

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 12 月 19 日 (19.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/255873 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/68 (2017.01) **C07K 1/20** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/099341

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 14 日 (14.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310703622.X 2023年6月14日 (14.06.2023) CN

(71) 申请人: 江苏迈威康新药研发有限公司 (JIANGSU MABWELL HEALTH PHARMACEUTICAL R & D CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。迈威(上海)生物科技股份有限公司(MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区李冰路576号(张江创想园)3号楼4楼, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 周伟(ZHOU, Wei); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。朱会凯(ZHU, Huikai); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。陈宇航(CHEN, Yuhang); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。王珍珍(WANG, Zhenzhen); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。谭小钉(TAN, Xiaoding); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

(54) 发明名称: 一种制备抗体药物偶联物的方法

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing an antibody-drug conjugate. According to the method, a highly homogeneous antibody conjugate molecule is obtained by means of a specific chemical site-directed conjugation method, and the proportion of a DAR2 main peak thereof reaches 99% or above. The preparation method of the present invention has few steps, and is easy to operate, and is thus beneficial for industrial scaled-up production. In addition, the prepared product has few impurities and a high purity, the medication safety is obviously improved, and the production cost is also reduced.

(57) 摘要: 本发明涉及一种制备抗体药物偶联物的方法, 其通过特定的化学定点偶联方法, 获得了高度均质的抗体偶联物分子, 其DAR2主峰占比达到99%以上。本发明的制备方法步骤少, 操作简单, 利于工业放大生产, 同时制备的产品杂质少、纯度高, 明显提高用药安全性, 也降低了生产成本。

WO 2024/255873 A1

一种制备抗体药物偶联物的方法

技术领域

5 本发明属于生物医药领域，更具体地，本发明涉及一种制备抗体药物偶联物的新方法。

背景概述

10 抗体-药物偶联物（ADC）是一种将小分子药物连接到单克隆抗体上的一种新药物形式，利用单克隆抗体的靶向功能，将小分子药物运输到靶部位发挥药效，减少毒副作用，提高了治疗窗口。近年来，抗体偶联药物是肿瘤精准治疗的热门方向之一，为肿瘤治疗带来希望。抗体-偶联药物（Antibody- Drug Conjugates, ADC）由靶向特异性抗原的抗体药物和小分子细胞毒药物通过连接子偶联而成，兼具传统小分子化疗的强大杀伤效应及抗体药物的肿瘤靶向性。截止到目前，全球已有十多款 ADC 药物获批上市。

15 抗体偶联药物由抗体、连接子、有效载荷(payload)等几部分组成。其中抗体和药物-连接体可以以不同的偶联方式连接。偶联方法主要分为非定点偶联和定点偶联。早期使用的是非定点偶联法，主要由赖氨酸偶联和半胱氨酸偶联，利用化学方法直接将药物与抗体上氨基酸残基进行偶联，不涉及抗体的改造或修饰，其偶联的毒素分子个数和偶联位点都不能确定，均一性欠佳。目前常用的定点偶联方式即通过基因工程位点或者特殊的连接头进行特异性偶联，实现更均一地偶联，能在特定位点实现细胞毒素的连接。定点偶联生产的抗体偶联药物20可以减少因偶联位点和偶联个数不同而造成药效、药代以及质控的波动。目前常见的定点偶联方式有 THIOMAB 技术、非天然氨基酸偶联技术、谷氨酰胺酶促偶联技术、Sortase 转肽酶偶联技术以及 Thiobridge 技术等。其中，利用抗体工程化或者酶促偶联对抗体的改造修饰可能会对抗体的结构稳定性有一定影响，同时对 CMC 有一定要求。另外，利用化学偶联的 Thiobridge 技术也有一定的缺陷，例如 DBM(dibromomaleimides)类连接子和其他含巯基的生物基团发生置换作用，而在血浆中不稳定，造成药效降低，毒副作用增加25 (Chem.-Eur.J,2019,25,43-59)。

30 药物抗体比 DAR (drug-to-antibody ratio) 是 ADC 药物独特的重要质量属性，它代表抗体偶联小分子药物的平均数量。药物偶联的程度会影响 ADC 药物的稳定性和聚集倾向。因此，DAR 值是进行 ADC 药物分析的关键质量属性，是 ADC 药物研发过程重要的质控环节。定点偶联技术可以实现抗体与小分子毒素定点、定量偶联，通过该技术获得的 ADC 具有合适的药抗比 DAR，均一性高，稳定性好，批次间重现性高，具有更好的活性和药动学特性，同时也更适用于 ADC 的大规模生产。目前的 ADC 药物的研发趋势是采用定点偶联方法将高活性小分子药物偶联到抗体上，形成定点 DAR2 的 ADC，如批准上市的靶向 CD19-ADC (loncastuximab tesirine, Zynlonta) 通过糖基化定点偶联技术将 PBD 小分子偶联到抗体35上，实现定点 DAR2，以及靶向 HER2 ADC (ARX788) 以及靶向 FR α ADC (MORAb-202)，

均采用非天然氨基酸突变的方法实现定点 DAR2。但这些方法要么需要使用酶，要么需对抗体序列进行改造，制造工艺复杂。

WO2022253033A1 公开了如下 ADC 偶联物制备方法：用依地酸二钠的溶液稀释抗体，然后用 Na_2HPO_4 溶液调 pH，加入 TCEP(三(2-羧乙基)膦)溶液混匀，室温放置 2h。向上述溶液体系加入抗体的 5-10 倍物质的量的溶解在 DMSO 的药物-连接体，混匀，室温静置 20h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱(Cytiva)将缓冲液置换为 pH 6.0 的 10mM 组氨酸缓冲溶液，得到 ADC 产物。经样品测定，该专利采用以上非定点偶联的方式制备的 ADC 偶联物的 DAR 为 4，未见 DAR 为 2 的结果记载。

WO2022078524A2 公开了抗体偶联物的定点偶联方法。其采用多种锌配合物和 TCEP 对抗体进行还原孵育后，引入有效载荷/接头复合物。然后加入半胱氨酸以消耗多余的 TCEP 和多余的有效载荷。氧化蛋白质中的游离巯醇基团。最后使用脱盐柱或 UF/DF 或离子交换色谱纯化反应混合物。采用 HIC-HPLC 对于偶联物 DAR 分析的结果显示，DAR 为 4 偶联物占比为 60-70%左右，而 DAR 为 2 偶联物的占比仅为 5-10%。可见，采用该专利方法所制备的抗体偶联物 DAR 主要集中在 4，而 DAR 为 2 的偶联物产物仅占少数。

WO2020164561A1 制备了具有改善的同质性的抗体-药物缀合物(ADC)，所用的偶联方法包括以下步骤：

(a)将还原剂(例如，三(2-羧乙基)膦(TCEP))和待缀合的抗体在有效量的过渡金属离子(例如， Zn^{2+} 等)的存在下在缓冲体系(例如，Hepes、组氨酸缓冲液、PBS、MES 等)中温育，以选择性地还原抗体内链间二硫键；(b)将过量的携带有反应性基团的有效载荷(例如，马来酰亚胺连接的药物)与步骤(a)得到的还原的巯基基团反应；以及 (c)加入有效量的氧化剂(例如，脱氢抗坏血酸(DHAA))以将未反应的巯基再氧化，然后回收获得的抗体-药物缀合物。虽然该偶联方法产生的抗体-药物缀合物(ADC)的同质性可以得到显著改善，但是其 ADC 产品的 DAR2 重量占比仅为 10-28%，该比例远小于 DAR4 的重量比数值。

对于 ADC 来讲，DAR 值是 ADC 的关键质量属性，高 DAR 虽然能将更多的小分子药物带到靶部位，可能起到更好的治疗效果，但是高 DAR 的设计会牺牲 ADC 药物的稳定性和均一性，可能引起抗体的集聚，从而影响 ADC 药物的药效，带来较大的毒副作用。制备高均一性和/或纯度的 DAR2 的 ADC 可避免高 DAR 带来的不利影响，并可有利于 ADC 药物的稳定和疗效。然而，如上所述，现有技术可通过糖基化定点偶联技术实现定点 DAR2。但这些方法要么需要使用酶，要么需对抗体序列进行改造，制造工艺复杂。目前报道的用于制备 ADC 的化学定点偶联法，虽然工艺相对简单，但只能实现主要 DAR 为 4 的 ADC 产物。

因此，本领域迫切需要一种更简便有效的定点 DAR2-ADC 制备方法。

发明内容

本发明提供一种抗体-药物偶联物的新制备方法，其通过特定的化学定点偶联方法，获得了高度均质的抗体偶联物分子，其 DAR2 主峰占比达到 99%以上。本发明的制备方法步骤

少,操作简单,利于工业放大生产,同时制备的产品杂质少、纯度高,明显提高用药安全性,也降低了生产成本。通过本发明的偶联方法制备的抗肿瘤药具有优异的抗肿瘤效果和安全性(包括较高的稳定性和较小的副作用)。

5 第一方面

本发明提供用于制备抗体-药物偶联物(ADC)的方法,该方法包括以下步骤:

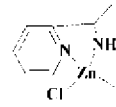
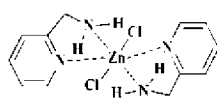
- (a) 在含抗体的缓冲溶液中,加入金属盐或金属配合物、还原剂,然后进行孵育;
- (b) 向(a)中的反应溶液中加入含药连接子进行偶联;和
- (c) 使用疏水作用色谱方法,采用疏水凝胶型填料和盐溶液对于偶联物产物进行纯化,

10 以获得高纯度的 DAR2-ADC 偶联物。

在一些实施方案中,步骤(a)中所述的金属盐或金属配合物中的金属可以选自 Zn、Cd 和 Hg 等。

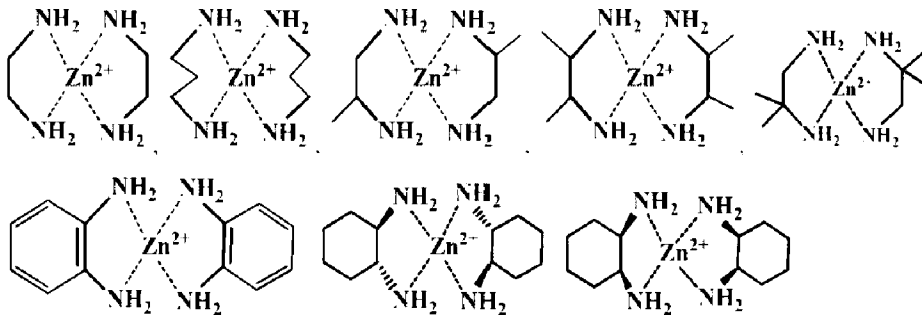
在一些实施方案中,步骤(a)中所述的金属盐或金属配合物选自下述中的一种或多种: Zn、

Cd 和 Hg 的盐酸盐或硫酸盐、



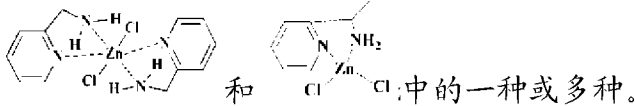
以及 WO2022078524A2 公开

的 Zn 盐或 Zn 配合物包括但不限于



$\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_3)_2)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)_2^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)_2)_2^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3)_2)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2)_2^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3)_2^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3)_2^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2)_2^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{COOH})_2)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3)_2^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_4^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_4^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_3)_2)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2)_4^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)_2)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2)_4^{2+}$,
 $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3)_2)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2)_4^{2+}$, $\text{Zn}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_4^{2+}$.

在一些实施方案中，步骤(a)中所述的金属盐或金属配合物选自 ZnCl_2 、 CdCl_2 、 HgCl_2 、



在一些实施方案中，步骤(a)中所述的还原剂选自三(2-羧乙基)膦 (TCEP)、二硫苏糖醇 (DTT)、巯基乙胺和巯基乙醇，优选 TCEP。

在一些实施方案中，步骤(a)中的抗体的浓度为 0.5-150 mg/mL，例如 1-75 mg/mL、1-50 mg/mL、2-40 mg/mL、3-30 mg/mL、4-30 mg/mL 或 5-15 mg/mL，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120 或 150 mg/mL。

在一些实施方案中，步骤(a)中所述的还原剂的用量是 1-6 倍抗体摩尔当量，例如 2-6、3-5、3.5-5.0 或 4.0-4.5 倍抗体摩尔当量，例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5 倍抗体摩尔当量。

在一些实施方案中，步骤(a)中所述的金属盐或金属配合物的用量为 1-5 倍抗体摩尔当量，例如 1-4、1-3 或 1.5-2.5 倍抗体摩尔当量，例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 或 5 倍抗体摩尔当量。

在一些实施方案中，步骤(a)中的所述缓冲溶液具有 5-8 的 pH，例如 5.5-7.5、6.5-7.5 或 6.5-7.4 的 pH，例如 5.0、5.5、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5 或 8.0 的 pH，优选 pH 为 6.9。

在一些实施方案中，步骤(a)中的所述缓冲溶液选自磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液，优选磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液。优选地，所述缓冲溶液中的缓冲剂浓度为 5 -100 mM，例如 10 -90 mM、20 -80 mM、30 -70 mM、40-60 mM、10 -30 或 mM，例如 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 mM。

在一些实施方案中，步骤(a)中所述的孵育在 0~30°C，例如 0~15°C 或 5-15°C 进行。

应当理解，本领域技术人员可以容易地确定本发明各反应的终点，从而确定反应进行的时间。

在一些实施方案中，步骤(a)中所述的孵育进行 1-48 小时，例如 2-24 小时、2-12 小时、3-10 小时、4-8 小时或 5-24 小时，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、或 35 小时。

在一些实施方案中，步骤(b)中的含药连接子的用量是 1-8 倍抗体摩尔当量，例如 2-6、2.5-5.5、3-5 或 3.5-4.5 倍抗体摩尔当量，例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7 或 7.5 倍抗体摩尔当量。

在一些实施方案中，步骤(b)中的偶联反应温度为 0~30°C，例如 0~15°C 或 3-15°C。

在一些实施方案中，步骤(b)中反应溶液具有 5-8 的 pH，例如 5.5-7.5、6.5-7.5 或 6.5-7.4 的 pH，例如 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 或 8.0 的 pH。

在一些实施方案中，含药连接子以 DMA 溶液形式提供。

在一些实施方案中，步骤(b)的偶联反应进行 0.2-24 小时，例如 0.5-12 小时、1-10 小时、1.5-5 小时、1-3 小时或 1-4 小时，例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9 或 10

小时。

在一些实施方案中，步骤(c)中所述疏水凝胶填料选自 Butyl-650M、Butyl-4FF、Butyl-650S、Butyl-ImpRes 和 Phenyl Sepharose HP。

5 在一些实施方案中，步骤(c)中的盐种类选自硫酸盐、氯化盐等，例如硫酸或盐酸的碱金属(例如锂、钠、钾)盐、碱土金属(例如钙、镁)盐，胺或氨与硫酸或盐酸形成的盐，优选硫酸铵、氯化钠；优选地，盐浓度为 0.1-5mol/L，例如 0.2-4 mol/L、0.3-3 mol/L、0.5-2 mol/L、0.5-1.5 mol/L、0.6-1.2 mol/L 或 0.6-1.0 mol/L，例如 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5 或 2.0 mol/L。

10 在一些实施方案中，步骤(c)所述的盐溶液用作疏水作用色谱的流动相 A。

在一些实施方案中，步骤(c)中的疏水作用色谱使用磷酸盐缓冲液作为流动相 B，优选地，所述磷酸盐缓冲液具有 5-200 mM 的磷酸盐浓度，具有 7.0-7.6 例如 7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5 的 pH。

在一些实施方案中，流动相 A 和/或流动相 B 还可含有其它溶剂例如异丙醇等。

15 在一些实施方案中，在步骤(b)后包含步骤(b')：加入金属离子螯合剂例如乙二胺四乙酸(EDTA)进行反应。

在一些实施方案中，步骤(b')在室温下进行，例如 5min-5 小时、10 min - 45 min 或 30 min。

20 在一些实施方案中，金属离子螯合剂的用量是 1-8 倍抗体摩尔当量，例如 2-6、2.5-5.5、3-5 或 3.5-4.5 倍抗体摩尔当量，例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7 或 7.5 倍抗体摩尔当量。

在一些实施方案中，在步骤(b')后包含步骤(b'')：加入脱氢抗坏血酸(DHAA)进行反应。

25 在一些实施方案中，步骤(b'')在 25~35℃ 下进行，例如 0.2-24 小时，例如 0.5-12 小时、1-10 小时、1.5-5 小时、1-3 小时或 1-4 小时，例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9 或 10 小时。

在一些实施方案中，DHAA 的用量是 1-16 倍抗体摩尔当量，例如 2-10、2-6、6-16 或 6-12 倍抗体摩尔当量，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14 或 16 倍抗体摩尔当量。

30 在一些实施方案中，本发明方法获得的 DAR2-ADC 具有大于 90% 的纯度，例如大于 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 的纯度，所述纯度例如通过 HIC-HPLC 测得。

在一些实施方案中，其中所述抗体选自人源化抗体、鼠源抗体、人抗体、嵌合抗体、单链抗体和双特异性抗体。

在一些实施方案中，其中所述抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。

35 在一些实施方案中，所述抗体是与下述抗原结合的抗体：HER2、B7H3、HER3、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD45、CD56、CD66e、CD70、CD74、CD73、CD79b、CD138、CD147、CD223、EpCAM、粘蛋白 1 (Mucin 1)、STEAP1、GPNMB、FGF2、FOLR1、

EGFR、EGFRvIII、组织因子(Tissuefactor)、c-MET、FGFR、Nectin 4、AGS-16、鸟苷酸环化酶 C (Guanylyl cyclase C)、间皮素(Mesothelin)、SLC44A4、PSMA、EphA2、AGS-5、GPC-3、c-KIT、RoR1、PD-L1、CD27L、5T4、Mucin16、NaPi2b、STEAP、SLITRK6、ETBR、BCMA、Trop-2、CEACAM5、SC-16、SLC39A6、Delta-like protein3、Claudin 18.2。

5 在一些实施方案中，所述抗体是抗 HER2 抗体。

在一些实施方案中，所述抗体包含阿达木单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、曲妥珠单抗(trastuzumab)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、尼妥珠单抗、利妥昔单抗、h23-12 或 hH2L1 的一个或多个 CDR (优选 3 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2H 和 HCDR3；或 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，更优选 6 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)，
10 或包含所述抗体的 VH 和/或 VL，或包含所述抗体的重链和/或轻链。

在一些实施方案中，所述抗体选自阿达木单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、曲妥珠单抗(trastuzumab)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、尼妥珠单抗、利妥昔单抗、h23-12 和 hH2L1。

在一些实施方案中，所述抗体包含 trastuzumab、Pertuzumab、h23-12 或 hH2L1 的一个或多个 CDR (优选 3 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2H 和 HCDR3；或 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，
15 更优选 6 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)，或包含 trastuzumab、Pertuzumab、h23-12 或 hH2L1 的 VH 和/或 VL，或包含所述抗体的重链和/或轻链。

在一些实施方案中，所述抗体选自 trastuzumab、Pertuzumab、h23-12 和 hH2L1。

20 在一些实施方案中，步骤(b)中的含药连接子为“L₁-A-L₂-D”所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，

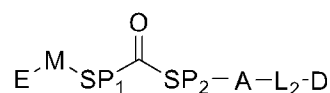
其中 L₁ 表示用于与抗体连接的接头单元，

A 表示一个或多个(例如 1、2、3 或 4 个)氨基酸，

L₂ 表示用于与小分子药物连接的接头单元，且

25 D 为小分子药物。

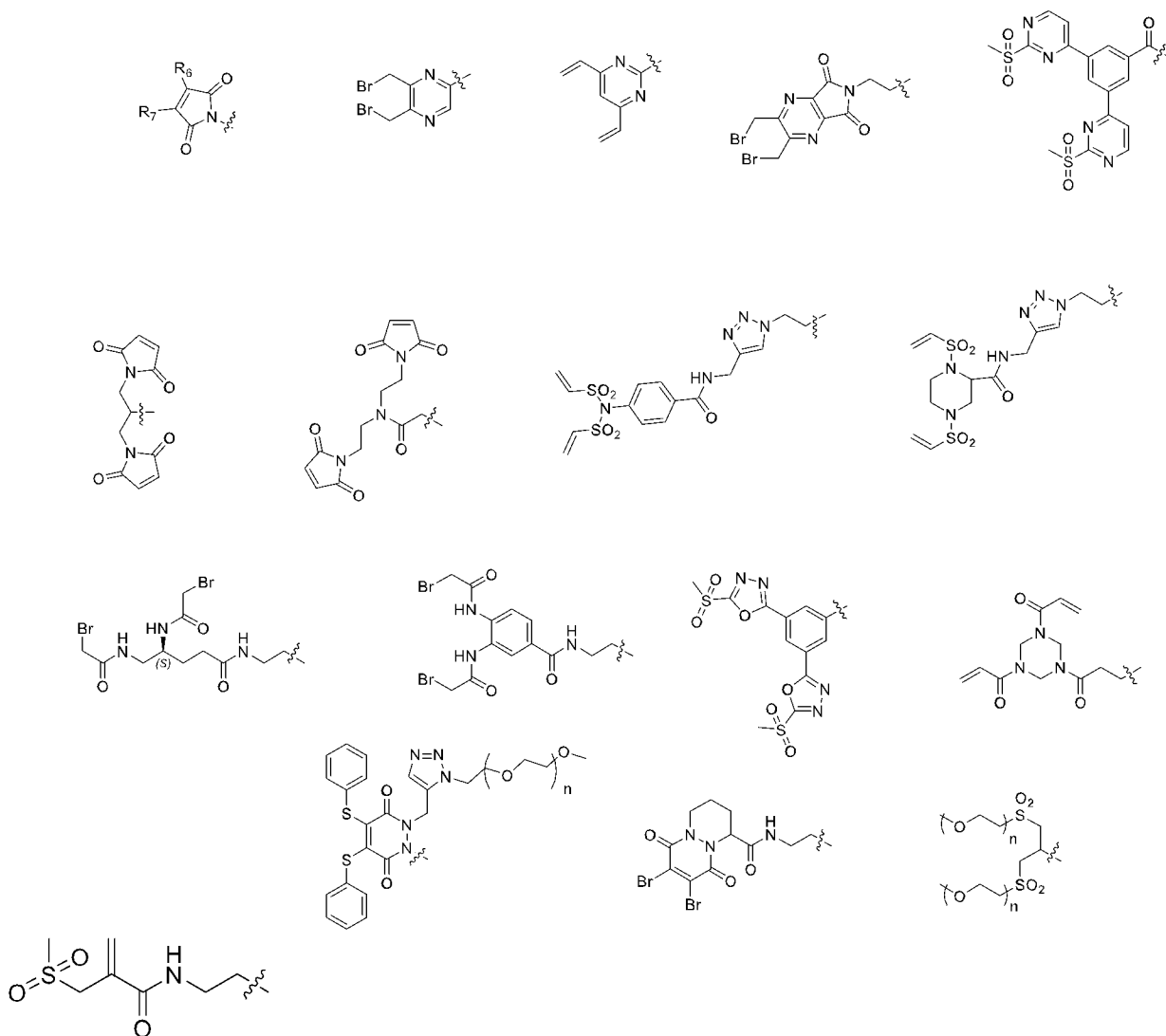
在一些实施方案中，步骤(b)中的含药连接子为式 A-I 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，



A-I

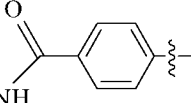
30

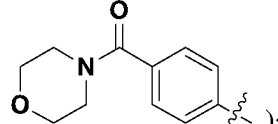
在结构式 A-I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，E 选自如下基团，其中，带有 ~ 的键表示与 M 的连接位点：



n 为选自 1-10 的整数, 例如为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

R₆、R₇ 独立地为卤素或 Ar'S-, Ar' 为苯基或由一个或多个取代基取代的苯基, 在取代的
5 苯基中, 所述取代基选自烷基 (例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 优选甲氧基)、5-6 元杂环基-CO-、卤素、酯基、酰胺基和氰

基。优选地, Ar' 为苯基、4-甲基氨基甲酰基苯基 (—NH—) 或 4-甲酰基吗啉取代

苯基 ();

10 M 为亚苯基或由一个或多个取代基取代的亚苯基, 或化学键; 在取代的亚苯基中, 所述取代基选自烷基 (例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基)、卤代烷基 (例如卤代 C1-C6 烷基、优选卤代 C1-C4 烷基, 例如三氟甲基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 优选甲氧基)、卤素、酯基、酰胺基和氰基; 优选地, M 为卤素取代的亚苯基。

SP₁选自 C1-8 亚烷基、C1-8 亚烷基亚苯基-、C1-8 亚环烷基或 C1-21 (优选 C1-16、更优选 C1-11) 直链亚杂烷基, 所述 C1-21 直链亚杂烷基包含 1-11 个 (优选 1-6 个) 选自 N、O 或 S 的杂原子, 其中所述 C1-8 亚烷基、C1-8 亚环烷基和 C1-21 直链亚杂烷基各自独立地任选被选自羟基、氧代、氨基、磺酸基和氰基的一个或多个取代基取代;

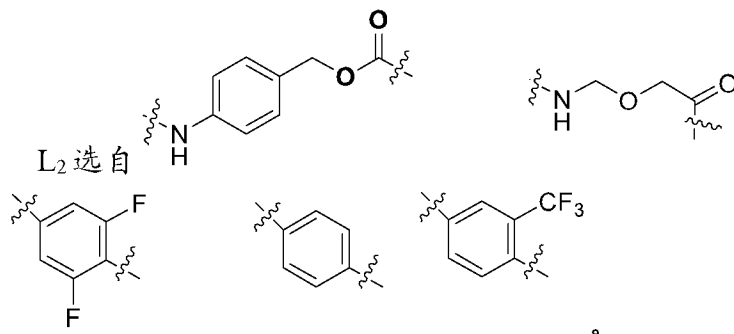
5 SP₂选自 -NH(CH₂CH₂O)_aCH₂CH₂CO-、-NH(CH₂CH₂O)_aCH₂CO-、-S(CH₂)_aCO-或化学键, 其中 a 为 1-20 的整数, 优选 1-10 的整数, 更优选 1-6 的整数;

A 表示 2-4 个氨基酸, 其中, A 表示 2 个氨基酸时, 可以为 NH-Phe-Lys-CO、NH-Val-Ala-CO、NH-Val-Lys-CO、NH-Ala-Lys-CO、NH-Val-Cit-CO、NH-Phe-Cit-CO、NH-Leu-Cit-CO、NH-Phe-Arg-CO 或 NH-Gly-Val-CO, 优选为 NH-Phe-Lys-CO、NH-Val-Ala-CO 或
 10 NH-Val-Cit-CO; A 表示 3 个氨基酸时, 可以为 NH-Glu-Val-Ala-CO、NH-Glu-Val-Cit-CO 或 NH-Ala-Ala-Ala-CO, 优选为 NH-Glu-Val-Ala-CO 或 NH-Ala-Ala-Ala-CO; A 表示 4 个氨基酸时, 可以为 NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO 或 NH-Gly-Phe-Gly-Gly-CO, 优选为 NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO。优选地, A 为 NH-Val-Ala-CO、NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO 或 NH-Ala-Ala-Ala-CO;

15

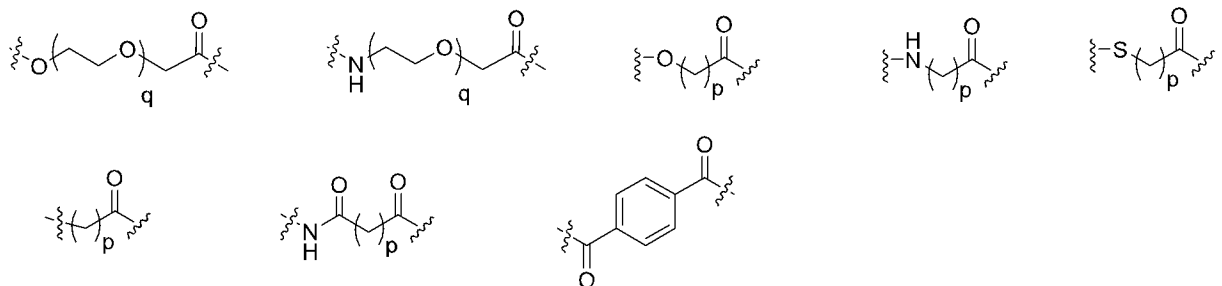
优选地, A 选自: NH-Val-Cit-CO、NH-Val-Ala-CO 和 NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO;

应当理解, A 左侧的 NH 是 A 中左侧氨基酸中氨基, A 右侧的 CO 是 A 中右侧氨基酸中的羰基。



20

在一些实施方案中, SP₁ 选自

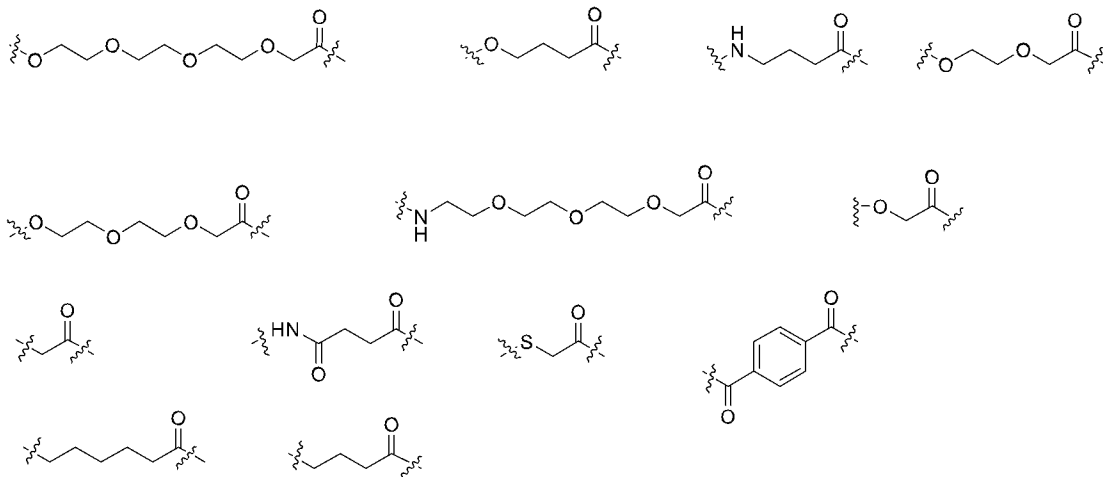


25 其中 q 为选自 1-10 的整数, 例如为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

p 为选自 1-20 的整数, 例如为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、

16、17、18、19 或 20;

在一些实施方案中, SP_1 选自

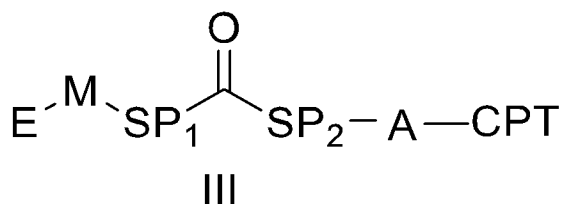


5

在一些是实施方案中, D 选自喜树碱类化合物、加利车霉素 (calicheamicin)、美登木素生物碱 (maytansinoids)、多拉司他汀 (dolastatin)、澳瑞他汀类化合物和单端孢霉素 (trichothecene)。

10 在一些是实施方案中, 所述美登木素衍生物选自 DM1、DM3 和 DM4; 所述澳瑞他汀类化合物选自 MMAE 和 MMAF; 所述喜树碱类化合物选自喜树碱、10-羟基喜树碱、依喜替康 (exatecan)、SN-38、托泊替康和喜树碱类衍生物。

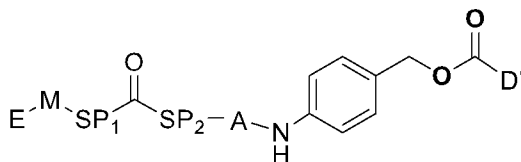
在一些实施方案中, 含药连接子为式 III 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药,



15

其中 E、M、 SP_1 、 SP_2 和 A 如上文所定义, CPT 为喜树碱类化合物。

在一些实施方案中, 含药连接子为式 III' 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药,

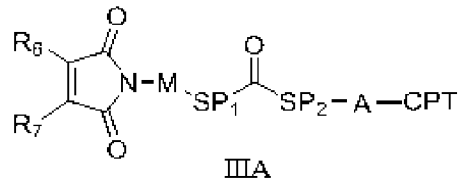


III'

20

其中 E、M、SP₁、SP₂ 和 A 如上文所定义，D' 为溴瑞他汀类化合物。

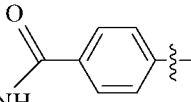
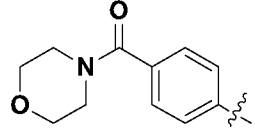
在一些实施方案中，式 III 化合物进一步为式 IIIA 化合物：



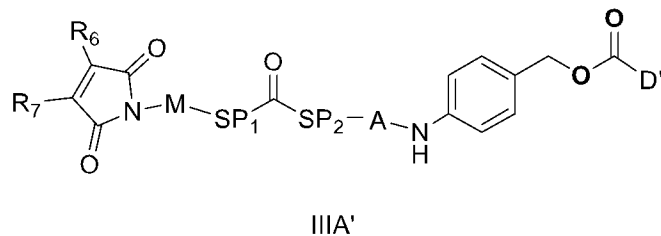
5

其中，R₆、R₇ 独立地为卤素或 Ar'S-，Ar' 为苯基或由一个或多个取代基取代的苯基，在取代的苯基中，所述取代基选自烷基（例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基）、烷氧基（例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基，优选甲氧基）、5-6 元杂环基-CO-、卤素、酯基、酰胺基和氰基。优选地，Ar' 为苯

10

基、4-甲基氨基甲酰基苯基(—NH—)或 4-吗啉代甲酰基苯基()，其中 M、SP₁、SP₂、A 和 CPT 如上文所定义。

在一些实施方案中，式 III' 化合物进一步为式 IIIA' 化合物：

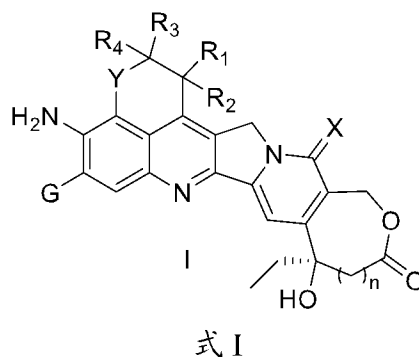


15

其中 R₆、R₇、M、SP₁、SP₂、A 和 D' 如上文所定义。

在一些实施方案中，在式 III 和式 IIIA 中，CPT 为如下式 I 或式 IA 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，以及对应的具体化合物：

20



在式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，R₁、R₂、R₃、R₄ 独立地为氢、卤素、

羟基、C1-6 烷氧基、氨基或取代氨基、C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基，或者 R₁、R₂、R₃、R₄ 中的任意两个连同它们所连接的碳原子构成 C3-6 环状烷基。当 R₁、R₂、R₃、R₄ 独立地为 C1-6 烷氧基时，所述 C1-6 烷氧基包括直链或支链的 C1-6 烷氧基，优选地为直链或支链的 C1-3 烷氧基，更优选甲氧基。当 R₁、R₂、R₃、R₄ 独立地为取代氨基时，所述取代氨基为由选自甲基和乙基的一个或多个取代基取代的氨基。当 R₁、R₂、R₃、R₄ 独立地为 C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基时，所述 C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基包括直链或支链的 C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基，并且，取代的 C1-7 烷基为由选自环丙基和环丁基的一个或多个取代基取代的 C1-7 烷基；或者，所述直链或支链的 C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基优选为 C1-3 烷基或取代的 C1-3 烷基，例如甲基、卤代甲基（优选三氟甲基）。

在式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，G 为氢、卤素、甲基或甲氧基。优选地，G 为氢、氟或氯。

在式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，Y 为氧、硫、砜、亚砜、亚甲基或取代亚甲基。取代亚甲基可以是亚甲基的一个氢被取代，也可以是两个氢同时被取代，取代基可以为苄基或烷基；当取代基为烷基时，所述烷基与 R₃ 和/或 R₄ 以及连同它们所连接的碳原子可以构成 C3-6 元并环或螺环的结构。当 Y 为取代亚甲基时，取代亚甲基的取代基优选为烷基，更优选为直链或支链的 C1-4 烷基。优选地，Y 为氧、硫、砜或亚砜；或者，优选地，Y 为氧、硫或亚甲基。

在式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，X 为氧或硫。

在式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，n=0 或 1。

在式 I 的一些实施方案中，在 R₁、R₂、R₃、R₄ 同时为氢、X 为氧、n=0 的情况下，当 Y 为亚甲基时，G 不可为氢或氟；而当 Y 为氧或硫时，G 不可为氢。

优选地，R₁、R₂、R₃、R₄ 独立地为氢、卤素（例如氟）、C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基，或者 R₁、R₂、R₃、R₄ 中的任意两个连同它们所连接的碳原子构成 C3-6 环状烷基（例如 C3-5 环状烷基）。进一步地，R₁、R₂ 可以是相同的；和/或，R₃、R₄ 可以是相同的。

优选地，Y 为由烷基取代的亚甲基，所述烷基与 R₃ 和/或 R₄ 以及连同它们所连接的碳原子可以构成 C3-6 元并环或螺环的结构。

优选地，X 可以为氧。

优选地，X 为氧，G 为氢、卤素（例如氟或氯）、甲基或甲氧基，Y 和 R₁、R₂、R₃、R₄ 如上文所定义。

优选地，X 为氧，G 为氢，Y 为亚甲基或取代亚甲基、氧或硫，R₁、R₂、R₃、R₄ 如上文所定义。

优选地，X 为氧，G 为氟，Y 为亚甲基或取代亚甲基、氧或硫，R₁、R₂、R₃、R₄ 如上文所定义。

优选地，X 为氧，G 为氯，Y 为亚甲基或取代亚甲基、氧或硫，R₁、R₂、R₃、R₄ 如上文所定义。

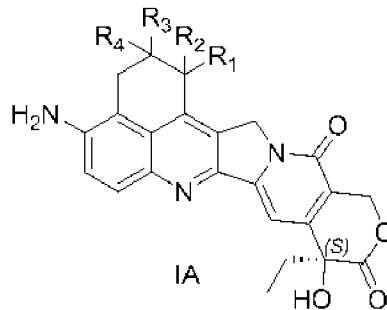
优选地，X 为氧，G 为甲基，Y 为亚甲基或取代亚甲基、氧或硫，R₁、R₂、R₃、R₄ 如上文所定义。

