

酶裂解连接子及包含其的配体-艾瑞布林偶联物

5 相关申请的交叉引用

本申请要求于2022年10月20日提交的申请号为“CN202211287874.0”、发明名称为“酶裂解连接子及包含其的配体-艾瑞布林偶联物”，以及于2023年07月12日提交的申请号为“CN202310853999.3”的专利申请的优先权，其内容通过引用整体并入本文。

10

技术领域

本公开涉及生物医药技术领域，具体而言，涉及一种酶裂解连接子及包含其的配体-艾瑞布林偶联物。

15 背景技术

抗体偶联药物（Antibody-Drug Conjugate, ADC）是通过连接子(linker)将具有生物活性的小分子药物偶联至单克隆抗体（单抗）上而产生的。目前绝大部分ADC是由靶向肿瘤抗原的抗体通过连接子与高效细胞毒性的小分子化学药物偶联而成，利用抗体与靶抗原特异性结合的特点，将小分子药物靶向递送至肿瘤细胞进而发挥杀伤肿瘤的作用。也有将特异性结合的配体、抗原和多肽等具有与抗体相似的特异性结合性质的蛋白及多肽偶联连接子毒素的。

连接子是关系到药物稳定性和治疗窗口的关键之一。首先，连接子需要具备一定的稳定性，从而在未达到肿瘤细胞之前，能确保ADC在血液循环过程中的完整性，避免提前释放毒素导致脱靶毒性，影响ADC药物的治疗窗口。而在进入靶细胞后，连接子要确保毒素的有效释放，发挥杀伤作用。多肽连接子是一种较为常见的可裂解连接子。截止2022年9月，已经有十个以上ADC药物被批准上市，多数通过将毒素经多肽连接子接头偶联于单克隆抗体半胱氨酸残基上，多肽可被肿瘤细胞的组织蛋白酶切断从而释放毒素，产生抗肿瘤作用。

现在临床研究中最常用的是缬氨酸-瓜氨酸(VC)，已上市药物 Adcetris

即采用这种连接子将 MMAE 与抗体相连。还有一些 ADCs 药物采用缬氨酸-丙氨酸(VA)和甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(GGFG),如 SGN-CD33A, Loncastuximab tesirine 和 DS-8201a。

5 艾瑞布林(艾日布林, Eribulin)作为抗体偶联物的毒素,其分子量大,结构复杂,亲水性较好。分子量大需要筛选合适长度连接子,结构复杂可能不同的连接子由于空间位阻酶切释放效率不同,亲水性好比较适合制备一个抗体分子偶联多个毒素的高偶联比值偶联物。PEG 作为一种连接子常用的组件,其亲水性好、稳定性好,常用 PEG 长度为 2~8 个,但是其光吸收不明显,合成较为复杂。

10

发明内容

本公开首次发现了 VAGGFG 作为酶裂解连接子的应用。

配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,所述配体-药物偶联物的通式为 TL-(L-D)_n;

15 其中,TL 为靶向配体,L 为接头单元,D 为艾瑞布林,n 为 1~20 的正整数;

L 中包含短肽 VAGGFG 作为酶裂解连接子。

本公开还涉及如上所述的配体-药物偶联物的制备方法、药物组合物及医药用途。

20 本公开所新发现的连接子,其具有显著提升的药物释放效率,对肿瘤细胞的杀伤能力更强,在配体-药物偶联物中具有很好的应用前景。

附图说明

25 为了更清楚地说明本公开具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本公开的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

30 图 1 为本公开一个实施例所提供的抗体 7B7-H04 和 7B7 通过不同接头单元偶联艾瑞布林的细胞活性检测结果。

图 2 为本公开一个实施例所提供的抗体 7B7-H04 和 7B7 通过不同接头单元偶联艾瑞布林的偶联比值和纯度结果;

- A: 7B7 裸抗体 (naked antibody) 的 DAR 检测结果;
- B: 7B7-H04 MC-VA-PAB-Eribulin 的 DAR 检测结果;
- C: 7B7-H04 MC-VA-PAB-Eribulin 的 SEC-HPLC 纯度检测结果;
- D: 7B7-H04 MC-GGFG-PAB-Eribulin 的 DAR 检测结果;
- 5 E: 7B7-H04 MC-GGFG-PAB-Eribulin 的 SEC-HPLC 纯度检测结果;
- F: 7B7-H04 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 DAR 检测结果;
- G: 7B7-H04 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 SEC-HPLC 纯度检测结果;
- H: 7B7 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 DAR 检测结果;
- I: 7B7 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 SEC-HPLC 纯度检测结果。

10 图 3 为本公开一个实施例所提供的抗体 7B7 通过不同接头单元偶联艾瑞布林 (Eribulin) 的体内抗肿瘤实验结果。

图 4 为本公开一个实施例所提供的抗体曲妥珠单抗 (Trastuzumab) 偶联 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的偶联比值、SEC-HPLC 纯度结果;

- A: 曲妥珠单抗裸抗体 (Trastuzumab naked antibody) 的 DAR 检测结果;
- 15 B: Trastuzumab MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 DAR 检测结果;
- C: Trastuzumab MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 SEC-HPLC 纯度检测结果。

20 图 5 为本公开一个实施例所提供的抗体贝马珠单抗 (Bemarituzumab) 偶联 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的偶联比值、SEC-HPLC 纯度结果;

- A: 贝马珠单抗裸抗体 (Bemarituzumab naked antibody) 的 DAR 检测结果;
- B: Bemarituzumab MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 DAR 检测结果;
- C: Bemarituzumab MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 SEC-HPLC 纯度检测结果。
- 25

具体实施方式

30 现将详细地提供本发明实施方式的参考, 其一个或多个实例描述于下文。提供每一实例作为解释而非限制本发明。实际上, 对本领域技术人员而言, 显而易见的是, 可以对本发明进行多种修改和变化而不背离本发明的范围或精神。例如, 作为一个实施方式的部分而说明或描述的特征可以

用于另一实施方式中，来产生更进一步的实施方式。

除非另有说明，用于披露本发明的所有术语(包括技术和科学术语)的意义与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的相同。通过进一步的指导，随后的定义用于更好地理解本发明的教导。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不是旨在于限制本发明。

本文所使用的术语“和/或”、“或/和”、“及/或”的选择范围包括两个或两个以上相关所列项目中任一个项目，也包括相关所列项目的任意的和所有的组合，所述任意的和所有的组合包括任意的两个相关所列项目、任意的更多个相关所列项目、或者全部相关所列项目的组合。需要说明的是，当用至少两个选自“和/或”、“或/和”、“及/或”的连词组合连接至少三个项目时，应当理解，在本申请中，该技术方案毫无疑问地包括均用“逻辑与”连接的技术方案，还毫无疑问地包括均用“逻辑或”连接的技术方案。比如，“A 及/或 B”包括 A、B 和 A+B 三种并列方案。又比如，“A，及/或，B，及/或，C，及/或，D”的技术方案，包括 A、B、C、D 中任一项（也即均用“逻辑或”连接的技术方案），也包括 A、B、C、D 的任意的和所有的组合，也即包括 A、B、C、D 中任两项或任三项的组合，还包括 A、B、C、D 的四项组合（也即均用“逻辑与”连接的技术方案）。

本公开中所使用的术语“含有”、“包含”和“包括”是同义词，其是包容性或开放式的，不排除额外的、未被引述的成员、元素或方法步骤。

本公开中用端点表示的数值范围包括该范围内所包含的所有数值及分数，以及所引述的端点。

本公开中涉及浓度数值，其含义包括在一定范围内的波动。比如，可以在相应的精度范围内波动。比如 2%，可以允许 $\pm 0.1\%$ 范围内波动。对于数值较大或无需过于精细控制的数值，还允许其含义包括更大波动。比如 100mM，可以允许 $\pm 1\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 5\%$ 等范围内的波动。涉及分子量，允许其含义包括 $\pm 10\%$ 的波动。

本公开中，涉及“多个”、“多种”等描述，如无特别限定，指在数量上指大于等于 2。

本公开中，以开放式描述的技术特征中，包括所列举特征组成的封闭式技术方案，也包括包含所列举特征的开放式技术方案。

本公开中，“优选”、“更好”、“更佳”、“为宜”仅为描述效果更好的实施方式或实施例，应当理解，并不构成对本公开保护范围的限制。本公开中，“可选地”、“可选的”、“可选”，指可有可无，也即指选自“有”或“无”两种并列方案中的任一种。如果一个技术方案中出现多处“可选”，如无特别说明，且无矛盾之处或相互制约关系，则每项“可

选“”各自独立。

如本文所用，术语“艾瑞布林”是指软海绵素 B(最初从海绵冈田软海绵 (*Halichondria okadae*) 分离的大环化合物)的合成类似物，其 CAS 为 253128-41-5。艾瑞布林为微管动力学抑制剂，认为其结合微管蛋白并通过抑制有丝分裂纺锤体组件，在 G2/M 期引起细胞周期停滞。术语“艾瑞布林甲磺酸盐”，CAS 为 441045-17-6，是指艾瑞布林的甲磺酸盐，其以商品名 HalavenTM 出售。

在本公开提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。除非和本申请的发明目的和/或技术方案相冲突，否则，本公开涉及的引用文献以全部内容、全部目的被引用。本公开中涉及引用文献时，相关技术特征、术语、名词、短语等在引用文献中的定义也一并被引用。本公开中涉及引用文献时，被引用的相关技术特征的举例、优选方式也可作为参考纳入本申请中，但以能够实施本公开为限。应当理解，当引用内容与本申请中的描述相冲突时，以本申请为准或者适当地根据本申请的描述进行修正。

本公开涉及 VAGGFG 作为酶裂解连接子的应用。

可采用的短肽还包括 X^1X^2 GGFG，其中， X^1X^2 均为氨基酸残基， X^1 和 X^2 各自独立的选自甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、谷氨酸和组氨酸；在一些实施方式中， X^1X^2 为 VC、VA、AC、AV、AA、VV 中的任一种。进一步的， X^1X^2 GGFG 中的任一个氨基酸可以被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代。

本公开还涉及一种配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，所述配体-药物偶联物的通式为 $TL-(L-D)_n$ ；

其中，TL 为靶向配体，L 为接头单元，D 为艾瑞布林，n 为 1~20 的正整数；

L 中包含短肽 VAGGFG 作为酶裂解连接子。

其中，n 的值还可以取 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19；优选 1~8，更优选 4~8。

术语“靶向配体”是能靶向性识别和结合目标细胞相关的抗原或受体的大分子化合物。配体的作用是将药物呈递给与配体结合的目标细胞群，这些配体包括但不限于蛋白类激素、凝集素、生长因子、抗体、具有结合能力的多肽或其他能与细胞结合的分子。在本公开的实施方式中，靶向配

