下:

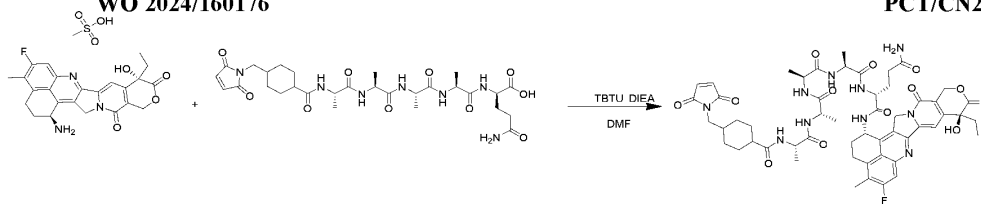


2. 产品合成 MCC-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体一 MCC-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-OH (244mg, 2.0eq) 加入反应瓶中, 再加入 DMF (2mL), 伊喜替康加磺酸盐 (100mg, 1.0eq), TBTU (132mg, 2.2eq), DIPEA (73mg, 3.0eq)。室温搅拌反应 1 小时。HPLC 检测, Exatecan 剩余 10%。

Prep-HPLC 纯化, 收集产品。浓缩干制备液, 得到黄色固体 (核磁如下)。

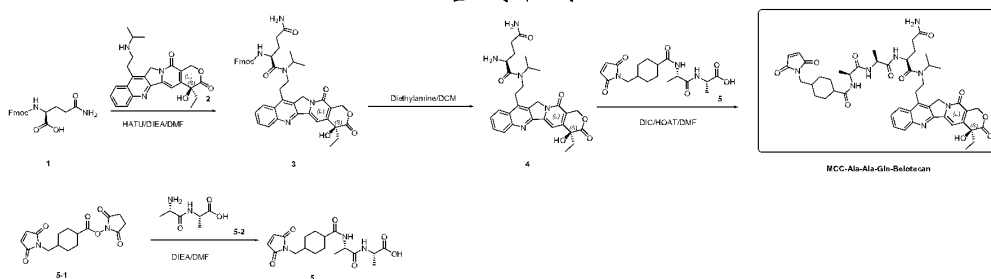
反应式如下:



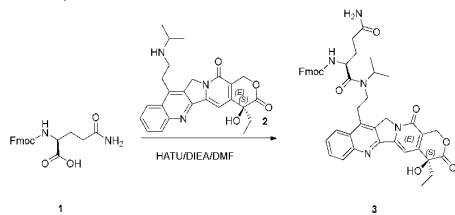
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.25-8.33(d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.87-7.95 (d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.76-7.86(d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.28-7.34(d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.20-7.26(m, 1H), 6.98-7.02(m, 1H), 6.73-6.76(m, 1H), 5.47-5.55(m, 1H), 5.40-5.41(m, 1H), 5.26-5.36(m, 2H), 5.05-5.15 (m, 2H), 4.12-4.20(m, 2H), 4.03-4.09(m, 1H), 3.87-3.94(m, 1H), 3.20-3.27(m, 2H), 3.12-3.18(m, 1H), 2.65-2.68(m, 1H), 2.36-2.43(m, 2H), 2.31-2.35(m, 1H), 2.02-2.13(m, 2H), 1.78-1.93(m, 3H), 1.6-1.76(m, 2H), 1.56-1.64(m, 2H), 1.21-1.27(m, 1H), 1.06-1.20(m, 6H), 0.85-0.94(m, 3H).

实施例六：连接子药物 MCC-Ala-Ala-Gln-Belotecan 的合成路线

MCC-Ala-Ala-Gln-Belotecan 合成路线

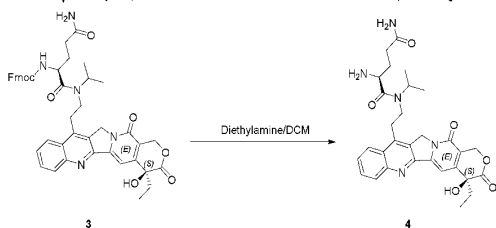


1. 中间体 3 Fmoc-Gln-Belotecan 合成



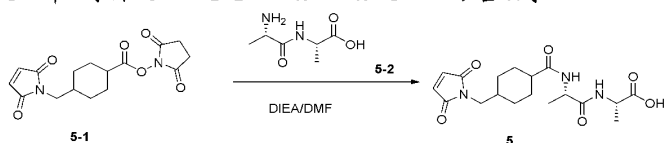
将中间体 1 (212 mg, 0.575 mmol, 5.0 eq), Belotecan (50 mg, 0.115 mmol, 1.0 eq), HATU (219 mg, 0.575 mmol, 5 eq) 加入反应瓶中, 加入 DMF (3 mL) 震荡使其溶解, 10°C 下加入 DIEA (190 μ L, 1.15 mmol, 10 eq), 10°C 搅拌反应 1 hr。HPLC 检测 Belotecan 反应完全。制备纯化, 收集产品。浓缩冻干, 得到黄色固体产物 3 Fmoc-Gln-Belotecan (51 mg, 纯度: 98.71%, 收率: 55.84%)。MS(ESI): m/z 784.3[M+H]⁺。

2. 中间体 4 Gln-Belotecan 合成



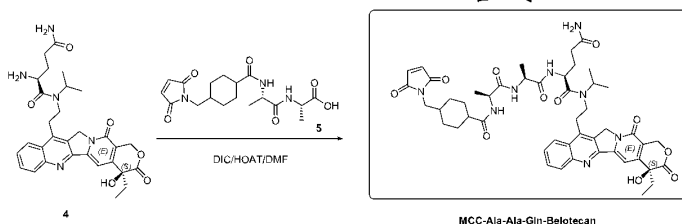
将中间体 3 Fmoc-Gln-Belotecan (51 mg, 0.065 mmol, 1.0 eq) 加入反应瓶中, 加入 DMF (4 mL), 二乙胺 (1 mL), 20°C 搅拌 2 hr, HPLC 检测原料无剩余。真空浓缩反应液, 加入 DMF (2 mL), 通过制备纯化, 将制备液浓缩后冻干得黄色固体 4 Gln-Belotecan (24 mg, 纯度: 91.96%, 收率: 60.40%)。MS(ESI): m/z 562.34[M+H]⁺。

