



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118414339 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 30

(21) 申请号 202280083630.2

谭小钉

(22) 申请日 2022.12.16

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11382

(66) 本国优先权数据

202111544686.7 2021.12.16 CN

专利代理师 张伟

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.17

(51) Int.Cl.

C07D 491/22 (2006.01)

C07D 495/22 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/139765 2022.12.16

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/109965 ZH 2023.06.22

(71) 申请人 迈威(上海)生物科技股份有限公司

地址 201210 上海市浦东新区李冰路576号

(张江创想园)3号楼4楼

申请人 江苏迈威康新药研发有限公司

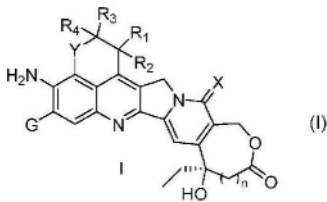
(72) 发明人 周伟 徐辉 朱会凯 王珍珍

(54) 发明名称

一种喜树碱类化合物及其偶联物

(57) 摘要

提供了一种喜树碱类化合物,其为结构式I所示的化合物或其药学上接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药;还提供了包含所述喜树碱类化合物的抗体药物偶联物。



# (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  
2023 年 6 月 22 日 (22.06.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/109965 A1**

(51) 国际专利分类号:

**C07D 491/22** (2006.01) **A61K 47/68** (2017.01)

**C07D 495/22** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/139765

(22) 国际申请日: 2022 年 12 月 16 日 (16.12.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202111544686.7 2021 年 12 月 16 日 (16.12.2021) CN

(71) 申请人: 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)。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)。

(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)。徐辉 (XU, Hui); 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)。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: 北京瑞恒信达知识产权代理事务所 (普通合伙) (LEADING INTELLECTUAL PROPERTY FIRM); 中国北京市西城区新街

口街道平安里大街 28 号中海国际中心 1802 室, 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, 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。

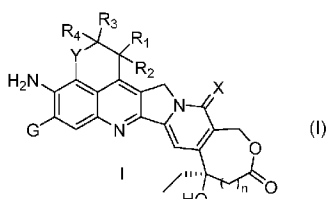
(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, 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))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: CAMPTOTHECIN COMPOUND AND CONJUGATE THEREOF

(54) 发明名称: 一种喜树碱类化合物及其偶联物



(57) Abstract: Provided is a camptothecin compound, which is a compound represented by structural formula I or a pharmaceutically acceptable salt, stereoisomer, solvate or prodrug thereof. An antibody-drug conjugate comprising the camptothecin compound is also provided.

(57) 摘要: 提供了一种喜树碱类化合物, 其为结构式 I 所示的化合物或其药学上接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药; 还提供了包含所述喜树碱类化合物的抗体药物偶联物。

WO 2023/109965 A1

## 一种喜树碱类化合物及其偶联物

相关申请的交叉引用

本专利申请要求于 2021 年 12 月 16 日提交的申请号为 CN202111544686.7 的中国发明专利申请的优先权权益，在此将其全部内容引入作为参考。

技术领域

本发明属于生物技术领域，更具体地，本发明涉及一种新型结构的喜树碱类似物及其在制备药物、特别是抗体药物偶联物中的应用。

背景技术

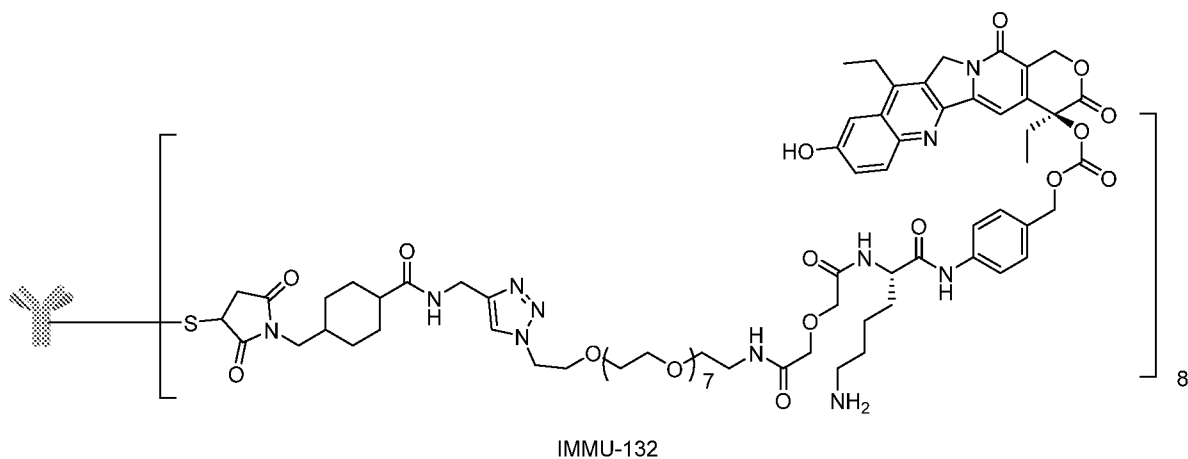
DNA 拓扑异构酶是广泛存在于生物体内的一类必需酶，是催化 DNA 拓扑学异构体相互转变的酶的总称，主要分为拓扑异构酶 I (Topoisomerase I, Topo I) 与拓扑异构酶 II (Topoisomerase II, Topo II) 这两类。其中，拓扑异构酶 I 在多种肿瘤细胞如结肠癌、宫颈癌、卵巢癌中有高表达，含量大大高于正常组织或细胞的含量，并且在 S 期肿瘤细胞中活性大幅提高，因此针对拓扑异构酶 I 的活性抑制剂可选择性抑制增殖期肿瘤细胞 DNA 复制。

研究表明，拓扑异构酶 I 是喜树碱(Camptothecin, CPT)及其类似物的主要靶点。喜树碱是一种细胞毒性喹啉类生物碱，可使正常解离的拓扑异构酶 I 和 DNA 链的共价化合物保持稳定，形成三元复合物。随着三元复合物的形成，CPT 抑制了最初由拓扑异构酶 I 介导的 DNA 裂解和重新链接反应，从而抑制 DNA 的合成，导致细胞死亡，发挥抗癌作用。

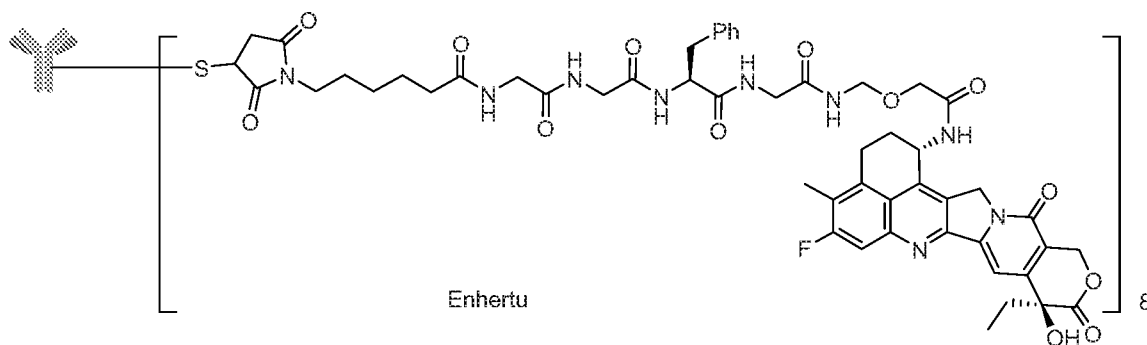
鉴于上述性质，喜树碱及其类似物已经成为一类重要的抗肿瘤药物；并且作为小分子药物用于抗体药物偶联物中。抗体药物偶联物(Antibody-drug conjugate, ADC)是由抗体或抗体类配体、小分子药物以及将该配体与药物偶联起来的连接子共同组成的一种新型肿瘤治疗药物，其结合了小分子药物的抗肿瘤活性和抗体或抗体类配体的高选择性、稳定性和良好的药代动力学特征，已经成为目前肿瘤治疗领域的关注热点。

迄今，国内外使用喜树碱(CPT)类化合物制备的 ADC 药物主要有：

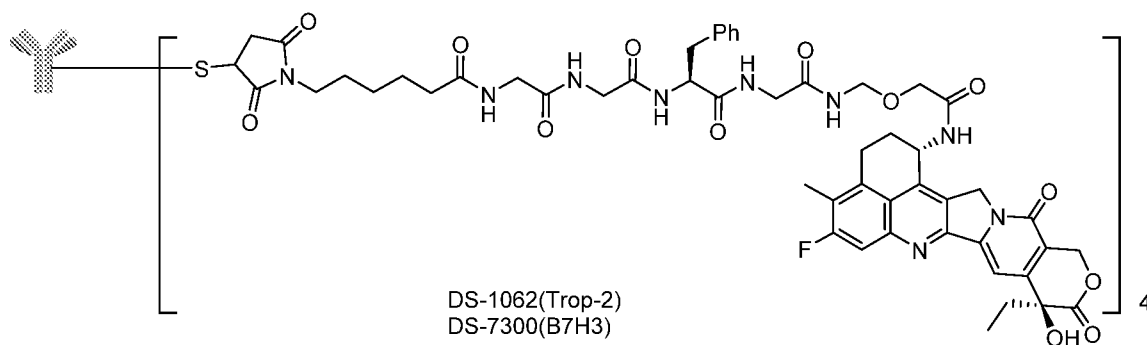
1. Sacituzumab govitecan (IMMU-132)，其是将拓扑异构酶 I 抑制剂 SN38 通过 CL2A-SN38 含药连接子与靶向 Trop-2 的 SAC 抗体偶联，制备得到 DAR=8 的靶向 Trop-2 ADC 药物。



2. 第一三共的 Enhertu (DS-0821), 其是将 Exatecan 通过 MC-GGFG-Dxd 含药连接子与靶向 HER2 抗体 Trastuzumab 偶联, 制得 DAR=8 的 ADC 药物。



3. 第一三共在研的 DS-1062, 其是将 Exatecan 通过 MC-GGFG-Dxd 含药连接子通过随机偶联方式与靶向 Trop-2 的 hTINA1 抗体偶联, 制备得到 DAR=4 的 ADC 药物; DS-7300, 其是将 MC-GGFG-Dxd 含药连接子通过随机偶联方式与靶向 B7H3 的 hM30 抗体偶联, 制备得到 DAR=4 的靶向 B7H3 ADC 药物。



以上 ADC 药物均显示出了一定的治疗效果, 但也存在一定的问题。例如, 由于 IMMU-132 中碳酸酯键的化学不稳定性, IMMU-132 在血浆中半衰期仅为约 12h, 可能导致副作用增加等问题, 患者会出现包括腹泻、疲劳、恶心、发热性中性粒细胞减少和白细胞减少等的不同程度毒性反应 (US2014/0170063A1)。而 DS-1062 和 DS-7300 采用随机偶联的方式会造成 ADC 产物具有较大的异质性。

目前, 含喜树碱类化合物的 ADC 的可选择种类仍比较少, 而且存在目标人群范围比

较窄、单药治疗效果不佳、毒副作用强等不利之处。因此，仍需要开发新的喜树碱类化合物以及相应的 ADC，以满足治疗需求。

## 发明内容

5 鉴于上述问题，本发明的目的是提供一种新结构的化合物以及采用其制备的抗体药物偶联物，该新结构的化合物为喜树碱类化合物本身，或者为喜树碱或喜树碱类化合物与连接子连接形成的化合物。

在本发明的上下文中，卤素是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)。

在本发明的上下文中，“接头”与“连接子”可互换使用。

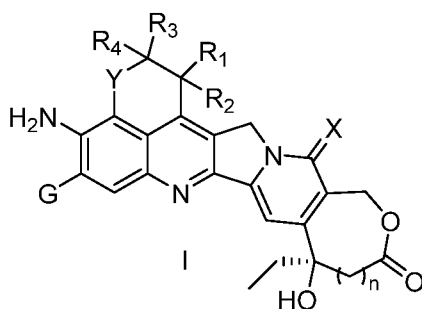
10 在本发明的上下文中，术语“含药连接子”是指药物（例如小分子药物，诸如喜树碱类化合物）与连接子直接或间接以共价键键合得到的化合物。

在本发明的上下文中，当基团被取代时，其可以由一个或多个取代基取代，取代基的数目取决于基团所含的氢原子数目，全部氢原子均可被取代。

15 本发明的技术方案如下。

第一方面，本发明提供喜树碱类化合物。

在本发明的第一方面，所述喜树碱类化合物为结构式 I 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：



结构式 I

20 在结构式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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）。

在结构式 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。

在结构式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，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<sub>3</sub> 和/或 R<sub>4</sub> 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。

在结构式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，X 为氧或硫。

在结构式 I 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，n=0 或 1。

结构式 I 中，在 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 独立地为氢、卤素（例如氟）、C1-7 烷基或取代的 C1-7 烷基，或者 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 可以是相同的；和/或，R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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 R<sub>3</sub> 和/或 R<sub>4</sub> 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 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 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，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 如上文所定义。

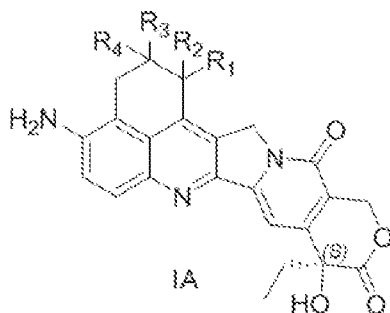
优选地，X 为氧，G 为甲氧基，Y 为亚甲基或取代亚甲基、氧或硫，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、

R<sub>4</sub>如上文所定义。

优选地，X为氧，G为氢，Y为氧、砷或亚砷，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>如上文所定义。

优选地，X为氧，G为氢，Y为砷或亚砷，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>如上文所定义。

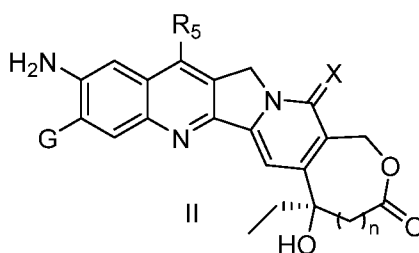
优选地，本发明提供的结构式I所示的化合物进一步为结构式IA所示的化合物：



结构式 IA

结构式 IA 中，基团 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>与上文结构式 I 中基团 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>的定义相同，但是 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>不同时为氢。

或者，在本发明的第一方面，所述喜树碱类化合物为结构式 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：



结构式 II

在结构式 II 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，R<sub>5</sub>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<sub>5</sub>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<sub>5</sub>为 C1-4 直链烷基。当 R<sub>5</sub>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<sub>5</sub>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。

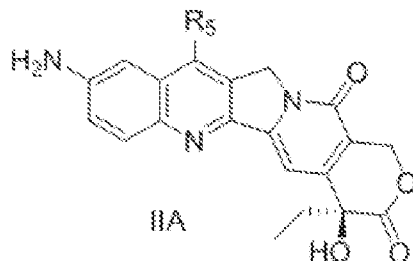
在结构式 II 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，G为氢、卤素（例如氟）、甲基或甲氧基。优选地，G为氢、氟或氯。

结构式 II 中，X为氧或硫。

结构式 II 中,  $n=0$  或 1。

结构式 II 中, 当 X 为氧、G 为氢、 $n=0$  时,  $R_5$  不可为正丁基。

优选地, 本发明提供的结构式 II 所示的化合物进一步为结构式 IIA 所示的化合物:

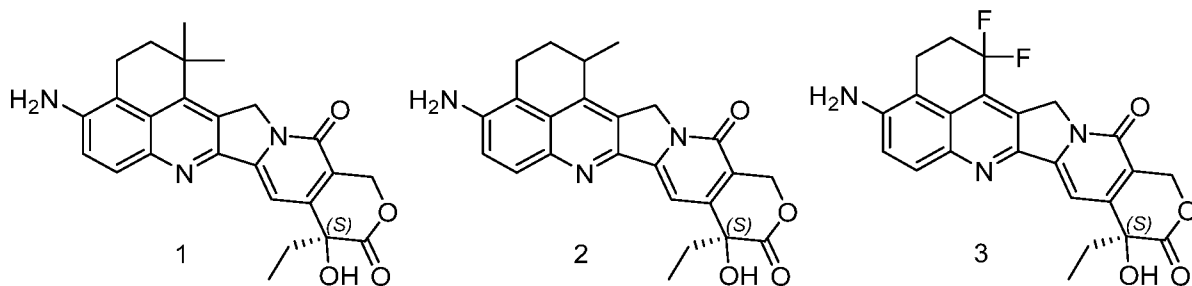


5

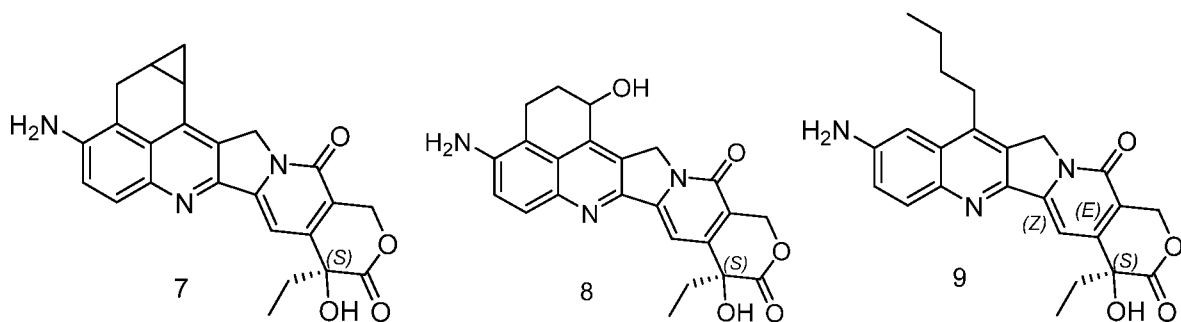
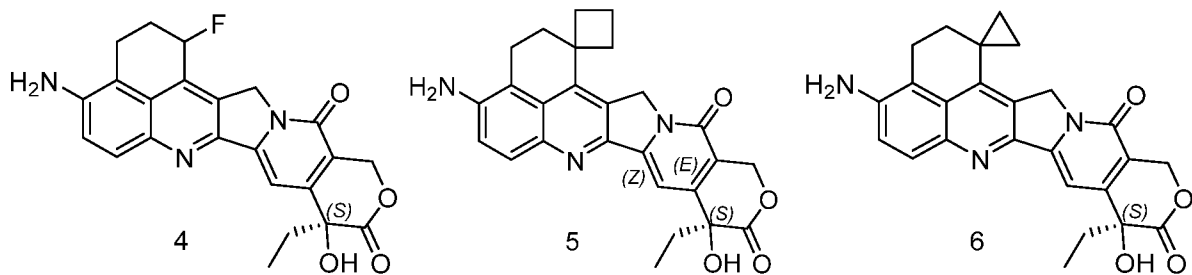
结构式 IIA

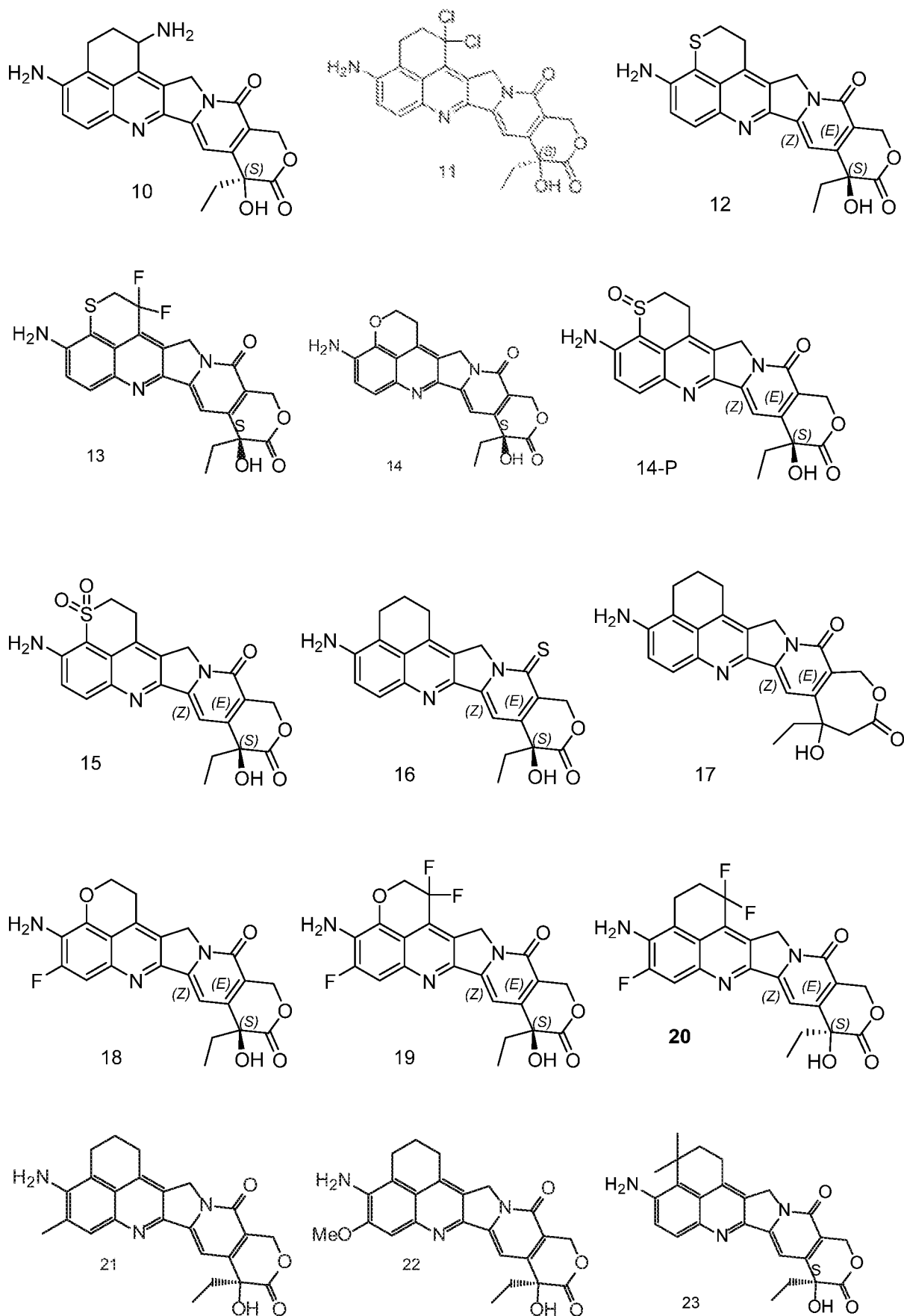
结构式 IIA 中, 基团  $R_5$  与上文结构式 II 中基团  $R_5$  的定义相同, 但是  $R_5$  不可为正丁基。

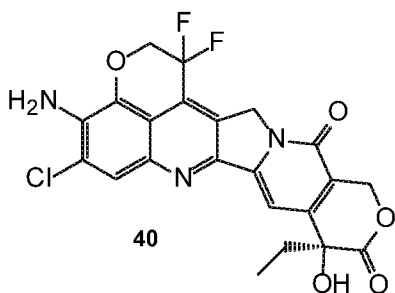
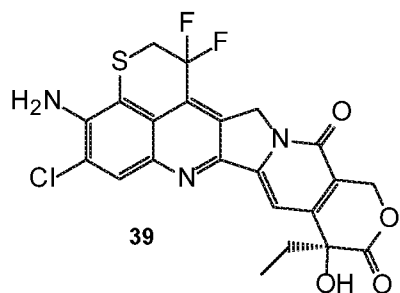
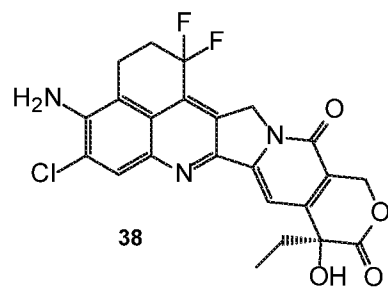
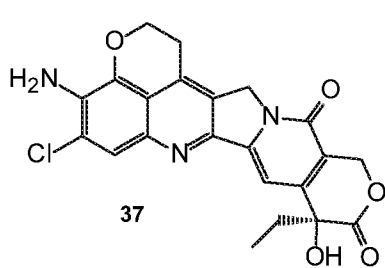
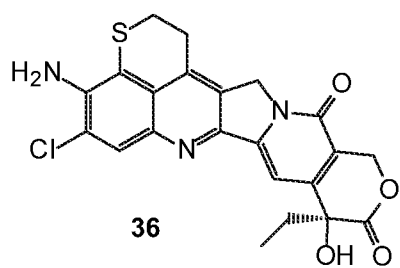
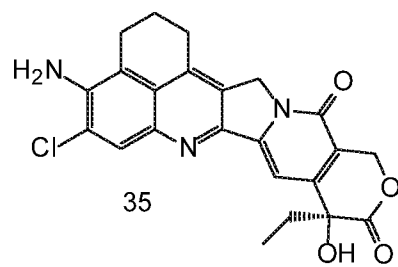
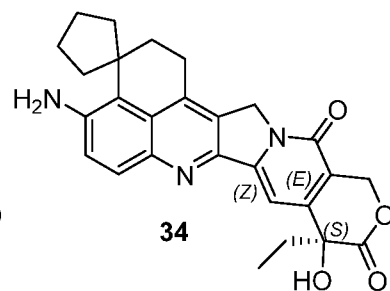
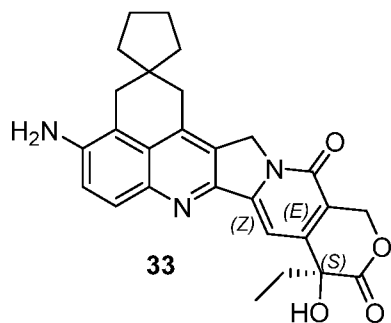
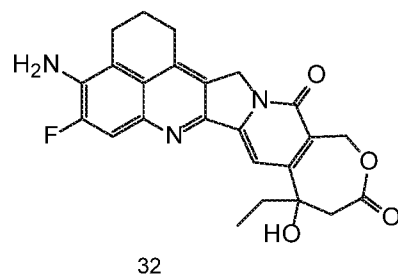
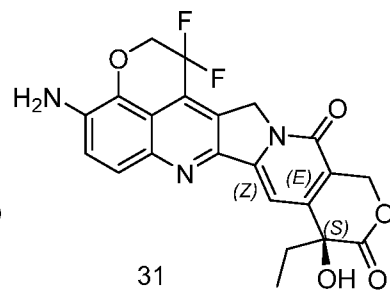
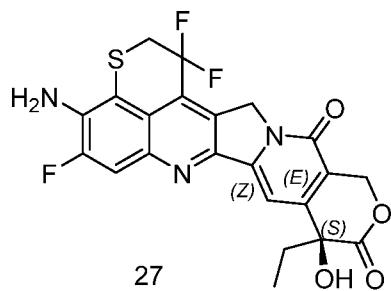
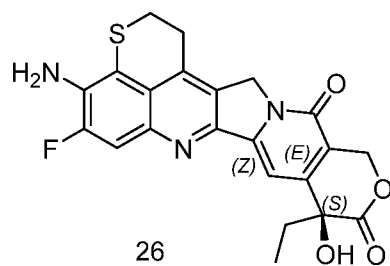
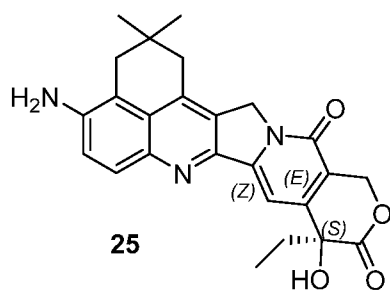
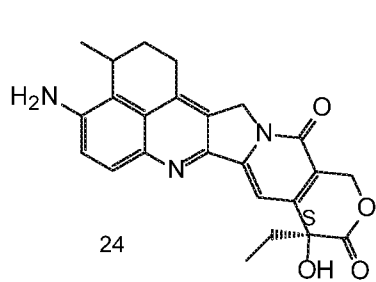
根据本发明的具体实施方式, 在本发明的第一方面, 所述化合物具有如下结构:



10

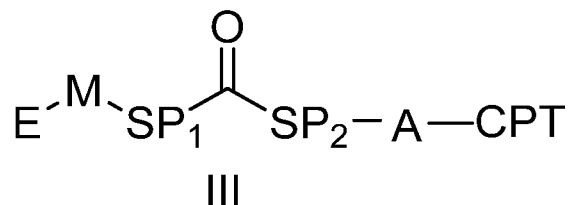






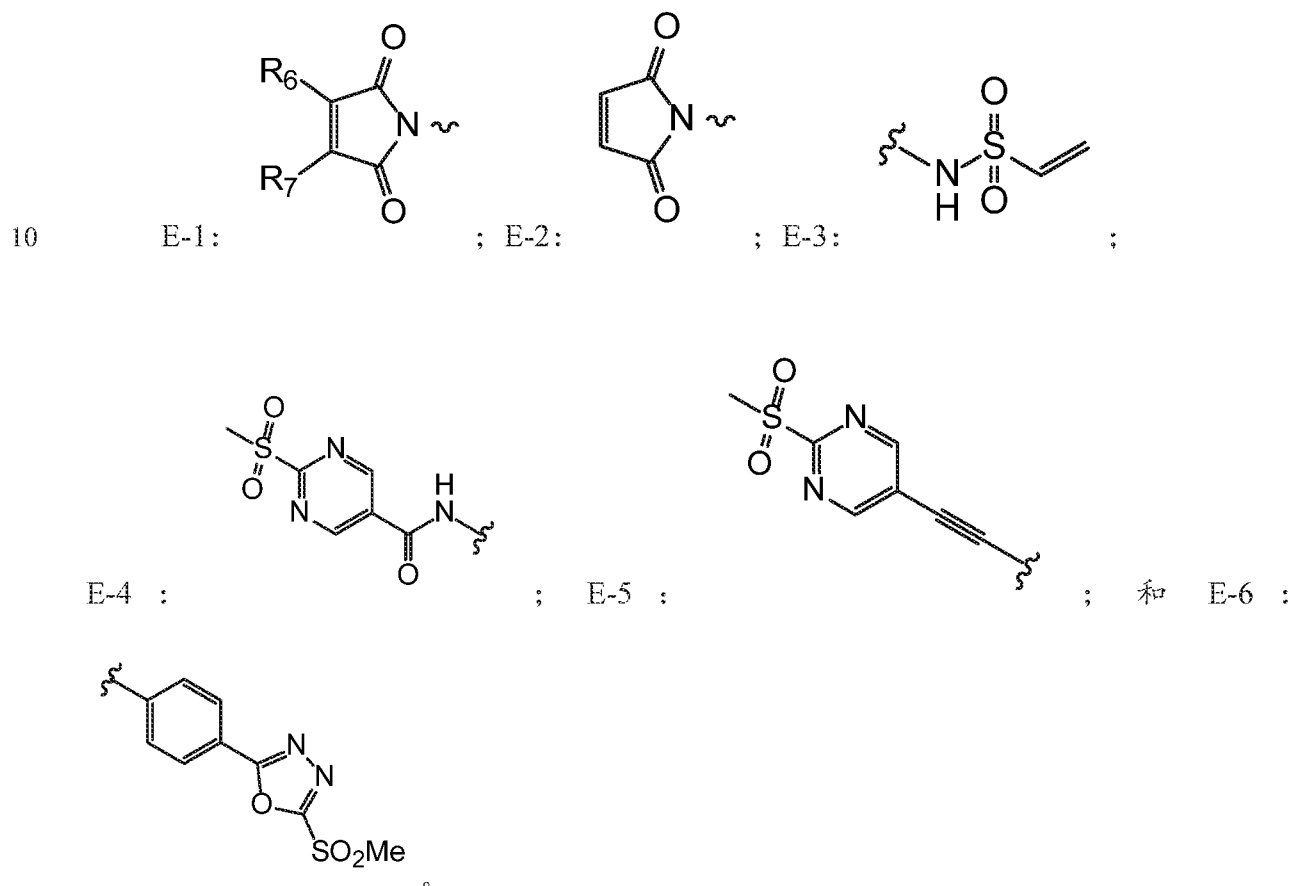
第二方面, 本发明提供具有通式“L-A-CPT”所示结构的含药连接子, 其中 L 表示用于抗体药物偶联物(ADC)的连接子, A 表示一个或多个氨基酸, CPT 为喜树碱类化合物。

在本发明的第二方面, 所述具有通式 L-A-CPT 所示结构的含药连接子为结构式 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。



结构式 III

在结构式 III 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, ~ 表示与 M 的连接位点:



在结构式 III 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, 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。

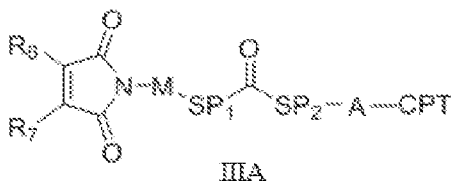
在结构式 III 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，SP<sub>1</sub> 选自 C1-8 亚烷基、C1-8 亚环烷基或 C1-21（优选 C1-16、更优选 C1-11）直链亚杂烷基，所述 C1-21 直链亚杂烷基包含 1-11 个（优选 1-6 个）选自 N、O 或 S 的杂原子，其中所述 C1-8 亚烷基、  
5 C1-8 亚环烷基和 C1-21 直链亚杂烷基各自独立地任选被选自羟基、氨基、磺酸基和氰基的一个或多个取代基取代。

在结构式 III 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，SP<sub>2</sub> 选自 -NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-、-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>CH<sub>2</sub>CO-、-S(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>CO- 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。

在结构式 III 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，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 NH-Val-Cit-CO-；A 表示 3  
10 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-。  
15 优选地，A 为 NH-Val-Ala-CO-、NH-Gly-Gly-Phe-Gly-CO- 或 NH-Ala-Ala-Ala-CO-。

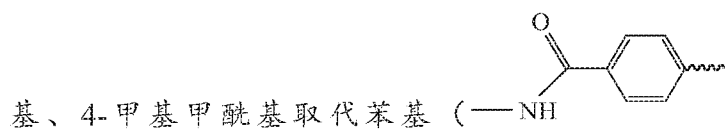
在结构式 III 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，CPT 为喜树碱类化合物。

其中，当基团 E 为 E1 时，本发明提供的结构式 III 进一步为结构式 IIIA：

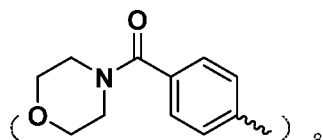


结构式 IIIA

在结构式 IIIA 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub> 独立地为氢、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  
25 C1-C4 烷氧基，优选甲氧基）、卤素、酯基、酰胺基和氰基。优选地，Ar' 为苯

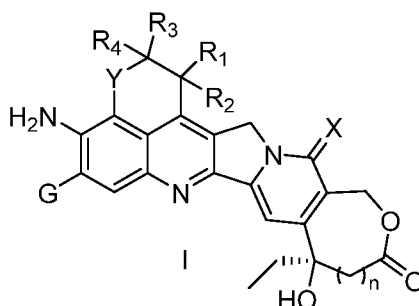


）或 4-甲酰基吗啉取代苯基



例如，在结构式 III 和结构式 IIIA 中，CPT 为本发明上文第一方面中提供的结构式 I 或结构式 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。

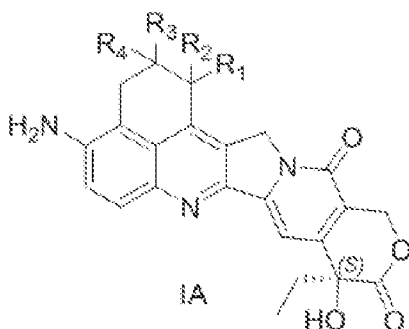
- 5 当 CPT 为本发明上文第一方面中提供的结构式 I 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药时：



结构式 I

- 10 结构式 I 中，基团 G、X、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、n 与上文第一方面中结构式 I 中基团 G、X、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、n 的定义相同。

当 CPT 为本发明上文第一方面中提供的结构式 IA 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药时：



结构式 IA

- 15 结构式 IA 中，基团 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 与上文第一方面中结构式 IA 中基团 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 的定义相同，但是 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 可以同时为氢。

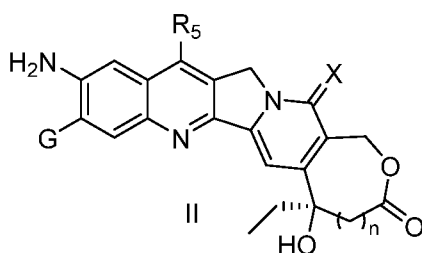
- 特别地，当结构式 IIIA 所示化合物中的“CPT”为结构式 IA 所示化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药时，R<sub>6</sub> 和 R<sub>7</sub> 可以同时为氢，或不同时为氢。同样地，结构式 IA 中的 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 可以同时为氢，或不同时为氢。根据本发明的具体实施方式，当 R<sub>6</sub> 和 R<sub>7</sub> 同时为氢时，结构式 IA 中的 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 不同时为氢；当

$R_6$  和  $R_7$  不同时为氢时, 结构式 IA 中的  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  可以同时为氢, 或不同时为氢。

在结构式 III 和结构式 IIIA 中, 结构式 I 或结构式 IA 所示的化合物经由其氨基 (分别参见结构式 I 或结构式 IA) 与 A 的羧基通过酰胺键相连, 即在结构式 I 或结构式 IA 所示化合物的氨基与结构式 III 或 IIIA 中 A 的羧基形成了酰胺键。

又如, 在结构式 III 和结构式 IIIA 中, CPT 为本发明上文第一方面中提供的结构式 II 或结构式 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。

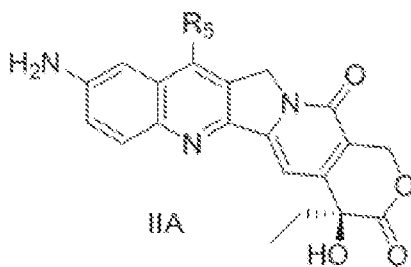
当 CPT 为本发明上文第一方面中提供的结构式 II 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药时:



结构式 II

结构式 II 中, 基团 G、 $R_5$ 、X、n 与上文第一方面中结构式 II 中基团 G、 $R_5$ 、X、n 的定义相同。

当 CPT 为本发明上文第一方面中提供的结构式 IIA 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药时:



结构式 IIA

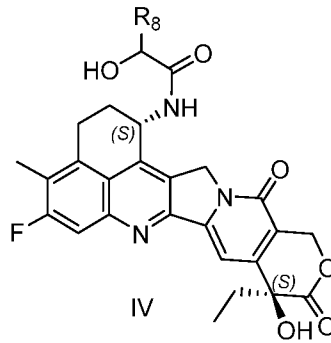
结构式 IIA 中, 基团  $R_5$  与上文第一方面中结构式 IIA 中基团  $R_5$  的定义相同, 但是可以为正丁基。

在结构式 III 和结构式 IIIA 中, 结构式 II 或结构式 IIA 所示的化合物经由其氨基 (分别参见结构式 II 或结构式 IIA) 与 A 的羧基通过酰胺键连接, 即结构式 II 或结构式 IIA 所示化合物的氨基与结构式 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结构式 III 中的“CPT”，并通过其氨基与结构式 III 或 IIIA 中 A 的羧基通过酰胺键连接。

又如，在结构式 III 和结构式 IIIA 中，CPT 可以为结构式 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：



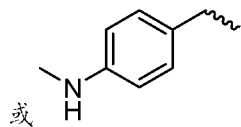
结构式 IV

在结构式 IV 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，R<sub>8</sub> 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。

10 当 R<sub>8</sub> 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。

特别地，当结构式 IIIA 所示化合物中的“CPT”为结构式 IV 所示化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药时，R<sub>6</sub> 和 R<sub>7</sub> 可以同时为氢，或不同时为氢。同  
15 样地，结构式 IV 中的 R<sub>8</sub> 可以为氢，或不为氢。根据本发明的具体实施方式，在 R<sub>6</sub> 和 R<sub>7</sub> 同时为氢时，R<sub>8</sub> 可以为氢或不为氢。

在结构式 III 和结构式 IIIA 中，结构式 IV 所示的化合物经由其与 R<sub>8</sub> 连接于同一个碳的羟基（参见结构式 IV）与 A 的羧基通过自释放结构相连，该自释放结构例如（

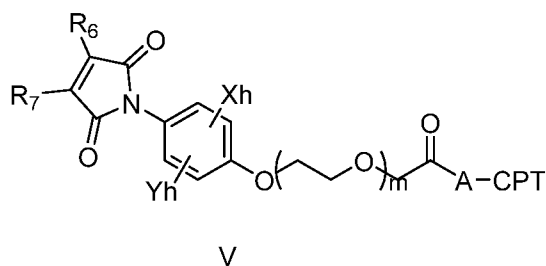


或  
20 )，实线表示与结构式 III 或结构式 IIIA 中 A 的羧基连接的位点，波浪线表示与结构式 IV 中羟基连接的位点。

特别地，对于结构式 IIIA 所示的化合物，当 R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub> 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。

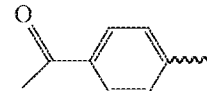
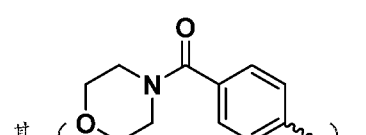
优选地，本发明提供的结构式 III 和结构式 IIIA 所示的化合物进一步为结构式 V 所

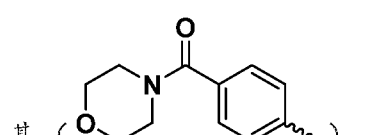
示的化合物。



结构式 V

结构式 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)、卤素、酯基、酰胺基和氰基。优

选地,  $Ar'$  为苯基、4-甲基甲酰基取代苯基 (—NH—) 或 4-甲酰基吗啉取代苯基 (—NH—)。

基 (—NH—)。

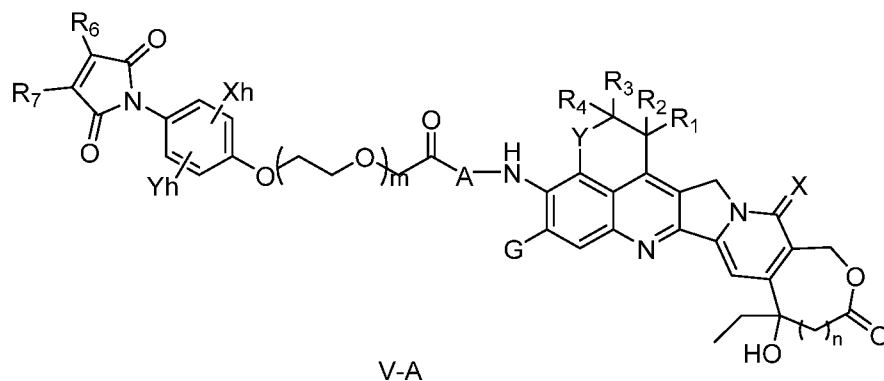
结构式 V 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明,  $X_h$  和  $Y_h$  独立地为氢、卤素、卤代烷基 (例如卤代 C1-C6 烷基、优选卤代 C1-C4 烷基, 例如三氟甲基) 或烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 例如甲氧基)。

结构式 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。

结构式 V 中,  $A$  表示 2-4 个氨基酸, 如上文所定义。

结构式 V 中, CPT 的定义及其在结构式 V 中的连接关系与结构式 III 和结构式 IIIA 中 CPT 相同, 如上文所定义。

优选地, 本发明提供的结构式 V 所示的化合物进一步为结构式 V-A 所示的化合物:



## 结构式 V-A

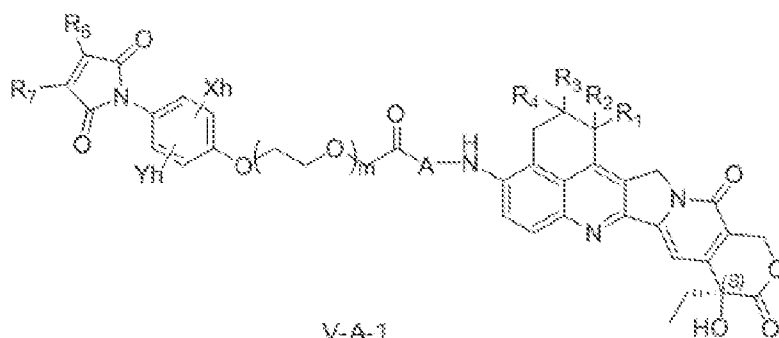
结构式 V-A 中, 基团 A、G、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、n 与上文结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、G、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、n 的定义相同。

优选地, 结构式 V-A 中, G 为氢、氟或氯。

5 优选地, 结构式 V-A 中, Y 为亚甲基、硫或氧。

结构式 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。

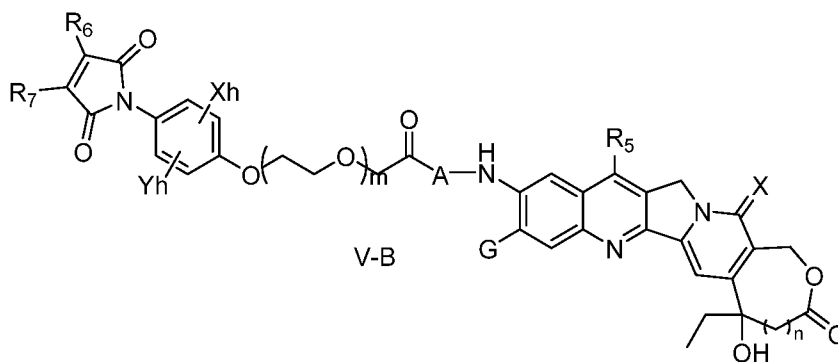
优选地, 本发明提供的结构式 V-A 所示的化合物进一步为结构式 V-A-1 所示的化合物:



10

## 结构式 V-A-1

或者, 本发明提供的结构式 V 所示的化合物进一步为结构式 V-B 所示的化合物:

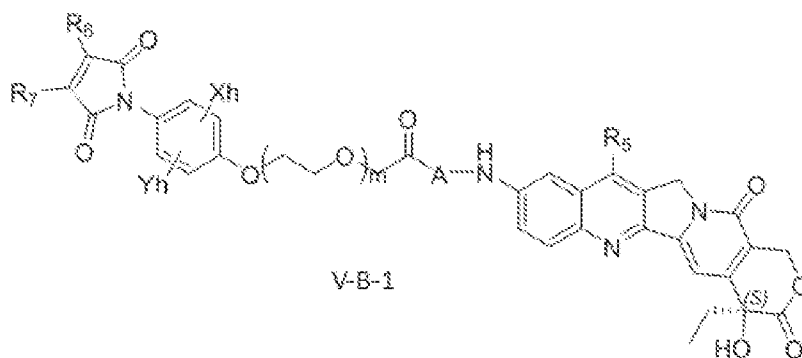


## 结构式 V-B

15 结构式 V-B 中, 基团 A、G、R<sub>5</sub>、X、n 与上文结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、G、R<sub>5</sub>、X、n 的定义相同。