体表示为 TL，靶向配体可通过配体上的杂原子与连接单元形成连接键。

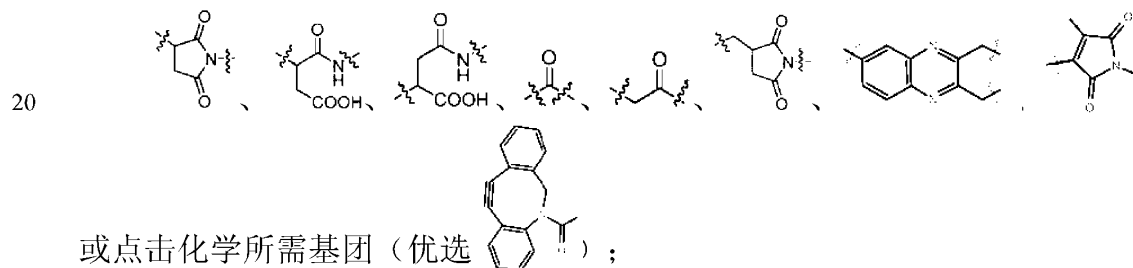
术语“药学上可接受的盐”是指本公开配体-药物偶联物的盐，意指对于给药至患者(例如哺乳动物)是可接受的盐(对于给定的剂量方案，其为包含具有可接受的哺乳动物安全性的抗衡离子的盐)。这种盐可衍生自药学上可接受的无机碱或有机碱，以及衍生自药学上可接受的无机酸或有机酸。本公开的配体-药物偶联物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐，可药用盐的非限制性示例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。尤其当所偶联的药物为艾瑞布林时，其优选的药学上可接受的盐是艾瑞布林甲磺酸盐。

本公开所用术语“溶剂化物”是指通过溶剂化作用形成的本公开化合物与溶剂分子的组合。在某些情况下，溶剂化物指水合物，即溶剂分子为水分子，本公开化合物与水的组合形成水合物。

在一些实施方式中，所述接头单元为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ， L^1 与 TL 相连， L^4 与 D 相连；

其中，

L^1 选自：



L^2 选自：

$-NC(R^1R^2)C(O)-$ 、 $-NR^3(CH_2)_oC(O)-$ 、 $-NR^3(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_pC(O)-$ 或化学键，其中 o 选自 0~20 的整数；p 选自 0~20 的整数；

25 R^1 、 R^2 各自独立地选自氢原子、氘原子、烷基、取代烷基、氘代烷基、杂烷基、羧基、氨基、取代氨基；

R^3 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、取代烷基、氘代烷基、环烷基、烷氧基烷基、芳基、取代芳基或杂芳基；

L^1 与 L^2 共用 N 原子；

30 L^3 为 VAGGFG；

L^4 选自: $-NR^4(CR^5R^6)_q-$ 、 $-C(O)NR^4-$ 、 $-C(O)NR^4(CH_2)_q-$ 或者化学键, q 选自 0~6 的整数;

R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、取代烷基、
5 氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基
或杂芳基。

在一些实施方式中, L^4 还可以选自: $-NR^4$ -芳基- $(CR^5R^6)_q-OC(O)-$ 、
- $NR^4(CR^5R^6)_q-OC(O)-$, q 选自 0~6 的整数;

R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、取代烷基、
10 氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基
或杂芳基。

在一些实施方式中, o 可为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、
12、13、14、15、16、17、18、19、20。

在一些实施方式中, p 可为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、
12、13、14、15、16、17、18、19、20。

15 在一些实施方式中, q 可为 0、1、2、3、4、5、6。

“ L^1 与 L^2 共用 N 原子”是指, 当所定义的 L^1 基团右侧端基、所定义的
 L^2 基团左侧端基均含 N 原子时, 二者共用 N 原子。

很明显, 可以通过将 L^1 简单替换为其它, 进而偶联到 TL 的其它天然
氨基酸位点、非天然氨基酸位点、末端位点、糖基化位点, 或通过整合或
20 点击化学等方式进行连接。点击化学偶联的实例如环加成反应、亲核开环
反应、非醇醛的羰基化学或碳碳多键的加成反应。

在一些实例中, TL 具有官能团 F^1 , L^1 具有或为其互补官能团。优选地,
反应性基团 L^1 和官能团 F^1 能够在生物正交反应中反应, 因为那些反应不会
干扰在该反应过程中存在的生物分子。生物正交反应和其中适合的官能团
25 是本领域技术人员已知的, 例如已知于 Gong 和 Pan, Tetrahedron Lett.2015,
56, 2123-2132, 包括 Staudinger 连接和无铜点击化学。因此, 优选 L^1 选自
1, 3-偶极子、炔烃、(杂)环辛炔、环辛烯、四嗪、酮、醛、烷氧基胺、肼
和三苯基膦。例如, 当 F^1 是叠氮基时, 叠氮化物修饰的抗体和接头-缀合物的
连接优选通过环加成反应进行。然后, 官能团 L^1 优选选自炔基, 优选末
30 端炔基和(杂)环炔基。例如, 当 F^1 是酮基时, 酮修饰的抗体与接头-缀合物的
连接优选通过与羟胺衍生物或肼的选择性缀合进行, 分别产生肟或腙。
然后, 官能团 L^1 优选为伯氨基(例如, $-NH_2$ 基团)、氨氧基(例如, $-O-NH_2$)
或肼基(例如, $-N(H)NH_2$)。例如, 当 F^1 是炔基时, 炔烃修饰的抗体与接头-
35 缀合物的连接优选通过环加成反应, 优选 1, 3-偶极环加成反应进行。然后,
官能团 L^1 优选为 1, 3-偶极子, 例如叠氮化物、硝酮或氧化脒。 F^1 和 L^1 的

位置也可以互换。

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

术语“取代烷基”指烷基中的氢被取代基团取代，除非文中另有说明，烷基的取代基可以是选自下组的多种基团：-卤素、-OR'、-NR'R''、-SR'、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、
 30 -NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(O)₂R'、-NH-C(NH₂)=NH、-NR'C(NH₂)=NH、-NH-C(NH₂)=NR'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NR'S(O)₂R''、-CN 和 -NO₂，取代基数量为 0 至 (2m'+1)，其中 m' 为该基团中碳原子的总数。R'、R'' 和 R''' 各自独立的指代氢、未取代的 C₁₋₈ 烷基、未取代的芳基、由 1-3 个卤素取代的芳基、未取代的 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷氧基或
 35 C₁₋₈ 硫代烷氧基、或未取代的芳基-C₁₋₄ 烷基。R' 和 R'' 连接于同一个氮原子时，它们可与该氮原子一起形成 3-、4-、5-、6-或 7-元环。例如，-NR'R'' 包括 1-吡咯烷基和 4-吗啉基。

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

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

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

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

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

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

术语“芳基”是指含有 6 至 14 个碳环原子的全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团，具有共轭的 π 电子体系的多环(即其带有相邻对碳原子的环)基团。芳基可以是单环或多环的(即，可以含有一个以上的环)。在多环芳环的情况下，只要求多环系统中的一个环是芳香环，而其余的环可以是饱和、部分饱和或不饱和环。芳基优选为 6 至 10 元的，例如苯基和萘基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环。

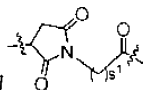
术语“杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族体系，其中杂原子包括氧、硫和氮。杂芳基优选为 5 至 10 元。更优选是 5 元或 6 元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、

吡嗪基、咪唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基等，所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环。杂芳基可以是任选取代的或未取代的。

术语“氘代烷基”指烷基上的氢被一个或多个氘原子取代，其中烷基如上所定义。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多 5 个，更优选为 1 个、2 个或 3 个氢原子彼此独立地被取代基取代。取代基仅处在它们的可能的化学位置，本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定(通过实验或理论)可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和(如烯)键的碳原子结合时可能是不稳定的。

在一些实施方式中， $-L^1-L^2-$ 为 , 且 $s1$ 为 2、3、4、5、6、7 或 8。

在一些实施方式中， L^4 为对氨基苄氧羰基 (PAB)。

在一些实施方式中，所述靶向配体为抗体或其抗原结合片段。

本文使用的术语“抗体”以它的最广泛意义使用，包括包含一个或多个特异性结合抗原的抗原结合结构域的免疫球蛋白或其他类型分子，为对特定抗原表现出结合特异性的蛋白质或多肽。抗体的具体实例可包括完整抗体(例如经典四链抗体分子)、单链抗体、单域抗体、双特异性抗体、多特异性抗体等。经典抗体分子通常为由 2 个相同重链和 2 个相同轻链通过二硫键相互连接组成的四聚体。根据氨基酸序列的保守性差异，将重链和轻链分为位于氨基端的可变区(V)和位于羧基端的恒定区(C)。可变区用于识别和结合抗原，恒定区(如 Fc 片段)用于启动下游效应，比如抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。在重链和轻链的可变区内，分别有三个局部区域的氨基酸组成和排列顺序具有更高的变异程度，为抗体与抗原结合的关键位置，因而也称为互补决定区(CDR)。CDR 的氨基酸序列可以使用本领域公认的编号方案，例如 Kabat、Chothia、IMGT、AbM 或 Contact 容易地确定。抗体可以为 IgG、IgM、IgD、IgE 或 IgA 抗体。

抗体的“抗原结合片段”指抗体分子中参与抗原特异性结合的氨基酸片段，例如， $F(ab')_2$ 、Fab 以及 scFv 中的一种。

术语“ $F(ab')_2$ ”是由胃蛋白酶消化整个全长抗体去除大部分 Fc 区同时完整保留一些铰链区后得到的。 $F(ab')_2$ 片段具有通过二硫键连接在一起的两个抗原结合 Fab 部分，因此 $F(ab')_2$ 片段为双价抗体，以 IgG 抗体制备得到的 $F(ab')_2$ 为例，分子量为约 110 kDa。

术语“Fab”是仍可与抗原结合的抗体结构，其为单价并且不含Fc部分。木瓜蛋白酶消化全长抗体后得到两个Fab片段以及一个Fc片段，每个Fab片段均为约50kDa。

5 术语“scFv”是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽连接成一条肽链而构成。通过正确折叠，来自重链和轻链的可变区通过非共价键相互作用形成Fv段，因而scFv能较好地保留其对抗原的亲合活性。

在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段选自兔源抗体、鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

10 “兔源抗体/鼠源抗体”是指可变区和恒定区（如果存在的话）衍生自兔/鼠免疫球蛋白序列的抗体。兔源抗体/鼠源抗体可方便地以相应抗原免疫兔/鼠（包括小鼠或大鼠）并从其分离目的抗体而获得。或者，在以相应抗原免疫兔/鼠后，分离并培养表达目的抗体的细胞(如B细胞)而获得。又或者，在以相应抗原免疫兔/鼠后，分离并培养表达目的抗体的细胞，将其与永生细胞如骨髓瘤细胞融合而获得杂交瘤细胞，培养杂交瘤细胞则可长期和大量获得目的抗体(如单克隆抗体)。

20 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”，是将第一动物源性抗体的可变区与第二动物源性的抗体的恒定区融合而成的抗体。建立嵌合抗体，要先建立分泌第一动物源性特异性单抗的杂交瘤，然后从杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆第二动物源性抗体的恒定区基因，将第一动物源性可变区基因与第二动物源性恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本公开一个优选的实施方案中，第一动物源性为兔源或鼠源，第二动物源性优选为人源，可以减轻第一动物源性抗体诱发的免疫应答反应。所述嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源κ、λ链或其变体的轻链恒定区。所述嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区。抗体恒定区的亚型、不同人的异构体和基于恒定区效应功能的变化产生的突变不影响抗体偶联物的制备。连接子毒素偶联位点比如半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、肽链羧基末端和糖基化位点等，包括天然位点和工程化改造位点，这些位点一般用于偶联。

30 术语“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为CDR移植抗体(CDR-grafted antibody)，是指将第一动物源性的CDR序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量第一动物源性蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”
35 人种系序列数据库(www.mrccpe.com.ac.uk/vbase) 获得，以及在Kabat, E.A.