3 中间体 5 MCC-Ala-Ala-OH 的合成



将原料 5-1 MCC-OSu (9.5 g, 59.31 mmol, 1.0 eq), 5-2 Ala-Ala-OH (21.8 g, 65.24 mmol, 1.1 eq) 加入反应瓶中, 25°C 加入 DMF (190 mL), 然后加入 DIEA (9.8 mL, 59.31 mmol, 1.0 eq), 60°C 搅拌反应 8 hr。HPLC 检测反应完全。反应液降至 25°C, 真空浓缩, 然后依次加入 H₂O (190 mL), DIEA (9.8 mL) 及 EA (190 mL), 25°C 搅拌 1 hr 后加入分液漏斗中静置分液。将水相分出, 用 EA (95 mL) 萃取两次。分去 EA 层, 在水相中缓慢滴加 2M 盐酸溶液(71.3 mL), 25°C 搅拌 1 hr 后过滤, 得到的固体经真空干燥得到白色固体 5 MCC-Ala-Ala-OH (16.55 g, 纯度: 95%, 收率: 73.54%)。MS(ESI): m/z 380.2[M+H]⁺。

4 MCC-Ala-Ala-Gln-Belotecan 合成

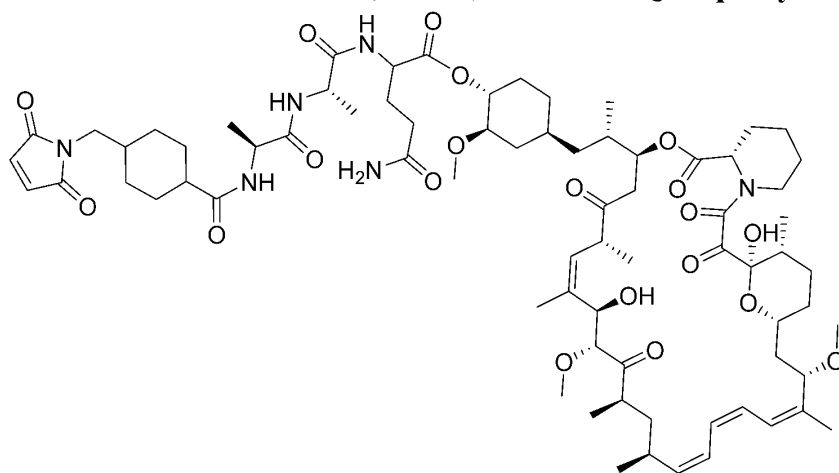


将中间体 4 (15 mg, 0.027 mmol, 1.0 eq), 5 MCC-Ala-Ala-OH (15.2 mg, 0.04 mmol, 1.5 eq), HOAT (7.3 mg, 0.054 mmol, 2.0 eq) 加入反应瓶中, 加入 DMF (2 mL) 震荡使其溶解, 10°C 下加入 DIC (8.0 μ L, 0.054

mmol, 2.0 eq), 20°C 搅拌反应 3 hr。HPLC 检测中间体 4 反应完全。制备纯化, 收集产品。浓缩冻干, 得到黄色固体产物 MCC-Ala-Ala-Gln-Belotecan (11 mg, 纯度: 96.42%, 收率: 43.03%)。MS(ESI): m/z 462.5[M+2H]²⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.58 (d, *J*= 10.4 Hz, 1H), 8.19 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H), 8.15 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H), 7.92-7.87 (m, 4H), 7.78 (t, *J*= 8.0 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.21 (brs, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.77 (brs, 1H), 5.46-5.43 (m, 4H), 4.79-4.76 (m, 1H), 4.35-4.28 (m, 1H), 4.26-4.21 (m, 2H), 3.42-3.38 (m, 2H), 3.23 (d, *J*= 6.8 Hz, 2H), 3.22-3.18 (m, 1H), 2.22-2.07 (m, 3H), 1.93-1.84 (m, 3H), 1.75-1.66 (m, 3H), 1.62-1.59 (m, 2H), 1.27-1.26 (m, 4H), 1.23-1.21 (m, 5H), 1.18-1.16 (m, 6H), 0.90-0.86 (m, 6H)。

另外, 本领域技术人员还可以参照以上实施例一~实施例六的制备方法获得本发明其他连接子药物偶联物, 例如, MCC-AAQ-Rapamycin,



MCC-AAQ-Rapamycin。

实施例七、EGFR 抗体药物偶联物的制备

一、抗体偶联物 EGFR 抗体-MCC-AAQ-Exatecan 的制备

1. 取 EGFR 抗体, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5 左右; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120min 以上, 连续混匀将抗体链间二硫键完全还原。

2. 向还原后的抗体溶液加入过量的 MCC-AAQ-Exatecan 溶液（溶于 DMSO），混匀后置于 3D 摇床上，室温下，反应 30min 以上，连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液，置于 3D 摇床上，室温下，反应 30min 以上，连续混匀。

3. 使用 30KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化，并置换到储存液（10mM Histidine, pH5.5 左右）中，置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22um 的除菌过滤器进行过滤，即得到抗体药物偶联物 EGFR 抗体-MCC-AAQ-Exatecan 于 4°C 进行保存。

4. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度，用 HIC 进行 DAR 检测，SEC 进行纯度检测。

二、其他 EGFR 抗体药物偶联物的制备

本发明的其他连接子药物偶联物（如式 I 所示的连接子药物偶联物）与 EGFR 抗体制备抗体药物偶联物的方法可参照上述抗体偶联物 EGFR 抗体-MCC-AAQ-Exatecan 的制备方法。

实施例八、HER2 抗体药物偶联物的制备

本发明的连接子药物偶联物（如式 I 所示的连接子药物偶联物）与 HER2 抗体制备抗体药物偶联物（如抗体药物偶联物 HER2 抗体-MCC-AAN-Exatecan）的方法可参照上述实施例七的抗体偶联物 EGFR 抗体-MCC-AAQ-Exatecan 的制备方法。

实施例九、不同抗体药物偶联物的体外活性测试

对本发明的不同抗体药物偶联物进行体外活性测试，以检测其细胞杀伤活性。

测试方法如下：

将靶细胞按一定数量铺板入 96 孔黑色底透的细胞培养板，经过 24 小时孵育后，加入浓度梯度稀释的样品，再经过 72 小时或 144 小时孵育后，使用显色试剂，显色 60 分钟，使用酶标仪进行读板。活细胞数越多，信号值越高，根据不同的浓度梯度点所得到的不同信号值，在酶标仪上形成四参数拟合曲线，得到 C 值即 IC₅₀ 值。