优选地, X 为氧, G 为甲氧基, Y 为亚甲基或取代亚甲基、氧或硫, R₁、R₂、R₃、R₄ 如上文所定义。

优选地, X 为氧, G 为氢, Y 为氧、砜或亚砜, R₁、R₂、R₃、R₄ 如上文所定义。

优选地, X 为氧, G 为氢, Y 为砜或亚砜, R₁、R₂、R₃、R₄ 如上文所定义。

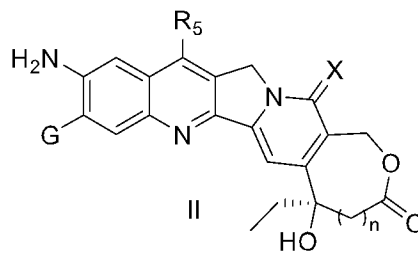
5 优选地, 式 I 所示的化合物进一步为式 IA 所示的化合物:



式 IA

式 IA 中, 基团 R₁、R₂、R₃、R₄ 与上文式 I 中基团 R₁、R₂、R₃、R₄ 的定义相同, R₁、R₂、R₃、R₄ 可以同时为氢或不同时为氢。

10 在一些实施方案中, 所述喜树碱类化合物为式 II 所示的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药:



式 II

15 在式 II 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, R₅ 为 C1-5 烷基或由一个或多个取代基取代的 C1-5 烷基、C3-6 环状烷基或由一个或多个取代基取代的 C3-6 环状烷基、苯基或取代苯基。当 R₅ 为 C1-5 烷基或取代的 C1-5 烷基时, 所述 C1-5 烷基包括直链或支链的 C1-5 烷基。进一步地, R₅ 为 C1-4 直链烷基。当 R₅ 为取代的 C1-5 烷基或取代的 C3-6 环状烷基时, 取代基选自卤素、羟基、甲氧基、三氟甲基、氨基或取代氨基、甲磺酰基和 C3-6 环状烷基; 并且其中, 取代氨基为由选自甲基和乙基的一个或多个取代基取代的氨基。当 R₅ 为取代苯基
20 时, 取代基选自烷基 (例如 C1-6 烷基、优选 C1-3) 或卤素。

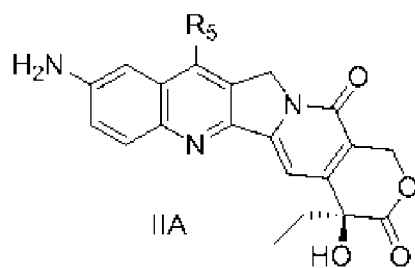
在式 II 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, G 为氢、卤素 (例如氟)、甲基或甲氧基。优选地, G 为氢、氟或氯。

式 II 中, X 为氧或硫。

式 II 中, n=0 或 1。

25 优选地, 式 II 中, 当 X 为氧、G 为氢、n=0 时, R₅ 不可为正丁基。

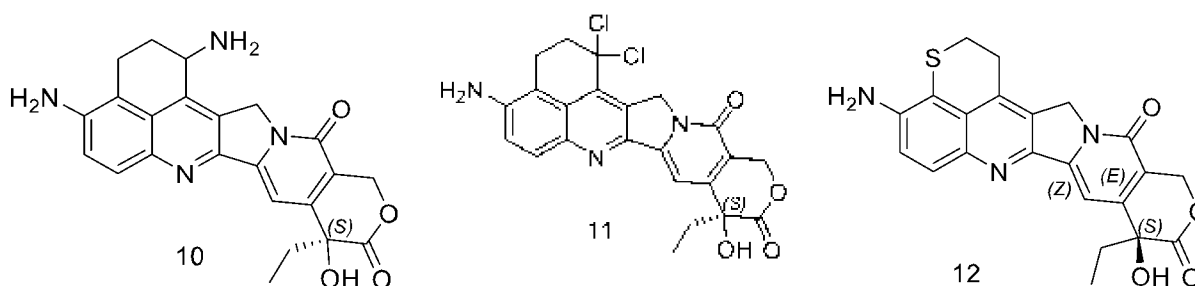
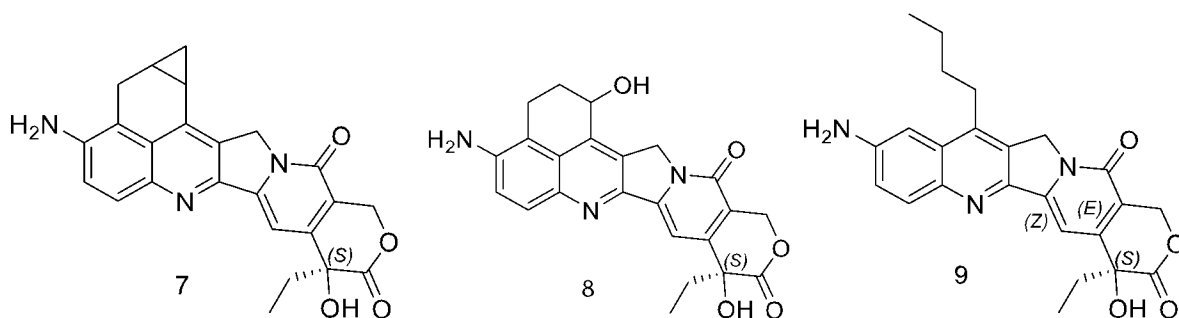
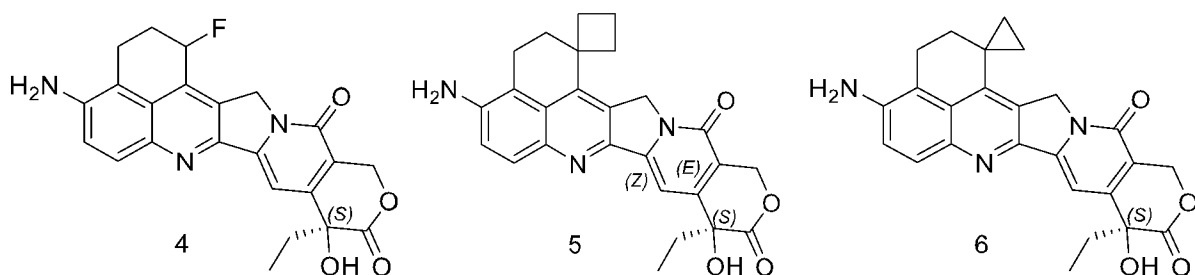
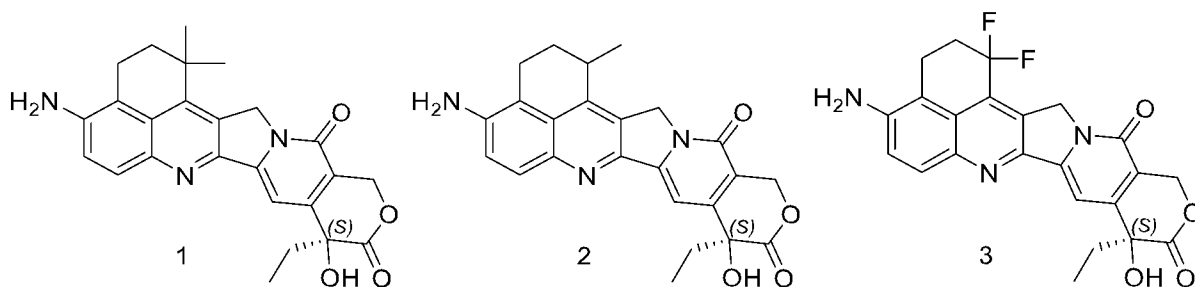
优选地, 式 II 所示的化合物进一步为式 IIA 所示的化合物:

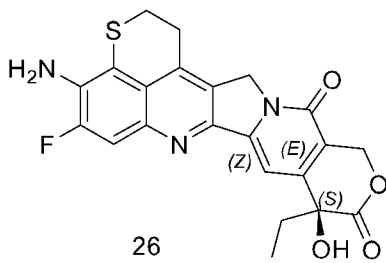
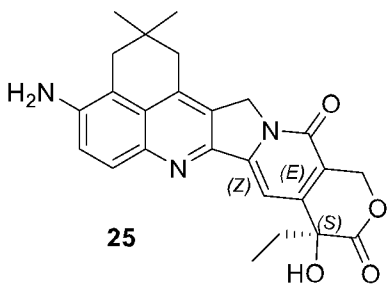
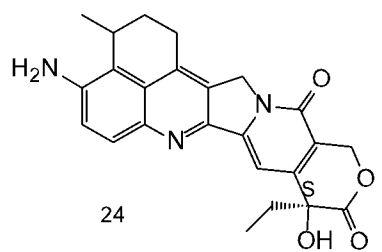
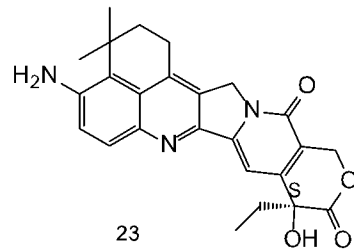
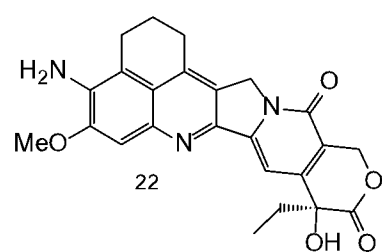
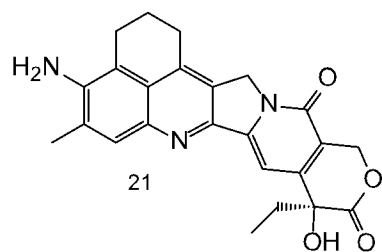
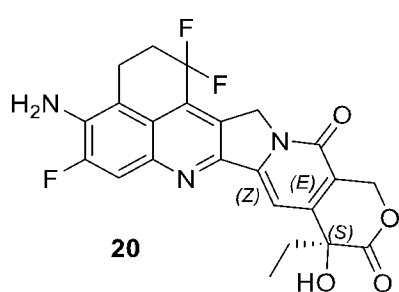
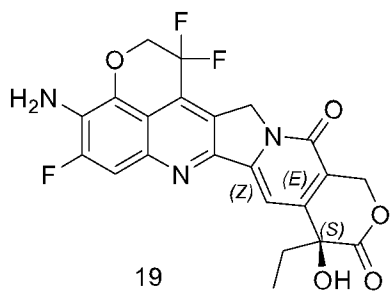
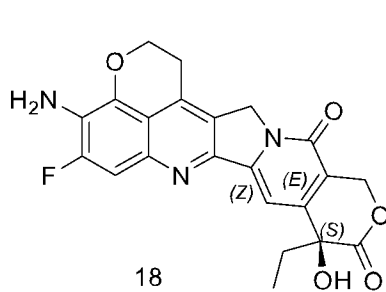
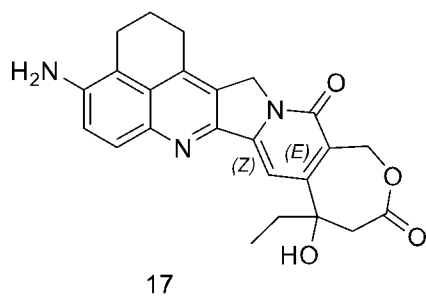
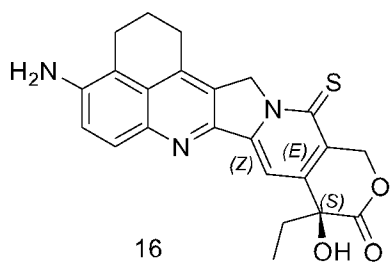
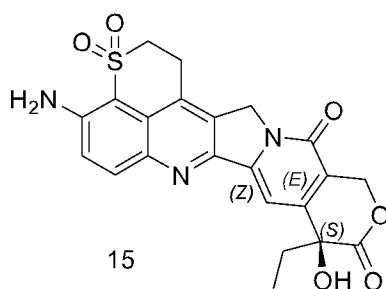
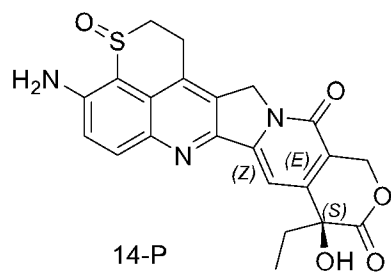
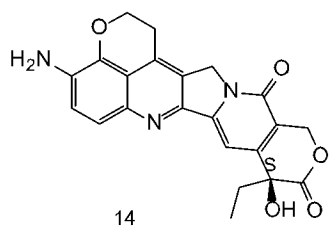
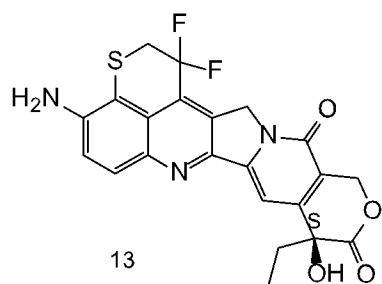


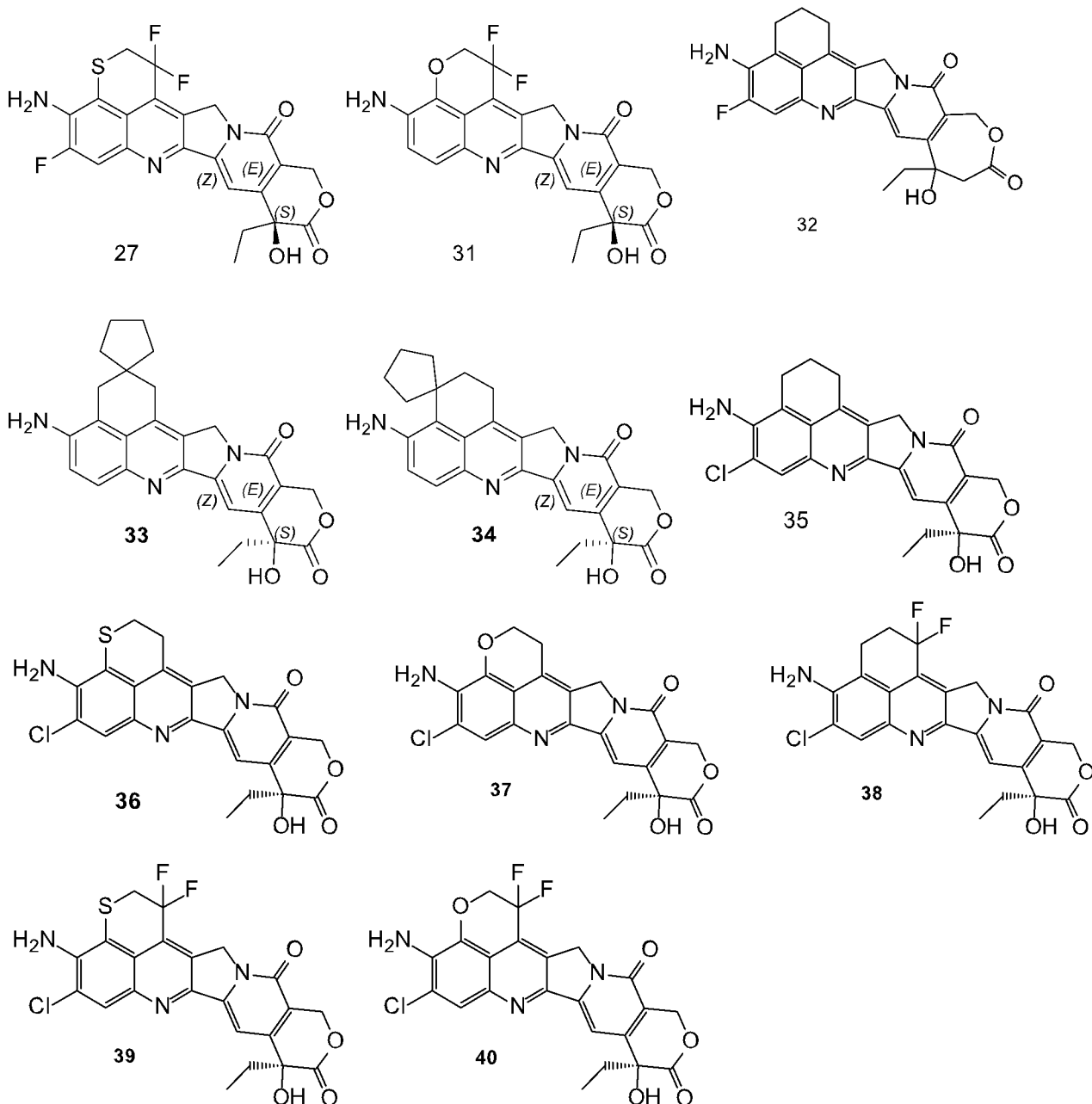
式 IIA

式 IIA 中, 基团 R_5 与上文式 II 中基团 R_5 的定义相同, 在一些实施方案中, R_5 不可为正丁基, 在一些实施方案中, R_5 可为正丁基。

5 在一些实施方案中, 所述喜树碱类化合物 (CPT) 具有如下结构:







5

在式 III 和式 IIIA 中，式 I 或式 IA 所示的化合物经由其氨基（分别参见式 I 或式 IA）与 A 的羧基通过酰胺键相连，即在式 I 或式 IA 所示化合物的氨基与式 III 或 IIIA 中 A 的羧基形成了酰胺键。

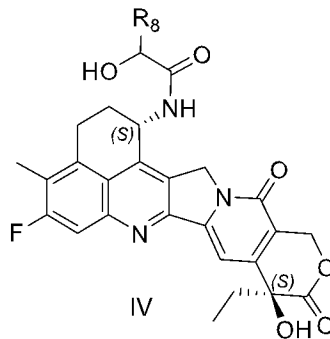
又如，在式 III 和式 IIIA 中，CPT 式 II 或式 IIA 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，以及对应的具体化合物。

在式 III 和式 IIIA 中，式 II 或式 IIA 所示的化合物经由其氨基（分别参见式 II 或式 IIA）与 A 的羧基通过酰胺键连接，即式 II 或式 IIA 所示化合物的氨基与式 III 或 IIIA 中 A 的羧基形成酰胺键。

上文提出的化合物 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、14-P、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40 或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药均可用作式 III 中的“CPT”，并通过其

氨基与式 III 或 IIIA 中 A 的羧基通过酰胺键连接。

又如，在式 III 和式 IIIA 中，CPT 可以为式 IV 所示的依喜替康（exteacan）衍生物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药：

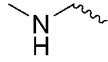
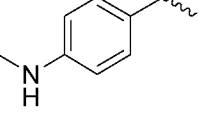


式 IV

在式 IV 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，R₈ 为氢、三氟甲基、C1-5 烷基或由一个或多个取代基取代的 C1-5 烷基、C3-6 环状烷基或由一个或多个取代基取代的 C3-6 环状烷基、或卤素。

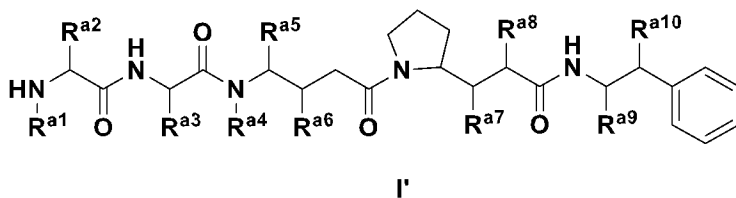
当 R₈ 为取代的 C1-5 烷基或取代的 C3-6 环状烷基时，所述取代基选自卤素、羟基、甲氧基、三氟甲基、氨基或取代氨基、甲磺酰基和 C3-6 环状烷基；并且其中，取代氨基为由选自甲基和乙基的一个或多个取代基取代的氨基。

在式 III 和式 IIIA 中，式 IV 所示的化合物经由其与 R₈ 连接于同一个碳的羟基（参见式

IV）与 A 的羧基通过自释放结构相连，该自释放结构例如（ 或 ），实线表示与式 III 或式 IIIA 中 A 的羧基连接的位点，波浪线表示与式 IV 中羟基连接的位点。

特别地，对于式 IIIA 所示的化合物，当 R₆、R₇ 为 Ar'S 时，M 优选为亚苯基或取代的亚苯基，同时 SP1 为 C1-21（优选 C1-16、更优选 C1-11）直链亚杂烷基，所述直链亚杂烷基包含 1-11 个（优选 1-6 个）选自 N、O 或 S 的杂原子。

在一些实施方案中，在式 III' 和式 IIIA' 中，D' 为如下式 I' 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，以及对应的具体化合物：



I'

其中 R^{a1}、R^{a2}、R^{a3}、R^{a4}、R^{a5} 和 R^{a8} 各自独立的选自 C₁₋₈ 烷基；优选 C₁₋₄ 烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

R^{a6} 和 R^{a7} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷氧基，例如甲氧基、乙氧基或丙氧基；

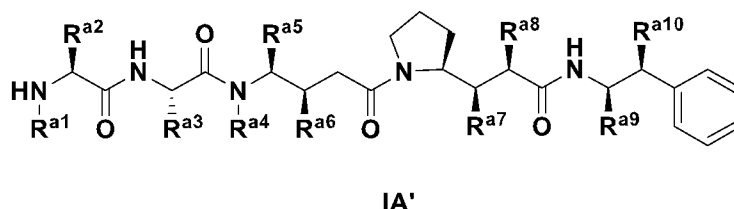
R^{a9} 选自 C₁₋₈ 烷基和 COOH；优选 C₁₋₄ 烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、

异丁基或仲丁基;

R^{a10} 选自 OH 和 H。

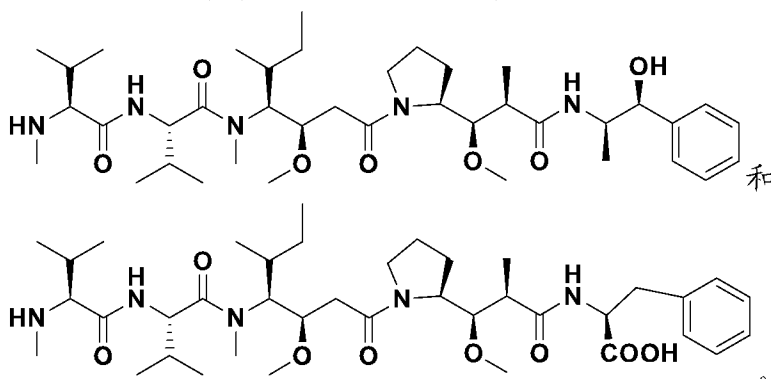
在一些实施方案中, 式 I' 化合物进一步为式 IA' 化合物:

5



其中 R^{a1} - R^{a10} 如上文所定义;

在一些实施方案中, 式 I' 化合物选自:

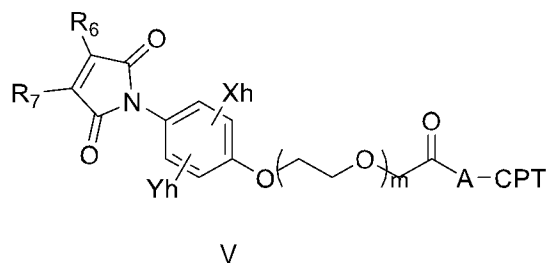


10

在 III' 和式 IIIA' 中, 式 I' 所示的化合物经由其氨基与 A 的羧基通过酰胺键连接, 即式 I' 所示化合物的左侧仲氨基与式 III' 或 IIIA' 中 A 的羧基形成酰胺键。

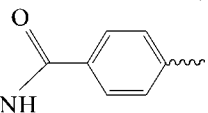
15

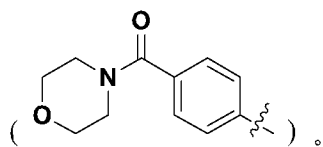
在一些实施方案中, 式 III 和式 IIIA 所示的化合物进一步为式 V 所示的化合物。



式 V

式 V 中, R_6 、 R_7 独立地为 $Ar'S$, Ar' 为苯基或由一个或多个取代基取代的苯基, 在取代的苯基中, 取代基选自烷基 (例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 优选甲氧基)、5-6 元杂环基-CO-、卤素、酯基、酰胺基和氰基。

优选地, Ar' 为苯基、4-甲基氨基甲酰基苯基 (—NH—) 或 4-吗啉代甲酰基苯基



式 V 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, Xh 和 Yh 独立地为氢、卤素、卤代烷基 (例如卤代 C1-C6 烷基、优选卤代 C1-C4 烷基, 例如三氟甲基) 或烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 例如甲氧基)。

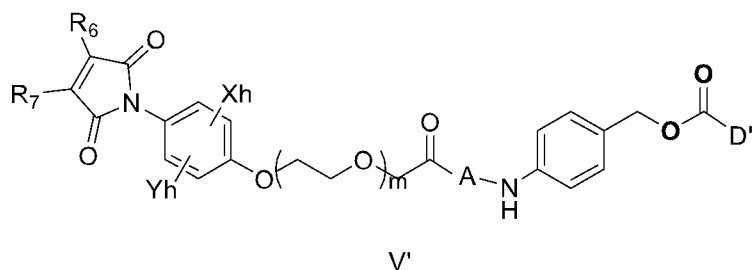
5 式 V 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, m 为 1~10、优选 1~5、更优选 3-5 中任一整数。

式 V 中, A 表示 2-4 个氨基酸, 如上文所定义。

式 V 中, CPT 的定义及其在式 V 中的连接关系与式 III 和式 IIIA 中 CPT 相同, 如上文所定义。

10

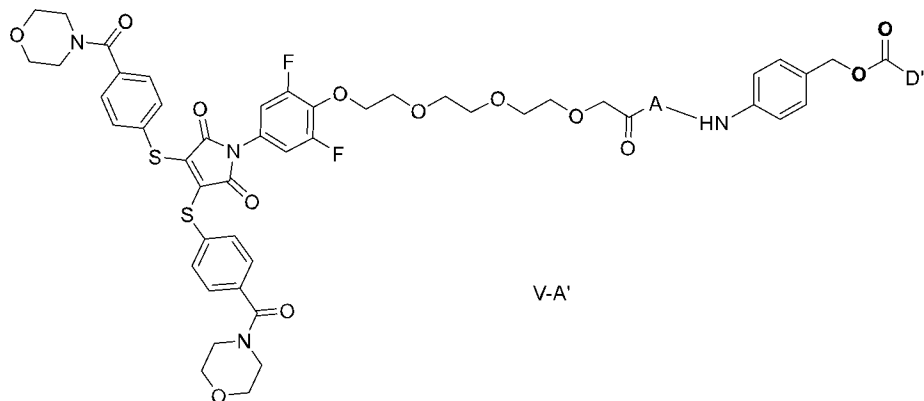
在一些实施方案中, 式 IIIA' 化合物进一步为式 V' 化合物,



其中 R⁶、R⁷、Xh、Yh、m 和 A 如上文(尤其式 V)所定义, D' 如上文所定义。

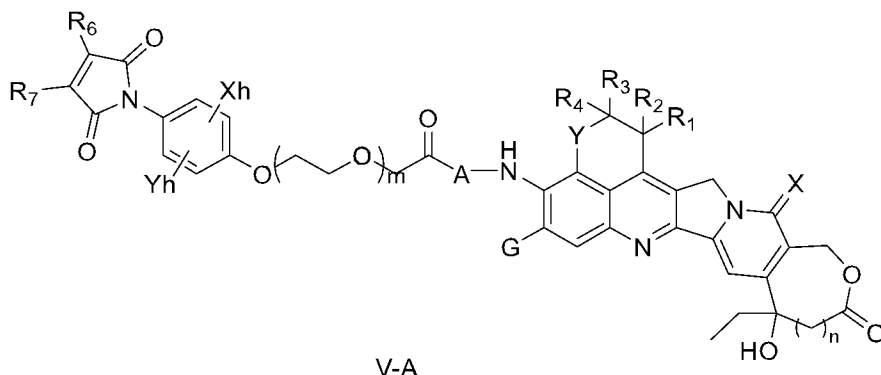
15

在一些实施方案中, 式 V' 化合物进一步为式 V-A' 化合物,



其中 A 和 D' 如上文所定义。

在一些实施方案中, 式 V 所示的化合物进一步为式 V-A 所示的化合物:



式 V-A

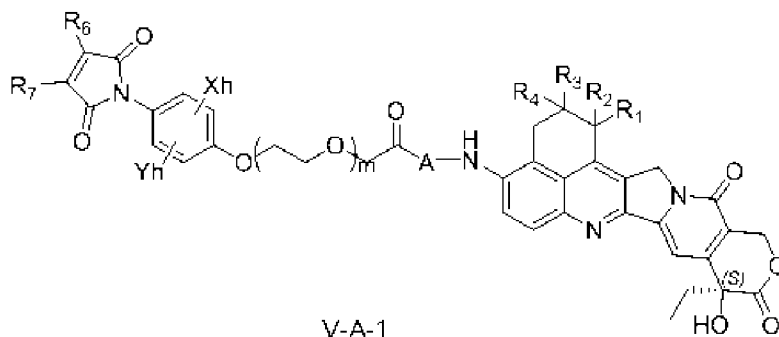
式 V-A 中, 基团 A、G、Y、R₁、R₂、R₃、R₄、X、n 与上文式 III 或式 IIIA 中基团 A、G、Y、R₁、R₂、R₃、R₄、X、n 的定义相同。

5 优选地, 式 V-A 中, G 为氢、氟或氯。

优选地, 式 V-A 中, Y 为亚甲基、硫或氧。

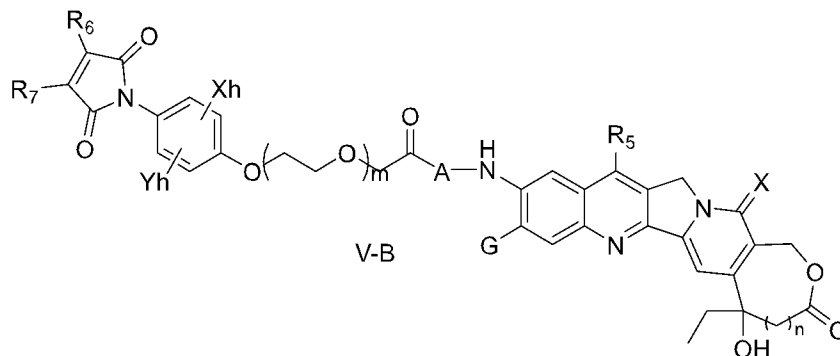
式 V-A 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, “-A-NH-”表示所示氨基与 A 中的羧基形成酰胺键。

在一些实施方案中, 式 V-A 所示的化合物进一步为式 V-A-1 所示的化合物:



式 V-A-1

或者, 式 V 所示的化合物进一步为式 V-B 所示的化合物:

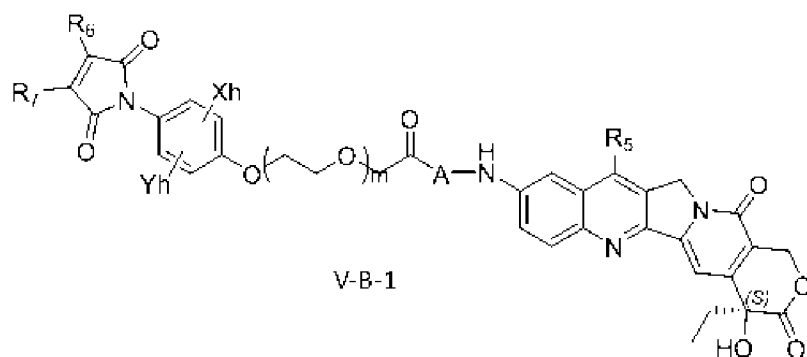


式 V-B

15 式 V-B 中, 基团 A、G、R₅、X、n 与上文式 III 或式 IIIA 中基团 A、G、R₅、X、n 的定义相同。

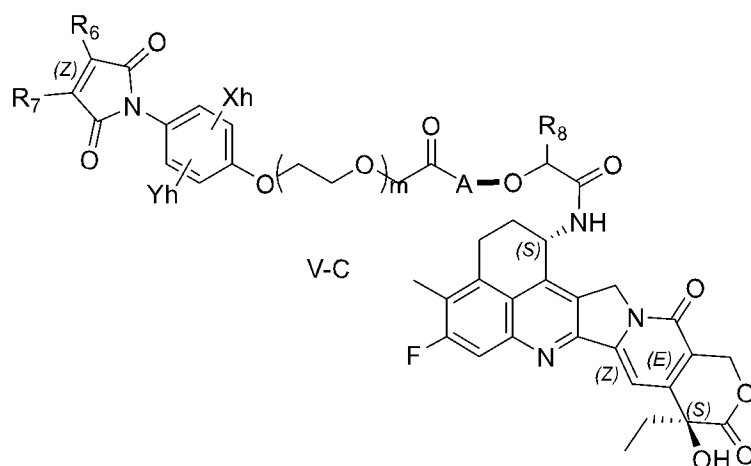
式 V-B 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, “-A-NH-”表示所示氨基与 A 中的羧基形成酰胺键。

优选地，式 V-B 所示的化合物进一步为式 V-B-1 所示的化合物：



式 V-B-1

或者，式 V 所示的化合物进一步为式 V-C 所示的化合物：



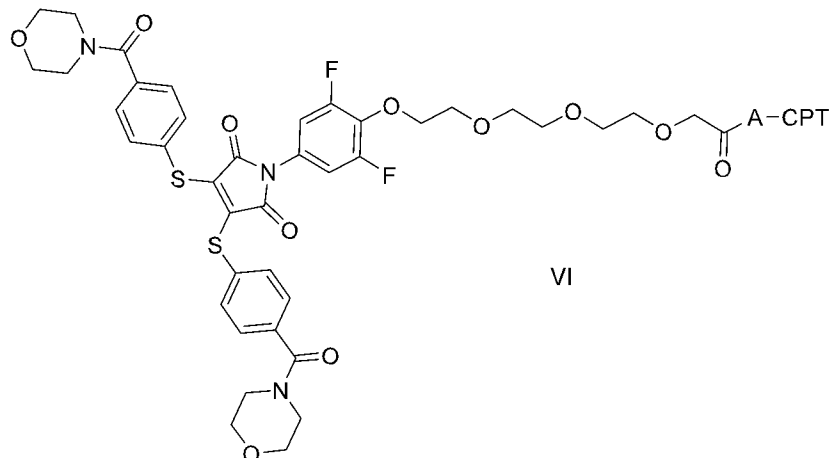
式 V-C

式 V-C 中，基团 A、R₈ 与上文式 III 或式 IIIV 中基团 A、R₈ 的定义相同。

式 V-C 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，“-A-NH-”表示所示氨基与 A 中的羧基形成酰胺键。

10 式 V-C 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，“—”与上文式 III 或式 IIIV 中的 CPT 为式 IV 时的自释放结构相同。

根据本发明的具体实施方式，式 V 所示的化合物进一步为式 VI 所示的化合物：

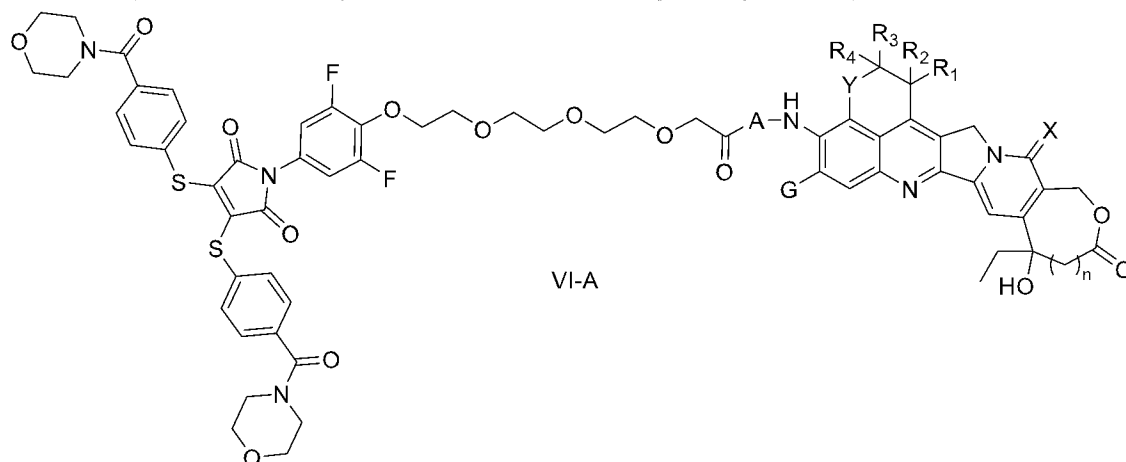


式 VI

式 VI 中, A 表示 2-4 个氨基酸, 如上文所定义。

式 VI 中, CPT 为喜树碱类化合物。CPT 的定义及其在式 VI 中的连接关系与式 III 和式 IIIA 中 CPT 相同, 如上文所定义。

优选地, 本发明提供的式 VI 所示的化合物进一步为式 VI-A 所示的化合物:



VI-A

式 VI-A

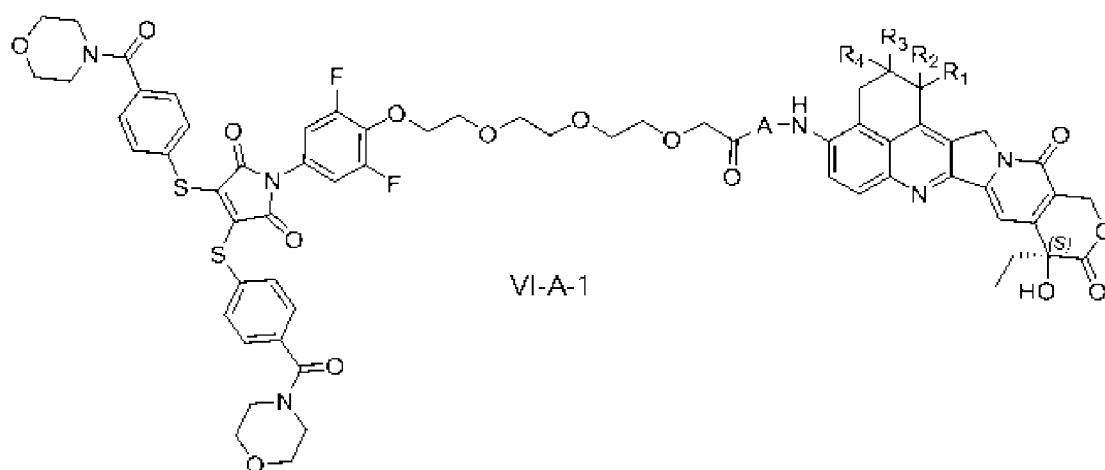
式 VI-A 中, 基团 A、G、Y、R₁、R₂、R₃、R₄、X、n 与上文式 III 或式 IIIA 中基团 A、G、Y、R₁、R₂、R₃、R₄、X、n 的定义相同。

优选地, 式 VI-A 中, G 为氢、氟或氯。

优选地, 式 VI-A 中, Y 为亚甲基、硫或氧。

式 VI-A 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, “-A-NH-”表示所示氨基与 A 中的羧基形成酰胺键。

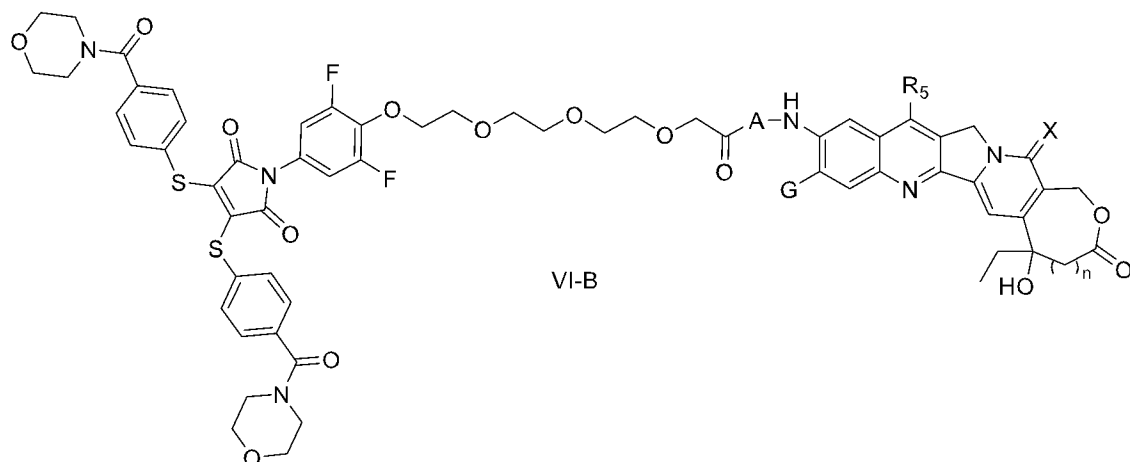
优选地, 式 VI-A 所示的化合物进一步为式 VI-A-1 所示的化合物:



VI-A-1

式 VI-A-1

或者, 式 VI 所示的化合物进一步为式 VI-B 所示的化合物:



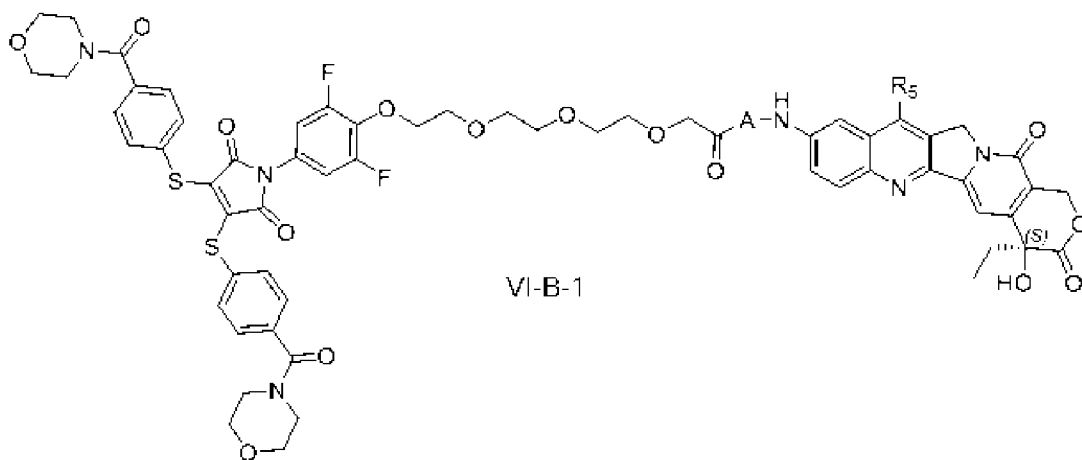
VI-B

式 VI-B

式 VI-B 中，基团 A、G、R₅、X、n 与上文式 III 或式 IIIA 中基团 A、G、R₅、X、n 的定义相同。

- 5 式 VI-B 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，“-A-NH-”表示所示 CPT 中的氨基与 A 中的羧基形成酰胺键。

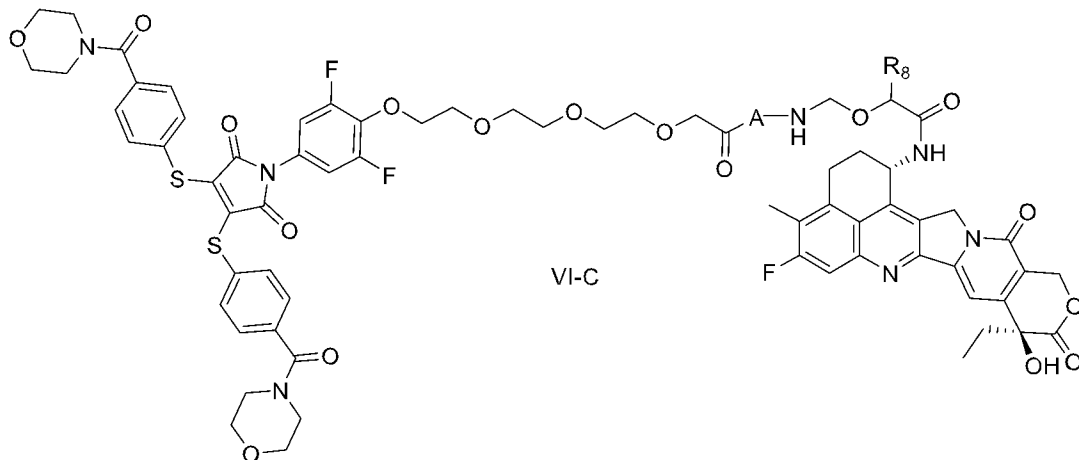
更优选地，式 VI-B 所示化合物进一步为式 VI-B-1 所示的化合物：



VI-B-1

式 VI-B-1

- 10 或者，式 VI 所示的化合物进一步为式 VI-C 所示的化合物：

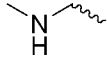


VI-C

式 VI-C

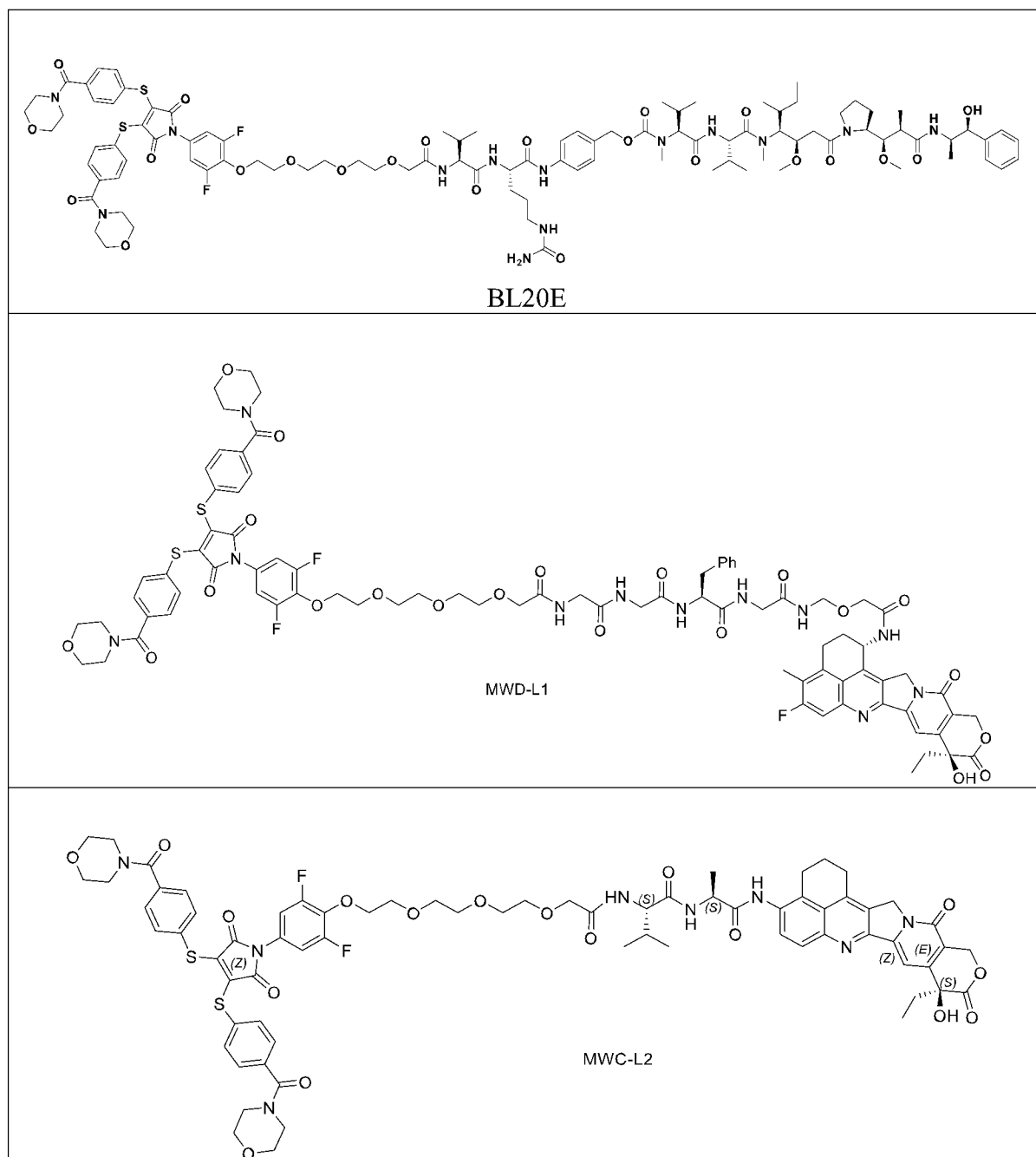
式 VI-C 中, 基团 A、R₈ 的定义与上文式 III 或式 IIIA 中基团 A、R₈ 的定义相同。

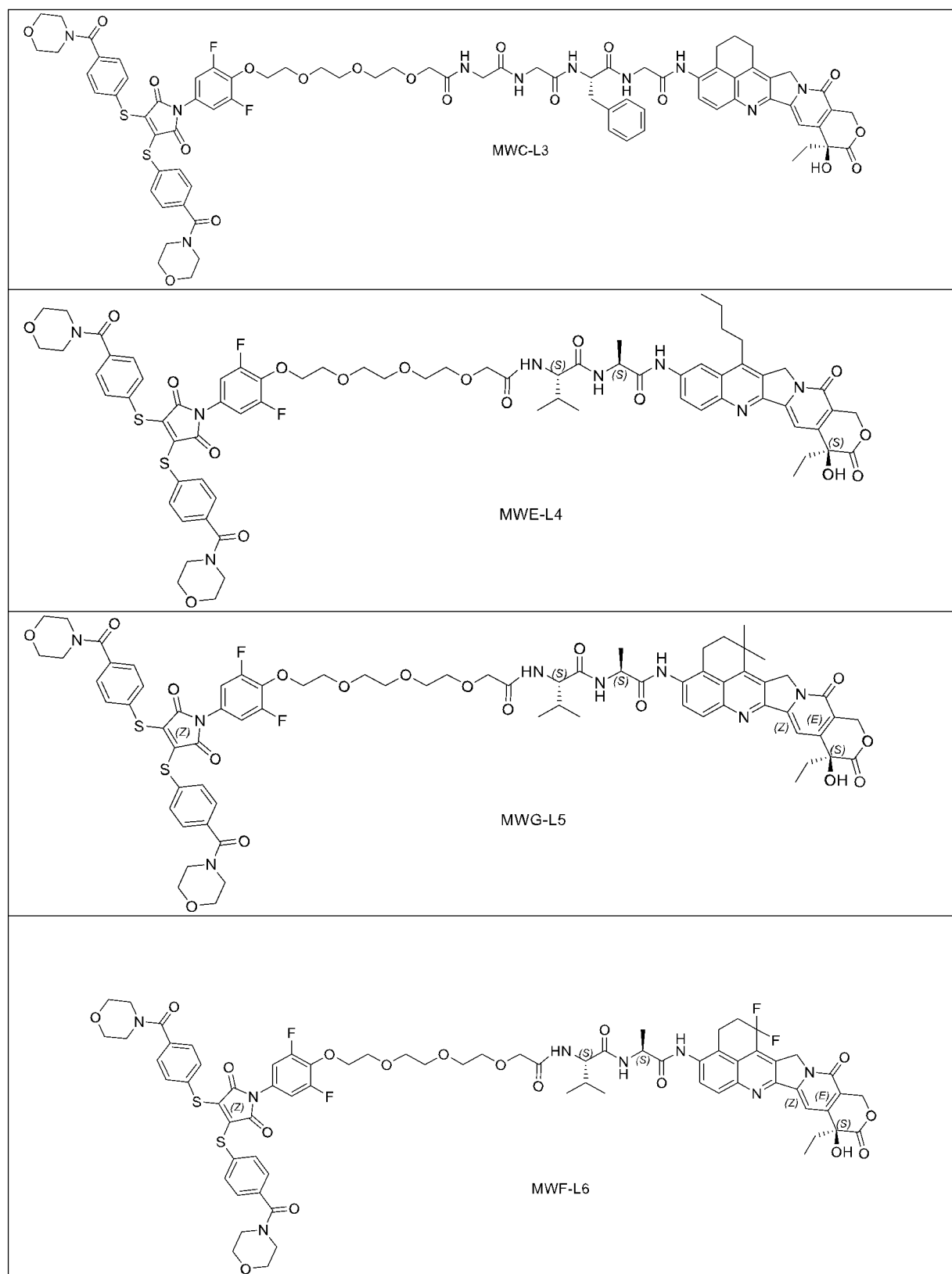
式 VI-C 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, “-A-NH-”表示所示氨基与 A 中的羧基形成酰胺键。

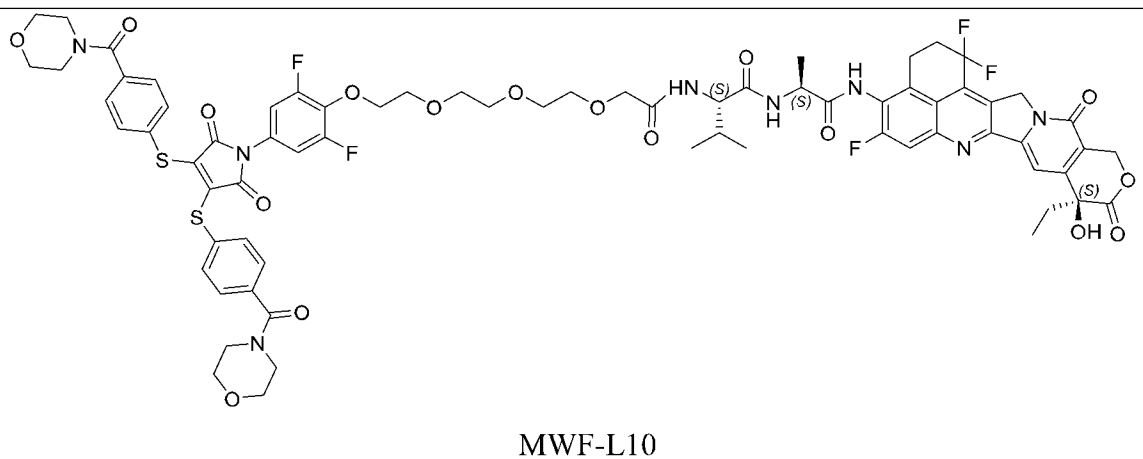
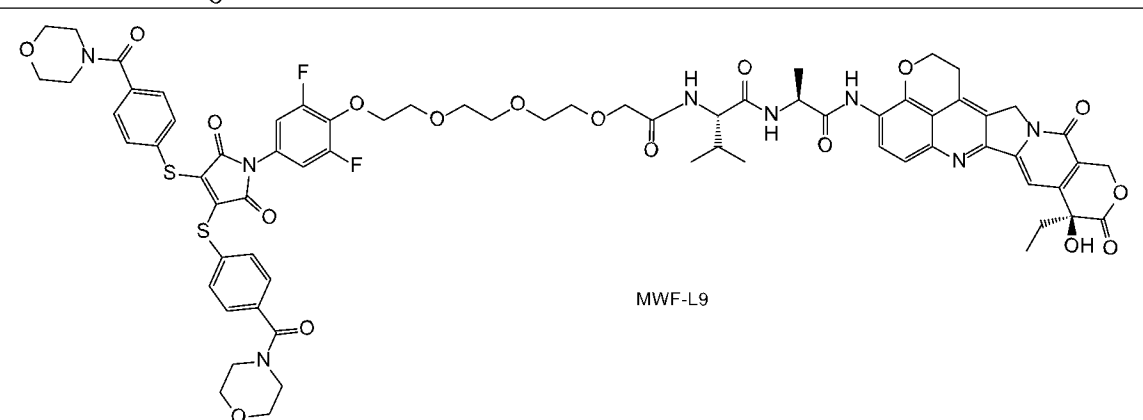
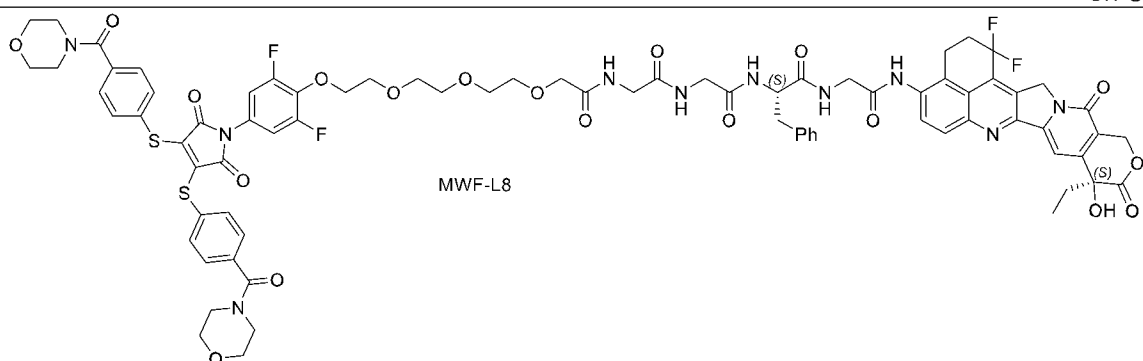
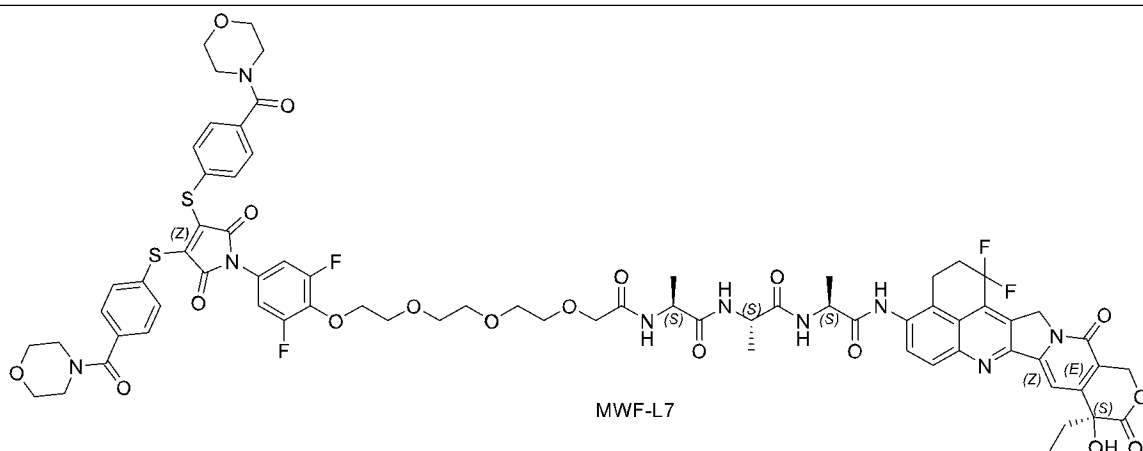
当式 V-C 中自释放结构为  时, 式 V-C 可进一步如式 VI-C 所示结构。

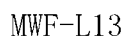
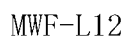
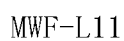
5

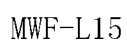
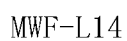
在一些实施方案中, 所述含药连接子选自以下结构:

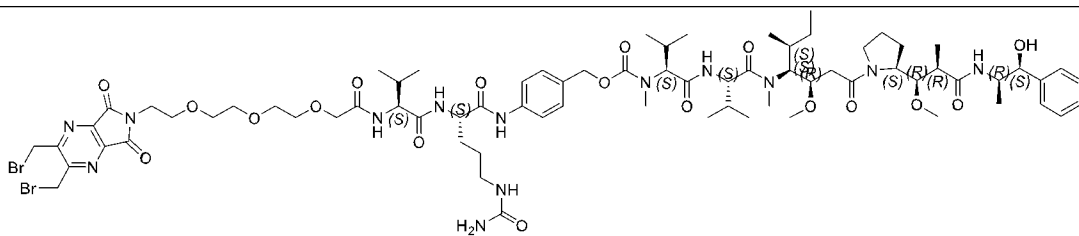
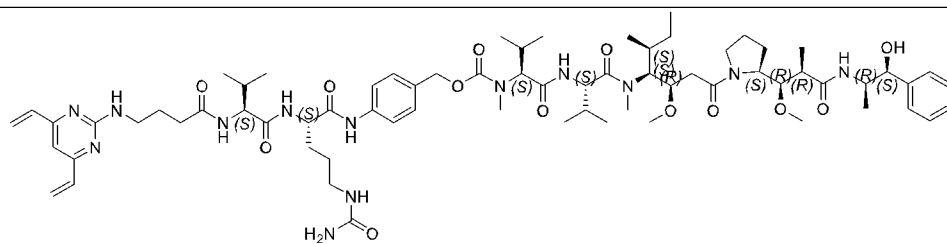
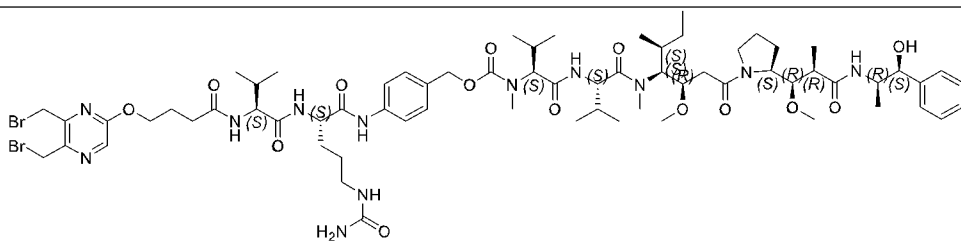
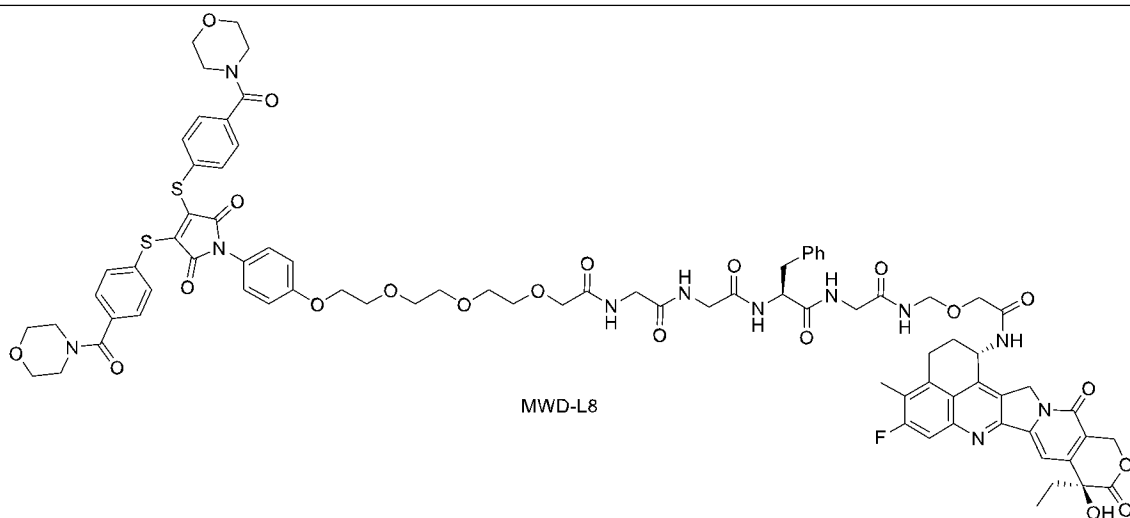


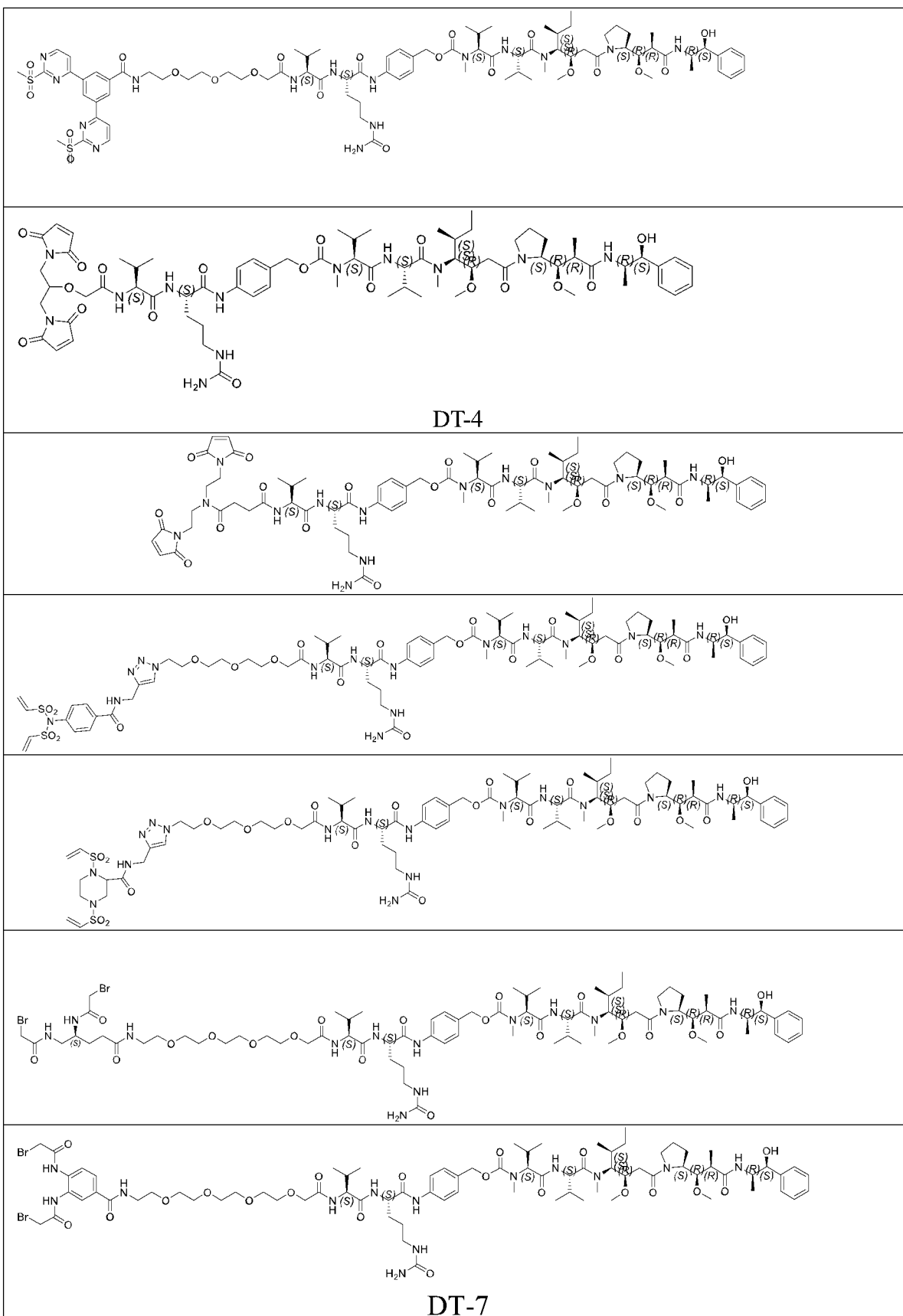


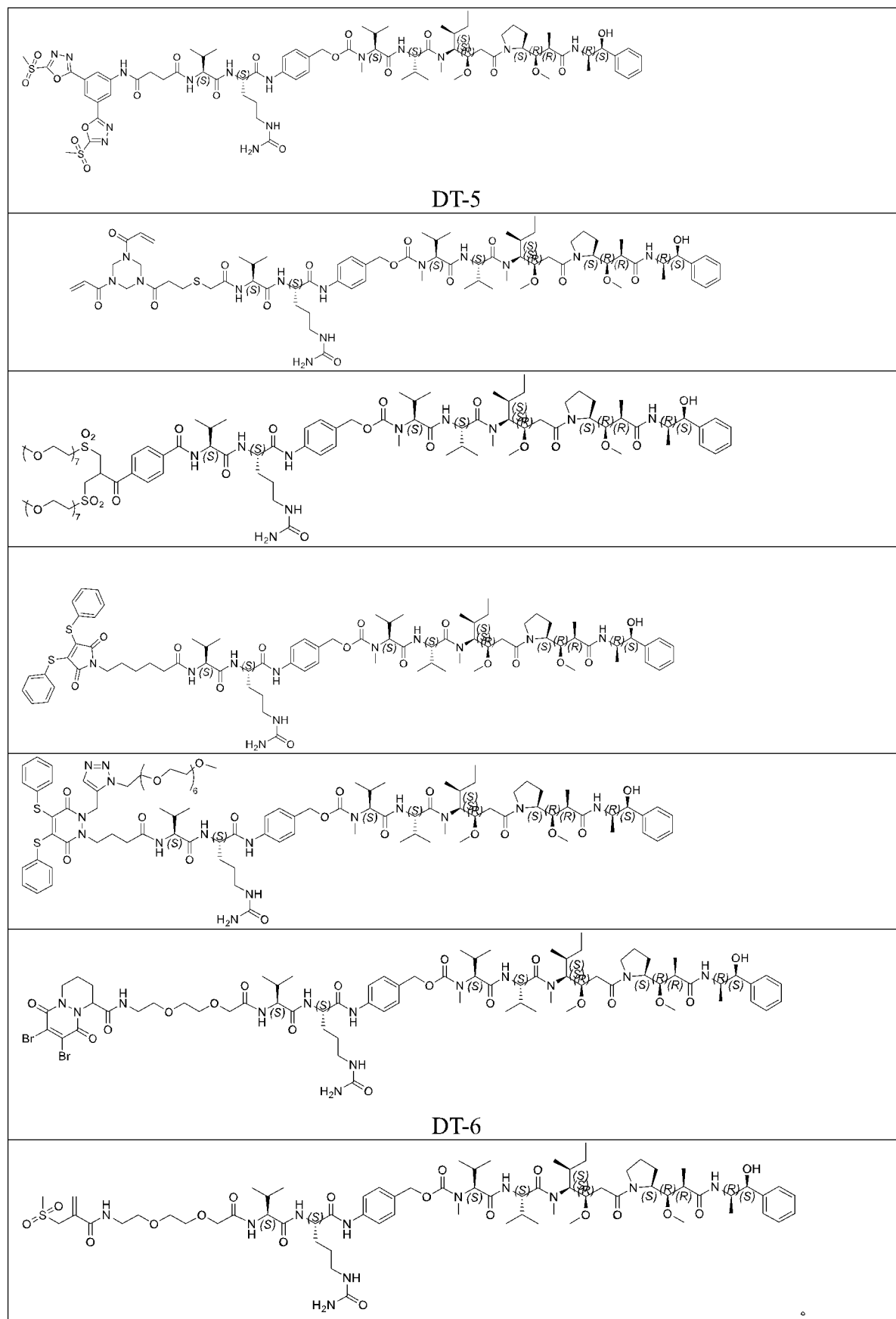












应当理解，本发明还涉及本发明实施例中公开的具体方法。另外，本发明具体实施例中某些技术特征用上述实施方案中的技术特征替换或组合后得到的技术方案也在本发明的考虑

中。

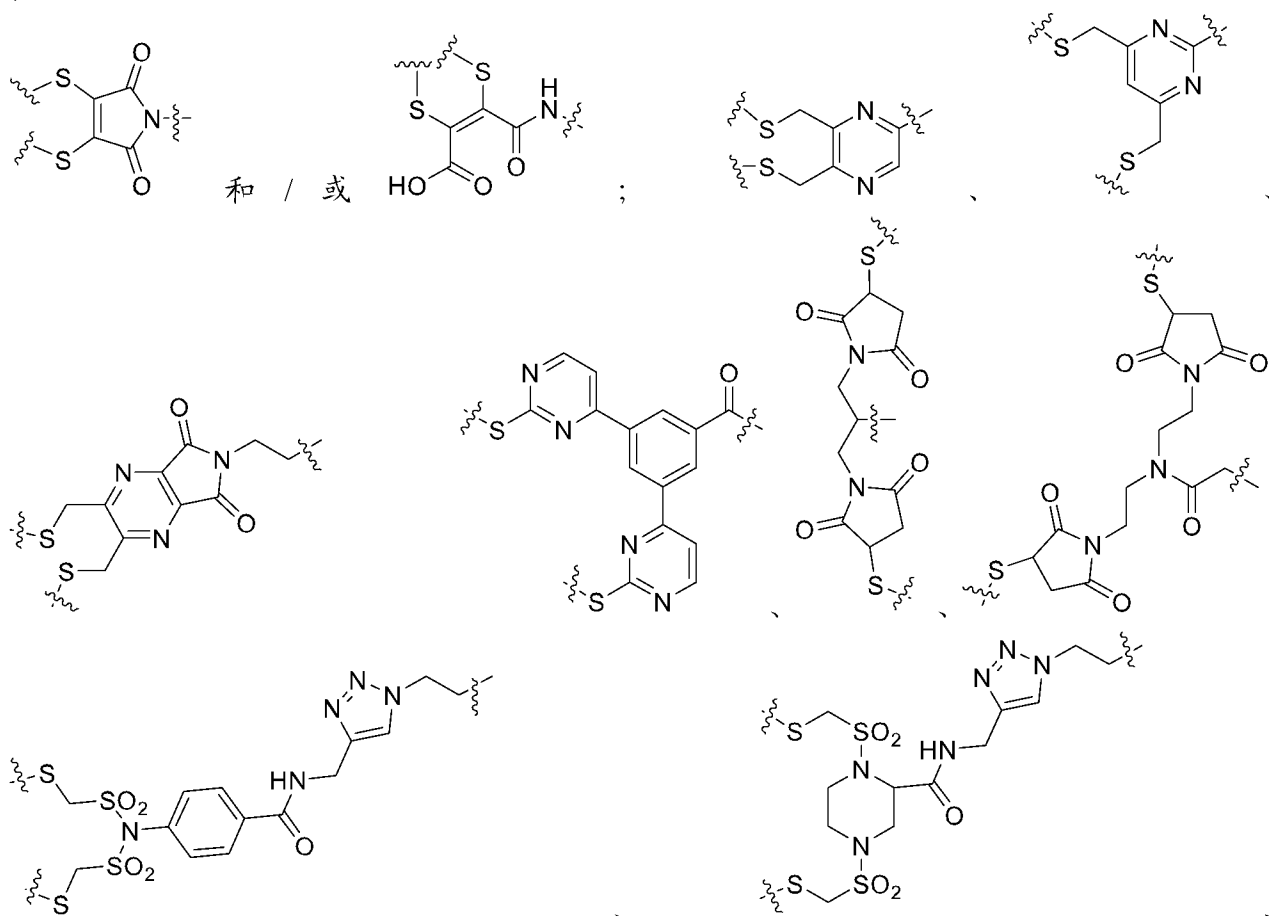
本发明中的一些小分子药物、含药连接子和/或其中间体、和/或抗体-药物偶联物等记载于中国专利申请 202211627164.8 中，将该专利申请以其全部内容引入本申请中作为本申请内容的一部分。