等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时, 引起的活性下降, 可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变, 以保持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。在
5 本公开一个优选的实施方案中, 第一动物源性为兔源或鼠源。人的抗体可变区框架经过设计选择。为避免免疫原性下降的同时, 引起的活性下降, 可对所述的人抗体可变区可进行最少反向突变, 以保持活性。

全人源化抗体 (human antibody) 是指将人类抗体基因通过转基因或转染色体技术, 将人类编码抗体的基因转移至基因工程改造的抗体基因缺失
10 动物中, 使动物表达人类抗体, 达到抗体全人源化的目的。

在一些实施方式中, 所述抗体选自: 抗 CD3 抗体、抗 FOLR1 抗体、抗 ROR1 抗体、抗 TNF α 抗体、抗组织因子 (tissue factor, TF) 抗体、抗 EpCAM 抗体、抗 EGFRvIII 抗体、抗 DLL-3 抗体、抗 PSMA 抗体、抗 MUC16 抗体、抗 ENPP3 抗体、抗 TDGF1 抗体、抗 ETBR 抗体、抗 MSLN 抗体、
15 抗 TIM-1 抗体、抗 LRRC15 抗体、抗 LIV-1 抗体、抗 CanAg/AFP 抗体、抗 Claudin 6 抗体、抗 Claudin 9 抗体、抗 Claudin 18.2 抗体、抗 Mesothelin 抗体、抗 HER2(ErbB2)抗体、抗 EGFR 抗体、抗 c-MET 抗体、抗 SLITRK6 抗体、抗 KIT/CD117 抗体、抗 STEAP1 抗体、抗 SLAMF7/CS1 抗体、抗 NaPi2B/SLC34A2 抗体、抗 GPNMB 抗体、抗 HER3(ErbB3)抗体、抗
20 MUC1/CD227 抗体、抗 AXL 抗体、抗 CD166 抗体、抗 B7-H3(CD276)抗体、抗 PTK7/CCK4 抗体、抗 PRLR 抗体、抗 EFNA4 抗体、抗 5T4 抗体、抗 NOTCH3 抗体、抗 Nectin 4 抗体、抗 TROP-2 抗体、抗 CD142 抗体、抗 CA6 抗体、抗 GPR20 抗体、抗 CD174 抗体、抗 CD70 抗体、抗 CD71 抗体、抗 EphA2 抗体、抗 LYPD3 抗体、抗 FGFR2 抗体、抗 FGFR3 抗体、抗 FR α
25 抗体、抗 CEACAMs 抗体、抗 GCC 抗体、抗 Integrin Av 抗体、抗 CAIX 抗体、抗 P-cadherin 抗体、抗 GD3 抗体、抗 Cadherin 6 抗体、抗 LAMP1 抗体、抗 FLT3 抗体、抗 BCMA 抗体、抗 CD79b 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD74 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD37 抗体、抗 CD47 抗体、抗 CD138 抗体、抗 CD352 抗
30 体、抗 CD25 抗体和抗 CD123 抗体。

在一些具体的实施方式中, 所述抗体选自下列抗体所组成的组:

抗 GD2 抗体 3F8、阿巴伏单抗 (Abagovomab)、阿昔单抗 (Abciximab)、ACZ885 (卡那单抗 (canakinumab))、阿达木单抗 (Adalimumab)、阿德木单抗 (Adecatumumab)、阿非莫单抗 (Afelimomab)、阿托珠单抗
35 (Afutuzumab)、培化阿珠单抗 (Alacizumab pegol)、阿仑单抗 (Alemtuzumab)、喷替酸阿妥莫单抗 (Altumomab pentetate)、麻安莫单抗 (Anatumomab mafenatox)、安芦珠单抗 (Anrukinzumab) (IMA-638)、

阿泊珠单抗 (Apolizumab)、阿西莫单抗 (Arcitumomab)、阿塞珠单抗 (Aselizumab)、阿替珠单抗 (Atezolizumab)、阿托木单抗 (Atorolimumab)、阿维单抗 (Avelumab)、巴匹珠单抗 (Bapineuzumab)、巴利昔单抗 (Basiliximab)、巴土昔单抗 (Bavituximab)、贝妥莫单抗 (Bectumomab)、
5 贝利木单抗 (Belimumab)、柏替木单抗 (Bertilimumab)、贝索单抗 (Besilesomab)、贝伐单抗 (Bevacizumab)、比西单抗 (Biciromab)、比伐单抗-DMI (Bivatuzumab mertansine)、兰妥莫单抗 (Blinatumomab)、Brentuximab vedotin、Briakinumab、卡那单抗 (Canakinumab)、美坎珠单抗 (Cantuzumab mertansine)、卡罗单抗喷地肽偶联物 (Capromab pendetide)、
10 卡妥索单抗 (Catumaxomab)、西利珠单抗 (Cedelizumab)、培舍珠单抗 (Certolizumabpegol)、西妥昔单抗 (Cetuximab)、泊西他珠单抗 (Citatumumab bogatox)、西妥木单抗 (Cixutumumab)、克立昔单抗 (Clenoliximab)、Clivatuzumab tetraxetan、CNTO148 (戈利木单抗 (golimumab))、CNTO 1275 (优特克单抗 (ustekinumab))、可那木单抗 (Conatumumab)、达
15 西珠单抗 (Dacetuzumab)、达克珠单抗 (Daclizumab)、地诺单抗 (Denosumab)、地莫单抗 (Detumomab)、阿托度单抗 (Dorlimomab aritox)、Dorlixizumab、度伐单抗 (durvalumab)、依美昔单抗 (Ecromeximab)、依库珠单抗 (Eculizumab)、埃巴单抗 (Edobacomab)、依决洛单抗 (Edrecolomab)、依法珠单抗 (Efalizumab)、依夫单抗 (Efungumab)、艾西莫单抗 (Elsilimumab)、
20 培戈赖莫单抗 (Enlimomab pegol)、西依匹莫单抗 (Epitumomabcituxetan)、依帕珠单抗 (Epratuzumab)、厄利珠单抗 (Erlizumab)、厄马索单抗 (Ertumaxomab)、埃达珠单抗 (Etaracizumab)、艾韦单抗 (Exbivirumab)、法索单抗 (Fanolesomab)、法拉莫单抗 (Faralimumab)、非维珠单抗 (Felvizumab)、非扎奴单抗 (Fezakinumab)、芬妥木单抗 (Figitumumab)、
25 芳妥珠单抗 (Fontolizumab)、福拉韦单抗 (Foravirumab)、夫苏木单抗 (Fresolimumab)、加利昔单抗 (Galiximab)、加维莫单抗 (Gavilimumab)、吉妥珠单抗奥佐米星 (Gemtuzumab ozogamicin)、戈利木单抗 (Golimumab)、戈利昔单抗 (Gomiliximab)、Ibalizumab、替伊莫单抗 (Ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗 (Igovomab)、英西单抗 (Imciromab)、英利昔单抗 (Infliximab)、
30 英妥木单抗 (Intetumumab)、伊诺莫单抗 (Inolimomab)、伊珠单抗奥佐米星 (Inotuzumab ozogamicin)、伊匹木单抗 (Ipilimumab)、伊妥木单抗 (Iratumumab)、凯利昔单抗 (Keliximab)、拉贝珠单抗 (Labetuzumab)、来金珠单抗 (Lebrikizumab)、来马索单抗 (Lemalesomab)、乐地单抗 (Lerdelimumab)、来沙木单抗 (Lexatumumab)、利韦单抗 (Libivirumab)、
35 林妥珠单抗 (Lintuzumab)、鲁卡木单抗 (Lucatumumab)、鲁昔单抗 (Lumiliximab)、马帕木单抗 (Mapatumumab)、马司莫单抗 (Maslimomab)、马妥珠单抗 (Matuzumab)、美泊利单抗 (Mepolizumab)、美替木单抗 (Metelimumab)、米拉珠单抗 (Milatumumab)、明瑞莫单抗 (Minretumomab)、

米妥莫单抗 (Mitumomab)、莫罗木单抗 (Morolimumab)、莫他珠单抗 (Motavizumab)、莫罗单抗-CD3 (Muromonab_CD3)、MY0-029 (司他莫单抗 (stamulumab)、他那可单抗 (Nacolomab tafenatox)、他那莫单抗 (Naptumomab estafenatox)、那他珠单抗 (Natalizumab)、奈巴库单抗 (Nebacumab)、奈昔木单抗 (Necitumumab)、奈瑞莫单抗 (Nerelimomab)、尼妥珠单抗 (Nimotuzumab)、纳武单抗 (Nivolumab)、疏诺莫单抗 (Nofetumomab merpentan)、奥瑞珠单抗 (Ocrelizumab)、奥度莫单抗 (Odulimumab)、奥法木单抗 (Ofatumumab)、奥马珠单抗 (Omalizumab)、莫奥珠单抗 (Opportuzumab monatox)、奥戈伏单抗 (Oregovomab)、奥昔珠单抗 (Otelixizumab)、帕昔单抗 (Pagibaximab) JQ 利珠单抗 (Palivizumab)、帕木单抗 (Panitumumab)、帕诺库单抗 (Panobacumab)、帕考珠单抗 (Pascolizumab)、派姆单抗 (Pembrolizumab)、帕尼单抗 (Pemtumomab)、培妥珠单抗 (Pertuzumab)、培克珠单抗 (Pexelizumab)、平妥莫单抗 (Pintumomab)、普立昔单抗 (Priliximab)、普立木单抗 (Pritumumab)、PRO 140、雷韦单抗 (Rafivirumab)、雷莫芦单抗 (Ramucirumab)、雷珠单抗 (Ranibizumab)、雷昔库单抗 (Raxibacumab)、瑞加韦单抗 (Regavirumab)、瑞利珠单抗 (Reslizumab)、利妥木单抗 (Rilotumumab)、利妥昔单抗 (Rituximab)、罗妥木单抗 (Robatumumab)、罗利珠单抗 (Rontalizumab)、罗维珠单抗 (Rovelizumab)、鲁利珠单抗 (Ruplizumab)、沙妥莫单抗 (Satumomab)、司韦单抗 (Sevirumab)、西罗珠单抗 (Sibrotuzumab)、西法木单抗 (Sifalimumab)、司妥昔单抗 (Siltuximab)、西利珠单抗 (Siplizumab)、苏兰珠单抗 (Solanezumab)、索耐珠单抗 (Sonepcizumab)、松妥珠单抗 (Sontuzumab)、司他芦单抗 (Stamulumab)、疏索单抗 (Sulesomab)、他珠单抗 (Tacatumumab tetraxetan)、他度珠单抗 (Tadocizumab)、他利珠单抗 (Talizumab)、他尼珠单抗 (Tanezumab)、帕他莫单抗 (Taplutumomab paptox)、替非珠单抗 (Tefibazumab)、阿替莫单抗 (Telimomab aritox)、替妥莫单抗 (Tenatumomab)、替奈昔单抗 (Teneliximab)、替利珠单抗 (Teplizumab)、TGN1412、替西木单抗 (Ticilimumab)、曲美木单抗 (tremelimumab)、替加珠单抗 (Tigatuzumab)、TNX-355 (伊巴珠单抗 (ibalizumab))、TNX-650、TNX-901 (他利珠单抗 (talizumab))、托珠单抗 (Tocilizumab)、托利珠单抗 (Toralizumab)、托西莫单抗 (Tositumomab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、曲美木单抗 (Tremelimumab)、西莫白介素单抗 (Tucotuzumab celmoleukin)、妥韦单抗 (Tuvirumab)、乌珠单抗 (Urtioxazumab)、优特克单抗 (Ustekinumab)、伐利昔单抗 (Vapaliximab)、维多珠单抗 (Vedolizumab)、维妥珠单抗 (Veltuzumab)、维帕莫单抗 (Vepalimumab)、维西珠单抗 (Visilizumab)、伏洛昔单抗 (Volociximab)、伏妥昔单抗 (Votumumab)、扎芦木单抗 (Zalutumumab)、扎木单抗 (Zanolimumab)、齐拉木单抗 (Ziralimumab)