表 1 MCC-AAQ-Exatecan ADC 在 MDA-MB-468 细胞系中的活性数据

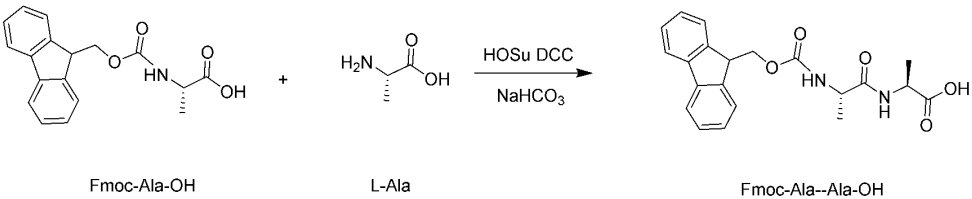
mAb	Linker Payload	ADC	HIC-	SEC-HPLC			活性数据
		Concentration	HPLC				
		mg/mL	DAR	HMW%	Mono%	LMW%	
EGFR 抗体	MCC- AAQ- Exatecan	3.0	8.0	1.0	98.7	0.3	IC50= ~ 0.082 nM;
HER2 抗 体	MCC- AAN- Exatecan	3.5	8.0	1.1	98.5	0.4	IC50= ~ 0.021 nM;

另外，本发明还提供了以下实施例。

实施例十、连接子药物偶联物 mc-AAN-Exatecan 的制备

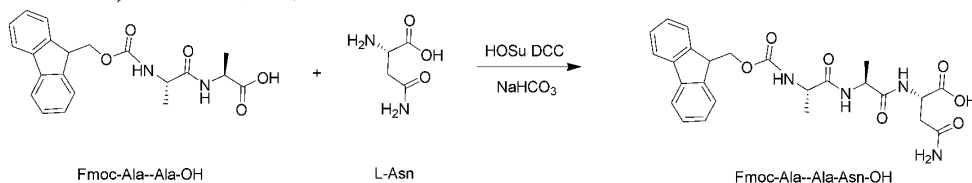
1. 中间体一的合成

将 Fmoc-Ala-OH(N-苄氧羰基-L-丙氨酸, CAS 号:35661-39-3)经 HOSu (N-羟基丁二酰亚胺, CAS 号: 6066-82-6) 活化后, 与 L-Ala (L-丙氨酸, CAS 号: 56-41-7) 反应得到中间体一; 具体的, 反应瓶内加入 Fmoc-Ala-OH (3g, 1.0eq)、HOSu (1.45g, 1.3eq), 加入 21mL 的 THF, 控制温度在室温, 搅拌条件下缓慢加入 DCC (2.59g, 1.3eq), 后室温进行反应, 用 HPLC 监控, 反应结束后, 将反应液过滤, 滤饼用 THF (6mL) 淋洗。滤液中加入纯化水 (15mL), 后加入 L-Ala (1.12g, 1.3eq), 碳酸氢钠固体 (0.81g, 1.0eq), 室温搅拌反应, HPLC 监控, 反应结束后加入柠檬酸 (2.02g, 1.0eq) 搅拌, 然后反应液用乙酸乙酯萃取, 浓缩有机相, 加入 DMF (12mL) 溶解产品, 过滤后通过 pre-HPLC, 浓缩制备液至无明显液滴流出后, 用乙酸乙酯萃取三次, 将乙酸乙酯相浓缩至干得到中间体一 1.75g, 该步反应收率为 57%, 反应式如下:



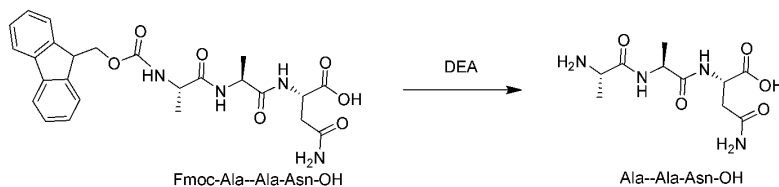
2. 中间体二的合成

将中间体一 (N-[苄甲氧羰基]-L-丙氨酰基-L-丙氨酸, CAS 号: 87512-31-0) 经 HOSu (N-羟基丁二酰亚胺, CAS 号: 6066-82-6) 活化后, 与 L-Asn (L-天冬酰胺, CAS 号: 70-47-3) 反应得到中间体二; 具体的, 反应瓶中加入中间体一 (0.87g, 1.0eq)、HOSu (0.34g, 1.3eq)、THF (9mL), 控制温度在室温, 搅拌条件下缓慢加入 DCC (0.61g, 1.3eq), 室温进行反应, 用 HPLC 监控, 反应结束后, 将反应液过滤, 滤饼用 THF (2mL) 淋洗。滤液中加入纯化水 (10mL), 加入 L-Asn (0.34g, 1.1eq), 碳酸氢钠固体 (0.19g, 1.0eq), 室温搅拌反应, HPLC 监控, 反应结束后, 加入一水合柠檬酸 (0.48g, 1.0eq) 搅拌, 浓缩反应液除去大部分溶剂, 制备纯化残余物, 浓缩制备液至无明显液滴流出后, 用乙酸乙酯萃取, 有机相浓缩至干得到中间体二 826mg, 该步反应收率为 73%。反应式如下:



3. 中间体三的合成

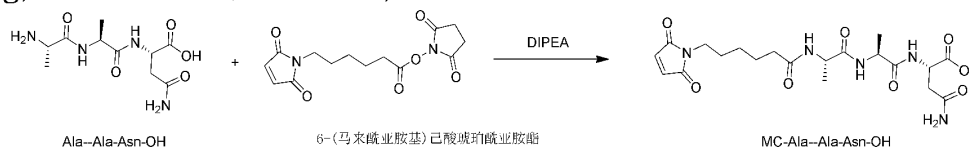
中间体二加 DEA (二乙胺, CAS 号: 109-89-7) 脱 Fmoc 后, 得到中间体三; 具体的, 反应瓶中加入中间体二 (100mg)、DMF (1.5mL), 控制温度在室温, 滴加 DEA (300 μ L), 室温进行反应, HPLC 监控, 至中间体二无剩余, 浓缩除去 DMF, 加入 DCM (4mL), 纯化水 (4mL), 搅拌后分液, 将水相浓缩至干得到中间体三 92mg, 该步反应收率为 166% (包裹部分溶剂), 反应式如下:



4. 中间体四的合成

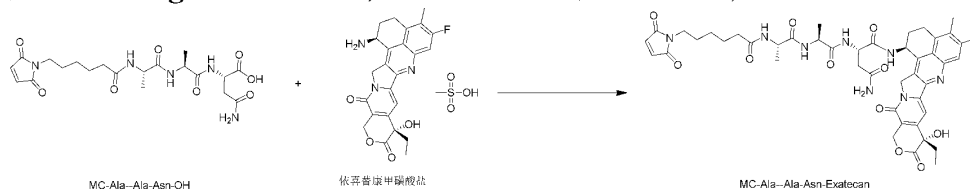
中间体三与 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯 (CAS 号: 55750-63-5)