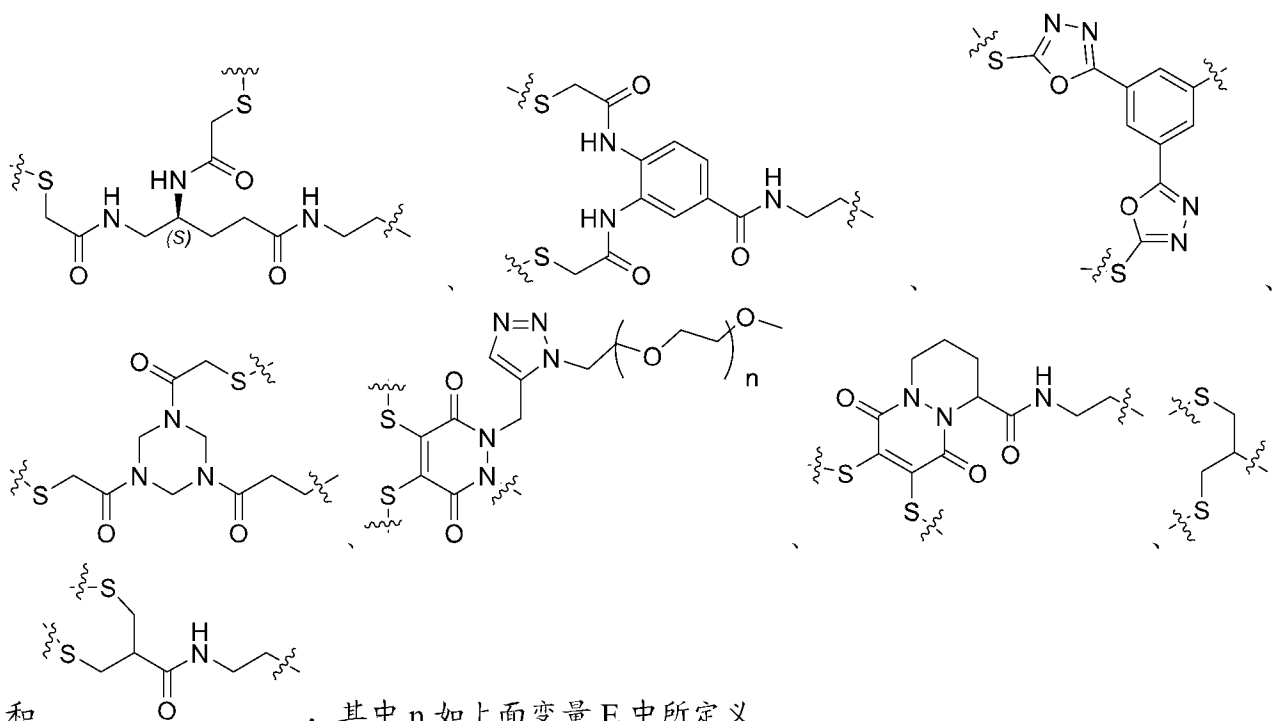
- 5 以上制备方法的各步骤彼此相互关联、相互作用产生了提高 DAR2-ADC 偶联物纯度的技术效果，该技术效果是各步骤作为整体所产生的。

第二方面

- 10 本发明提供了抗体药物偶联物，其具有通式 $(\text{mAb})^* \left[\text{E}_L - \text{M} - \text{SP}_1 - \text{CO} - \text{SP}_2 - \text{A} - \text{L}_2 - \text{D} \right]_y$ 所示结构，其中 mAb 表示抗体或抗体片段，例如上文定义的抗体，基团 M、SP₁、SP₂、A、L₂ 及 D 如上文第一方面中所定义。y 为 1~10、优选 1~8（例如 1~5）、更优选 1~3，最优选 2。

其中，E_L 选自如下基团，其中， $\sim\text{S}$ 表示与 mAb 中半胱氨酸相连，另外的带有 $\sim$ 的键表示与 M 相连：





和 $\text{O}=\text{O}$ ，其中 n 如上面变量 E 中所定义。

在所述通式结构中，mAb可以是IgG型抗体或其片段，优选为的IgG1亚型抗体或其片段。

5

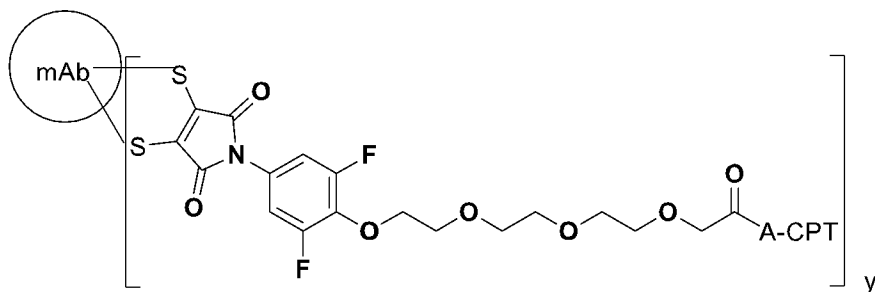
在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物是通过第一方面所述的本发明的方法制备的。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物具有约 2 的平均 DAR。

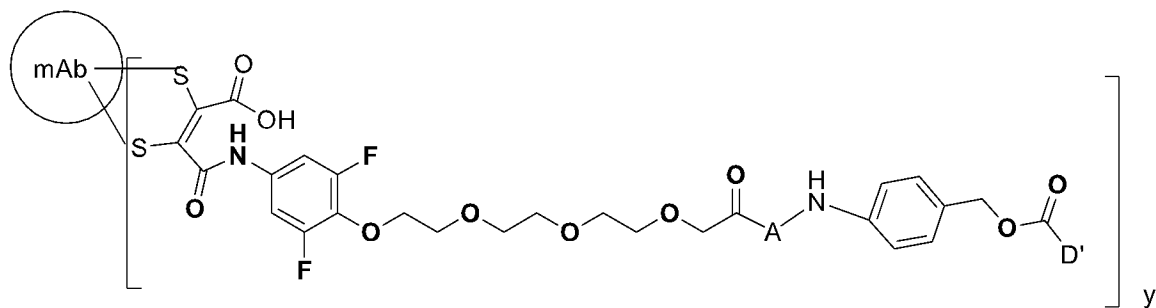
10 在一些实施方案中,所述抗体药物偶联物(DAR2-ADC)具有大于 90%的纯度,例如大于 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%的纯度,所述纯度例如通过 HIC-HPLC 测得。

在一些实施方案中,所述抗体药物偶联物具有如下通式 VII、VII'、VIII、VIII' 所示的结

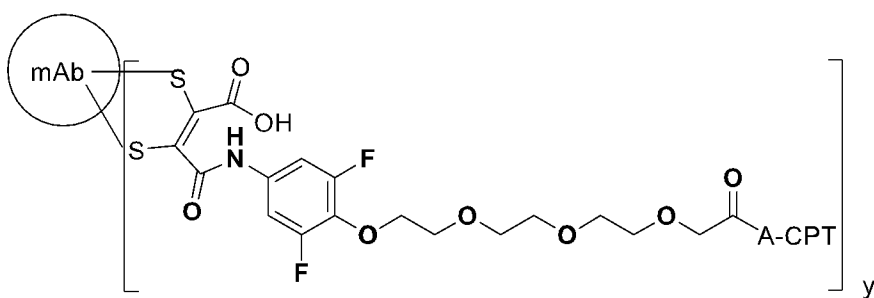
15 构:



通式 VII



通式 VII'



通式 VIII

和/或

其中 y 为 1~10、优选 1~8（例如 1~5）、更优选 1、2 或 3。

其中，基团 A、CPT、D' 与上文第一方面中定义相同。

第三方面

在第三方面，本发明提供了本发明第一方面的制备方法中所述的小分子药物、含药连接子 15 子和/或其中间体（包括但不限于式 A-I、I、I'、I-A、IA'、II、II-A、III、III'、III-A、III-A'、V、V-A、V-A-1、V-B、V-B-1、V-C、VI、VI-A、VI-A-1、VI-B、VI-B-1、VI-C），优选地包括但不限于实施例公开的化合物。

第四方面

本发明提供了药物组合物，其包含本发明第一至第三方面述及的小分子药物、含药连接子 20 子、其中间体和/或抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药。

在一些实施方案中，所述药物组合物为液体制剂或冻干制剂。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含缓冲剂、稳定剂和表面活性剂。

第五方面

本发明提供根据本发明的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药、抗体药物偶联物或药物组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

优选地，所述肿瘤为癌症。优选地，所述肿瘤与肿瘤相关抗原例如 HER2、B7H3、HER3、
5 CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD45、CD56、CD66e、CD70、CD74、CD73、
CD79b、CD138、CD147、CD223、EpCAM、粘蛋白 1 (Mucin 1)、STEAP1、GPNMB、FGF2、
FOLR1、EGFR、EGFRvIII、组织因子(Tissuefactor)、c-MET、FGFR、Nectin 4、AGS-16、鸟
苷酸环化酶 C (Guanylyl cyclase C)、间皮素(Mesothelin)、SLC44A4、PSMA、EphA2、AGS-5、
GPC-3、c-KIT、RoR1、PD-L1、CD27L、5T4、Mucin16、NaPi2b、STEAP、SLITRK6、ETBR、
10 BCMA、Trop-2、CEACAM5、SC-16、SLC39A6、Delta-like protein3、Claudin 18.2 阳性或高
表达相关。

优选地，所述肿瘤为结肠直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、胰腺癌、肝癌、卵巢癌、子宫内膜
癌、输卵管癌、胃癌、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、食道鳞状细胞癌、头颈部鳞
状细胞癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤。

第六方面

本发明提供采用根据本发明的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药、
抗体药物偶联物或药物组合物治疗肿瘤的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用所
述化合物或抗体药物偶联物。

优选地，所述肿瘤为癌症。优选地，所述肿瘤与肿瘤相关抗原例如 HER2、B7H3、HER3、
20 CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD45、CD56、CD66e、CD70、CD74、CD73、
CD79b、CD138、CD147、CD223、EpCAM、粘蛋白 1 (Mucin 1)、STEAP1、GPNMB、FGF2、
FOLR1、EGFR、EGFRvIII、组织因子(Tissuefactor)、c-MET、FGFR、Nectin 4、AGS-16、鸟
苷酸环化酶 C (Guanylyl cyclase C)、间皮素(Mesothelin)、SLC44A4、PSMA、EphA2、AGS-5、
GPC-3、c-KIT、RoR1、PD-L1、CD27L、5T4、Mucin16、NaPi2b、STEAP、SLITRK6、ETBR、
25 BCMA、Trop-2、CEACAM5、SC-16、SLC39A6、Delta-like protein3、Claudin 18.2 阳性或高
表达相关。

优选地，所述肿瘤为结肠直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、胰腺癌、肝癌、卵巢癌、子宫内膜
癌、输卵管癌、胃癌、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、食道鳞状细胞癌、头颈部鳞
状细胞癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤。

30 优选地，所述受试者为哺乳动物，优选灵长类动物，更优选为人。

本发明的方法和/产品具有以下优势和/或益处：

- (1) 本发明的方法可提供高度均质的抗体偶联物分子，其 DAR2 主峰占比达到 99%以上；
- (2) 本发明的制备方法步骤少，操作简单，利于工业放大生产，同时制备的产品杂质少、
35 纯度高，明显提高用药安全性，也降低了生产成本；和/或
- (3) 通过本发明的偶联方法制备的抗肿瘤药具有优异的抗肿瘤效果和安全性,包括高的稳

定性和较小的副作用，扩大治疗窗口，提升治疗效果，减少毒性反应。

定义：

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“抗体药物偶联物”或“ADC”是指生物活性化合物片段（小分子药物）与抗体或其抗原结合片段部分连接得到的物质。生物活性化合物片段与靶向部分通过连接子相连。在一些情况中，所述连接子在特定环境（例如胞内低 pH 值环境）中或特定作用（例如溶酶体蛋白酶的作用）下能够断裂，从而使生物活性化合物片段与抗体或其抗原结合片段分离。在本公开的部分实施方案中，所述连接子包含可切割或不可切割的单元，例如肽或二硫键。在本公开的部分实施方案中，生物活性化合物片段与抗体或其抗原结合片段直接通过共价键相连，所述共价键在特定环境或作用下能够断裂，从而使生物活性化合物片段与抗体或其抗原结合片段部分分离。

术语“连接子”是指将生物活性化合物片段（小分子药物）与抗体部分连接起来的片段。在这点上，连接子在连接至抗体或其抗原结合片段之前（即连接子前体）具有可与抗体或其抗原结合片段的官能团形成键的官能团。

术语“小分子药物”是指低分子量的能够调节生物过程的化合物。“小分子”被定义为分子量小于 10kD、通常小于 2kD 和优选小于 1kD 的分子。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂，小分子可以比大分子更能透过细胞、对降解更不易感和更易于引发免疫应答。小分子药物包括但不限于细胞毒性剂，例如喜树碱类化合物、加利车霉素（calicheamicin）、美登木素生物碱（maytansinoids）、多拉司他汀（dolastatin）、澳瑞他汀类化合物和单端孢毒素（trichothecene）。优选地，所述美登木素衍生物选自 DM1、DM3 和 DM4；所述澳瑞他汀类化合物选自本发明实施方案中提及的澳瑞他汀类化合物，包括但不限于 MMAE 和 MMAF；所述喜树碱类化合物选自喜树碱、10-羟基喜树碱、依喜替康、SN-38 和托泊替康以及本发明实施方案中提及的喜树碱类化合物。

本公开中，当小分子药物为 ADC 或含药连接子的一部分时，其指来自小分子药物的结构片段，例如小分子药物的羟基或氨基与连接子键合形成的结构片段，在肿瘤组织间或肿瘤细胞内连接子裂解/降解/酶切后，能够形成具有生物活性的药物（例如小分子细胞毒药物，所述药物包括其失去一个原子或原子团后的基团）或其衍生物（例如其前体）的部分（片段或基

团)。为了避免歧义,“小分子药物”并非仅指已获得医药监管部门审批的“药品”,还包括临床中,或者研发和学术研究中任何有潜在治疗生物活性的化合物。

术语“含药连接子”是指生物活性化合物片段(小分子药物)与连接子连接形成的化合物。在本文中有时也称为“药物连接子偶联物”。

5 金属离子螯合剂是指通过其与金属离子的强结合作用,将金属离子包合到螯合剂内部,变成稳定的、分子量更大的化合物,从而阻止金属离子起作用的化合物。金属离子螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸、

术语“药物组合物”指这样的组合物,其以允许包含在其中的活性成分以生物学活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

10 术语“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中,具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常,在癌症的背景中,术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前,特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

15 术语“烷基”是指直链、支链完全饱和的烃基,优选 C₁-C₁₀,更优选 C₁-C₈、C₁-C₆,或者 C₁-C₄ 烷基。烷基实例是甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基或正癸基等等。

术语“亚烷基”是指如上所定义的烷基进一步去掉一个氢原子形成的二价基团。

20 术语“环烷基”是指环状的烷基基团,优选 C₃-C₁₅ 环烷基,例如 C₃-C₈ 环烷基、C₃-C₆ 环烷基。环烷基实例是环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环己基或环庚基等等。

术语“亚环烷基”是指如上定义环烷基进一步去掉一个氢原子形成的二价基团。

术语“亚杂烷基”是指如上定义的烷基,其在链中包含 1 个或多个选自 N、O 或 S 的杂原子。应当理解,亚杂烷基不包括两个或更多个 N、O 或 S 杂原子直接相互连接形成的基团。

25 优选地,亚杂烷基为 C₁-21(例如 C₁-10、C₁-6)直链亚杂烷基,其包含 1-11 个(优选 1-6 个、1-3 个)选自 N、O 或 S 的杂原子。

术语“杂环基”是指可以任选地被取代的含有一个或多个(例如 1、2、3 或 4 个)选自 N、O、S、SO、SO₂ 或 P 的杂原子的部分不饱和或完全不饱和的 3-10 元环状基团,优选 3-10 元环状基团,更优选 3-6 元环状基团;更加优选 5-6 元环状基团;所述杂环基含有 1-9 个碳原子,优选含有 2-8 个碳原子,更优选含有 3-5 个碳原子。杂环基的实例包括: 1,3-二氧杂环戊烷基、1,3-二噁烷基、1,4-二噁烷基、咪唑啉基、吡啶基、吗啉基、吡啶酮、2-吡咯烷酮、哌嗪基、高哌嗪基、哌啶基、吡嗪基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢喹啉基、四氢噻吩基、噁烷基、氧硫杂环戊烷基、噻烷基等等。

“化学键”是指连接两侧基团的键,例如对于基团-A-L₂-D,当 L₂ 为化学键时,所述基团可写作-A-D。

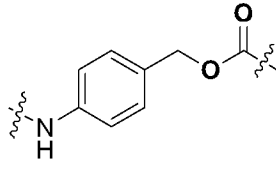
术语“卤素”是指 F、Cl、Br、I。

术语“还原剂”是指能够选择性还原二硫键的试剂。还原剂选自但不限于三(2-羧乙基)膦

(TCEP) (包括三(2-羧乙基)膦盐酸盐)、二硫苏糖醇(DTT)、巯基乙胺、巯基乙醇及其组合。

术语“抗体摩尔当量”是指相对于抗体而言的摩尔当量。

应当理解,对于本申请的通式结构中的二价基团,所列举的基团以所显示的方向与两侧基团相连接,除非如此进行连接得到的结构不合理或偏离本发明、或与上下文矛盾。例如当



5 L₂为 时, L₂左侧的氨基与 A 连接, L₂右侧的羰基与小分子药物 (D) 连接。

术语“药物与抗体比率”或“DAR”是指偶联于本文所述的抗体部分(mAb)的小分子药物部分(D)与抗体部分的数量比例。ADC 的 DAR 可以在 1 到 10 的范围内,但是取决于抗体上的连接位点的数量,更高的负载也是可能的。提及负载到单个抗体上的药物的数量时,可以使用术语 DAR。DAR 也可被计算为产品中分子群体的平均 DAR,即通过检测方法(例如通过常规方法如质谱法、ELISA 测定、电泳和/或 HPLC)测得的产品中偶联于本文所述的 mAb 部分的小分子药物部分(D)与 Ab 部分的总体比例(摩尔比例),此 DAR 在文中称为平均 DAR。在一些实施方案中,本发明的抗体药物偶联物的平均 DAR 值是 1.0-10.0,例如 4.0-10.0、5.0-9.0、6.0-8.0、1.0-8.0, 2.0-6.0, 例如 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8.0、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 和 10.0,以这些数值中的两个作为端点的范围。

20 术语“DAR2-ADC”是指 DAR 为 2 的 ADC,即抗体连接有 2 个小分子药物的 ADC。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 10%的下限和比指定数字数值大 10%的上限的范围内的数字数值。

如本文所用,术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项。

25 如本文所用,术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤,但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中,当使用术语“包含”或“包括”时,除非另有指明,否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组合的情形。例如,当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时,也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

具体实施方式

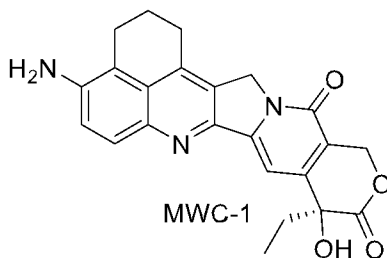
30 以下通过具体实施方式的描述对本披露作进一步说明,但这并非是对本披露的限制。本领域技术人员根据本披露的教导,可以做出各种修改或改进,而不脱离本披露的基本思想和范围。所用仪器或设备未注明来源的,均为可以通过市购获得的产品。所用试剂未注明来源的,为可以通过市购获得的或通过常规方法合成的产品。

本文中的缩写具有以下含义，未提供含义的缩写具有本领域通常理解的含义：

缩写	名称
KHMDS	六甲基二硅基氨基钾
NFSI	N-氟代双苯磺酰亚胺
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
PE	石油醚
EA	乙酸乙酯
eq	当量
MeOH	甲醇
DMF	二甲基甲酰胺
PB	磷酸氢二钠和磷酸二氢钠缓冲溶液
IPA	异丙醇
MTS	Abcam, 货号 ab223881

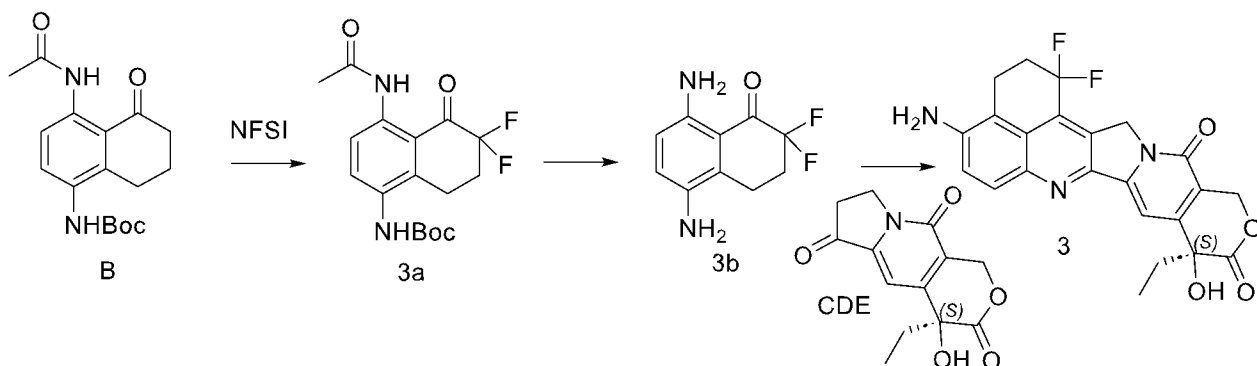
5 实施例 1 小分子的合成

实施例 1.1 化合物 MWC-1 的合成



按照 WO2020200880A1 专利方法，以 B-1 为中间体，制备得到 MWC-1，为黄色固体，
LC-MS (ESI) : [M+1]⁺=404

实施例 1.2 化合物 3 的合成



步骤 1

于 500ml 三口烧瓶中，氮气保护下，将化合物 B (2.45g, 7.7mmol, 1eq) 溶于四氢呋喃 (200ml) 中，用干冰-丙酮浴将反应液冷却至 -70~-60℃，慢慢滴加 KHMDS (1M, 31ml, 31.0mmol, 4eq)，滴毕，于 -70~-60℃ 搅拌 10 分钟；滴加 NFSI 的四氢呋喃溶液 (将 NFSI (7.35g, 23mmol, 3eq) 溶于四氢呋喃 (70ml))，滴毕，于 -70~-60℃ 搅拌 10 分钟，自然升温至 20~30℃ 并搅 3 小时；加入饱和氯化铵水溶液 (80ml) 淬灭反应，反应液用乙酸乙酯 (150ml*3) 萃取，合并有机相，饱和食盐水洗涤，浓缩至干得粗品，经柱层析纯化，洗脱剂为石油醚：乙酸乙酯=1: 0-1: 3，得化合物 3a，黄色固体，0.85g，收率 31.2%。LC-MS (ESI)：[M+1]⁺=355.8

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.49 (s, 1H), 8.64 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 3.01 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.55 – 2.39 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.44 (s, 9H)

步骤 2

于 100ml 单口烧瓶中，将化合物 3a (0.85g, 2.4mmol)，与 6N 盐酸 (30ml) 混合，加热回流反应 4 小时。停止加热，待反应液冷却至室温后，用碳酸氢钠调节 pH 至 7~8，用二氯甲烷 (30ml*3) 萃取，合并有机相，饱和食盐水洗涤，浓缩至干得粗品，经柱层析纯化，洗脱剂为石油醚：乙酸乙酯=1: 0~1: 3，得化合物 3b，棕色固体 0.25g，收率 49.1%。LC-MS (ESI)：[M+1]⁺=213.9

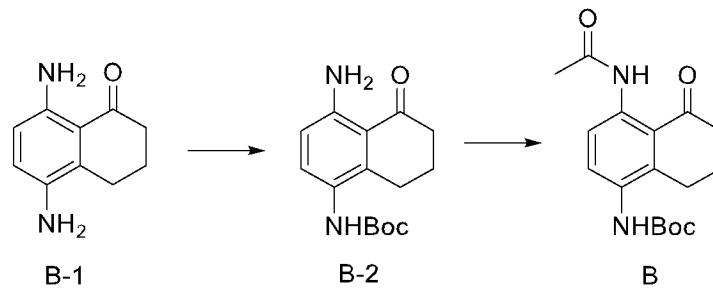
步骤 3

于 50ml 单口反应瓶中，氮气保护下，将化合物 3b (120mg, 0.59mmol, 1eq)、CDE 三环化合物 (180mg, 0.68mmol, 1.2eq) 和 PPTS (35mg, 0.14mmol, 0.25eq) 混合于 15ml 乙酸中，加热回流反应 3~4 小时；减压蒸馏，蒸除大部分乙酸，残留物经柱层析粗分离，洗脱剂为二氯甲烷：甲醇=15:1，得到粗品 80mg，再经制备液相分离纯化，得喜树碱类化合物 3，为土黄色固体，LC-MS (ESI)：[M+1]⁺=440.8

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 7.89 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.31 (d, J = 8.9 Hz, 0H), 5.59 – 5.26 (m, 5H), 3.11 – 3.05 (m, 4H), 2.73 – 2.59 (m, 3H), 1.98 (dt, J = 14.0, 7.0 Hz, 1H), 1.05 – 0.98 (m, 3H)

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.87 (d, J = 9.1 Hz, 0H), 7.41 (d, J = 9.1 Hz, 0H), 7.21 (s, 0H), 6.50 (s, 0H), 6.15 (s, 1H), 5.36 (d, J = 46.6 Hz, 1H), 2.93 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 2.66 – 2.54 (m, 1H), 1.97 – 1.68 (m, 3H), 1.24 (s, 1H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)

化合物 B 的合成



化合物 B-1 按照文献 *Jornal of Medcinal Chemstry*, 1998, 41(13), 2308-2318 方法合成, 化合物 B-1 为棕色固体, LC-MS (ESI): $[M+1]^+=177$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6.76 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.67 (bs, 2H), 6.42 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.20 (bs, 2H), 2.56 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.48 – 2.41 (m, 2H), 1.96 – 1.84 (m, 2H)

于 250ml 三口烧瓶中, 将化合物 B-1 (2.18g, 12.4mmol, 1eq) 溶于四氢呋喃 (100ml) 中, 加入 Boc 酸酐 (8.2g, 37.6mmol, 3eq), 于 40~45°C 搅拌反应 5 小时; 将反应液直接浓缩干, 经柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯 = 1: 0~1: 3, 得化合物 B-2, 黄色固体 3.0g, 收率 90%。

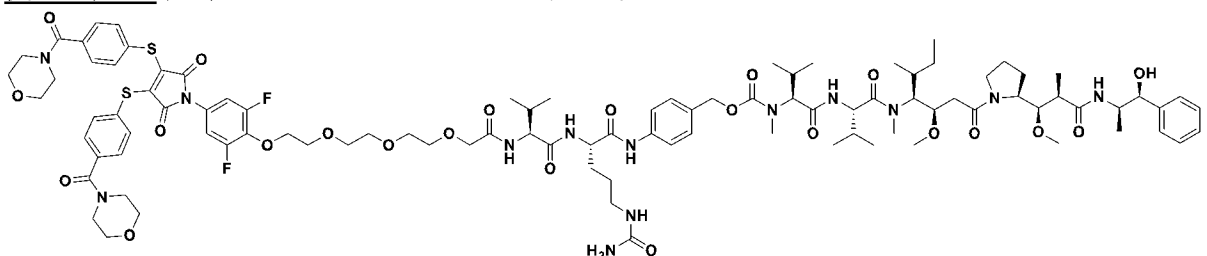
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (s, 1H), 6.41 (t, $J = 10.2$ Hz, 3H), 5.90 (s, 1H), 2.73 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.61 – 2.47 (m, 2H), 2.02 – 1.86 (m, 3H), 1.49 – 1.36 (m, 9H)

于 250ml 三口烧瓶中, 将化合物 B-2 (3.0g, 10.8mmol, 1eq) 和 DIPEA (3.5g, 27.1mmol, 1.5eq) 混于二氯甲烷 (125ml) 中, 用冰盐浴将反应液冷却至 -5~0°C, 滴加乙酰氯 (1.3g, 16.5mmol, 2eq), 滴毕, 撤除冰盐浴, 自然升温, 于室温下搅拌反应 4 小时; 将反应液浓缩干, 残留物经柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯 = 1: 0~1: 3, 得化合物 B, 淡黄色固体, 3.48g, 收率 100%。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 12.01 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.57 (t, $J = 36.2$ Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 2.80 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.65 – 2.58 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.07 – 1.98 (m, 2H), 1.44 (s, 9H)

实施例 2 新型含药连接子的合成

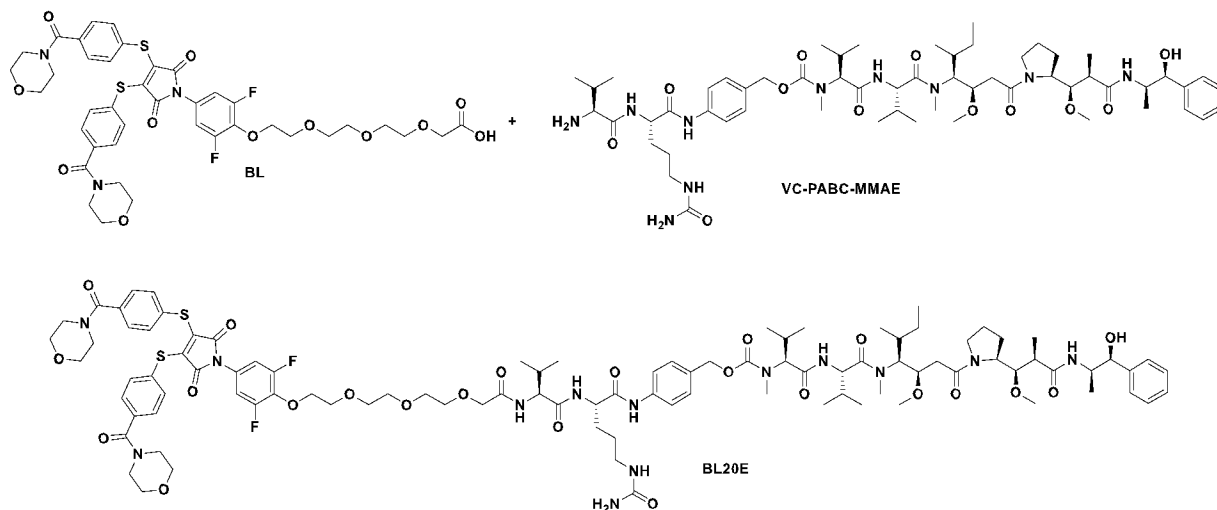
实施例 2.1 含药连接子 BL20E (C-3) 的合成



BL20E (C-3)

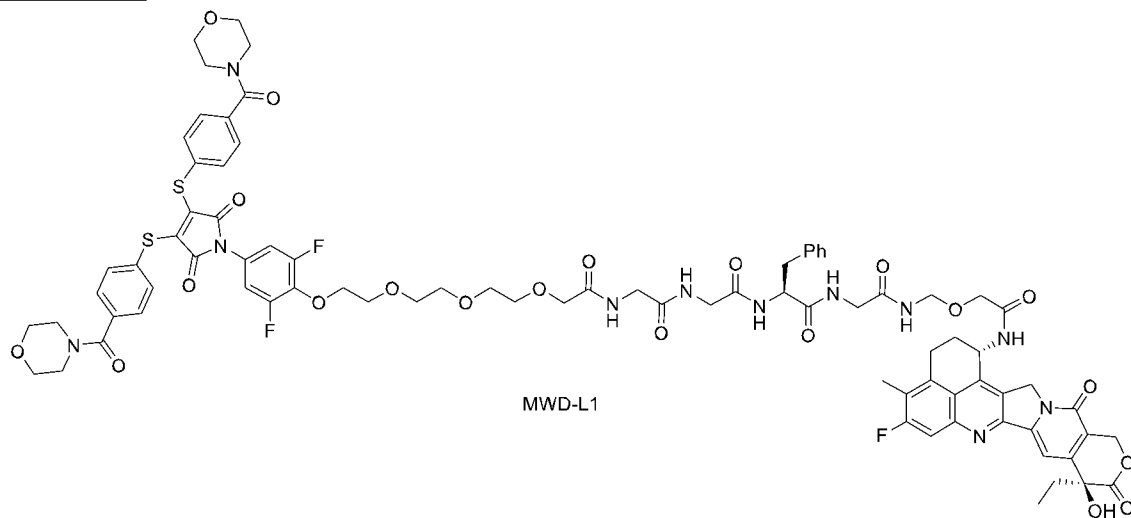
BL20E 化合物按照 WO2018/095422A1 公开的方法, 由 BL 接头化合物与

VC-PABC-MMAE 缩合得到，合成路线如下：



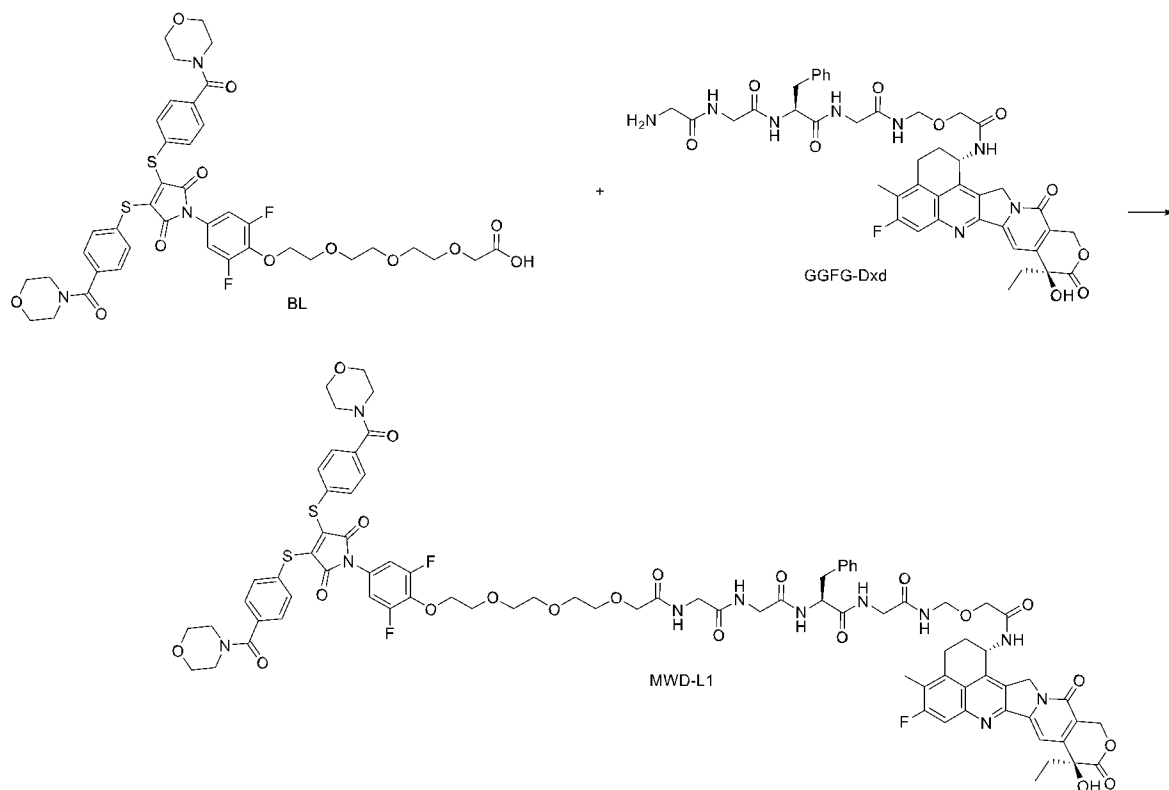
BL20E 化合物为黄色固体，LC-MS (ESI): $[M+1]^+$ 为 1963 (C-3)。

实施例 2.2 含药连接子 MWD-L1 的合成



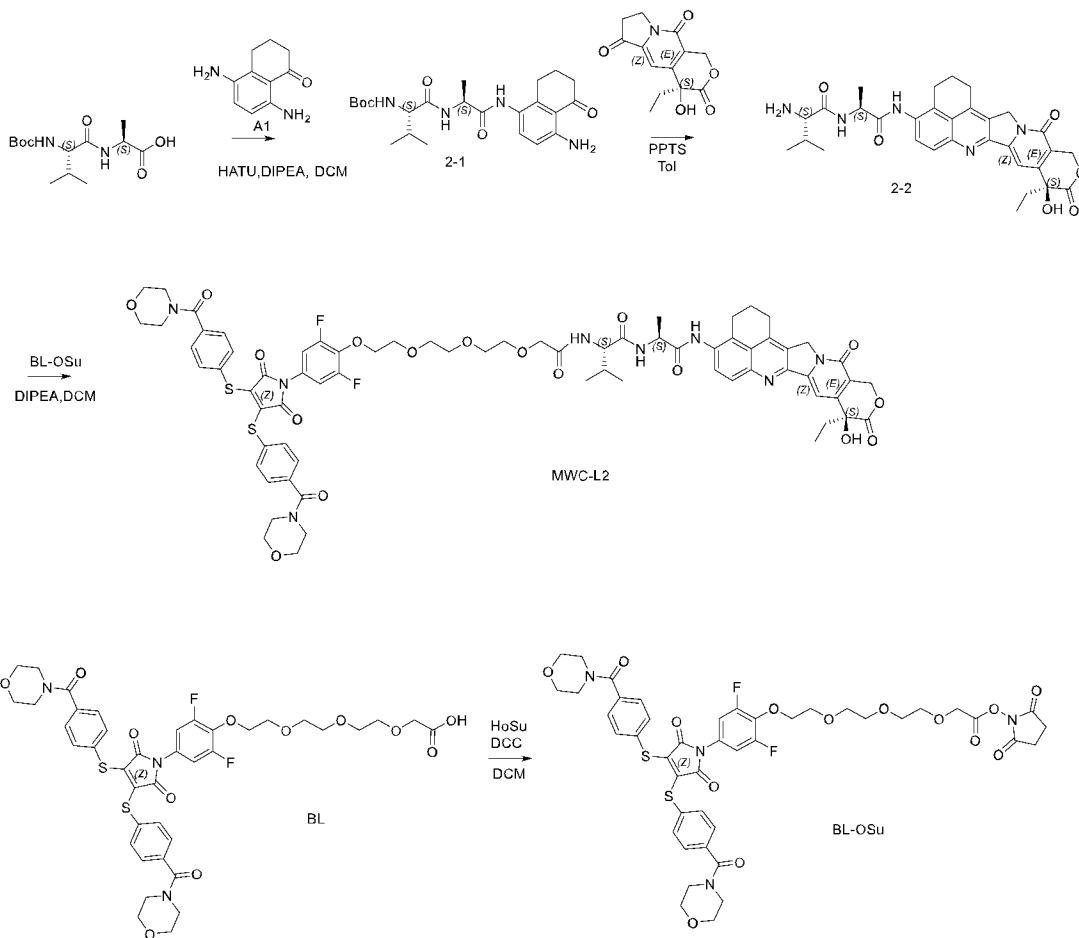
5

MWD-L1 化合物由 BL 接头化合物与 GGFG-Dxd 合成得到，合成路线如下：



BL 接头化合物 (857mg, 1mmol)、GGFG-Dxd[按照专利公开文件 (US20190151328A1) 中所述方法合成得到] (840mg, 1mmol, 1eq)、DIPEA (323mg, 2.5mmol, 2.5eq), HATU (570mg, 1.5mmol, 1.5eq), 溶于 30ml DCM 中, 搅拌反应 2h。将反应液冷却至 5~10°C, 加入 1N 盐酸 (20ml), 搅拌 0.5h。分液, 水相用 DCM (30ml*2) 萃取, 合并有机相。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干。柱层析纯化, 洗脱剂: DCM: MeOH=50: 1~10: 1, 得含药接头 MWD-L1 为黄色固体, 500mg, 收率 29.8%, LC-MS(ESI):M+1=1681, (M+1)/2=840.9。