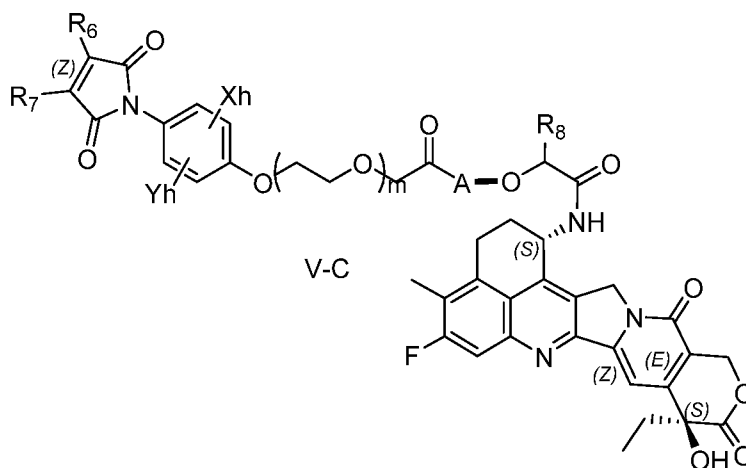
结构式 V-B 中, 并且在本发明的上下文中如无其他说明, “-A-NH-” 表示所示氨基与 A 中的羧基形成酰胺键。

20 优选地, 本发明提供的结构式 V-B 所示的化合物进一步为结构式 V-B-1 所示的化合物:



结构式 V-B-1

或者，本发明提供的结构式 V 所示的化合物进一步为结构式 V-C 所示的化合物：



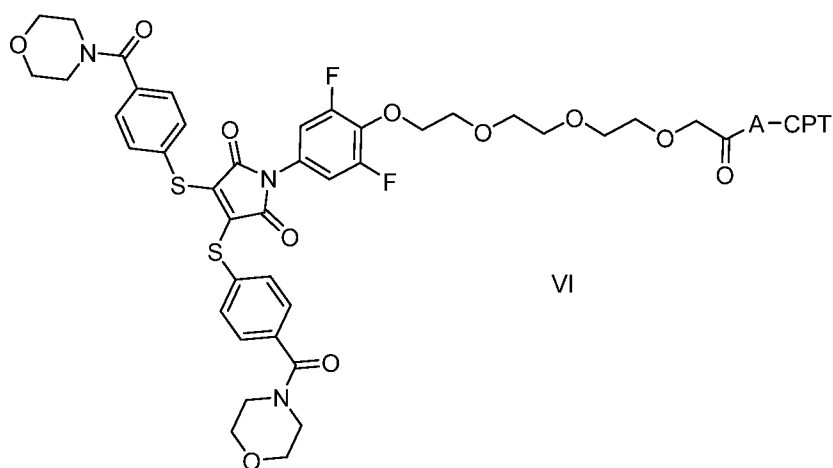
结构式 V-C

结构式 V-C 中，基团 A、R<sub>8</sub> 与上文结构式 III 或结构式 IIIV 中基团 A、R<sub>8</sub> 的定义相同。

结构式 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 结构式 V-C 中，并且在本发明的上下文中如无其他说明，‘—’与上文结构式 III 或结构式 IIIV 中的 CPT 为结构式 IV 时的自释放结构相同。

根据本发明的具体实施方式，本发明提供的结构式 V 所示的化合物进一步为结构式 VI 所示的化合物：



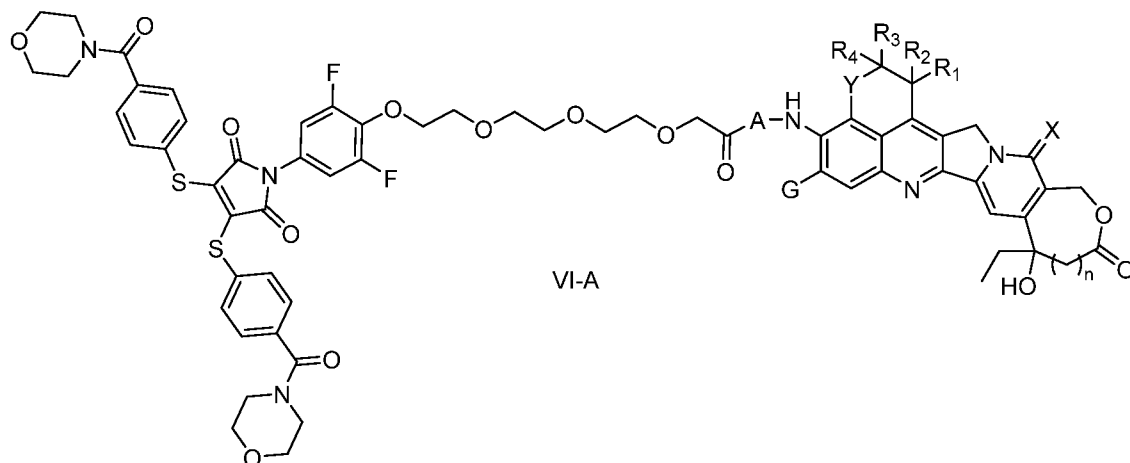
VI

结构式 VI

结构式 VI 中，A 表示 2-4 个氨基酸，如上文所定义。

结构式 VI 中，CPT 为喜树碱类化合物。CPT 的定义及其在结构式 VI 中的连接关系  
5 与结构式 III 和结构式 IIIA 中 CPT 相同，如上文所定义。

优选地，本发明提供的结构式 VI 所示的化合物进一步为结构式 VI-A 所示的化合物：



VI-A

结构式 VI-A

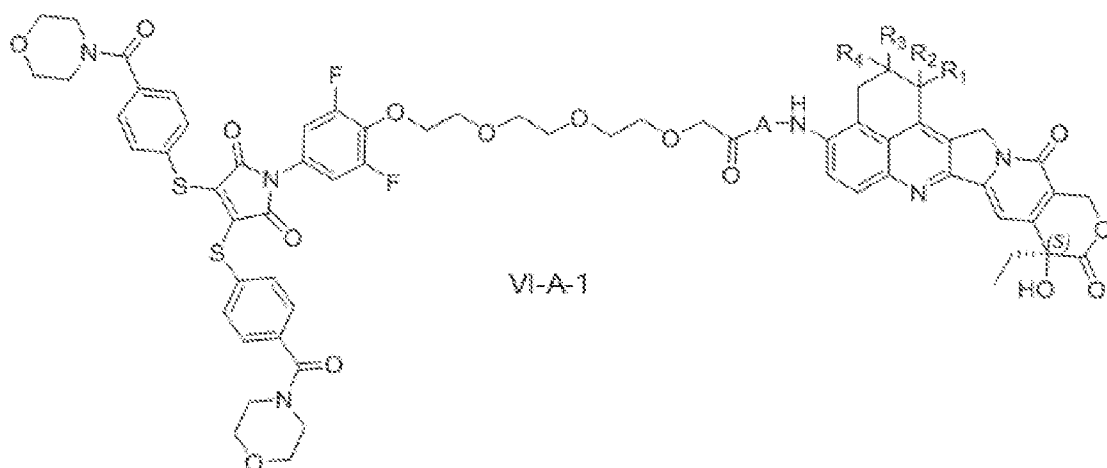
结构式 VI-A 中，基团 A、G、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、n 与上文结构式 III 或结构  
10 式 IIIA 中基团 A、G、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、n 的定义相同。

优选地，结构式 VI-A 中，G 为氢、氟或氯。

优选地，结构式 VI-A 中，Y 为亚甲基、硫或氧。

结构式 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。

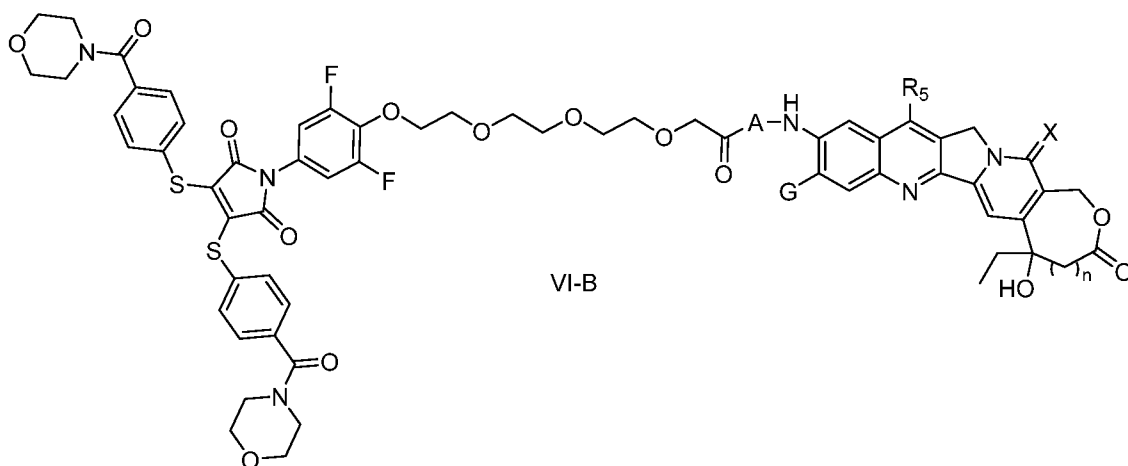
15 优选地，本发明提供的结构式 VI-A 所示的化合物进一步为结构式 VI-A-1 所示的化合物：



VI-A-1

结构式 VI-A-1

或者，结构式 VI 所示的化合物进一步为结构式 VI-B 所示的化合物：



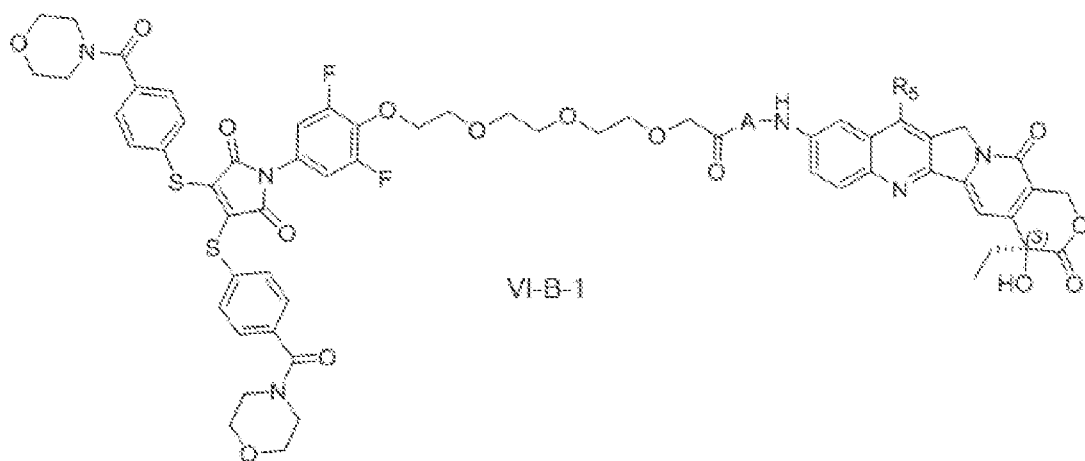
VI-B

结构式 VI-B

结构式 VI-B 中，基团 A、G、R<sub>5</sub>、X、n 与上文结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、G、R<sub>5</sub>、X、n 的定义相同。

结构式 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。

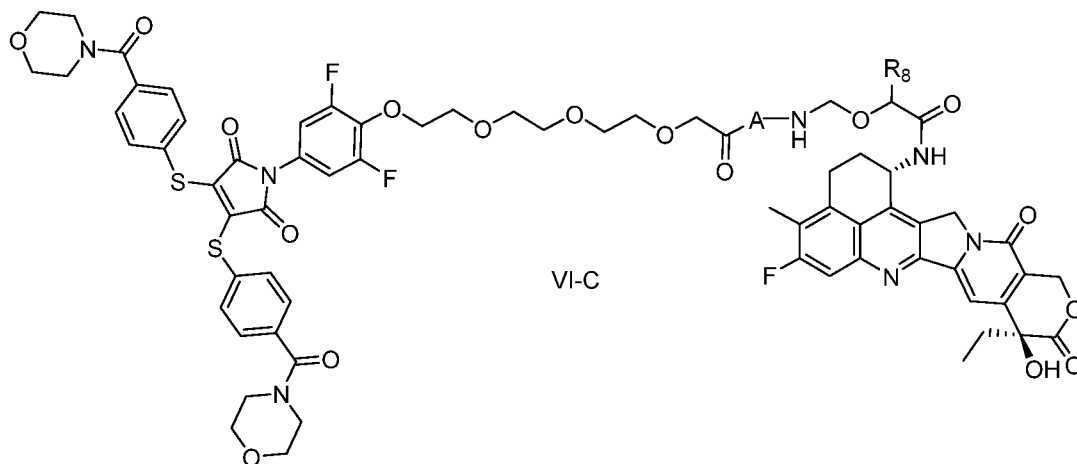
更优选地，结构式 VI-B 所示化合物进一步为结构式 VI-B-1 所示的化合物：



VI-B-1

结构式 VI-B-1

或者，本发明提供的结构式 VI 所示的化合物进一步为结构式 VI-C 所示的化合物：

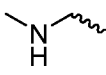


VI-C

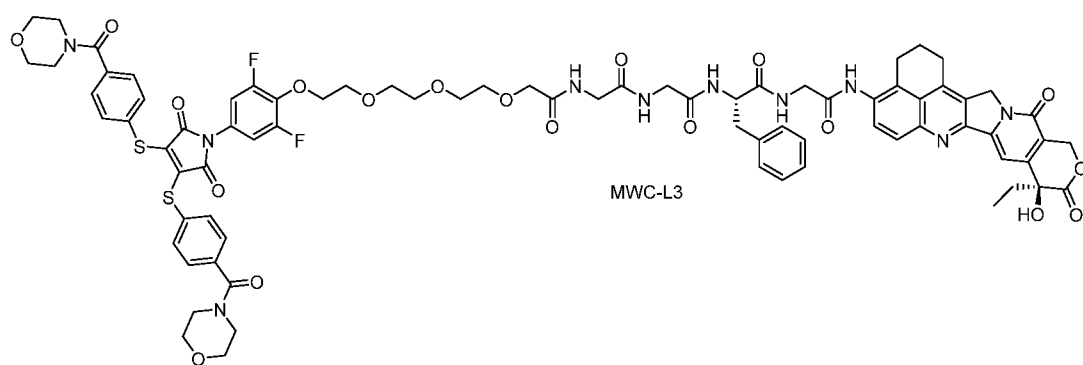
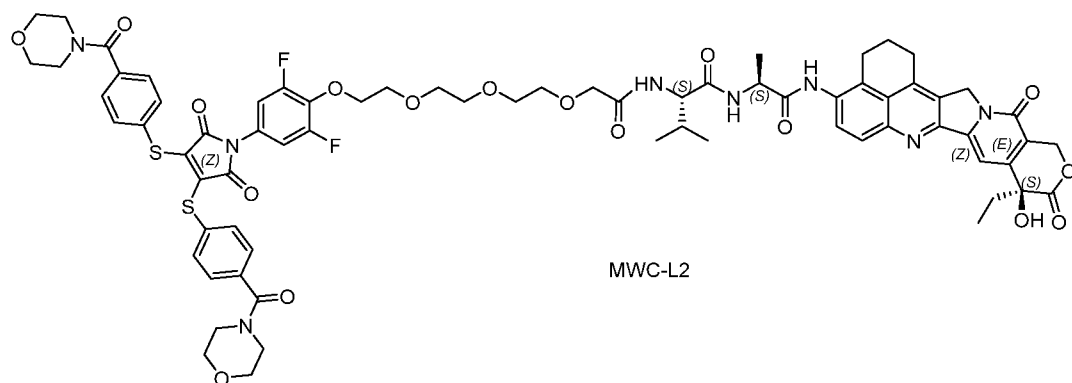
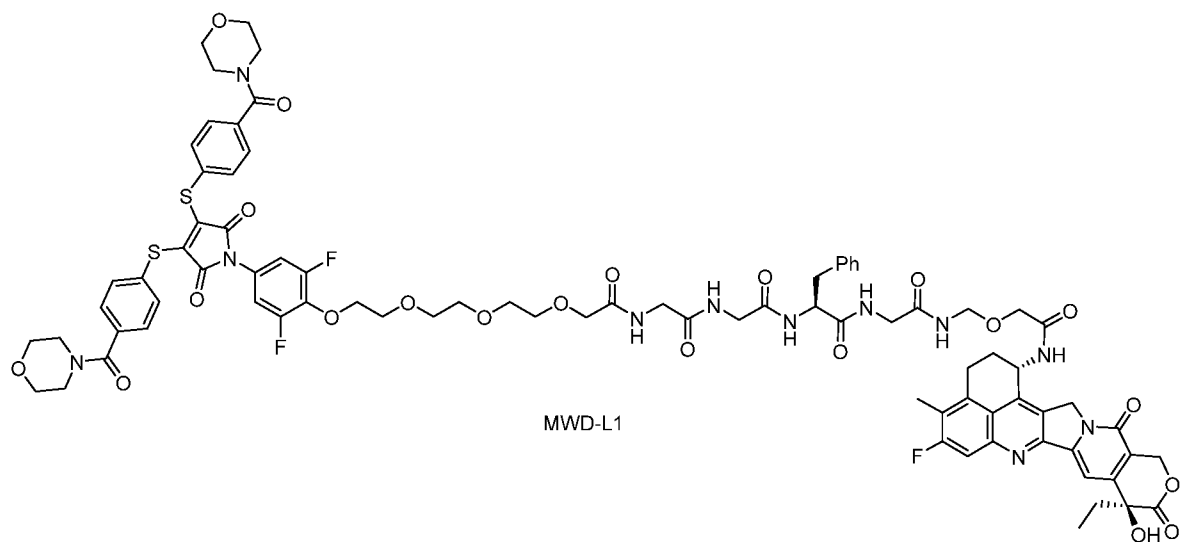
结构式 VI-C

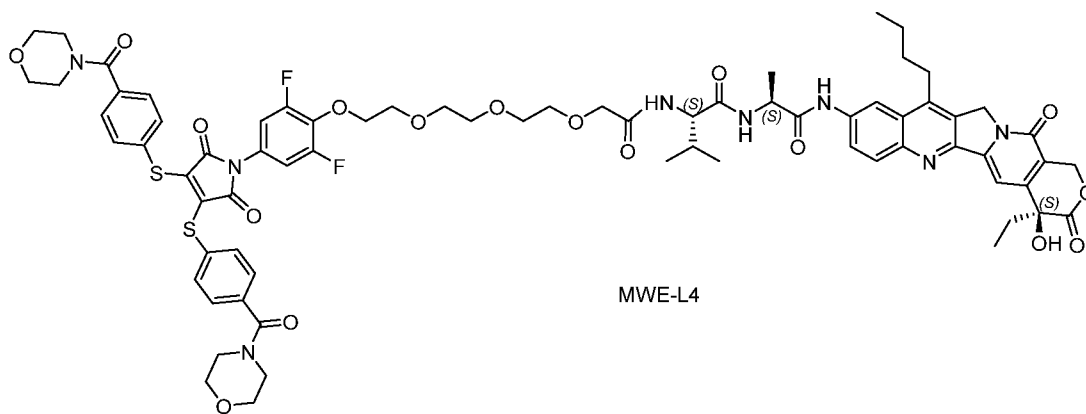
结构式 VI-C 中，基团 A、R<sub>8</sub> 的定义与上文结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、R<sub>8</sub> 的定义相同。

结构式 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。

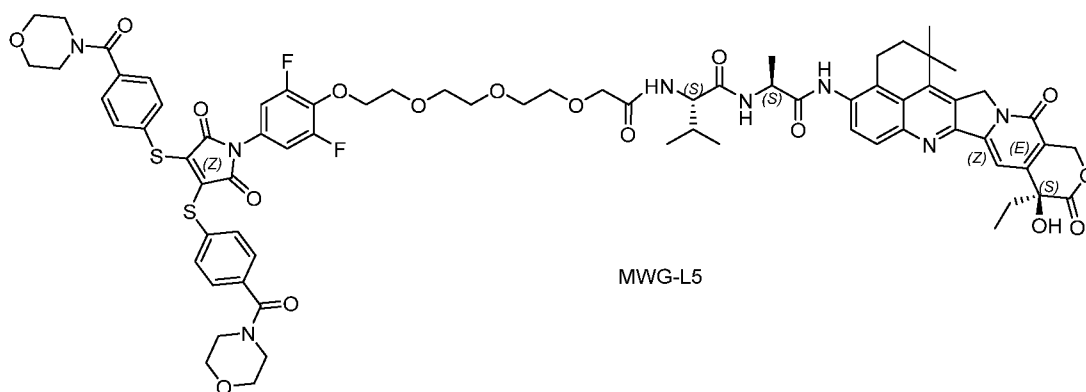
10 当结构式 V-C 中自释放结构为  时，结构式 V-C 可进一步如结构式 VI-C 所示结构。

根据本发明的具体实施方式，在本发明的第二方面，所述化合物具有如下结构：

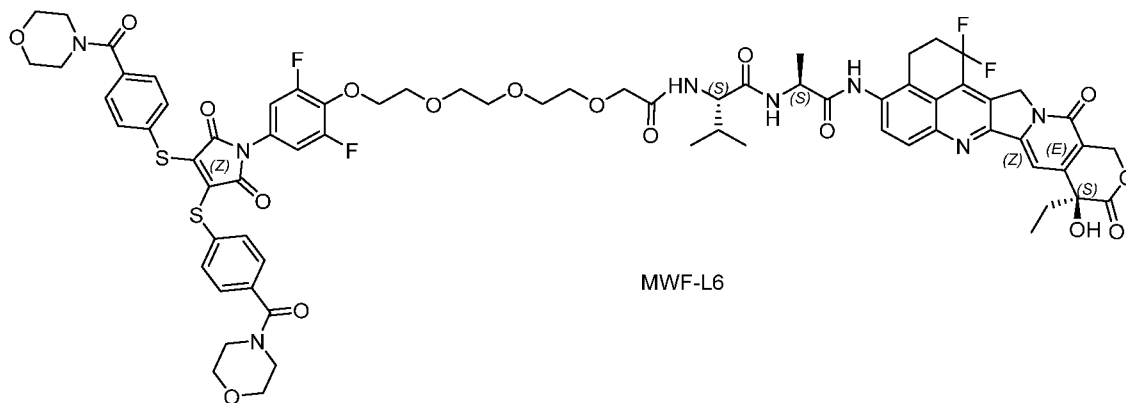




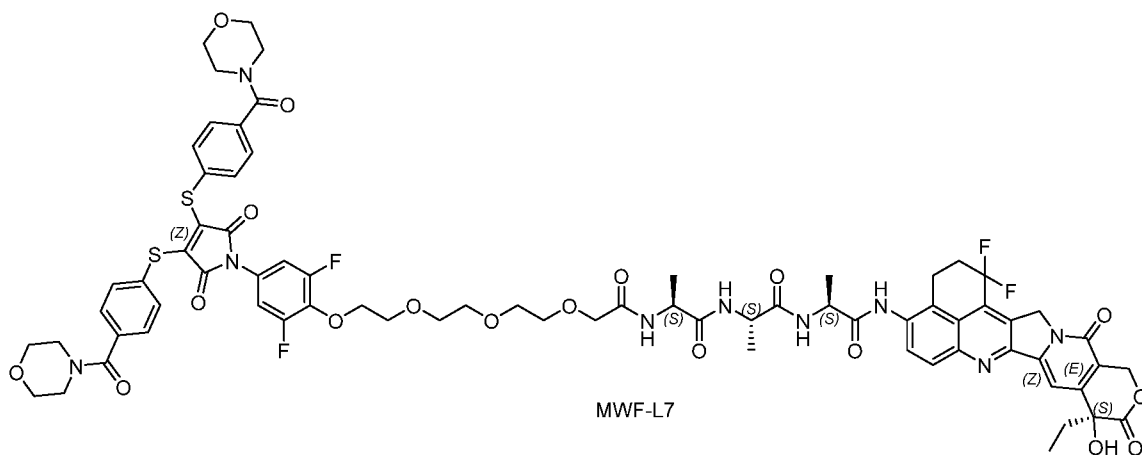
MWE-L4



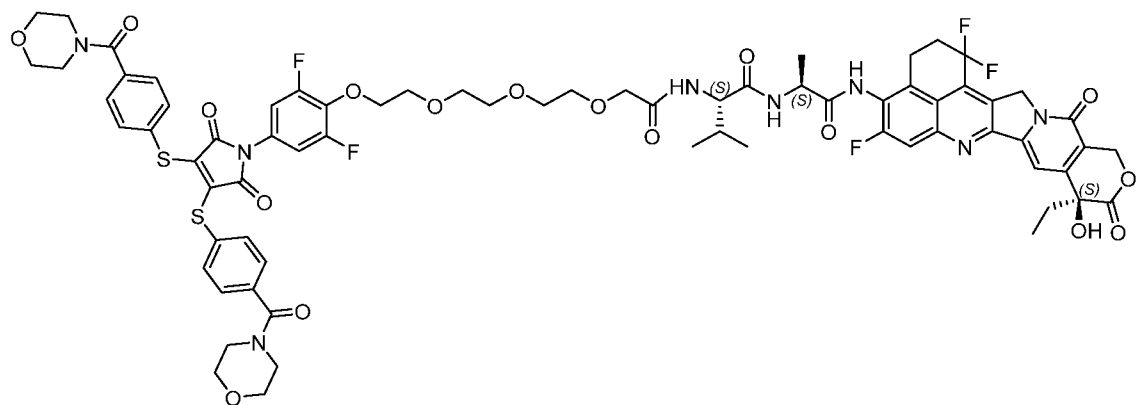
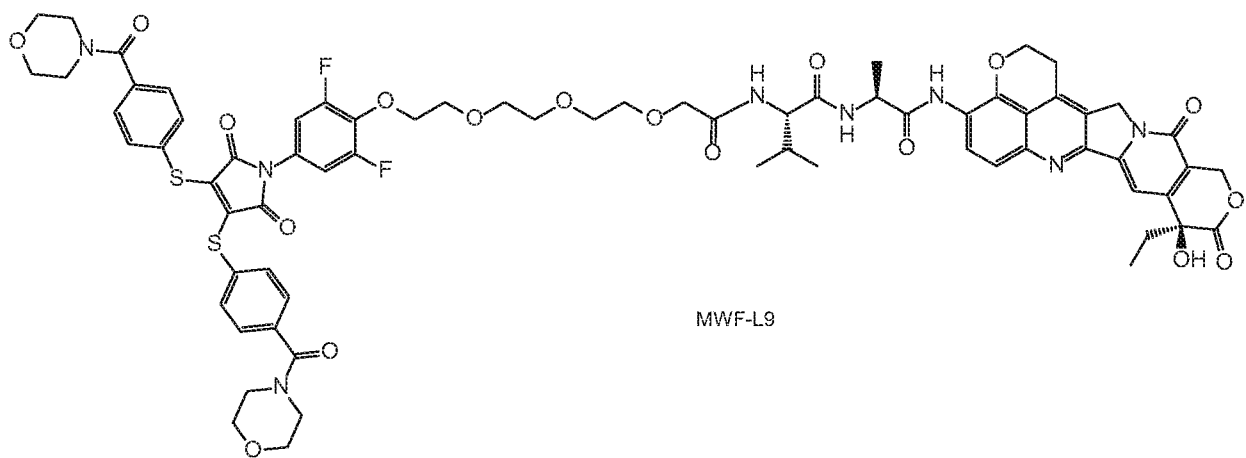
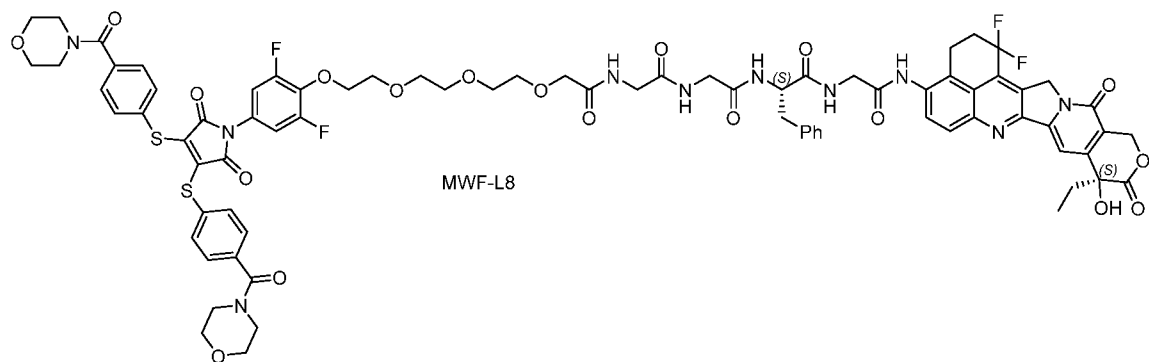
MWG-L5

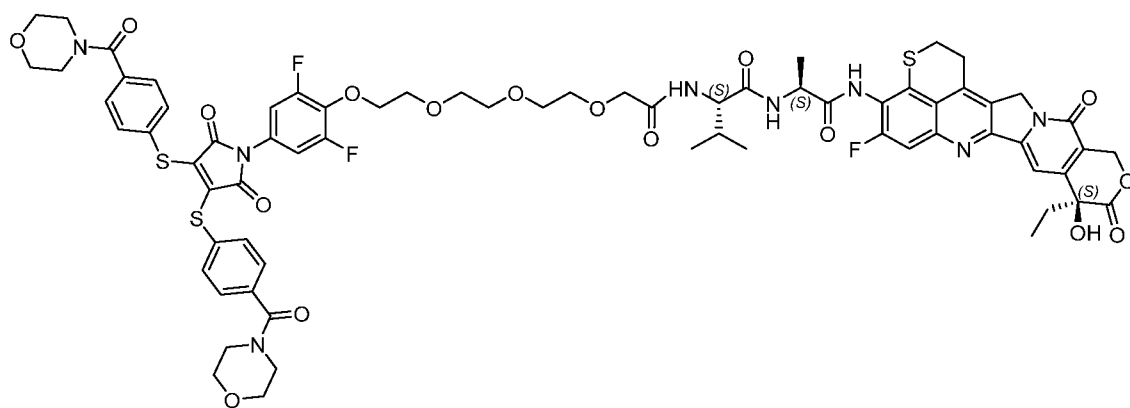


MWF-L6

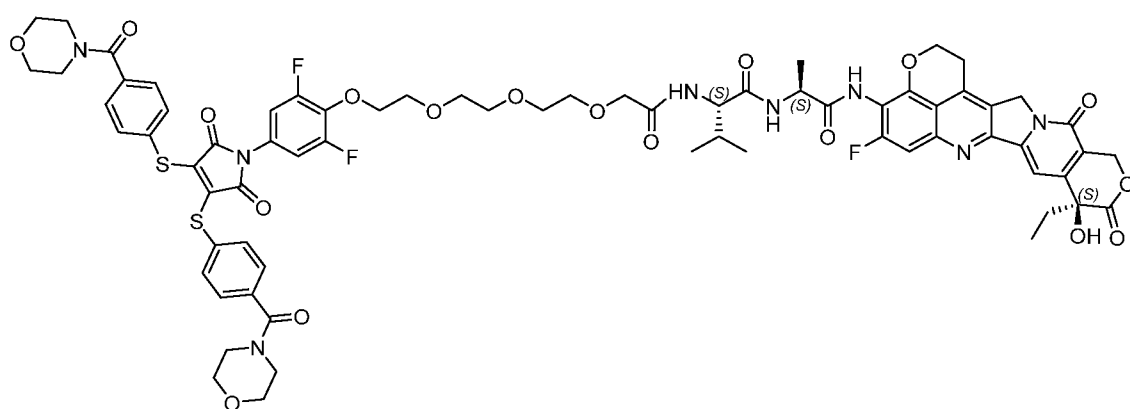


MWF-L7



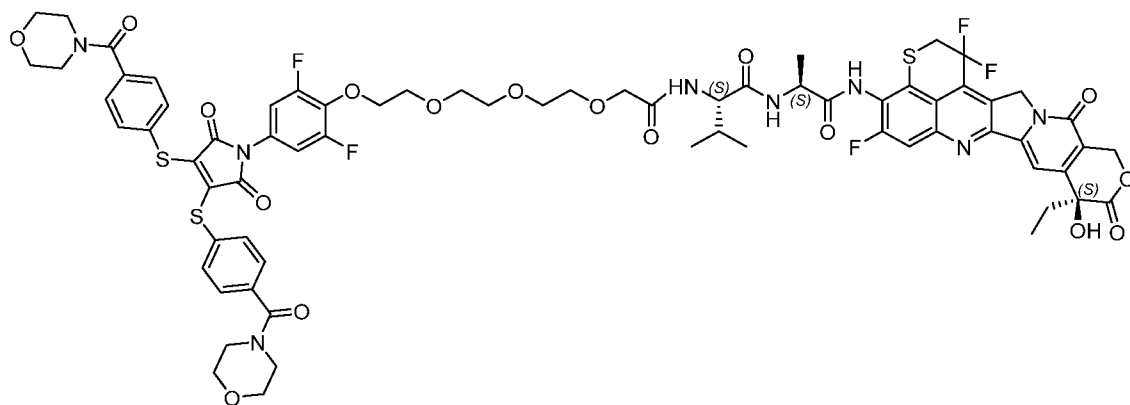


MWF-L11

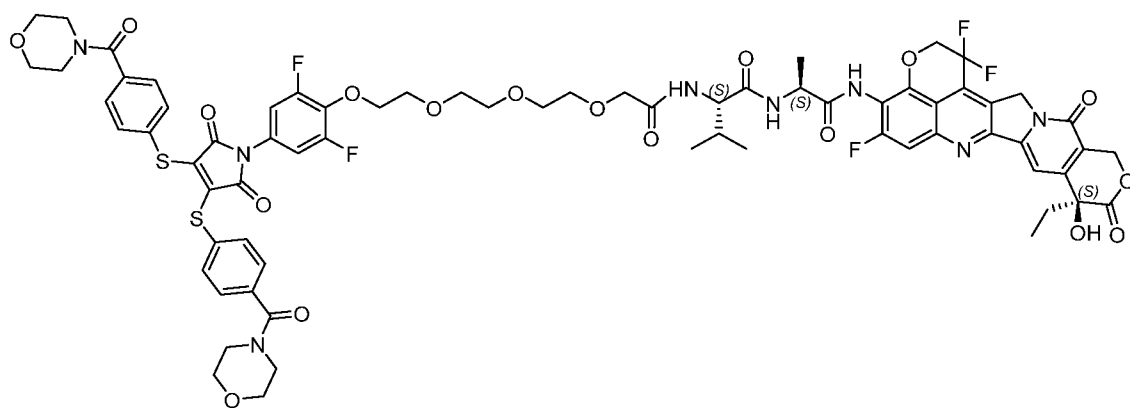


MWF-L12

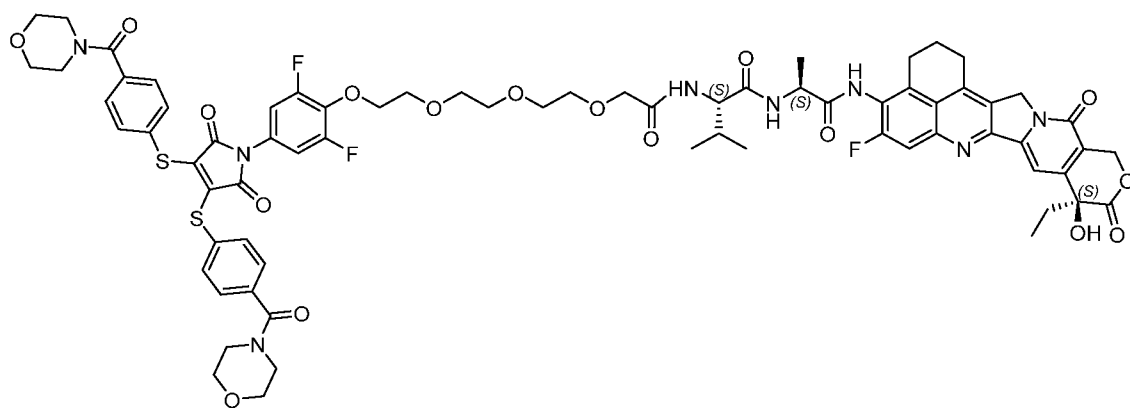
5



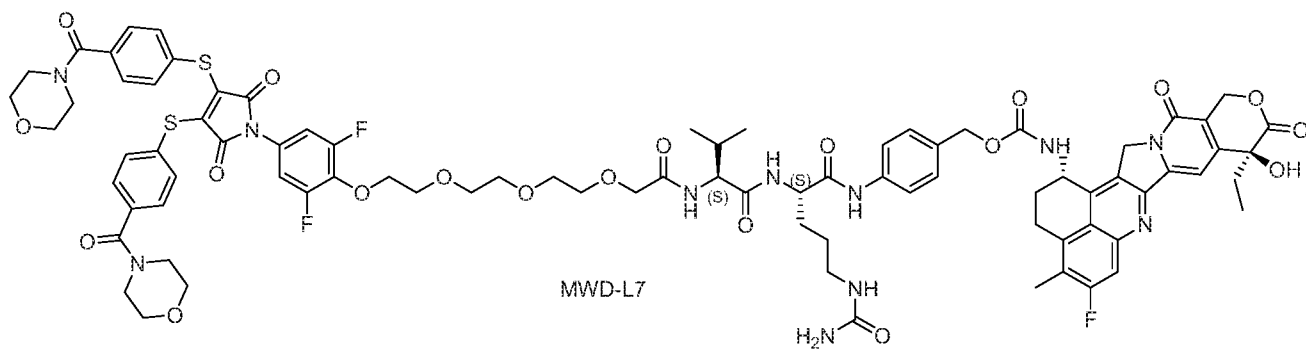
MWF-L13



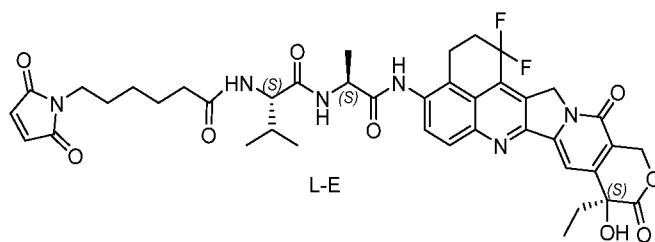
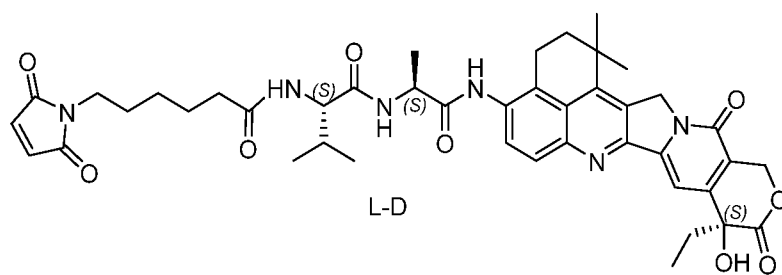
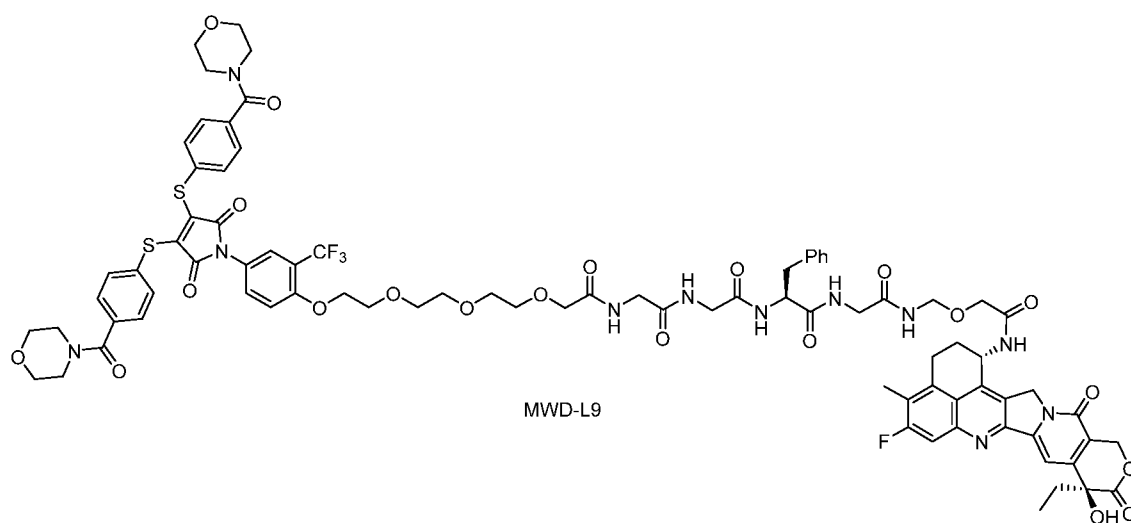
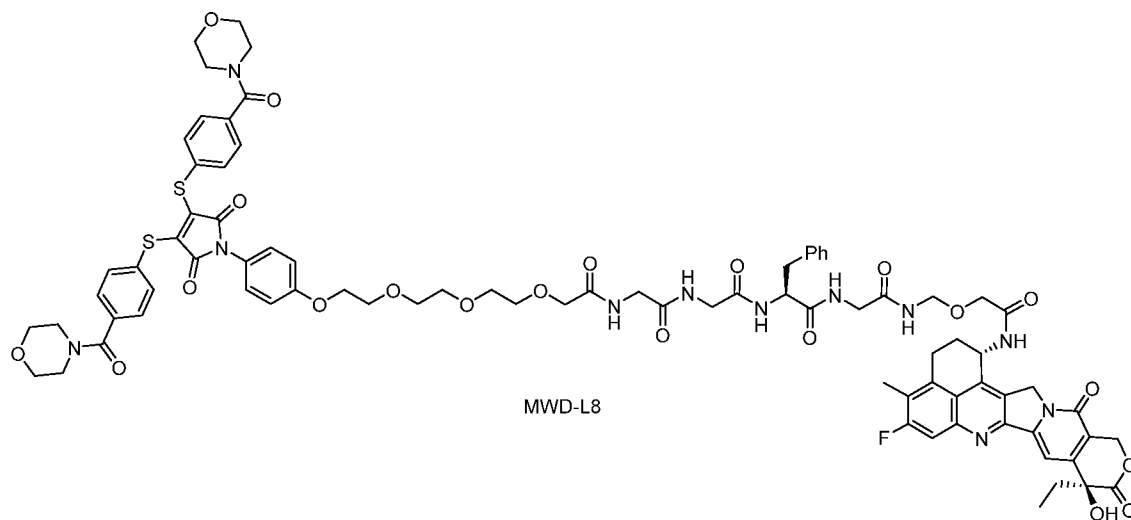
MWF-L14

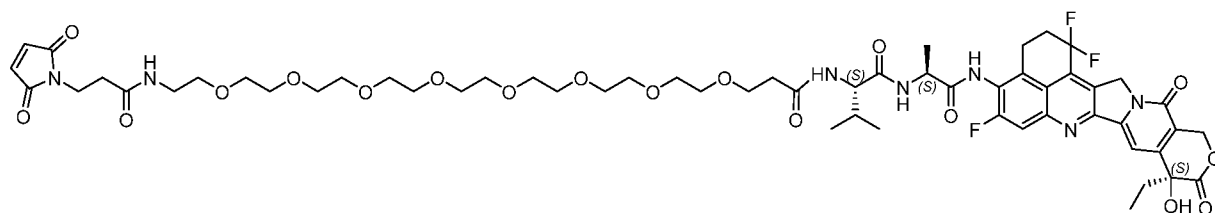
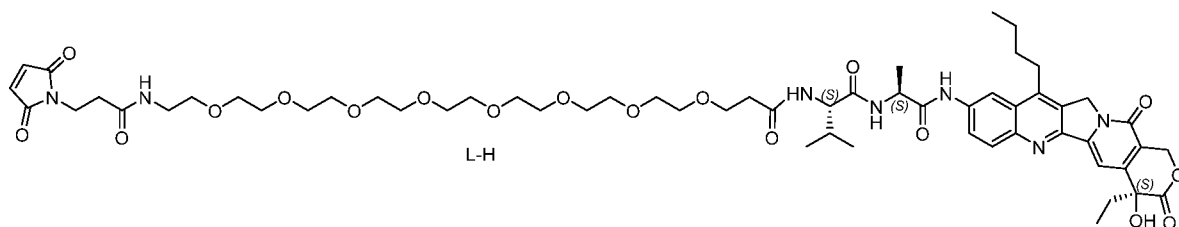
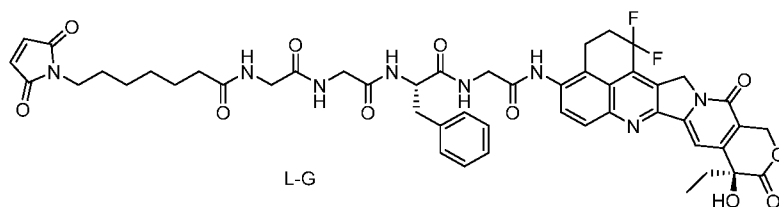
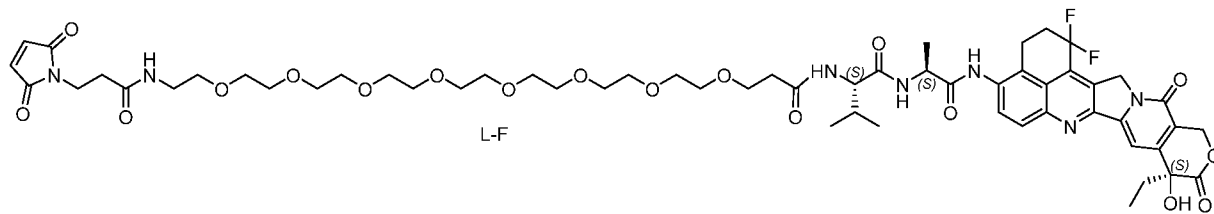