反应得到中间体四；具体的，反应瓶中加入中间体三 (92mg, 1.0eq)、6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(135mg, 1.3eq)、DMF(1.5mL)、DIPEA(0.059mL, 1.0eq)，HPLC 监控，反应完成后，制备纯化，浓缩制备液，得到中间体四 56mg，该步反应收率为 35.7%，反应式如下：



5. 产品的合成

中间体四与依喜替康甲磺酸盐 (CAS 号: 169869-90-3) 经缩合反应得到中间体四；具体的，室温条件下，反应瓶中加入中间体四 (26mg, 1.0eq)，加入 DMF(1.5mL)，依次加入依喜替康甲磺酸盐(29.6mg, 1.0eq)、EEDQ(20.7mg, 1.5eq)，HATU (31.8mg, 1.5eq)、DMAP (0.7mg, 0.1eq)、DIPEA (29.2μL, 3.0eq)，室温进行反应。HPLC 监控，反应完成后，制备纯化，浓缩制备液，得到产品 16.5mg (核磁如下)，该步反应收率为 33.5%，反应式如下：



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.22-8.29 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.94-8.05 (d, $J=2.0$ Hz, 3H), 7.83-7.88(d, $J=2.0$ Hz,1H), 7.75-7.82(d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.34-7.40 (m,1H), 7.28-7.33 (m,1H), 6.96-7.02(d, $J=8.0$ Hz,2H), 6.87-6.94(m,1H), 5.42-5.55(m,1H), 5.41-5.46(m,2H), 5.21-5.26(m,1H), 4.41-4.49(m,1H), 4.00-4.12(m,2H), 3.32-3.40(m,2H), 3.12-3.17(m,2H), 2.86-2.96(m,2H), 2.71-2.76(m,2H), 2.36-2.43(m,2H), 2.14-2.24(m,1H), 1.97-2.07(m,3H), 1.81-1.93(m,2H), 1.36-1.52(m,4H), 1.05-1.25(m,8H), 0.83-0.93(m,3H).

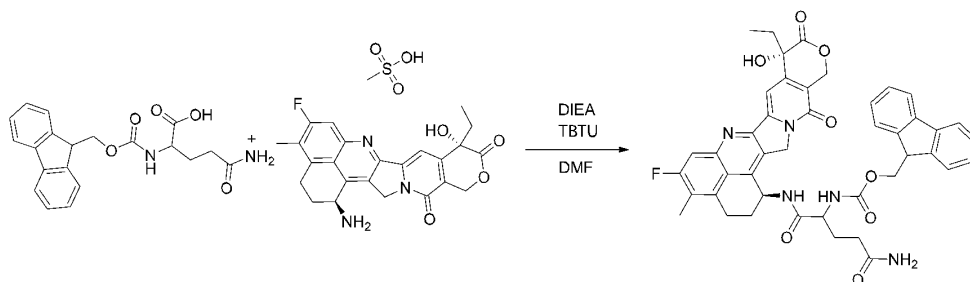
实施例十一、连接子药物偶联物 mc-Ala-Ala-Gln-Exatecan 的制备

中间体一的合成 Fmoc-Gln-Exatecan

将 Fmoc-Gln-OH (N-苄氧羰基-L-谷氨酰胺) (76.3mg 1.1eq.)、Exatecan(100mg 1.0eq.)加入反应瓶中，加入 DMF(1ml)，DIEA(29mg 1.5eq.)，TBTU (72.5mg 1.1eq.)，室温反应。HPLC 监控，无原料剩余。反应结束后，

加入硅胶浓缩拌样，过柱纯化。收集产品，浓缩干，得到产品 140mg，纯度 95%（有约 4%TBTU 的副产物 Hobt 未除尽），收率 94%。

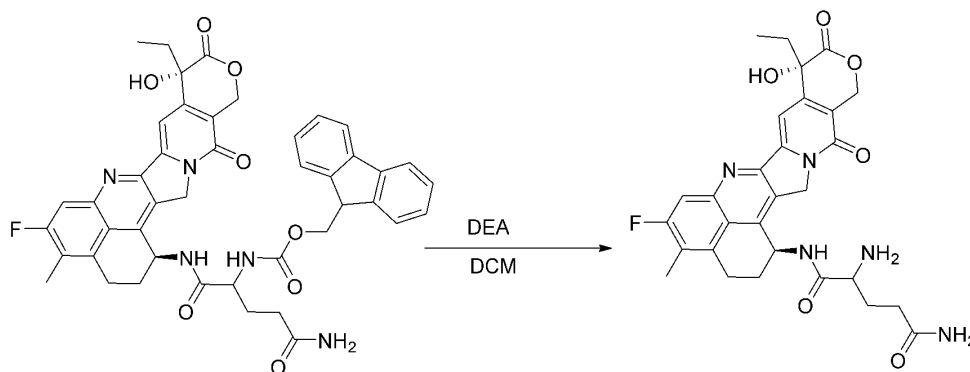
反应式如下：



1. 中间体二的合成 Gln-Exatecan

将中间体一 Fmoc-Gln-Exatecan(130mg 1.0eq.)加入反应瓶中,加入 DCM (2ml), 室温搅拌, 不能溶清。加入 DEA (0.5ml), 室温反应。HPLC 监控, 无原料剩余。停止反应, 缓慢加入 MTBE(10ml), 析出大量固体, 搅拌 30min。过滤, 得到灰白色固体, 干燥, 得到 95mg, 纯度 96%, 收率 94%。

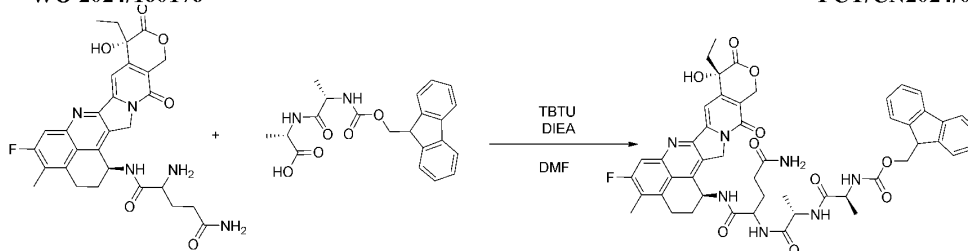
反应式如下：



2. 中间体三的合成 Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体二 Gln-Exatecan (100mg 1.0eq.)加入反应瓶中, DMF(1mL), Fmoc-Ala-Ala-OH (67.8mg 1.0eq), TBTU (68.4mg 1.2eq.) DIEA (34.4mg 1.5eq.), 室温反应。HPLC 监控, 无中间体二剩余, 停止反应。加入硅胶拌样, 过柱纯化, 收集产品得到产品 140mg, 纯度 95%, 收率 85%。