实施例 2.3 含药连接器 MWC-L2 的合成



步骤 1

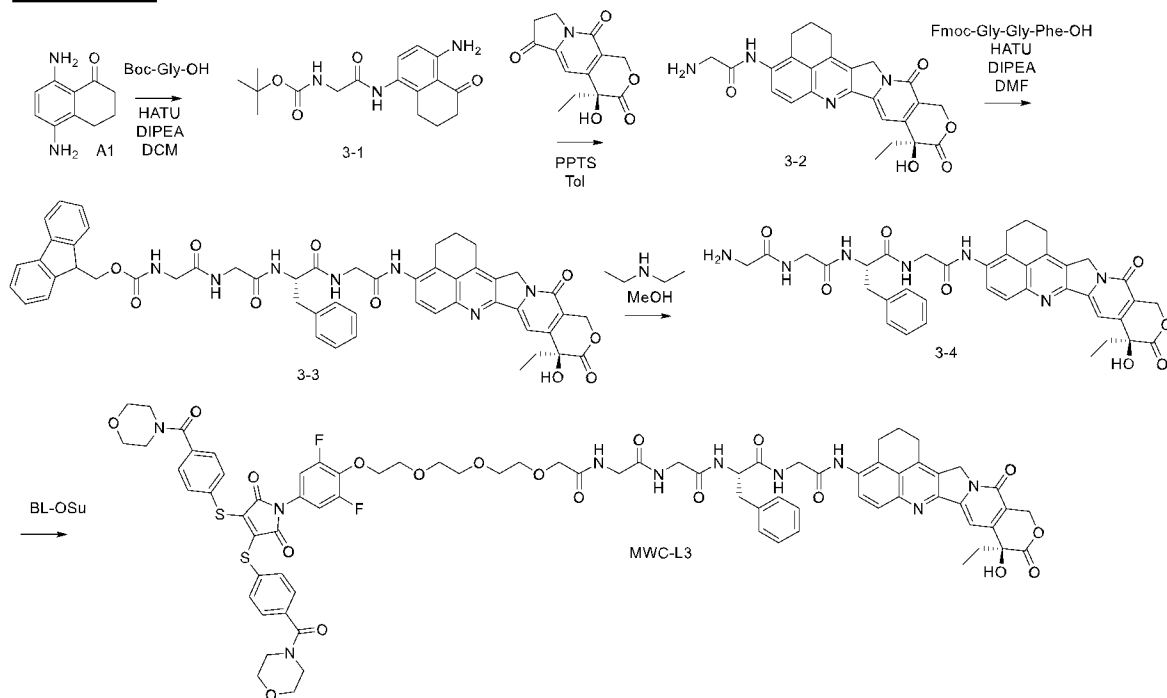
Boc-Val-Ala-OH (288mg, 1mmol)、A1 化合物[根据文献 Journal of Medicinal Chemistry, 1998, vol. 41, #13, p. 2308-2318 方法合成得到](176mg, 1mmol, 1eq)、DIPEA(322mg, 2.5mmol, 2.5eq)、HATU(456mg, 1.2mmol, 1.2eq)溶于 30ml DCM 中, 搅拌反应 2h。反应液旋干, 柱层析纯化, 洗脱剂: PE: EA=10: 1~5: 1, 定量地得到中间体 2-1, 为灰绿色固体(450mg)。

步骤 2

中间体 2-1 (450mg, 1mmol)、CDE 三环化合物 (263mg, 1mmol, 1eq)、对甲苯磺酸吡啶盐 (PPTS) (251mg, 1mmol, 1eq) 悬浮于 30ml 甲苯中, 加热回流反应 2 小时。停止加热, 待反应液冷却后, 收集固体沉淀物即为中间体 2-2 粗品, 棕色固体 750mg。LC-MS(ESI):M+1=574。不经纯化直接下一步反应。

步骤 3

BL 接头化合物 (857mg, 1mmol)、HoSu (138mg, 1.2mmol, 1.2eq)、DCC (310mg, 1.5mmol, 1.5eq) 溶于 30ml DCM 中, 室温搅拌 3h, 反应液抽滤, 滤液即为 A-OSu 的 DCM 溶液。将滤液加入到中间体 2-2 粗品、DIPEA (323mg, 2.5mmol, 2.5eq)、DCM (30ml) 的混合溶液中, 搅拌反应 3h。将反应液冷却至 10°C 下, 加入 1N 盐酸 (20ml), 搅拌 0.5h。分液, 水相用 DCM (30ml*2) 萃取, 合并有机相。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干。柱层析纯化, 洗脱剂: DCM: MeOH=50: 1~10: 1, 得连接器 MWC-L2 为橘红色固体, 325mg, 收率 23.0%, LC-MS(ESI):M+1=1414, (M+1)/2=707

实施例 2.4 含药连接子 MWC-L3 的合成**步骤 1**

- 5 Boc-Gly-OH (175mg, 1mmol)、A1 化合物 (176mg, 1mmol, 1eq)、DIPEA (322mg, 2.5mmol, 2.5eq)、HATU (456mg, 1.2mmol, 1.2eq) 溶于 30ml DCM 中, 搅拌反应 2h。反应液旋干, 柱层析纯化, 洗脱剂: PE: EA=10: 1~5: 1, 定量地得到中间体 3-1 为淡绿色固体 335mg。

步骤 2

- 10 中间体 3-1 (335mg, 1mmol)、CDE 三环化合物 (263mg, 1mmol, 1eq)、PPTS (251mg, 1mmol, 1eq) 悬浮于 30ml 甲苯中, 加热回流反应 2 小时。停止加热, 待反应液冷却后, 收集固体沉淀物即为中间体 3-2 粗品, 棕色固体 560mg。LC-MS(ESI):M+1=461。不经纯化直接下一步反应。

步骤 3

- 15 Fmoc-Gly-Gly-Phe-OH (501mg, 1mmol)、中间体 3-2 粗品 (560mg)、DIPEA (322mg, 2.5mmol, 2.5eq)、HATU (456mg, 1.2mmol, 1.2eq) 溶于 20ml DMF 中, 搅拌反应 3h。加入 1N 盐酸 (30ml), 搅拌 0.5h。用 DCM (30ml*2) 萃取, 合并有机相。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干。柱层析纯化, 洗脱剂: DCM: MeOH=50: 1~10: 1, 得中间体 3-3 为棕色固体, 350mg, LC-MS(ESI):M+1=945

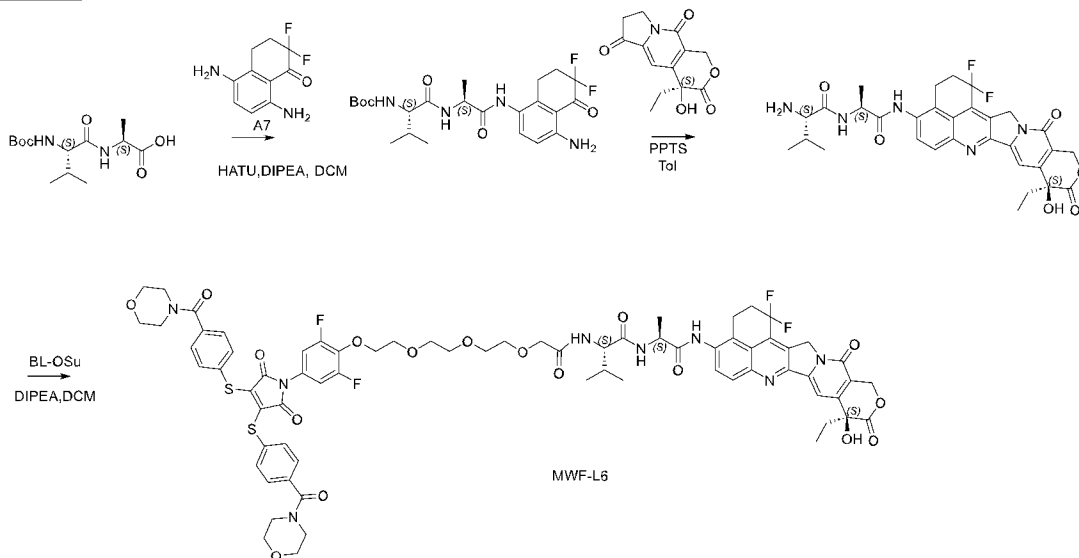
步骤 4

- 20 中间体 3-3 (350mg, 0.37mmol) 溶于甲醇 (20ml) 中, 加入二乙胺 (2ml), 搅拌反应 3h。旋干反应液, 得中间体 3-4 粗品, 为棕色粘稠物, LC-M(ESI):M+1=722, 粗品不经纯化直接下一步。

步骤 5

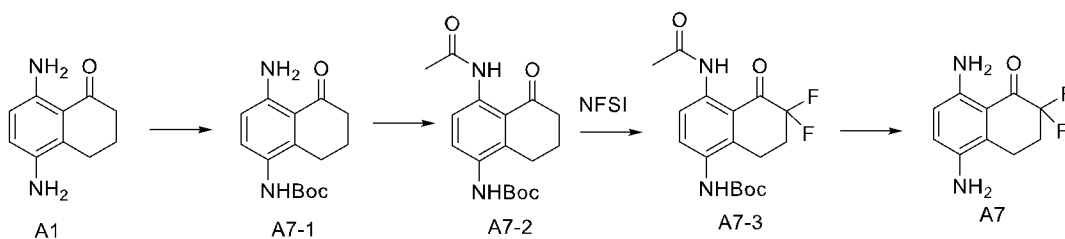
BL 接头化合物 (318mg, 0.37mmol)、HoSu (51mg, 0.44mmol, 1.2eq)、DCC (114mg, 0.56mmol, 1.5eq) 溶于 30ml DCM 中, 室温搅拌 3h, 反应液抽滤。将滤液加入到中间体 3-4 粗品、DIPEA (120mg, 0.93mmol, 2.5eq)、DCM (30ml) 的混合溶液中, 搅拌反应 3h。将反应液冷却至 10°C 下, 加入 1N 盐酸 (20ml), 搅拌 0.5h。分液, 水相用 DCM (30ml*2) 萃取, 合并有机相。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干。柱层析纯化, 洗脱剂: DCM: MeOH=50: 1~10: 1, 得连接子 MWC-L3, 为橘红色固体 120mg, 收率 20.8%, LC-MS(ESI):M+1=1562, (M+1)/2=781

实施例 2.5 含药连接子 MWF-L6 的合成



根据 MWC-L2 的合成方法, 由化合物 A7 代替化合物 A1 制备得到 MWF-L6, 为橘红色固体, LC-MS(ESI):M+1=1450。

其中化合物 A7 按如下方法合成得到



于 250ml 三口烧瓶中, 将 A1 化合物 (2.18g, 12.4mmol, 1eq) 溶于四氢呋喃 (100ml) 中, 加入 Boc 酸酐 (8.2g, 37.6mmol, 3eq), 于 40~45°C 搅拌反应 5 小时; 将反应液直接浓缩干, 经柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯=1: 0~1: 3, 得 A7-1 化合物, 黄色固体 3.0g, 收率 90%。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (s, 1H), 6.41 (t, $J = 10.2$ Hz, 3H), 5.90 (s, 1H), 2.73 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.61 – 2.47 (m, 2H), 2.02 – 1.86 (m, 3H), 1.49 – 1.36 (m, 9H)

于 250ml 三口烧瓶中, 将 A7-1 化合物 (3.0g, 10.8mmol, 1eq) 和 DIPEA (3.5g, 27.1mmol, 1.5eq) 混于二氯甲烷 (125ml) 中, 用冰盐浴将反应液冷却至 -5~0°C, 滴加乙酰氯 (1.3g, 16.5mmol, 2eq), 滴毕, 撤除冰盐浴, 自然升温, 于室温下搅拌反应 4 小时; 将反应液浓缩干, 残留物经柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯=1: 0~1: 3, 得 A7-2 化合物, 淡黄

色固体, 3.48g, 收率 100%。

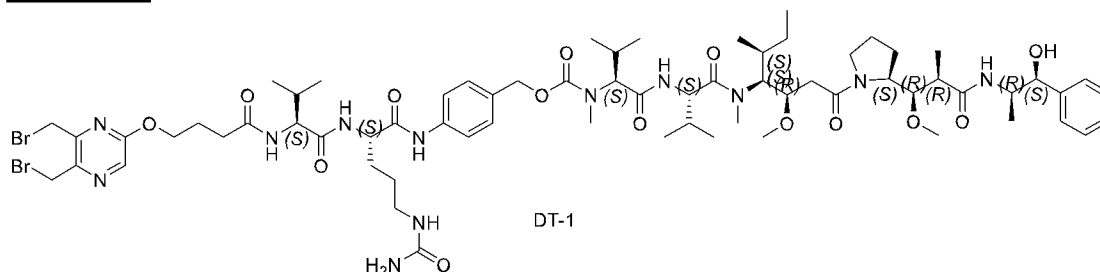
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 12.01 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.57 (t, $J = 36.2$ Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 2.80 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.65 – 2.58 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.07 – 1.98 (m, 2H), 1.44 (s, 9H)

于 500ml 三口烧瓶中, 氮气保护下, 将 A7-2 化合物 (2.45g, 7.7mmol, 1eq) 溶于四氢呋喃 (200ml) 中, 用干冰-丙酮浴将反应液冷却至 $-70\sim-60^\circ\text{C}$, 慢慢滴加 KHMDS (1M, 31ml, 31.0mmol, 4eq), 滴毕, 于 $-70\sim-60^\circ\text{C}$ 搅拌 10 分钟; 滴加 NFSI 的四氢呋喃溶液 (将 NFSI (7.35g, 23mmol, 3eq) 溶于四氢呋喃 (70ml)), 滴毕, 于 $-70\sim-60^\circ\text{C}$ 搅拌 10 分钟, 自然升温至 $20\sim30^\circ\text{C}$ 并搅 3 小时; 加入饱和氯化铵水溶液 (80ml) 淬灭反应, 反应液用乙酸乙酯 (150ml*3) 萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 浓缩至干得粗品, 经柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯=1: 0-1: 3, 得 A7-3 化合物, 黄色固体, 0.85g, 收率 31.2%。LC-MS (ESI): $[\text{M}+1]^+=355.8$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 11.49 (s, 1H), 8.64 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 3.01 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.55 – 2.39 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.44 (s, 9H)

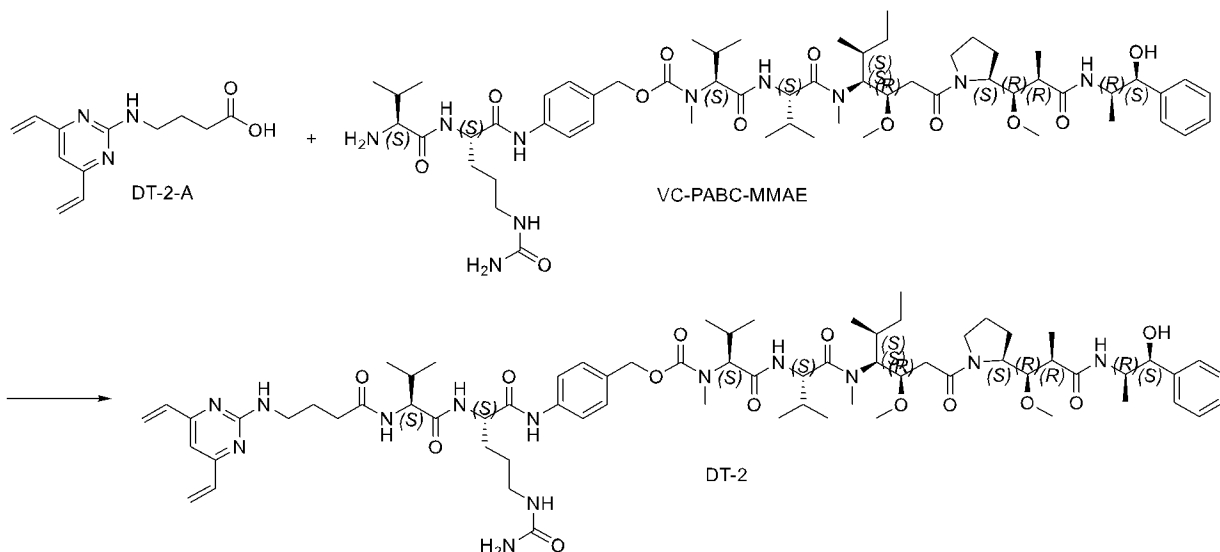
于 100ml 单口烧瓶中, 将 A7-3 化合物 (0.85g, 2.4mmol), 与 6N 盐酸 (30ml) 混合, 加热回流反应 4 小时。停止加热, 待反应液冷却至室温后, 用碳酸氢钠调节 pH 至 7~8, 用二氯甲烷 (30ml*3) 萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 浓缩至干得粗品, 经柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯=1: 0~1: 3, 得 A7 化合物, 棕色固体 0.25g, 收率 49.1%。LC-MS (ESI): $[\text{M}+1]^+=213.9$

实施例 2.6 含药连接子 DT-1 的合成



根据 CN114106088A 的方法合成得到 DT-1, 为黄色固体, LC-MS (ESI): $[\text{M}+1]^+=1474.4$

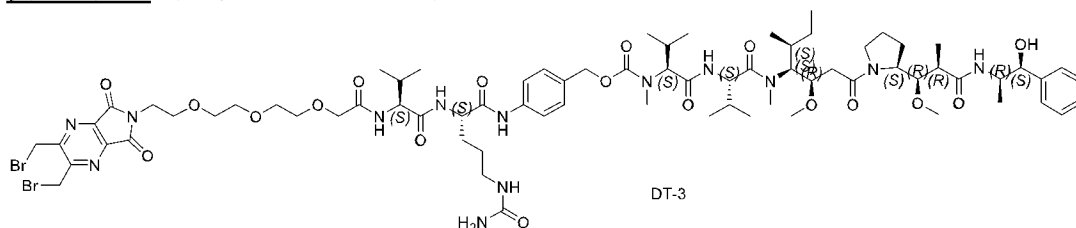
实施例 2.7 含药连接子 DT-2 的合成



根据 BL20E 化合物合成方法，由 DT-2-A 化合物代替 BL 接头化合物，合成得到 DT-2，为淡黄色固体，LC-MS (ESI) : $[M+1]^+=1339.7$

5 其中 DT-2-A 化合物按照文献 Chem. Sci., 2022, 13, 8781–8790 合成得到。

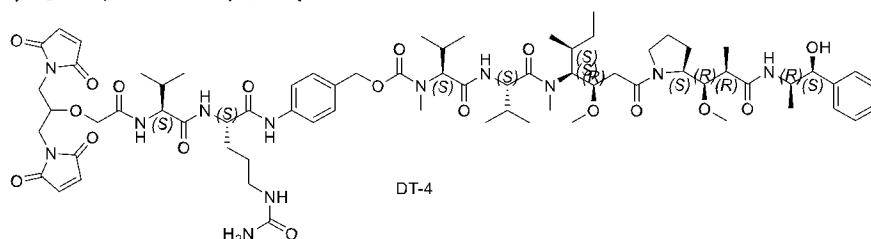
实施例 2.8 含药连接子 DT-3 的合成



根据 WO2022253033A 的方法合成得到 DT-3，为淡黄色固体，LC-MS (ESI) : $[M+1]^+=1631.5$ 。

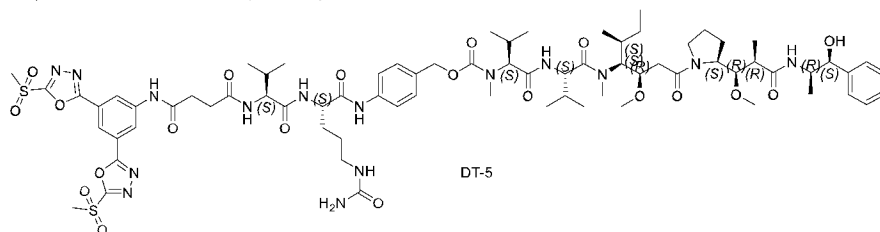
10

实施例 2.9 含药连接子 DT-4 的合成



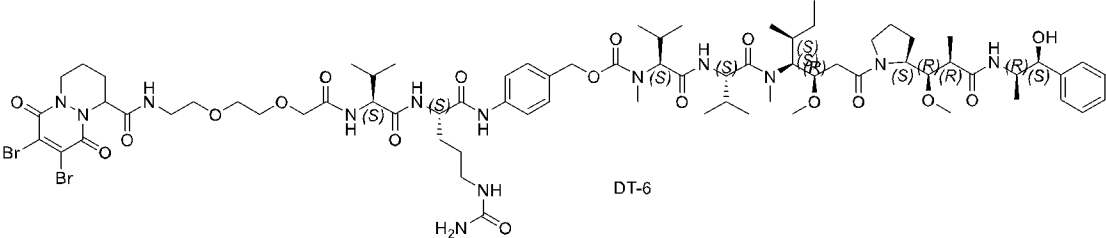
根据 CN103933575B 的方法合成得到 DT-4，为淡黄色固体，LC-MS (ESI) : $[M+1]^+=1414.7$

15 实施例 2.10 含药连接子 DT-5 的合成



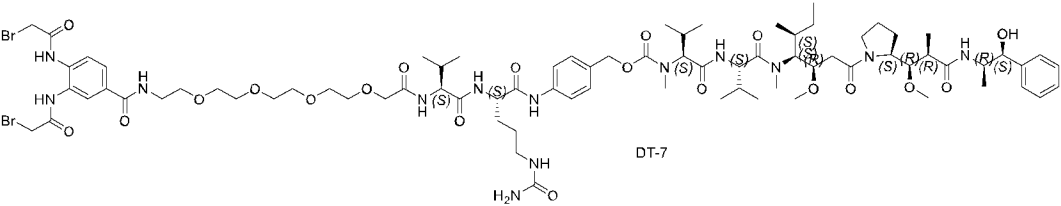
根据 CN109232464A 的方法合成得到 DT-5，为黄色固体，LC-MS（ESI）： $[M+1]^+=1591.8$

实施例 2.11 含药连接子 DT-6 的合成



根据 KR2019014324A 的方法合成得到 DT-6，为黄色固体，LC-MS（ESI）： $[M+1]^+=1619.6$

5 实施例 2.12 含药连接子 DT-7 的合成



根据 JP2018138538A 的方法合成得到 DT-7，为黄色固体，LC-MS（ESI）： $[M+1]^+=1733.7$

实施例 2.12 中使用的 MC-VC-PAB-MMAE 购自 MCE。

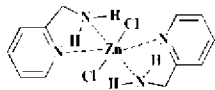
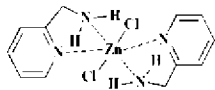
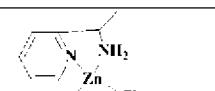
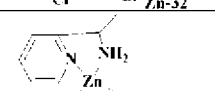
10 实施例 3 偶联工艺研究

实施例 3.1 抗体还原条件及金属离子的筛选

将 trastuzumab 抗体换液至 pH6.5~7.4 20mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，并稀释至 5-15 mg/mL。依次加入不同金属离子水溶液与三(2-羧乙基)膦盐酸盐（TCEP）水溶液，并在 0~15°C 过夜反应，反应当量如表 1-1 所示。然后，向上述反应液中加入 3 倍抗体摩尔当量的 BL20E（C-3）的 DMA 溶液，0~15°C 反应 2 h 后换液至 pH6.5~7.4 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。调节上述反应液浓度至约 5-15 mg/mL，加入 4 倍抗体当量乙二胺四乙酸（EDTA），室温下反应 30 min 后换液至 pH 7.4~8.0 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。调节上述反应液浓度至约 5-15 mg/mL，加入 8 倍抗体当量脱氢抗坏血酸（DHAA），并在 25~35°C 反应 2 h 后换液至 pH 7.4 的 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中。获得抗体药物偶联物产物。取样分析，测定抗体偶联比率（DAR），检测结果见表 1-1。

表 1-1. 不同的还原剂当量及不同金属离子的筛选结果

金属离子种类	抗体摩尔当量	TCEP 摩尔当量	金属离子或金属配合物摩尔当量	HIC(主峰 D2%)
ZnCl ₂	1	4.0	2	65
ZnCl ₂	1	4.5	2	78
CdCl ₂	1	4.0	2	69
CdCl ₂	1	4.5	2	74
HgCl ₂	1	4.0	2	64
HgCl ₂	1	4.5	2	65

 Zn-21	1	4.0	2	61
 Zn-21	1	4.5	2	63
 Zn-32	1	4.0	2	69
 Zn-32	1	4.5	2	72

可见，在本申请的制备方法中采用以上金属离子或金属配合物以及反应物当量可以实现 DAR2-ADC 的 HIC 峰值为 61-74%。

实施例 3.2 抗体偶联条件的筛选

5 将 trastuzumab 抗体换液至 pH6.5~7.4 20mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，并稀释至 5-15 mg/mL。依次加入 2 倍抗体摩尔当量的 $ZnCl_2$ 水溶液与 4.0~4.5 倍抗体摩尔当量的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP) 水溶液，并在 0~15°C 下过夜反应后换液至不同 pH 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。然后，向上述反应液中加入 3 倍抗体摩尔当量的 BL20E(C-3) 的 DMA 溶液，偶联反应温度及偶联溶液的 pH 如表 1-2 所示。上述偶联反应结束后换液至 pH 6.5~7.4 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。调节上述反应液浓度至约 5-15 mg/mL，加入 4 倍抗体当量乙二胺四乙酸 (EDTA)，室温下反应 30 min 后换液至 pH 7.4~8.0 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。调节上述反应液浓度至约 5-15 mg/mL，加入 8 倍抗体摩尔当量脱氢抗坏血酸 (DHAA)，并在 25~35°C 下反应 2 h 后换液至 pH 7.4 的 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中。获得抗体药物偶联物产物。取样分析，测定抗体偶联比率 15 (DAR) 及纯度，检测结果见表 1-2。

表 1-2. 不同偶联反应温度及不同偶联溶液 pH 的筛选结果

偶联反应温度 (°C)	偶联溶液 pH	HIC (主峰 D2%)	NR-CE-SDS(纯度%)
4	6.5	75	78.8
4	6.9	78	79.4
10	6.5	61	69.5
10	6.9	65	67.4

可见，在本申请的制备方法中采用以上偶联反应温度和偶联溶液 pH 可以实现 DAR2-ADC 的 HIC 峰值为 61-78%。

20 实施例 3.3 抗体纯化条件的筛选

将 trastuzumab 抗体换液至 pH6.5~7.4 20mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，并稀释至 5-15 mg/mL。依次加入 2 倍抗体摩尔当量的 $ZnCl_2$ 水溶液与 4.0~4.5 倍抗体摩尔当量的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP) 水溶液，并在 0~15°C 下过夜反应。然后，向上述反应液中加入 3

倍抗体摩尔当量的 BL20E(C-3)的 DMA 溶液,0~15℃下反应 2h 后换液至 pH6.5~7.4 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。调节上述反应液浓度至约 10 mg/mL, 加入 4 倍抗体当量乙二胺四乙酸 (EDTA), 室温下反应 30 min 后换液至 pH 7.4~8.0 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。调节上述反应液浓度至约 5-15 mg/mL, 加入 8 倍抗体当量脱氢抗坏血酸 (DHAA), 并在 25~35℃ 下反应 2 h。反应结束后换液至 pH 7.5 的 50 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中, 稀释至约 5~20mg/mL, 加入硫酸铵溶液调节电导, 对于抗体药物偶联物产物采用疏水作用色谱 (HIC) 进行上样纯化, 纯化条件见表 1-3。对于纯化后的产物取样进行 HIC 分析, HIC 检测结果见表 1-3。

表 1-3. 不同纯化条件的筛选结果

填料种类	盐种类	盐浓度 (mol/L)	收率 (%)	HIC-HPLC (D2%)
Butyl-650M	硫酸铵	0.60	30	100
Butyl-650M	硫酸铵	0.65	50	99.1
Butyl-650M	硫酸铵	0.75	43	99.4
Butyl-650M	氯化钠	2	48	99.1
Butyl-4FF	硫酸铵	0.75	42	98.8
Butyl-650S	硫酸铵	0.60	35	100
Butyl-650S	硫酸铵	0.65	43	99.6
Butyl-ImpRes	硫酸铵	0.60	34	100
Butyl-ImpRes	硫酸铵	0.65	40	99.8
Butyl-ImpRes	氯化钠	1.50	NA, 样品流穿	NA
Butyl-ImpRes	氯化钠	2.00	37	100
Phenyl Sepharose HP	硫酸铵	0.6	32	100
Phenyl Sepharose HP	氯化钠	1.50	NA, 样品流穿	NA
Phenyl Sepharose HP	氯化钠	2.00	NA, 样品流穿	NA

可见,在本申请的制备方法中采用以上填料、盐种类和盐浓度(作为 A 相)可以实现 DAR2-ADC 的 HIC 峰值为 98-100%。

实施例 3.4 不同含药连接子与不同抗体偶联实验

将抗体换液至 pH6.5~7.4 20mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中, 并稀释至 5-15 mg/mL。依次加入 2 倍抗体摩尔当量的 ZnCl₂ 水溶液与 4.0~4.5 倍抗体摩尔当量的三(2-羧乙基)磷盐酸盐 (TCEP) 水溶液, 并在 0~15℃下过夜反应。然后, 向上述反应液中加入 2.5~5.5 倍抗体摩尔当量的含药连接子的 DMA 溶液, 0~15℃下反应 2h 后换液至 pH 6.5~7.4 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。调节上述反应液浓度至约 5-15 mg/mL, 加入 4 倍抗体摩尔当量乙二胺四乙酸 (EDTA), 室温下反应 30 min 后换液至 pH 7.4~8.0 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。调节上述反应液浓度至约 5-15 mg/mL, 加入 8 倍抗体摩尔当量脱氢抗坏血酸 (DHAA), 并在 25~35℃ 下反应 2 h。反应结束后换液至 pH 7.5 的 50 mM 磷酸

二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中，稀释至约 5~20 mg/mL，加入硫酸铵溶液调节电导，使用 pH 7.5 的 50 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠+0.45~0.75 M 硫酸铵溶液作为 A 相，pH 7.5 的 50 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠溶液作为 B 相，使用 Butyl 650M 填料进行纯化，得到的纯化溶液浓缩换液至 pH 7.4 的 20 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中。纯化后取样分析，测定所得

5 抗体药物偶联物产物中的抗体偶联比率（DAR）及纯度，检测结果见表 1-4。

表 1-4. 不同抗体偶联不同小分子实验结果

抗体	含药连接子	抗体与含药连接子摩尔当量比	纯化前 HIC-HPLC（主峰 D2%）	纯化后 HIC-HPLC（主峰 D2%）	NR-CE-SDS（纯度%）
trastuzumab	MWD-L1	1:2.5	77.4	99.7	86.3
trastuzumab	MWC-L2	1:2.5	68.2	99.8	81.2
trastuzumab	MWC-L3	1:3	73.4	99.6	78.5
trastuzumab	MWF-L6	1:3	78.9	98.8	79.2
trastuzumab	BL20E	1:3	75.1	99.1	88.7
Pertuzumab	MWD-L1	1:2.5	77.9	99.4	75.6
Pertuzumab	MWF-L6	1:3	69.9	99.4	76.3
Pertuzumab	DT-3	1:4.5	73.9	98.2	81.9
h23-12	MWF-L6	1:3	76.5	99.5	78.5
h23-12	DT-4	1:4.5	72.1	99.1	77.2
h23-12	DT-5	1:5.5	65.3	97.6	80.5
hH2L1	BL20E	1:3	70.4	99.6	86.7
hH2L1	MWF-L6	1:3	75.6	99.1	74.6

其中，抗体 h23-12 是根据专利 WO2021068949A1 描述方法制备的，抗体 hH2L1 是根据专利 CN113527486A 描述方法制备的。

10 实施例 3.5 对比实施例

按照专利 WO2020/164561A1 公开的制备方法，制备抗体药物偶联物 Trastuzumab-MC-VC-PAB-MMAE。简述如下：

- (1) 将 ZnCl₂（0.04mM）和 TCEP（0.08mM）加入到 Trastuzumab 抗体溶液中，4℃下过夜反应；
- 15 (2) 向上述（1）反应液中加入 MC-VC-PAB-MMAE 的 DMA 溶液（0.12mM）中,4℃下反应 2h；抗体与含药连接子摩尔当量比为 1:3。
- (3) 向上述（2）反应液中加入半胱氨酸（0.08mM）以除去过量的 MC-VC-PAB-MMAE；
- (4) 向上述（3）反应液中加入 EDTA（0.08mM），随后加入 DHAA（0.16mM）；
- 20 (5) 使用脱盐柱（型号：40K，0.5mL，REF：87766，Lot：SJ251704，Thermo）纯化上述反应混合液。

表 1-5. HIC 分析对比结果

	抗体	含药连接子	纯 化 前 HIC-HPLC(主峰)	纯 化 后 HIC-HPLC (主峰)
实验例抗体药物偶联物: trastuzumab-B-VC-PAB-MMAE	trastuzumab	BL20E (B-VC-PAB-MMAE)	75.1 (主峰 D2%)	99.1(主峰 D2%)
对比例抗体药物偶联物	trastuzumab	MC-VC-PAB-MMAE	NA	78.1(主峰 D4%)
对比例抗体药物偶联物	trastuzumab	MC-VC-PAB-MMAE	NA	10.1(主峰 D2%)

实施例 4 抗体药物偶联物的理化表征

实施例 4.1 抗体药物偶联物的理化表征

- 5a、疏水作用色谱（HIC-HPLC）测定 DAR
- 流动相 A: 2.0 M (NH₄)₂SO₄ + 50 mM PB, pH 7.0
- 流动相 B: 50 mM PB + 15%IPA, pH 7.0
- 流速: 0.6 mL/min
- 进样浓度: 3~5mg/mL
- 10进样体积: 10μL
- 分析柱: TOSOH Butyl NPR, 4.6*100mm, 2.5μm, PN0042168, CN081D00130D
- 柱温: 25℃
- 检测波长: 280nm
- 梯度:

时间	%A	%B
初始	100	0
15	0	100
20	0	100
20.1	100	0
30	100	0

- 15进样分析: 对于浓度超过 5mg/mL 的样品, 用 50%A 相溶液稀释样品, 0.2μm 滤头过滤后进样分析; 对于 5mg/mL 或以下样品, 可直接过滤后进样分析。
- DAR=Σ (加权峰面积) /100, 即 DAR=(D0 峰面积比×0+ D1 峰面积比×1+ D2 峰面积比×2+ D3 峰面积比×3+ D4 峰面积比×4+ D5 峰面积比×5+ D6 峰面积比×6+ D7 峰面积比×7+ D8 峰面积比×8) /100。
- 20b. 非还原毛细管电泳 NR-CE-SDS 测定纯度

根据《中国药典四部》通则 3127 单抗分子大小变异体测定法测定。

实施例 5 抗体药物偶联物的生物活性分析

5.1 抗体药物偶联物体外杀伤作用研究

示例性地，使用以下方法进行实验。

本实验利用人胃癌细胞 NCI-N87（购自：ATCC）。用完全培养基（RPMI 1640 培养基 45ml，5 ml FBS，混匀后使用）将 NCI-N87 细胞密度调到 15×10^4 之后，100 μ l/孔加入细胞培养板中，过夜培养。第二天，用上述完全培养基稀释 ADC 样品，分别稀释到 50ug/ml，之后再 4 倍梯度稀释，共 9 个梯度加零点，所有样品均设 3 个复孔。设阴性对照（细胞+培养基）和空白对照（无细胞，纯培养基）；将上述稀释后的 ADC 样品依次加入到过夜培养的细胞培养板中，100 μ l/孔。然后置于细胞培养箱中孵育 120h。取出细胞培养板，40 μ l/孔加入 MTS（abcam，货号 ab223881）后，37℃培养箱反应 2-4h；取出细胞板，在 490nm 处读取 OD 值。