MWF-L15

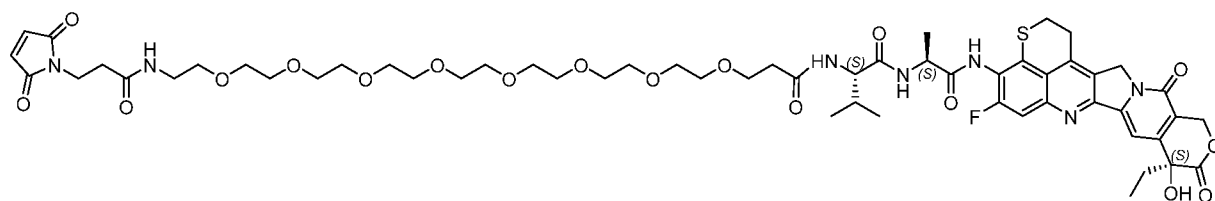


MWD-L7

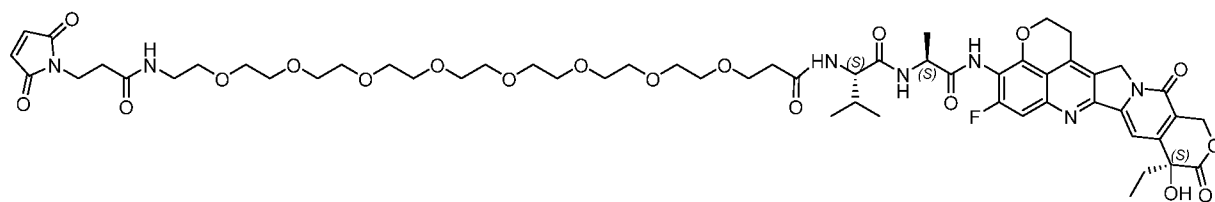




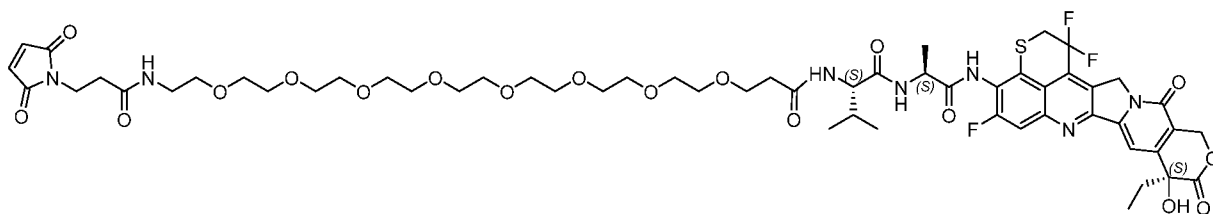
L-I



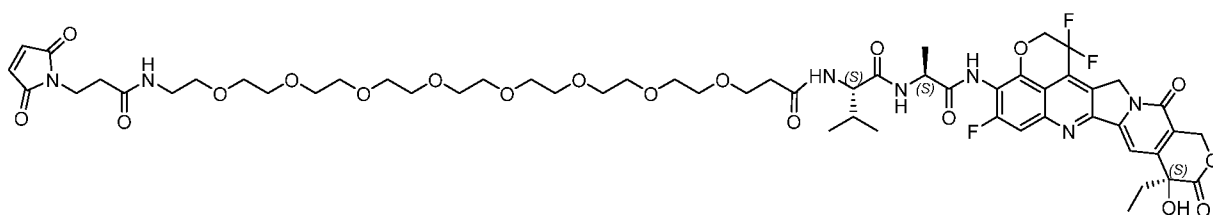
L-J



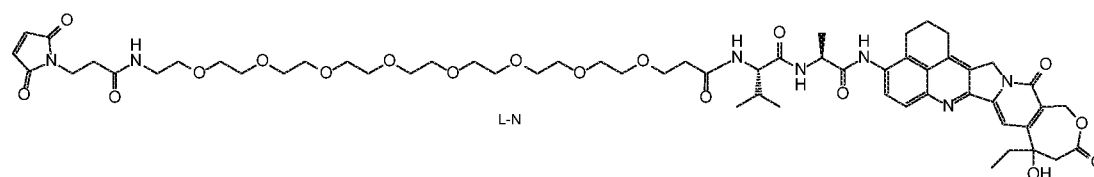
L-K



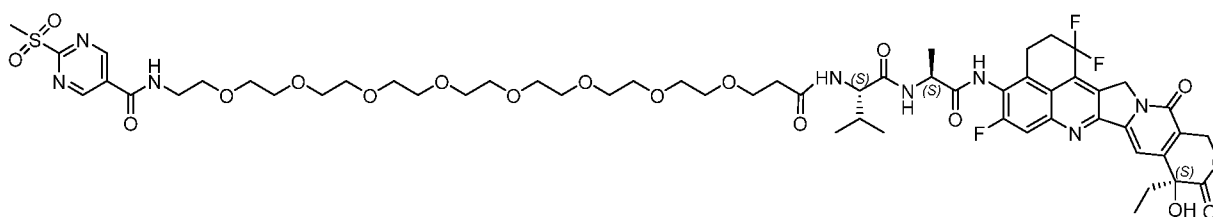
L-L



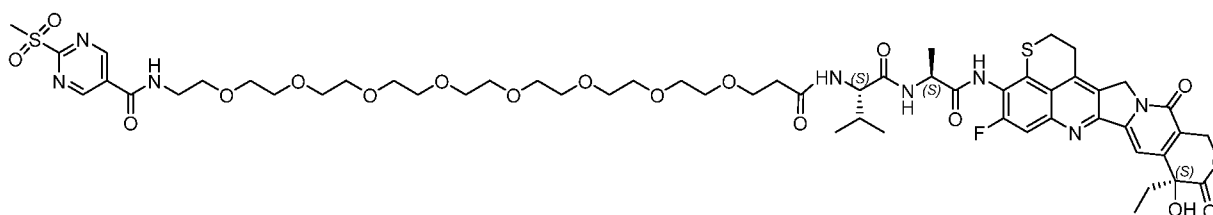
L-M



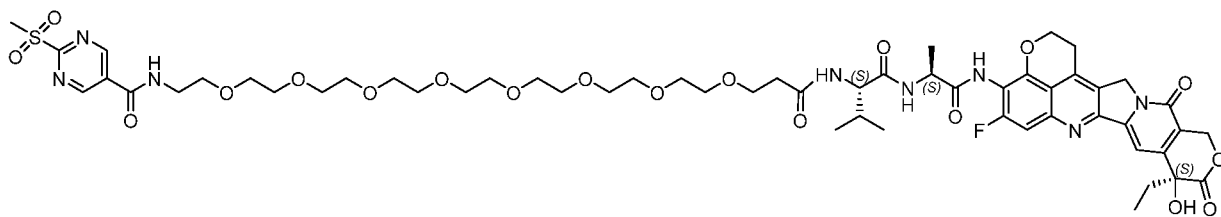
L-N



MWS-L1

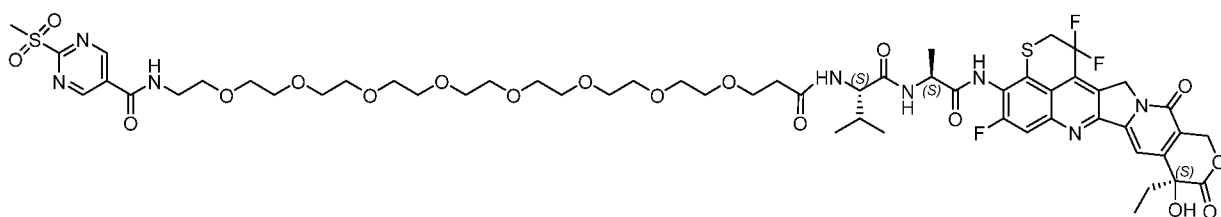


MWS-L2



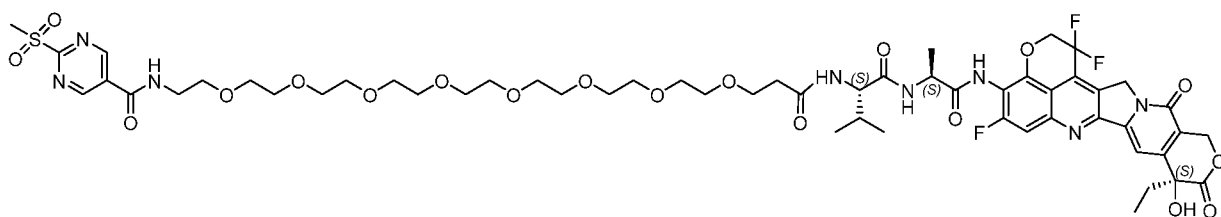
MWS-L3

5



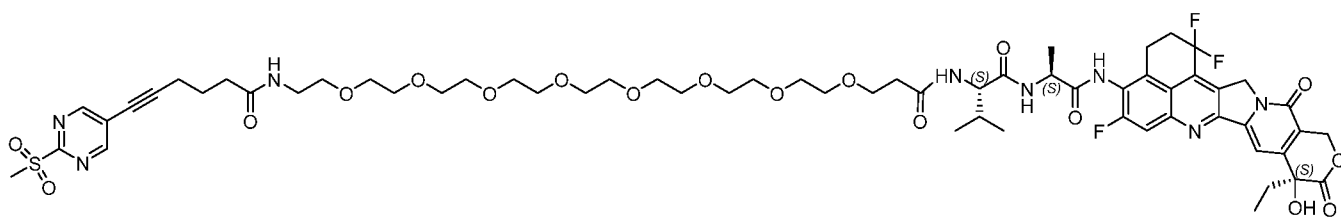
MWS-L4

10

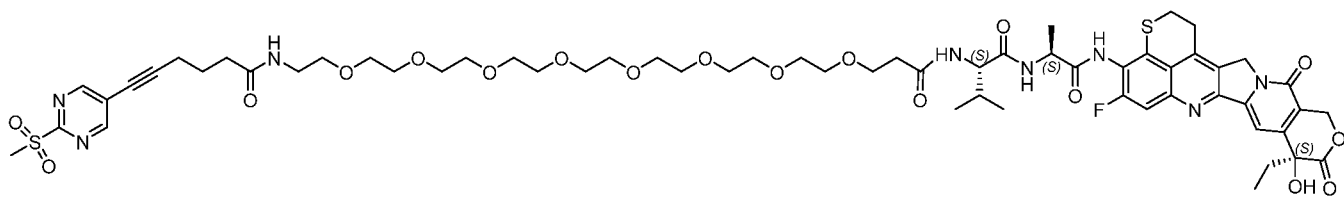


MWS-L5

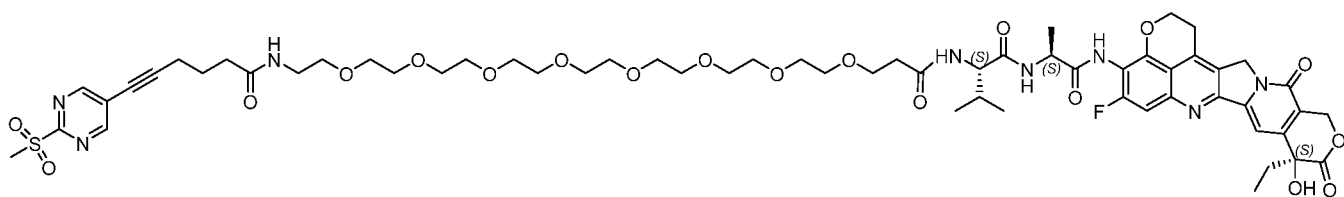
15



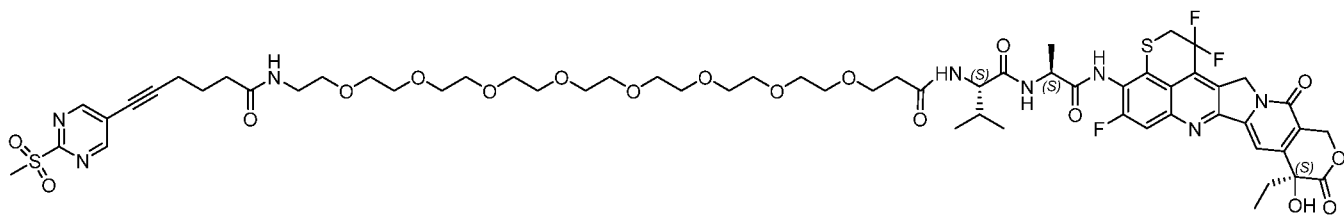
MWS-L6



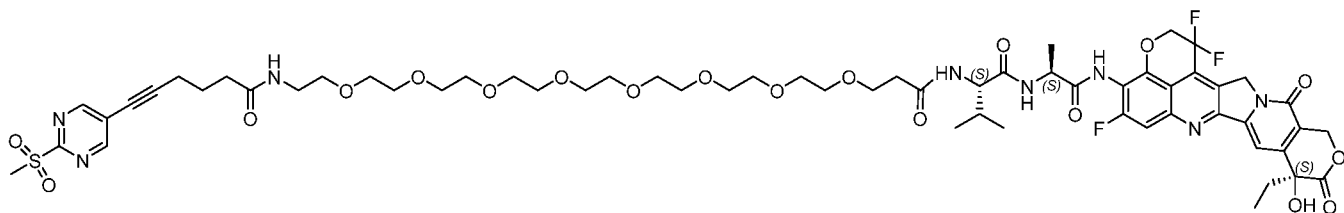
MWS-L7



MWS-L8



MWS-L9

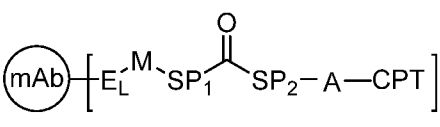


MWS-L10

第三方面, 本发明提供由如上结构式 I、I-A、II、II-A、III、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 所示化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药与抗体或抗体片段制得的抗体药物偶联物。

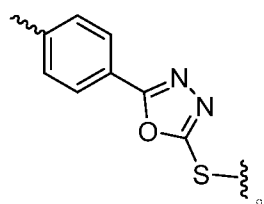
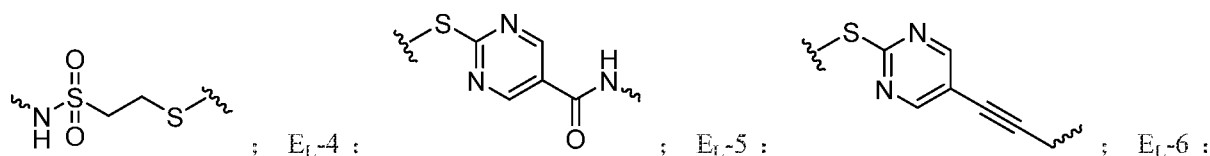
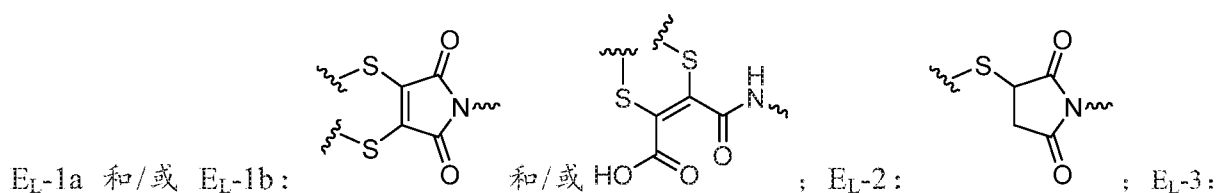
在本发明的第三方面, 所述抗体或抗体片段靶向肿瘤相关抗原, 所述肿瘤相关抗原例如 HER2、B7H3、HER3、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD45、CD56、

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、  
 5 NaPi2b、STEAP、SLITRK6、ETBR、BCMA、Trop-2、CEACAM5、SC-16、SLC39A6、Delta-like protein3、Claudin 18.2。

优选地，所述抗体药物偶联物具有通式  所示结构，

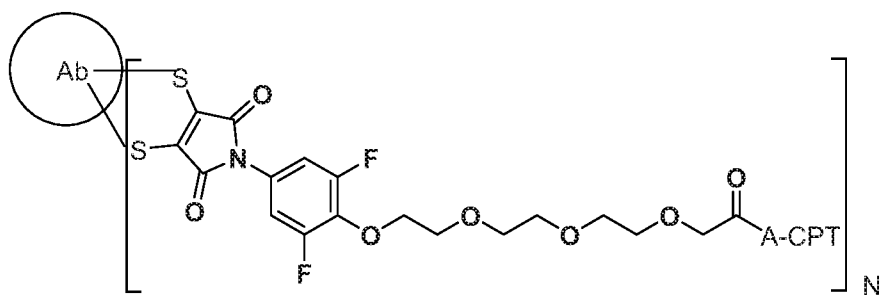
其中 mAb 表示抗体或抗体片段，基团 M、SP<sub>1</sub>、SP<sub>2</sub>、A 及 CPT 与上文结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 M、SP<sub>1</sub>、SP<sub>2</sub>、A 及 CPT 的定义相同。N 为 1~10、优选 1~8（例如 1~5）、  
 10 更优选 3~8。

其中，E<sub>L</sub> 选自如下基团，其中， 表示与 mAb 中半胱氨酸相连， 表示与 M 相连：



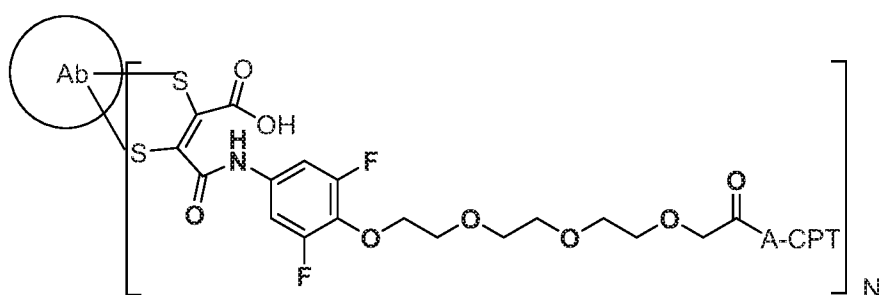
在所述通式结构中，mAb 可以是靶向上述任何肿瘤相关抗原的 IgG 型抗体或其片段，优选为的 IgG1 亚型抗体或其片段。

优选地，当结构式 VI 所示的化合物与抗体或抗体片段偶联时，所述抗体药物偶联物具有如下通式 VII 或通式 VIII 所示的结构：



通式 VII

和/或



通式 VIII

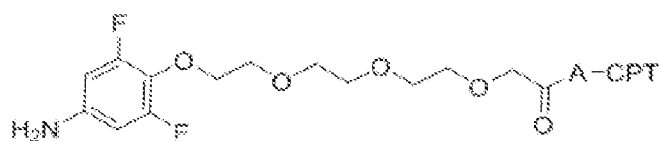
其中 N 为 1~10、优选 1~8 (例如 1~5)、更优选 3-8。

其中, Ab 对应上文通式  $\left[ \text{mAb} - \left( \text{E}_L - \text{M} - \text{SP}_1 - \text{C}(=\text{O}) - \text{SP}_2 - \text{A} - \text{CPT} \right)_N \right]$  中的 mAb。

通式 VII 和 VIII 中, 基团 A、CPT 与上文第二方面中提供的结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、CPT 的定义相同。

本发明在第三方面中提供的通式 VII 和 VIII 所示的抗体药物偶联物在细胞 (例如肿瘤细胞) 内可生成前药代谢产物。

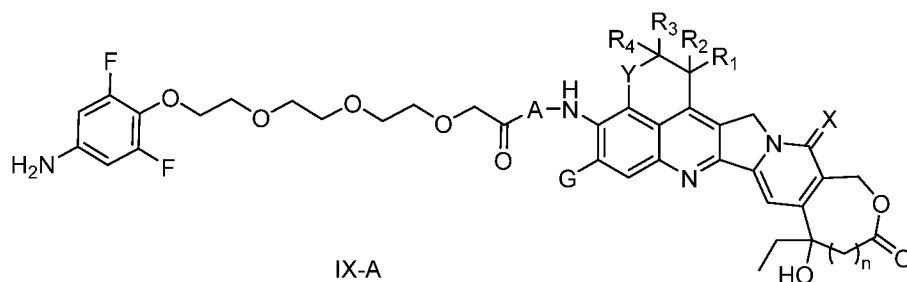
第四方面, 本发明提供结构式 IX 所示的化合物:



结构式 IX

结构式 IX 中, 基团 A、CPT 与上文第二方面中提供的结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、CPT 的定义相同。

具体地, 使用式 VI-A 化合物制备得到的抗体药物偶联物的前药代谢产物为结构式 IX-A 所示的化合物:



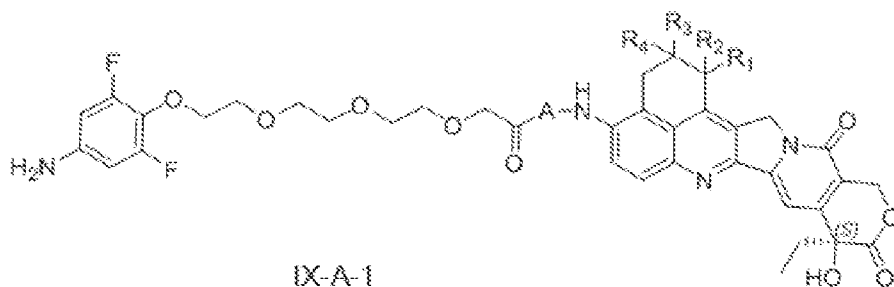
IX-A

结构式 IX-A

5 结构式 IX-A 中, 基团 A、G、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、n 与上文第二方面中提供的结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、G、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、n 的定义相同。

结构式 IX-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。

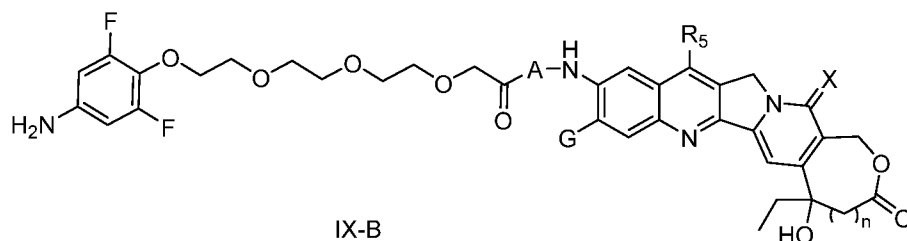
10 优选地, 本发明提供的结构式 IX-A 所示的化合物进一步为结构式 IX-A-1 所示的化合物:



IX-A-1

结构式 IX-A-1

使用式 VI-B 化合物制备得到的抗体药物偶联物的前药代谢产物为结构式 IX-B 所示的化合物:



IX-B

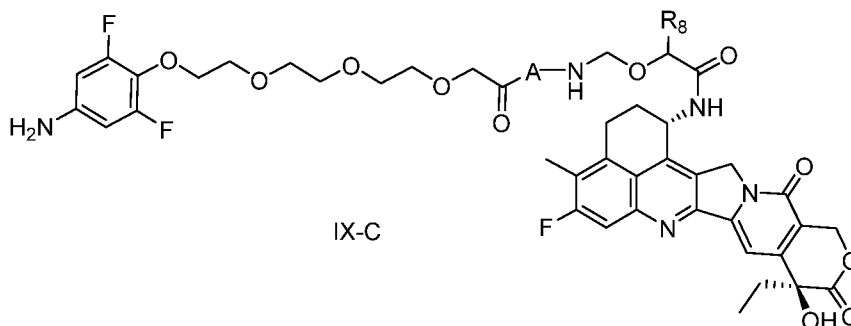
结构式 IX-B

15 结构式 IX-B 中, 基团 A、G、R<sub>5</sub>、X、n 与上文第二方面中提供的结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、G、R<sub>5</sub>、X、n 的定义相同。

结构式 IX-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。

当使用式 VI-C 化合物制备得到的抗体药物偶联物的前药代谢产物为结构式 IX-C 所示的化合物：



IX-C

结构式 IX-C

结构式 IX-C 中，基团 A、R<sub>8</sub> 与上文第二方面中提供的结构式 III 或结构式 IIIA 中基团 A、R<sub>8</sub> 的定义相同。

结构式 IX-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。

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、溶剂化物或前药或抗体药物偶联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、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD45、CD56、CD66c、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、ST4、Mucin16、NaPi2b、STEAP、SLITRK6、ETBR、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、溶剂化物或前药或抗体药物偶联物治疗肿瘤的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用所述化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药或抗体药物偶联物。

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、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、  
5 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 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、  
10 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。

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。

#### 附图说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

15 图 1：本发明的抗体药物偶联物 HIC 分析结果。

图 2：本发明的抗体药物偶联物在胰腺癌小鼠模型中的药效结果。

图 3：本发明的抗体药物偶联物在膀胱癌小鼠模型中的药效结果。

图 4：本发明的抗体药物偶联物在肺癌小鼠模型中的药效结果。

图 5：本发明的抗体药物偶联物的旁观者效应研究结果（均数±SD，n=2）。

20 图 6：本发明的抗体药物偶联物和抗体的细胞内吞时效曲线（均数±SD，n=3）。

图 7：本发明的抗体药物偶联物诱导肿瘤细胞凋亡的研究结果。

图 8：本发明的抗体药物偶联物和抗体与肿瘤细胞结合的量效曲线。

#### 具体实施方式

25 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用  
于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

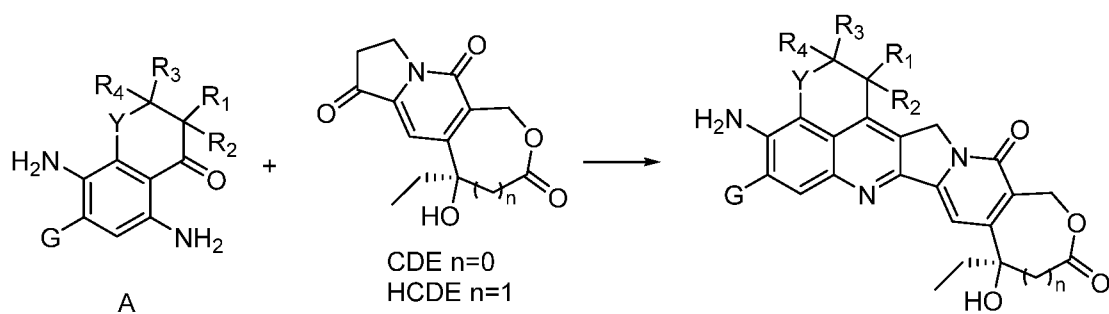
下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的  
原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

#### 30 实施例组 1 喜树碱类化合物的合成

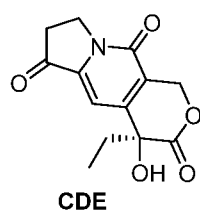
喜树碱类化合物合成通法：

本发明的喜树碱类化合物可以由式 A 所示化合物与 CDE 三环化合物经 Friedlander

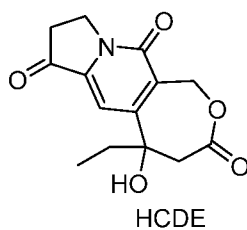
反应得到，反应通式如下：



其中，CDE 三环化合物购买自 MCE：

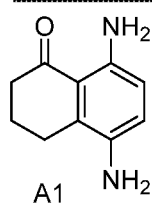


- 5 HCDE 三环化合物按照 Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2010, vol. 18, # 9, p. 3140-3146 方法制备得到：

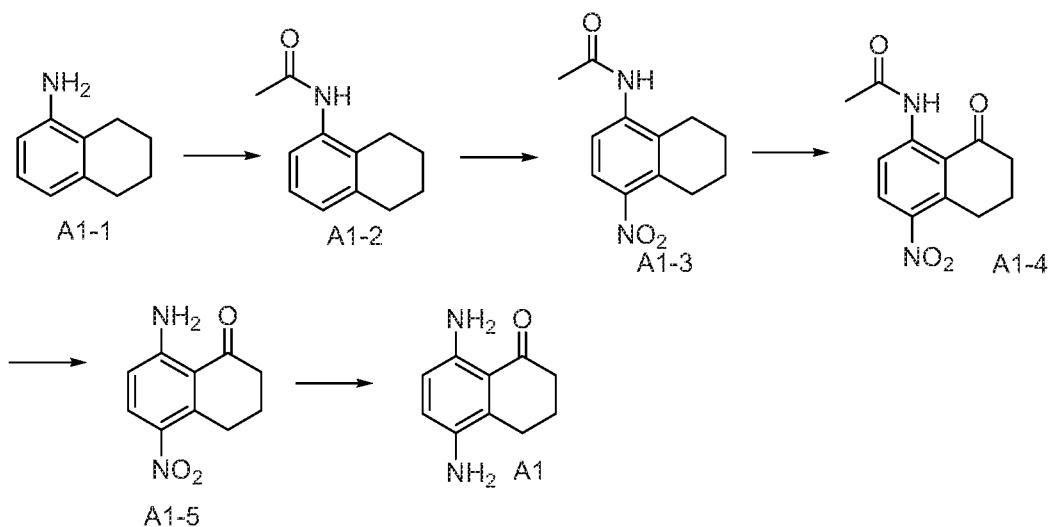


### 实施例组 1.1 式 A 所示化合物的合成

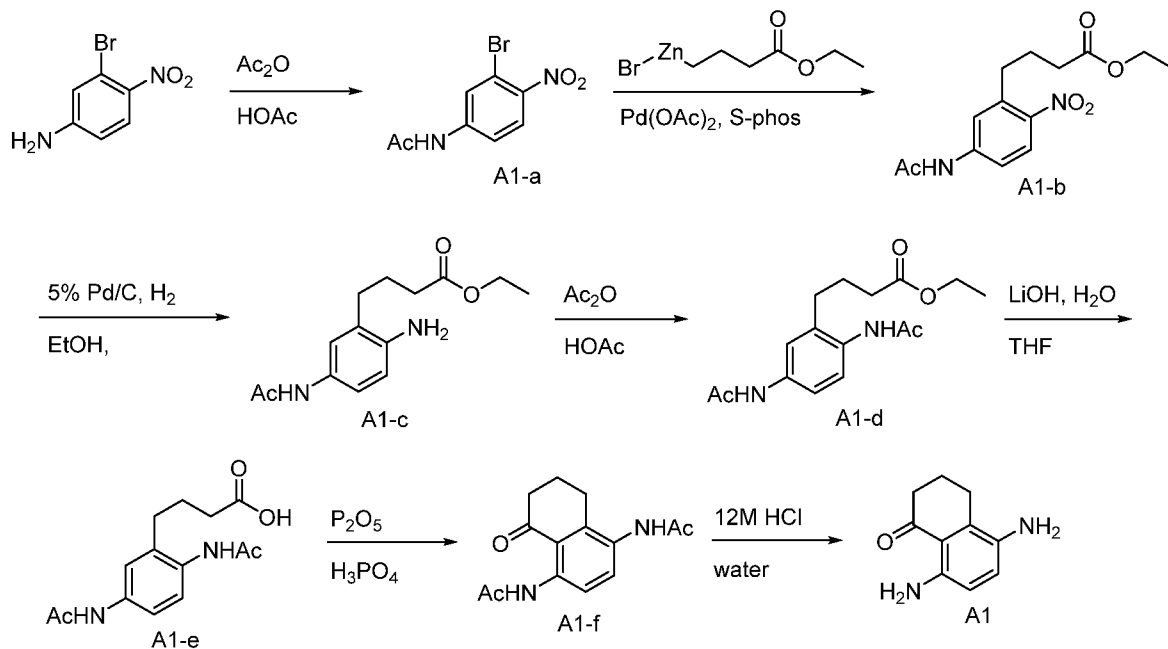
#### 10 实施例 1.1.1 化合物 A1 的合成



方法一、按照专利公布文件 WO2020200880A1 方法，合成化合物 A1，合成路线如下：



方法二、锌试剂钯催化偶联法合成化合物 A1，合成路线如下：



#### (1) 乙酰化

- 5 在 500 mL 烧瓶中加入 3-溴-4-硝基苯胺 (25.00 g, 0.12mol) 和 200 mL 醋酸，缓慢滴加 50 mL 乙酸酐，室温下反应 16 小时。TLC 检测原料反应完全后，将反应液过滤，反应液减压浓缩除去醋酸，合并滤饼用 200 mL MTBE 打浆，过滤干燥的黄色固体 (A1-a) 27.6 g。收率 92%。LC-MS (ESI):  $m/z$  259 (M+H)<sup>+</sup>。

#### (2) 4-乙氧基-4-氧代丁基溴化锌的制备

- 10 在一个 250 mL 三口烧瓶中 (温度计，回流冷凝管，橡胶塞) 加入活化过的锌粉 (19.0 g, 0.29mol, 2.00 eq)，置换氮气后加入无水 DMF (145 mL)，再次置换氮气，室温下加入碘单质 (1.86 g, 0.015mol, 0.1 eq)，可观察到溶液由无色变为棕红色，再逐渐变为淡黄色最后恢复无色 (2-3 min)，然后加入 4-溴丁酸乙酯 (28.6 g, 0.15mol, 1.00 eq)，升温至

80℃（内温）反应 4~5 小时，TLC 检测反应完全后，将反应液静置，冷却至室温待用，上清液呈淡黄色，浓度为 1 mol/L。

### (3) 锌试剂偶联

500 mL 反应瓶中加入无水 DMF (120 mL) 和中间体 A1-a (25.0 g, 1.00 eq)，置换氮气后加入醋酸钨 (433 mg, 0.02 eq)，置换氮气室温下搅拌 10 min 后加入 S-PHOS (1.6 g, 0.04 eq)，再次置换氮气，搅拌 20 min 后室温 (25-30℃) 滴加上述步骤中制备的 4-乙氧基-4-氧代丁基溴化锌 (145 mL, 1.50 eq)，加完后保持 25-30℃ 反应 16 小时。TLC 检测 (DCM:EA=5:1) 原料反应完全后，将反应液冷却至室温，向反应液中加入氯化铵溶液 (15 mL) 淬灭反应。将反应液倒入 1 L 水中，加入 400 mL 乙酸乙酯，分液，布氏漏斗过滤，水相用乙酸乙酯 (400 mL \* 2) 萃取，有机相用水 (500 mL) 洗涤两遍，饱和氯化钠溶液 (500 mL) 洗涤一遍，无水硫酸钠干燥，减压浓缩，得红棕色油状液体 (A1-b) 37.0 g，收率 130%。粗产品不用进一步纯化，直接用于下一步反应。LC-MS (ESI): [M+1]<sup>+</sup>= 295。

### (4) 中间体 A1-c 的合成

3 L 三口反应瓶中加入中间体 A1-b (37.0 g, 1.0 eq) 和乙醇 (1.5 L)，原料完全溶解。反应体系冷却至 5℃，加入 5% Pd/C (5.7 g, 1.0 eq)，氢气氛围下（常压）升温至 25℃ 反应 16 小时。TLC 检测 (DCM:EA=5:1) 反应完毕，反应体系在硅藻土下过滤，有机相浓缩得粗产品 (A1-c) 33.0 g，收率 130%。粗产品不用进一步纯化，直接用于下一步反应。LC-MS (ESI): [M+1]<sup>+</sup>= 265。

### (5) 中间体 A1-d 的合成

在 1 L 烧瓶中加入中间体 A1-c (33.0 g, 1.00 eq) 和 260 mL 醋酸，缓慢滴加 46 mL 乙酸酐，室温下反应 2 小时。TLC 检测 (DCM:MeOH=10:1) 原料反应完全后，将反应液过滤，反应液减压浓缩除去醋酸，加入 250 mL 水，水相用乙酸乙酯 (400 mL \* 2) 萃取，有机相用水 (500 mL) 洗涤两遍，饱和氯化钠溶液 (500 mL) 洗涤一遍，无水硫酸钠干燥，减压浓缩，得粗产品 32g。粗产品用 400 mL MTBE 打浆，过滤干燥的淡黄色固体 (A1-d) 27.0 g，收率 91%。四步反应总收率为 83.7%。

LC-MS (ESI): [M+1]<sup>+</sup>=307。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.87 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.37 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.06 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.02 (s, 6H), 1.79 – 1.64 (m, 2H), 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 3H)。

### (6) 中间体 A1-e 的合成

500 mL 三口反应瓶中加入中间体 A1-d (27.0 g, 88mmol, 1.0 eq)，水 (100 mL) 和四氢呋喃 (200 mL)，原料完全溶解。室温条件下加入一水合氢氧化锂 (18.5 g, 441mmol，

5.0 eq), 反应体系维持室温继续反应 3 小时。TLC 检测反应完毕, 减压蒸出大部分四氢呋喃, 残留物加入 300 mL 水, 水相用 EA 萃取 (2×100 mL), 弃去有机相。水相在冰浴下用 6N 盐酸调 pH 至 4, 有固体析出, 过滤得白色固体(中间体 A1-e), 19.1 g, 收率 78%。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.09 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 7.38 (d, J = 15.5 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 2.51 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.02 (s, 6H), 1.76 – 1.61 (m, 2H)

#### (7) 化合物 A1 的合成

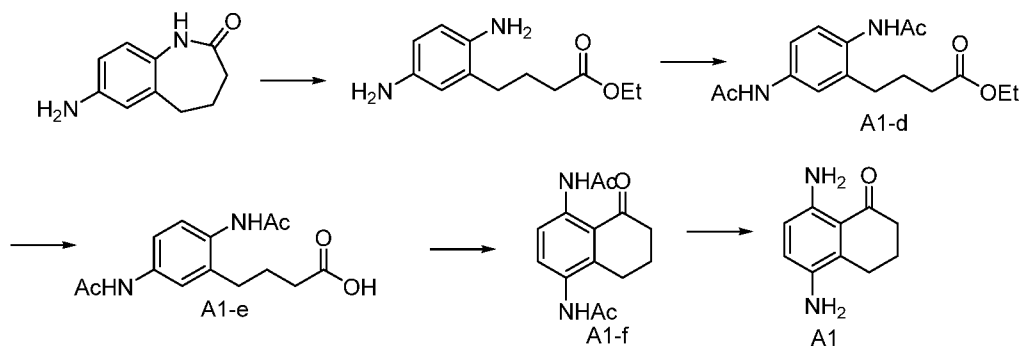
250 mL 反应瓶中加入多聚磷酸 40ml, 加热至 90℃, 分批加入中间体 A1-5 (5.0 g, 17.97mmol), 内温保持 95-100℃反应 5 小时。TLC 检测反应完毕, 撤去加热, 体系降温至 50-60℃, 向反应体系中滴加 15 mL 4M HCl(aq) (温度会升至 100℃) 淬灭反应, 滴毕, 冰浴下滴加 600 mL 4M NaOH 水溶剂调 pH 到 10。水相用乙酸乙酯 (50 mL \* 3) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液 (50 mL) 洗涤一遍, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 得黄色固体 (中间体 A1-f) 3.75 g, 收率 80.5%。不经纯化直接下一步反应。LC-MS (ESI): [M+1]<sup>+</sup>=261。

250 mL 三口反应瓶中将原料中间体 A1-f (3.75 g) 悬浮于 19% 盐酸 (30 mL) 中。反应体系加热至 90℃ (内温) 反应 3 小时。TLC 检测原料反应完毕, 冰盐浴降温至 5℃ 以下, 滴加 4M NaOH 溶液 (45 mL, 30 eq) 调 pH 到 10, 水相用乙酸乙酯 (80 mL \* 5) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液 (50 mL) 洗涤一遍, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 得粗产品 2.45g。粗产品柱层析纯化, 洗脱剂为 DCM, 得黄色固体 (化合物 A1), 1.93 g, 收率 76%。两步反应总收率 61.2%。

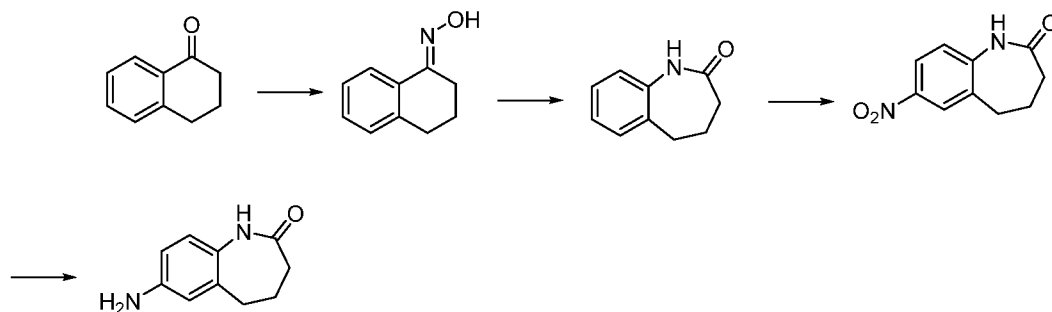
LC-MS (ESI): [M+1]<sup>+</sup>= 177。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.76 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.68 (s, 2H), 6.42 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 2.55 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.46 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.00 – 1.80 (m, 2H)

方法三、内酰胺水解法制备化合物 A1, 合成路线如下:



根据专利公布文件 CN106349233A 方法制备得到氨基内酰胺化合物。

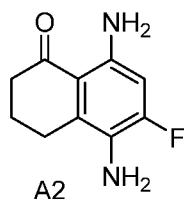


于 500ml 三口烧瓶中, 将氨基内酰胺化合物 (17.6g, 0.1mol), 乙醇 (250ml), 98% 硫酸 (5ml) 混合, 加热回流反应 24 小时。取样检测, 待反应完全后, 将反应液减压浓缩至干。残留物加入二氯甲烷 (200ml) 和水 (100ml), 冰浴降温至 10°C 以下, 用 1N 氢氧化钠水溶液调节 pH7~8, 搅拌分液, 水相用二氯甲烷萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸馏, 蒸除有机溶剂, 得到二氨基乙酯中间体粗品, 25g, 直接下一步反应。

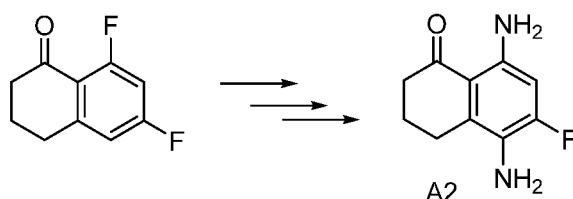
二氨基乙酯中间体溶于二氯甲烷 (200ml) 中, 加入三乙胺 (20.2g, 0.2mol, 2eq), 冰浴降温至 10°C 以下, 滴加乙酸酐 (25.5g, 0.25mol, 2.5eq)。滴毕, 保温反应 1 小时, 取样检测, 待反应完全后, 将反应液倒入冰的 1N 盐酸中, 搅拌 15 分钟, 分液, 水相二氯甲烷 (50ml\*3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸馏, 蒸除有机溶剂, 粗产品用 400 mL MTBE 打浆, 过滤干燥得中间体 A1-e 为淡黄色固体, 26.9 g。两步反应总收率 87.8%。LC-MS (ESI): m/z 307 (M+H)<sup>+</sup>。

再根据方法 2, 从中间体 A1-e 制备得到化合物 A1。

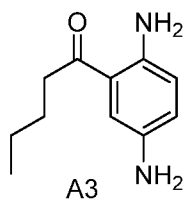
#### 实施例 1.1.2 化合物 A2 的合成



按照专利公布文件 WO2021148501 方法, 合成化合物 A2, 合成路线如下:



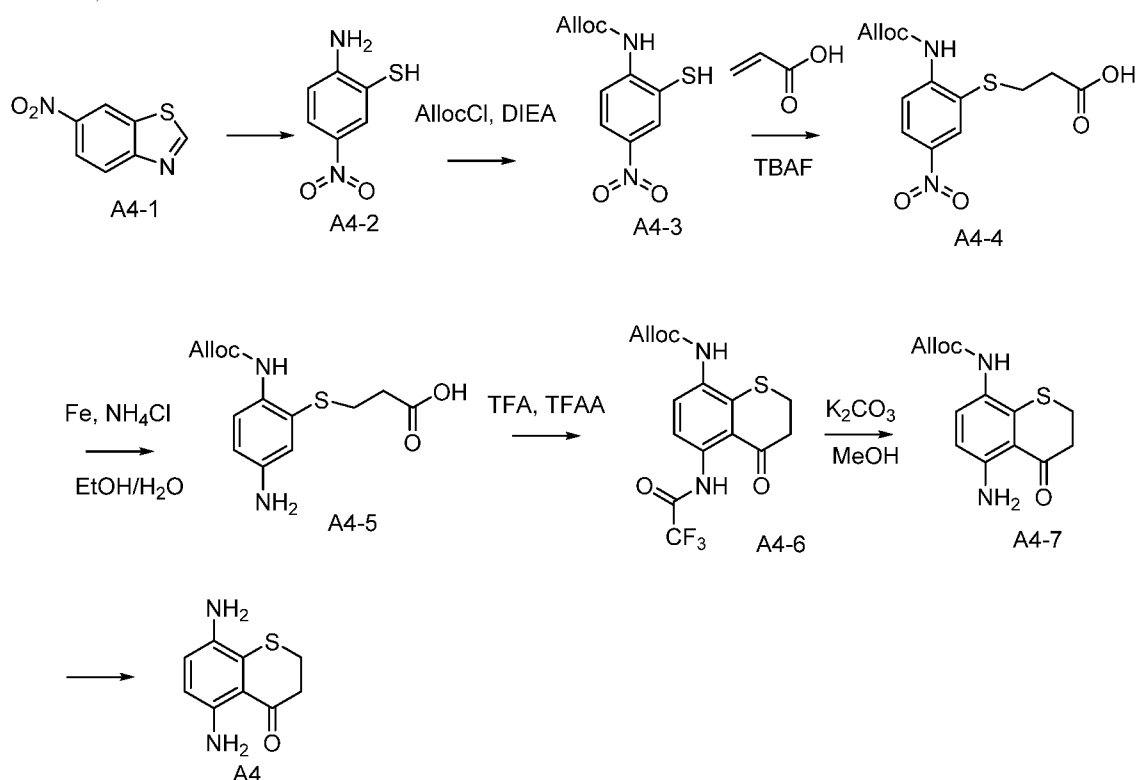
#### 实施例 1.1.3 化合物 A3 的合成



按照专利公布文件 US2004266803A 方法，合成化合物 A3。

#### 实施例 1.1.4 化合物 A4 的合成

5 按照与文献 Journal of Medicinal chemistry, 1998, 41(13), 2308-2318 类似的方法合成化合物 A4，合成路线如下：