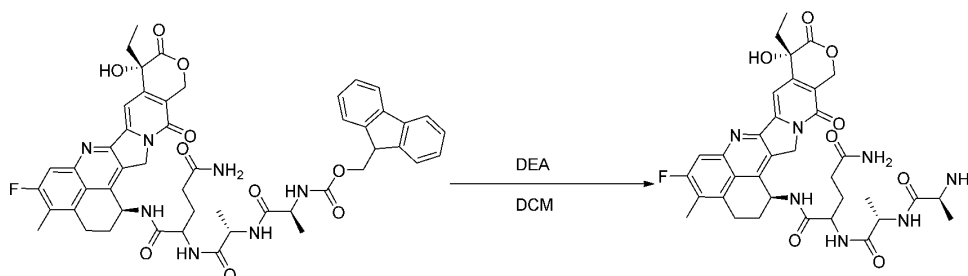
反应式如下：



3. 中间体四的合成 Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体三 Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan (140mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, 加入 DCM (2ml), DEA (0.5ml), 室温反应。HPLC 监控, 无原料剩余。停止反应, 缓慢加入 MTBE (10ml), 析出大量固体, 搅拌 30min。过滤, 得到灰白色固体, 干燥, 得到 70mg 产品。纯度 96% 收率 66%。

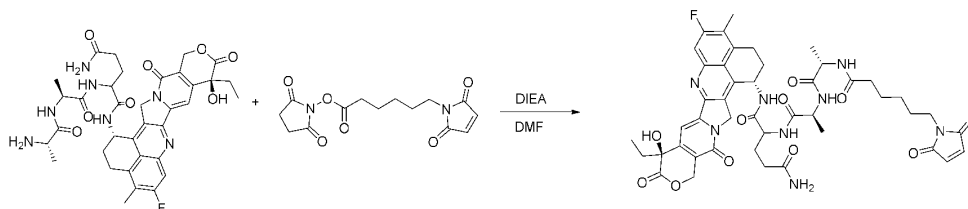
反应式如下:



4. 产品合成 mc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体四 Ala-Ala-Gln-Exatecan (50mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, DMF (1mL), 再加入 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯 (21.8mg 1.1eq), DIEA (12.1mg 1.5eq.), 室温反应。HPLC 监控, 至中间体四无剩余, 停止反应。制备纯化, 收集产品, 浓缩干, 得到产品 35mg(核磁如下)。纯度 98% 收率 55%。

反应式如下:



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.28-8.36 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.90-7.96(d, J = 2.0Hz, 2H), 7.75-7.87(d, J = 2.0 Hz, 2H), 7.27-7.33(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.20-7.25 (m, 1H), 6.97-7.03(d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.69-6.75(m, 1H), 6.49-6.53(m, 1H),

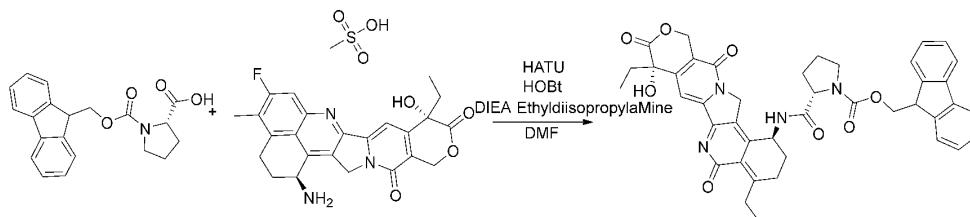
5.46-5.55(m,1H), 5.40-5.45(m,2H), 5.24-5.34(m,1H), 5.04-5.14(m,1H), 4.31-4.38(m,1H), 4.02-4.23(m,2H), 3.86-3.96(m,1H), 3.40-3.49(m,1H), 3.33-3.40(m,2H), 3.12-3.20(m,1H), 2.36-2.42(m,2H), 2.15-2.25(m,1H), 2.00-2.12(m,4H), 1.71-1.93(m,3H), 1.36-1.52(m,4H), 1.01-1.20(m,10H), 0.83-0.92(m,3H).

实施例十二、连接子药物偶联 mc-Pro-Exatecan 的制备

1. 中间体一的合成 Fmoc-Pro-Exatecan

将 Fmoc-Pro-OH (N-芴甲氧羰基-L-脯氨酸) (41mg 1.3eq.)、Exatecan(50mg 1.0eq.)加入反应瓶中,加入 DMF (1ml), DIEA (49mg 4eq.)溶解.加入 HATU (46mg 1.3eq.), HOBt(12.7mg 1.0eq.)室温反应, HPLC 监控,无原料剩余。反应结束后,加入硅胶浓缩拌样,过柱纯化。收集产品,浓缩干,得到产品 50mg, 纯度 95% 收率 73%。

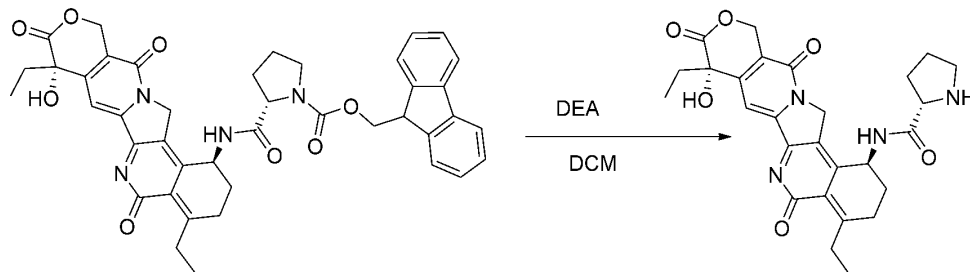
反应式如下:



2. 中间体二的合成 Pro-Exatecan

将中间体一 Fmoc-Pro-Exatecan (50mg 1.0eq.) 加入反应瓶中,加入 DCM (1ml), DEA (0.2ml), 室温反应, HPLC 监控,无原料剩余。停止反应,缓慢加入 MTBE (10ml),析出大量固体,搅拌 30min。过滤,得到灰白色固体,干燥,得到 30mg 纯度 96% 收率 86%。

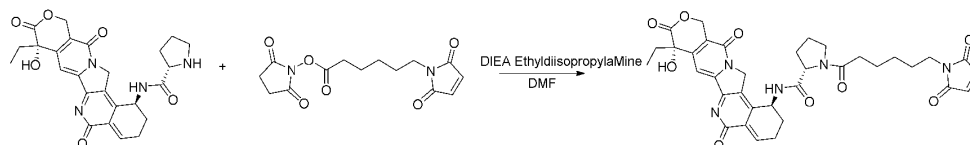
反应式如下:



3. 产品的合成 mc-Pro-Exatecan

将中间体二 Pro-Exatecan (30mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, DMF (1mL), 再加入 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯 (21.2mg 1.1eq), DIEA (12.1mg 1.5eq.), 室温反应, HPLC 监控, 至中间体二无剩余, 停止反应。加入硅胶拌样, 过柱纯化, 收集产品得到产品 25mg (核磁如下)。纯度 96% 收率 56%。

反应式如下:



^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.17-8.26 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.80-7.90 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 7.21-7.28 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.98-7.04 (m, 1H), 5.01-5.11 (m, 1H), 4.14-4.24 (m, 1H), 3.97-4.08 (m, 1H), 3.47-3.57 (m, 1H), 3.20-3.27 (m, 1H), 3.05-3.16 (m, 2H), 2.30-2.36 (m, 2H), 2.00-2.15 (m, 4H), 1.77-1.92 (m, 3H), 1.65-2.00 (m, 6H), 1.45-1.64 (m, 4H), 1.09-1.24 (m, 4H), 0.95-1.07 (m, 2H), 0.79-0.94 (m, 3H).

实施例十三、抗体偶联物 HER2 抗体-mc-AAN-Exatecan (DAR8) 的制备

1. 取 10mg 的 HER2 抗体, 用 PBS buffer 稀释至浓度 5mg/mL, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5 左右; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 8 倍摩尔数的 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120min 以上, 连续混匀。

2. 向还原后的抗体溶液加入过量的 mc-AAN-Exatecan 溶液(溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30min 以上, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30min 以上, 连续混匀。

3. 使用 15mL 的 30KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10mM Histidine, pH5.5 左右) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22um 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 HER2 抗体-mc-AAN-Exatecan 于 4°C 进行保存。

4. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检测, SEC 进行纯度检测。

实施例十四、不同抗体药物偶联物的体外活性测试

参照实施例十三的工艺，利用连接子药物偶联物 **mc-AAN-Exatecan** 分别与 **HER2** 抗体、**EGFR** 抗体及非特异结合抗体(**Anti-HEL**)偶联制备相应 **ADC**，利用连接子药物偶联物 **mc-Pro-Exa** 与 **HER2** 抗体偶联制备 **ADC**，并检测细胞杀伤活性。

测试方法如下：

将靶细胞按一定数量铺板入 **96** 孔黑色底透的细胞培养板，经过 **24** 小时孵育后，加入浓度梯度稀释的样品，再经过 **72** 小时孵育后，使用显色试剂，显色 **60** 分钟，使用酶标仪进行读板。活细胞数越多，信号值越高，根据不同的浓度梯度点所得到的不同信号值，在酶标仪上形成四参数拟合曲线，得到 **C** 值即 **IC₅₀** 值。

详细数据如下。

表 2 **mc-AAN-Exatecan ADC** 在不同细胞系中的活性数据

mAb	Linker Payload	ADC Concentration	HIC- HPLC	SEC-HPLC			活性数据
		mg/mL	DAR	HMW%	Mono%	LMW%	
HER2 抗体	mc-AAN-Exatecan	5.2	8.0	0.98	98.7	0.34	SKBR3（乳腺癌细胞株） mc-AAN-Exatecan ADC：IC₅₀=0.051 nM；
Anti- HEL 抗体（non-binding）		2.7	8.0	1.69	98.10	0.25	无特异性活性

WO 2024/160176		PCT/CN2024/074508					
EGFR 抗体		3.1	8.0	1.86	96.73	1.4	DIFI（结直肠癌细胞株） mc-AAN-Exatecan ADC : IC50= ~ 0.045 nM;

表 3 Exatecan ADC 与 Payload 活性数据对比

Sample Name	Linker Payload	ADC Concentration	HIC-HPLC	SEC-HPLC			活性数据
		mg/mL	DAR	HMW%	Mono%	LMW%	
HER2 抗体	mc-AAN-Exatecan	5.2	8.0	0.98	98.7	0.34	SKBR3（乳腺癌细胞株） 1. mc-AAN-Exatecan ADC : IC50=0.051 nM; 2. Exatecan : IC50=2.021 nM;

表 4 mc-Pro-Exa ADC 在乳腺癌细胞系中的活性数据

mAb	Linker Payload	ADC Concentration	HIC-HPLC	SEC-HPLC			活性数据
		mg/mL	DAR	HMW%	Mono%	LMW%	
HER2 抗体	mc-Pro-Exa	3.7	8.0	0.94	98.7	0.09	SKBR3(乳腺癌细胞株:IC50 = 0.087 nM)

实施例十五、使用不同结构的连接子或细胞毒素制备 ADC 并检测分析

参照实施例十 Linker-Payload 和实施例十三 ADC 原液的制备过程,发明人制备了以下的 ADC 原液,并对所获得 ADC 原液的基本质量特性进行检测分析。

在使用相同的抗体 HER2 抗体进行偶联后，DAR 值均接近于 8；基于对这些 ADC 的检测数据分析，可获得如下结论：

1. 相较于含有 PAB 片段，不含有 PAB 的 Linker-Payload 制备的 ADC 其聚合物含量 (HMW%) 显著低于含有 PAB 片段制备的 ADC，说明 PAB 片段不利于该类 Linker-Payload 制备 ADC，具体数据见表 5；

2. 含有伯胺 (-NH₂) 结构 Payload 能够通过不包含 PAB 片段的 Linker 释放，而含有非伯胺基团 (-NH-(i-Pr) 结构) 的 Payload 无法通过不包含 PAB 片段的 Linker 释放，具体数据见表 6。

发明人研究了 mc-Pro-PAB-Exatecan 与抗体 TF (即 CN201610705557.4 中的 TF-mAb-H39) 偶联、mc-Pro-Exatecan 与 HER2 抗体偶联所获得的 ADC 中聚合物的含量，发现 PAB 结构影响非常明显，从 Linker 中去除 PAB 后，聚合物能够从 70~80% 左右降低至 1%。

表 5 PAB 片段对 HMW% 残留量的影响分析数据

mAb	Linker Payload	ADC	HIC-HPLC	SEC-HPLC		
		Concentration				
		mg/mL	DAR	HMW%	Mono%	LMW%
HER2 抗体	mc-Pro-Exatecan	4.6	8.0	1.07	98.6	0.38
TF 抗体	mc-Pro-PAB-Exatecan	4.4	7.1 (估值)	76.8	23.2	0.03