表 1-6 不同抗体药物偶联物活性对比研究结果

细胞株	抗体	含药连接子	EC50(ng/mL)	最大杀伤(%)	板号
NCI-N87	Trastuzumab	MWD-L1	43.8	89	P1
	Trastuzumab	MWC-L2	45.7	91.9	
	Trastuzumab	MWC-L3	55.6	85.4	
	Trastuzumab	MWD-L1	50.2	89.9	P2
	Trastuzumab	MWF-L6	25.7	90.6	
	Trastuzumab	BL20E	35.4	87.4	
	Trastuzumab	MWD-L1	53.2	98.6	P3
	Pertuzumab	MWF-L6	24.8	87.8	
	Pertuzumab	DT-3	100.7	92.1	
	Trastuzumab	MWD-L1	54.1	90.3	P4
	Pertuzumab	MWD-L1	50.2	89.5	
	h23-12	DT-5	210.2	93.2	
	Trastuzumab	MWD-L1	43.8	90.4	P5
	h23-12	MWF-L6	21.3	88.6	
	h23-12	DT-4	89.8	93.7	
	Trastuzumab	MWD-L1	58.4	89.5	P6
	hH2L1	BL20E	40.1	93.1	
	hH2L1	MWF-L6	20.2	87.5	

权 利 要 求

1. 一种用于制备抗体-药物偶联物(ADC)的方法, 该方法包括以下步骤:

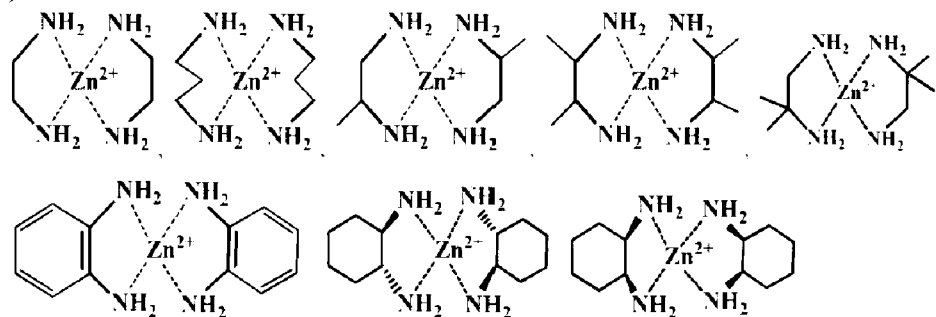
(a) 在含抗体的缓冲溶液中, 加入金属盐或金属配合物、还原剂, 然后进行孵育;

(b) 向(a)中的反应溶液中加入含药连接子进行偶联; 和

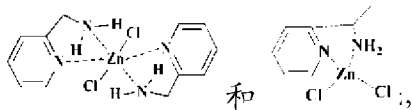
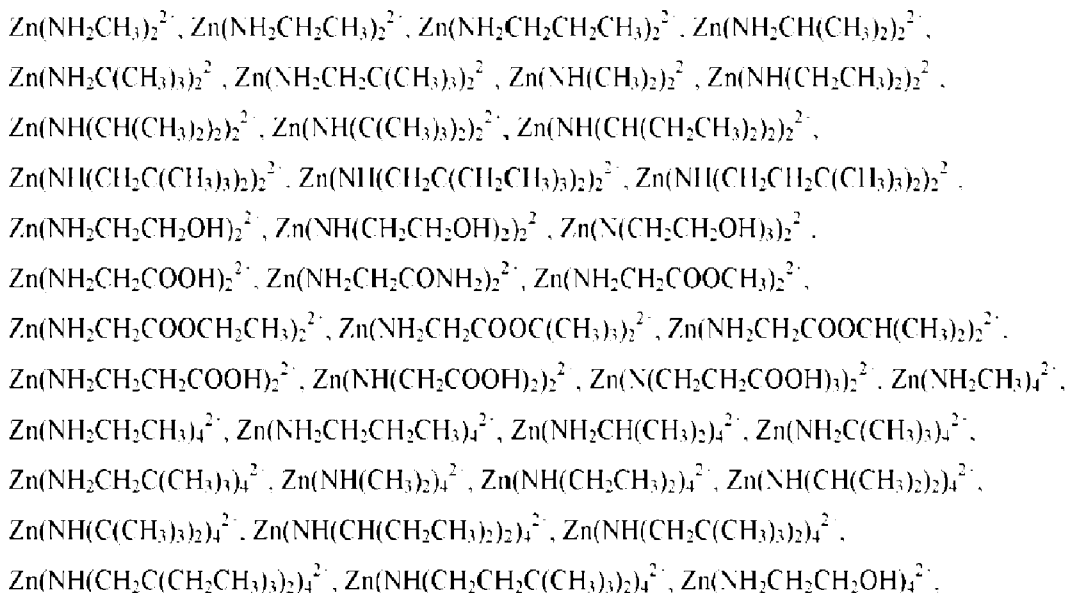
(c) 使用疏水作用色谱方法, 采用疏水凝胶型填料和盐溶液对于偶联物产物进行纯化, 以获得高纯度的 DAR2-ADC 偶联物。

2. 权利要求 1 所述的方法, 其中步骤(a)中所述的金属盐或金属配合物中的金属可以选自 Zn、Cd 和 Hg 等,

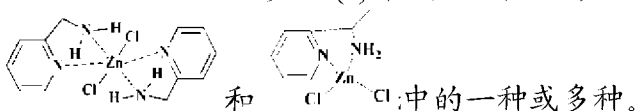
优选地, 步骤(a)中所述的金属盐或金属配合物选自下述中的一种或多种: Zn、Cd 和 Hg



的盐酸盐或硫酸盐、



更优选地, 步骤(a)中所述的金属盐或金属配合物选自 ZnCl_2 、 CdCl_2 、 HgCl_2 、



3. 权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 步骤(a)中所述的还原剂选自三(2-羧乙基)膦

(TCEP)、二硫苏糖醇(DTT)、巯基乙胺和巯基乙醇,优选 TCEP。

4. 权利要求 1-3 中任何一项所述的方法,其中步骤(a)中的抗体的浓度为 0.5-150 mg/mL,例如 4-30 mg/mL,

步骤(a)中所述的还原剂的用量是 1-6 倍抗体摩尔当量,例如 3.5-5.0 倍抗体摩尔当量,

5 步骤(a)中所述的金属盐或金属配合物的用量为 1-5 倍抗体摩尔当量,例如 1-3 倍抗体摩尔当量,

步骤(a)中的所述缓冲溶液具有 5-8 的 pH,例如 6.5-7.5 的 pH,优选 pH 为 6.9,和/或

步骤(a)中的所述缓冲溶液选自磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液,优选磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液,优选地,所述缓冲溶液中的缓冲剂浓度为 5
10 -100 mM,例如 10-30 或 mM。

5. 权利要求 1-4 中任何一项所述的方法,其中步骤(b)中的含药连接子的用量是 1-8 倍抗体摩尔当量,例如 3-5 倍抗体摩尔当量,

优选地,步骤(b)中反应溶液具有 5-8 的 pH,例如 6.5-7.5 的 pH。

6. 权利要求 1-5 中任何一项所述的方法,其中步骤(c)中所述疏水凝胶填料选自
15 Butyl-650M、Butyl-4FF、Butyl-650S、Butyl-ImpRes 和 Phenyl Sepharose HP,和/或

步骤(c)中的盐种类选自硫酸盐、氯化盐,优选硫酸铵、氯化钠;优选地,盐浓度为 0.1-5mol/L,例如 0.6-1.2 mol/L。

7. 权利要求 1-6 中任何一项所述的方法,其中在步骤(b)后包含步骤(b'):加入金属离子螯合剂例如乙二胺四乙酸(EDTA)进行反应,

20 优选地,金属离子螯合剂的用量是 1-8 倍抗体摩尔当量,例如 3-5 倍抗体摩尔当量。

8. 权利要求 1-7 中任何一项所述的方法,其中,在步骤(b')后包含步骤(b''):加入脱氢抗坏血酸(DHAA)进行反应,

优选地,DHAA 的用量是 1-16 倍抗体摩尔当量,例如 6-12 倍抗体摩尔当量。

9. 权利要求 1-8 中任何一项所述的方法,其中,所述方法获得的 DAR2-ADC 具有大于
25 90%的纯度,所述纯度例如通过 HIC-HPLC 测得。

10. 权利要求 1-9 中任何一项所述的方法,其中所述抗体选自人源化抗体、鼠源抗体、人抗体、嵌合抗体、单链抗体和双特异性抗体,

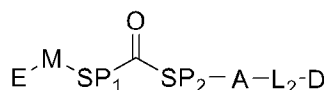
优选地,所述抗体是与下述抗原结合的抗体: HER2、B7H3、HER3、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD45、CD56、CD66e、CD70、CD74、CD73、CD79b、CD138、
30 CD147、CD223、EpCAM、粘蛋白 1 (Mucin 1)、STEAP1、GPNMB、FGF2、FOLR1、EGFR、EGFRvIII、组织因子(Tissuefactor)、c-MET、FGFR、Nectin 4、AGS-16、鸟苷酸环化酶 C (Guanylyl cyclase C)、间皮素(Mesothelin)、SLC44A4、PSMA、EphA2、AGS-5、GPC-3、c-KIT、RoR1、PD-L1、CD27L、5T4、Mucin16、NaPi2b、STEAP、SLITRK6、ETBR、BCMA、Trop-2、CEACAM5、SC-16、SLC39A6、Delta-like protein3、Claudin 18.2;

35 优选地,所述抗体包含阿达木单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、曲妥珠单抗(trastuzumab)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、尼妥珠单抗、利妥昔单抗、h23-12 或 hH2L1 的一个或多个 CDR (优选 3 个 CDR,即 HCDR1、HCDR2H 和 HCDR3;或 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,更优选 6

个 CDR, 即 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3), 或包含所述抗体的 VH 和/或 VL, 或包含所述抗体的重链和/或轻链;

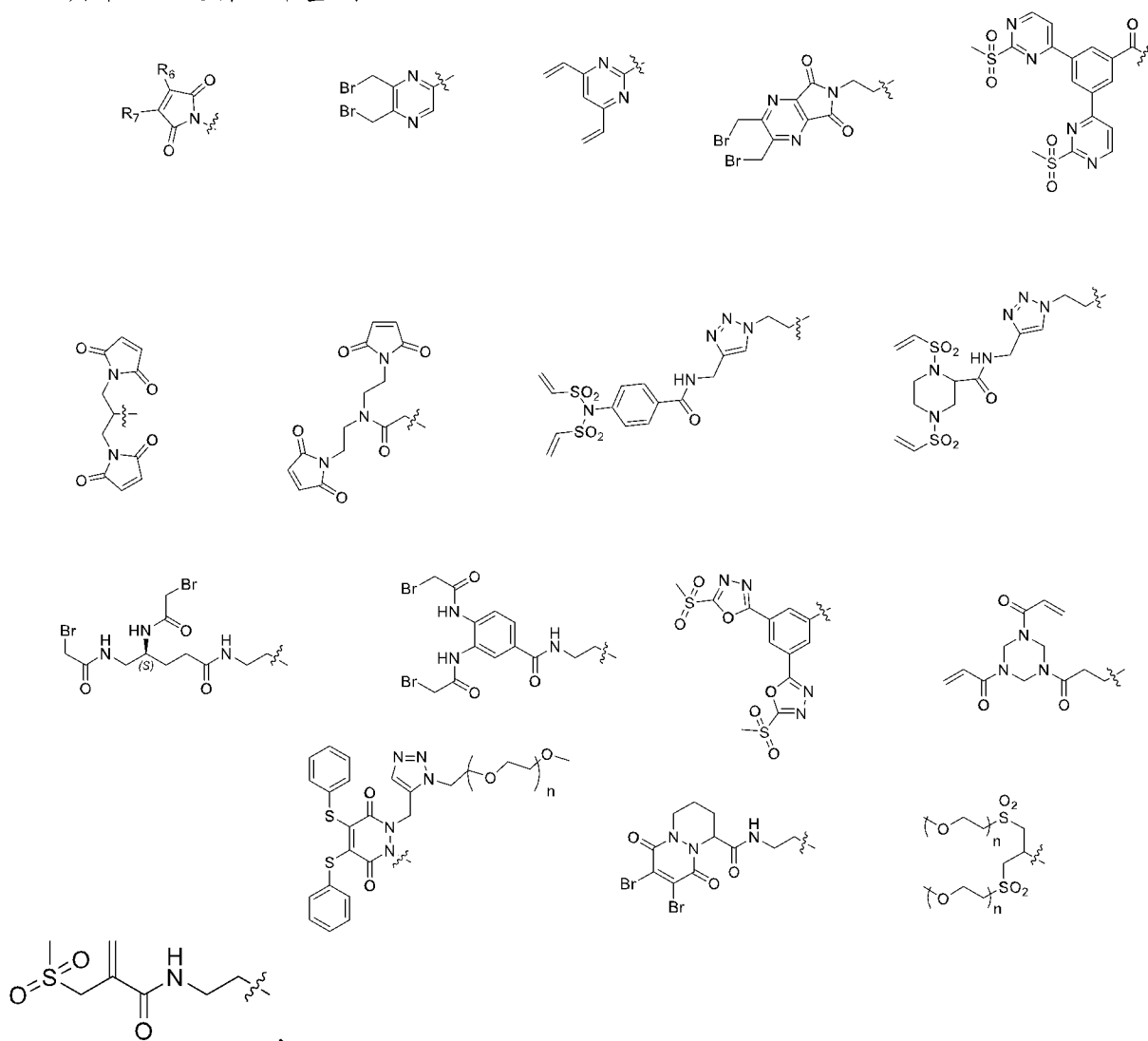
优选地, 所述抗体选自 trastuzumab、Pertuzumab、h23-12 和 hH2L1。

11. 权利要求 1-10 中任何一项所述的方法, 其中步骤(b)中的含药连接子为式 A-I 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药,



A-I

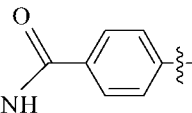
其中, E 选自如下基团:

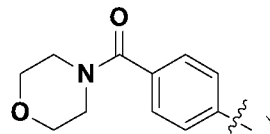


其中, 带有 ~ 的键表示与 M 的连接位点:

n 为选自 1-10 的整数, 例如为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

R₆、R₇ 独立地为卤素或 Ar'S-, Ar' 为苯基或由一个或多个取代基取代的苯基, 在取代的苯基中, 所述取代基选自烷基 (例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 优选甲氧基)、5-6 元杂环基-CO-、卤素、酯基、酰胺基和氰

基, 优选地, Ar' 为苯基、4-甲基氨基甲酰基苯基 () 或 4-甲酰基吗啉取代

苯基 ();

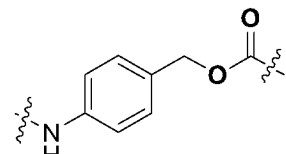
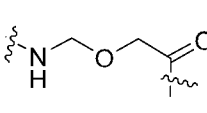
M 为亚苯基或由一个或多个取代基取代的亚苯基, 或化学键; 在取代的亚苯基中, 所述
5 取代基选自烷基 (例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基)、卤代烷基 (例如卤代 C1-C6 烷基、
优选卤代 C1-C4 烷基, 例如三氟甲基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基、
优选甲氧基)、卤素、酯基、酰胺基和氰基; 优选地, M 为卤素取代的亚苯基;

SP₁ 选自 C1-8 亚烷基、C1-8 亚烷基亚苯基-、C1-8 亚环烷基或 C1-21 (优选 C1-16、更优
10 选 C1-11) 直链亚杂烷基, 所述 C1-21 直链亚杂烷基包含 1-11 个 (优选 1-6 个) 选自 N、O
或 S 的杂原子, 其中所述 C1-8 亚烷基、C1-8 亚环烷基和 C1-21 直链亚杂烷基各自独立地任
选被选自羟基、氧代、氨基、磺酸基和氰基的一个或多个取代基取代;

SP₂ 选自 -NH(CH₂CH₂O)_aCH₂CH₂CO-、-NH(CH₂CH₂O)_aCH₂CO-、-S(CH₂)_aCO-或化学
键, 其中 a 为 1-20 的整数, 优选 1-10 的整数, 更优选 1-6 的整数;

A 表示 2-4 个氨基酸, 其中, A 表示 2 个氨基酸时, 可以为 NH-Phe-Lys-CO、NH-Val-Ala-CO、
15 NH-Val-Lys-CO、NH-Ala-Lys-CO、NH-Val-Cit-CO、NH-Phe-Cit-CO、NH-Leu-Cit-CO、
NH-Phe-Arg-CO 或 NH-Gly-Val-CO, 优选为 NH-Phe-Lys-CO、NH-Val-Ala-CO 或
NH-Val-Cit-CO; A 表示 3 个氨基酸时, 可以为 NH-Glu-Val-Ala-CO、NH-Glu-Val-Cit-CO 或
NH-Ala-Ala-Ala-CO, 优选为 NH-Glu-Val-Ala-CO 或 NH-Ala-Ala-Ala-CO; A 表示 4 个氨基酸
时, 可以为 NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO 或 NH-Gly-Phe-Gly-Gly-CO, 优选为
20 NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO, 优选地, A 为 NH-Val-Ala-CO、NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO 或
NH-Ala-Ala-Ala-CO;

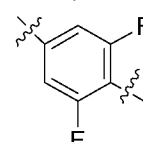
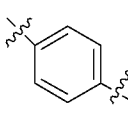
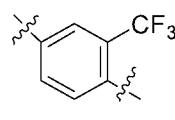
优选地, A 选自: NH-Val-Cit-CO、NH-Val-Ala-CO 和 NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO;

L₂ 选自   和化学键;

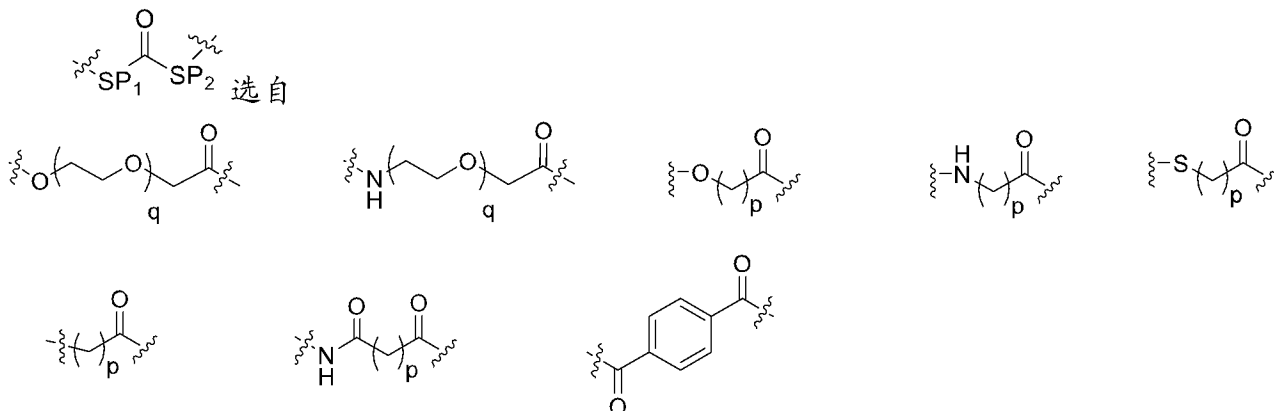
25

D 为小分子药物。

12. 权利要求 11 所述的方法, 其中

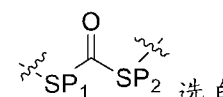
M 选自    。

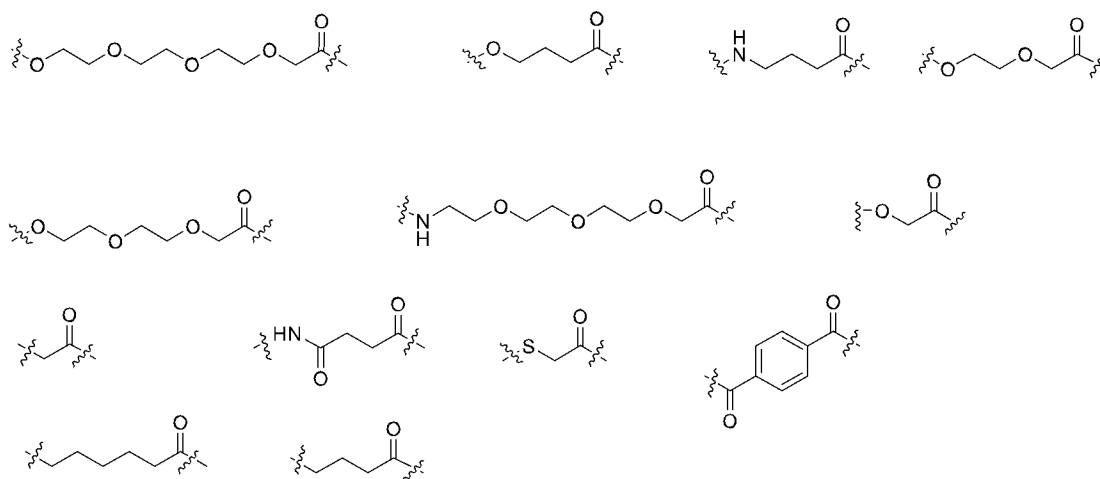
13. 权利要求 11 或 12 所述的方法, 其中



其中 q 为选自 1-10 的整数;

5 p 为选自 1-20 的整数;

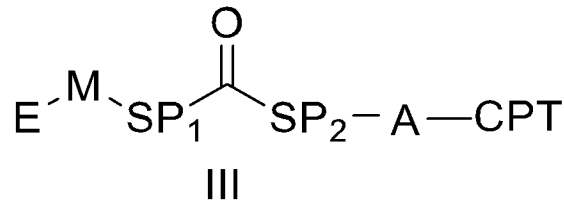
优选地,  选自



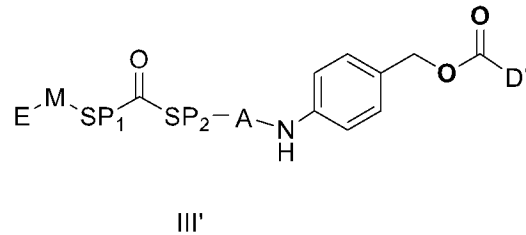
10 14. 权利要求 11-13 中任何一项所述的方法, 其中 D 选自喜树碱类化合物、加利车霉素 (calicheamicin)、美登木素生物碱 (maytansinoids)、多拉司他汀 (dolastatin)、澳瑞他汀类化合物和单端孢霉素 (trichothecene);

15 优选地, 所述美登木素衍生物选自 DM1、DM3 和 DM4; 所述澳瑞他汀类化合物选自 MMAE 和 MMAF; 所述喜树碱类化合物选自喜树碱、10-羟基喜树碱、依喜替康、SN-38、托泊替康和喜树碱类衍生物。

15. 权利要求 11-14 中任何一项所述的方法, 其中, 含药连接子为式 III 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药,

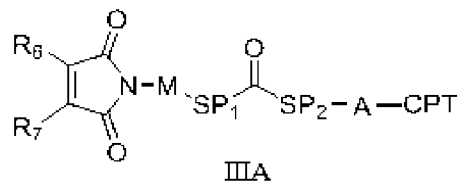


其中 E、M、SP₁、SP₂ 和 A 如权利要求 11-14 之一所定义，CPT 为喜树碱类化合物；或者为式 III' 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，

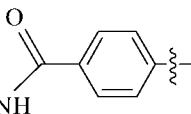
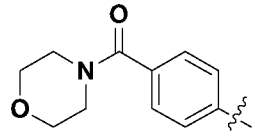


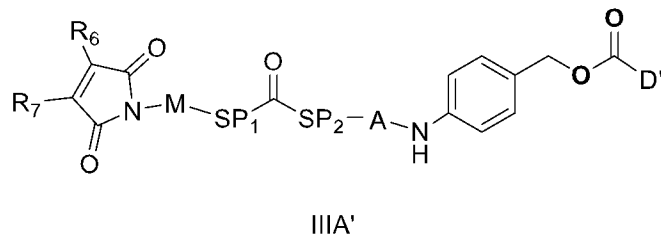
其中 E、M、SP₁、SP₂ 和 A 如权利要求 11-14 之一所定义，D' 为溴瑞他汀类化合物。

16. 权利要求 15 所述的方法，其中式 III 化合物进一步为式 IIIA 化合物：



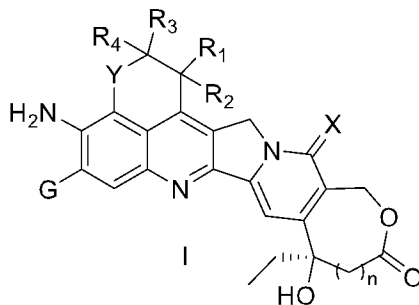
其中，R₆、R₇ 独立地为卤素或 Ar'S-，Ar' 为苯基或由一个或多个取代基取代的苯基，在取代的苯基中，所述取代基选自烷基（例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基）、烷氧基（例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基，优选甲氧基）、5-6 元杂环基-CO-、卤素、酯基、酰胺基和氰基，优选地，Ar' 为苯

15 基、4-甲基氨基甲酰基苯基()或 4-吗啉代甲酰基苯基(), 其中 M、SP₁、SP₂、A 和 CPT 如权利要求 15 中所定义；且 式 III' 化合物进一步为式 IIIA' 化合物：



其中 R₆、R₇、M、SP₁、SP₂、A 和 D' 如权利要求 15 中所定义。

17. 权利要求 15 或 16 所述的方法, 其中 CPT 为如下式 I 或式 IA 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药, 以及对应的具体化合物:



式 I

其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立地为氢、卤素、羟基、C1-6 烷氧基、氨基或取代氨基、C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基, 或者 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 中的任意两个连同它们所连接的碳原子构成 C3-6 环状烷基, 当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立地为 C1-6 烷氧基时, 所述 C1-6 烷氧基包括直链或支链的 C1-6 烷氧基, 优选地为直链或支链的 C1-3 烷氧基, 更优选甲氧基, 当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立地为取代氨基时, 所述取代氨基为由选自甲基和乙基的一个或多个取代基取代的氨基, 当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立地为 C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基时, 所述 C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基包括直链或支链的 C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基, 并且, 取代的 C1-7 烷基为由选自环丙基和环丁基的一个或多个取代基取代的 C1-7 烷基; 或者, 所述直链或支链的 C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基优选为 C1-3 烷基或取代的 C1-3 烷基, 例如甲基、卤代甲基 (优选三氟甲基);

G 为氢、卤素、甲基或甲氧基, 优选地, G 为氢、氟或氯;

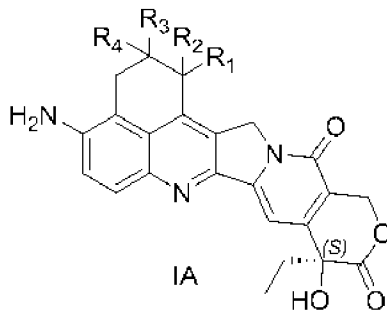
Y 为氧、硫、砷、亚砷、亚甲基或取代亚甲基, 取代亚甲基可以是亚甲基的一个氢被取代, 也可以是两个氢同时被取代, 取代基可以为苄基或烷基; 当取代基为烷基时, 所述烷基与 R_3 和/或 R_4 以及连同它们所连接的碳原子可以构成 C3-6 元并环或螺环的结构, 当 Y 为取代亚甲基时, 取代亚甲基的取代基优选为烷基, 更优选为直链或支链的 C1-4 烷基, 优选地,

Y 为氧、硫、砷或亚砷; 或者, 优选地, Y 为氧、硫或亚甲基;

X 为氧或硫; 且

$n=0$ 或 1;

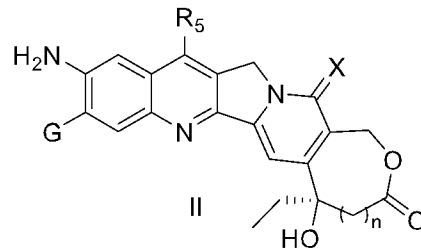
优选地, 式 I 所示的化合物进一步为式 IA 所示的化合物:



式 IA

式 IA 中, 基团 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 与式 I 中基团 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 的定义相同。

18. 权利要求 15 或 16 所述的方法，其中所述喜树碱类化合物为式 II 所示的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药：



式 II

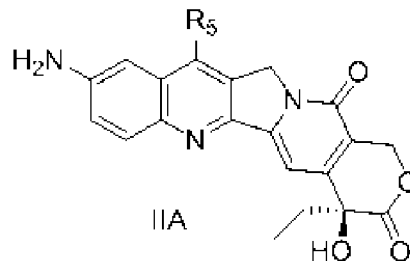
- 5 其中 R_5 为 C1-5 烷基或由一个或多个取代基取代的 C1-5 烷基、C3-6 环状烷基或由一个或多个取代基取代的 C3-6 环状烷基、苯基或取代苯基，当 R_5 为 C1-5 烷基或取代的 C1-5 烷基时，所述 C1-5 烷基包括直链或支链的 C1-5 烷基，进一步地， R_5 为 C1-4 直链烷基，当 R_5 为取代的 C1-5 烷基或取代的 C3-6 环状烷基时，取代基选自卤素、羟基、甲氧基、三氟甲基、氨基或取代氨基、甲磺酰基和 C3-6 环状烷基；并且其中，取代氨基为由选自甲基和乙基的一个或多个取代基取代的氨基，当 R_5 为取代苯基时，取代基选自烷基（例如 C1-6 烷基、优选 C1-3）或卤素；

G 为氢、卤素（例如氟）、甲基或甲氧基，优选地，G 为氢、氟或氯；

X 为氧或硫；且

$n=0$ 或 1；

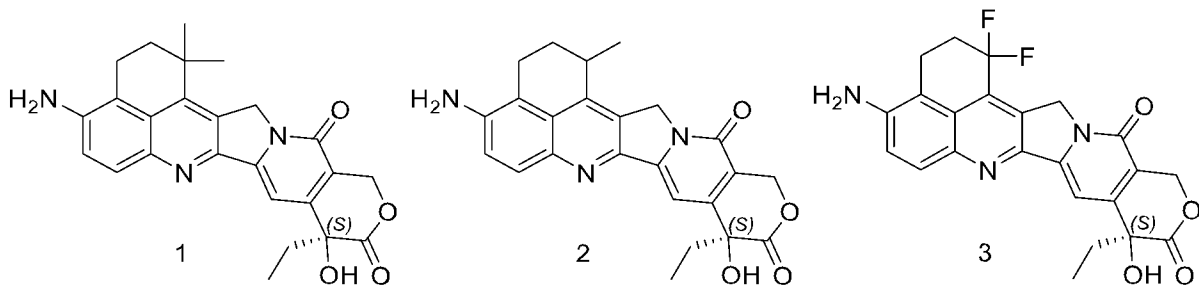
- 15 优选地，式 II 所示的化合物进一步为式 IIA 所示的化合物：

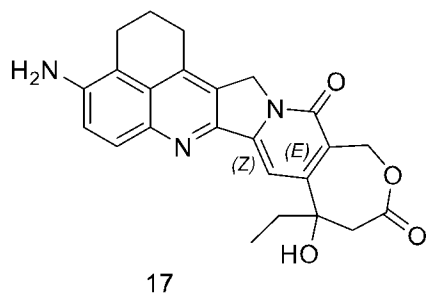
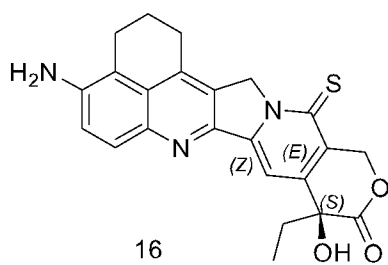
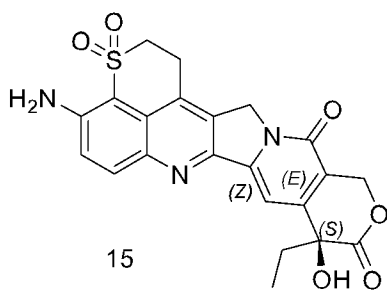
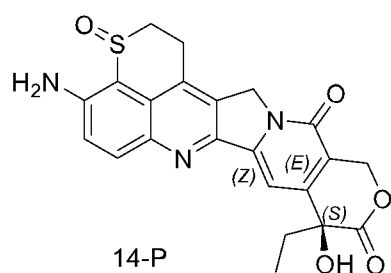
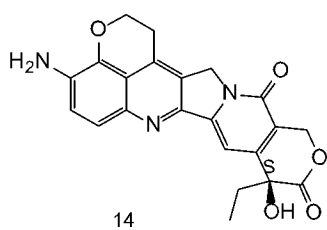
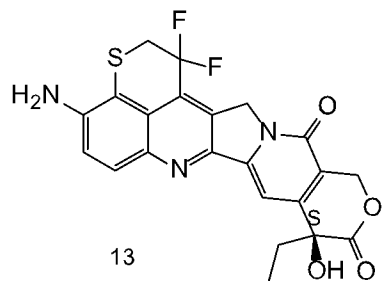
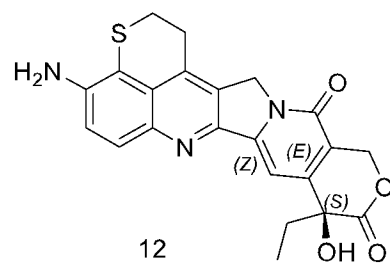
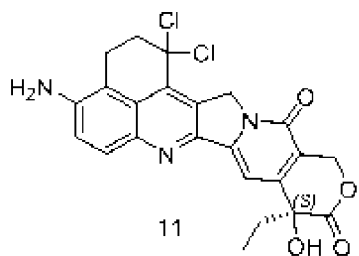
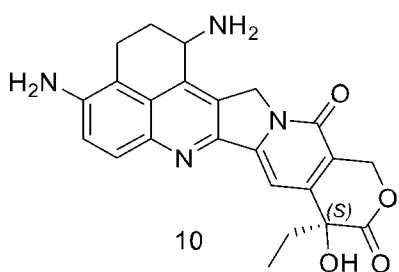
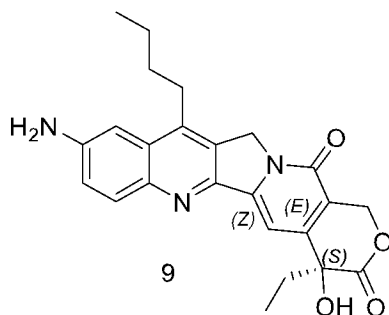
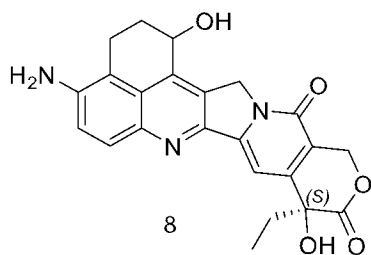
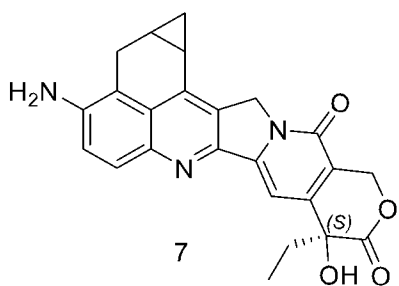
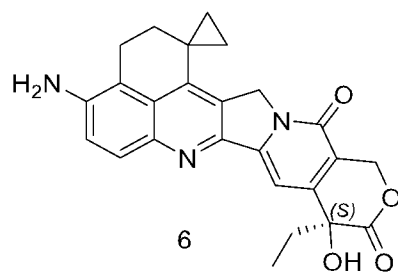
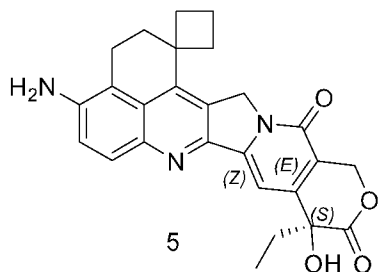
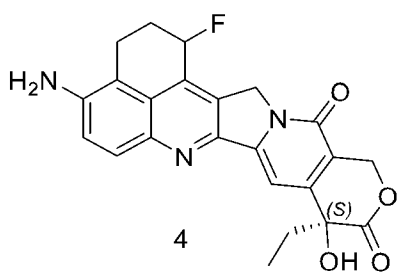