步骤 1:

A4-2 中间体由 A4-1 化合物按照文献方法制备得到。

10 步骤 2:

于-5~5℃下，将 A4-2 中间体 (3.4g) 溶于二氯甲烷中，加入三乙胺 (3.0g)，继续慢慢滴加 AllocCl (2.8g)，滴加完毕搅拌反应 1~2 小时；加水淬灭，水洗一次，饱和食盐水洗涤一次，无水硫酸钠干燥，浓缩干得 A4-3 中间体粗品 5.5g。LC-MS (ESI): [M+1]<sup>+</sup>=255.7。

15 步骤 3:

常温下，将 A4-3 中间体 (5.5g) 混于 TBAF (55ml) 和丙烯酸 (110ml) 中，加热至 50~55℃搅拌反应 24 小时；反应也直接浓缩干，柱层析，石油醚洗脱至甲醇:二氯甲烷=1:

50 得 A4-4 中间体粗品约 5.2g。LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=327.4$ 。

步骤 4:

常温下, 将 A4-4 中间体 (5.0g) 混于乙醇: 水=3: 1 的 100ml 混合溶液中, 加入氯化铵 (5.5g) 和铁粉 (5.5g), 加热至回流反应 1~2 小时; 反应也冷却至室温, 过滤, 固  
5 体用乙醇洗涤, 浓缩干, 得 A4-5 中间体粗品约 3.8g, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=297.4$ 。

步骤 5:

20~30℃, 将 A4-5 中间体 (3.8g) 混于三氟乙酸 (38ml) 中, 加入三氟乙酸酐 (38ml), 搅拌反应 18~24 小时; 后处理: 直接浓缩干, 柱层析, 石油醚洗脱至乙酸乙酯: 石油醚  
=1: 4 得 A4-6 中间体: 1.0g; LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=375.3$ 。

10 步骤 6:

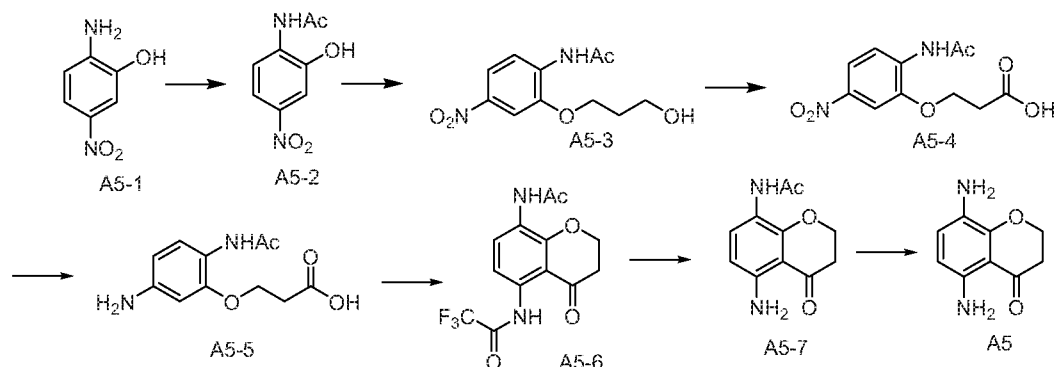
常温下, 将 A4-6 中间体 (1.0g) 混于甲醇 (20ml) 中, 加入碳酸钾 (2.0g) 和水 (5ml) 搅拌反应 1~2 小时; 加水稀释反应液, 乙酸乙酯萃取, 有机相饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩干得粗品, 柱层析石油醚洗脱至乙酸乙酯: 石油醚=1: 2 得 A4-7 中间体:  
0.65g, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=279.3$ 。

15 步骤 7:

常温下, 将 A4-7 中间体 (500mg) 溶于四氢呋喃 (20ml) 中, 氮气保护下, 加入吡咯 (120mg) 和四三苯基膦钨 (160mg), 完毕搅拌反应 1~2 小时; 将反应液直接浓缩干, 柱层析二氯甲烷: 甲醇=30: 1 纯化, 得到 A4 为棕色固体, 30mg; LC-MS (ESI):  
[M+1]<sup>+</sup>=195.4。

### 20 实施例 1.1.5 化合物 A5 的合成

按照与文献 Journal of Medicinal chemistry, 1998, 41(13), 2308-2318 类似的方法合成化合物 A5, 合成路线如下:



25 步骤 1:

20~30℃, 将 A5-1 化合物 (25g) 混于乙酸 (100ml) 中, 慢慢加入乙酸酐 (24.9g),

加料完毕，搅拌 3~4 小时；将反应液慢慢转入冰水中，搅拌析出固体，过滤，收集固体，水洗，真空干燥得 A5-2 中间体为黄色固体，31.0g，LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=197.2$ 。

步骤 2:

20~30℃，将 A5-2 中间体 (29g)、碳酸钾 (40g)、碘化钾 (5g) 和溴丙醇 (25g) 混于 DMF (300ml) 中，加热至 100~110℃，搅拌 3~4 小时；反应液冷却至室温，加入冰水中淬灭，用乙酸乙酯 2L 萃取三次，合并，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩干用石油醚打浆得固体，真空干燥得 A5-3 中间体，为黄色固体：33.0g，LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=255.3$ 。

步骤 3:

20~25℃，将 A5-3 中间体 (23g) 溶于乙腈 (1L) 中，依次加入磷酸二氢钠溶液 (0.67mol, pH 6.7, 900ml)、TEMPO (5g) 和亚氯酸钠溶液 (52.0g 溶于 60ml 水中) 和次氯酸钠溶液 (38ml 混合 38ml 水)，加料完毕，反应液呈现深棕色，搅拌 30 分钟；将反应液冷却至室温，用 2N 的盐酸调节 pH 至 2~3，乙酸乙酯萃取 (1000ml×3)，乙酸乙酯层合并，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤浓缩干，石油醚打浆得 A5-4 中间体粗品 24.0g，LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=269.2$ 。

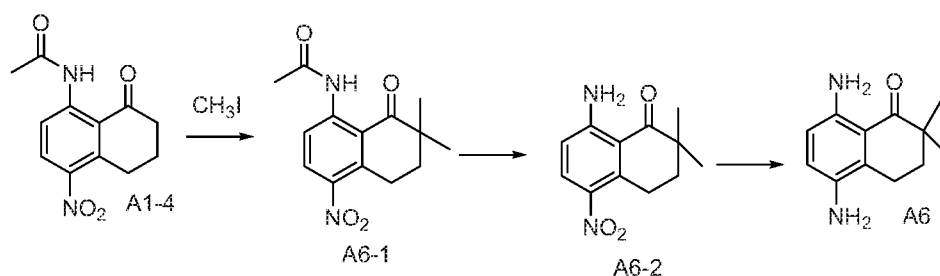
步骤 4:

常温下，将 A5-4 中间体 (25g) 和 5% 钨炭 (5g) 混于甲醇 (500ml) 中，加压氢化反应 3~4 小时；过滤掉钨炭，固体用甲醇洗涤，滤液浓缩，残留物石油醚打浆得粗品，真空干燥得 A5-5 中间体，为黄色固体：18.0g，LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=239.5$ 。

按照化合物 A4 合成中步骤 5，步骤 6 类似的方法，从 A5-5 中间体出发合成 A5-7 中间体，最后用 6N 盐酸脱除乙酰基保护，制备得到化合物 A5，为黄色固体，LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=179.2$ 。

#### 实施例 1.1.6 化合物 A6 的合成

按照文献 Journal of Medicinal chemistry, 1998, 41(13), 2308-2318 方法合成化合物 A6，合成路线如下：



化合物 A6 为黄色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=248.9$ 。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  12.289 (1H, s), 8.666-8.648 (1H, d), 8.198-8.1 (1H, d), 3.138-3.108 (2H, t), 2.768-2.734 (2H, t), 2.219 (3H, s), 2.050-1.991 (2H, m)

5        步骤 1:

于 250ml 三口烧瓶中, 氮气保护下, 将 A1-4 化合物 (1.25g, 5mmol, 1eq) 溶于 150 ml 四氢呋喃中, 降温到  $-60^\circ\text{C}$ , 加入 LDA (2 M in THF, 7.6ml, 15.2mmol, 3.04eq), 加毕后于  $-60^\circ\text{C}$  下搅拌反应 30 分钟。加入 MeI (1.45g, 10.21mmol, 2.04eq), 加毕, 撤除干冰浴, 自然升温, 室温反应过夜。加入 50 ml 氯化铵水溶液淬灭反应, 用乙酸乙酯 (150ml\*3) 萃取, 合并有机相, 用水洗涤一次, 有机相浓缩至干得粗品。粗品经柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯=1: 0~5: 1, 得 A6-1 化合物, 黄色固体, 350mg, 收率 28%。

$^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.49 (1H, s), 8.77 (1H, d), 8.03 (1H, d), 3.21 (2H, m), 2.22 (3H, s), 1.90 (2H, t), 1.20 (6H, s)

15       步骤 2:

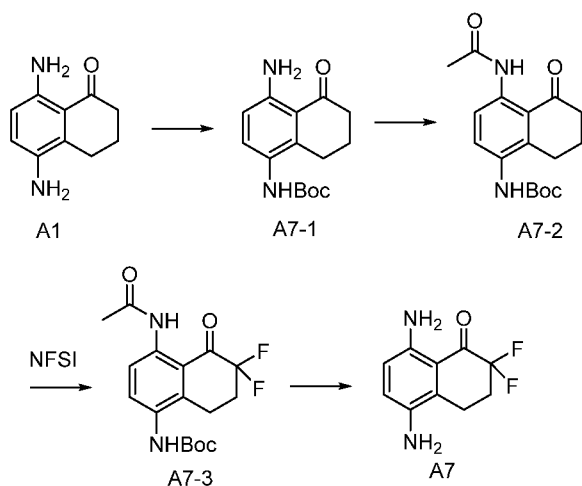
于 100ml 单口烧瓶中, 将 A6-1 化合物 (280mg) 与 20 ml 6 N 盐酸混合, 加热回流搅拌反应 2 小时; 停止加热, 待反应液冷却至室温后, 用碳酸氢钠将反应液 pH 调到 7~8, 用二氯甲烷 (30ml\*3) 萃取, 合并有机相, 浓缩干, 得 A6-2 化合物, 棕灰色固体, 275mg。粗品不经纯化, 直接下一步反应。

20       步骤 3:

于 50ml 三口烧瓶中, 将 A6-2 化合物 (220mg) 溶于乙酸 (25ml) 中, 加入 1.3 克铁粉, 加毕, 于  $80\sim 85^\circ\text{C}$  搅拌 1-2 小时; 待反应完全后, 减压蒸馏蒸除乙酸, 残留物加入水 (30ml), 用碳酸氢钠将 pH 调到 7~8, 用二氯甲烷 (30ml\*3) 萃取, 浓缩干得粗品, 粗品经柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯=1: 0~2: 1, 得 A6 化合物, 棕色固体, 122mg, 两步反应收率 75%。LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=205.0$

### 实施例 1.1.7 化合物 A7 的合成

合成路线如下:



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℃ 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%。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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℃，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%。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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~-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): [M+]<sup>+</sup>=355.8

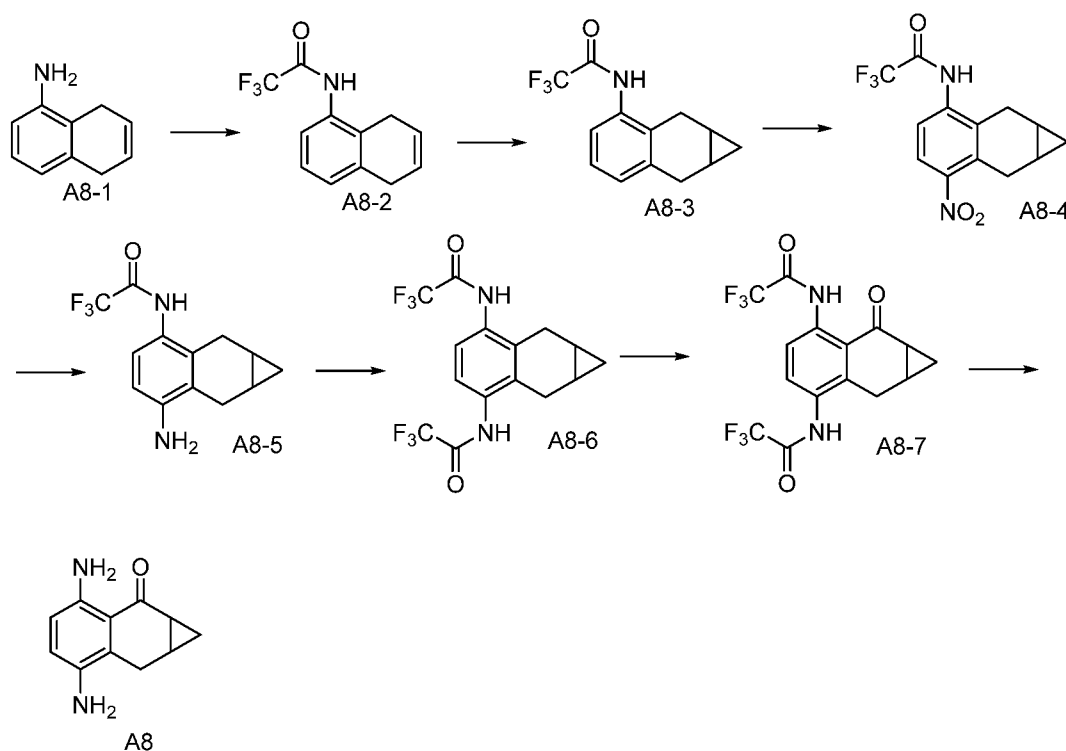
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.49 (s, 1H), 8.64 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 8.5 Hz,

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, 浓缩干得粗品, 经柱层析  
5 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): [M+1]<sup>+</sup>=213.9

### 实施例 1.1.8 化合物 A8 的合成

合成路线如下:



按照文献 Journal of Medicinal Chemistry, 1989, vol. 32, # 6, p. 1217-1230 方法合成 A8-1 化合物。LC-MS: (ESI): [M+1]<sup>+</sup>=146.3。

A8-1 化合物 (1.8 g)、DIEA (4.8 g) 加入 DCM (50 ml) 中。冷至 0℃。加入三氟乙酸酐 (4.8 g), 升温至室温, 反应 1 小时。加入水 (20 ml), 分层有机层, 旋干。过柱纯化  
15 (EA:PE=0-30%) 得 A8-2 中间体为白色固体, 2.7 g。LC-MS: (ESI): [M+1]<sup>+</sup>=242.2。

Zn(Et)<sub>2</sub> (33.6 ml) 加入 DCM (70 ml) 中, 冷至 0℃。加入 TFA (3.8 g)、CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub> (9.0 g)。反应 15 分钟。滴加 A8-2 化合物 (2.7 g) 的 DCM (30 ml) 溶液。滴毕, 室温搅拌过夜。加入水 (30 ml), 分层有机层, 干燥, 旋干得 A8-3 中间体为灰白色固体, 2.7 g。LC-MS (ESI): [M+1]<sup>+</sup>=256.1。

A8-3 中间体 (1.5 g) 加入 DCM (100 ml) 及乙酸酐 (30 ml) 中, 冷至 0℃, 加入 65% 硝酸

(2.8 g), 室温反应过夜。加入水(50 ml)、DCM(100 ml)。分层有机层, 旋干。油泵拉干得 A8-4 中间体粗品, 1.6 g, 直接用于下一步。LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=301.2$ 。

A8-4 中间体 (1.6 g 粗品)、铁粉(3.2 g)、氯化铵(6.4 g)加入无水乙醇(100 ml)中, 升温回流过夜。冷却, 过滤, 旋干, 过柱纯化(EA:PE=0-50%)得 A8-5 中间体为棕色油状物,

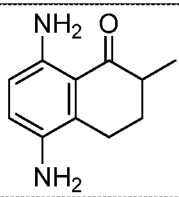
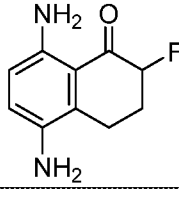
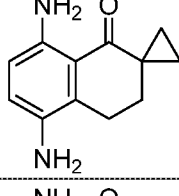
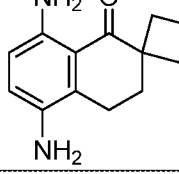
5 0.25 g。LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=271.3$ 。

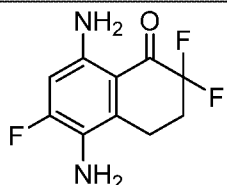
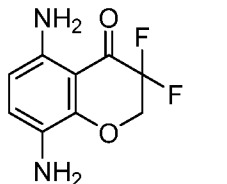
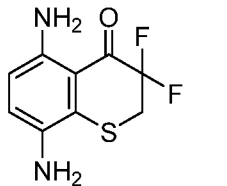
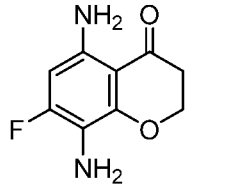
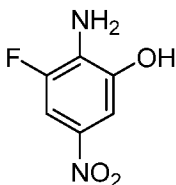
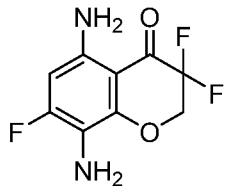
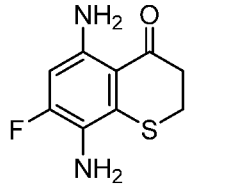
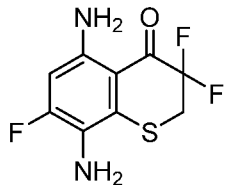
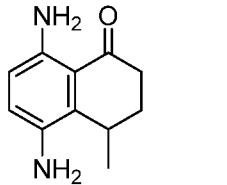
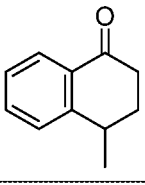
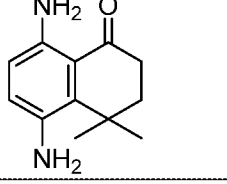
A8-5 中间体 (250 mg)、DIEA (400 mg)加入 DCM (10 ml)中, 冷至 0℃, 加入三氟乙酸酐(320 mg), 室温反应 1 小时。加入水(5 ml)洗涤。分出有机层, 干燥, 过滤, 旋干得 A8-6 中间体为黄色固体, 340 mg。LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=367.3$ 。

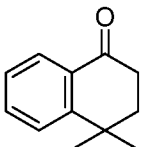
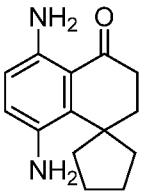
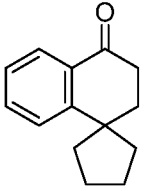
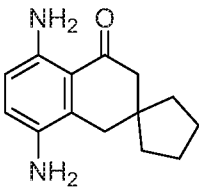
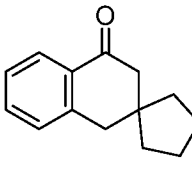
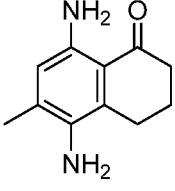
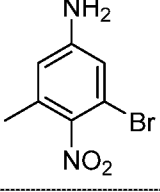
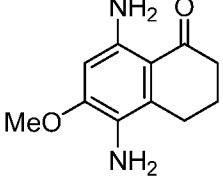
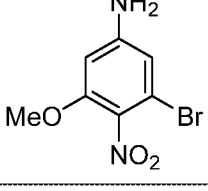
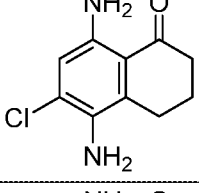
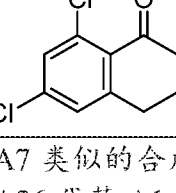
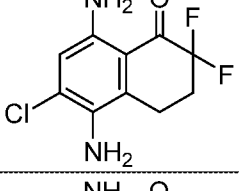
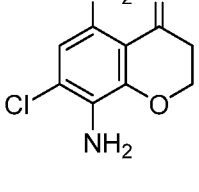
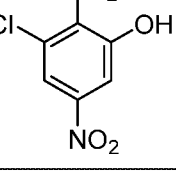
A8-6 中间体 (150 mg)、CrO<sub>3</sub>(400 mg)加入乙酸(8 ml)及乙酸酐(4 ml)中, 30-40℃反应  
10 3 小时。旋干溶剂。加入水(5 ml), 用 DCM (20 ml)萃取。分出有机层, 干燥, 过滤, 旋干得 A8-7 中间体粗品 160 mg, 直接用于下一步。LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=381.3$ 。

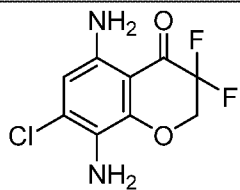
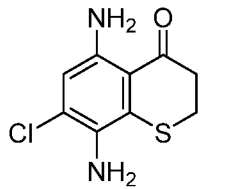
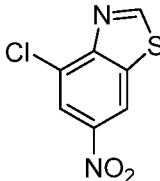
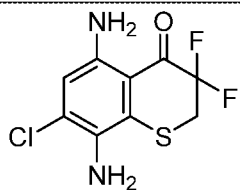
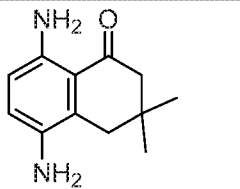
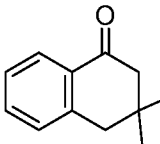
A8-7 中间体经 6N 盐酸脱出双三氟乙酰基保护, 经柱层析纯化得到化合物 A8。LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=189.3$ 。

15 根据上述类似的方法可以合成如下化合物

|     | 结构                                                                                  | 质谱              | 合成方法                                        |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|
| A9  |  | $[M+1]^+=191.2$ | 用 A6 类似的合成方法<br>LDA 改为 1.5eq, MeI 改为 1.2eq  |
| A10 |  | $[M+1]^+=195.2$ | 用 A7 类似的合成方法<br>LDA 改为 1.5eq, NFSI 改为 1.2eq |
| A11 |  | $[M+1]^+=203.2$ | 用 A6 类似的合成方法<br>用 1, 2-二碘乙烷 1.2eq 代替碘甲烷     |
| A12 |  | $[M+1]^+=217.2$ | 用 A6 类似的合成方法<br>用 1, 3-二溴丙烷 1.2eq 代替碘甲烷     |

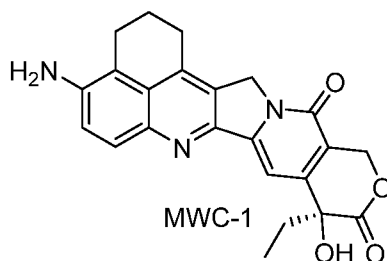
|     |                                                                                     |                 |                                                                                                                |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A13 |    | $[M+1]^+=231.2$ | 用 A7 类似的合成方法<br>用 A2 代替 A1 合成得到                                                                                |
| A14 |    | $[M+1]^+=215.2$ | 用 A7 类似的合成方法<br>用 A5 代替 A1 合成得到                                                                                |
| A15 |    | $[M+1]^+=231.2$ | 用 A7 类似的合成方法<br>用 A4 代替 A1 合成得到                                                                                |
| A16 |    | $[M+1]^+=197.2$ | 用 A5 类似的合成方法<br><br>用 合成得到  |
| A17 |  | $[M+1]^+=233.2$ | 用 A7 类似的合成方法<br>用 A16 代替 A1 合成得到                                                                               |
| A18 |  | $[M+1]^+=213.2$ | 用 A6 类似的合成方法<br><br>用 合成得到 |
| A19 |  | $[M+1]^+=249.3$ | 用 A7 类似的合成方法<br>用 A18 代替 A1 合成得到                                                                               |
| A20 |  | $[M+1]^+=191.2$ | 根据 A1 合成方法三<br><br>用 合成得到  |
| A21 |  | $[M+1]^+=205.3$ | 根据 A1 合成方法三                                                                                                    |

|     |                                                                                     |                 |                                                                                                                   |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                                     |                 | <br>用 合成得到                      |
| A22 |    | $[M+1]^+=231.4$ | 根据 A1 合成方法三<br><br>用 合成得到       |
| A23 |    | $[M+1]^+=231.3$ | 根据 A1 合成方法三<br><br>用 合成得到       |
| A24 |   | $[M+1]^+=191.2$ | 根据 A1 合成方法二<br><br>用 合成得到      |
| A25 |  | $[M+1]^+=207.3$ | 根据 A1 合成方法二<br><br>用 合成得到     |
| A26 |  | $[M+1]^+=211.6$ | 用 A2 类似的合成方法<br><br>用 Cl 合成得到 |
| A27 |  | $[M+1]^+=247.6$ | 用 A7 类似的合成方法<br>用 A26 代替 A1 合成得到                                                                                  |
| A28 |  | $[M+1]^+=213.6$ | 用 A5 类似的合成方法<br><br>用 合成得到    |

|     |                                                                                    |                 |                                                                                                              |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A29 |   | $[M+1]^+=249.6$ | 用 A7 类似的合成方法<br>用 A28 代替 A1 合成得到                                                                             |
| A30 |   | $[M+1]^+=229.7$ | 用 A6 类似的合成方法<br><br>用 合成得到 |
| A31 |   | $[M+1]^+=265.7$ | 用 A7 类似的合成方法<br>用 A30 代替 A1 合成得到                                                                             |
| A32 |  | $[M+1]^+=205.3$ | 根据 A1 合成方法三<br><br>用 合成得到 |

### 实施例组 1.2 喜树碱类化合物合成 (Friedlander 反应)

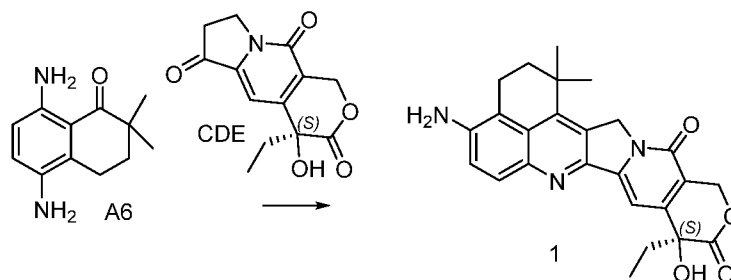
对照喜树碱类化合物 MWC-1 的合成:



- 5 常温下, 将化合物 A1 (176mg, 1eq) 和 CDE 环化合物 (315mg, 1.2eq)、PPTS (301mg, 1.2eq) 混于甲苯 (50ml) 中, 回流分水反应 3~4 小时; 将反应液直接浓缩干, 柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚洗脱至甲醇/二氯甲烷=1: 20, 得 MWC-1, 为黄色固体, 260mg, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=404$ 。

#### 10 实施例 1.2.1 喜树碱类化合物 1 的合成

合成路线如下:

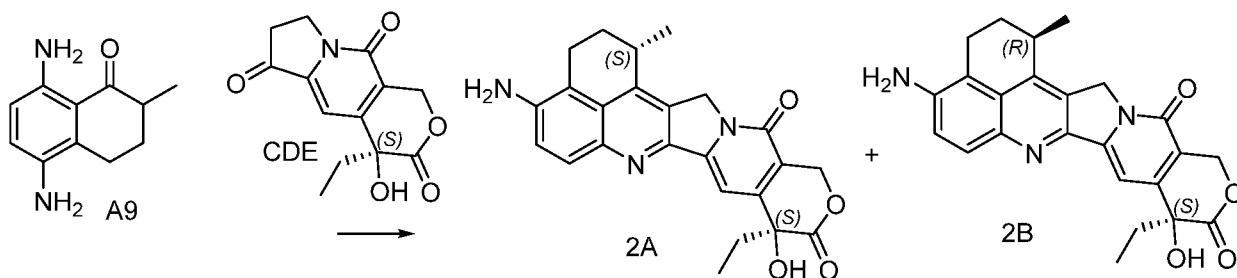


于 50ml 单口反应瓶中，氮气保护下，将化合物 A6 (120mg, 0.59mmol, 1eq)、CDE 三环化合物 (180mg, 0.68mmol, 1.2eq) 和 PPTS (35mg, 0.14mmol, 0.25eq) 混合于 15ml 中，加热回流反应 3~4 小时；减压蒸馏，蒸除大部分乙酸，残留物经柱层析粗分离，洗脱剂为二氯甲烷：甲醇=15:1，得到粗品 80mg，再经制备液相分离纯化，得喜树碱类化合物 1 为黄色固体，3 mg。

LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=432.4$ 。

### 实施例 1.2.2 喜树碱类化合物 2 (2A 和 2B) 的合成

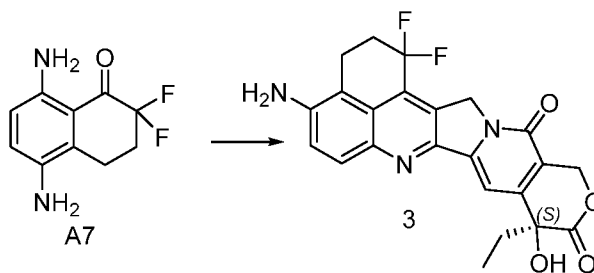
合成路线如下：



按照实施例 1.2.1 类似的方法，用 A9 代替 A6 合成得到，经制备液相分离纯化，得化合物 2A (保留时间早)，为黄色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=418.3$ ；化合物 2B (保留时间晚)，为黄色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=418.4$ 。

### 实施例 1.2.3 喜树碱类化合物 3 的合成

合成路线如下：



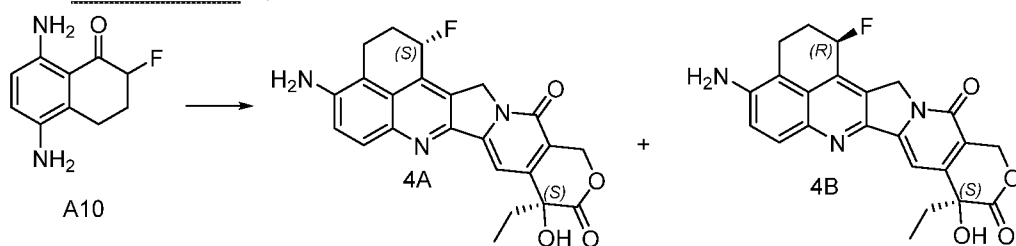
按照实施例 1.2.1 类似方法合成，用 A7 代替 A6，用甲苯代替乙酸作溶剂，制备得喜

树碱类化合物 3 为土黄色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=440.8$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Acetone)  $\delta$  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)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  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)

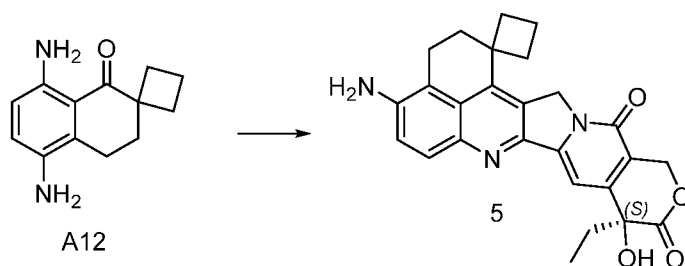
#### 实施例 1.2.4 喜树碱类化合物 4 (4A 和 4B) 的合成



按照实施例 1.2.1 类似的合成方法, 用 A10 代替 A6 制备得到, 经制备液相分离纯化, 得化合物 4A (保留时间早), 为土黄色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=422.3$ ; 化合物 4B (保留时间晚), 为土黄色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=422.3$ 。

#### 实施例 1.2.5 喜树碱类化合物 5 的合成

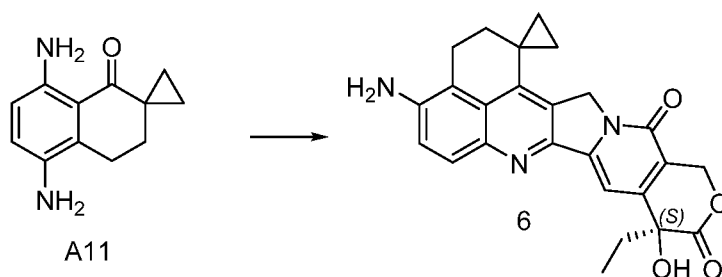
合成路线如下:



按照实施例 1.2.1 类似方法, 用 A12 代替 A6 制备得到喜树碱类化合物 5 为黄色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=444.3$ 。

#### 实施例 1.2.6 喜树碱类化合物 6 的合成

合成路线如下:

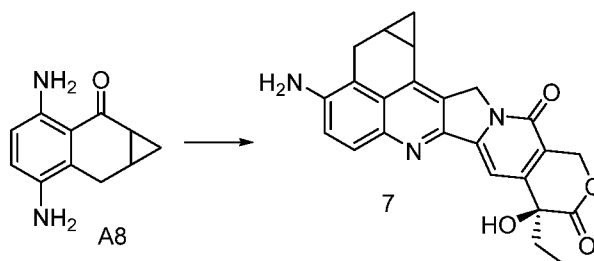


按照实施例 1.2.1 类似方法，用 A11 代替 A6 合成得到，喜树碱类化合物 6 为黄色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=430.5$ 。

5

### 实施例 1.2.7 喜树碱类化合物 7 的合成

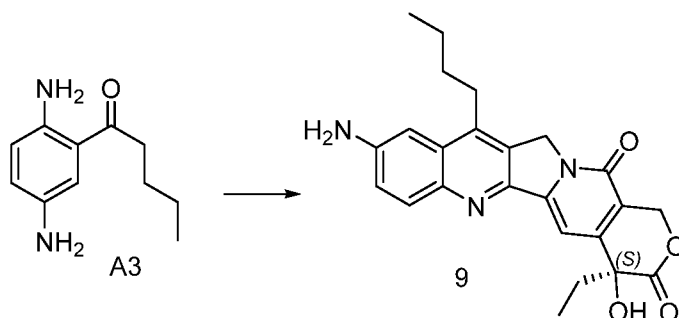
合成路线如下：



按照实施例 1.2.1 类似的合成方法，用 A8 代替 A6 合成，得化合物 7 为黄色固体，  
10 0.7 mg。LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=416.3$ 。

### 实施例 1.2.8 喜树碱类化合物 9 的合成

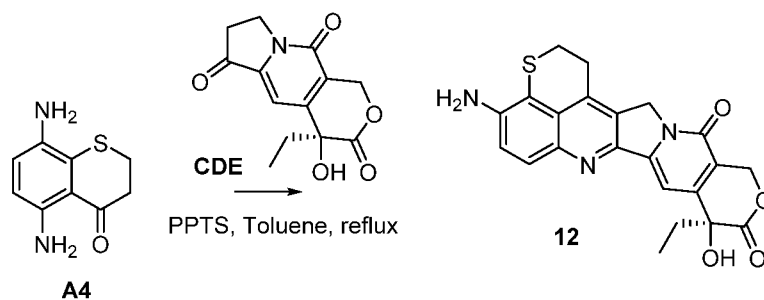
合成路线如下：



15 按照实施例 1.2.1 类似的合成方法，用 A3 代替 A6 合成，得到喜树碱类化合物 9，为棕红色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=420.3$ 。

### 实施例 1.2.9 喜树碱类化合物 12 的合成

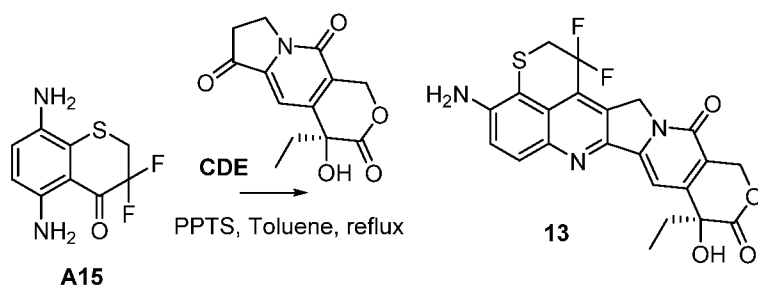
按照与文献 Journal of Medicinal chemistry, 1998, 41(13), 2308-2318 类似的方法合成  
20 化合物 12，合成路线如下：



按照实施例 1.2.1 类似的合成方法, 用 A4 代替 A6, 用甲苯代替乙酸作溶剂, 合成得化合物 12 为棕色固体, 30mg; LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=422.5$ 。

#### 5 实施例 1.2.10 喜树碱类化合物 13 的合成

合成路线如下:

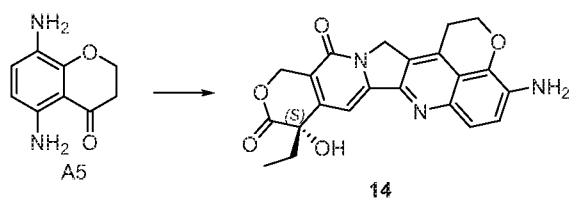


按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A15 代替 A6, 用甲苯作溶剂合成得到化合物 13, 为棕色固体, LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=458.4$ 。

10

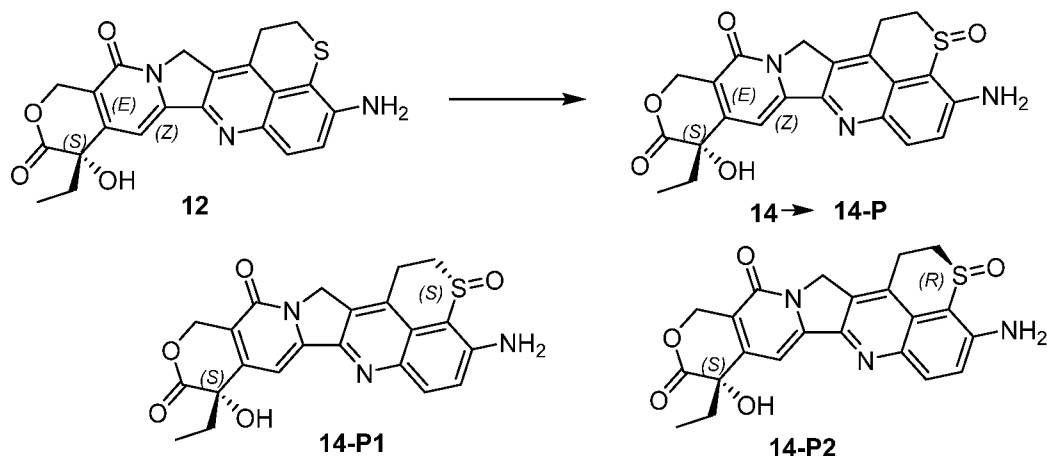
#### 实施例 1.2.11 喜树碱类化合物 14 的合成

合成路线如下:



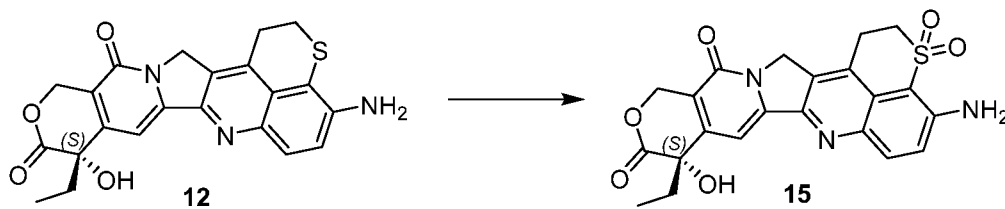
按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A5 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 制备得到化合物 14, 为黄色固体, LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=406.1$ 。

#### 实施例 1.2.12 喜树碱类化合物 14-P 的合成



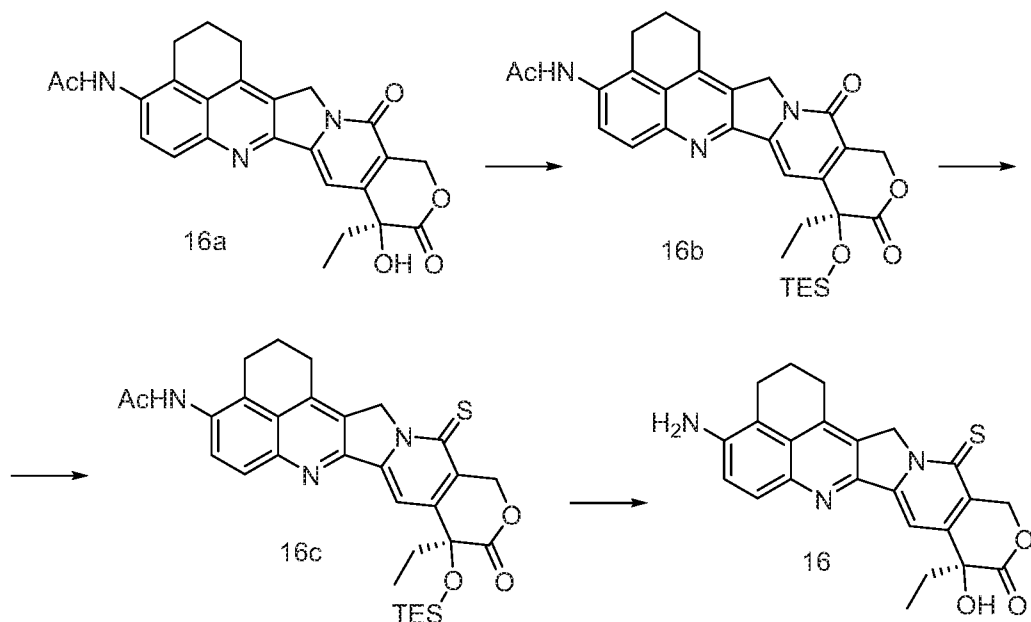
常温下，将化合物 12 (200mg) 溶于乙酸 (24ml)、水 (3ml) 混合溶剂中，氮气保护下，降温到 5℃，加入 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (580mg)，搅拌反应 2 小时，反应液浓缩干，用 HPLC 制备液相分离得到化合物 14-P1 和 14-P2。冻干得到化合物 14-P1 棕色固体 42 mg、化合物 14-P2 棕色固体 25 mg；LC-MS (ESI) : [M+1]<sup>+</sup>=438.5。

#### 实施例 1.2.13 喜树碱类化合物 15 的合成



常温下，将化合物 12 (100mg) 溶于乙酸 (24ml)、水 (3ml) 混合溶剂中，氮气保护下，降温到 5℃，加入 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (750mg)，搅拌反应 2 小时，回到室温 25℃ 搅拌反应过夜，LCMS 分析反应完全，将反应液浓缩干，用 HPLC 制备液相分离，收集，冻干得到化合物 15 为棕色固体 8 mg。LC-MS (ESI) : [M+1]<sup>+</sup>=454.4。

#### 实施例 1.2.14 喜树碱类化合物 16 的合成

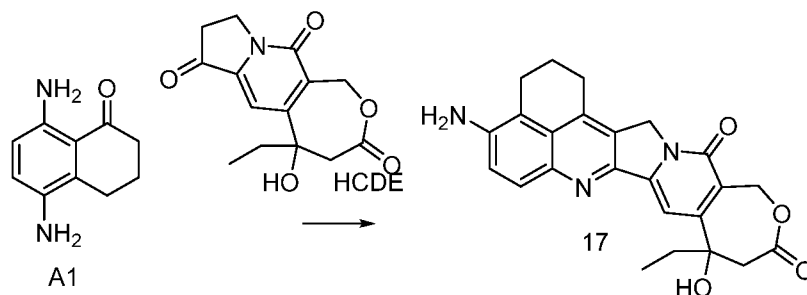


按照 WO2020200880A1 专利方法合成中间体 16a, 然后按照文献(J. Med. Chem. 2008, 51, 3040-3044) 的方法, 制备 16a-硫代喜树碱结构中间体 16c, 最后脱除乙酰基保护, 经制备得到化合物 16, LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=420.3$ 。

5

#### 实施例 1.2.15 喜树碱类化合物 17 的合成

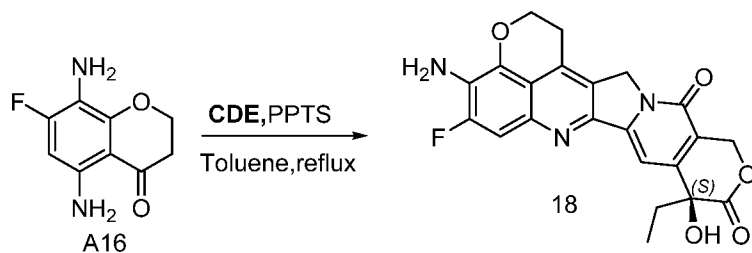
合成路线如下:



按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A1 代替 A6, 用 HCDE 代替 CDE, 用甲  
10 苯作溶剂合成, 得到高喜树碱化合物 17 (S,R 混合物), LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=418.5$ 。

#### 实施例 1.2.16 喜树碱类化合物 18 的合成

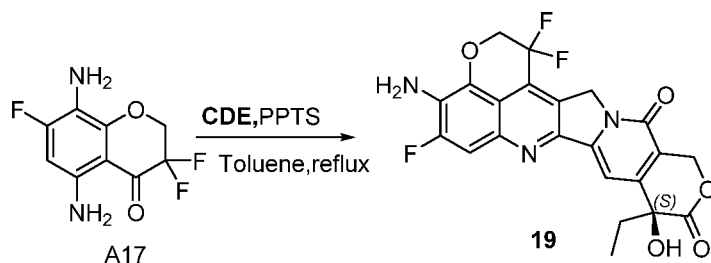
合成路线如下:



按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A16 代替 A6, 用甲苯作溶剂合成化合物 18, 为淡黄色固体, LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=424.2$ 。

#### 5 实施例 1.2.17 喜树碱类化合物 19 的合成

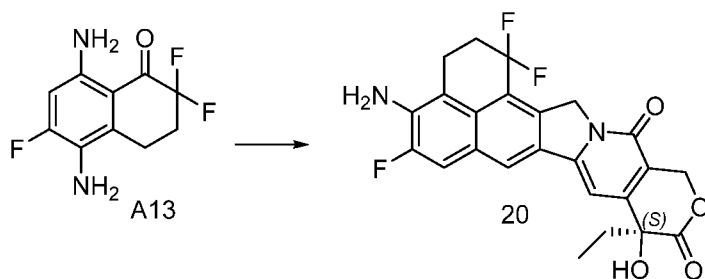
合成路线如下:



按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A17 代替 A6, 用甲苯作溶剂合成化合物 19, 为黄色固体, LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=460.5$ 。