以及阿佐莫单抗（Zolimomab aritox）。

在一些实施方式中，所述抗体选自：

- i) 曲妥珠单抗（Trastuzumab）抗体；
- ii) 贝马珠单抗（Bemarituzumab）抗体；
- 5 iii) 抗 B7-H3 抗体：其重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 依次如 SEQ ID NO:1~3 所示，轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 依次如 SEQ ID NO:4~6 所示。

在一些实施方式中，所述抗 B7-H3 抗体的重链可变区 HCVR 如 SEQ ID NO:7 所示，轻链可变区 LCVR 如 SEQ ID NO:8 所示。

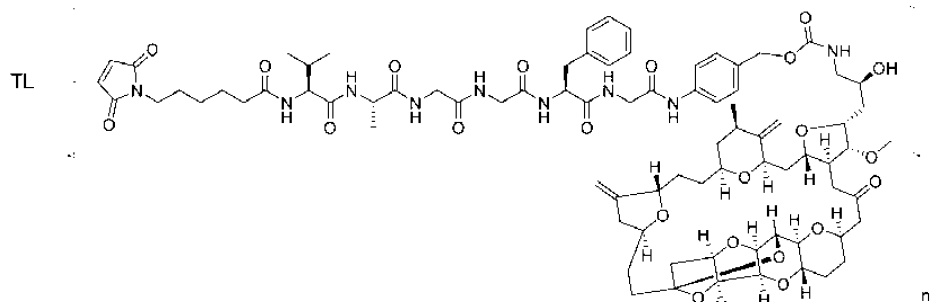
- 10 在一些实施方式中，所述抗 B7-H3 抗体的重链恒定区如 SEQ ID NO:9 或 10 所示，轻链恒定区如 SEQ ID NO:11 所示。

- 15 上述氨基酸序列的变体也在本发明范围内，相应的变体与 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:6 任一多肽相比，分别包含发生在至少一个 CDR 区域的至多 3 个氨基酸的突变；或者，变体相对于 SEQ ID NO:7~SEQ ID NO:15 整体序列而言，可包含 3 个以内或更多的突变，例如与 SEQ ID NO:7~SEQ ID NO:15 任一多肽相比具有至少 80%、85%、90%、93%、95%、97% 或 99% 同一性的序列。突变可以为氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；优选地，所述突变为保守置换。

- 20 “保守置换”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。

- 25 通常视为保守置换的置换是在脂肪族氨基酸 Ala、Val、Leu 和 Ile 中的彼此置换、羟基残基 Ser 和 Thr 的互换、酸性残基 Asp 和 Glu 的交换、酰胺残基 Asn 和 Gln 之间的置换、碱性残基 Lys 和 Arg 的交换以及芳香残基 Phe、Tyr 间的置换。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等(1987)Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页, (第 4 版)）。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

在一些实施方式中，所述配体-药物偶联物的结构如下所示：



本公开还涉及制备如上所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的方法，包括：

5 将所述靶向配体还原后，与预先合成的-L-D 进行偶联反应，得到通式为 TL-L-D 所示的化合物。

还原剂优选 TCEP，特别地，优选还原靶向配体上的二硫键。

本公开还涉及药物组合物，其包含如上所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

10 如本公开所用，“药学上可接受载体、稀释剂或赋形剂”包括当与活性组分组合时允许所述组分保持生物学活性并且与受试者的免疫系统不发生反应的任何材料。

本公开还涉及如上所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

15 术语“癌症”指的是以失调的细胞生长为特征的生理病症或疾病。“肿瘤”包括癌细胞。在一些实施方式中，所述的肿瘤为乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌（如非小细胞肺癌）、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

本公开还涉及一种治疗受试者的医学状况的方法，包括施用安全和有效量的如上所述的配体-药物偶联物。

优选其中所述医学状况为癌症。

25 短语“安全和有效量的”。如本文所用，意指在合理的医药调节范围内化合物或组合物的量大到足以明显有效地缓解所治疗的症状或病症，但小到足以避免严重的副作用（以合理的有益/危险比率）。本公开的方法所用的药物组合物中的活性成份的安全和有效量随所治疗的特定症状、年龄和所治疗患者的身体状况，疾病的严重性、治疗时间、同期治疗情况、使

用的特定活性成份、使用的特定的药物学可接受的赋形剂及包括参与治疗医师的知识和技能在内的这类因素的不同而不同。

应该理解的是，设想的治疗方法还将包括施用其他治疗实体，特别优选为免疫治疗实体，包括病毒癌症疫苗（例如，编码癌症特异性抗原的腺病毒载体）、细菌癌症疫苗（例如，表达一种或多种癌症特异性抗原的非热原性大肠杆菌）、酵母癌症疫苗、N-803（也被称为 ALT-803，ALTOR 生物科学公司）、化疗药物、抗体（例如，与肿瘤相关抗原或患者特异性肿瘤新抗原结合）、干细胞移植（例如，异体或自体）和肿瘤靶向细胞因子（例如，NHS-IL12，IL-12 与肿瘤靶向抗体或其片段偶联）。在一些实施方式中，设想的治疗方法还包括对所述患者进行放射性治疗。在一些实施方式中，设想的治疗方法还包括对所述患者进行手术，例如肿瘤切除手术。

配体-药物偶联物也可以与抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇、类固醇、氧、抗氧化剂、COX 抑制剂、心脏保护剂、金属螯合剂、IFN- γ 和/或 NSAID 组合施用和/或共配制。药物组合物中可以包含上述治疗实体。

术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用，是指任何动物，例如任何哺乳动物，包括（但不限于）人类、非人类灵长类动物、啮齿类动物、狗、猫、黑猩猩、猩猩、长臂猿、猕猴、狨猴、猪、马、熊猫和大象等等。

如本文所用，“治疗”是指任何疾病后果的任何改善，例如存活期延长、发病率较小和/或作为替代治疗方式的副产物的副作用减轻。如本领域中容易了解，疾病完全根除为优选的，但并不是治疗行为的必要条件。如本文所用，“治疗”是指向受试者（例如患者）施用所述配体-药物偶联物。治疗可以为治愈、医治、缓和、减轻、改变、医治、改善、减弱、好转或影响病症、病症的症状或例如癌症的患病倾向性。

本公开的药物组合物可通过任何途径投与，如所属领域的技术人员将了解。在一些实施例中，本公开的医药组合物通过静脉内（IV）投与。

下面将结合实施例对本公开的实施方案进行详细描述。应理解，这些实施例仅用于说明本公开而不适用于限制本公开的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，优先参考本公开中给出的指引，还可以按照本领域的实验手册或常规条件，还可以参考本领域已知的其它实验方法，或者按照制造厂商所建议的条件。

下述的具体实施例中，涉及原料组分的量度参数，如无特别说明，可能存在称量精度范围内的细微偏差。涉及温度和时间参数，允许仪器测试精度或操作精度导致的可接受的偏差。

实施例 1 Anti-B7-H3 抗体制备

以公开日为 2021 年 09 月 17 日的中国专利申请 CN113402610A 中 anti-B7-H3 抗体序列为基础, 进一步进行单克隆抗体的表达和纯化。

如无特殊说明, 本公开中所有抗体的表达可以选择使用商业化载体 pTT5, 在其启动子后的 EcoR I 和 Hind III 限制性酶切位点之间插入抗体序列, 抗体轻链或重链序列前包括信号肽在内的核酸序列可以选用如下序列为:

GAATTCGCCGCCACCATGGGATGGTCCTGTATTATCCTGTTTCCTGG
TCGCTACCGCTACCGGTGTCCACTCA

上述序列下划线为 EcoR I 和起始氨基酸。

抗体轻链或重链序列后为:

TGAAAGCTT (其为终止密码子和 Hind III)。

抗体氨基酸序列优化为核苷酸序列后插入上述信号肽和终止子之间。

重链 H00 序列:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLE
WVASISGGGIYIYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARHGGAGYFDYWGGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

轻链 L00 序列:

DSQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRGSESVHSLAWYQQKPGKAPKL
LVYNAKTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYGSP
WTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11)

重链 H04 序列:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLE
WVASISGGGIYIYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARHGGAGYFDYWGGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTSPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
5 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPCRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

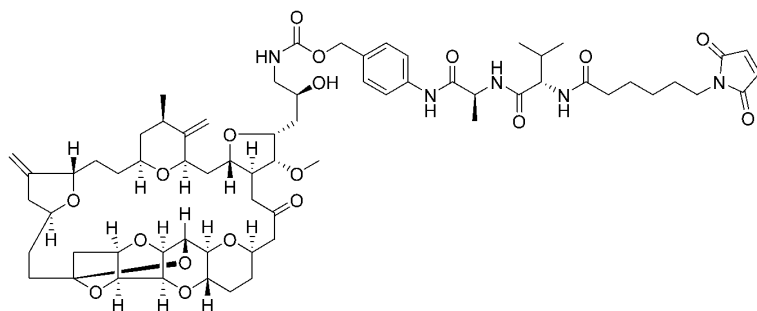
Anti-B7-H3 抗体为克隆 7B7, 轻链 L00 和重链 H00 的抗体为 7B7。轻
链 L00 和重链 H04 的抗体为 7B7-H04。7B7-H04 抗体为工程化改造抗体,
10 工程化改造适合产生均一偶联比值的偶联产物, 非常适合评估不同连接子
毒素。

将上述抗体轻重链分别构建于载体中, 提取质粒。将悬浮驯化 CHO-K1
细胞复苏于 OPM-CD TransCHO 培养基(厂家: 奥浦迈, OPM, 货号 P83059),
培养至密度 2 百万个细胞/ml, 活率 95%以上, 体积 1000ml。将轻链质粒
15 0.5mg 和重链质粒 0.5mg 合并且溶于 10ml 培养基, 将 3mg 溶于培养基的
PEI (厂家: Polyscience, 货号: 24765-1) 稀释于 10ml 培养基中, 混合质
粒和 PEI 的溶液并置于室温 10 分钟, 然后滴加至 1000ml 细胞培养液中,
置于 37°C 培养 5 天后以 12000g 离心 15 分钟收获上清。将上清用 HiTrap
Mabselect SuRe 进行纯化, 并用 50mM 乙酸洗脱, 中和后的收集峰用 30KD
20 超滤管(厂家 Merck, 货号 UFC9030)置换于 PBS pH7.4 中。将抗体测定
280nm 吸光度值, 吸光度值除以理论消光系数为浓度值。

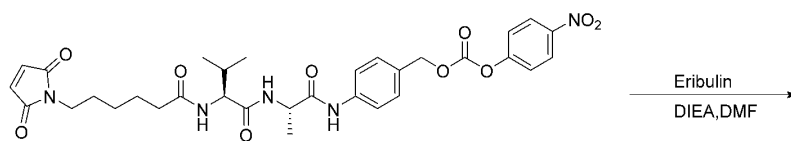
实施例 2 对照连接子毒素的合成

1. 连接子毒素 MC-VA-PAB-Eribulin 的合成

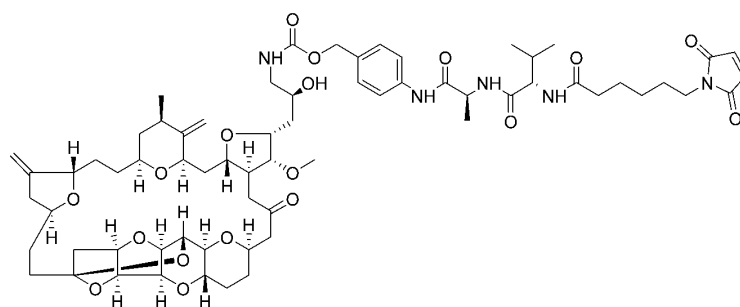
25 设计的连接子毒素 MC-VA-PAB-Eribulin (LK-322018) 结构如下:



化合物 LK-322018 的合成路线为:



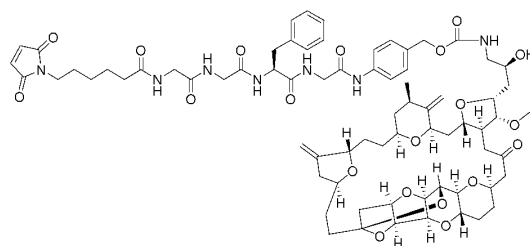
Mc-VA-PABC-PNP

LK-322018
Mc-VA-PAB-Eribulin

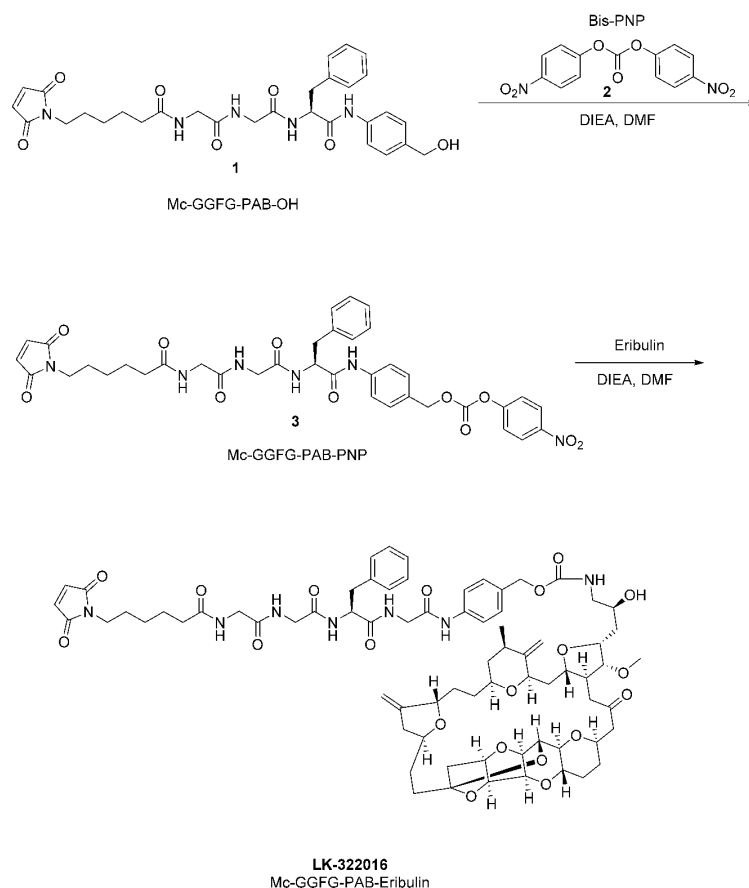
化合物 LK-322018 的合成: 将市售化合物 MC-VA-PABC-PNP (5.9 mg, 0.091 mmol) 溶于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中, 依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (3.1 mg, 0.024 mmol) 和市售艾瑞布林 (5 mg, 0.007 mmol), 室温反应 16 小时, 通过液质联用色谱监测原料反应完毕后, 加入 5ml 水, 乙酸乙酯萃取三次 (每次 10ml), 分液后合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后并浓缩, 所得粗品通过制备液相纯化得到 LK-322018。ESI-MS m/z : 1240 (M-H)。

2. 连接子毒素 MC-GGFG-PAB-Eribulin 的合成

设计的连接子毒素 MC-GGFG-PAB-Eribulin (LK-322016) 结构如下:



化合物 LK-322016 的合成路线为:



化合物 3 的合成：将市售化合物 1（50 mg）溶于 2ml N,N-二甲基甲酰胺中，依次加入 Bis-PNP（36 mg，0.1182 mmol）和 N,N-二异丙基乙基胺（20.3 mg，0.006053 mmol），室温反应 16 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，加入 15ml 水，用乙酸乙酯萃取三次（每次 10ml），分液后合并有机相，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥后并浓缩，所得粗品通过制备液相纯化得到标题化合物 3。ESI-MS m/z : 743(M+H)。

化合物 LK-322016 的合成：将化合物 3（7.26 mg，0.009079 mmol）溶于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中，依次加入 N,N-二异丙基乙基胺（3.1 mg，0.02412 mmol）和市售艾瑞布林（5 mg，0.007 mmol），室温反应 16 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，加入 5ml 水，乙酸乙酯萃取三次（每次 10ml），分液后合并有机相，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥后并浓缩，所得粗品通过制备液相纯化得到 LK-322016。ESI-MS m/z : 1389(M-H)。

3. 连接子毒素 Mal-PEG2-VC-PAB-Eribulin 的合成

具体合成步骤参考公开日为 2018 年 11 月 23 日的中国专利申请 CN108883198A 第 145 页，合成方法与步骤均与专利相同。在 (DOI:

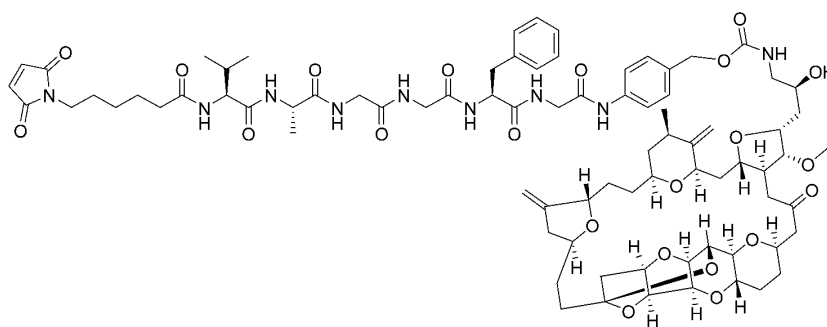
10.1158/1535-7163.MCT-17-1215, MORAb-202, an Antibody-Drug Conjugate Utilizing Humanized Anti-human FR α Farletuzumab and the Microtubule-targeting Agent Eribulin, has Potent Antitumor Activity) 一文中显示 Mal-PEG2-VC-PAB-Eribulin 与 MC-VC-PAB-Eribulin 对若干细胞系活性方面相同, 认为二者基本一致。因而, 在本公开中于某些情况下可将

5 Mal-PEG2-VC-PAB-Eribulin 与 MC-VC-PAB-Eribulin 替换使用。

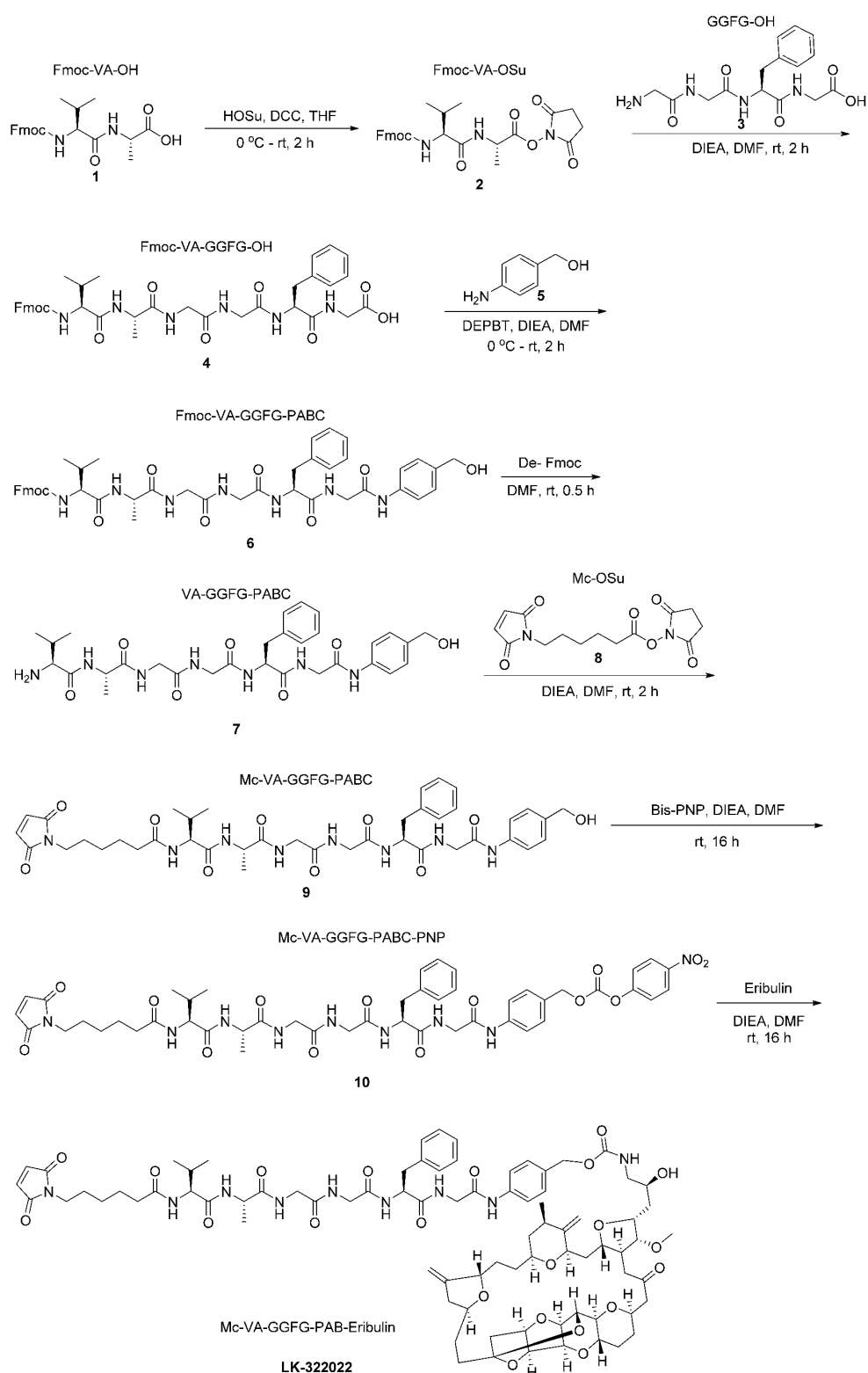
实施例 3 实验组连接子毒素的合成

连接子毒素 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的合成

10 设计的连接子毒素 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin (LK-322022) 结构如下:



化合物 LK-322022 的合成路线为:



化合物 2 的合成：将市售的化合物 1（100 mg，0.244 mmol）溶于 3ml

四氢呋喃中，降温至 0°C，加入 HOSU (33.7 mg, 0.293 mmol) 和 DCC (60.3 mg, 0.293 mmol)，室温反应 2 小时，通过 TLC 点板和液质联用色谱监测原料反应完毕后，将反应液过滤，滤液浓缩所得粗品直接投入下一步反应。ESI-MS m/z:508(M+H)。

5 化合物 4 的合成：将化合物 2 (crude, 0.244 mmol) 与市售的化合物 3 (82 mg, 0.244 mmol) 混合于 3ml N,N-二甲基甲酰胺中，加入 N,N-二异丙基乙基胺 (126 mg, 0.976 mmol)，室温反应 2 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，减压蒸馏去除溶剂，粗品用 10ml 水打浆，过滤得到标题化合物粗品 (200 mg, 收率: 100%)。ESI-MS m/z:729(M+H)。