在研究 mc-Pro-Belotecan 和 mc-Pro-Exatecan 分别与 HER2 抗体偶联的 ADC 体外细胞杀伤活性时，发现偶联 mc-Pro-Belotecan 的 ADC 无肿瘤细胞杀伤活性，说明其结构稳定，不能通过酶解反应释放 Payload；而偶联 mc-Pro-Exatecan 的 ADC 体现出较好的杀伤活性，表明该结构能够释放 Payload；同时，mc-Pro-Exatecan 与 non-binding 抗体(无靶向内吞作用)偶联产生的 ADC 没有特异性细胞杀伤活性，表明该结构在胞外稳定，需内吞至细胞内后，才能释放出 Payload。除此以外，通过对比 mc-Pro-Belotecan 和 mc-Pro-Exatecan 的化学结构，可发现两者关键性的区别在于 Belotecan 以-NH-(i-Pr) 结构与 Proline 连接，而 Exatecan 则是以-NH₂ 结构与 Proline 连接；因此推定，如果

Linker 中的氨基酸片段与含有伯胺 (-NH₂) 结构 Payload 连接,可以在去除疏水性结构 PAB 的情况下,通过酶解反应释放 Payload (对于大多数目前在研的 ADC, PAB 结构作为自释放片段,是有效释放 Payload 的必需结构);这样,既能够降低 Linker-Drug 的疏水性,减少制备 ADC 时产生的聚合物含量,也可以表现出相应的细胞杀伤活性。

表 6 不同 Linker-Payload 分别与 HER2 抗体偶联分析数据

mAb	Linker Payload	ADC Concentration	HIC- HPLC	SEC-HPLC			活性数据
		mg/mL	DAR	HMW%	Mono%	LMW%	
HER2 抗体	mc-Pro- Belotecan	4.5	8.0	1.1	98.7	0.20	无特异性活性
	mc-Pro- Exatecan	4.6	8.0	1.07	98.6	0.38	SKBR3 (乳腺癌细胞株) mc-AAN-Exatecan ADC: IC50=0.087 nM;

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1、一种连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述连接子药物偶联物具有式 I 所示的结构，

M-X-D

式 I

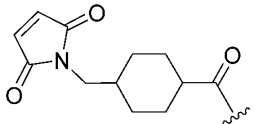
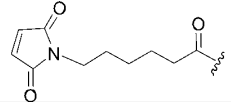
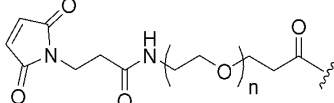
其中，

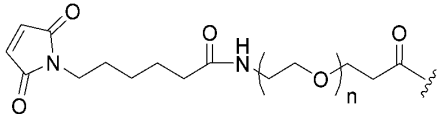
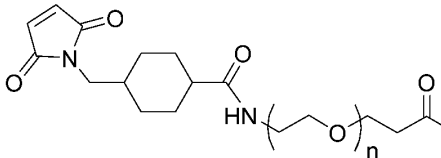
M 为包含马来酰亚胺 (**m**) 片段或环辛炔片段的化学结构；

X 为 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段，优选选自 **Ala-Ala-Ala-Ala-Asn**、**Ala-Ala-Ala-Asn**、**Ala-Ala-Asn**、**Ala-Asn**、**Asn**、**Ala-Ala-Ala-Ala-(3-cyano-alanine)**、**Ala-Ala-Ala-(3-cyano-alanine)**、**Ala-Ala-(3-cyano-alanine)**、**Ala-(3-cyano-alanine)**、**3-cyano-alanine**、**Ala-Ala-Ala-Pro**、**Ala-Ala-Pro**、**Ala-Pro**、**Pro**、**Pro-Asn**、**Asn-Pro**、**Lys**、**Lys-Asn**、**Lys-Pro**、**Ala-Ala-Ala-Ala-Gln**、**Ala-Ala-Ala-Gln**、**Ala-Ala-Gln**、**Ala-Gln**、**Ala-Ala-Ala-Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)**、**Ala-Ala-Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)**、**Ala-Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)**、**Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)**、**2-amino-4-cyanobutanoic acid**、**Gly-Gly-Gly-Gln**、**Gly-Gly-Gln**、**Gly-Gln**、**Gln** 及它们的氘代化物；

D 为细胞毒素。

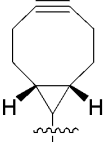
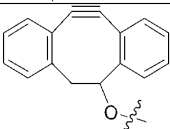
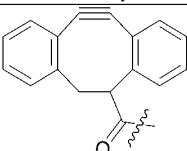
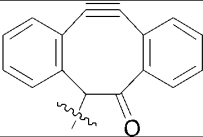
2、权利要求 1 的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，所述包含马来酰亚胺 (**m**) 片段的化学结构选自 **4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-甲酰基 (MCC)**、**6-马来酰亚氨基己酰基 (MC)**、**M-(PEG)_n**、**MC-(PEG)_n**、**MCC-(PEG)_n**，各结构如下所示：

MCC	
MC	
M-(PEG)_n	

MC-(PEG) _n	
MCC-(PEG) _n	

其中，n 代表 PEG 的聚合度，优选为 2-12 之间的整数。

3、权利要求 1 的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，所述包含环辛炔片段的化学结构选自 BCN、DIBO、DIBAC、BARAC 等，各结构如下所示：

BCN	
DIBO	
DIBAC	
BARAC	

。

4、权利要求 1-3 任一项的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，所述 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段选自 Ala-Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn、Asn、Ala-Ala-Ala-Ala- (3-cyano-alanine)、Ala-Ala-Ala- (3-cyano-alanine)、Ala-Ala- (3-cyano-alanine)、Ala- (3-cyano-alanine)、3-cyano-alanine、Ala-Ala-Ala-Pro、Ala-Ala-Pro、Ala-Pro、Pro、Pro-Asn、Asn-Pro、Lys、Lys-Asn、Lys-Pro、Ala-Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Ala-Gln、Ala-Ala-Gln、Ala-Gln、Ala-

Ala-Ala-Ala- (2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-Ala-Ala- (2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)、Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)、2-amino-4-cyanobutanoic acid、Gly-Gly-Gly-Gln、Gly-Gly-Gln、Gly-Gln、Gln 及它们的氘代化物。

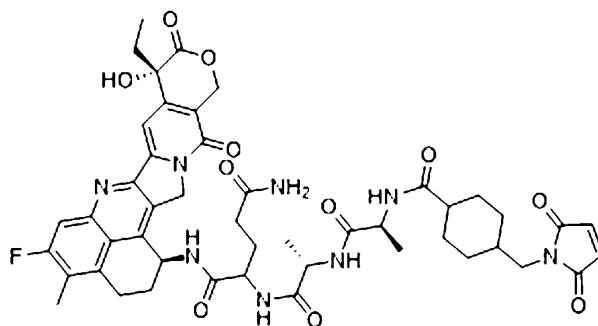
5、权利要求 1-4 任一项的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，D 为含有羟基 (-OH)、伯胺 (-NH₂)或仲胺 (-NHR) 基团的细胞毒素；