#### 实施例 1.2.18 喜树碱类化合物 20 的合成

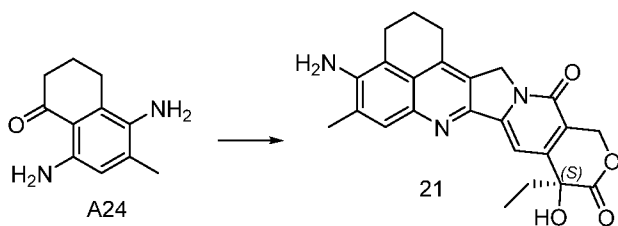
合成路线如下:



按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A13 代替 A6, 用甲苯作溶剂合成化合物 20, 为黄色固体, LC-MS (ESI) :  $[M+1]^+=458.2$ 。

#### 实施例 1.2.19 喜树碱类化合物 21 的合成

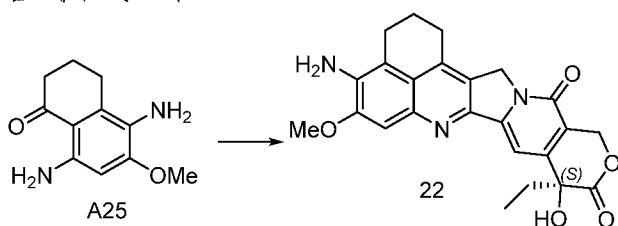
合成路线如下:



按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A24 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 得到化合物 21, 为棕红色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=418.4$ 。

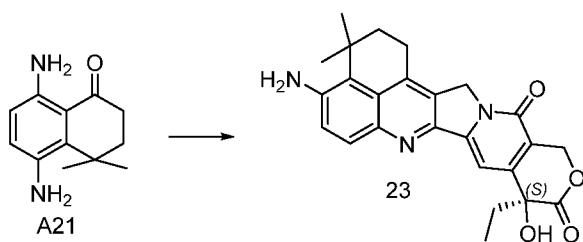
5

**实施例 1.2.20** 喜树碱类化合物 22 的合成  
合成路线如下:



10 按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A25 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 得到化合物 22, 为棕红色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=434.4$ 。

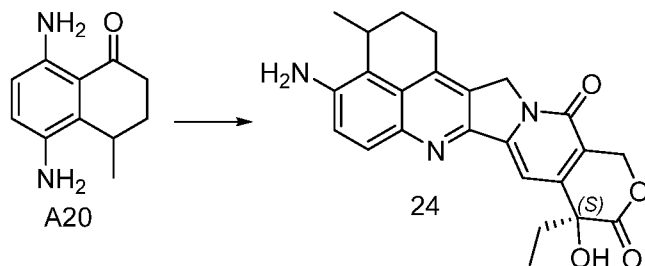
**实施例 1.2.21** 喜树碱类化合物 23 的合成  
合成路线如下:



15

按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A21 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 得到化合物 23, 为棕红色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=432.4$ 。

20 **实施例 1.2.22** 喜树碱类化合物 24 的合成  
合成路线如下:

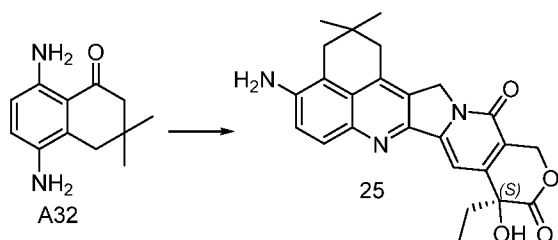


按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法，用 A20 代替 A6，用甲苯作溶剂，得到化合物 24（一对异构体），为棕红色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 418.4$ 。

5

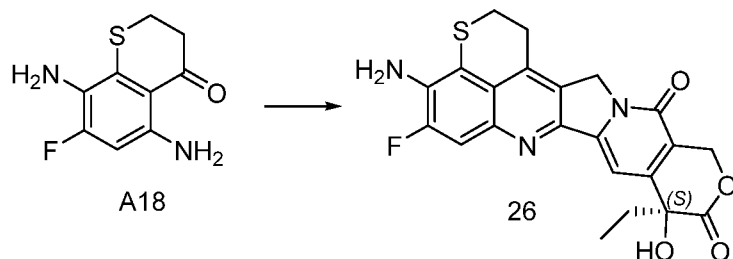
#### 实施例 1.2.23 喜树碱类化合物 25 的合成

合成路线如下：



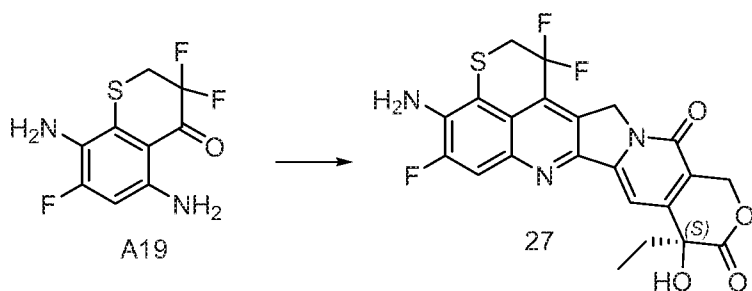
10 按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法，用 A32 代替 A6，用甲苯作溶剂，得到化合物 25，为棕红色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 432.4$ 。

#### 实施例 1.2.24 喜树碱类化合物 26 的合成



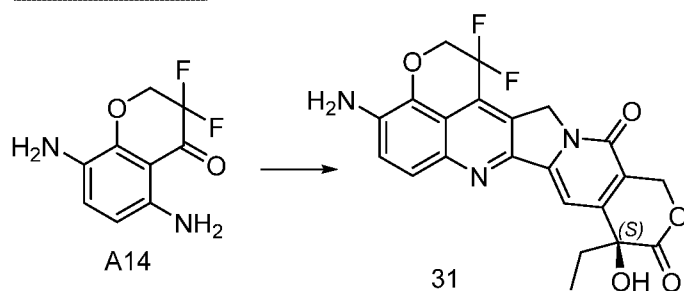
15 按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法，用 A18 代替 A6，用甲苯作溶剂合成，得到化合物 26，为棕红色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 440.4$ 。

#### 实施例 1.2.25 喜树碱类化合物 27 的合成



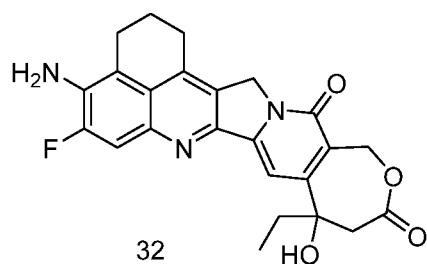
按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法，用 A19 代替 A6，用甲苯作溶剂，得到化合物 27，为棕红色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=476.4$ 。

#### 5 实施例 1.2.26 喜树碱类化合物 31 的合成



按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法，用 A14 代替 A6，用甲苯作溶剂得到化合物 31，为黄色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=442.4$ 。

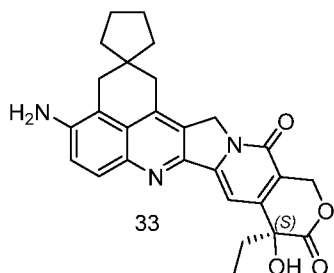
#### 10 实施例 1.2.27 喜树碱类化合物 32 的合成



按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法，用 A2 代替 A6，用 HCDE 代替 CDE，用甲苯作溶剂合成得到化合物 32，为黄色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+=436.4$ 。

#### 15 实施例 1.2.28 喜树碱类化合物 33 的合成

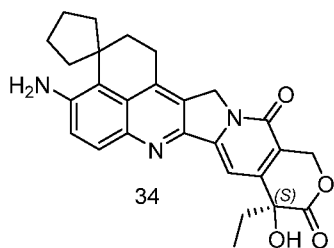
合成路线如下：



按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A23 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 化合物 33 为黄色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 458.5$ 。

#### 5 实施例 1.2.29 喜树碱类化合物 34 的合成

合成路线如下:

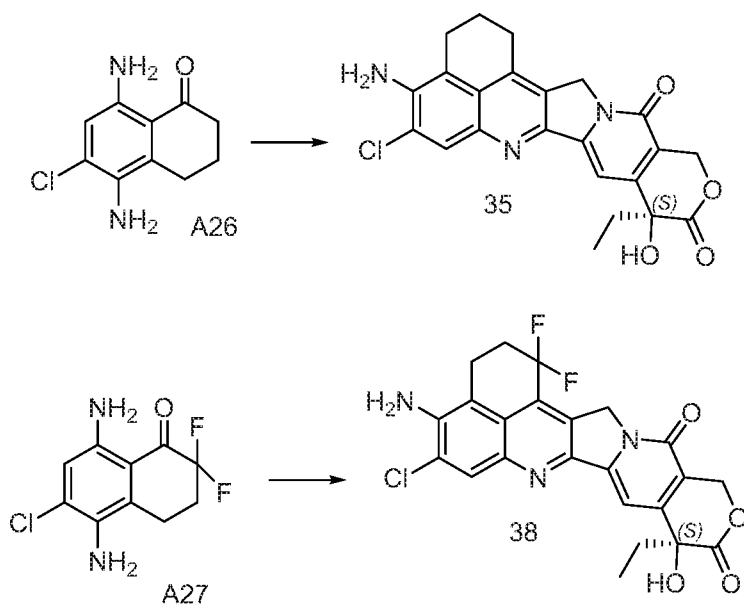


按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A22 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 合成化合物 34 为黄色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 458.5$ 。

10

#### 实施例 1.2.30 喜树碱类化合物 35 和化合物 38 的合成

合成路线如下:



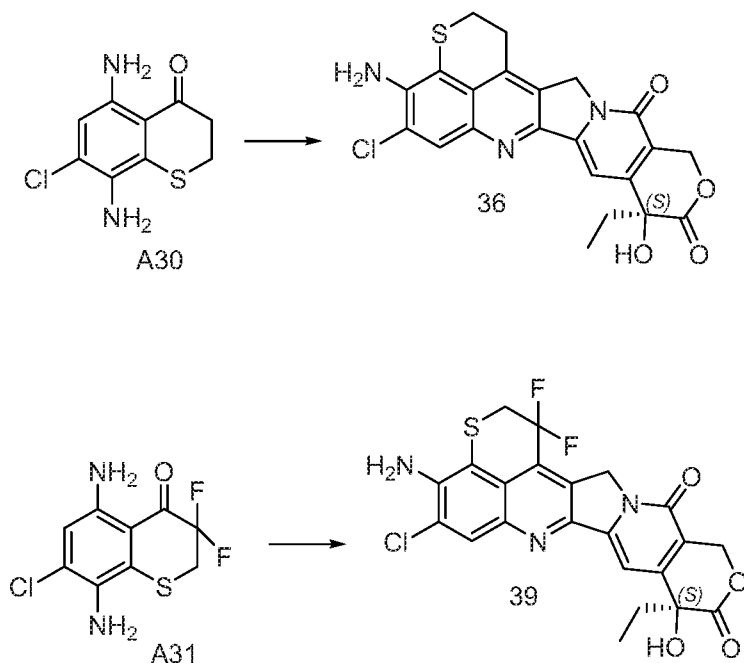
按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A26 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 合成化合

物 35, 为棕红色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 438.7$ 。

按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A27 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 合成, 得到化合物 38, 为棕红色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 474.7$ 。

### 5 实施例 1.2.31 喜树碱类化合物 36 和化合物 39 的合成

合成路线如下:

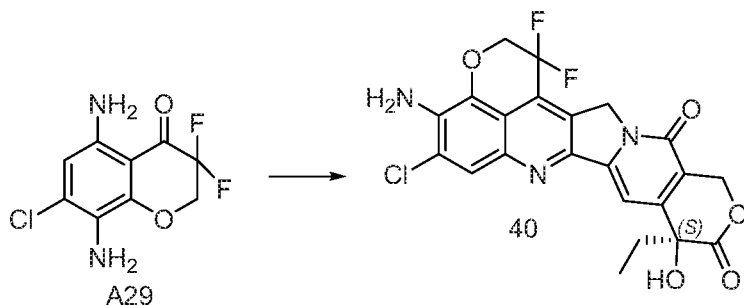
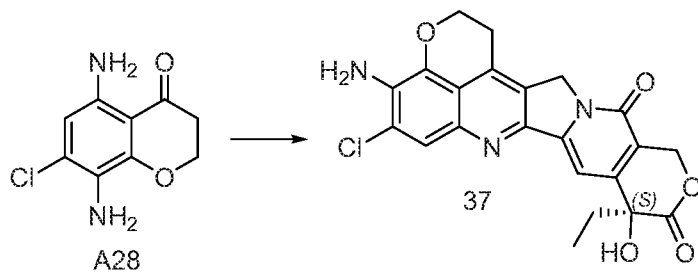


按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A30 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 合成化合物 36, 为棕红色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 456.7$ 。

10 按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法, 用 A31 代替 A6, 用甲苯作溶剂, 合成类得到化合物 39, 为棕红色固体, LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 492.7$

### 实施例 1.2.32 喜树碱类化合物 37 和化合物 40 的合成

合成路线如下:

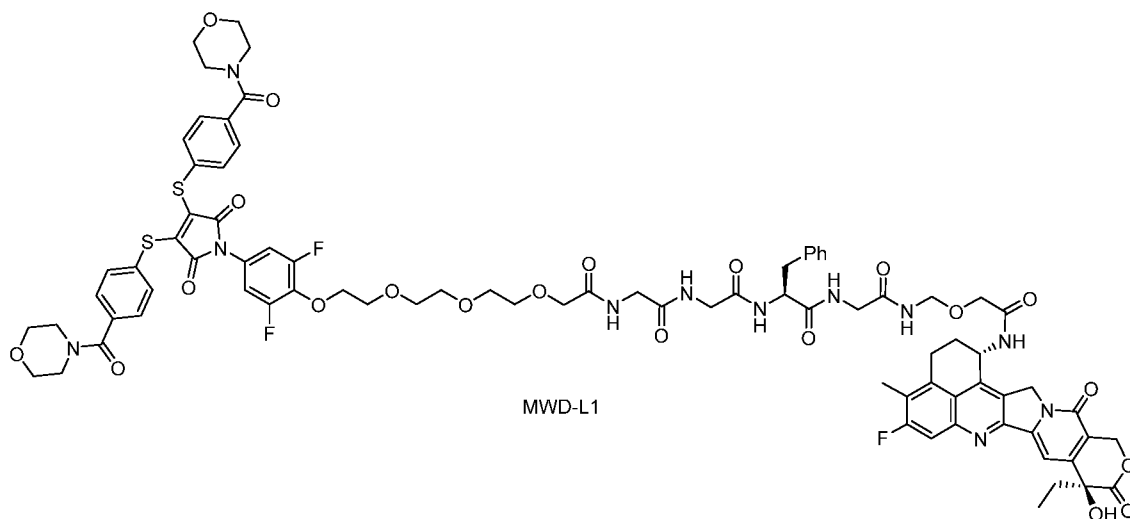


按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法，用 A28 代替 A6，用甲苯作溶剂，合成化合物 37，为棕红色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 440.8$ 。

按照实施例 1.2.1 类似方法的合成方法，用 A29 代替 A6，用甲苯作溶剂，合成得到  
5 化合物 40，为棕红色固体，LC-MS (ESI):  $[M+1]^+ = 476.7$ 。

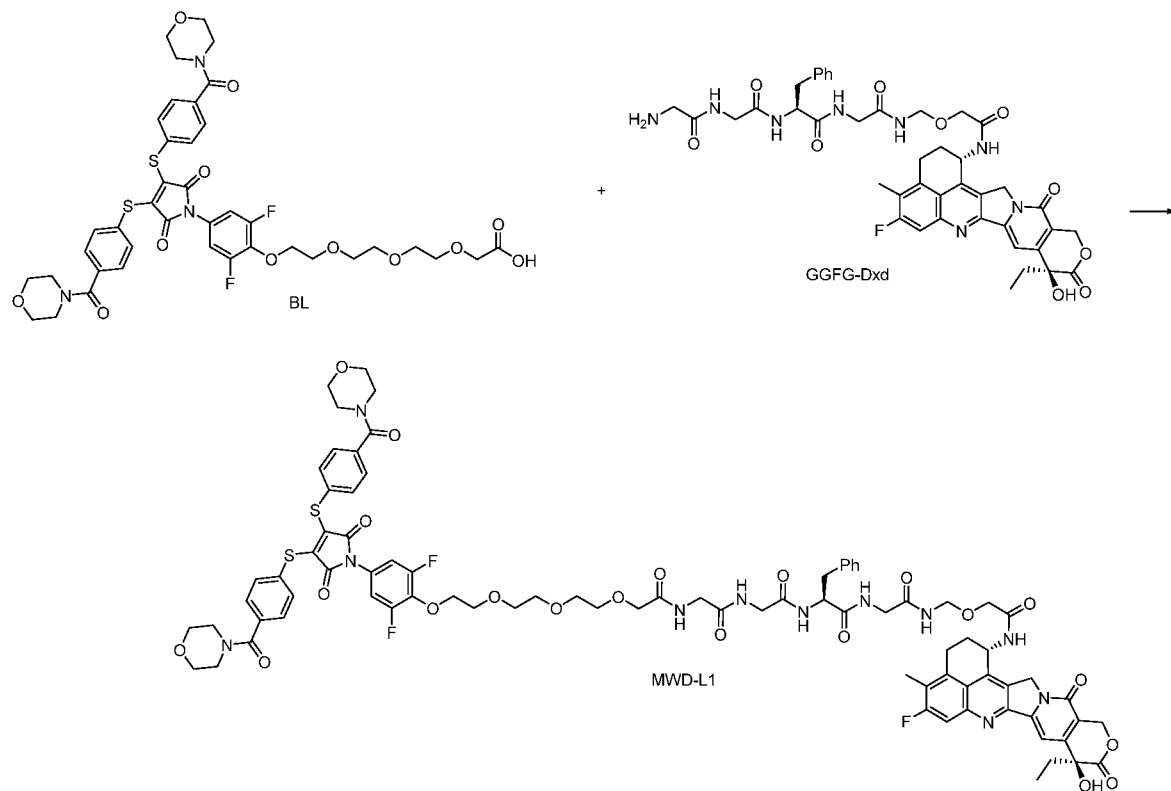
## 实施例组 2 含药连接子的合成

### 实施例 2.1 含药连接子 MWD-L1 的合成

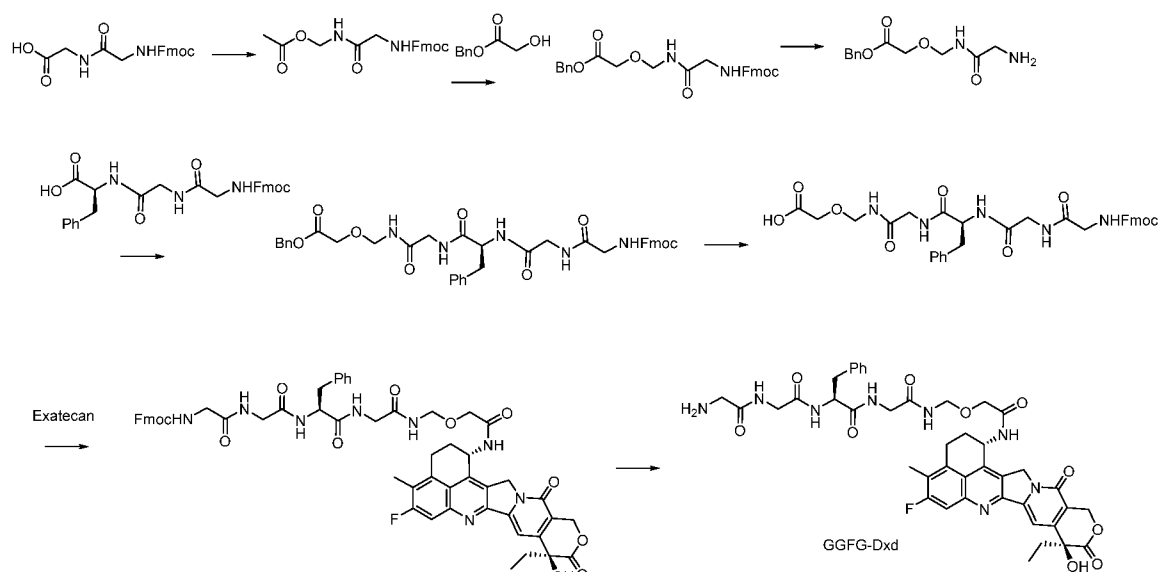


10

合成路线如下：



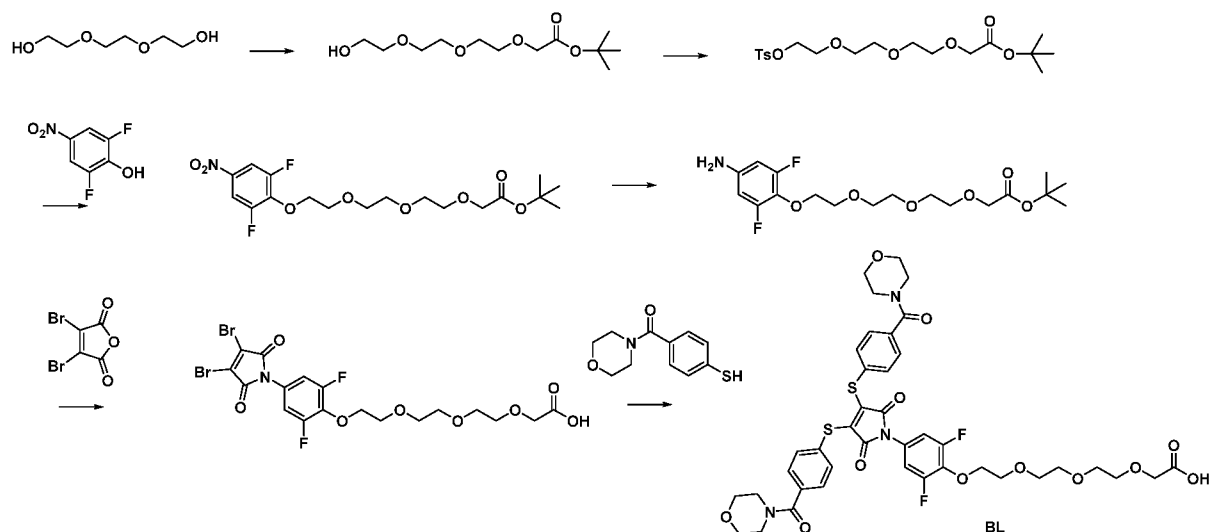
GGFG-Dxd 按照专利公开文件 (US20190151328A1) 中所述方法合成:



GGFG-Dxd 为淡黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=841;

5

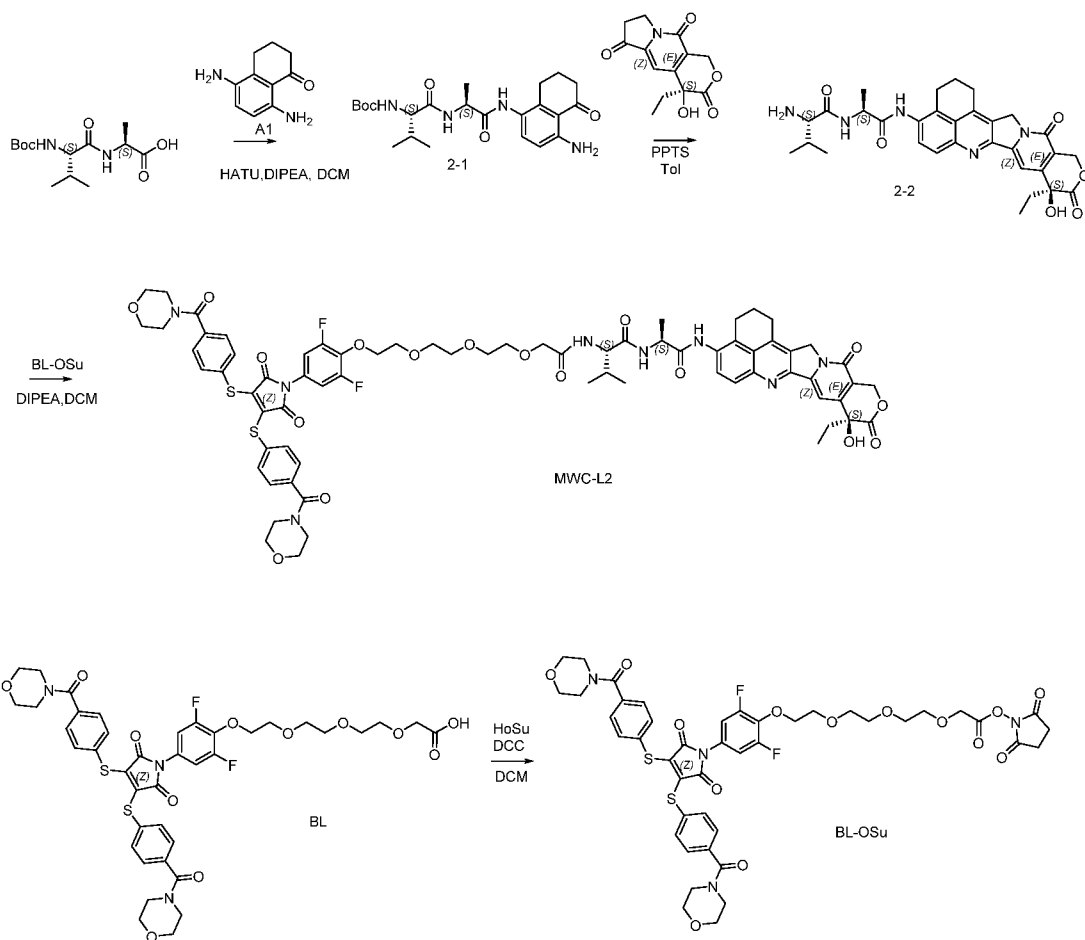
BL 接头化合物按照专利公布文件 WO2018/095422A1 中所述方法合成:



BL 接头化合物为黄色固体, LC-MS(ESI): $M+1=858$

BL 接头化合物(857mg, 1mmol), GGFG-Dxd(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。  
 5 将反应液冷却至 5~10℃, 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): $M+1=1681$ ,  $(M+1)/2=840.9$ 。

## 10 实施例 2.2 含药连接子 MWC-L2 的合成



### 步骤 1

Boc-Val-Ala-OH (288mg, 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。  
 5 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

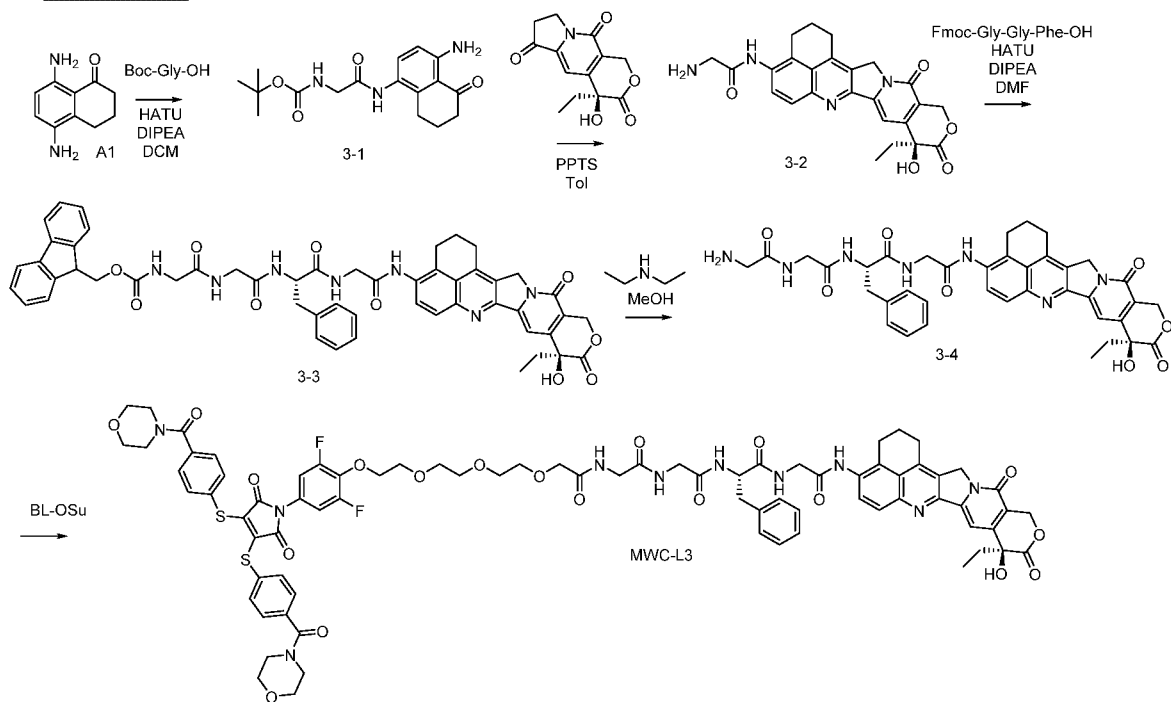
中间体 2-1 (450mg, 1mmol), CDE 三环化合物 (263mg, 1mmol, 1eq), 对甲苯磺酸吡啶盐 (PPTS) (251mg, 1mmol, 1eq) 悬浮于 30ml 甲苯中, 加热回流反应 2 小时。  
 10 停止加热, 待反应液冷却后, 收集固体沉淀物即为中间体 2-2 粗品, 棕色固体 750mg。LC-MS(ESI):M+1=574。不经纯化直接下一步反应。

### 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℃ 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-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 2.3 含药连接子 MWC-L3 的合成



#### 步骤 1

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

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

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

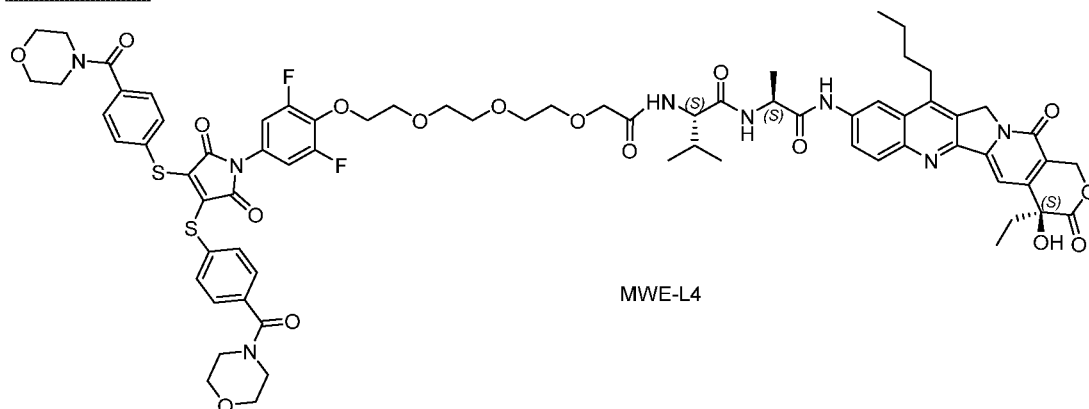
## 步骤 4

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。

## 5 步骤 5

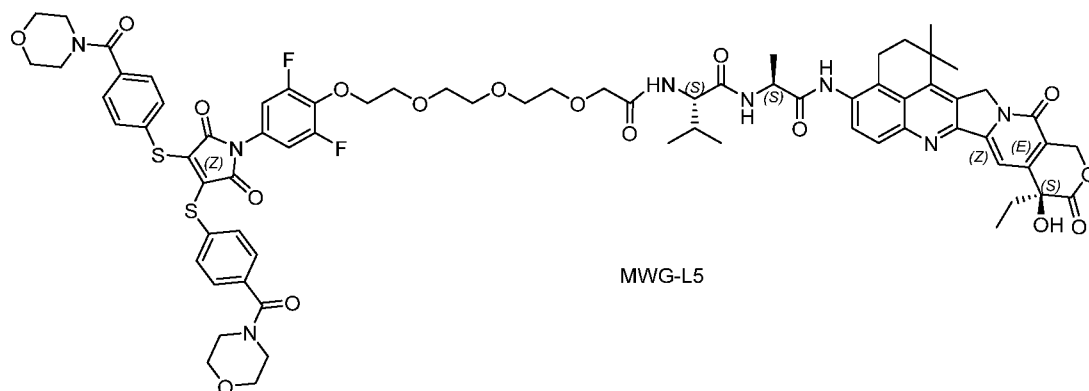
BL 接头化合物 (318mg, 0.37mmol), HoSu (51mg, 0.44mmol, 1.2eq), DCC (114mg, 0.56mmol, 1.5eq) 溶于 30ml DCM 中, 室温搅拌 3h, 反应液抽滤。将滤液加入到中间体 3-4 粗品、DIPEA (120mg, 0.93mmol, 2.5eq)、DCM (30ml) 的混合溶液中, 搅拌反应 3h。将反应液冷却至 10℃ 下, 加入 1N 盐酸 (20ml), 搅拌 0.5h。分液, 水相用 DCM (30ml\*2) 萃取, 合并有机相。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干。柱层析纯化, 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 2.4 含药连接 MWE-L4 的合成



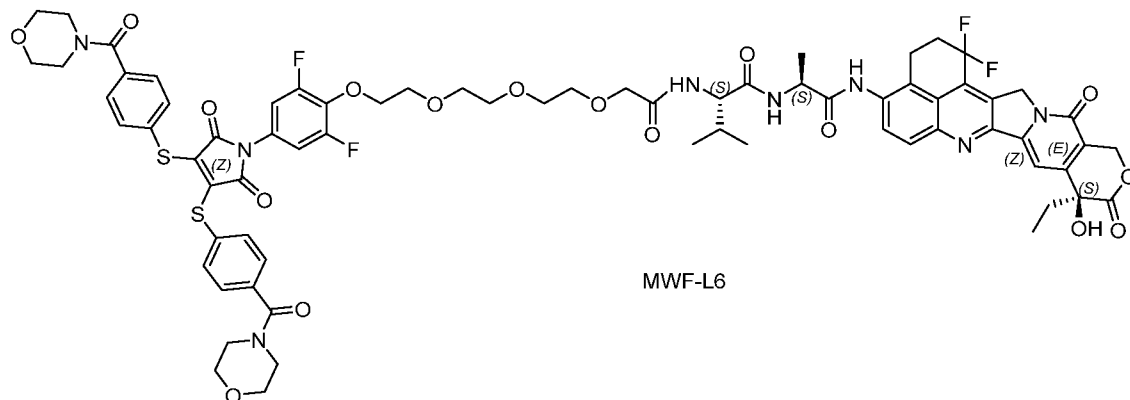
根据实施例 2.2 的方法用 A3 代替 A1 合成得到 MWE-L4, 为橘红色固体, LC-MS(ESI):M+1=1430

## 实施例 2.5 含药连接子 MWG-L5 的合成



根据实施例 2.2 的方法用 A6 代替 A1 合成得到 MWG-L5, 为橘红色固体,  
LC-MS(ESI):M+1=1442

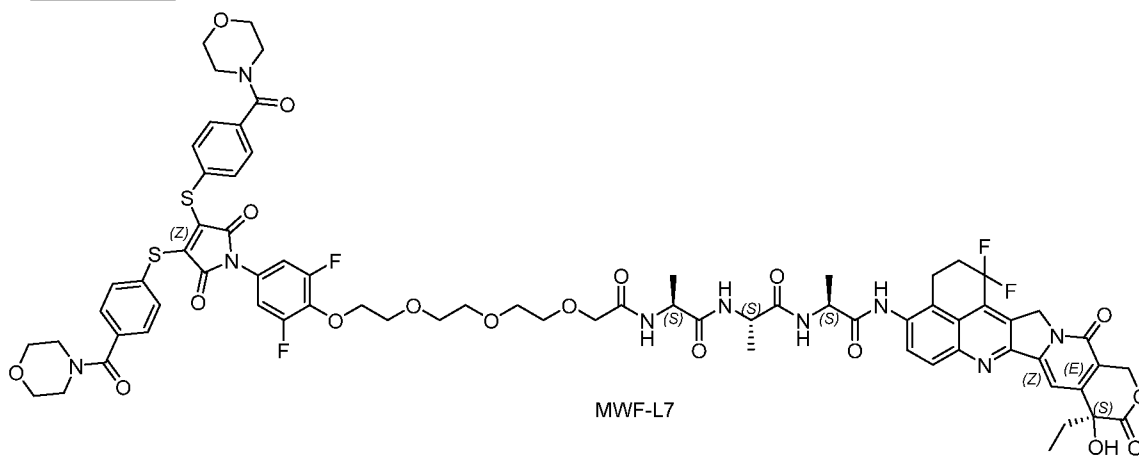
#### 实施例 2.6 含药连接子 MWF-L6 的合成



5

根据实施例 2.2 的方法用 A7 代替 A1 合成得到 MWF-L6, 为橘红色固体,  
LC-MS(ESI):M+1=1450

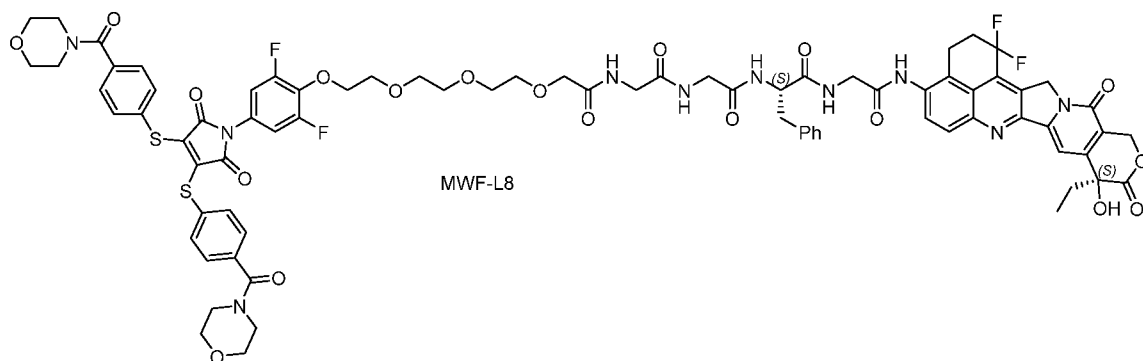
#### 实施例 2.7 含药连接子 MWF-L7 的合成



10

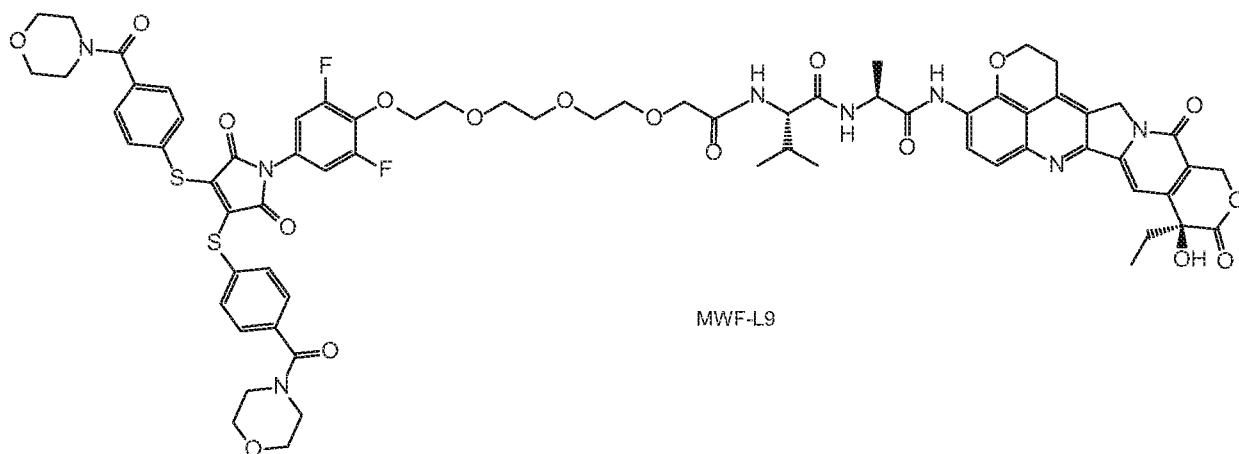
根据实施例 2.2 的方法用 A7 代替 A1, 用 Alloc-Ala-Ala-Ala-OH 代替 Alloc-Val-Ala-OH  
合成得到 MWF-L7, 为橘红色固体, LC-MS(ESI):M+1=1493.5

#### 实施例 2.8 含药连接子 MWF-L8 的合成



根据实施例 2.3 的方法用 A7 代替 A1 合成得到 MWF-L8, 为橘红色固体, LC-MS(ESI):M+1=1598.4。

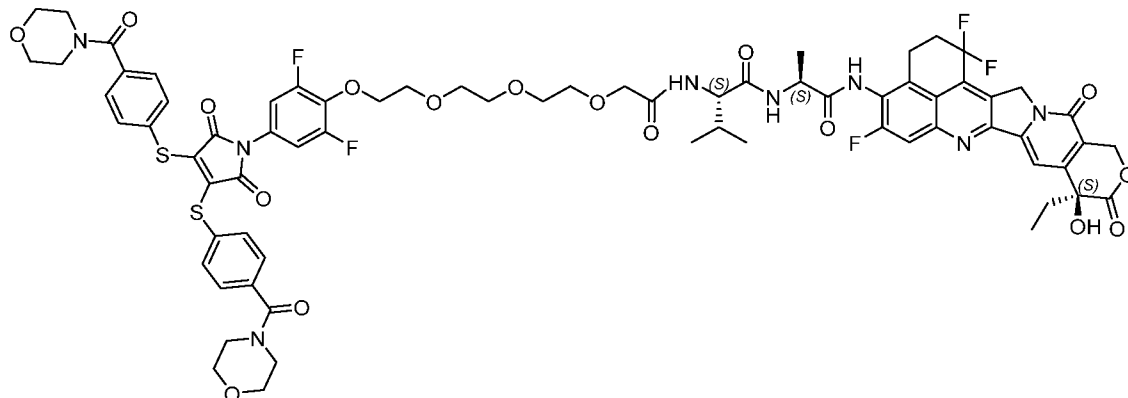
## 5 实施例 2.9 含药连接子 MWF-L9 的合成



根据实施例 2.2 的方法用 A5 代替 A1 合成得到 MWF-L9, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1416.4。

10

## 实施例 2.10 含药连接子 MWF-L10 的合成

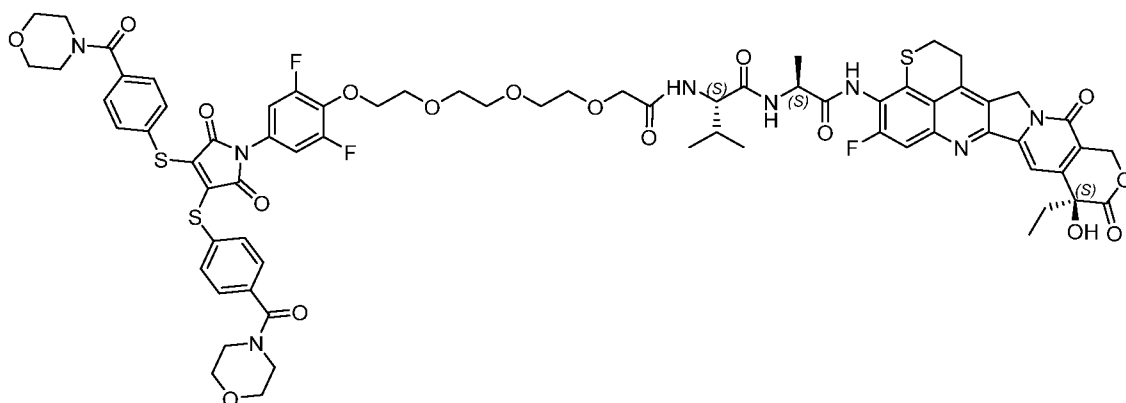


MWF-L10

根据实施例 2.2 的方法用 A13 代替 A1 合成得到 MWF-L10, 为黄色固体,

LC-MS(ESI):M+1=1468.4。

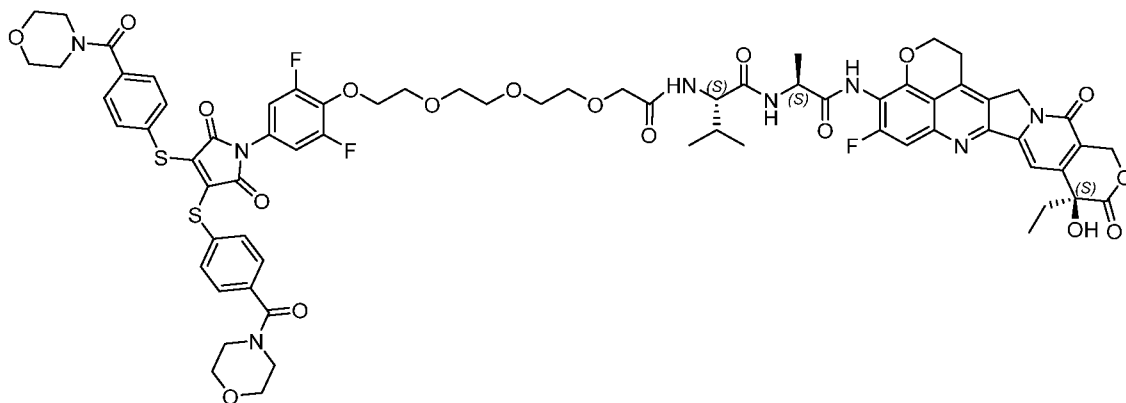
### 实施例 2.11 含药连接子 MWF-L11 的合成



MWF-L11

根据实施例 2.2 的方法用 A18 代替 A1 合成得到 MWF-L11, 为黄色固体,  
LC-MS(ESI):M+1=1450.4。

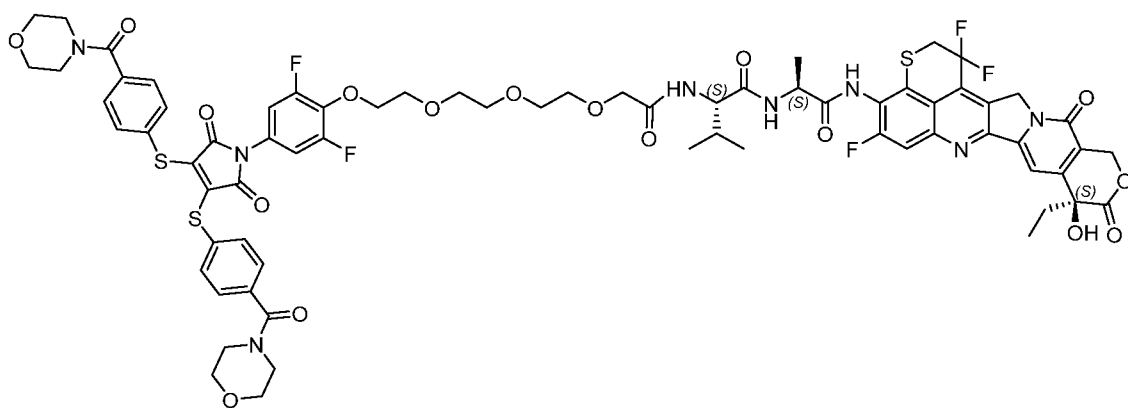
### 实施例 2.12 含药连接子 MWF-L12 的合成



MWF-L12

根据实施例 2.2 的方法用 A16 代替 A1 合成得到 MWF-L12, 为黄色固体,  
LC-MS(ESI):M+1=1434.4。

### 实施例 2.13 含药连接子 MWF-L13 的合成

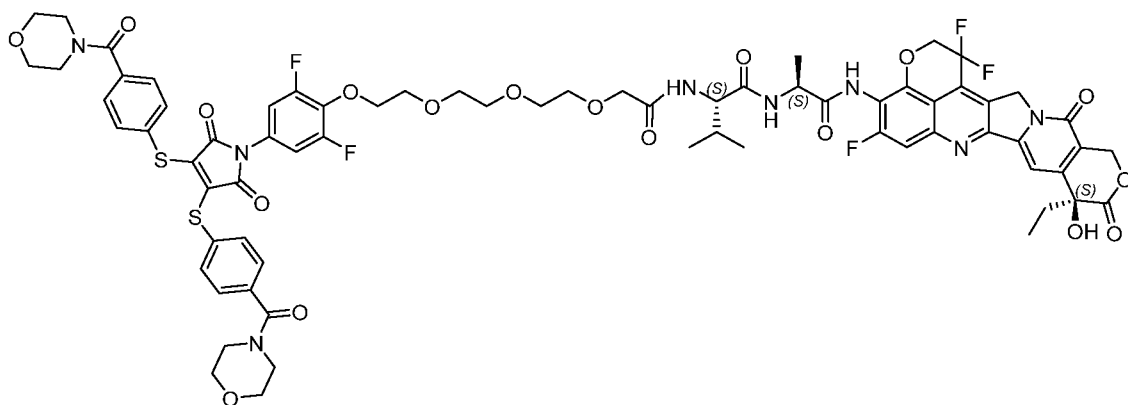


MWF-L13

根据实施例 2.2 的方法用 A19 代替 A1 合成得到 MWF-L13, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1486.4。