10 化合物 6 的合成：将化合物 4 (200 mg, 0.274 mmol) 溶于 5ml N,N-二甲基甲酰胺中，降温至 0°C，依次加入化合物 5 (41 mg, 0.329 mmol)、N,N-二异丙基乙基胺 (107 mg, 0.823 mmol) 和 DEPBT (124 mg, 0.412 mmol)，室温反应 4 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，反应液用 10ml 氯化铵水溶液淬灭，乙酸乙酯萃取三次 (每次 10ml)，分液后合并有机相，
15 饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥后并浓缩，所得粗品经过硅胶柱层析[二氯甲烷/甲醇=88:12(v/v)]纯化得到标题化合物 6 (100 mg, 收率: 43.8%)。ESI-MS m/z:834(M+H)。

化合物 7 的合成：将化合物 6 (100 mg, 0.120 mmol) 溶于 3ml N,N-二甲基甲酰胺中，加入哌啶 (31 mg, 0.360 mmol)，室温反应 0.5 小时，
20 通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，减压蒸馏去除溶剂，所得粗品经过硅胶柱层析[二氯甲烷/甲醇=82:18(v/v)]纯化得到标题化合物 7 (76 mg, 收率: 100%)。ESI-MS m/z:612(M+H)。

化合物 9 的合成：将化合物 7 (76mg, 0.124mmol) 与市售的化合物 8 (46 mg, 0.149mmol) 混合于 3ml N,N-二甲基甲酰胺中，加入 N,N-二异丙基乙基胺 (32mg, 0.248 mmol)，室温反应 2 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，减压蒸馏去除溶剂，所得粗品经过硅胶柱层析[二氯甲烷/甲醇=82:18(v/v)]纯化得到标题化合物 9 (70mg, 收率: 70%)。ESI-MS m/z:805(M+H)。

化合物 10 的合成：将化合物 9 (70 mg, 0.087 mmol) 溶于 3ml N,N-二甲基甲酰胺中，依次加入 Bis-PNP (40 mg, 0.130 mmol) 和 N,N-二异丙基乙基胺 (22 mg, 0.174 mmol)，室温反应 16 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，减压蒸馏去除溶剂，所得粗品经过硅胶柱层析[二氯甲烷/甲醇=90:10(v/v)]纯化得到标题化合物 10 (40 mg, 收率: 47.6%)。ESI-MS m/z:970(M+H)。

35 化合物 LK-322022 的合成：将化合物 10 (14 mg, 0.014 mmol) 溶于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中，依次加入 N,N-二异丙基乙基胺 (3.5 mg, 0.027

mmol) 和市售艾瑞布林 (5 mg, 0.007 mmol), 室温反应 16 小时, 通过液质联用色谱监测原料反应完毕后, 加入 5ml 水, 乙酸乙酯萃取三次 (每次 10ml), 分液后合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后并浓缩, 所得粗品通过制备液相纯化得到 LK-322022 (5.1 mg, 收率: 48.1%)。ESI-MS
5 m/z:1560(M-H)。

实施例 4 抗体偶联

取上述实施例中待偶联的抗体 7B7-H04 和 7B7, 各取 3mg 抗体, 用 10mM 磷酸钠缓冲液 pH7.4 稀释至 3mg/ml, 加入三 (2-羟乙基) 膦盐酸盐
10 TCEP 母液, TCEP 母液为以 10mM 磷酸钠缓冲液 pH7.4 配置 10mM 母液 (TCEP 厂家 Sigma, 货号 C4706-2G, CAS. 51805-45-9), 确保 TCEP 摩尔终浓度与抗体摩尔终浓度为 4: 1, 将抗体置于 37°C 还原 45 分钟。加入实施例 2 和 3 中的连接子毒素母液, 母液为以二甲基亚砜 DMSO 溶解连接子毒素至 5mM, 确保连接子毒素摩尔终浓度与抗体摩尔终浓度为 6: 1, 将
15 抗体置于 2~8°C 偶联 2 小时。后将抗体转入 30 KD 超滤管中 (厂家 Merck, 货号 UFC9030), 置于 3000g 离心力 2~8°C 换液, 将残留毒素降至反应浓度的千分之一, 随后无菌过滤, 测定浓度, 分装冻存。

为获得不同偶联比值 DAR 的产物, 将抗体: 还原剂: 连接子毒素的摩尔比在 1: 1~6: 2~15 间调整, 其余条件保持不变, 最终偶联产物的 DAR 值
20 以检测结果为准。

实施例 5 不同 ADC 的效果的体外比较

一、检测方法

1. 细胞活性检测

25 将人 Calu-6 (厂家 Procell, 货号 CL-327, 人肺癌细胞) 复苏, 接种 96 孔培养板, 培养基为 DMEM/F12 (厂家 Hyclone, 货号 SH30023.01) 且含 10%FBS (厂家 Gibco, 货号 10099141), 每孔 2500 个细胞, 体积 150 微升, 置于 37°C, 5%二氧化碳培养箱培养, 约 20 小时后加入含有不同抗体偶联药物的培养基 50 微升, 使药物最终浓度在 0~100nM 之间的 12 个稀释
30 浓度 (首孔浓度 100nM, 后续依次 5 倍稀释 10 个梯度, 最后一个梯度药物为 0, 每个样品复孔重复), 继续共培养 4~7 天后取出培养板, 每孔加入 CTG 检测试剂 50 微升 (CellTiterGlo, 厂家 Promega, 货号 G7575), 反应 2 分钟, 按试剂盒推荐操作进行, 然后用 Tecan Spark 测定荧光度值。将复孔取平均值并作为 Y 轴, 以稀释梯度 log10 值为 X 轴, 做平滑曲线图, 按
35 照四参数计算 EC/IC₅₀ 值。

采用类似的细胞活性检测方法，可将细胞系替换为 Jurket、MCF-7 和 MDA-MB-468 进行再次验证。

2. 偶联比值检测分析

抗体所连接药物数量的平均值（DAR）值通过疏水层析 HIC-HPLC 方法检测，分析柱为 TSKgel Butyl-NPR, 4.6mm × 10cm, 2.5 微米，厂家 TOSOH, 货号 042168。取待测样品约 0.3mg，体积为 150 微升，加入 150 微升的流动相 A，10000g 离心 5 分钟取上清。流动相 A 为 20mM 磷酸钠+1.5M 硫酸铵 pH7.0，流动相 B 为 20mM 磷酸钠+20%（v/v）乙腈 pH7.0。分析柱连接在安捷伦 1260 高效液相色谱仪，流速 0.6ml/min，流动相 A 冲洗 30 分钟以上至 280nm 紫外基线平稳，进样 50 微克样品，流动相 A 冲洗 2 分钟后进行 18 分钟梯度洗脱（0%B – 100%B），继续保持 100%流动相 B 冲洗 5 分钟后结束。根据每个 DAR 值的峰面积计算每个 DAR 值占百分比。将每个峰的百分比与 DAR 值乘积后累加，然后除以总百分比即为平均 DAR 值。

3. 纯度检测分析

SEC-HPLC 纯度通过分子筛方法检测，分析柱为 TSKgel G3000SWXL, 7.8mm x 30cm, 5 微米，厂家 TOSOH, 货号 08541。取待测样品约 0.3mg，体积为 300 微升，10000g 离心 5 分钟取上清。流动相为 50mM 磷酸钠+0.1M 氯化钠 pH6.8。分析柱连接在安捷伦 1260 高效液相色谱仪，流速 0.8ml/min，流动相冲洗 30 分钟以上至 280nm 紫外基线平稳，进样 100 微克样品，流动相冲洗 20 分钟。根据峰面积计算高分子、单体、低分子各个峰占百分比。

二、检测结果

1. 细胞活性检测结果

抗体 7B7-H04 偶联 MC-VA-PAB-Eribulin, Mal-PEG2-VC-PAB-Eribulin, MC-GGFG-PAB-Eribulin 和 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin，偶联物针对 Calu6 细胞活性 EC/IC₅₀ 显示，EC/IC₅₀ 分别是 115.9pM、29.97pM，62.32pM 和 11.40pM（图 1），即 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的效果显著优于其他各组。

对于 7B7 偶联 Mal-PEG2-VC-PAB-Eribulin 和 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin，EC/IC₅₀ 分别是 50.23pM 和 9.241pM（图 1），依然是 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 取得了更佳的技术效果。

在除 Calu-6 细胞系外的其他细胞系中检测得到的 EC/IC₅₀ 趋势与上述相似，均是 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 效果最优。

2. 偶联比值和纯度结果

各组的偶联物平均 DAR 值和 SEC-HPLC 纯度结果如图 2 和下表所示：

组别	平均 DAR 值	SEC-HPLC 纯度（%）
----	----------	----------------

7B7 naked antibody	0	-
7B7-H04 MC-VA-PAB-Eribulin	3.33	97.15
7B7-H04 MC-GGFG-PAB-Eribulin	3.27	97.10
7B7-H04 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin	3.31	98.66
7B7 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin	4.25	95.88
7B7-H04 Mal-PEG2-VC-PAB-Eribulin	<4.2	>95

偶联物平均 DAR 值为 3.33，3.27 和 3.31（图 2），说明 VAGGFG 的多肽连接子在偶联比值接近时活性好于 GGFG 和 VA 多肽连接子。

采用与上述类似的方法，在其他几种常见的肿瘤细胞系（例如：MCF-7 和 MDA-MB-468）中进行验证，均有一致的趋势，即相比其他几种偶联物，
5 采用包含 VAGGFG 连接子的偶联物具有最佳的 EC/IC₅₀ 表现，且平均 DAR 值和 SEC-HPLC 纯度表现稳定，满足抗体偶联物要求。

实施例 6 体内药效学分析

委托 Bioduro 公司（www.bioduro-sundia.com）进行体内药效评估，取
10 培养良好的人乳腺癌肿瘤细胞系（MDA-MB-468）接种于免疫缺陷型小鼠（B-NDG），每只接种 1000 万个细胞，至肿瘤生长至 100mm³ 后随机分组，次日，每组按 3mg/kg 累计给药 2 次，每周一次，每周两次测定肿瘤大小，至实验结束。整个过程经过实验动物委员会审批通过。

实验结果如图 3 所示，从结果可知，7B7 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin
15 组在对肿瘤体积的抑制方面有效果。

采用同样的动物模型，将细胞系替换为 Calu6 和 MCF-7 进行再次验证，
每组独立地选自按 1~10mg/kg 给药（如 2、3、4、5、6、7、8 或 9mg/kg），
与 MDA-MB-468 的实验趋势一致，对肿瘤体积的抑制方面效果最佳。

实施例 7 稳定性测试

将 7B7-MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 偶联物在 PBS 缓冲液、食蟹猴血浆
20 和小鼠血浆中测试稳定性，浓度 100nM，置于 37℃放置 0、4、7、10、14 天，然后测定样品对 Jurket 细胞的杀伤活性。发现艾瑞布林释放率（Y 轴）随着时间（X 轴）延长，最高有 0.1~5%比例艾瑞布林释放，显示连接子血
25 浆稳定性非常好。

实施例 8 其它抗体的偶联测试

上述实施例的实验结果均基于抗体 7B7-H04 和 7B7 进行验证。

曲妥珠单抗（Trastuzumab）重链序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE
WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY
CSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
5 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
10 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 12）

曲妥珠单抗（Trastuzumab）轻链序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL
LIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF
15 GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO: 13）

贝马珠单抗（Bemarituzumab）重链序列：

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFTTYNVHWVRQAPGQGL
20 EWIGSIYPDNGDTSYNQNFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYY
CARGDFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
25 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK（SEQ ID NO: 14）