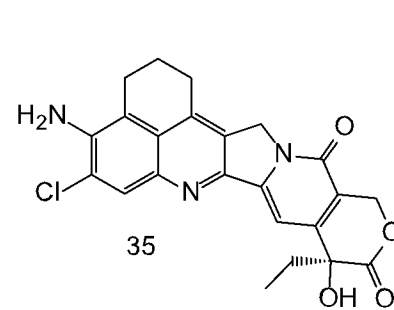
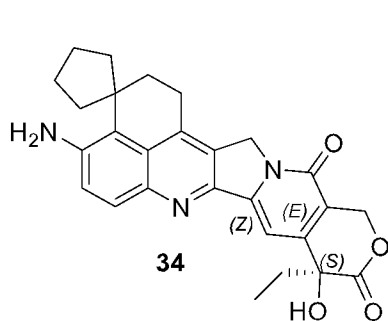
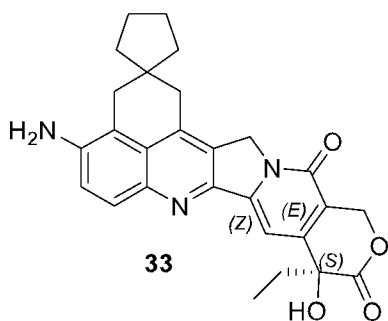
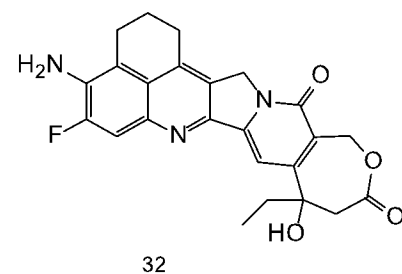
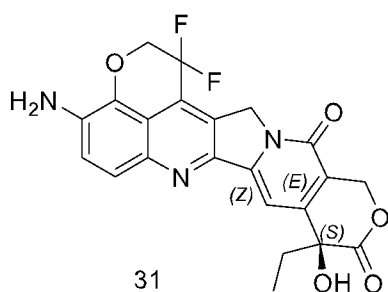
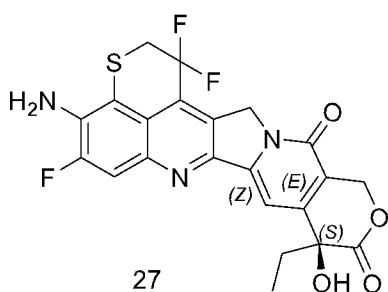
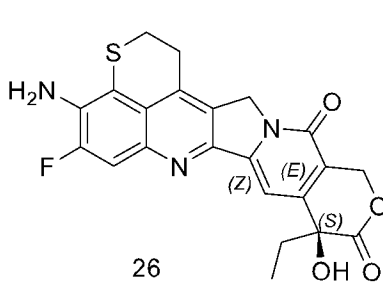
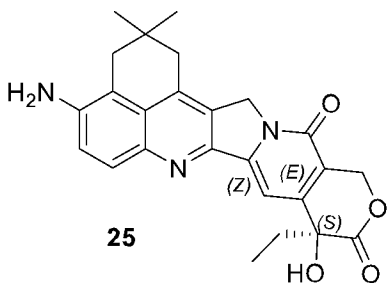
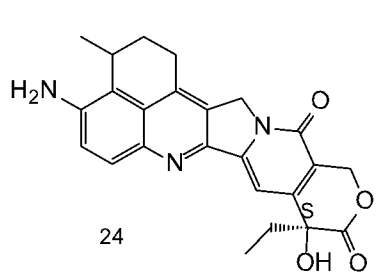
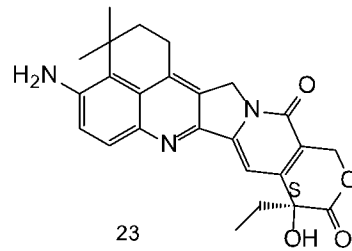
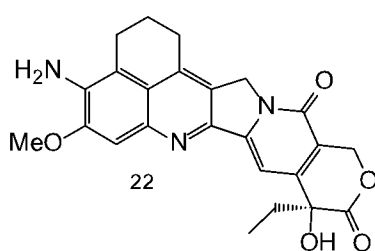
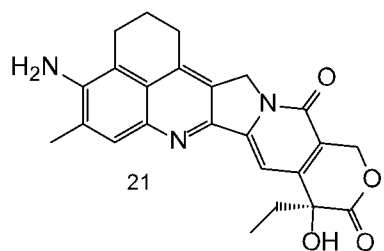
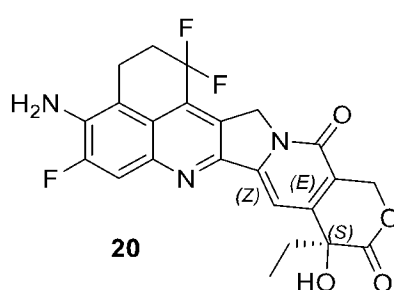
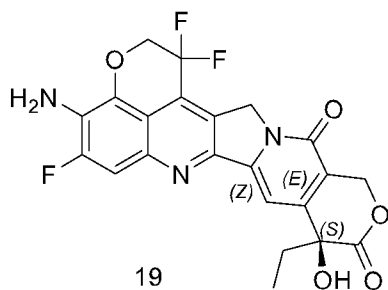
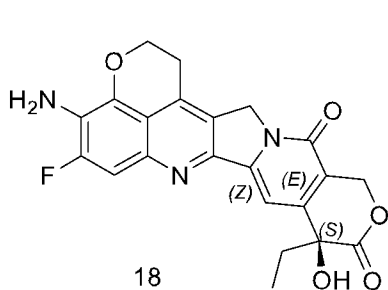
式 IIA

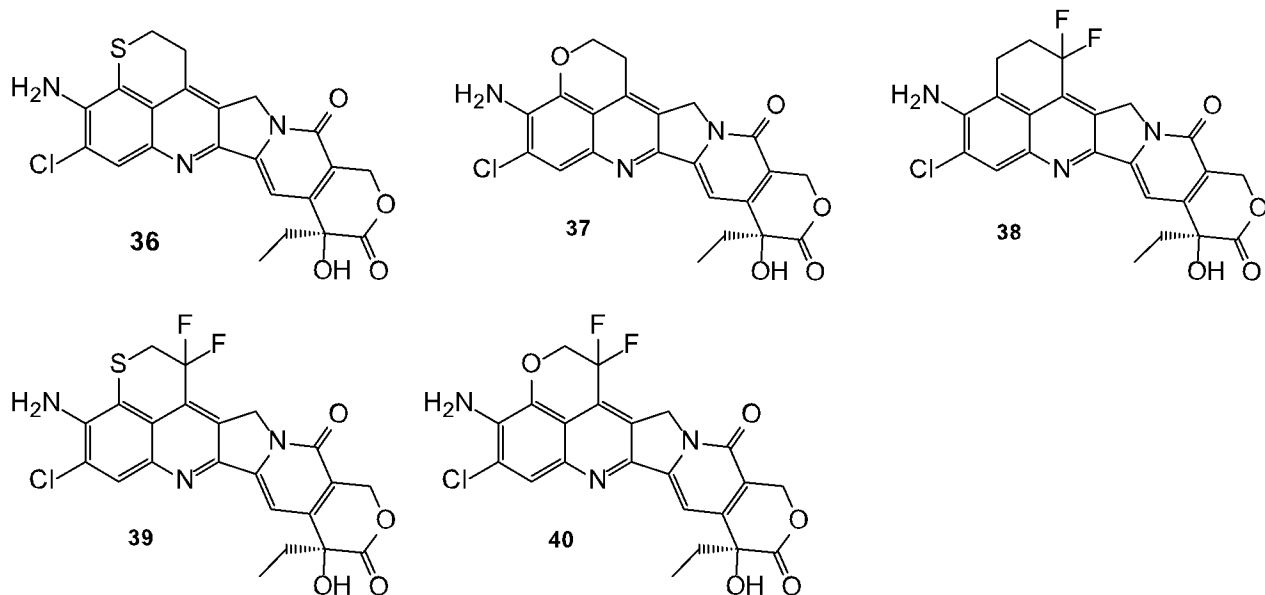
式 IIA 中，基团 R_5 与式 II 中基团 R_5 的定义相同。

19. 权利要求 15 或 16 所述的方法，其中，所述喜树碱类化合物（CPT）具有如下结构：



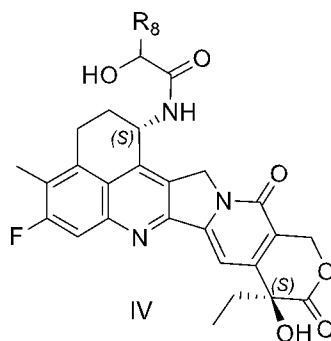






20. 权利要求 14-19 中任一项所述的方法，其中喜树碱类化合物的氨基与 A 的羧基形成了酰胺键。

5 21. 权利要求 15-20 中任一项所述的方法，其中 CPT 为式 IV 所示的依喜替康衍生物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药：

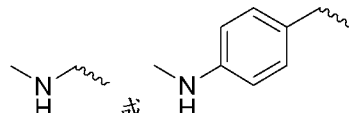


式 IV

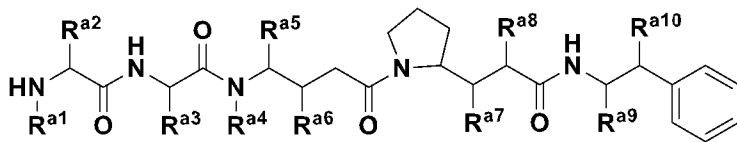
10 其中 R_8 为氢、三氟甲基、C1-5 烷基或由一个或多个取代基取代的 C1-5 烷基、C3-6 环状烷基或由一个或多个取代基取代的 C3-6 环状烷基、或卤素；

当 R_8 为取代的 C1-5 烷基或取代的 C3-6 环状烷基时，所述取代基选自卤素、羟基、甲氧基、三氟甲基、氨基或取代氨基、甲磺酰基和 C3-6 环状烷基；并且其中，取代氨基为由选自甲基和乙基的一个或多个取代基取代的氨基；

优选地，式 IV 所示的化合物经由其与 R_8 连接于同一个碳的羟基（参见式 IV）与 A 的羧

15 基通过自释放结构相连，该自释放结构例如（），实线表示与式 III 或式 IIIA 中 A 的羧基连接的位点，波浪线表示与式 IV 中羟基连接的位点。

22. 权利要求 15-21 中任一项所述的方法，其中，在式 III' 和式 IIIA' 中，D' 为如下式 I' 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，以及对应的具体化合物：



I'

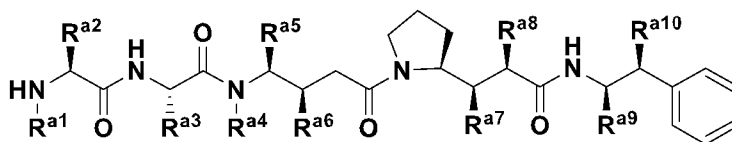
其中 R^{a1} 、 R^{a2} 、 R^{a3} 、 R^{a4} 、 R^{a5} 和 R^{a8} 各自独立的选自 C_{1-8} 烷基；优选 C_{1-4} 烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

5 R^{a6} 和 R^{a7} 各自独立地选自 C_{1-8} 烷氧基，例如甲氧基、乙氧基或丙氧基；

R^{a9} 选自 C_{1-8} 烷基和 $COOH$ ；优选 C_{1-4} 烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

R^{a10} 选自 OH 和 H ；

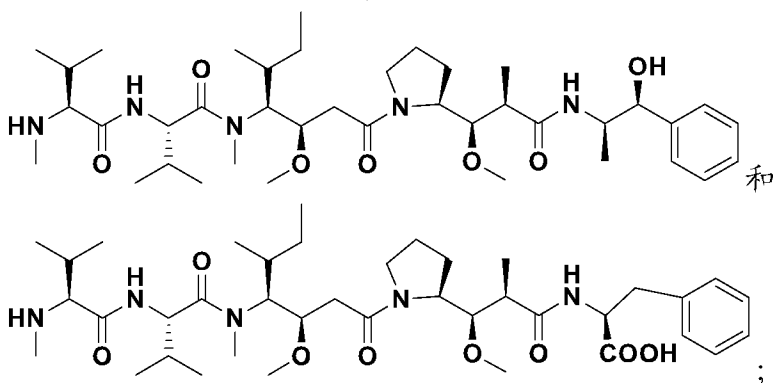
10 优选地，式 I' 化合物进一步为式 IA' 化合物：



IA'

其中 R^{a1} - R^{a10} 如对式 I' 中所定义；

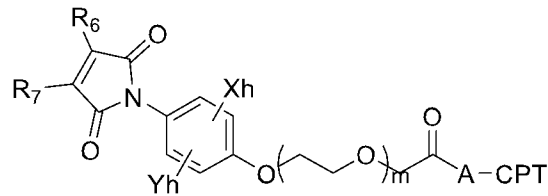
更优选地，式 I' 化合物选自：



优选地，在 III' 和式 IIIA' 中，式 I' 所示化合物的左侧仲氨基与式 III' 或 IIIA' 中 A 的羧基形成酰胺键。

23. 权利要求 15-22 中任一项所述的方法，其中

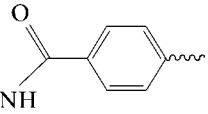
式 III 和式 IIIA 所示的化合物进一步为式 V 所示的化合物，

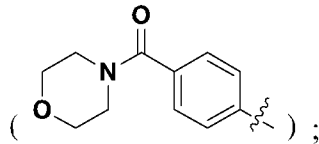


V

式 V

式 V 中, R_6 、 R_7 独立地为 $Ar'S$, Ar' 为苯基或由一个或多个取代基取代的苯基, 在取代的苯基中, 取代基选自烷基 (例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷

氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 优选甲氧基)、5-6 元杂环基-CO-、卤素、酯基、酰胺基和氰基, 优选地, Ar' 为苯基、4-甲基氨基甲酰基苯基 (—NH—) 或 4-吗啉代甲酰基苯基

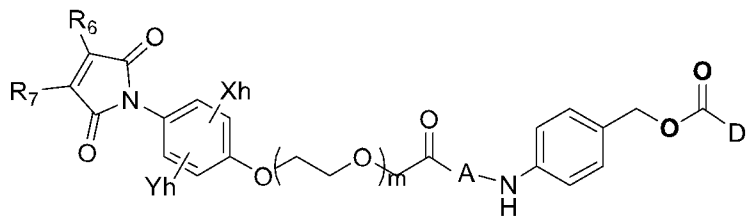


Xh 和 Yh 独立地为氢、卤素、卤代烷基 (例如卤代 C1-C6 烷基、优选卤代 C1-C4 烷基, 例如三氟甲基) 或烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 例如甲氧基);

m 为 1~10 的整数;

A 和 CPT 如权利要求 15-22 之一所定义;

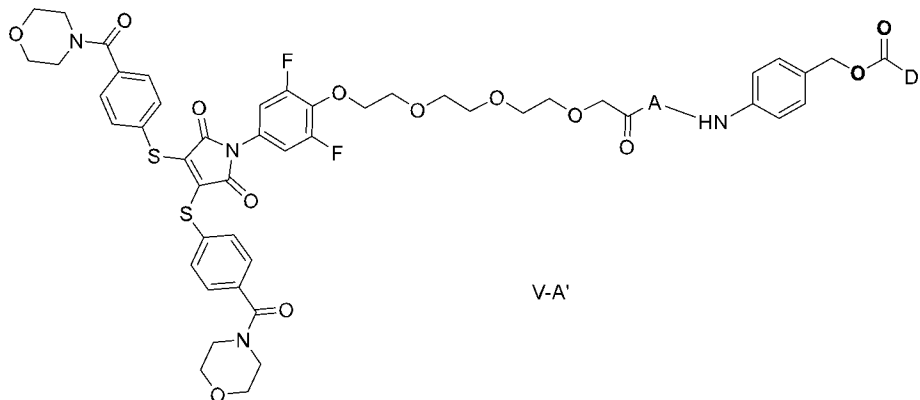
且式 IIIA' 化合物进一步为式 V' 化合物,



V'

其中 R^6 、 R^7 、 Xh 、 Yh 、 m 、 A 和 D' 如权利要求 16-22 之一所定义;

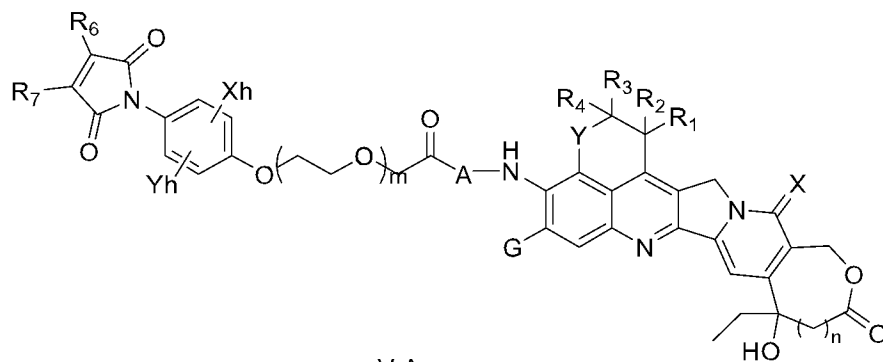
优选地, 式 V' 化合物进一步为式 V-A' 化合物,



V-A'

其中 A 和 D' 如权利要求 16-22 之一所定义。

24. 权利要求 23 所述的方法，其中，式 V 所示的化合物进一步为式 V-A 所示的化合物：

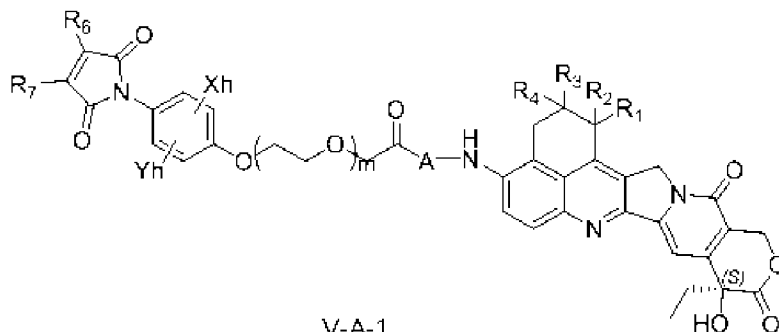


V-A

式 V-A

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

优选地，式 V-A 所示的化合物进一步为式 V-A-1 所示的化合物：

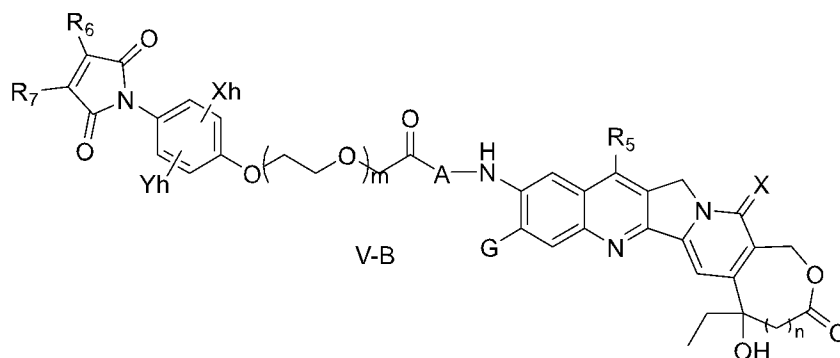


V-A-1

式 V-A-1

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

或者，式 V 所示的化合物进一步为式 V-B 所示的化合物：

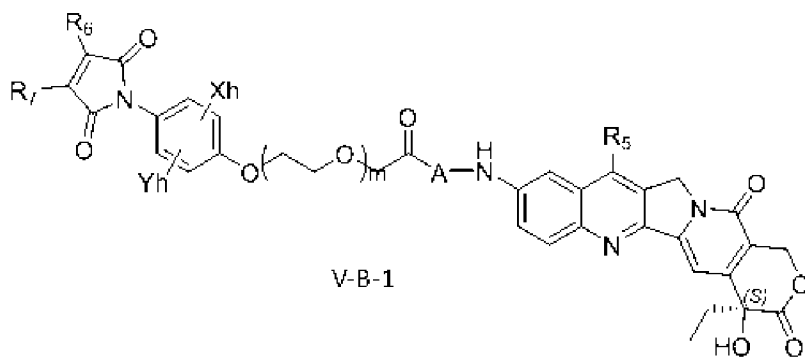


V-B

式 V-B

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

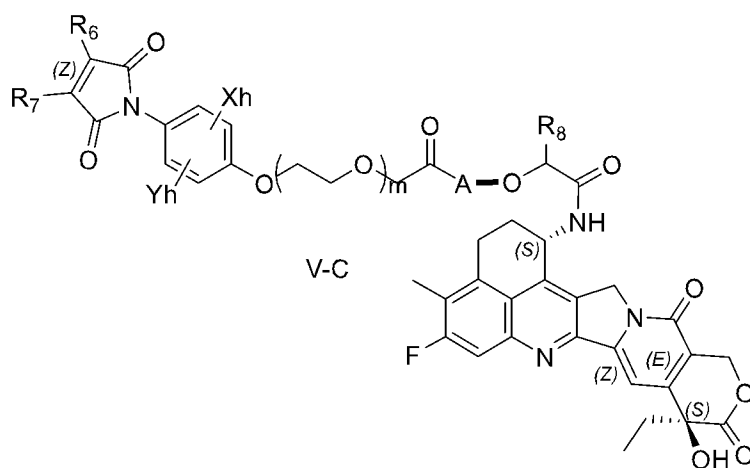
优选地，式 V-B 所示的化合物进一步为式 V-B-1 所示的化合物：



式 V-B-1

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

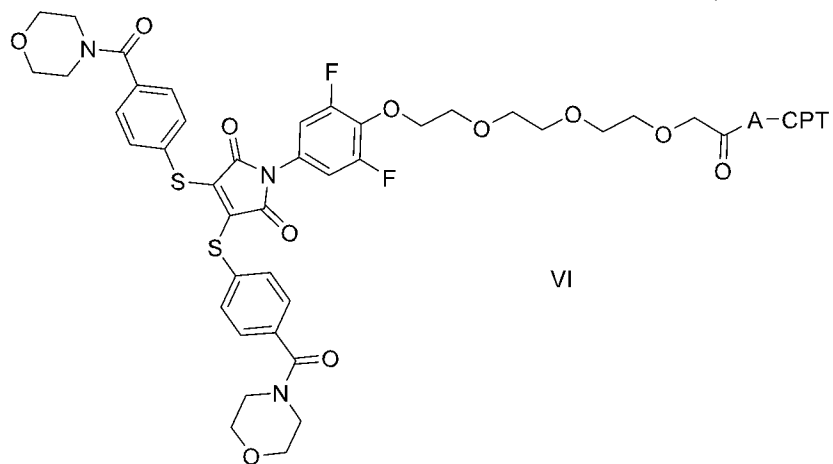
或者，式 V 所示的化合物进一步为式 V-C 所示的化合物：



式 V-C

其中各变量如权利要求 23 中所定义。

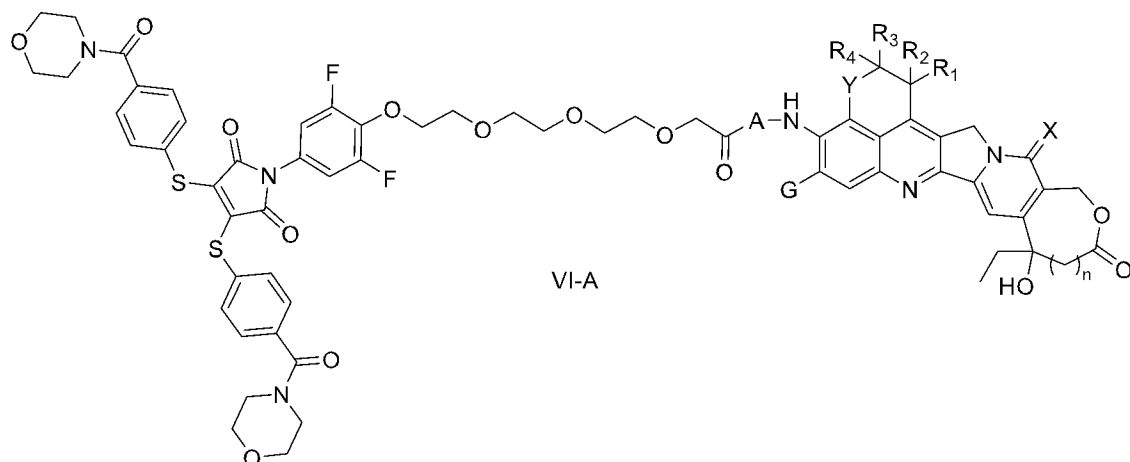
25. 根据权利要求 23 所述的方法，其中式 V 所示的化合物进一步为式 VI 所示的化合物：



式 VI

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

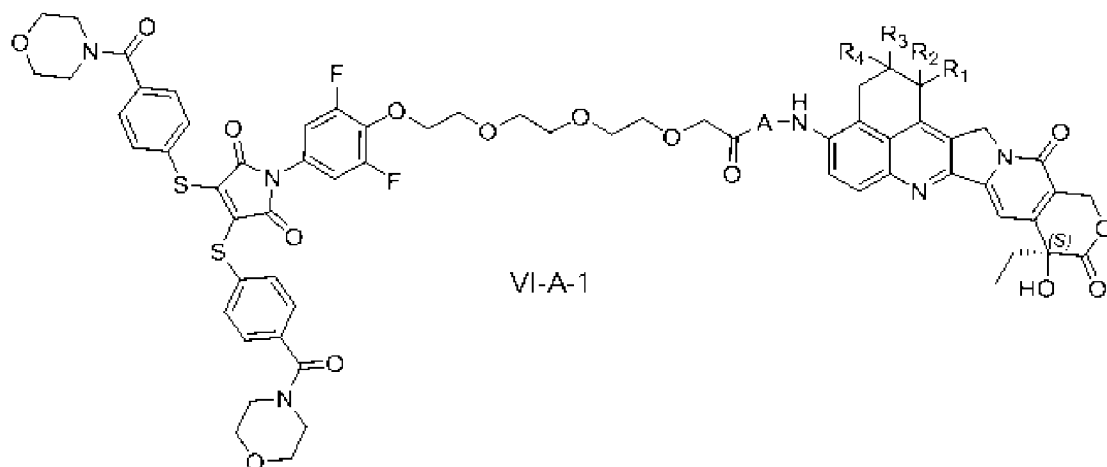
优选地，式 VI 所示的化合物进一步为式 VI-A 所示的化合物：



式 VI-A

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

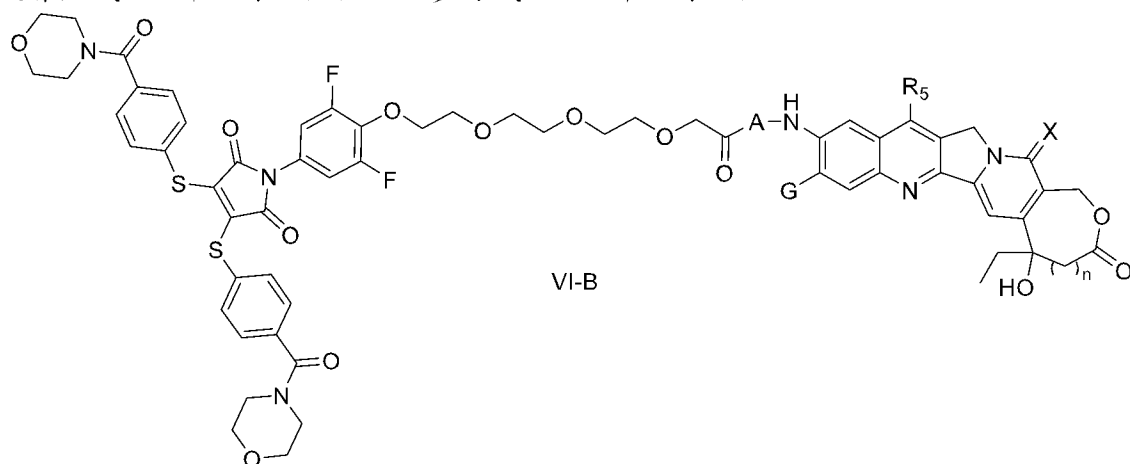
优选地，式 VI-A 所示的化合物进一步为式 VI-A-1 所示的化合物：



式 VI-A-1

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

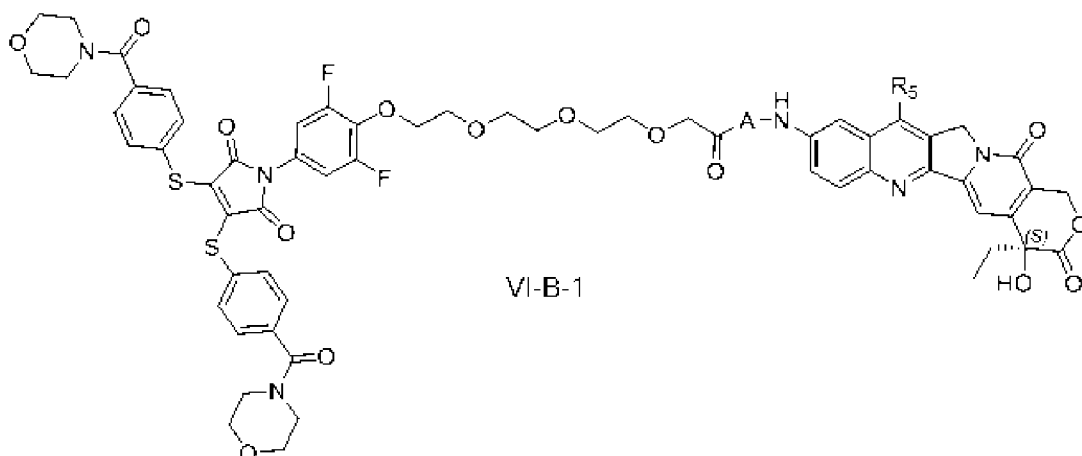
或者，式 VI 所示的化合物进一步为式 VI-B 所示的化合物：



式 VI-B

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

更优选地，式 VI-B 所示化合物进一步为式 VI-B-1 所示的化合物：

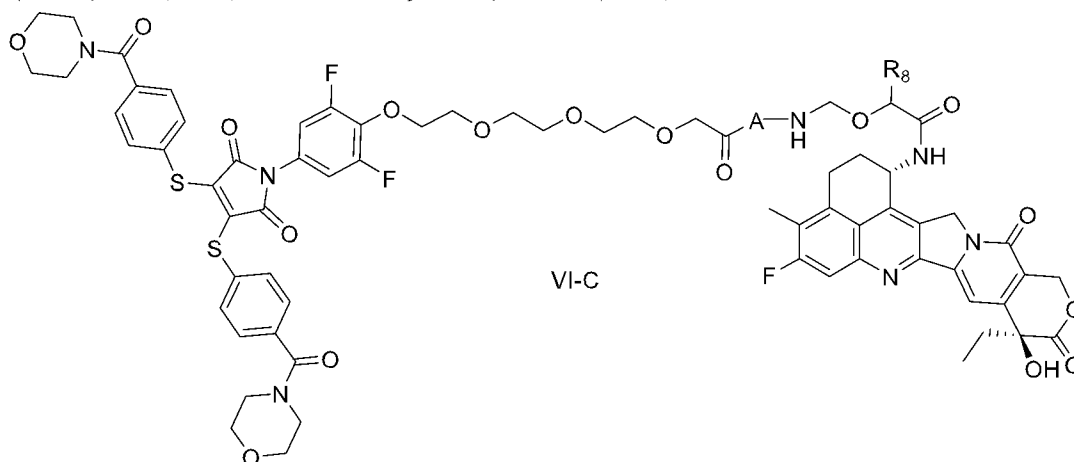


VI-B-1

式 VI-B-1

其中各变量如权利要求 23 中所定义；

5 或者，式 VI 所示的化合物进一步为式 VI-C 所示的化合物：



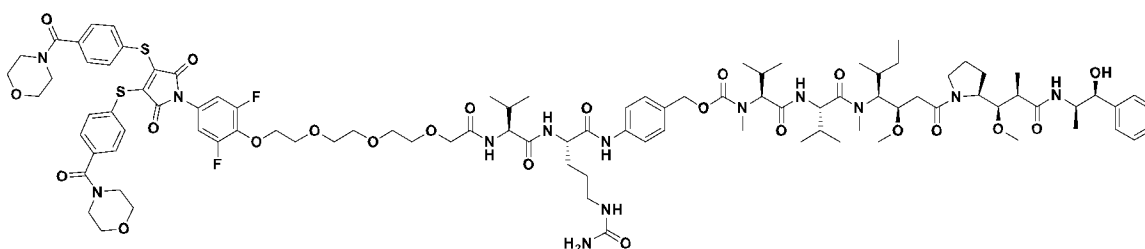
VI-C

式 VI-C

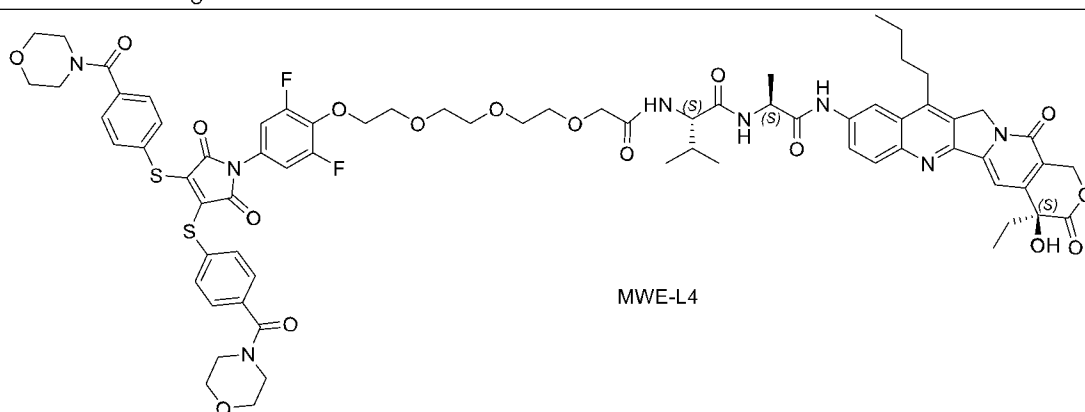
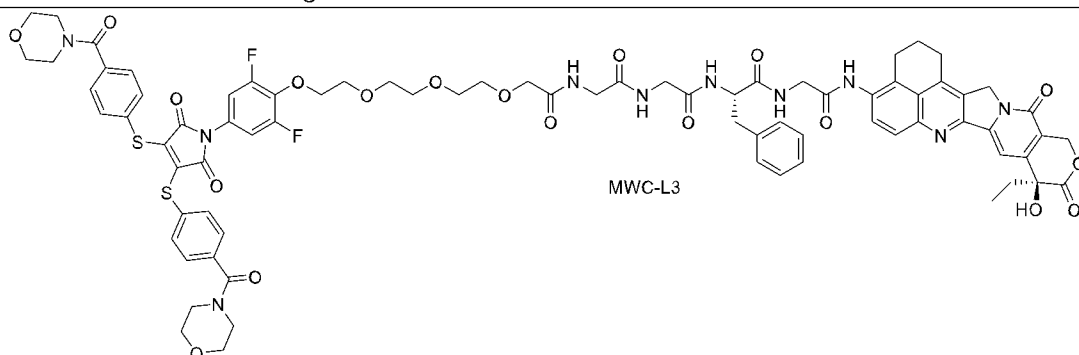
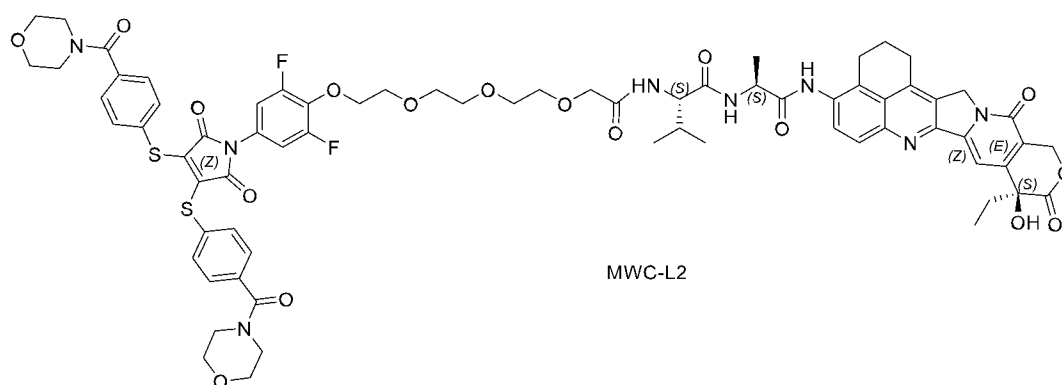
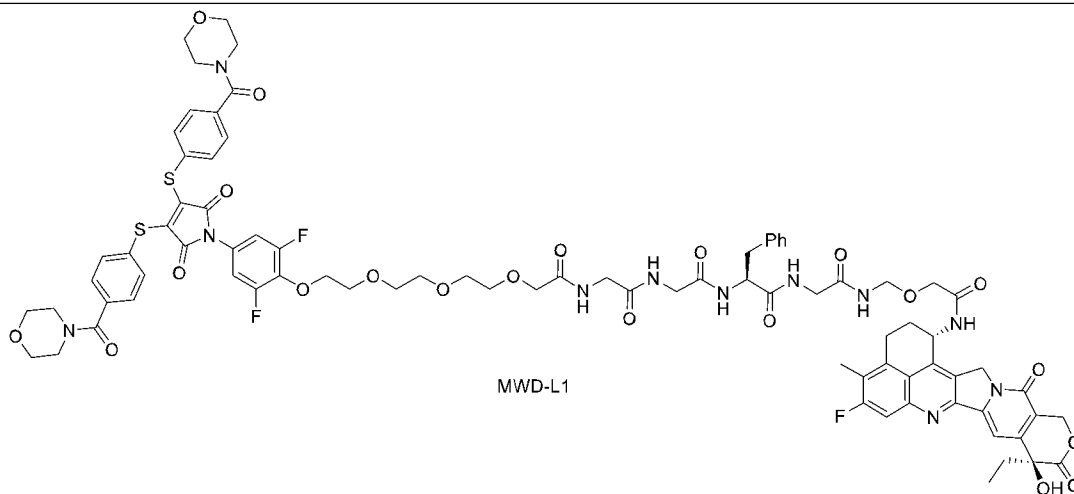
其中各变量如权利要求 23 中所定义