5

#### 实施例 2.14 含药连接子 MWF-L14 的合成

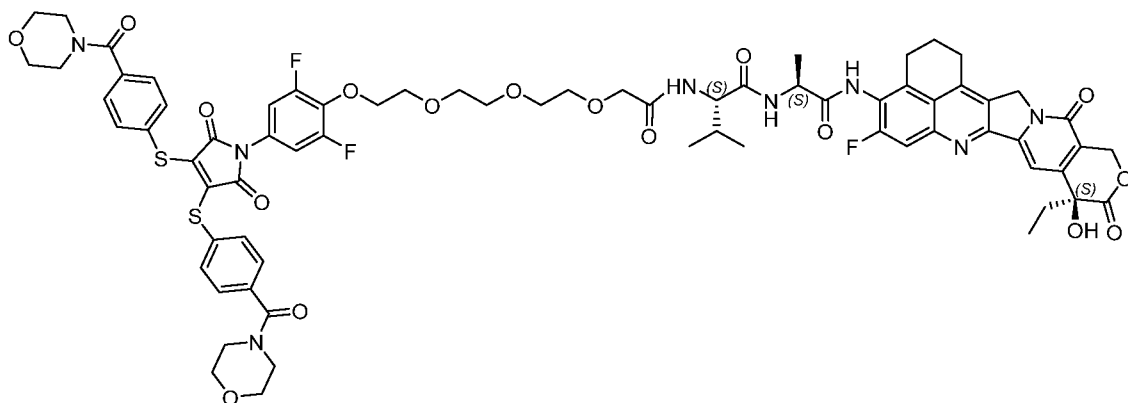


MWF-L14

根据实施例 2.2 的方法用 A17 代替 A1 合成得到 MWF-L14, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1470.4。

10

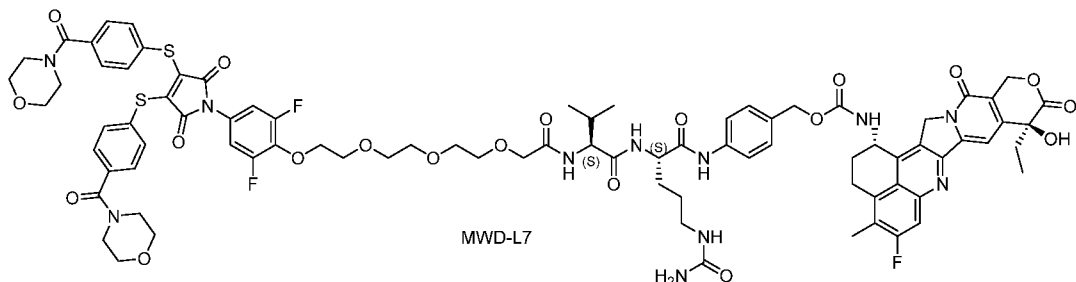
#### 实施例 2.15 含药连接子 MWF-L15 的合成



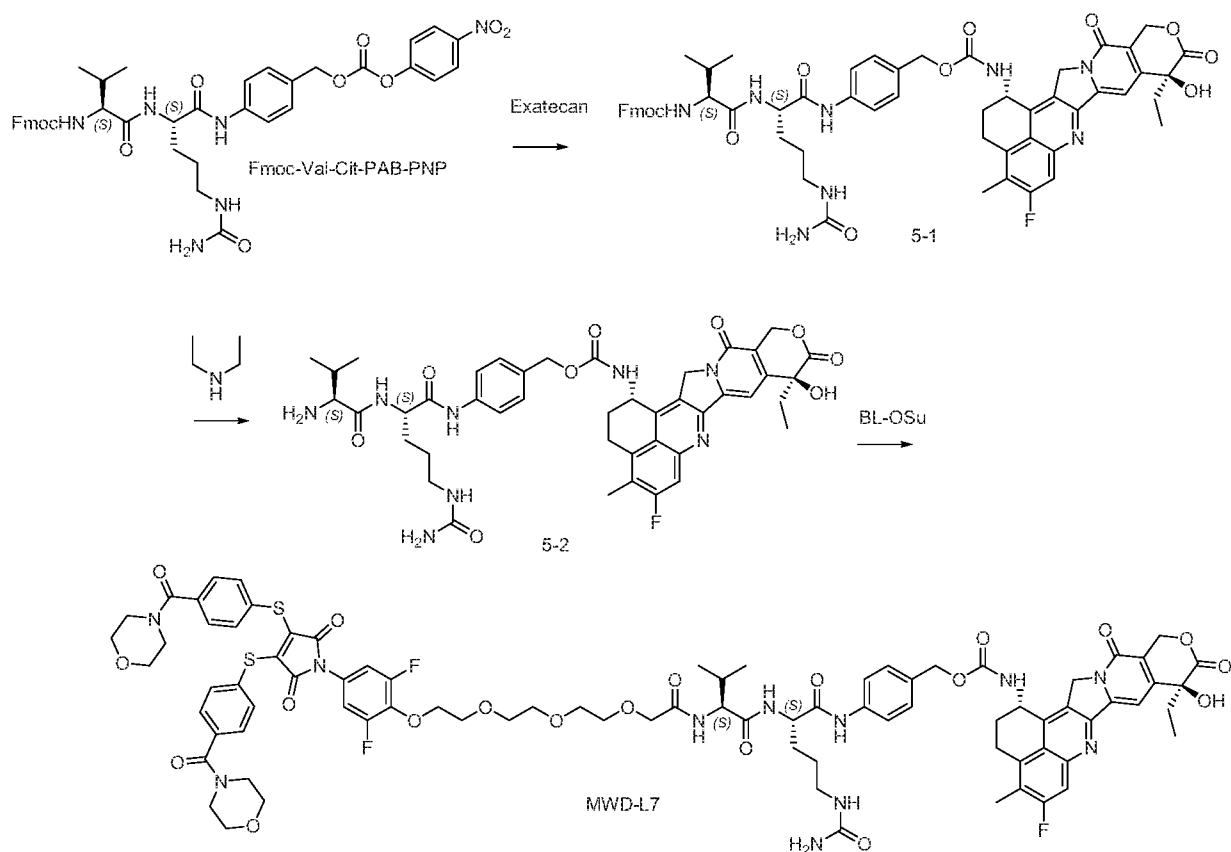
## MWF-L15

根据实施例 2.2 的方法用 A2 代替 A1 合成得到 MWF-L15, 为黄色固体,  
LC-MS(ESI):M+1=1432.4。

## 5 实施例 2.16 含药连接子 MWD-L7 的合成



合成路线如下:



## 10 步骤 1

Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (153mg, 0.2mmol), 甲磺酸依沙替康 (106mg, 0.2mmol, 1eq), DIPEA (65mg, 0.5mmol, 2.5eq), 溶于 30ml DCM 中, 搅拌反应 2h。反应液旋干, 柱层析纯化, 洗脱剂: DCM: MeOH=50: 1~10: 1, 得到中间体 5-1 为淡黄色固体 180mg。LC-MS(ESI):M+1=1064。

## 步骤 2

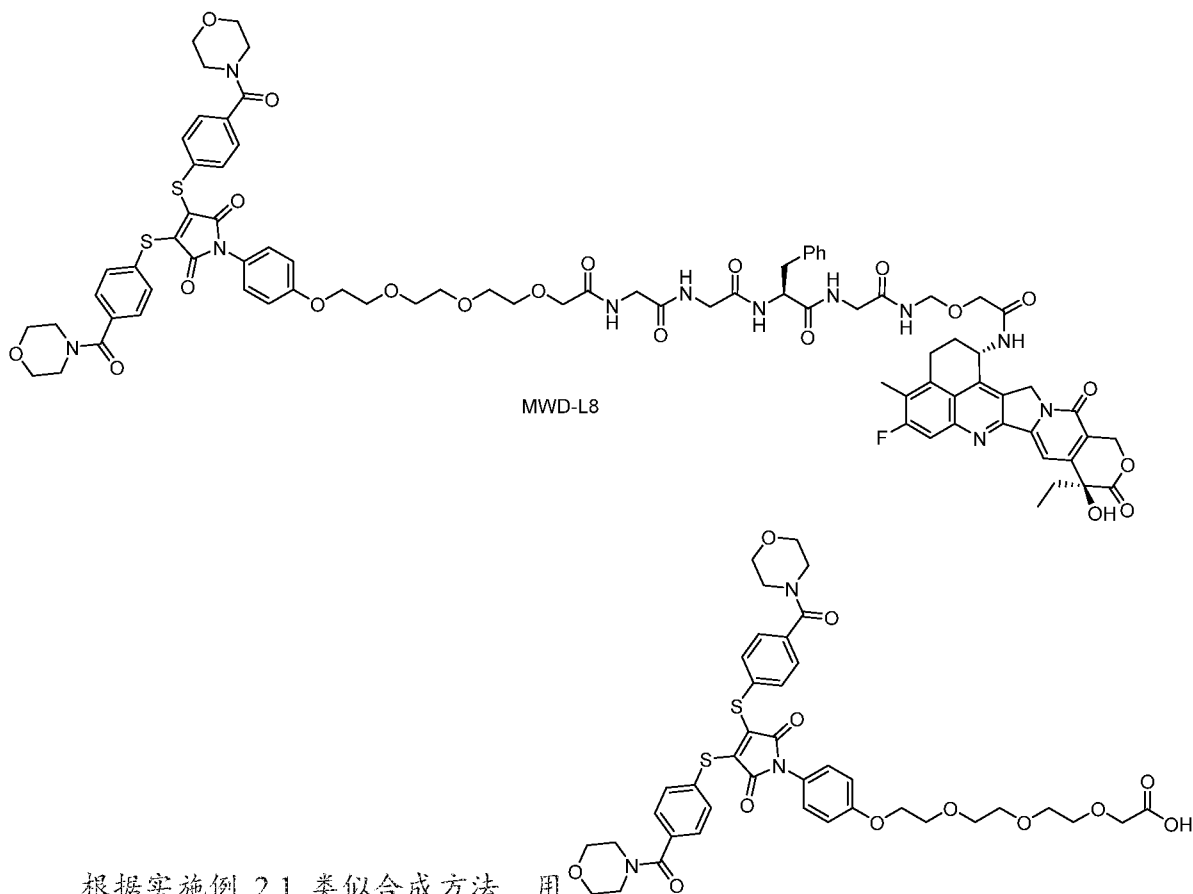
中间体 5-1 (180mg, 0.17mmol) 溶于甲醇 (20ml) 中, 加入二乙胺 (2ml), 搅拌反应 3h。旋干反应液, 得中间体 5-2 粗品为淡黄色粘稠物, LC-M(ESI):M+1=842, 粗品不经纯化直接下一步。

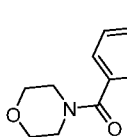
## 5 步骤 3

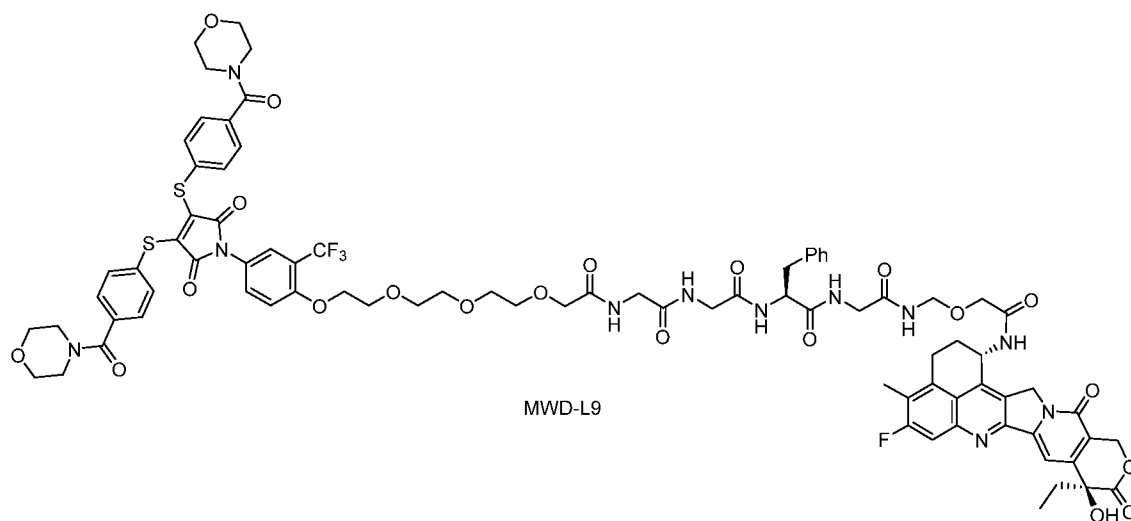
BL 接头化合物 (146mg, 0.17mmol), HoSu (25mg, 0.21mmol, 1.2eq), DCC (54mg, 0.26mmol, 1.5eq) 溶于 20ml DCM 中, 室温搅拌 3h, 反应液抽滤。将滤液加入到中间体 5-1 粗品、DIPEA (56mg, 0.43mmol, 2.5eq)、DCM (20ml) 的混合溶液中, 搅拌反应 3h。将反应液冷却至 5~10℃, 加入 1N 盐酸 (20ml), 搅拌 0.5h。分液, 水相用 DCM (30ml\*2) 萃取, 合并有机相。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干。柱层析纯化, 洗脱剂: DCM: MeOH=50: 1~10: 1, 得含药连接子 MWD-L7 为黄色固体 67mg, 收率 23.1%, LC-MS(ESI):M+1=1682, (M+1)/2=841。

## 实施例 2.17 含药连接子 MWD-L8 的合成

15



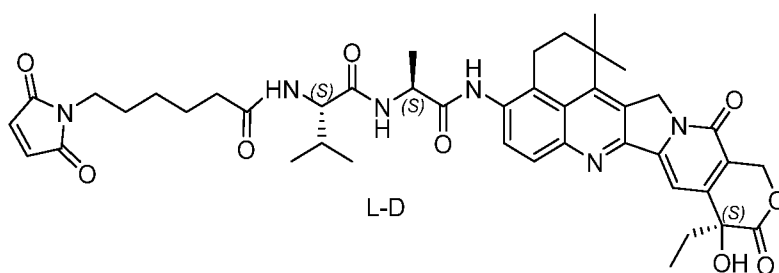
根据实施例 2.1 类似合成方法, 用  代替 BL 化合物合成得到 MWD-L8 为淡黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1645.7。

**实施例 2.18** 含药连接子 MWD-L9 的合成

根据实施例 2.1 类似合成方法，用

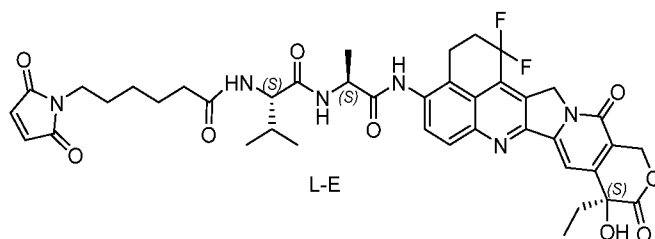
代

5 替 BL 化合物合成得到 MWD-L9 为淡黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=1713.7。

**实施例 2.19** 含药连接子 L-D 的合成

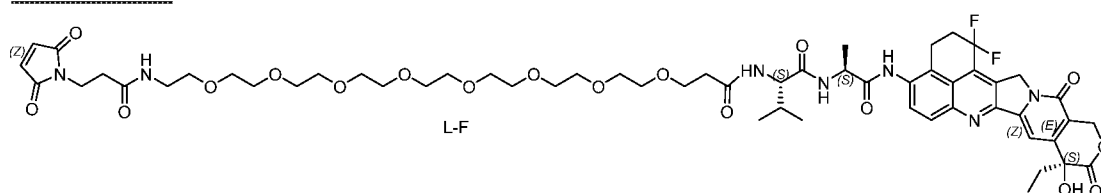
10 根据实施例 2.5 类似合成方法，用 MC-OSU 代替 BL-OSU 化合物合成得到 L-D 为淡黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=795.9。

**实施例 2.20** 含药连接子 L-E 的合成



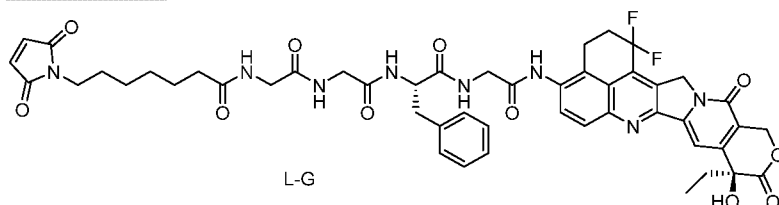
根据实施例 2.2 类似合成方法, 用 MC-OSU 代替 BL-OSU 化合物合成得到 L-E 为淡黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=803.8。

#### 5 实施例 2.21 含药连接子 L-F 的合成



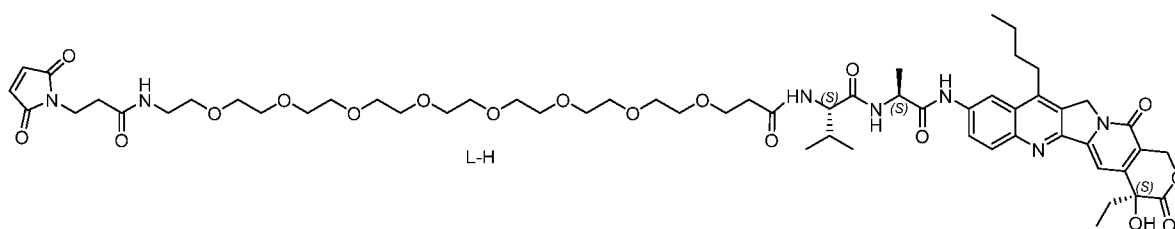
根据实施例 2.2 类似的方法, 用 A7 代替 A1, 用 MaL-PEG8-COOH 代替 BL 化合物制备得到 L-F, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1185。

#### 10 实施例 2.22 含药连接子 L-G 的合成

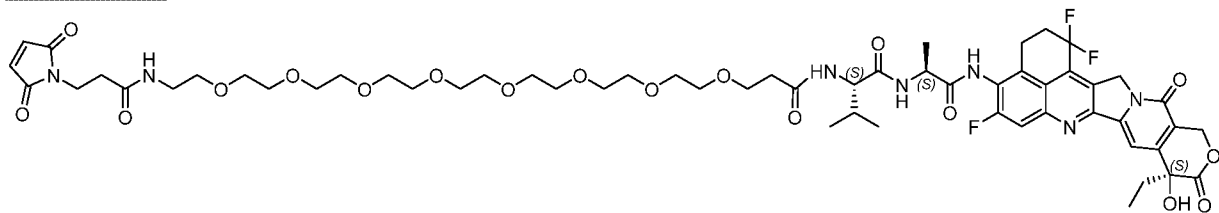


根据实施例 2.3, 用 MC-OSu 化合物代替 BL-OSu 化合物, 制备得到 L-G, 为黄色固体, MS(ESI):M+1=965.98。

#### 15 实施例 2.23 含药连接子 L-H 的合成



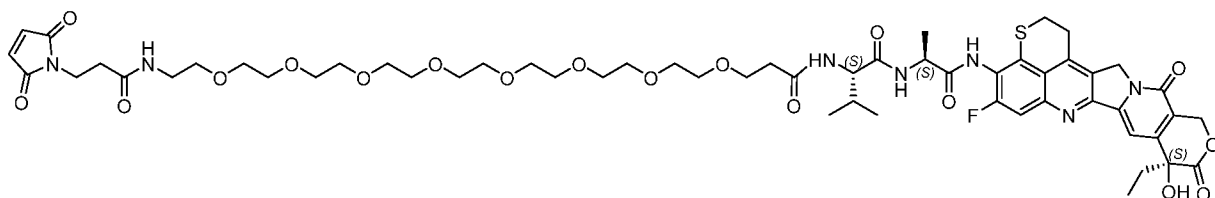
根据实施例 2.4 类似合成方法, 用 MaL-PEG8-COOH 代替 BL 化合物合成得到 L-H 为淡黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1165.3。

**实施例 2.24** 含药连接子 L-I 的合成

5

L-I

用实施例 2.2 类似的方法，用 A13 代替 A1，制备得到 L-I，为黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=1203.4。

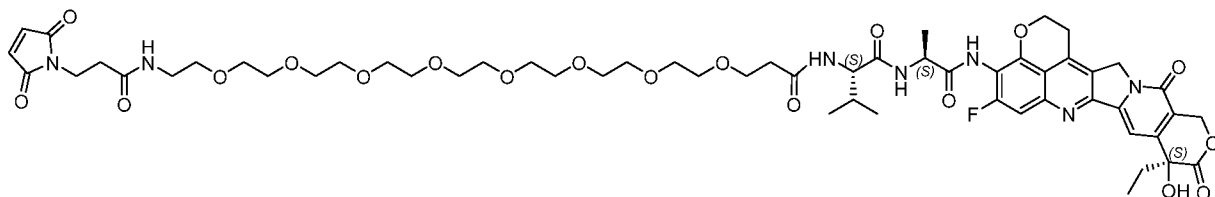
**实施例 2.25** 含药连接子 L-J 的合成

10

L-J

用实施例 2.2 类似的方法，用 A18 代替 A1，制备得到 L-J，为黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=1185.4。

15

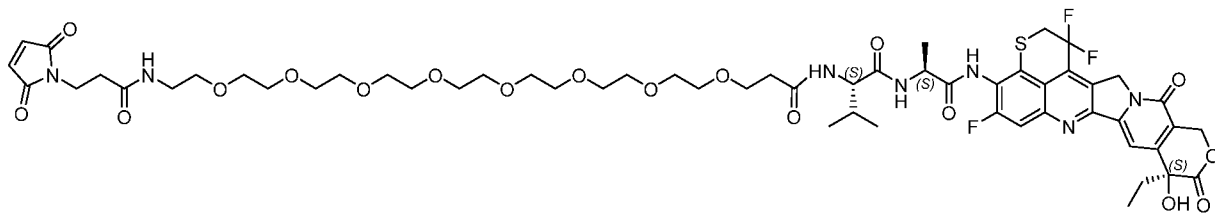
**实施例 2.26** 含药连接子 L-K 的合成

L-K

用实施例 2.2 类似的方法，用 A16 代替 A1，制备得到 L-K，为黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=1169.3。

20

**实施例 2.27** 含药连接子 L-L 的合成

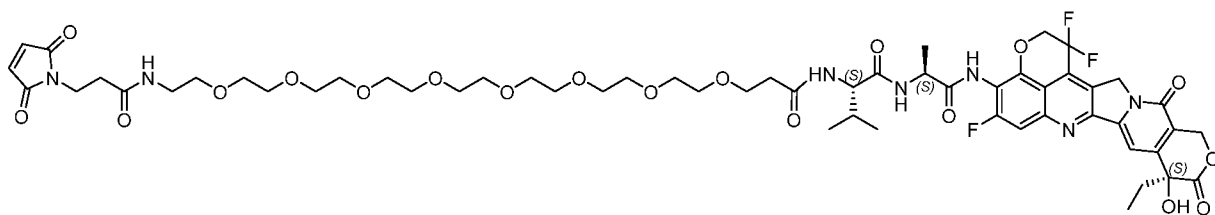


L-L

用实施例 2.2 类似的方法，用 A19 代替 A1，制备得到 L-L，为黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=1221.4。

5

### 实施例 2.28 含药连接子 L-M 的合成

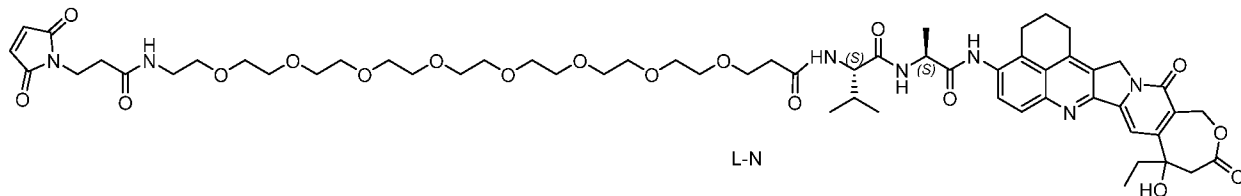


L-M

用实施例 2.2 的方法，用 A17 代替 A1，制备得到 L-M，为黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=1205.4。

10

### 实施例 2.29 含药连接子 L-N 的合成

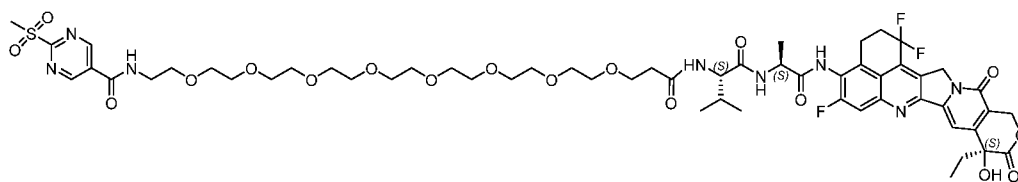


L-N

按照实施例 2.2 类似的方法合成，用 HCDE 中间体代替 CDE 中间体；用 MaL-PEG8-COOH 代替 BL 化合物制备得到 L-N，为黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=1163.2 (一对非对映异构体混合物)。

15

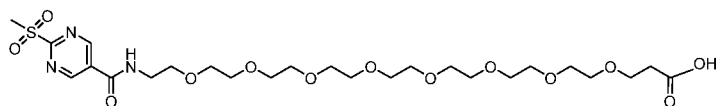
### 实施例 2.30 含药连接子 MWS-L1 的合成



MWS-L1

20

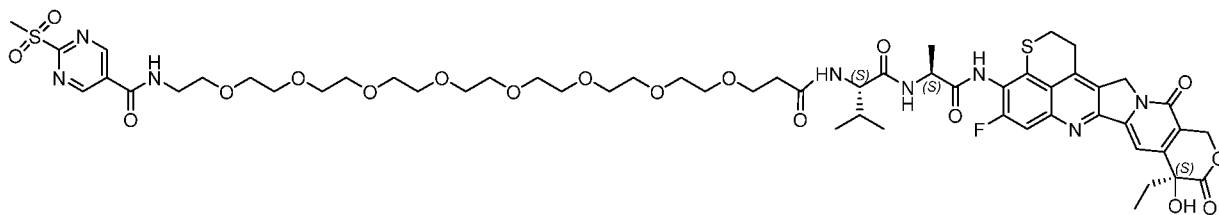
按照实施例 2.2 类似的方法用 A13 代替 A1, 用



代替 BL 接头化合物制备得到

MWS-L1, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1236.3。

#### 5 实施例 2.31 含药连接子 MWS-L2 的合成

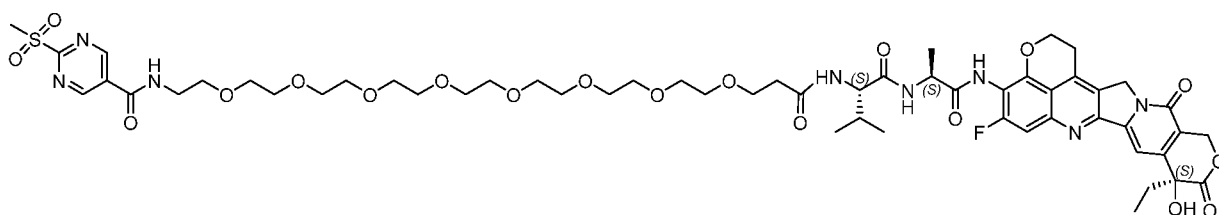


MWS-L2

用实施例 2.2 类似的方法, 用 A18 代替 A1, 制备得到 MWS-L2, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1218.4。

10

#### 实施例 2.32 含药连接子 MWS-L3 的合成

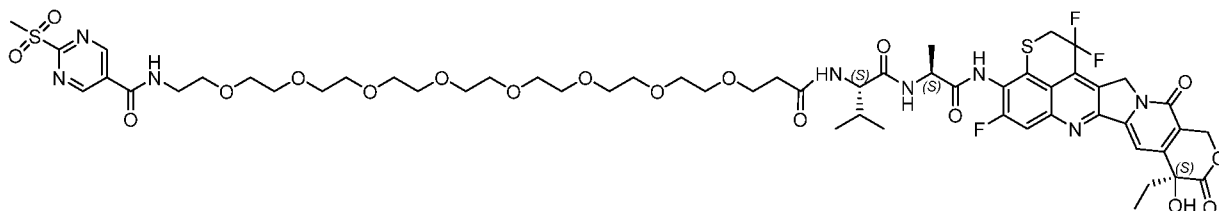


MWS-L3

用实施例 2.2 类似的方法, 用 A16 代替 A1, 制备得到 MWS-L3, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1202.4。

15

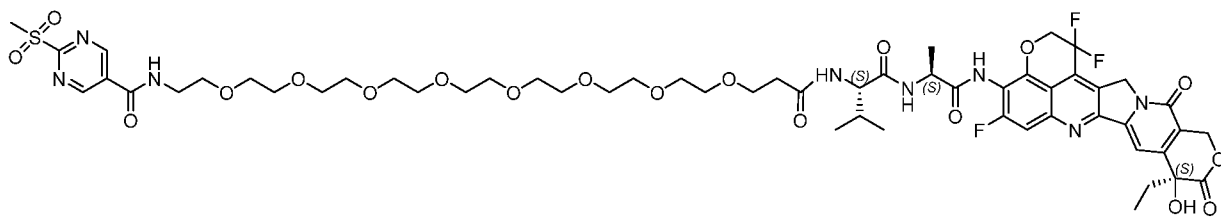
#### 实施例 2.33 含药连接子 MWS-L4 的合成



MWS-L4

用实施例 2.2 类似的方法, 用 A19 代替 A1, 制备得到 MWS-L4, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1254.4。

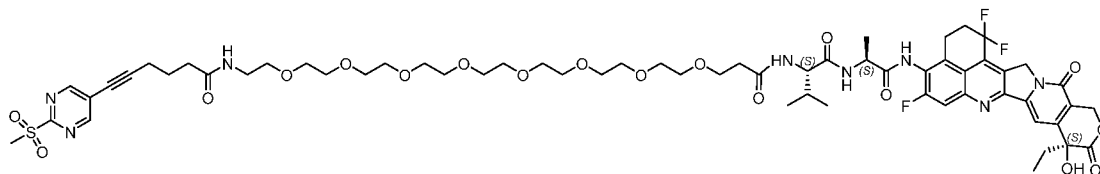
20

**实施例 2.34** 含药连接子 MWS-L5 的合成

MWS-L5

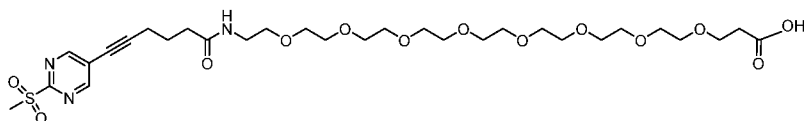
根据实施例 2.2 的方法，用 A17 代替 A1，制备得到 MWS-L5，为黄色固体，

5 LC-MS(ESI):M+1=1238.4。

**实施例 2.35** 含药连接子 MWS-L6 的合成

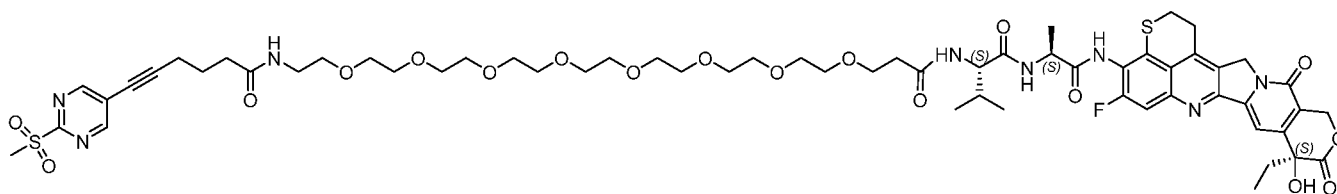
MWS-L6

10 按照实施例 2.11 类似的方法用



代替 Mal-PEG8-COOH 制备得

到 MWS-L6，为黄色固体，LC-MS(ESI):M+1=1302.4

**实施例 2.36** 含药连接子 MWS-L7 的合成

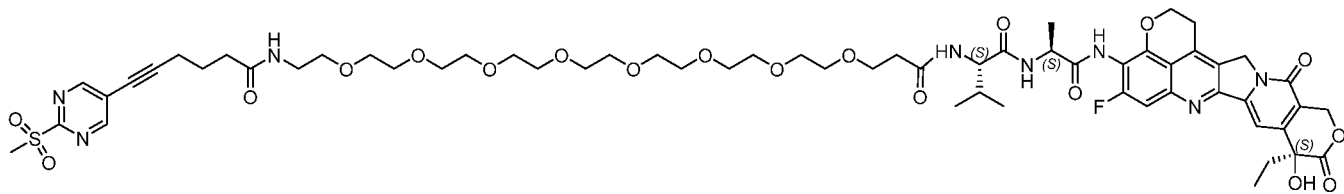
MWS-L7

用实施例 2.2 类似的方法，用 A18 代替 A1，制备得到 MWS-L7，为黄色固体，

LC-MS(ESI):M+1=1284.4。

20

**实施例 2.37** 含药连接子 MWS-L8 的合成

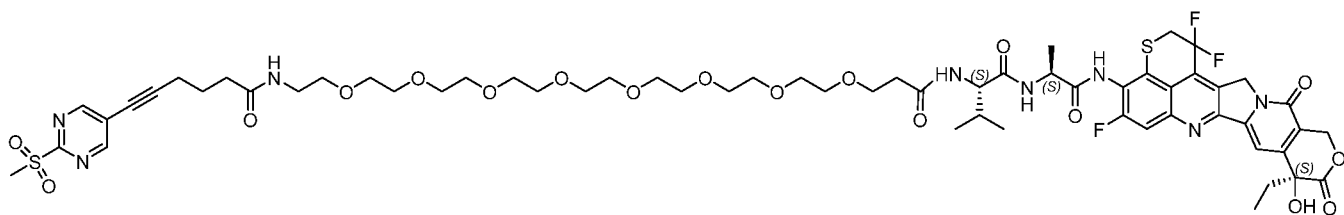


MWS-L8

用实施例 2.2 类似的方法, 用 A16 代替 A1, 制备得到 MWS-L8, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1268.4。

5

### 实施例 2.38 含药连接子 MWS-L9 的合成

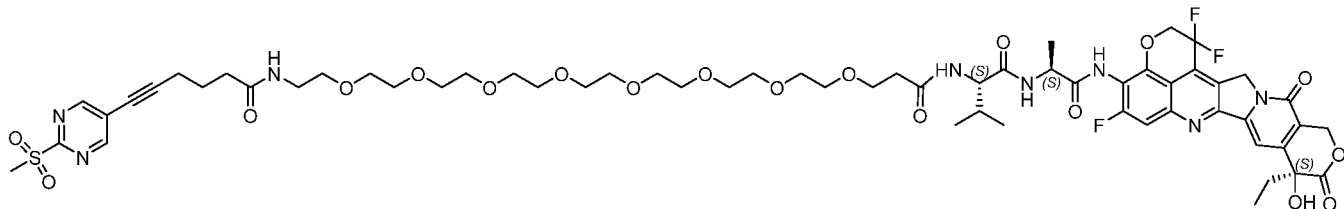


MWS-L9

用实施例 2.2 类似的方法, 用 A19 代替 A1, 制备得到 MWS-L9, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1320.4。

10

### 实施例 2.39 含药连接子 MWS-L10 的合成



MWS-L10

用实施例 2.2 类似的方法, 用 A17 代替 A1, 制备得到 MWS-L10, 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1304.4。

15

## 实施例组 3 对比含药连接子的合成

### 实施例 3.1 含药连接子 L-A、L-B 和 L-C 的合成

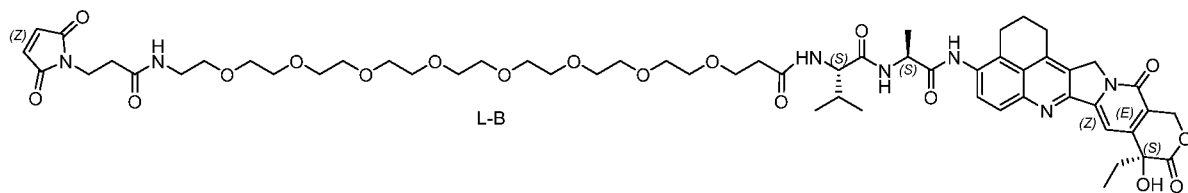
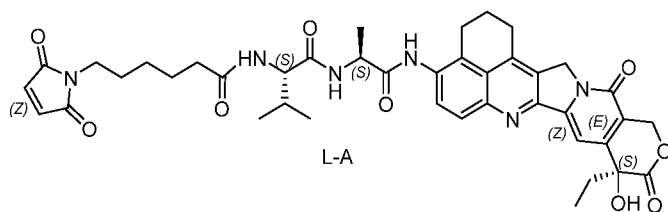
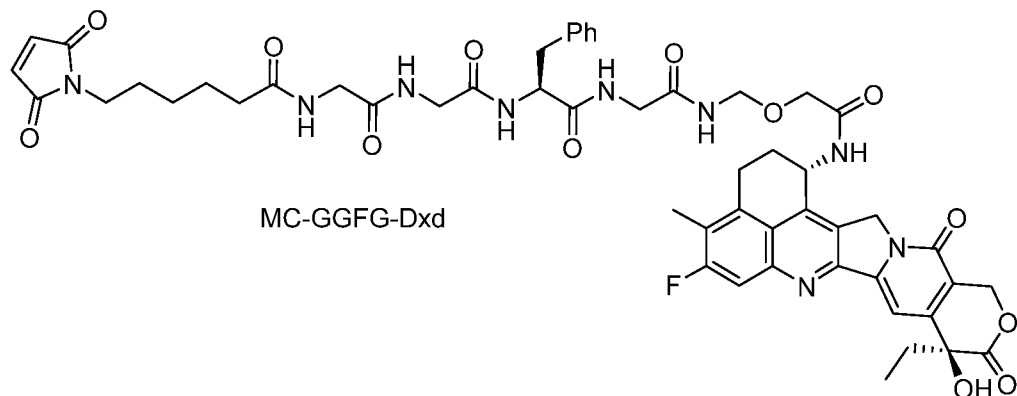
20

#### 3.1.1 随机偶联含药连接子的合成

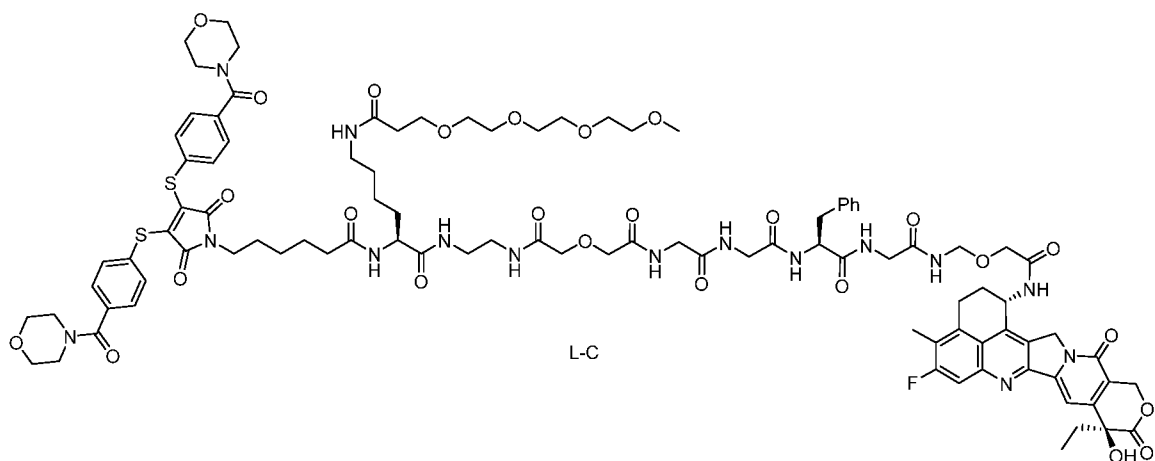
含药连接子 MC-GGFG-Dxd 按照专利公开文件 (US20190151328A1) 所述方法合成, 得到 MC-GGFG-Dxd 为淡黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1034,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )。

含药连接子 L-A 和 L-B, 按照专利公开文件 (WO2020200880) 所述方法合成, 得到

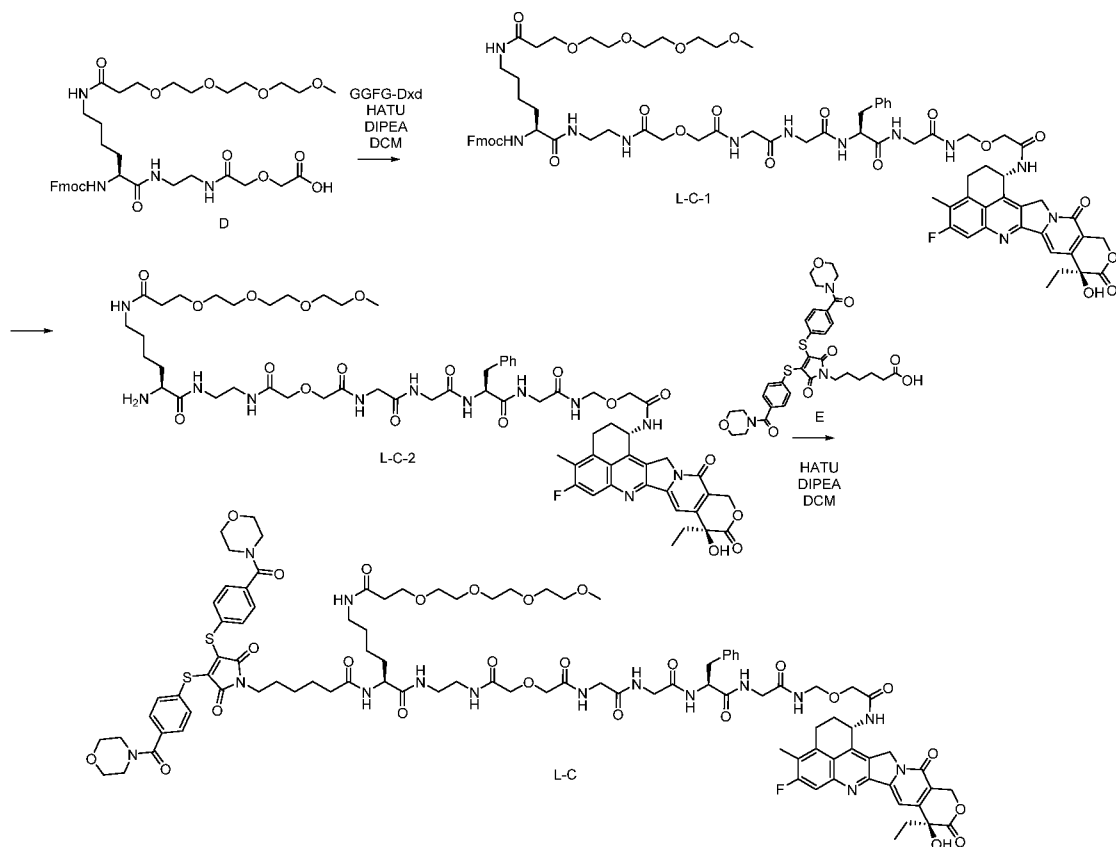
L-A 为黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=767; L-B 为棕色粘稠物, LC-MS(ESI):M+1=1149。



### 3.2.2 其他环桥连含药连接子 L-C 的合成



合成路线如下:



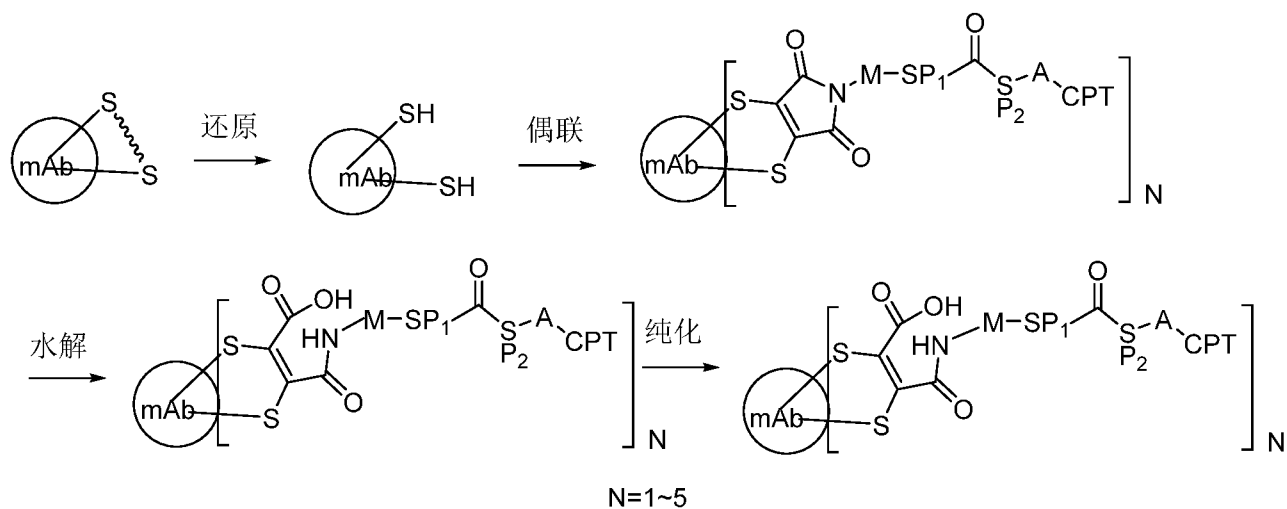
按照含药连接子 L-1 类似的方法合成连接子 L-C, L-C 为淡黄色固体, LC-MS(ESI):M+1=1982, (M+1)/2=991。

5

#### 实施例组 4 抗体药物偶联物的制备与理化表征

抗体药物偶联物制备工艺

a. 定点偶联制备工艺

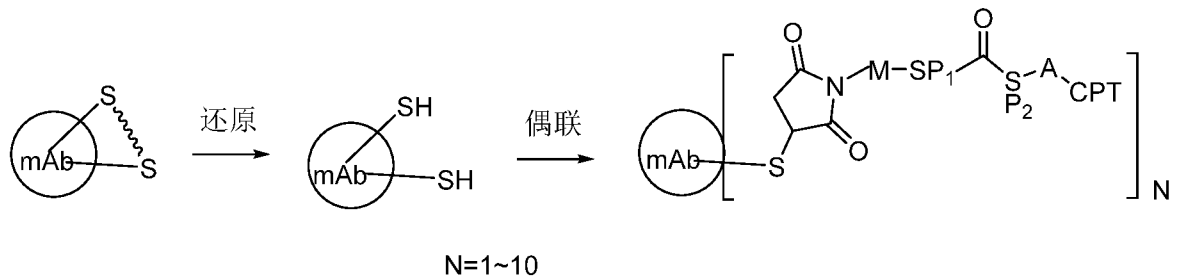


10

抗体经还原打开二硫键, 再与连接子进行偶联形成桥接抗体药物偶联物, 再经水解

打开马来酰亚胺环，最后经纯化得到 DAR=4 的抗体-药物偶联物。

#### b. 随机偶联制备工艺



5 抗体经还原打开二硫键，再与连接子进行偶联形成桥接抗体药物偶联物。

示例性地，采用了以下实验方法：

#### 4.1 抗体药物偶联物的通用制备方法

##### a. 定点偶联的通用制备方法

10 抗体的还原：将 120mg 的抗体样品使用 Sephadex G25 载体的 NAP-25 色谱柱、置换至 pH 值 7.0 含有 50mM 的氯化钠、50mM 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中，并将抗体浓度稀释至 10mg/ml。取 10ml 共计 100mg 的抗体样品，以抗体-TCEP 摩尔比 1 比 10 当量添加 10mg/ml 的 TCEP (Sigma-Aldrich) 的水溶液，加入 TCEP 水溶液的体积为 2.1ml。孵育 2 小时后，使用 Sephadex G25 色谱柱反应溶液进行置换，置换至 pH 6.5 含有 50mM 氯化钠，50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲的缓冲溶液中。

15 抗体与含药连接子的偶联及水解：将上述还原后的抗体稀释至 5mg/mL，依次加入反应总体积 2% 的 0.38ml N,N-二甲基乙酰胺 (DMA) 0.38ml 作为预溶剂，以抗体-小分子药物摩尔比 1 比 5.5 倍当量添加 0.67ml 含 10mg/mL 含药连接子的 DMA-含药连接子混合溶液作为反应液。室温搅拌 30 分钟。使用 Sephadex G25 载体的 NAP-25 色谱柱将反应液置换至 pH8.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液，除去过量的含药连接子，37℃ 水浴加热 20 3 小时。

抗体药物偶联物的纯化：将上述样品进行使用 AMICOM 超滤离心管进行浓缩，将样品浓缩至 15mg/mL 左右。添加 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+3M 磷酸铵缓冲溶液至电导率为 100ms/cm。上样至 TOYOPEAL Butyl-650M 填料（购自 TOSOH）疏水柱，A 相为 50mm 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+0.6M 硫酸铵，B 相为 50mm 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠的 25 缓冲溶液。B 相 0-100% 梯度 8 倍柱体积洗脱，对主峰进行收集。

使用 AMICOM 超滤离心管将最终样品置换至 pH 值 7.4 的 50mM 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲盐中，并使用 0.22um 的滤膜进行过滤 (Sartorius stedim Ministart)。

##### b. 随机偶联的通用制备方法

按照CN 105849126 A专利公开的制备方法制备得到。

4.2 抗体药物偶联物的通用分析方法

a. 紫外分光光度法测定药物抗体偶联比（UV-DAR法）与浓度

抗体药物偶联物浓度可通过测定在280nm及小分子特征吸收波长下的UV吸光度，然后进行下述计算而得到。

a1. 抗体药物偶联物的药物抗体偶联比（DAR）测定

根据文献[Clin Cancer Res. 2004 Oct 15;10(20):7063-70]可知DAR（抗体药物偶联比）

$$= (\epsilon_{280}^{Ab} - A_{280} / A_z \times \epsilon_z^{Ab}) / (A_{280} / A_z \times \epsilon_z^D - \epsilon_{280}^D)$$
，其中， $\epsilon_{280}^{Ab}$ 为抗体在280nm下摩尔吸收系数， $A_{280}$ 为抗体药物偶联物在280nm下紫外吸收值， $A_z$ 为抗体药物偶联物在含药连接子特征吸收波长Z nm下紫外吸收值， $\epsilon_z^{Ab}$ 为抗体在含药连接子特征吸收波长Z nm下摩尔吸收系数， $\epsilon_z^D$ 为含药连接子在其特征吸收波长Z nm下摩尔吸收系数， $\epsilon_{280}^D$ 为含药连接子在280 nm下摩尔吸收系数。

其中：

| 含药连接子       | $\epsilon_z^D$ | $\epsilon_{280}^D$ |
|-------------|----------------|--------------------|
| MWD-L1      | 20146(Z=370nm) | 16171              |
| MWD-L7      | 20146(Z=370nm) | 16171              |
| MWD-L8      | 20146(Z=370nm) | 16171              |
| MWD-L9      | 20146(Z=370nm) | 16171              |
| MWC-L2      | 20196(Z=370nm) | 18643              |
| MWC-L3      | 23501(Z=360nm) | 21039              |
| MWF-L6      | 16901(Z=385nm) | 18108              |
| MWF-L7      | 16901(Z=385nm) | 18108              |
| MWF-L8      | 16901(Z=385nm) | 18108              |
| L-J         | 13738          | 18001              |
| MC-GGFG-DXD | 20217(Z=370nm) | 5178               |
| L-A         | 21430(Z=370nm) | 7670               |
| L-B         | 9635(Z=255nm)  | 5534               |

a2. 药物浓度测定

由于某一波长下的总吸光度等于存在于体系内的所有吸收化学物质种类的吸光度的和（吸光度的加成性），所以假设在抗体与含药连接子偶联前后，抗体及含药连接子的摩尔吸光系数不发生变化时，抗体药物偶联物浓度有如下关系：

$$A_{280} = \epsilon_{280}^{ADC} \times C_{ADC} \times L = (\epsilon_{280}^D \times DAR + \epsilon_{280}^{Ab}) C_{ADC} \times L$$

因此，抗体药物偶联物摩尔浓度(mol/L)  $C_{ADC} = A_{280} / (\epsilon_{280}^{Ab} + \epsilon_{280}^D \times DAR)$ ，由此得到抗体药物偶联物浓度 (g/L)  $C_{ADC} = A_{280} / (\epsilon_{280}^{Ab} + \epsilon_{280}^D \times DAR) \times MW_{ADC} = A_{280} / (\epsilon_{280}^{Ab} + \epsilon_{280}^D \times DAR) \times (MW_{Ab} + MW_D \times DAR)$ ，将DAR值代入式中即得蛋白浓度。

5        其中， $MW_{ADC}$ 为抗体药物偶联物分子量， $MW_{Ab}$ 为抗体分子量， $MW_D$ 为含药连接子分子量。

b. 疏水层析法

b1. 抗体药物偶联物疏水色谱HIC-HPLC测定DAR值

样品制备：样品用流动相B稀释至2.0 mg/ml后，12000 rpm离心10 min，取上清用于

10      HPLC分析；

色谱柱：Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5，5 $\mu$ m，4.6mm \*35mm；

流动相A：1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 25 mM PB，pH 7.0；

流动相B：25 mM PB + 20% IPA，pH 7.0；

流速：0.6 mL/min；

15      检测波长：280nm；

柱温：30℃；

上样量：10  $\mu$ L；

HIC色谱梯度

| 时间   | %A  | %B  |
|------|-----|-----|
| 0    | 100 | 0   |
| 10   | 80  | 20  |
| 20   | 40  | 60  |
| 25   | 0   | 100 |
| 25.1 | 100 | 0   |
| 35   | 100 | 0   |

DAR 计算公式：

20       $DAR = \sum (加权峰面积) / 100$ ，即  $DAR = (D0 峰面积比 * 0 + D1 峰面积比 * 1 + D2 峰面积比 * 2 + D3 峰面积比 * 3 + D4 峰面积比 * 4 + D5 峰面积比 * 5 + D6 峰面积比 * 6 + D7 峰面积比 * 7 + D8 峰面积比 * 8) / 100$ 。

b2. 抗体药物偶联物疏水色谱HIC-HPLC测定DAR值

样品制备：样品用流动相B稀释至2.0 mg/ml后，12000 rpm离心10 min，取上清用于

25      HPLC分析；

色谱柱：TSKgel Butyl-NPR，2.5μm，4.6mm \*100mm；

流动相A：1.2 M (NH4)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 25 mM PB，pH 7.0；

流动相B：25 mM PB + 20% IPA，pH 7.0；

流速：0.6 mL/min；

5 检测波长：280nm；

柱温：30℃；

上样量：10 μL；

HIC色谱梯度

| 时间   | %A  | %B  |
|------|-----|-----|
| 0    | 100 | 0   |
| 1    | 100 | 0   |
| 20   | 0   | 100 |
| 20.1 | 100 | 0   |
| 30   | 100 | 0   |

DAR 计算公式：同 b1。

10 b3. 抗体药物偶联物疏水色谱HIC-HPLC测定DAR值

样品制备：样品用流动相B稀释至2.0 mg/ml后，12000 rpm离心10 min，取上清用于

HPLC分析；

色谱柱：Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5，5μm，4.6mm \*35mm；

流动相A：2.5 M (NH4)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 125 mM PB，pH 7.0

15 流动相B：125 mM PB，pH 7.0

流速：0.5 mL/min；

检测波长：280nm；

柱温：30℃；

上样量：10 μL；

20 HIC色谱梯度

| 时间   | %A | %B | %C | %D |
|------|----|----|----|----|
| 0    | 80 | 0  | 0  | 20 |
| 20   | 5  | 45 | 3  | 47 |
| 22   | 0  | 50 | 3  | 47 |
| 22.1 | 80 | 0  | 0  | 20 |

|    |    |   |   |    |
|----|----|---|---|----|
| 30 | 80 | 0 | 0 | 20 |
|----|----|---|---|----|

DAR 计算公式：同 b1。

c. 质谱法 LC-MS 测定 DAR 值

样品处理：取适量样品于超滤管中，采用 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 置换缓冲液(pH7.1)进行置换，补加缓冲液，超滤离心（13000g\*5min）。加入 8 μl 的 PNGase F 酶至置换后的样品  
5 中，37℃ 孵育 5 h 进行脱糖处理，孵育结束后，12000 rpm 离心 5 min，取上清液于进样小瓶中作为供试样品待用。

色谱柱：PolyLC® PolyHYDROXYETHYLA Column, 300 Å, 5μm, 2.1mm×200mm；

流动相：50mM 乙酸铵，pH 7.0；

运行时间：10min；

10 流速：0.1mL/min；

进样体积：2μL；

柱温：25℃；

检测波长：280nm；

离子化方式：ESI positive

15 干燥气体温度：325℃

干燥气体流速：8 L/min

雾化器压力：20psig

鞘气温度：325℃；

鞘气流量：12L/min；

20 扫描设置：900-8000 m/z。

d. 分子排阻色谱 SEC-HPLC 测定分子大小异质性

样品处理：样品用流动相稀释至约 1.0 mg/ml 后，12000 rpm 离心 10 min，取上清进样分析。

色谱柱：TOSOH, TSKgel G3000SWXL, 5 μm, 7.8mm\*300mm；

25 流动相：100 mM PB+200 mM 盐酸精氨酸，5%异丙醇（pH 6.8）；

流速：0.6 mL/min；

检测波长：280 nm；

柱温：30℃；

上样量：20 uL；

30 洗脱时间：20 min；

洗脱梯度：等度洗脱。

e. 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。

f. 反向作用色谱 (RP-HPLC) 法测定抗体药物偶联物小分子/抗体偶联比 (DAR 值)

按照专利公开文件 (US 10227417 B2) 所述方法分析。

5 根据公式计算 DAR 值:  $DAR=2\times(\sum \text{轻链加权峰面积}+\sum \text{重链加权峰面积})/100$ 。即:  
 $DAR=2\times(L0 \text{ 峰面积比}\times 0+L1 \text{ 峰面积比}\times 1+H0 \text{ 峰面积比}\times 0+H1 \text{ 峰面积比}\times 1+H2 \text{ 峰面积比}\times 2+H3 \text{ 峰面积比}\times 3)/100$ 。

g. 反向作用色谱 (RP-HPLC) 法测定抗体药物偶联物小分子/抗体偶联比 (DAR 值)

样品前处理: 按照专利公开文件 (US 10227417 B2) 所述方法处理样品。

10 HPLC 仪器: Waters Acquity Arc

流动相 A: 0.1% TFA+ACN

流动相 B: 0.1% TFA+H2O

分析柱: Waters; BioResolve; 2.1\*100mm; 2.7μm; 450 Å; PN 0024168

进样体积: 5 μL

15 流速: 0.25 mL/min

柱温: 80℃

检测器: PDA 检测器

检测波长: 280 nm

梯度:

| 时间 (min) | 流动相 A | 流动相 B |
|----------|-------|-------|
| 0        | 25    | 75    |
| 12.5     | 36    | 64    |
| 20       | 45    | 55    |
| 25       | 45    | 55    |
| 25.1     | 25    | 75    |
| 35       | 25    | 75    |

20

**实施例 4.1** 靶向 Trop-2 的抗体药物偶联物的制备与表征

根据本实施例组 4 的偶联方法, 将靶向 Trop-2 抗体 hTINA1 (根据 WHO Drug Information 中 Datopotamab 的序列进行制备)、h23-12 各 100mg, 分别与含药连接子 MWD-L1、MWC-L2、MWC-L3、MWF-L6、MWD-L7、MWD-L8、MWD-L9 及 MWF-L8  
25 制备 ADC。得到桥连 ADC 药物 1a、1b、1c、1d、1j、1k、1l、1m、1n、1o 和 1p; 收集 1d

未进行疏水层析的中间样品，作为中间样品lj保存。

根据专利CN105849126B方法，将靶向Trop-2抗体hTINA1、h23-12各100mg，分别与MC-GGFG-Dxd、L-A、L-B、L-J、MWS-L7、L-I及MWS-L6制备ADC，得到随机偶联ADC 1e、1f、1g、1h、1i、1q、1r、1s、1t 和1u。

5 使用本实施例组4中紫外分光光度法4.2a、疏水层析法4.2b以及分子排阻色谱法4.2d 分别对桥连ADC（1a-1d、1j、1k-1p）的DAR值、浓度及纯度进行测定。

使用本实施例组4中反向作用色谱法4.2f对含MC-GGFG-Dxd含药连接子的ADC样品（1e、1h、1q、1r、1s、1t及1u）DAR值进行测定、反向色谱法4.2g对含L-A或L-B含药连接子的ADC样品(1f、1g、1i)DAR值进行测定；使用实施例组4中4.2a紫外分光光度法以及  
10 4.2d分子排阻色谱法分别对非桥连ADC药物（1e-1i）的浓度及纯度进行测定。

结果见表 1。

表 1. 靶向 Trop-2 的抗体药物偶联物的表征结果

| 序号 | 名称           | 抗体     | 含药连接子       | DAR | 浓度 mg/ml | SEC   |
|----|--------------|--------|-------------|-----|----------|-------|
| 1a | Trop2-ADC-1  | h23-12 | MWD-L1      | 4.0 | 4.6      | 99.0% |
| 1b | Trop2-ADC-2  | h23-12 | MWC-L2      | 4.0 | 3.8      | 99.2% |
| 1c | Trop2-ADC-3  | h23-12 | MWC-L3      | 4.0 | 12.3     | 97.2% |
| 1d | Trop2-ADC-4  | hTINA1 | MWD-L1      | 4.0 | 5.7      | 99.3% |
| 1e | Trop2-ADC-5  | h23-12 | MC-GGFG-Dxd | 3.8 | 4.5      | 99.9% |
| 1f | Trop2-ADC-6  | h23-12 | L-B         | 3.7 | 6.1      | 88.1% |
| 1g | Trop2-ADC-7  | h23-12 | L-A         | 4.1 | 7.3      | 97.7% |
| 1h | Trop2-ADC-8  | hTINA1 | MC-GGFG-Dxd | 4.2 | 9.5      | 99.2% |
| 1i | Trop2-ADC-9  | hTINA1 | L-B         | 4.2 | 7.7      | 93.8% |
| 1j | Trop2-ADC-4' | hTINA1 | MWD-L1      | 未统计 | 8.3      | 未统计   |
| 1k | Trop2-ADC-10 | h23-12 | MWD-L7      | 4.0 | 7.7      | 98.9% |
| 1l | Trop2-ADC-11 | h23-12 | MWD-L8      | 4.0 | 6.3      | 99.5% |
| 1m | Trop2-ADC-12 | h23-12 | MWD-L9      | 4.0 | 7.2      | 99.1% |
| 1n | Trop2-ADC-13 | hTINA1 | MWF-L6      | 4.0 | 7.1      | 98.1% |
| 1o | Trop2-ADC-14 | h23-12 | MWF-L6      | 4.1 | 4.3      | 99.6% |
| 1p | Trop2-ADC-15 | h23-12 | MWF-L8      | 3.3 | 4.7      | 未统计   |
| 1q | Trop2-ADC-16 | h23-12 | L-J         | 3.9 | 5.1      | 未统计   |

|    |              |        |        |     |       |       |
|----|--------------|--------|--------|-----|-------|-------|
| 1r | Trop2-ADC-17 | h23-12 | MWS-L7 | 4.4 | 约 7.3 | 未统计   |
| 1s | Trop2-ADC-18 | h23-12 | L-J    | 8.0 | 4.4   | 未统计   |
| 1t | Trop2-ADC-19 | h23-12 | L-I    | 3.0 | 约 2.0 | 99.1% |
| 1u | Trop2-ADC-20 | h23-12 | MWS-L6 | 3.0 | 约 2.5 | 99.1% |

(本发明中, h23-12 为具有如下序列的单克隆抗体:

重链可变区:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEITPSD  
NYGSYNQKFKGRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGHGNYVSFDYWGQG

5 TLVTVSS (SEQ ID NO: 7)

重链 CDR1: SYWMH (SEQ ID NO: 1)

重链 CDR2: EITPSDNYGSYNQKFKG (SEQ ID NO: 2)

重链 CDR3: GHGNYVSFDY (SEQ ID NO: 3)

轻链可变区:

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGYTLPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)

轻链 CDR1 氨基酸: RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 4)

轻链 CDR2 氨基酸: YTSRLES (SEQ ID NO: 5)

轻链 CDR3 氨基酸: QQGYTLPPYT (SEQ ID NO: 6)

15 重链恒定区:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  
20 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

轻链恒定区:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:

25 10)

#### 实施例 4.2 靶向 Her2 抗体药物偶联物的制备

根据本实施例组4的偶联方法, 将靶向HER-2抗体曲妥珠单抗 (CAS: 180288-69-1,

购自上海罗氏制药有限公司)各100mg,分别与含药连接子MWD-L1、MWD-L2、MWE-L4、MWF-L6、MWD-L8、MWD-L9、L-C, MWC-L3进行制备桥连ADC 2a、2b、2c、2h、2i、2d, 2l。

分别根据专利CN105829346B方法,将靶向HER-2抗体曲妥珠单抗各100mg分别与MC-GGFG-DXD、L-A、L-B制备随机偶联ADC 2e, 2f, 2g, 2k, 2m。

使用本实施例组4中紫外分光光度法4.2a、疏水层析法4.2b以及分子排阻色谱法4.2d分别对桥连ADC (2a-2d, 2h-2j, 2l) 的DAR值、浓度及纯度进行测定。

使用实施例组4中反向色谱法4.2f对含MC-GGFG-Dxd含药连接子的ADC样品 (2g) DAR值进行测定、反向色谱法4.2g对含L-A或L-B含药连接子的ADC样品(2e、2b)DAR值进行测定;使用紫外分光光度法4.2a以及分子排阻色谱法4.2d分别对非桥连ADC 药物 (2e-2g, 2k, 2m) 的DAR值、浓度及纯度进行测定。

结果见表 2。

表 2. 靶向 HER-2 的抗体药物偶联物的表征结果

| 序号 | 名称          | 抗体    | 含药连接子       | DAR | 浓度 mg/ml | SEC   |
|----|-------------|-------|-------------|-----|----------|-------|
| 2a | Her2-ADC-1  | 曲妥珠单抗 | MWC-L1      | 3.9 | 4.6      | 98.0% |
| 2b | Her2-ADC-2  | 曲妥珠单抗 | MWC-L2      | 4.0 | 3.8      | 99.2% |
| 2c | Her2-ADC-3  | 曲妥珠单抗 | MWE-L4      | 4.0 | 3.7      | 97.5% |
| 2d | Her2-ADC-4  | 曲妥珠单抗 | L-C         | 3.9 | 3.8      | 97.72 |
| 2e | Her2-ADC-5  | 曲妥珠单抗 | L-A         | 4.3 | 4.8      | 99.0% |
| 2f | Her2-ADC-6  | 曲妥珠单抗 | L-B         | 4.1 | 6.2      | 98.6% |
| 2g | Her2-ADC-7  | 曲妥珠单抗 | MC-GGFG-Dxd | 4.0 | 6.6      | 99.8% |
| 2h | Her2-ADC-8  | 曲妥珠单抗 | MWD-L8      | 4.0 | 7.5      | 98.9% |
| 2i | Her2-ADC-9  | 曲妥珠单抗 | MWD-L9      | 4.0 | 7.8      | 99.5% |
| 2j | Her2-ADC-10 | 曲妥珠单抗 | MWF-L6      | 4.0 | 7.2      | 98.7% |
| 2k | Her2-ADC-11 | 曲妥珠单抗 | MC-GGFG-Dxd | 8.0 | 5.3      | 99.2% |
| 2l | Her2-ADC-12 | 曲妥珠单抗 | MWC-L3      | 3.5 | 16.7     | 99.5% |
| 2m | Her2-ADC-13 | 曲妥珠单抗 | L-B         | 8.0 | 1.8      | 95.0% |

实施例 4.3 化合物的结构表征

对实施例1和实施例2制备的Trop2样品 (1a、1h、1j) 以及Her2样品 (2b、2e) 如下分别使用本实施例组4中4.2b进行疏水层析分析,以比较不同连接技术产生的ADC的药物

异质性。

结果见表3。

表3. 抗体药物偶联物的表征结果

| 序号 | 名称           | 抗体     | 含药连接子       | HIC 层析方法 |
|----|--------------|--------|-------------|----------|
| 1d | Trop2-ADC-4  | hTINA1 | MWC-L1      | 4.2.b3   |
| 1h | Trop2-ADC-8  | hTINA1 | MC-GGFG-Dxd | 4.2.b2   |
| 1j | Trop2-ADC-4' | hTINA1 | MWC-L1      | 4.2.b3   |
| 2b | Her2-ADC-2   | 曲妥珠单抗  | MWC-L2      | 4.2.b3   |
| 2e | Her2-ADC-5   | 曲妥珠单抗  | L-A         | 4.2.b2   |

比较Trop2-ADC-4'、Trop2-ADC-4以及Trop2-ADC-8可知，使用含药连接子MWD-L1  
5 制备的ADC药物Trop2-ADC-4和Trop2-ADC-4'与使用MC-GGFG-Dxd制备的已知ADC药  
物（Trop2-ADC-8）相比，具有更优异的药物均一性。结果见图1。

比较Her2-ADC-2以及Her2-ADC-5可知，使用含药连接子MWC-L2制备的ADC药物  
Her2-ADC-2比使用已知连接子L-A制备的Her2-ADC-5的均一性更佳。

10

实施例组 5 测活评价

实施例 5.1 喜树碱类化合物活性对比研究

口腔上皮癌细胞 KB（购自：ATCC）使用 DMEM 培养基添加 10% FBS 培养；人胃  
癌细胞 NCI-N87（购自：ATCC）使用 RPMI1640 培养基添加 10% FBS 培养；人结肠癌  
细胞 HT29（购自：ATCC）使用 RPMI1640 培养基添加 10% FBS 培养；人胰腺腺癌细胞  
15 BxPC-3（购自：ATCC）使用 RPMI1640 培养基添加 10% FBS 培养。

使用上述相应培养基将 KB 细胞调整细胞密度至  $2 \times 10^4$  个/mL；将 NCI-N87 细胞调整  
细胞密度至  $5 \times 10^4$  个/mL；将 HT29 细胞调整细胞密度至  $5 \times 10^4$  个/mL，100 $\mu$ L/孔铺于 96  
孔透明平底板中，过夜培养；将 BxPC-3 细胞调整细胞密度至  $5 \times 10^4$  个/mL。

使用培养基稀释待测样品至 20 $\mu$ M，然后 5 倍稀释，设置 9 个梯度（设置不加样品孔  
20 即细胞最大生长孔和不加细胞孔即培养基本底）。按 100 $\mu$ L/孔加入细胞培养板中，二氧化  
碳培养箱孵育 96 小时。孵育完毕后，按照 20 $\mu$ L/孔加入配置好的 CCK-8（购自：同仁化  
学），二氧化碳培养箱孵育 3 小时后，酶标仪读取 OD450 值。

数据采用 prism7 软件进行 4 参数拟合曲线，最大杀伤计算公式为：1-（最大杀伤孔  
的 OD450 值-培养基本底 OD450 值）/（细胞最大生长孔 OD450 值-培养基本底 OD450  
25 值）\*100%。结果见表 4。

表 4 喜树碱类化合物活性对比研究结果

| 细胞株     | 样品名称      | EC50(nM) | 最大杀伤(%) | 板号 | 杀伤天数 |
|---------|-----------|----------|---------|----|------|
| HT29    | MWC-1     | 9.894    | 89      | P1 | 4 天  |
|         | 化合物 1     | 43.43    | 91.9    |    |      |
|         | Dxd       | 132.8    | 85.4    |    |      |
|         | MWC-1     | 8.678    | 89.9    | P2 |      |
|         | 化合物 3     | 6.045    | 90.6    |    |      |
|         | Dxd       | 126.6    | 87.4    |    |      |
| KB      | MWC-1     | 14.83    | 98.6    | P1 | 4 天  |
|         | 化合物 1     | 52.31    | 97.6    |    |      |
|         | Dxd       | 135.8    | 94.7    |    |      |
|         | MWC-1     | 15.67    | 98.6    | P2 |      |
|         | 化合物 3     | 7.467    | 95.6    |    |      |
|         | Dxd       | 138.5    | 94.9    |    |      |
| NCI-N87 | MWC-1     | 4.444    | 93.4    | P1 | 4 天  |
|         | 化合物 1     | 21.93    | 92.1    |    |      |
|         | Dxd       | 45.33    | 92.8    |    |      |
|         | MWC-1     | 5.217    | 93.3    | P2 |      |
|         | 化合物 3     | 3.371    | 92.1    |    |      |
|         | Dxd       | 43.71    | 92.7    |    |      |
|         | 化合物 3     | 0.706    | 90.9    | P3 |      |
|         | 化合物 7     | 3.312    | 87.9    |    |      |
|         | 化合物 3     | 10.750   | 92.9    | P4 |      |
|         | 化合物 12    | 8.426    | 94.9    |    |      |
|         | 化合物 3     | 6.219    | 87.7    | P5 |      |
|         | 化合物 14-P1 | 503.40   | 42.5    |    |      |
|         | 化合物 27    | 1.746    | 90.6    |    |      |
|         | 化合物 3     | 7.849    | 88.4    | P6 |      |
|         | 化合物 14-P2 | 2001.00  | 68.4    |    |      |
|         | 化合物 3     | 10.31    | 92.0    | P7 |      |

|        |           |          |      |     |     |
|--------|-----------|----------|------|-----|-----|
|        | 化合物 15    | 178.4    | 83.6 | P8  |     |
|        | 化合物 3     | 14.510   | 90.2 |     |     |
|        | 化合物 18    | 1.574    | 92.9 |     |     |
|        | 化合物 26    | 1.021    | 93.4 |     |     |
|        | 化合物 3     | 2.340    | 93.1 | P9  |     |
|        | 化合物 20    | 0.059    | 93.2 |     |     |
|        | 化合物 3     | 4.503    | 88.3 | P10 |     |
|        | 化合物 31    | 8.593    | 90.7 |     |     |
|        | Dxd       | 11.930   | 94.6 | P11 |     |
|        | 化合物 17    | 7.429    | 87.6 |     |     |
| BxPC-3 | 化合物 3     | 2.809    | 98.0 | P1  | 4 天 |
|        | 化合物 7     | 11.36    | 94.4 |     |     |
|        | 化合物 3     | 3.531    | 96.6 | P2  |     |
|        | 化合物 12    | 2.148    | 98.5 |     |     |
|        | 化合物 3     | 4.197    | 94.7 | P3  |     |
|        | 化合物 14-P1 | 2.17E+19 | 38.8 |     |     |
|        | 化合物 27    | 1.524    | 97.7 |     |     |
|        | 化合物 3     | 2.39     | 93.1 | P4  |     |
|        | 化合物 14-P2 | 1.96E+32 | 43.3 |     |     |
|        | 化合物 3     | 3.234    | 97.7 | P5  |     |
|        | 化合物 15    | 79.640   | 87.9 |     |     |
|        | 化合物 3     | 5.950    | 93.9 | P6  |     |
|        | 化合物 18    | 1.451    | 99.6 |     |     |
|        | 化合物 26    | 1.111    | 99.1 |     |     |
|        | 化合物 3     | 3.004    | 99.3 | P7  |     |
|        | 化合物 20    | 0.683    | 99.2 |     |     |
|        | 化合物 3     | 5.815    | 93.7 | P8  |     |
|        | 化合物 31    | 4.423    | 93.7 |     |     |
|        | 化合物 3     | 3.234    | 97.7 | P9  |     |
|        | 化合物 15    | 79.640   | 87.9 |     |     |

|  |        |        |      |     |  |
|--|--------|--------|------|-----|--|
|  | 化合物 13 | 1.405  | 98.9 | P10 |  |
|  | Dxd    | 24.310 | 91.8 |     |  |
|  | 化合物 19 | 1.402  | 97.4 |     |  |
|  | 化合物 3  | 2.388  | 95.9 |     |  |
|  | 化合物 3  | 5.815  | 93.7 | P11 |  |
|  | 化合物 14 | 6.456  | 84.7 |     |  |
|  | 化合物 31 | 4.423  | 93.7 |     |  |

以下对具有不同含药连接子的抗体药物偶联物进行活性对比研究。

**实施例 5.2** 不同含药连接子情况下的靶向 Her2 ADC 的活性对比研究

将 Her2 高表达的细胞系 N87（购自：ATCC）从液氮中取出，复苏后用完全培养基  
5 将细胞密度调到  $5 \times 10^4$  个/ml 之后，100  $\mu$ l/孔加入细胞培养板中，过夜培养；使用 96 孔  
细胞培养板，对细胞板 A 排、H 排、1 列和 12 列以 200  $\mu$ l/孔加入无菌 PBS 或者无菌纯  
化水来包边。

使用完全培养基稀释上文制备的靶向 Her2 的 ADC 样品，依次稀释到 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。第 11 列应设阴性对照（细  
10 胞+培养基）和空白对照（无细胞，纯培养基），然后置于细胞培养箱中孵育 120h 或 168  
小时（详细见表）。取出细胞培养板，40  $\mu$ l/孔加入 MTS 后，37℃培养箱反应 2-4h；取出  
细胞板，在 490nm 处读取 OD 值。

结果见表 5。

表 5. 靶向 Her2 ADC 的体外细胞杀伤效果

| 板号                                       | 样品名称       | 抗体    | 含药连接子           | EC50<br>(ng/ml) | 细胞杀伤效果<br>最高百分比<br>(%) |
|------------------------------------------|------------|-------|-----------------|-----------------|------------------------|
| Plate1(120h)<br>(NCI-N87:<br>5000cell/孔) | Her2-ADC-7 | 曲妥珠单抗 | MC-GGFG-<br>Dxd | 50.32           | 80.8                   |
|                                          | Her2-ADC-5 | 曲妥珠单抗 | L-A             | 54.33           | 71.1                   |
|                                          | Her2-ADC-4 | 曲妥珠单抗 | L-C             | 43.21           | 72.8                   |
| Plate2(120h)<br>(NCI-N87:<br>5000cell/孔) | Her2-ADC-7 | 曲妥珠单抗 | MC-GGFG-<br>Dxd | 60.95           | 82.6                   |
|                                          | Her2-ADC-5 | 曲妥珠单抗 | L-A             | 61.98           | 72.0                   |

|  |            |       |        |       |      |
|--|------------|-------|--------|-------|------|
|  | Her2-ADC-1 | 曲妥珠单抗 | MWD-L1 | 37.64 | 87.5 |
|--|------------|-------|--------|-------|------|

上述结果表明，使用 MWD-L1 含药连接子的 ADC 药物的药效优于使用现有 MC-GGFG-Dxd、L-A 连接子的 ADC；而使用自制的桥连含药连接子 L-C 相较 MWD-L1 以及 MC-GGFG-Dxd 要差。

- 进一步地，参照上文所述，对使用 MWC-L2 含药连接子的 ADC 与使用 L-B、  
5 MC-GGFG-Dxd 的 ADC 做进一步比较。结果见表 6。

表 6. 靶向 Her2 ADC 的体外细胞杀伤效果

| 板号                                       | 样品名称       | 抗体    | 含药连接子       | EC50<br>(ng/ml) | 细胞杀伤效果最高百分比 (%) |
|------------------------------------------|------------|-------|-------------|-----------------|-----------------|
| Plate1(168h)<br>(NCI-N87:<br>5000cell/孔) | Her2-ADC-7 | 曲妥珠单抗 | MC-GGFG-Dxd | 80.98           | 90.7            |
|                                          | Her2-ADC-6 | 曲妥珠单抗 | L-B         | NA              | 71.1            |
|                                          | Her2-ADC-2 | 曲妥珠单抗 | MWC-L2      | 36.61           | 89.5            |

上述结果表明，MWC-L2 含药连接子相较已知含药连接子 L-B、MC-GGFG-Dxd 而言，同样具有一定的体外杀伤优势。

- 进一步地，参照上文所述，对 MWD-L1 含药连接子与 MWD-L8、MWD-L9 含药连  
10 接子进行比较。结果见表 7。

表 7. 靶向 Her2 ADC 的体外细胞杀伤效果

| 板号                                       | 样品名称       | 抗体    | 含药连接子  | EC50<br>(ng/ml) | 细胞杀伤效果最高百分比% |
|------------------------------------------|------------|-------|--------|-----------------|--------------|
| Plate1(168h)<br>(NCI-N87:<br>5000cell/孔) | Her2-ADC-8 | 曲妥珠单抗 | MWD-L8 | 97.05           | 94.9         |
|                                          | Her2-ADC-9 | 曲妥珠单抗 | MWD-L9 | 110.90          | 69.5         |
|                                          | Her2-ADC-1 | 曲妥珠单抗 | MWD-L1 | 52.31           | 84.9         |

上述结果表明，含有苯基取代的含药连接子 MWD-L1 的 ADC 相较含苯基无取代的含药连接子 MWD-L8 以及苯基三氟甲基取代的含药连接子 MWD-L9 的 ADC 而言，药效更为显著。

15

### 实施例 5.3 不同含药连接子情况下的靶向 Trop2 ADC 的活性对比研究

将 Trop2 高表达的细胞系 BxPC3（购自：ATCC）从液氮中取出，复苏后用完全培养基将细胞密度调到  $5 \times 10^4$  个/ml 之后，100  $\mu$ l/孔加入细胞培养板中，过夜培养；使用 96

孔细胞培养板，对细胞板 A 排、H 排、1 列和 12 列使用 200  $\mu$ l/孔加入无菌 PBS 或者无菌纯化水来包边。

使用完全培养基稀释上文制备的靶向 Trop2 的 ADC 样品，依次稀释到 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。第 11 列应设阴性对照（细胞+培养基）和空白对照（无细胞，纯培养基），然后置于细胞培养箱中孵育 120h。取出细胞培养板，40  $\mu$ l/孔加入 MTS 后，37℃培养箱反应 2-4h；取出细胞板，在 490nm 处读取 OD 值。

结果见表 8。

表 8. 靶向 Trop2 ADC 的体外细胞杀伤效果

| 板号                                          | 样品名称         | 抗体     | 含药连接子       | EC50<br>(ng/ml) | 细胞杀伤效果最高百分比 (%) |
|---------------------------------------------|--------------|--------|-------------|-----------------|-----------------|
| Plate1(120h)<br>)<br>(BXPC3:5<br>000cell/孔) | Trop2-ADC-1  | h23-12 | MWD-L1      | 40.90           | 76.9            |
|                                             | Trop2-ADC-2  | h23-12 | MWC-L2      | 41.51           | 77.9            |
|                                             | Trop2-ADC-6  | h23-12 | L-B         | 321.50          | 55.5            |
| Plate1(120h)<br>)<br>(BXPC3:5<br>000cell/孔) | Trop2-ADC-1  | h23-12 | MWD-L1      | 51.94           | 76.2            |
|                                             | Trop2-ADC-2  | h23-12 | MWC-L2      | 57.29           | 73.9            |
|                                             | Trop2-ADC-7  | h23-12 | L-A         | 247.70          | 56.2            |
| Plate1(120h)<br>)<br>(BXPC3:5<br>000cell/孔) | Trop2-ADC-4  | hTINA1 | MWD-L1      | 54.84           | 77.6            |
|                                             | Trop2-ADC-9  | hTINA1 | L-B         | 210.90          | 53.9            |
|                                             | Trop2-ADC-8  | hTINA1 | MC-GGFG-Dxd | 83.49           | 81.3            |
| Plate1(120h)<br>)<br>(BXPC3:5<br>000cell/孔) | Trop2-ADC-8  | hTINA1 | MC-GGFG-Dxd | 133.1           | 84.9            |
|                                             | Trop2-ADC-15 | h23-12 | MWF-L8      | 80.17           | 81.6            |
|                                             | Trop2-ADC-14 | h23-12 | MWF-L6      | 67.11           | 82.2            |
| Plate1(120h)<br>)<br>(BXPC3:5<br>000cell/孔) | Trop2-ADC-14 | h23-12 | MWF-L6      | 71.87           | 84.6            |
|                                             | Trop2-ADC-16 | h23-12 | L-J         | 53.2            | 79.9            |
|                                             | Trop2-ADC-17 | h23-12 | MWS-L7      | 45.7            | 83.2            |

|                                        |              |        |        |      |      |
|----------------------------------------|--------------|--------|--------|------|------|
| Plate1(120h)<br>(BXPC3:5<br>000cell/孔) | Trop2-ADC-14 | h23-12 | MWF-L6 | 73.4 | 85.2 |
|                                        | Trop2-ADC-18 | h23-12 | L-J    | 32.4 | 88.7 |
| Plate1(120h)<br>(BXPC3:5<br>000cell/孔) | Trop2-ADC-14 | h23-12 | MWF-L6 | 70.2 | 83.1 |
|                                        | Trop2-ADC-19 | h23-12 | L-I    | 30.4 | 88.9 |
|                                        | Trop2-ADC-20 | h23-12 | MWS-L6 | 34.5 | 86.3 |

上述结果表明, 使用 MWD-L1、MWC-L2 含药连接子制备的 ADC 药物药效相当, 且使用本发明含药连接子制备的 ADC 药物药效均优于使用现有 L-B、L-A 以及 MC-GGFG-Dxd 连接子的 ADC。

进一步地, 参照上文所述, 对 Trop2-ADC-1 与 Trop2-ADC-10 以及 Trop2-ADC-6 做进一步比较。结果见表 9。

表 9. 靶向 Trop2 ADC 的体外细胞杀伤效果

| 板号                                     | 样品名称         | 抗体     | 含药连接子  | EC50<br>(ng/ml) | 细胞杀伤效果<br>最高百分比% |
|----------------------------------------|--------------|--------|--------|-----------------|------------------|
| Plate1(120h)<br>(BXPC3:5<br>000cell/孔) | Trop2-ADC-1  | h23-12 | MWD-L1 | 72.61           | 79.4             |
|                                        | Trop2-ADC-10 | h23-12 | MWD-L7 | 95.83           | 75.8             |
|                                        | Trop2-ADC-6  | h23-12 | L-B    | 553.50          | 50.2             |

通过比较上述实施结果可知, 含有不同释药结构的含药连接子的 ADC 药物存在显著的活性差异, 其中使用 MWD-L1 时的药效最佳。

进一步地, 参照上文所述, Trop2-ADC-1 与 Trop2-ADC-9、Trop2-ADC-8 做进一步比较。结果见表 10。

表 10. 靶向 Trop2 的 ADC 体外细胞杀伤效果

| 板号                                     | 样品名称        | 抗体     | 含药连接子       | EC50<br>(ng/ml) | 细胞杀伤效果<br>最高百分比% |
|----------------------------------------|-------------|--------|-------------|-----------------|------------------|
| Plate1(120h)<br>(BXPC3:5000<br>cell/孔) | Trop2-ADC-1 | h23-12 | MWD-L1      | 43.67           | 93.3             |
|                                        | Trop2-ADC-9 | hTINA1 | L-B         | 126.50          | 80.9             |
|                                        | Trop2-ADC-8 | hTINA1 | MC-GGFG-Dxd | 90.58           | 92.0             |

上述结果表明, 本发明提供的新型 ADC 药物 Trop2-ADC-1, 相较于 Trop2-ADC-8、

Trop2-ADC-9 具有一定的活性优势。

**实施例 5.4** 不同 ADC 毒素对于低丰度肿瘤和肿瘤细胞附近低抗原表达细胞的体外药效研究

5 由于晚期肿瘤的异质性，肿瘤组织的抗原表达不一。低丰度肿瘤，以及肿瘤附近低表达细胞造成的旁观者效应往往影响到晚期肿瘤患者的预后，是药物评估的重要指标。因此对低丰度肿瘤，以及肿瘤细胞附近低表达细胞进行了分别评估。

(1) 不同 ADC 毒素对于低丰度肿瘤地的体外药效研究

10 细胞 HS-746T 购自 ATCC；细胞用含 10 % 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640/IMEM (1:1) 培养液培养，培养液中同时添加青、链霉素，于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 空气的培养箱中培养。

细胞接种后，细胞经 0.1μg/mL 和 1 μg/mL 的 Trop2-ADC-1、Trop2-ADC-2、Trop2-ADC-5、Trop2-ADC-10、Trop2-ADC-14 分别处理 168 小时后，收集细胞，计数；之后将细胞与 Dylight 488 NHS Ester 标记的上述 Trop2-ADC 在 4℃避光孵育 1 小时，离心去上清后以磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)重悬，用 PBS(pH7.4)洗三次，以流式细胞仪 BD ACCURI C6 PLUS 检测计算 Hs746t 细胞数。

表 11. 靶向 Trop2 的 ADC 对于低丰度肿瘤 HS-746T 体外细胞杀伤效果

| 化合物          | 给药浓度<br>(μg/mL) | 连接子      | 活性化合物类型 | 细胞数 (低<br>表达单细<br>胞) | 抑制率<br>(%) |
|--------------|-----------------|----------|---------|----------------------|------------|
| Vechicle     | NA              | NA       | NA      | 353700               | NA         |
| Trop2-ADC-1  | 0.1             | MWD-L1   | 伊莎替康类   | 189000               | 46.6       |
| Trop2-ADC-1  | 1               | MWD-L1   | 伊莎替康类   | 171000               | 51.7       |
| Trop2-ADC-2  | 0.1             | MWC-L2   | MWC-1   | 269100               | 23.9       |
| Trop2-ADC-2  | 1               | MWC-L2   | MWC-1   | 267300               | 24.4       |
| Trop2-ADC-5  | 0.1             | GGFG-DXD | 伊莎替康类   | 345600               | 2.3        |
| Trop2-ADC-5  | 1               | GGFG-DXD | 伊莎替康类   | 345600               | 2.3        |
| Trop2-ADC-10 | 0.1             | MWD-L7   | 伊莎替康类   | 347700               | 1.7        |
| Trop2-ADC-10 | 1               | MWD-L7   | 伊莎替康类   | 339600               | 4.0        |
| Trop2-ADC-14 | 0.1             | MWF-L6   | 化合物 3   | 210600               | 40.5       |
| Trop2-ADC-14 | 1               | MWF-L6   | 化合物 3   | 206100               | 41.7       |