优选地，所述含有羟基 (-OH)、伯胺 (-NH₂)或仲胺 (-NHR) 基团的细胞毒素选自喜树碱类拓扑异构酶 I 抑制剂、Daunorubicin 类拓扑异构酶 II 抑制剂、金盏花素衍生物、分子胶类化合物、免疫抑制剂；

更优选地，所述含有羟基 (-OH)、伯胺 (-NH₂)或仲胺 (-NHR) 基团的细胞毒素选自依喜替康 (Exatecan)、14-氨基喜树碱 (14-AC)、9-氨基喜树碱 (9-AC)、贝洛替康 (belotecan)、MMAE 及其衍生物、MMAF 及其衍生物、来那度胺、雷帕霉素 (Rapamycin) 及其衍生物；

最优选地，所述含有羟基 (-OH)、伯胺 (-NH₂)或仲胺 (-NHR) 基团的细胞毒素选自依喜替康 (Exatecan)、贝洛替康 (belotecan)、雷帕霉素 (Rapamycin)。

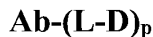
6、权利要求 1-5 任一项的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，所述连接子药物偶联物为 MCC-AAQ-Exatecan，其具有如下所示的结构：



。

7、一种抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述抗体药物偶联物由权利要求 1-6 任一项所述的连接子药物偶联物与抗体偶联形成；

优选地，所述抗体药物偶联物具有式 II 所示的结构，



式 II

其中，

Ab 为抗体；

L 为接头，其结构为 $\text{M}'\text{-X}$ ，其中， M' 与 Ab 相连，X 与 D 相连；

M' 为如权利要求 1-6 任一项定义的 M 通过马来酰亚胺基团连接至 Ab 所形成的化学结构；

X 为如权利要求 1-6 任一项定义的 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段；

D 为如权利要求 1-6 任一项定义的细胞毒素；

p 为 2-8 之间的任意数值。

8、权利要求 7 的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述抗体选自鼠源抗体、兔源抗体、噬菌体展示来源抗体、酵母展示来源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人源抗体、抗体片段、双特异性抗体及多特异性抗体；

优选地，所述抗体为单克隆抗体，选自：HER2 抗体、EGFR 抗体。

9、药物组合物，其包含权利要求 1-6 任一项所述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，或权利要求 6 或 7 的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物；

优选地，所述药物组合物还包含用于治疗肿瘤的化疗药物、免疫治疗药物和免疫抑制剂中的至少一种；

优选地，所述药物组合物还包含至少一种药用辅料。

10、权利要求 1-6 任一项所述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的

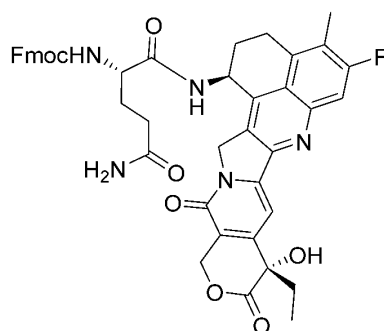
盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，或权利要求 7 或 8 的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗肿瘤。

11、制备权利要求 1-6 任一项所述的连接子药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物的方法，所述方法包括以下步骤：

1. 制备由 1~5 个氨基酸或其衍生物组成的连接片段 X；
2. 将 X 与包含马来酰亚胺 (m) 片段或环辛炔片段的化学结构 M 连接，得到 M-X；
3. 将细胞毒素 D 与 M-X 连接，得到连接子药物偶联物 M-X-D。

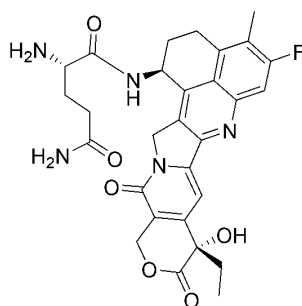
12、权利要求 11 的方法，所述连接子药物偶联物为 MCC-AAQ-Exatecan，所述方法包括以下步骤：

1. 将 Fmoc-Gln 与 Exatecan 反应得到中间体一，其中中间体一结构式如下：



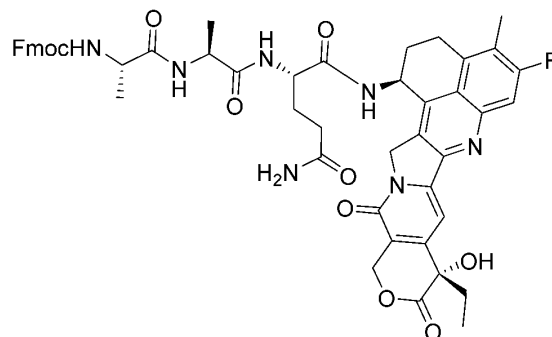
Fmoc-Gln-Exatecan

2. 将中间体一经 DEA 脱 Fmoc 保护基，到中间体二，其中中间体二结构式如下：



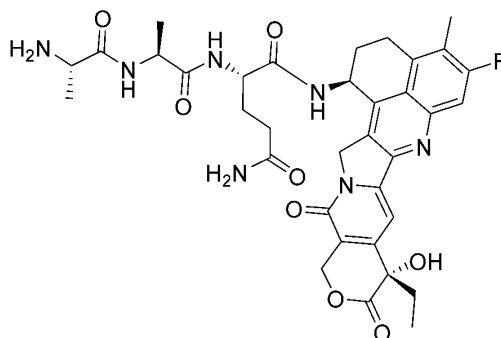
Gln-Exatecan

3. 将中间体二与 **Fmoc-Ala-Ala** 反应得到中间体三, 其中中间体三结构式如下:



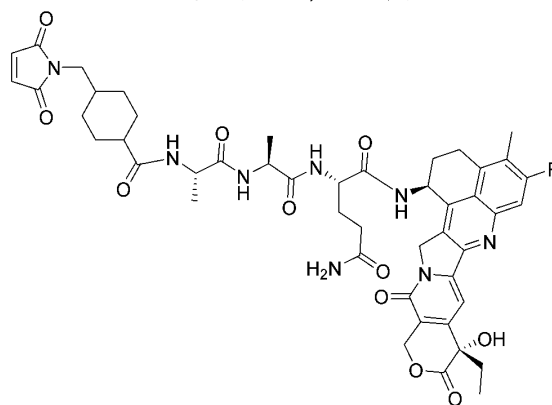
Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

4. 将中间体三脱 **Fmoc** 保护基得到中间体四, 其中中间体四结构式如下:



Ala-Ala-Gln-Exatecan

5. 将中间体四与 **MCC** 缩合得到产品, 其中产品结构式如下:



mcc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

o