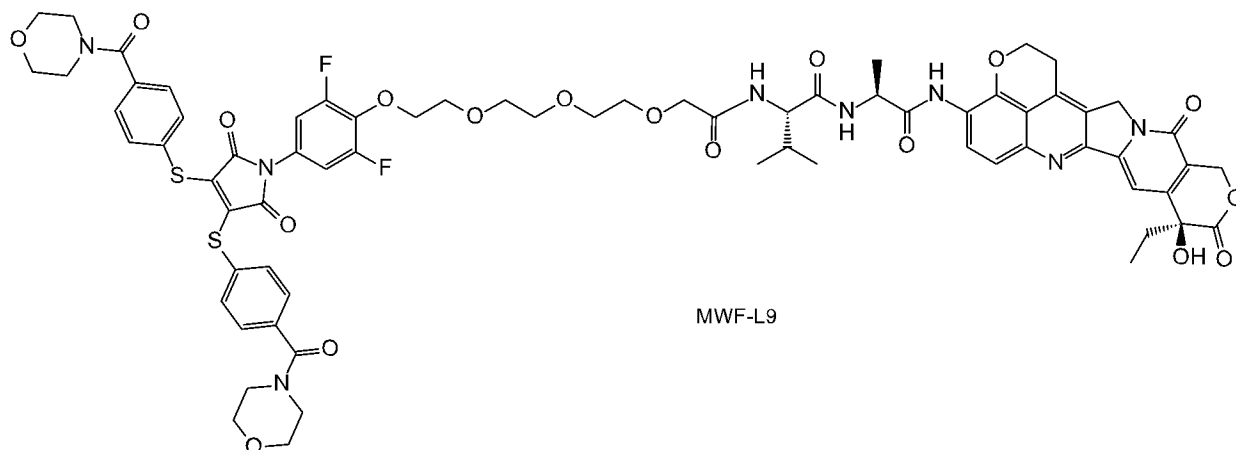
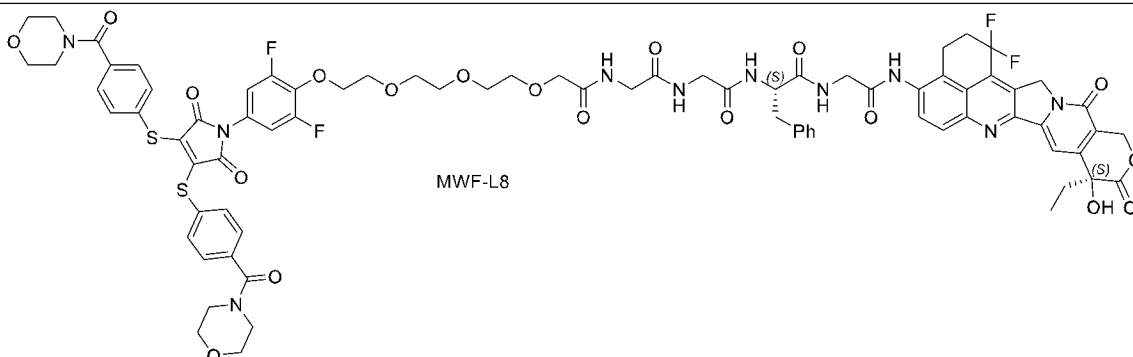
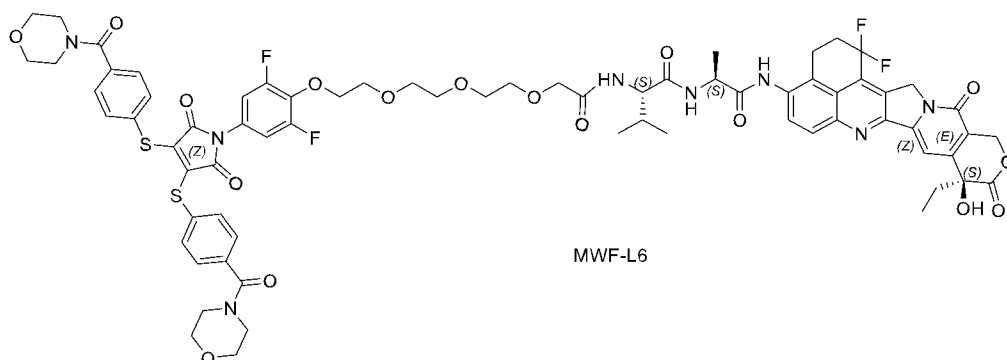
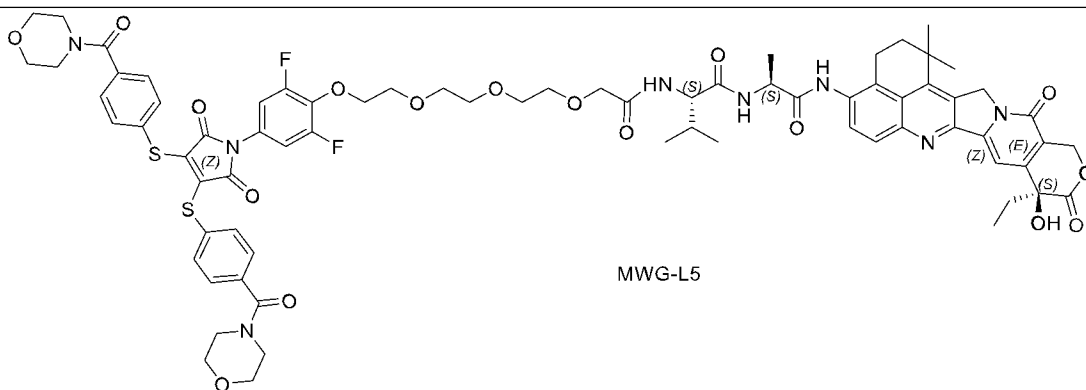
式 VI-C 中，基团 A、R₈ 的定义与上文式 III 或式 IIIA 中基团 A、R₈ 的定义相同。

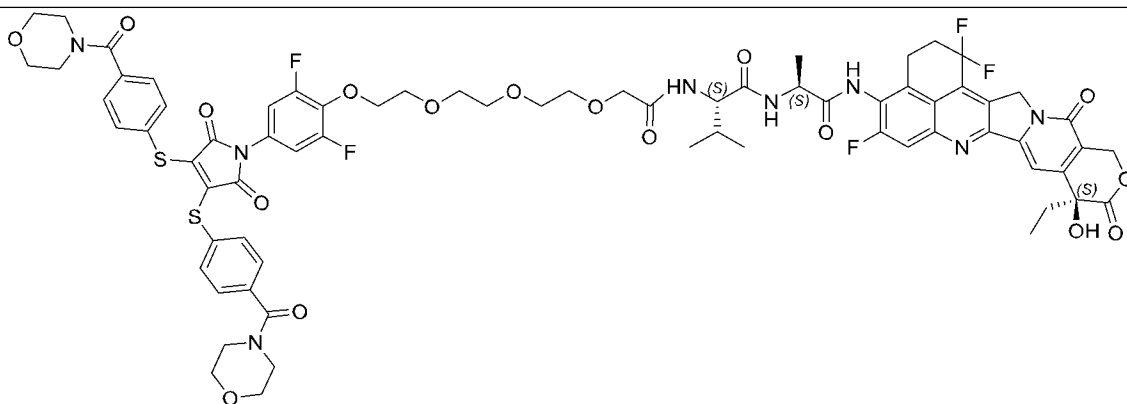
10 26. 根据权利要求 1-25 中任何一项所述的方法，其中所述含药连接器选自以下化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药：



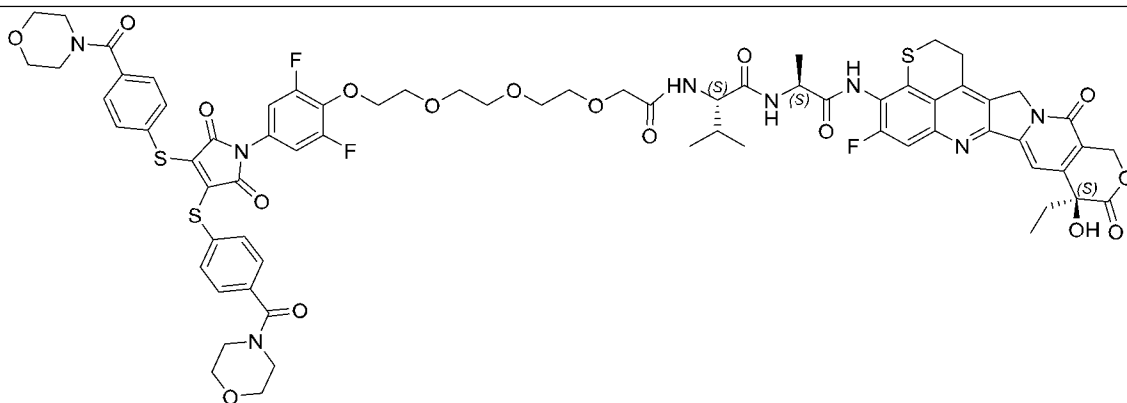
BL20E



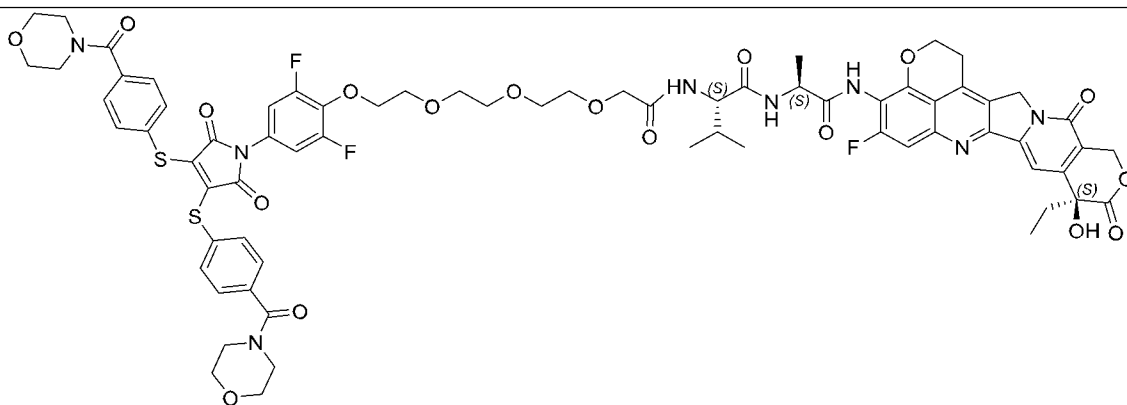




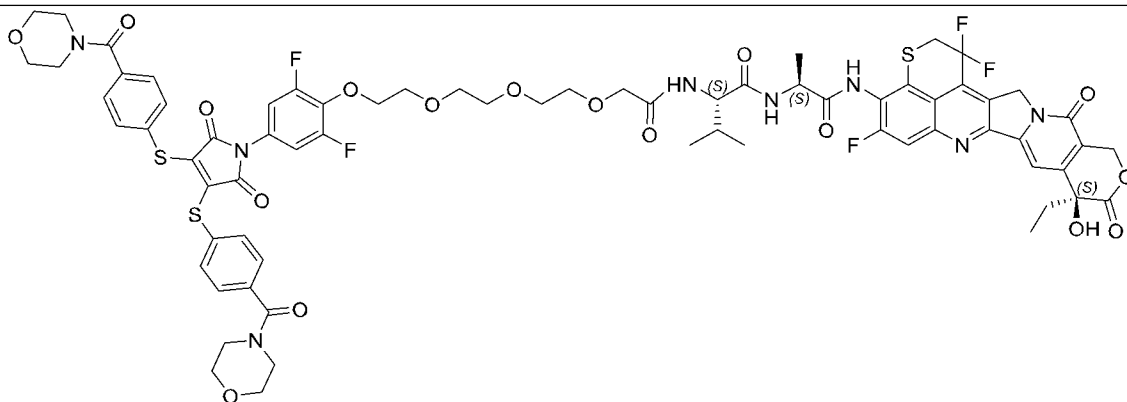
MWF-L10



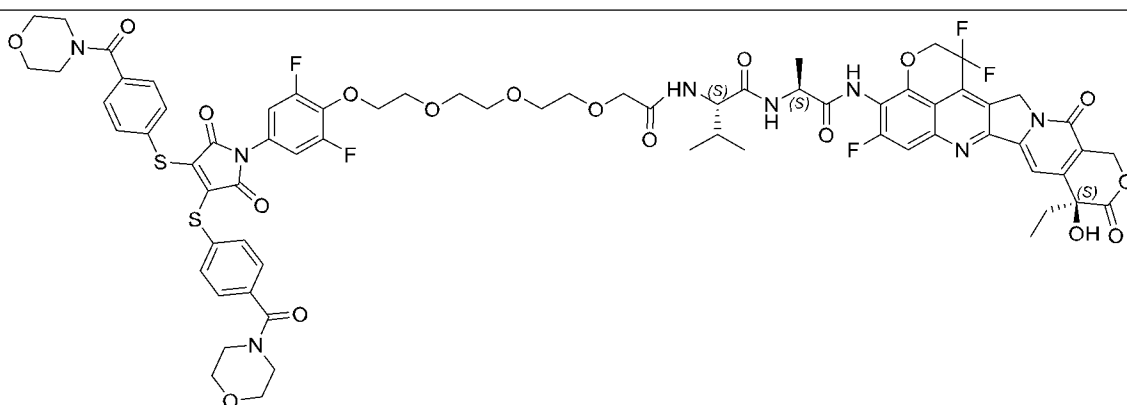
MWF-L11



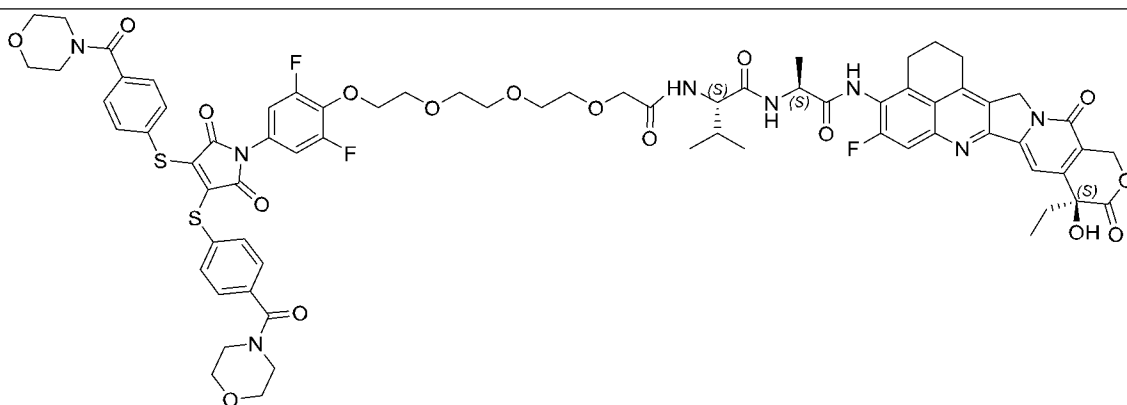
MWF-L12



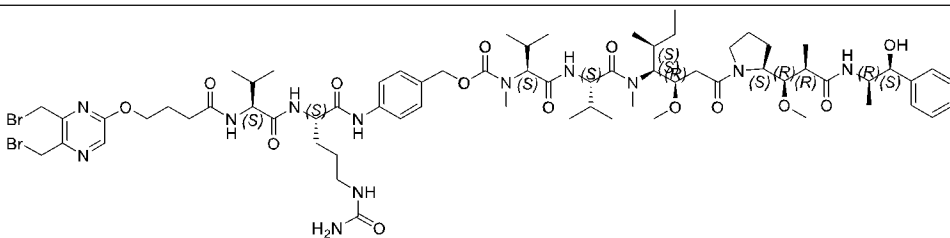
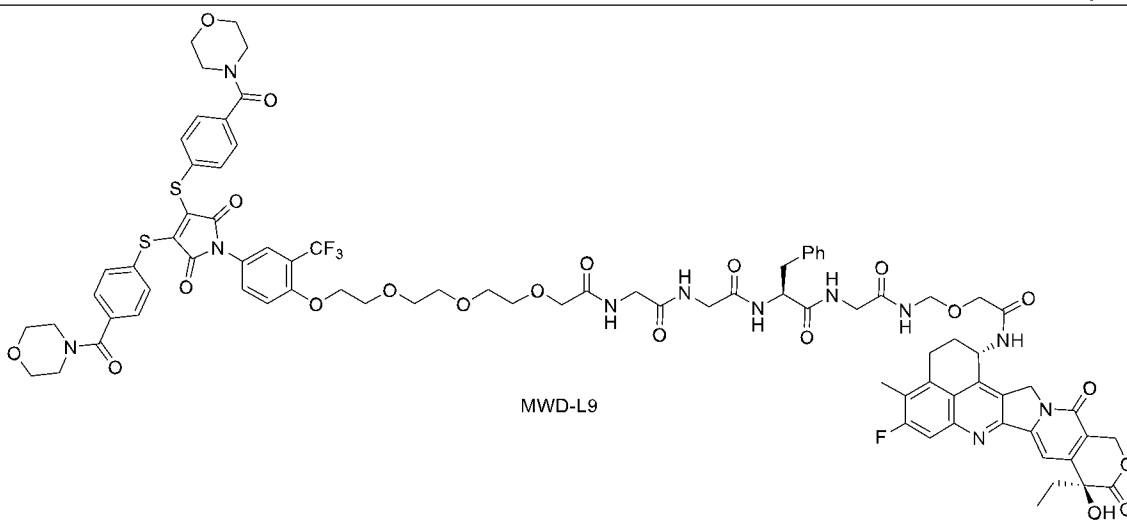
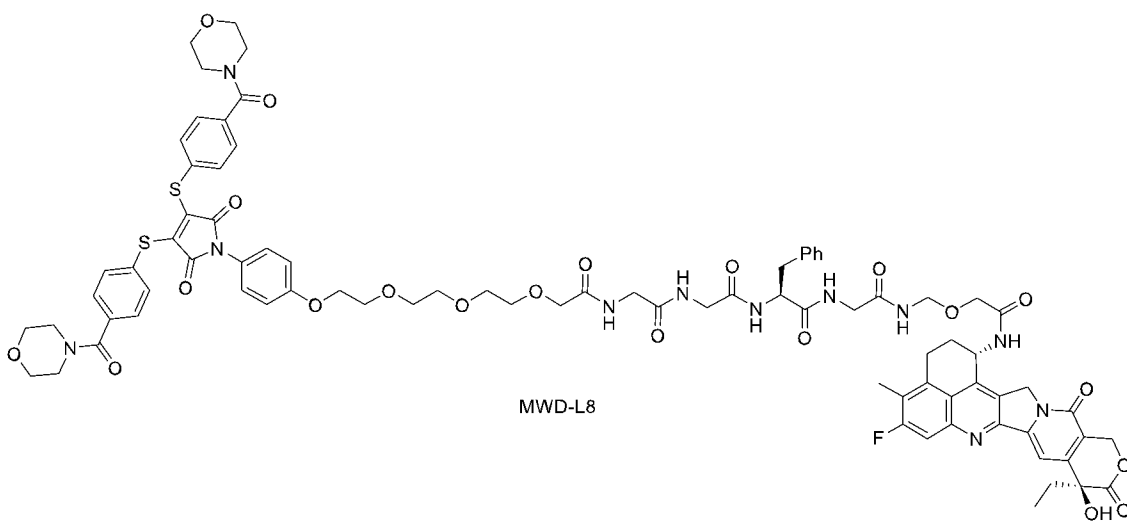
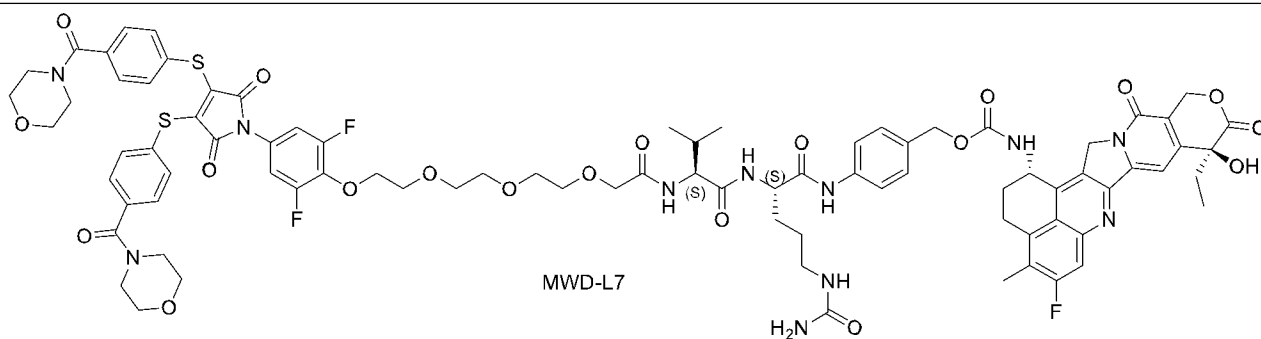
MWF-L13

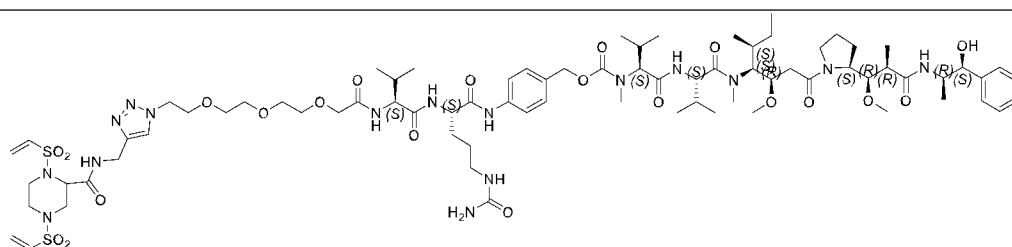
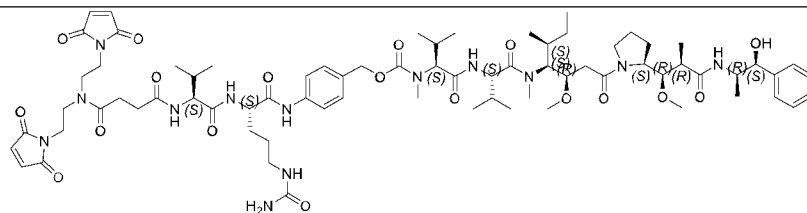


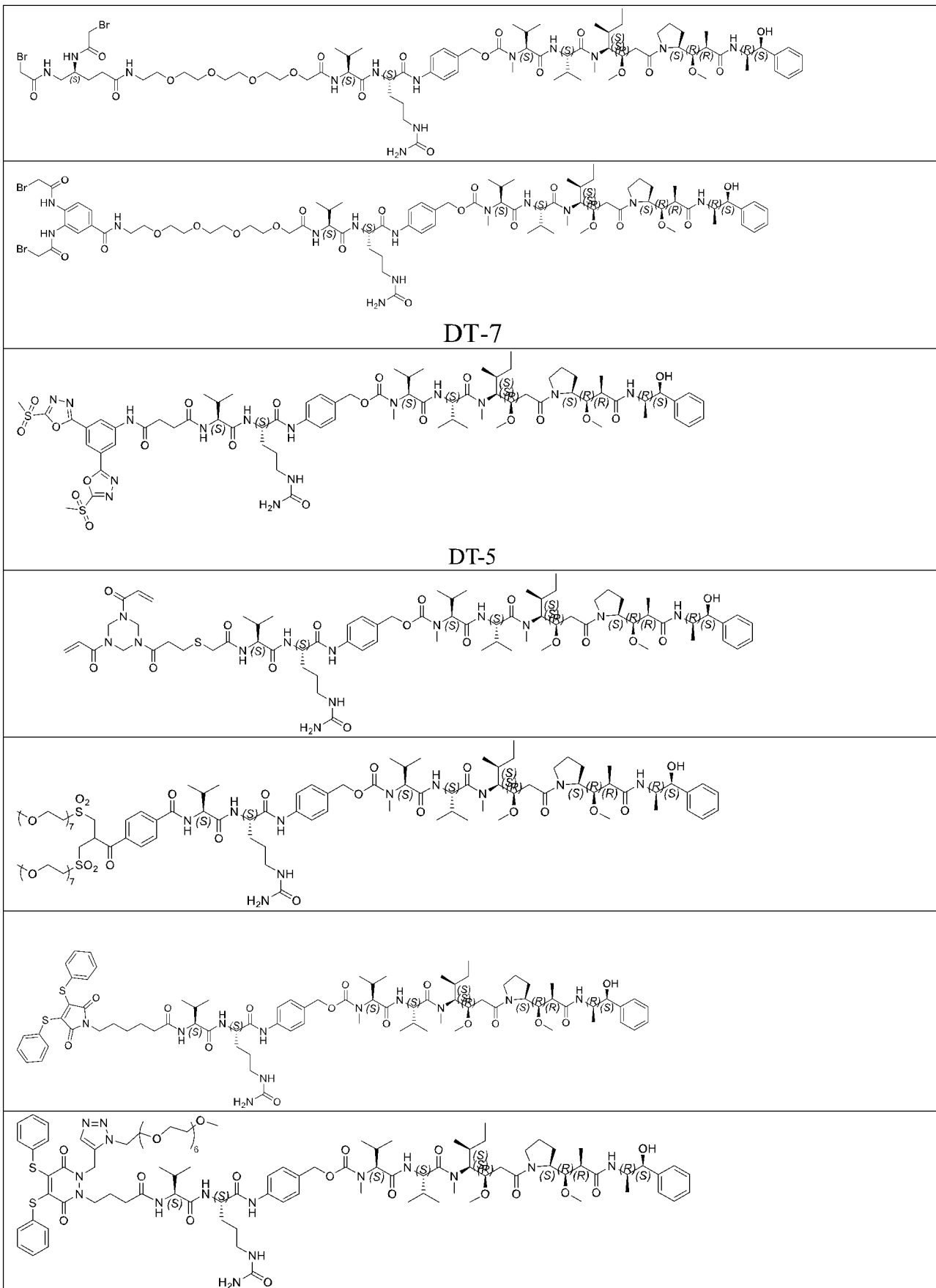
MWF-L14

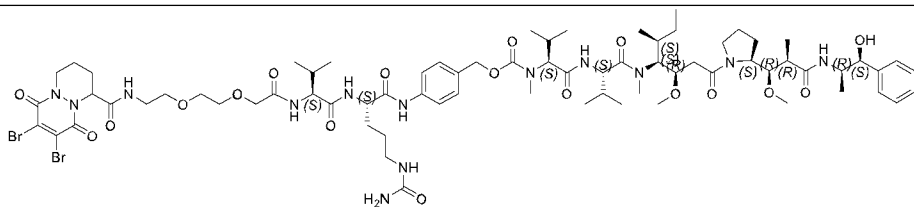


MWF-L15

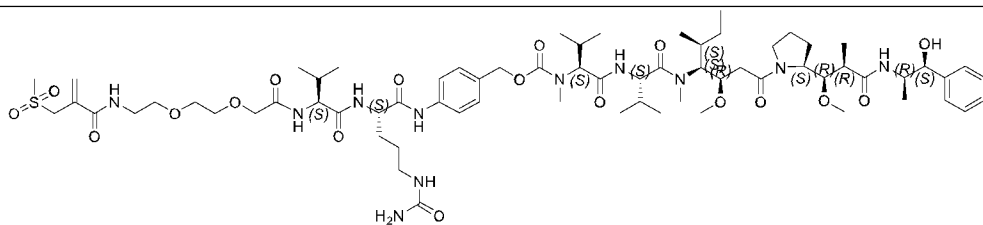








DT-6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/099341

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K47/68(2017.01)i; C07K16/00(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i; C07K1/20(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPABS; CNTXT; VEN; ENTXT; DWPI; CNKI; CJFD; 读秀, DUXIU; 万方, WANFANG; Elsevier; Pubmed; SpringerLink; ISI Web of Science; STNext: 抗体-药物偶联物, 抗体药物偶联物, 缓冲溶液, 缓冲液, 金属盐, 金属配合物, 过渡金属, 抗体, 连接子, 接头, 缀合, 偶联, 疏水作用色谱, 疏水性交互作用层析, 纯化, 均质性, 均一性, DAR2, DAR=2, D2, ADC, drug, conjugation, conjugate, antibody, metal, buffer, linker, homogeneity, homogeneousness, homogenous, Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC, purification, purify, Phenyl Sepharose, Butyl 650M		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 113423730 A (WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO., LTD.) 21 September 2021 (2021-09-21) description, paragraphs [0011], [0019]-[0027], [0032]-[0036], [0190], [0231] and [0242]	1-26
Y	CN 106729743 A (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 31 May 2017 (2017-05-31) description, paragraph [0007]	1-26
Y	CN 105899235 A (SYNTHON B.V.) 24 August 2016 (2016-08-24) abstract, and description, paragraphs [0045], [0048] and [0116]-[0120]	1-26
Y	CN 109600993 A (ABBVIE INC.) 09 April 2019 (2019-04-09) description, paragraphs [1006]-[1020]	1-26
Y	WO 2022078524 A2 (HANGZHOU DAC BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 21 April 2022 (2022-04-21) claims 1-5	1-26
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 August 2024		Date of mailing of the international search report 15 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/099341

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113423730	A	21 September 2021	JP	2022520260	A	29 March 2022
				JP	7232925	B2	03 March 2023
				WO	2020164561	A1	20 August 2020
				TW	202045540	A	16 December 2020
				TWI	756633	B	01 March 2022
				EP	3924378	A1	22 December 2021
				EP	3924378	A4	05 April 2023
				US	2022040321	A1	10 February 2022
				US	11478553	B2	25 October 2022
				KR	20210125034	A	15 October 2021
CN	106729743	A	31 May 2017	EA	201792590	A1	29 March 2019
				EA	039757	B1	10 March 2022
				US	2019076438	A1	14 March 2019
				PT	3381469	T	02 September 2021
				JP	2021152006	A	30 September 2021
				JP	7200454	B2	10 January 2023
				PL	3381469	T3	29 November 2021
				DK	3381469	T3	09 August 2021
				HK	1243957	B	04 October 2019
				HUE	055671	T2	28 December 2021
				ES	2887349	T3	22 December 2021
				US	2023293536	A1	21 September 2023
				EP	3381469	A1	03 October 2018
				EP	3381469	A4	31 July 2019
				EP	3381469	B1	30 June 2021
				JP	2019502650	A	31 January 2019
				JP	6888871	B2	16 June 2021
				WO	2017088734	A1	01 June 2017
				US	2021252006	A1	19 August 2021
				US	11903948	B2	20 February 2024
				CA	3000763	A1	01 June 2017
				KR	20180080128	A	11 July 2018
				AU	2016359514	A1	26 April 2018
CN	105899235	A	24 August 2016	MY	177390	A	14 September 2020
				WO	2015104359	A2	16 July 2015
				WO	2015104359	A3	11 September 2015
				ZA	201604531	B	25 July 2018
				CY	1120595	T1	11 December 2019
				AU	2015205574	A1	07 July 2016
				AU	2015205574	B2	15 August 2019
				LT	3092010	T	25 October 2018
				CL	2016001741	A1	12 May 2017
				HRP	20181525	T1	16 November 2018
				TR	201810856	T4	27 August 2018
				EP	3092010	A2	16 November 2016
				EP	3092010	B1	11 July 2018
				CA	2935456	A1	16 July 2015
				CA	2935456	C	18 September 2018
				ES	2687225	T3	24 October 2018
				US	2016324979	A1	10 November 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/099341

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				US	10266606	B2	23 April 2019		
				JP	2017502085	A	19 January 2017		
				JP	6419844	B2	07 November 2018		
				KR	20160106721	A	12 September 2016		
				KR	102323301	B1	09 November 2021		
				MX	2016009068	A	28 September 2016		
				PL	3092010	T3	31 January 2019		
				DK	3092010	T3	27 August 2018		
				PT	3092010	T	28 September 2018		
				SG	11201605605	SA	30 August 2016		
				RU	2016132634	A	16 February 2018		
				RU	2016132634	A3	05 September 2018		
				RU	2680404	C2	21 February 2019		

CN	109600993	A	09 April 2019	WO	2017214233	A1	14 December 2017		
				MX	2018015284	A	18 September 2019		
				US	2019153107	A1	23 May 2019		
				EP	3468615	A1	17 April 2019		
				US	2024199745	A1	20 June 2024		
				CA	3027173	A1	14 December 2017		
				EP	3888689	A1	06 October 2021		
				JP	2019521114	A	25 July 2019		
				AU	2017277422	A1	03 January 2019		
				BR	112018075639	A2	09 April 2019		

WO	2022078524	A2	21 April 2022	WO	2022078524	A3	25 August 2022		
				WO	2022078524	A4	08 December 2022		
				CA	3236754	A1	11 May 2023		
				WO	2023078021	A1	11 May 2023		
				CA	3236930	A1	21 April 2022		
				TW	202334217	A	01 September 2023		
				CA	3236852	A1	11 May 2023		
				KR	20240095442	A	25 June 2024		
				KR	20240095316	A	25 June 2024		
				WO	2023078273	A1	11 May 2023		
				AU	2022383265	A1	13 June 2024		
				AU	2022381163	A1	13 June 2024		
				AU	2021362997	A1	16 May 2024		

A. 主题的分类

A61K47/68(2017.01)i; C07K16/00(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i; C07K1/20(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPABS;CNTXT;VEN;ENTXT;DWPI;CNKI;CJFD;读秀;万方;Elsevier;Pubmed;SpringerLink;ISI Web of Science;STNext;抗体-药物偶联物, 抗体药物偶联物, 缓冲溶液, 缓冲液, 金属盐, 金属配合物, 过渡金属, 抗体, 连接子, 接头, 缀合, 偶联, 疏水作用色谱, 疏水性交互作用层析, 纯化, 均质性, 均一性, DAR2, DAR=2, D2, ADC, drug, conjugation, conjugate, antibody, metal, buffer, linker, homogeneity, homogeneousness, homogenous, Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC, purification, purify, Phenyl Sepharose, Butyl 650M

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 113423730 A (上海药明生物技术有限公司) 2021年9月21日 (2021 - 09 - 21) 说明书第[0011]、[0019]– [0027]、[0032]– [0036]、[0190]、[0231]、[0242]段	1–26
Y	CN 106729743 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2017年5月31日 (2017 - 05 - 31) 说明书第[0007]段	1–26
Y	CN 105899235 A (斯索恩生物制药有限公司) 2016年8月24日 (2016 - 08 - 24) 摘要, 说明书第[0045]、[0048]、[0116]–[0120]段	1–26
Y	CN 109600993 A (艾伯维公司) 2019年4月9日 (2019 - 04 - 09) 说明书第[1006]–[1020]段	1–26
Y	WO 2022078524 A2 (HANGZHOU DAC BIOTECH CO LTD) 2022年4月21日 (2022 - 04 - 21) 权利要求1–5	1–26

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年8月19日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月15日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

于秀培

电话号码 (+86) 0512-88996497

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/099341

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113423730	A	2021年9月21日	JP	2022520260	A	2022年3月29日
				JP	7232925	B2	2023年3月3日
				WO	2020164561	A1	2020年8月20日
				TW	202045540	A	2020年12月16日
				TWI	756633	B	2022年3月1日
				EP	3924378	A1	2021年12月22日
				EP	3924378	A4	2023年4月5日
				US	2022040321	A1	2022年2月10日
				US	11478553	B2	2022年10月25日
				KR	20210125034	A	2021年10月15日
CN	106729743	A	2017年5月31日	EA	201792590	A1	2019年3月29日
				EA	039757	B1	2022年3月10日
				US	2019076438	A1	2019年3月14日
				PT	3381469	T	2021年9月2日
				JP	2021152006	A	2021年9月30日
				JP	7200454	B2	2023年1月10日
				PL	3381469	T3	2021年11月29日
				DK	3381469	T3	2021年8月9日
				HK	1243957	B	2019年10月4日
				HUE	055671	T2	2021年12月28日
				ES	2887349	T3	2021年12月22日
				US	2023293536	A1	2023年9月21日
				EP	3381469	A1	2018年10月3日
				EP	3381469	A4	2019年7月31日
				EP	3381469	B1	2021年6月30日
				JP	2019502650	A	2019年1月31日
				JP	6888871	B2	2021年6月16日
				WO	2017088734	A1	2017年6月1日
				US	2021252006	A1	2021年8月19日
				US	11903948	B2	2024年2月20日
				CA	3000763	A1	2017年6月1日
				KR	20180080128	A	2018年7月11日
				AU	2016359514	A1	2018年4月26日
CN	105899235	A	2016年8月24日	MY	177390	A	2020年9月14日
				WO	2015104359	A2	2015年7月16日
				WO	2015104359	A3	2015年9月11日
				ZA	201604531	B	2018年7月25日
				CY	1120595	T1	2019年12月11日
				AU	2015205574	A1	2016年7月7日
				AU	2015205574	B2	2019年8月15日
				LT	3092010	T	2018年10月25日
				CL	2016001741	A1	2017年5月12日
				HRP	20181525	T1	2018年11月16日
				TR	201810856	T4	2018年8月27日
				EP	3092010	A2	2016年11月16日
				EP	3092010	B1	2018年7月11日
				CA	2935456	A1	2015年7月16日
				CA	2935456	C	2018年9月18日
				ES	2687225	T3	2018年10月24日
				US	2016324979	A1	2016年11月10日

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)	
				US	10266606	B2	2019年4月23日		
				JP	2017502085	A	2017年1月19日		
				JP	6419844	B2	2018年11月7日		
				KR	20160106721	A	2016年9月12日		
				KR	102323301	B1	2021年11月9日		
				MX	2016009068	A	2016年9月28日		
				PL	3092010	T3	2019年1月31日		
				DK	3092010	T3	2018年8月27日		
				PT	3092010	T	2018年9月28日		
				SG	11201605605	SA	2016年8月30日		
				RU	2016132634	A	2018年2月16日		
				RU	2016132634	A3	2018年9月5日		
				RU	2680404	C2	2019年2月21日		
CN	109600993	A	2019年4月9日	WO	2017214233	A1	2017年12月14日		
				MX	2018015284	A	2019年9月18日		
				US	2019153107	A1	2019年5月23日		
				EP	3468615	A1	2019年4月17日		
				US	2024199745	A1	2024年6月20日		
				CA	3027173	A1	2017年12月14日		
				EP	3888689	A1	2021年10月6日		
				JP	2019521114	A	2019年7月25日		
				AU	2017277422	A1	2019年1月3日		
				BR	112018075639	A2	2019年4月9日		
WO	2022078524	A2	2022年4月21日	WO	2022078524	A3	2022年8月25日		
				WO	2022078524	A4	2022年12月8日		
				CA	3236754	A1	2023年5月11日		
				WO	2023078021	A1	2023年5月11日		
				CA	3236930	A1	2022年4月21日		
				TW	202334217	A	2023年9月1日		
				CA	3236852	A1	2023年5月11日		
				KR	20240095442	A	2024年6月25日		
				KR	20240095316	A	2024年6月25日		
				WO	2023078273	A1	2023年5月11日		
				AU	2022383265	A1	2024年6月13日		
AU	2022381163	A1	2024年6月13日						
AU	2021362997	A1	2024年5月16日						