贝马珠单抗（Bemarituzumab）轻链序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQGVSNDAVAVYQQKPGKAPKL
30 LIYSASYRYTGVPSPRFSRSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQHSTTPYTF
GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO: 15）

35 进一步的，按照上述实施例，制备曲妥珠单抗（Trastuzumab）和贝马珠单抗（Bemarituzumab）偶联连接子毒素 MC-VAGGFG-PAB-Eribulin 的 ADC 进行验证。结果显示偶联比值平均 DAR 值 2~3，纯度>95%（图 4、图 5）。以 SK-BR-3 细胞系（人乳腺癌细胞）和 KATO III 细胞系（人胃癌

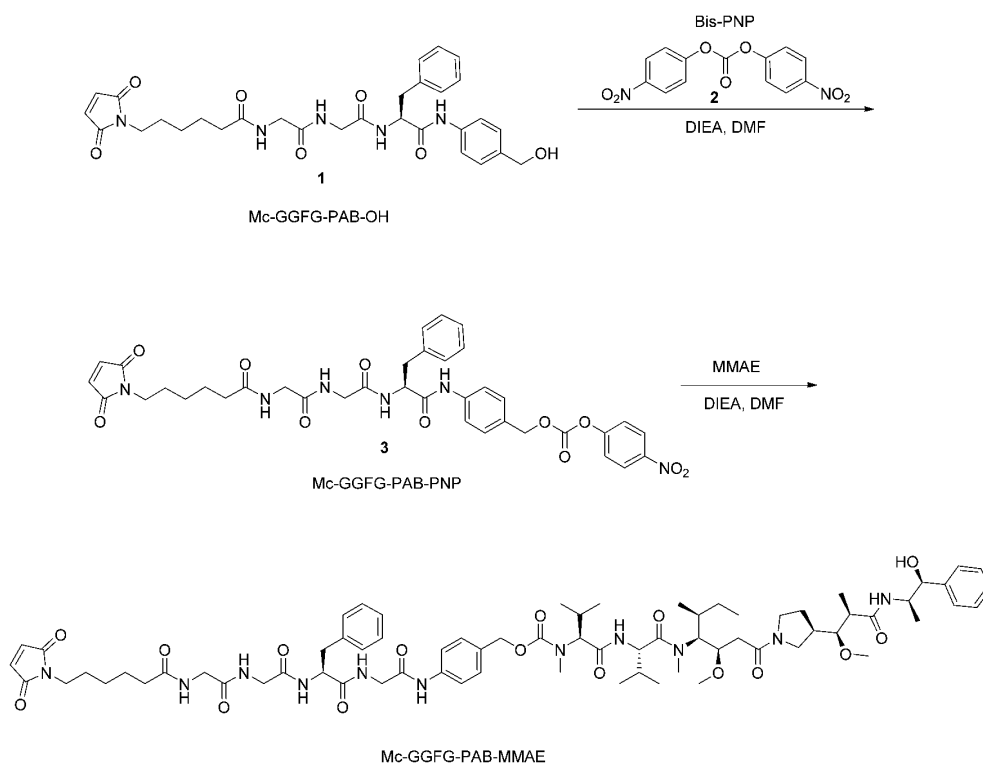
细胞) 进行活性测定, 与 Calu-6 相同方法测定细胞活性 EC_{50} 值为 32pM 和 97pM。

实施例 9 其它药物的偶联测试

- 5 为了测试不同毒素的差异, 合成了不同多肽连接子毒素, 按照上述实施例的相关实验方法进行偶联物制备和活性测定, 结果表明: 在甲基溴瑞他汀 EMMAE 和依喜替康 Exatecan 中, 测试的不同多肽连接子在细胞水平未表现出显著差异, 与上述实施例中艾瑞布林作为毒素的结果有差异。

- 10 化合物 MC-VC-PAB-MMAE 为市售, MC-VA-PAB-MMAE 已有报道与 MC-VC-PAB-MMAE 无显著差异。

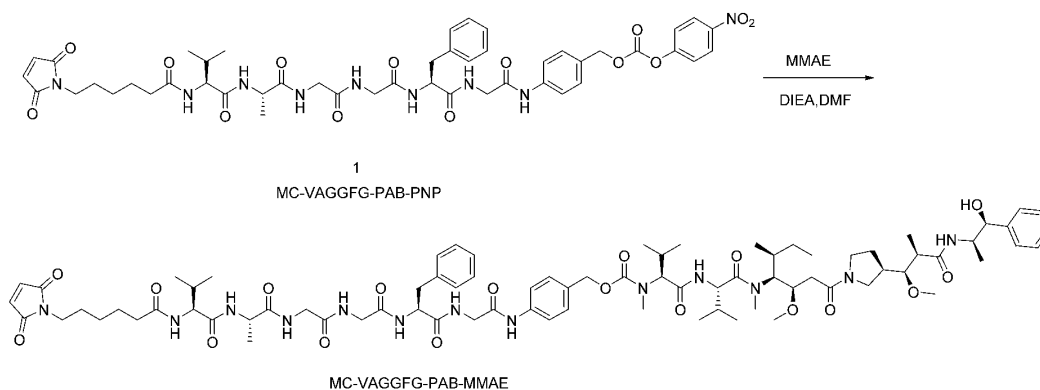
化合物 MC-GGFG-PAB-MMAE 的合成路线为:



- 15 合成步骤为: 将市售化合物 1 (50 mg, 0.0865 mmol) 溶于 2ml N,N-二甲基甲酰胺中, 依次加入 Bis-PNP (36 mg, 0.1182 mmol) 和 N,N-二异丙基乙基胺 (20.3 mg, 0.006053 mmol), 室温反应 16 小时, 通过液质联用色谱监测原料反应完毕后, 加入 15ml 水, 用乙酸乙酯萃取三次 (每次 10ml), 分液后合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后并浓缩, 所得粗品通过制备液相纯化得到化合物 3 (50 mg, 收率: 77.8%)。将化合物 3 (7.26 mg, 0.009 mmol) 溶于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中, 依次加入 N,N-二异丙基

- 乙基胺 (3.1 mg, 0.02412 mmol) 和市售 MMAE (7.9 mg, 0.011 mmol), 室温反应 15 小时, 通过液质联用色谱监测原料反应完毕后, 加入 5ml 水, 乙酸乙酯萃取三次 (每次 10ml), 分液后合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后并浓缩, 所得粗品通过制备液相纯化得到目标化合物 (8.5 mg, 收率: 62%)。ESI-MS m/z : 1378(M+H)。

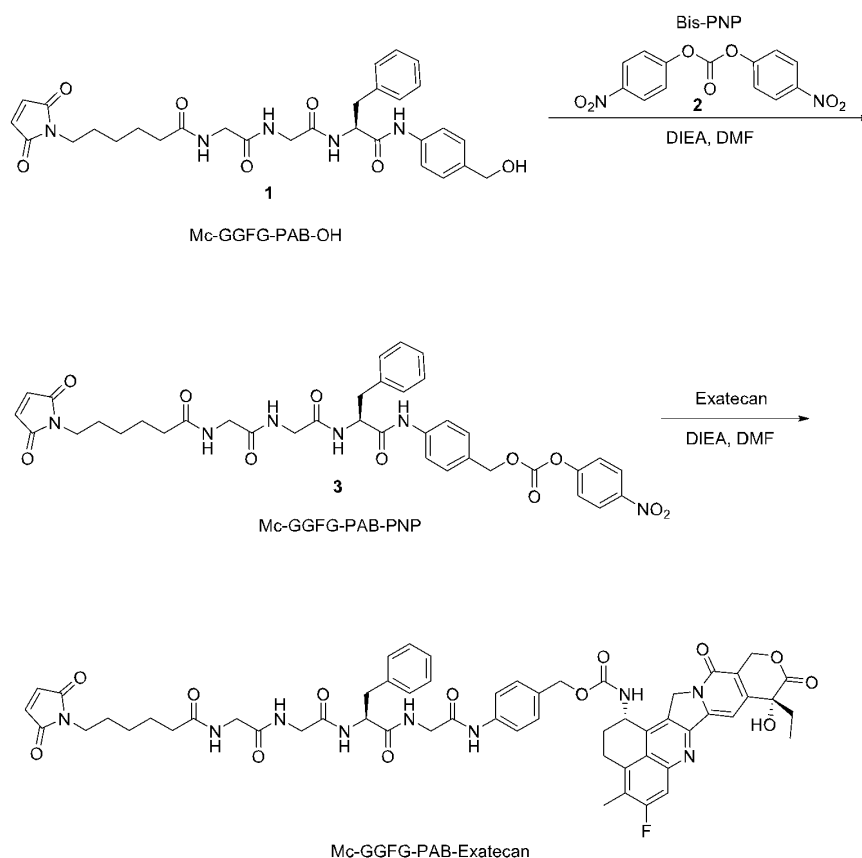
化合物 MC-VAGGFG-PAB-MMAE 的合成路线为:



- 步骤: 将化合物 1 (合成路线同实验组) (9.7mg, 0.01mmol) 溶于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中, 依次加入 N,N-二异丙基乙基胺 (3.0 mg, 0.02 mmol) 和市售 MMAE (7.9 mg, 0.011 mmol), 室温反应 15 小时, 通过液质联用色谱监测原料反应完毕后, 加入 5ml 水, 乙酸乙酯萃取三次 (每次 10ml), 分液后合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后并浓缩, 所得粗品通过制备液相纯化得到目标化合物 (9.3 mg, 收率: 60%)。ESI-MS m/z : 1548(M+H)。

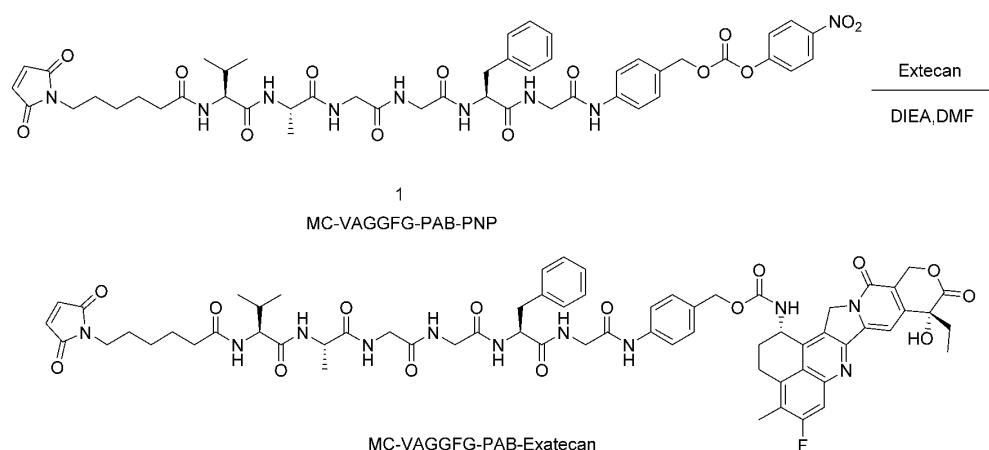
- 15 化合物 MC-VA-PAB-Exatecan 为市售。

化合物 MC-GGFG-PAB-Exatecan 的合成路线为:



步骤：将市售化合物 1（50 mg，0.0865 mmol）溶于 2ml N,N-二甲基甲酰胺中，依次加入 Bis-PNP（36 mg，0.1182 mmol）和 N,N-二异丙基乙基胺（20.3 mg，0.006053 mmol），室温反应 16 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，加入 15ml 水，用乙酸乙酯萃取三次（每次 10ml），分液后合并有机相，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥后并浓缩，所得粗品通过制备液相纯化得到化合物 3（50 mg，收率：77.8%）。将化合物 3（7.26 mg，0.009079 mmol）溶于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中，依次加入 N,N-二异丙基乙基胺（3.1 mg，0.02412 mmol）和市售 Exatecan（5 mg，0.011 mmol），室温反应 15 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，加入 5ml 水，乙酸乙酯萃取三次（每次 10ml），分液后合并有机相，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥后并浓缩，所得粗品通过制备液相纯化得到目标化合物（6.0 mg，收率：61%）。ESI-MS m/z:1096(M+H)。

化合物 MC-VAGGFG-PAB-Exatecan 合成路线为：



步骤：将化合物 1（合成路线同实验组）（9.7mg，0.01mmol）溶于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中，依次加入 N,N-二异丙基乙基胺（3.0 mg，0.02 mmol）和市售 Extecan（5 mg，0.011 mmol），室温反应 15 小时，通过液质联用色谱监测原料反应完毕后，加入 5ml 水，乙酸乙酯萃取三次（每次 10ml），分液后合并有机相，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥后并浓缩，所得粗品通过制备液相纯化得到目标化合物（7.3 mg，收率：58%）。ESI-MS m/z :1266(M+H)。

将上述化合物按照实施例 4 偶联抗体 7B7，制备偶联比值为 3~4 的偶联物，并按照实施例 5 测定针对细胞系 MCF-7 的活性。结果如下：1) 偶联 MMAE 毒素，为 VC、GGFG 和 VAGGFG 多肽连接子的偶联物活性 IC_{50} 为 0.49、0.41、0.27 nM；2) 偶联 Extecan 毒素，为 VA、GGFG 和 VAGGFG 多肽连接子的偶联物活性 IC_{50} 为 242、270、307 nM。

以上所述实施例仅表达了本公开的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本公开构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本公开的保护范围。因此，本公开专利的保护范围应以所附权利要求为准，说明书及附图可以用于解释权利要求的内容。

权 利 要 求 书

1. VAGGFG 作为酶裂解连接子的应用。

2. 配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，所述配体-药物偶联物的通式为 $TL-(L-D)_n$ ；

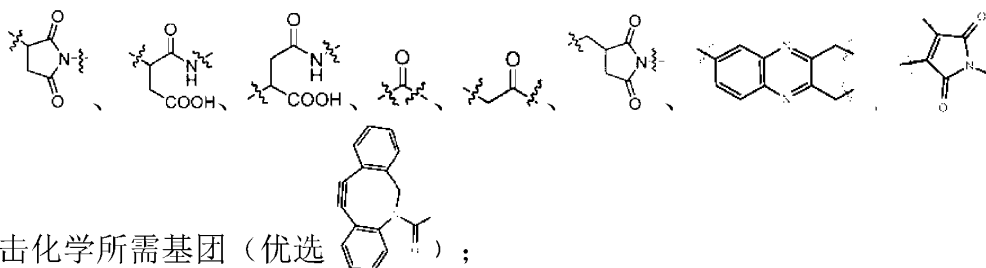
5 其中，TL 为靶向配体，L 为接头单元，D 为艾瑞布林，n 为 1~20 的正整数；

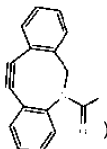
L 中包含短肽 VAGGFG 作为酶裂解连接子。

3. 根据权利要求 2 所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，所述接头单元为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ， L^1 与 TL 相连， L^4 与 D 相连；

10 其中，

L^1 选自：



或点击化学所需基团（优选 ）；

L^2 选自：

15 $-NC(R^1R^2)C(O)-$ 、 $-NR^3(CH_2)_oC(O)-$ 、 $-NR^3(CH_2CH_2O)_oCH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_pC(O)-$ 或化学键，其中 o 选自 0~20 的整数；p 选自 0~20 的整数；

R^1 、 R^2 各自独立地选自氢原子、氘原子、烷基、取代烷基、氘代烷基、杂烷基、羧基、氨基、取代氨基；

20 R^3 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、取代烷基、氘代烷基、环烷基、烷基、烷氧基烷基、芳基、取代芳基或杂芳基；

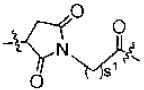
L^1 与 L^2 共用 N 原子；

L^3 为 VAGGFG；

L^4 选自： $-NR^4(CR^5R^6)_q-$ 、 $-C(O)NR^4-$ 、 $-C(O)NR^4(CH_2)_q-$ 或者化学键，q 选自 0~6 的整数；

25 R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、取代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基。

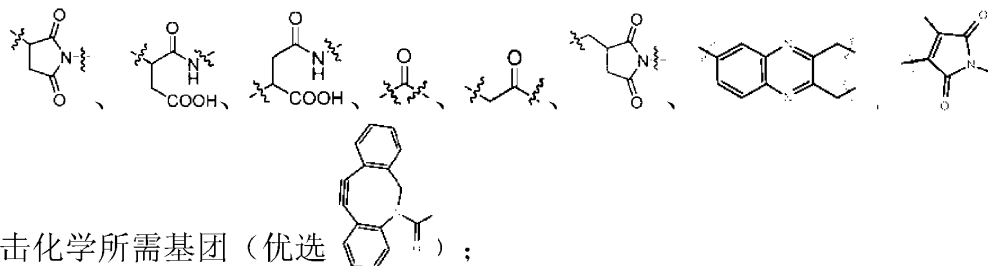
4. 根据权利要求 3 所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶

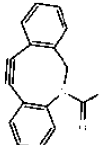
剂化物, $-L^1-L^2-$ 为 , 且 s_1 为 2、3、4、5、6、7 或 8。

5. 根据权利要求 2 所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 所述接头单元为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, L^1 与 TL 相连, L^4 与 D 相连;

其中,

5 L^1 选自:



或点击化学所需基团 (优选 );

L^2 选自:

10 $-NC(R^1R^2)C(O)-$ 、 $-NR^3(CH_2)_oC(O)-$ 、 $-NR^3(CH_2CH_2O)_oCH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_pC(O)-$ 或化学键, 其中 o 选自 0~20 的整数; p 选自 0~20 的整数;

R^1 、 R^2 各自独立地选自氢原子、氘原子、烷基、取代烷基、氘代烷基、杂烷基、羧基、氨基、取代氨基;

R^3 选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、取代烷基、氘代烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、芳基、取代芳基或杂芳基;

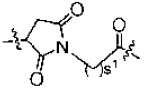
15 L^1 与 L^2 共用 N 原子;

L^3 为 VAGGFG;

L^4 选自: $-NR^4$ -芳基- $(CR^5R^6)_q-OC(O)-$ 、 $-NR^4(CR^5R^6)_q-OC(O)-$, q 选自 0~6 的整数;

20 R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、取代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基、取代芳基或杂芳基。

6. 根据权利要求 5 所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

剂化物, $-L^1-L^2-$ 为 , 且 s_1 为 2、3、4、5、6、7 或 8。

7. 根据权利要求 5 所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, L^4 为对氨基苄氧羰基 (PAB)。

8. 根据权利要求 2~7 任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受

的盐或溶剂化物，所述靶向配体为抗体或其抗原结合片段。

9. 根据权利要求8所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，所述抗体或其抗原结合片段选自兔源抗体、鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

5 10. 根据权利要求9所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，所述抗体选自：抗CD3抗体、抗FOLR1抗体、抗ROR1抗体、抗TNF α 抗体、抗TF抗体、抗EpCAM抗体、抗EGFRvIII抗体、抗DLL-3抗体、抗PSMA抗体、抗MUC16抗体、抗ENPP3抗体、抗TDGF1抗体、
10 抗ETBR抗体、抗MSLN抗体、抗TIM-1抗体、抗LRRC15抗体、抗LIV-1抗体、抗CanAg/AFP抗体、抗Claudin 6抗体、抗Claudin 9抗体、抗Claudin 18.2抗体、抗Mesothelin抗体、抗HER2抗体、抗EGFR抗体、抗c-MET抗体、抗SLITRK6抗体、抗KIT/CD117抗体、抗STEAP1抗体、抗SLAMF7/CS1抗体、抗NaPi2B/SLC34A2抗体、抗GPNMB抗体、抗HER3抗体、抗MUC1/CD227抗体、抗AXL抗体、抗CD166抗体、抗B7-H3(CD276)
15 抗体、抗PTK7/CKK4抗体、抗PRLR抗体、抗EFNA4抗体、抗5T4抗体、抗NOTCH3抗体、抗Nectin 4抗体、抗TROP-2抗体、抗CD142抗体、抗CA6抗体、抗GPR20抗体、抗CD174抗体、抗CD70抗体、抗CD71抗体、抗EphA2抗体、抗LYPD3抗体、抗FGFR2抗体、抗FGFR3抗体、抗FR α 抗体、抗CEACAMs抗体、抗GCC抗体、抗Integrin Av抗体、抗CAIX抗体、
20 抗P-cadherin抗体、抗GD3抗体、抗Cadherin 6抗体、抗LAMP1抗体、抗FLT3抗体、抗BCMA抗体、抗CD79b抗体、抗CD19抗体、抗CD20抗体、抗CD33抗体、抗CD56抗体、抗CD74抗体、抗CD22抗体、抗CD30抗体、抗CD37抗体、抗CD47抗体、抗CD138抗体、抗CD352抗体、抗CD25抗体和抗CD123抗体。

25 11. 根据权利要求8所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，所述抗体选自：

i) Trastuzumab抗体；

ii) Bemarituzumab抗体；

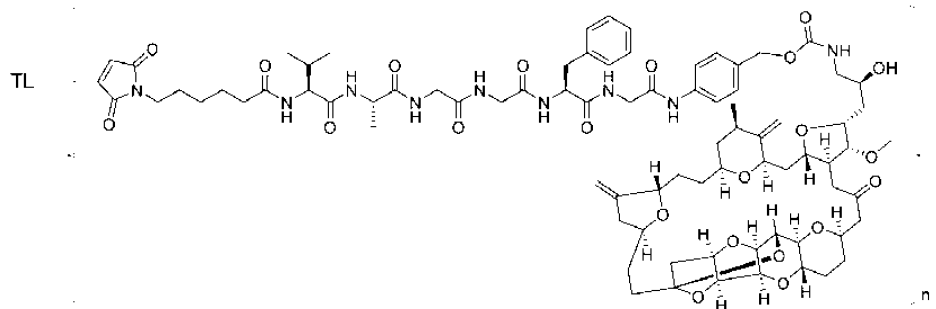
30 iii) 抗B7-H3抗体：其重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3依次如SEQ ID NO:1~3所示，轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3依次如SEQ ID NO:4~6所示。

12. 根据权利要求11所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，所述抗B7-H3抗体的重链可变区HCVR如SEQ ID NO:7所示，轻链可变区LCVR如SEQ ID NO:8所示。

35 13. 根据权利要求12所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或

溶剂化物, 所述抗 B7-H3 抗体的重链恒定区如 SEQ ID NO:9 或 10 所示, 轻链恒定区如 SEQ ID NO:11 所示。

14. 根据权利要求 2、5~7、9~13 任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 所述配体-药物偶联物的结构如下所示:



15. 制备权利要求 2~14 任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的方法, 包括:

将所述靶向配体还原后, 与预先合成的-L-D 进行偶联反应, 得到通式为 TL-L-D 所示的化合物。

16. 药物组合物, 其包含权利要求 2~14 任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

17. 权利要求 2~14 任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

18. 根据权利要求 17 所述的用途, 所述的肿瘤为乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。