通过上述研究可知,对于低丰度肿瘤细胞 HS-746T 而言。使用含药连接子 MWD-L1, MWC-L2 及 MWF-L6 的小分子均表现出一定的杀伤作用。GGFG-DXD、MWD-L7 这两种连接形式的 ADC 对低丰度肿瘤的杀伤作用几乎没有。此外,含有化合物 3 的含药连接子,相较 MWC-1 的小分子具有更好的杀伤作用。可能与化合物 3 本身更良好的细胞膜穿透性有关。

(2) 不同 ADC 毒素对于肿瘤细胞附近低抗原表达细胞的体外药效研究

KPL-4 细胞、MDA-MB-468 细胞购自 ATCC,细胞用含 10 % 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640/IMEM (1: 1) 培养液培养,培养液中同时添加青、链霉素,于 37℃、含 5% CO2 空气的培养箱中培养。

HER2 阳性的 KPL-4 细胞和 HER2 阴性的 MDA-MB-468 细胞共同接种,或 HER2 阴性的 MDA-MB-468 细胞单独接种,经药物处理 168 小时后,收集细胞,将细胞与 Dylight 488 NHS Ester 标记的抗 HER2 抗体在 4℃避光孵育 1 小时,离心去上清后以 PBS(pH 7.4)重悬,用 PBS 洗三次,以流式细胞仪 BD ACCURI C6 PLUS 检测计算 KPL-4 和 MDA-MB-468 细胞比例,并计算各自细胞数。

表 12. 靶向 HER2 的 ADC 在 HER2 阳性的 KPL-4 细胞和 HER2 阴性的 MDA-MB-468 的旁观者效应研究

| 化合物         | 给药浓度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 连接子      | 细胞数      | HER2+ 高表达 |            | HER2 阴性 |            |
|-------------|------------------------------|----------|----------|-----------|------------|---------|------------|
|             |                              |          |          | 细胞数       | 抑制率<br>(%) | 细胞数     | 抑制率<br>(%) |
| Vehicle     | NA                           | NA       | 1.77E+06 | 1309761   | 0          | 459035  | Vehicle    |
| Her2-ADC-7  | 0.1                          | GGFG-DXD | 8.73E+05 | 537626    | 59         | 334170  | 27         |
| Her2-ADC-2  | 0.1                          | MWC-L2   | 4.61E+05 | 239732    | 82         | 220064  | 52         |
| Her2-ADC-10 | 0.1                          | MWF-L6   | 3.04E+05 | 117335    | 91         | 185460  | 60         |
| Her2-ADC-13 | 0.1                          | L-B      | 9.04E+05 | 566466    | 57         | 336329  | 27         |
| Her2-ADC-7  | 1                            | GGFG-DXD | 2.04E+05 | 58643     | 96         | 144152  | 69         |
| Her2-ADC-2  | 1                            | MWC-L2   | 1.16E+05 | 43408     | 97         | 71387   | 84         |
| Her2-ADC-10 | 1                            | MWF-L6   | 1.10E+05 | 56423     | 96         | 52373   | 89         |
| Her2-ADC-13 | 1                            | L-B      | 3.82E+05 | 116920    | 91         | 263875  | 43         |

通过上述研究可知,在高浓度组 (1 $\mu\text{g/mL}$ ) 的条件下,各 ADC 组对阴性细胞均具有较好的肿瘤抑制作用。然而,各浓度组阳性细胞数与阴性细胞数的比对可知。MWF-L6 及 MWC-L2 旁观者杀伤作用优于对照组 GGFG-DXD 以及 L-B。

**实施例 5.5** 不同含药连接子体内杀伤作用研究

使用人胰腺癌 BxPc-3 细胞，其购自中国科学院细胞库。BxPc-3 细胞用 10-cm 培养皿贴壁培养，培养条件为 RPMI 1640 培养液中加 10%胎牛血清以及青、链霉素，于 37℃，含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。一周 2-3 次传代，当细胞呈指数生长期时，胰酶消化、收集细胞，计数，接种。

使用不同含药连接子的抗体药物偶联物 Trop2-ADC-1、Trop2-ADC-2、Trop2-ADC-3、Trop2-ADC-5 进行不同剂量组条件下分组比较研究（表 13）。分别对小鼠静脉注射(IV)给药，给药体积 10 mL/kg；溶剂组给予相同体积的溶剂（生理盐水）；具体给药剂量和给药方案见表 13。每周测 2 次肿瘤体积，称小鼠体重，记录数据。

实验结束、达到实验终点或肿瘤体积达到 2000mm<sup>3</sup>，CO<sub>2</sub> 麻醉处死动物，随后解剖取瘤并拍照。结果见表 13 和图 2。

表 13. Trop2-ADC-1、Trop2-ADC-2、Trop2-ADC-3、Trop2-ADC-5 对人胰腺癌 BxPc-3 裸小鼠皮下移植瘤的疗效(根据肿瘤体积计算 TGI%)。

| 分组                      | 含药连接子    | TV(D0)<br>SEM | TV(D21)<br>SEM | T/C(%) | TGI% | P 值   | PR | 动物<br>数<br>(D0) | 动物<br>数<br>(D21) |
|-------------------------|----------|---------------|----------------|--------|------|-------|----|-----------------|------------------|
| 溶剂                      |          | 123.3±1.4     | 2107.7±177.7   | -      | -    | -     | 0  | 10              | 10               |
| Trop2-ADC-1<br>3 mg/kg  | MWD-L1   | 124±2.1       | 1006.7±208.9   | 44     | 56   | 0.002 | 0  | 6               | 6                |
| Trop2-ADC-1<br>10 mg/kg | MWD-L1   | 120.9±1.5     | 197.8±33.6     | 4      | 96   | 0.000 | 1  | 6               | 6                |
| Trop2-ADC-2<br>3 mg/kg  | MWC-L2   | 124.9±2.1     | 141.6±15.9     | 1      | 99   | 0.000 | 3  | 6               | 6                |
| Trop2-ADC-2<br>10 mg/kg | MWC-L2   | 121±1.7       | 106.6±7.1      | -12    | 112  | 0.000 | 5  | 6               | 6                |
| Trop2-ADC-3<br>3 mg/kg  | MWC-L3   | 124.4±2.3     | 244±74.5       | 6      | 94   | 0.000 | 3  | 6               | 6                |
| Trop2-ADC-3<br>10 mg/kg | MWC-L3   | 123.5±2.8     | 107.6±6.7      | -13    | 113  | 0.000 | 5  | 6               | 6                |
| Trop2-ADC-5             | GGFG-Dxd | 123±2.1       | 1301±130.2     | 59     | 41   | 0.007 | 0  | 6               | 6                |

|                         |          |           |             |    |    |       |   |   |   |
|-------------------------|----------|-----------|-------------|----|----|-------|---|---|---|
| 3 mg/kg                 |          |           |             |    |    |       |   |   |   |
| Trop2-ADC-5<br>10 mg/kg | GGFG-Dxd | 123.9±1.4 | 751.2±228.4 | 32 | 68 | 0.000 | 0 | 6 | 6 |

上述结果表明，定点含药连接子 MWD-L1、MWC-L2 及 MWC-L3 体内活性均优于对照分子 GGFG-DXD。与此同时，尽管 MWC-L2 与 MWC-L3 分别采用了 VA 的二肽结构以及 GGFG 的四肽释放结构，但体内药效处于一个相当的水平。

5

**实施例 5.6 靶向 TROP2 的抗体药物偶联物体内药效研究**

使用人膀胱癌 HT1376 细胞，其购自中国科学院细胞库。HT1376 细胞用 10-cm 培养皿贴壁培养，培养条件为 RPMI 1640 培养液中加 10%胎牛血清以及青、链霉素，于 37℃，含 5% CO2 培养箱中培养。一周 2-3 次传代，当细胞呈指数生长期时，胰酶消化、收集

10

细胞，计数，接种。

本实施例以抗体药物偶联物 Trop2-ADC-14 为例，在不同剂量组条件下对 Trop2-ADC-14 进行分组比较研究（表 14）。分别对小鼠静脉注射(IV)给药，给药体积 10 mL/kg；溶剂组给予相同体积的溶剂（生理盐水）；具体给药剂量和给药方案见表 14。每周测 2 次肿瘤体积，称小鼠体重，记录数据。

15

实验结束、达到实验终点或肿瘤体积达到 2000mm<sup>3</sup>，CO<sub>2</sub> 麻醉处死动物，随后解剖取瘤并拍照。结果见表 14 和图 3，示出了各组小鼠肿瘤体积的生长变化情况。

表 14. Trop2-ADC-14 对人膀胱癌 HT1376 裸小鼠皮下移植瘤的疗效（根据肿瘤体积计算 TGI%）。

| 分组                   | 平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> ) |   |      | 平均肿瘤体 (mm <sup>3</sup> ) |   |       | TGI (%) | P 值    |
|----------------------|---------------------------|---|------|--------------------------|---|-------|---------|--------|
|                      | D0                        |   | SEM  | D21                      |   | SEM   | D21     | D21    |
| 生理盐水 (saline)        | 124.97                    | ± | 0.61 | 1053.31                  | ± | 111.3 | —       | —      |
| Trop2-ADC-14 1mg/kg  | 126.07                    | ± | 1.35 | 601.9                    | ± | 54.1  | 49      | 0.003  |
| Trop2-ADC-14 3mg/kg  | 125.82                    | ± | 2.55 | 130.38                   | ± | 37.7  | 100     | <0.001 |
| Trop2-ADC-14 10mg/kg | 124.94                    | ± | 2.02 | 82.6                     | ± | 3.2   | 134     | <0.001 |
| DS-1062a 3mg/kg      | 123.51                    | ± | 1.81 | 609.3                    | ± | 65.8  | 48      | 0.004  |
| Trodelvy™ 3mg/kg     | 123.7                     | ± | 1.44 | 735.3                    | ± | 91.3  | 34      | 0.045  |

注：P 值为与溶剂组相比；DS-1062a 可商购，也可参照专利公布文件 CN105849126A 制

20

备

上述结果表明，在 HT1376 人膀胱癌移植瘤模型中，与溶剂组相比，Trop2-ADC-14 具有显著肿瘤抑制活性；另一方面，同剂量下，Trop2-ADC-14 对肿瘤抑制活性显著优于 DS-1062 及 Trodelvy。

5        **实施例 5.7** 靶向 TROP2 的抗体药物偶联物体内药效研究

使用肺癌细胞 Calu-3，其购自中国科学院细胞库。Calu-3 细胞用 10-cm 培养皿贴壁培养，培养条件为 RPMI 1640 培养液中加 10%胎牛血清以及青、链霉素，于 37℃，含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。一周 2-3 次传代，当细胞呈指数生长期时，胰酶消化、收集细胞，计数，接种。

10        本实施例以抗体药物偶联物 Trop2-ADC-14 为例，在不同剂量组条件下对 Trop2-ADC-14 进行分组比较研究（表 15）。分别对小鼠静脉注射(IV)给药，给药体积 10 mL/kg；溶剂组给予相同体积的溶剂（生理盐水）；具体给药剂量和给药方案见表 15。每周测 2 次肿瘤体积，称小鼠体重，记录数据。

实验结束、达到实验终点或肿瘤体积达到 2000mm<sup>3</sup>，CO<sub>2</sub> 麻醉处死动物，随后解剖  
15        取瘤并拍照。结果见表 15 和图 4，示出了各组小鼠肿瘤体积的生长变化情况。

表 15. Trop2-ADC-14 对人肺癌 Calu-3 裸小鼠皮下移植瘤的疗效(根据肿瘤体积计算 TGI%)。

| 分组                   | 平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> ) |   |     | 平均肿瘤体 (mm <sup>3</sup> ) |   |      | TGI (%) | P 值    |
|----------------------|---------------------------|---|-----|--------------------------|---|------|---------|--------|
|                      | D0                        |   | SEM | D21                      |   | SEM  | D21     | D21    |
| 生理盐水 (saline)        | 121.7                     | ± | 1.0 | 1316.6                   | ± | 94.5 | —       | —      |
| Trop2-ADC-14 1mg/kg  | 119.6                     | ± | 1.3 | 268.6                    | ± | 94.0 | 88      | <0.001 |
| Trop2-ADC-14 3mg/kg  | 121.1                     | ± | 1.0 | 105.4                    | ± | 5.2  | 113     | <0.001 |
| Trop2-ADC-14 10mg/kg | 121.6                     | ± | 1.4 | 96.7                     | ± | 1.8  | 120     | <0.001 |
| DS-1062a 3mg/kg      | 121.2                     | ± | 0.9 | 751.7                    | ± | 52.2 | 99      | <0.001 |
| Trodelvy™ 3mg/kg     | 120.2                     | ± | 1.3 | 136.6                    | ± | 17.2 | 47      | <0.001 |

注：P 值为与溶剂组相比

上述结果表明，在 Calu-3 人肺癌移植瘤模型中，与溶剂组相比，Trop2-ADC-14 具有  
20        显著肿瘤抑制活性；与此同时，同剂量下，Trop2-ADC-14 对肿瘤抑制活性优于 DS-1062 及 Trodelvy™。

**实施例 5.8** 靶向 TROP2 的抗体药物偶联物旁观者效应的研究

TROP2 阳性的 BxPC-3 细胞(购自 ATCC)和 TROP2 阴性的 HT-29 细胞(购自 ATCC)共同接种或 TROP2 阴性的 HT-29 细胞单独接种于 6 孔板中。经 Trop2-ADC-14 (10、30、100 ng/mL) 或者 DS-1062a (100、300 ng/mL) 处理 144 小时后, 收集细胞, 计数。之后将细胞与 Dylight 488 NHS Ester 标记的 Trop2-ADC-14 在冰上避光孵育 1 小时, 离心去上清后以 PBS 重悬, 用 PBS 洗三次, 以流式细胞仪 BD ACCURI C6 PLUS 检测计算 BxPC-3 和 HT-29 细胞比例, 并计算各自细胞数。结果见图 5。

通过上述研究可知, Trop2-ADC-14 具有很强的旁观者效应, 在杀伤 TROP2 阳性细胞的同时, 杀伤 TROP2 阴性细胞; Trop2-ADC-14 在 30 ng/mL 时旁观者杀伤效应与参比药物 DS-1062a 在 300 ng/mL 时效果相当 (图 5 中的 5A), 结果提示 Trop2-ADC-14 旁观者效应整体上强于参比药物 DS-1062。Trop2-ADC-14、DS-1062a 均对单独培养、TROP2 阴性的 HT-29 细胞增殖没有明显影响 (图 5 中的 5B)。

**实施例 5.9** 靶向 TROP2 的抗体药物偶联物及喜树碱类化合物对不同肿瘤细胞增值抑制的研究

贴壁生长细胞应用 SRB 法检测抗体药物偶联物或喜树碱类化合物对体外培养肿瘤细胞增殖的影响。接种一定数量的对数生长期细胞于 96 孔培养板, 贴壁生长过夜后, 加入不同浓度的抗体、抗体药物偶联物或喜树碱类化合物。144 小时后, 用三氯乙酸固定。用 SRB (以 1%冰醋酸配制, 浓度为 4 mg/mL) 溶液染色后, 每孔加入 10 mM Tris 溶液溶解。用酶标仪在 510 nm 波长下读 OD 值。

抑制率 (%) = (OD 值对照孔 - OD 值给药孔) / OD 值对照孔 × 100%

悬浮生长细胞应用 MTT 法检测抗体药物偶联物或喜树碱类化合物对体外培养肿瘤细胞增殖的影响。接种一定数量的对数生长期细胞于 96 孔培养板, 贴壁生长过夜后, 加入不同浓度的抗体药物偶联物或喜树碱类化合物。144 小时后, 每孔加入 MTT, 继续于 37℃ 5% CO2 饱和湿度培养箱中培养 4 小时。每孔加入 100 μL 三联液, 酶标仪上 570 nm 和 690nm 波长下测定 OD 值。

根据各浓度抑制率, 以 Graphpad Prism 8.0 软件计算半数抑制浓度 IC50。实验单独重复 1 次, 数据表示为均值 ± SD。结果见表 16。

表 16. 靶向 TROP2 的 ADC 及喜树碱类化合物对不同肿瘤细胞增值抑制结果

|     |      | IC50 (nM)    |          |            |           |          |            |        |
|-----|------|--------------|----------|------------|-----------|----------|------------|--------|
| 细胞株 | 病理类型 | Trop2-ADC-14 |          |            | 化合物 3     |          |            | h23-12 |
|     |      | 第一次<br>试验    | 第二<br>次试 | 均数<br>± SD | 第一次<br>试验 | 第二<br>次试 | 均数<br>± SD |        |

|                  |            |       | 验     |             |     | 验   |             |       |
|------------------|------------|-------|-------|-------------|-----|-----|-------------|-------|
| MDA-MB-231/TROP2 | 三阴性乳腺癌     | 0.05  | 0.11  | 0.08 ± 0.05 | 0.1 | 0.1 | 0.06 ± 0.01 | >67.3 |
| BxPC-3           | 胰腺癌        | 0.09  | 0.10  | 0.09 ± 0.01 | 0.2 | 0.2 | 0.17 ± 0.01 | >67.3 |
| HT1376           | 膀胱癌        | 0.24  | 0.20  | 0.22 ± 0.03 | 1.0 | 0.9 | 0.98 ± 0.08 | >67.3 |
| NCI-N87          | 胃癌         | 0.40  | 0.54  | 0.47 ± 0.10 | 0.4 | 0.5 | 0.47 ± 0.07 | >67.3 |
| Calu-3           | 肺癌         | 3.20  | 3.50  | 3.35 ± 0.21 | 0.4 | 0.4 | 0.40 ± 0.02 | >67.3 |
| MDA-MB-468       | 三阴性乳腺癌     | 7.26  | 5.13  | 6.20 ± 1.51 | 0.2 | 0.2 | 0.16 ± 0.01 | >67.3 |
| MCF-7            | ER 阳性乳腺癌   | >65.4 | >65.4 | >65.4       | 0.2 | 0.1 | 0.11 ± 0.08 | >67.3 |
| Colo 205         | 结肠癌        | >65.4 | >65.4 | >65.4       | 0.2 | 0.2 | 0.21 ± 0.05 | >67.3 |
| BT-20            | 三阴性乳腺癌     | >65.4 | >65.4 | >65.4       | 0.5 | 0.5 | 0.53 ± 0.01 | >67.3 |
| BT-474           | HER2 阳性乳腺癌 | >65.4 | >65.4 | >65.4       | 2.3 | 0.5 | 1.43 ± 1.25 | >67.3 |
| MDA-MB-231       | 三阴性乳腺癌     | >65.4 | >65.4 | >65.4       | 0.8 | 0.8 | 0.69 ± 0.15 | >67.3 |
| HT-29            | 结肠癌        | >65.4 | >65.4 | >65.4       | 0.4 | 0.4 | 0.40 ± 0.01 | >67.3 |

#### 实施例 5.10 靶向 TROP2 的抗体药物偶联物内吞功能的研究

将 BxPC-3 细胞（购自：ATCC）接种于 6 孔板中，分别加入荧光标记的 1 μg/mL Trop2-ADC-14、Trop2-ADC-14 mAb（即抗体 h23-12），于 37°C 分别孵育 3、6、12、18、24 和 48 小时。胰酶消化，洗去未内吞药物，然后用流式细胞仪（BD ACCURI C6 PLUS）检测荧光强度。实验单独重复 1 次。结果见图 6。

通过上述研究可知，荧光标记的 Trop2-ADC-14、h23-12 与 TROP2 阳性细胞 BxPC-3 温育后，被细胞内吞；内吞具有时间依赖性，随着时间延长内吞药物逐渐增加；Trop2-ADC-14 在 24 小时时的内吞药物大于抗体 h23-12。

**实施例 5.11** 靶向 TROP2 的抗体药物偶联物及喜树碱类化合物诱导细胞凋亡的研究

BxPC-3 细胞（购自 ATCC）接种于 6 孔板中，经 Trop2-ADC-14 (0.020、0.196、1.963 nM)、DS-1062 (0.020、0.196、1.963 nM)、Trop2-ADC-14 mAb（即抗体 h23-12）(6.728 nM) 和化合物 3 (0.1、1、10 nM) 处理 120 小时后，收集细胞，加入 Annexin-V-FITC 和 PI，室温避光染色 15 分钟，最后加入 300  $\mu$ l 1x 结合缓冲液重悬，用流式细胞仪（BD AccuriTMC6 Plus flow cytometer）检测凋亡，每组样品门中为  $1 \times 10^4$  个细胞。实验数据用 BD CSamplerTMPlus C6 Plus 软件分析。结果见图 7。

通过上述研究可知，Trop2-ADC-14 0.196 nM 即明显诱导细胞凋亡标志性蛋白 pro-PARP 降解，诱导 pro-caspase 3 水解成活性蛋白 caspase 3 (cleaved-caspase 3)，细胞凋亡诱导作用具有浓度依赖性；Trop2-ADC-14 细胞凋亡诱导作用明显强于相同浓度的 DS-1062a，后者在 0.196 nM 时凋亡诱导作用并不明显；小分子毒素化合物 3 同样浓度依赖地诱导 BxPC-3 细胞凋亡；抗体 h23-12 对 BxPC-3 细胞没有明显的凋亡作用。

**实施例 5.12** 靶向 TROP2 的抗体药物偶联物与 TROP2 阳性细胞结合活性的研究

不同浓度 (1、3、10、30、100、300、1000、3000、10000、30000、100000 ng/mL) 荧光标记的 Trop2-ADC-14、Trop2-ADC-14 mAb（即抗体 h23-12）与 BxPC-3 细胞（购自 ATCC）冰上避光孵育 1 小时，离心去上清后以 PBS 清洗、重悬，以流式细胞仪 (BD ACCURI C6 PLUS) 检测与细胞结合的药物荧光强度。实验单独重复 1 次。结果见表 17 和图 8。

表 17. Trop2-ADC-14、h23-12 与 BxPC-3 细胞结合 EC50 (均数  $\pm$  SD, n=2)

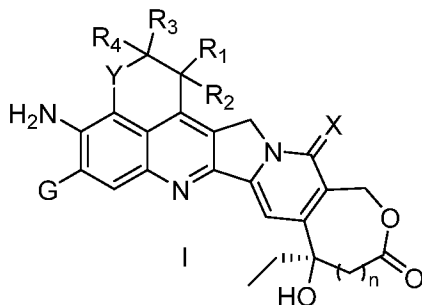
| 药物           | EC50 (ng/mL, mean $\pm$ SD) |
|--------------|-----------------------------|
| Trop2-ADC-14 | 1296.0 $\pm$ 155.6          |
| 抗体 h23-12    | 1137.5 $\pm$ 128.0          |

通过上述研究可知，Trop2-ADC-14、抗体 h23-12 均浓度依赖地与 TROP2 阳性肿瘤细胞 BxPC-3 结合，结合 EC50 分别为 1296.0  $\pm$  155.6 ng/mL、1137.5  $\pm$  128.0 ng/mL，提示二者与 TROP2 阳性细胞结合能力相当；作为对照，Trop2-ADC-14、抗体 h23-12 与 TROP2 阴性细胞 HT-29 均没有明显结合。结果提示，Trop2-ADC-14、抗体 h23-12 与肿瘤细胞结合依赖于 TROP2 的表达水平。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求的范围。

## 权 利 要 求

1. 结构式 I 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：



结构式 I

结构式 I 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；

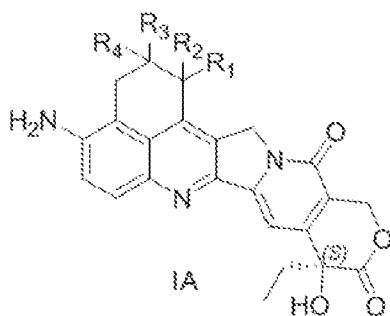
G 为氢、卤素、甲基或甲氧基；

Y 为氧、硫、砷、亚砷、亚甲基或取代亚甲基；

X 为氧或硫；

$n=0$  或 1。

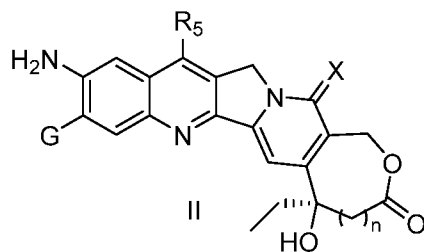
2. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，其特征在于，所述化合物为结构式 IA 所示的化合物：



结构式 IA

结构式 IA 中， $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  不同时为氢。

3. 结构式 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：



结构式 II

结构式 II 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;

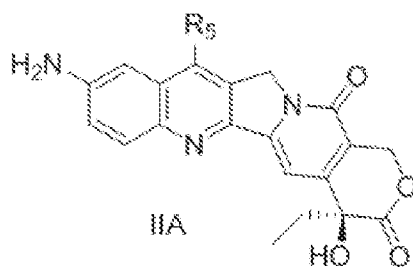
5 G 为氢、卤素、甲基或甲氧基;

X 为氧或硫;

$n=0$  或 1;

当 X 为氧、G 为氢、 $n=0$  时,  $R_5$  不可为正丁基。

10 4. 根据权利要求 3 所述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, 其特征在于, 所述化合物为结构式 IIA 所示的化合物:

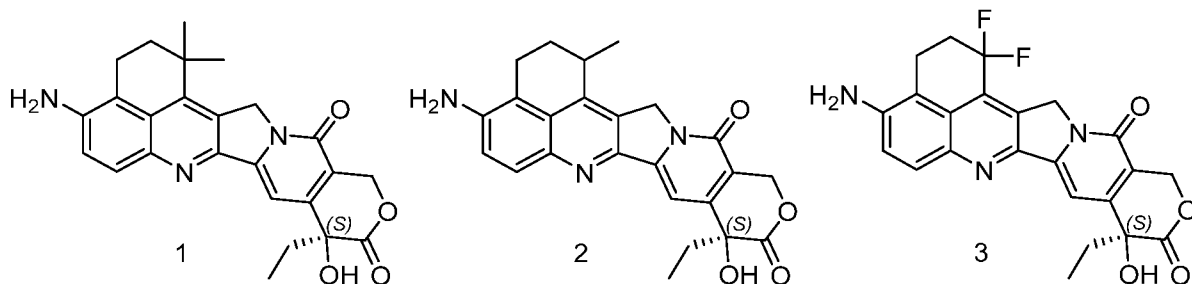


结构式 IIA

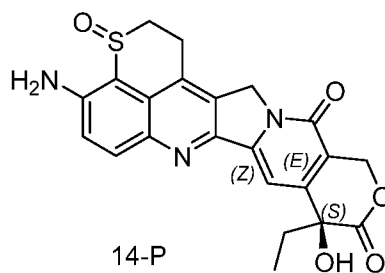
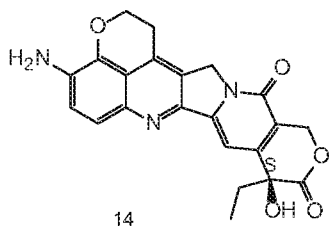
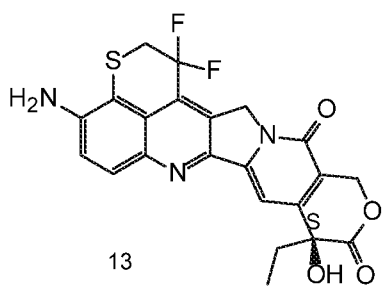
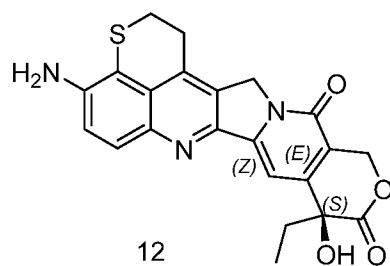
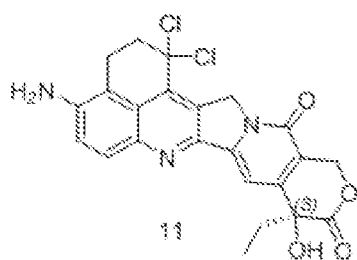
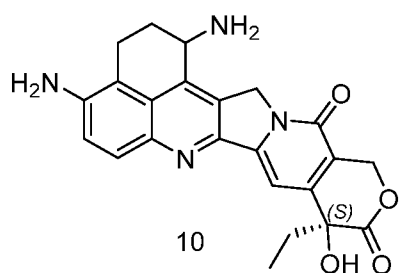
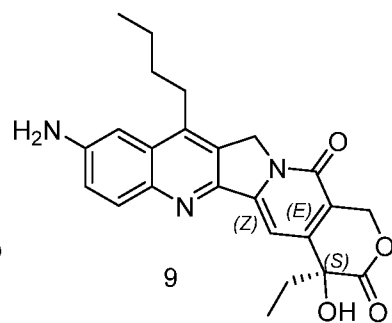
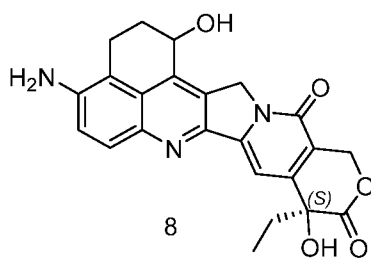
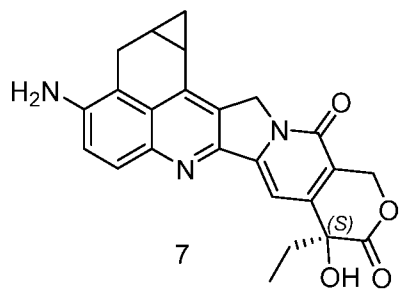
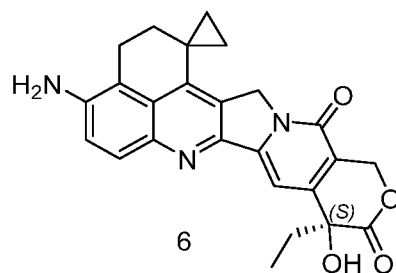
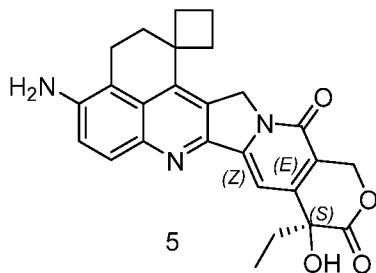
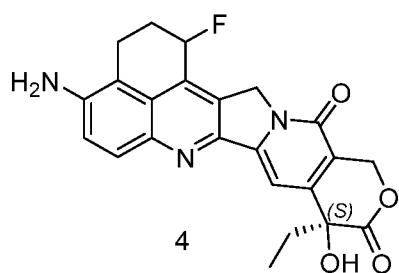
结构式 IIA 中,  $R_5$  不可为正丁基。

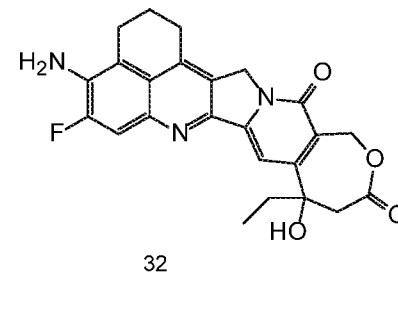
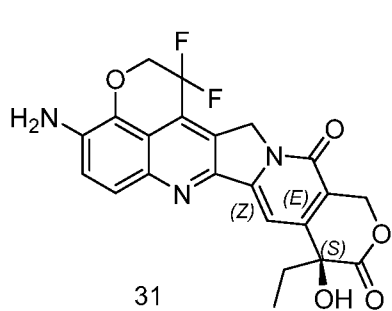
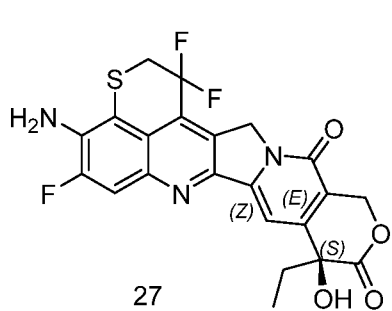
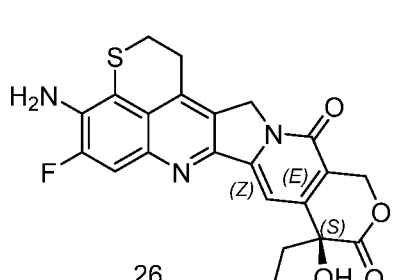
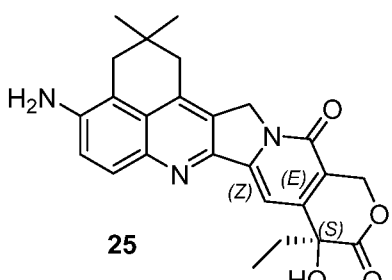
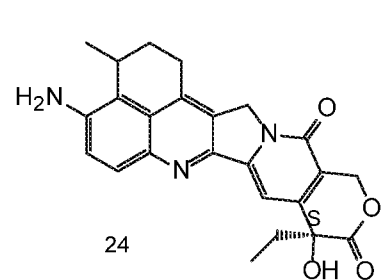
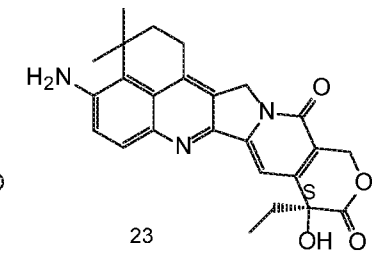
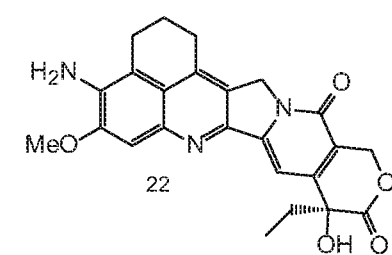
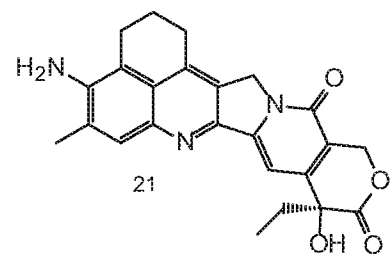
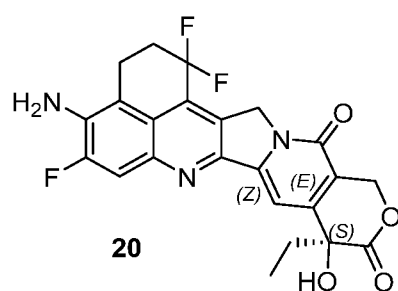
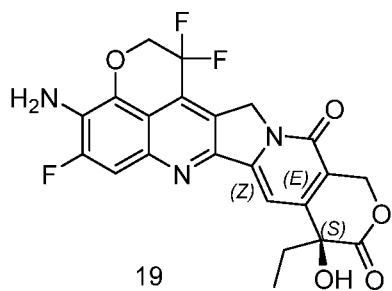
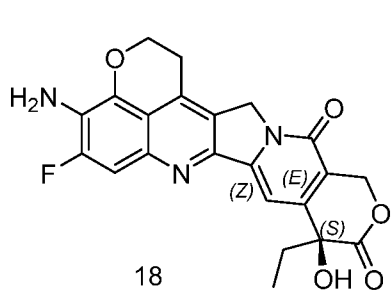
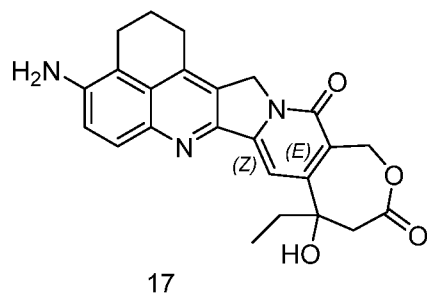
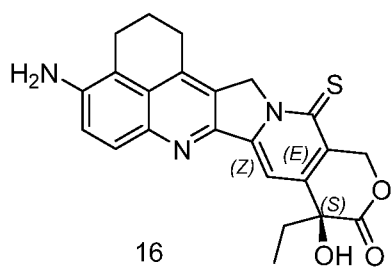
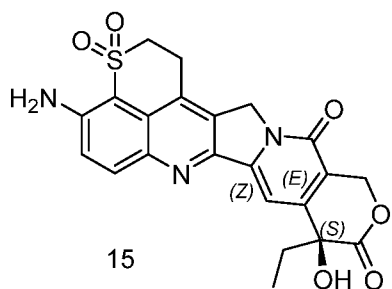
15

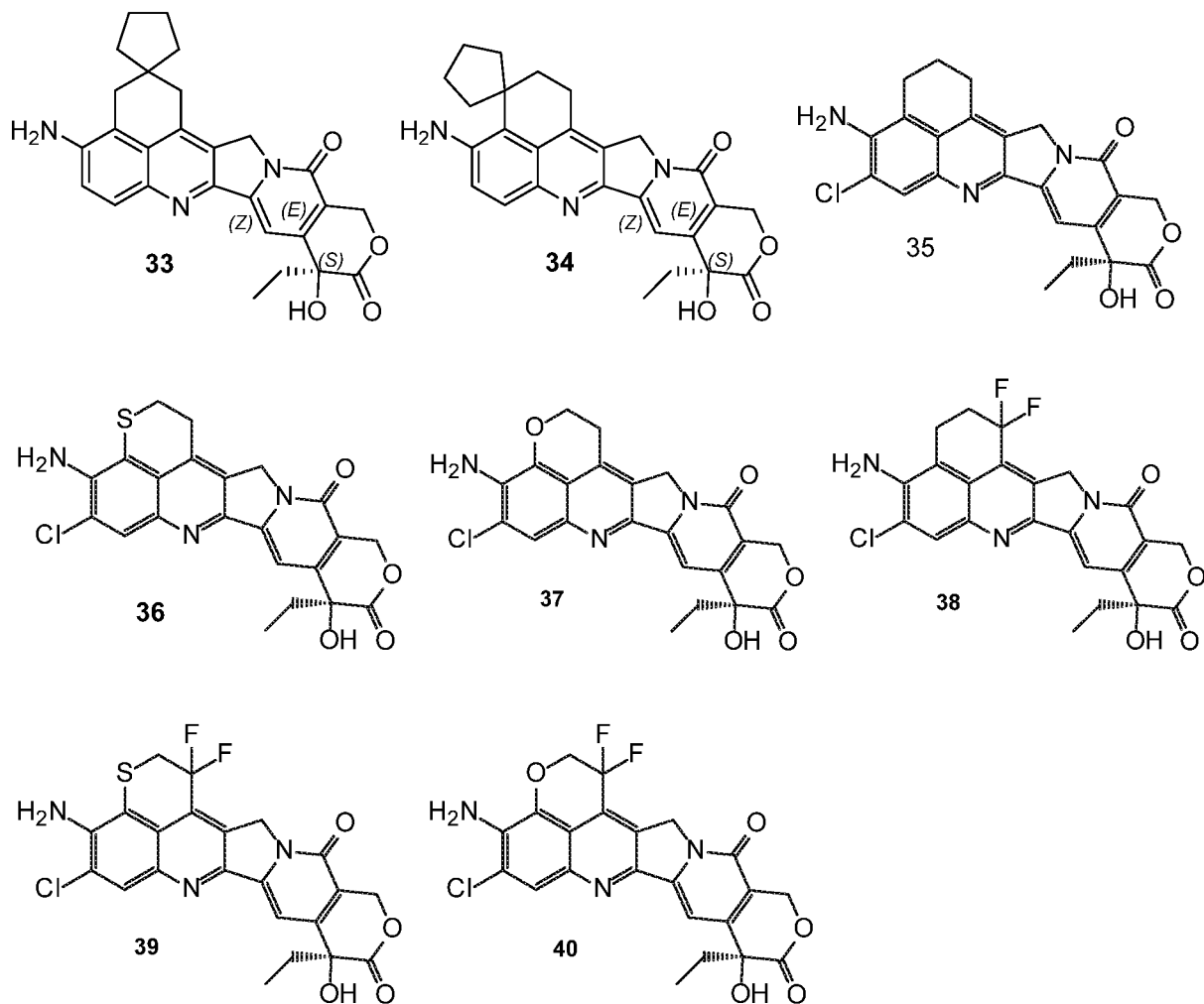
5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药, 其特征在于, 所述化合物具有如下结构:



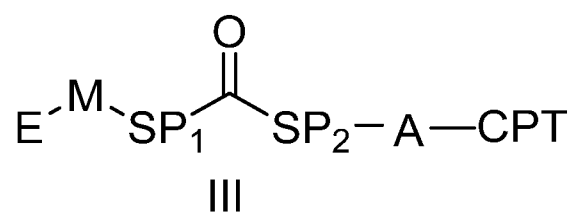
20





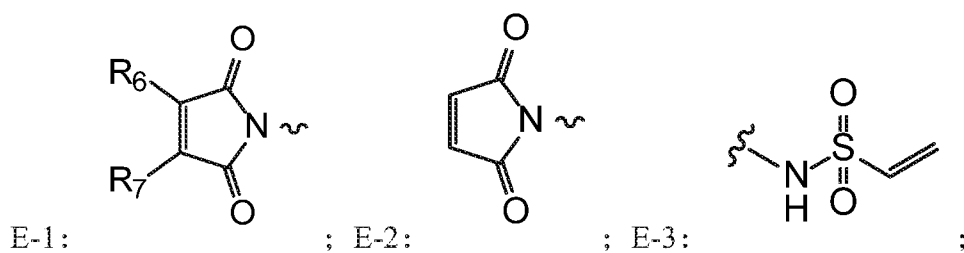


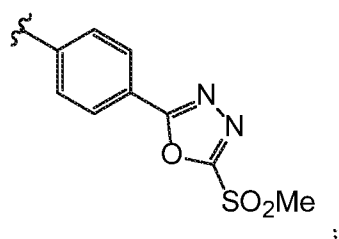
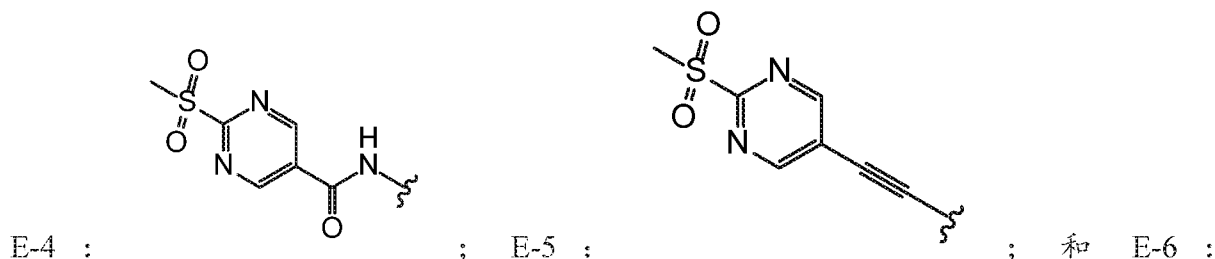
5 6. 结构式 III 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药:



结构式 III

结构式 III 中, E 选自如下基团, 其中, 表示与 M 的连接位点:





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、卤代烷基、烷氧基、卤素、酯基、酰胺基和氰基；优选地，M 为卤素取代的亚苯基；

SP<sub>1</sub> 选自 C1-8 亚烷基、C1-8 亚环烷基或 C1-21 直链亚杂烷基，所述 C1-21 直链亚杂烷基包含 1-11 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、氨基、磺酸基和氰基的一个或多个取代基取代；

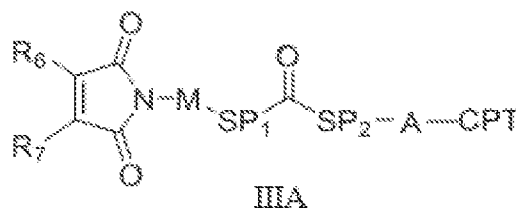
SP<sub>2</sub> 选自 -NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-、-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>CH<sub>2</sub>CO-、-S(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>CO- 或化学键，其中 a 为 1-20 的整数，优选 1-10 的整数，更优选 1-6 的整数；

A 表示 2-4 个氨基酸；

A 表示 2-4 个氨基酸；

CPT 为喜树碱类化合物。

7. 根据权利要求 6 所述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，其特征在于，所述化合物为结构式 IIIA 所示的化合物：



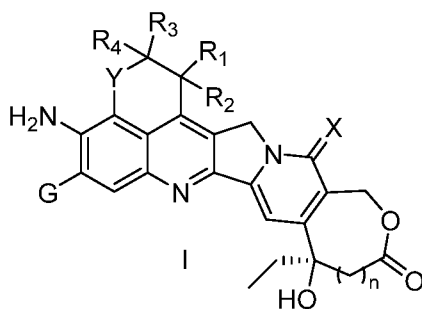
结构式 IIIA

结构式 IIIA 中，R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub> 独立地为氢、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、烷氧基、卤素、酯基、酰胺基

和氟基；

优选地，Ar'为苯基、4-甲基甲酰基取代苯基或4-甲酰基吗啉取代苯基。

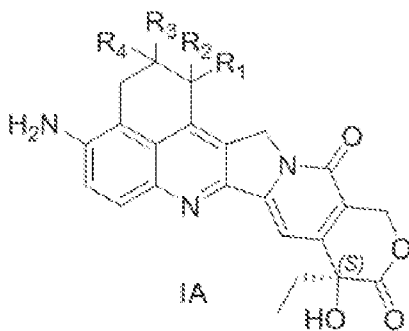
8. 根据权利要求6或7所述的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药，其特征在于，结构式III或结构式IIIA中，CPT为结构式I所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药：



结构式 I

- 结构式I中，基团G、X、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、n与权利要求1中基团G、X、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、n的定义相同；

优选地，CPT为结构式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：

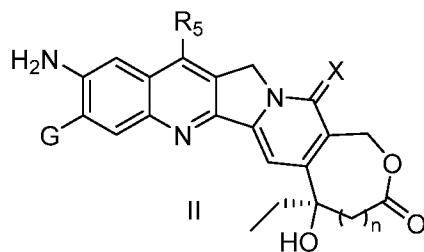


结构式 IA

- 结构式IA中，基团R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>与权利要求2中基团R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>的定义相同，但是R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>可以同时为氢；

在结构式III或结构式IIIA中，结构式I或结构式IA所示的化合物经由其氨基与A的羧基通过酰胺键相连。

9. 根据权利要求6或7所述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，其特征在于，结构式III或结构式IIIA中，CPT为结构式II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：

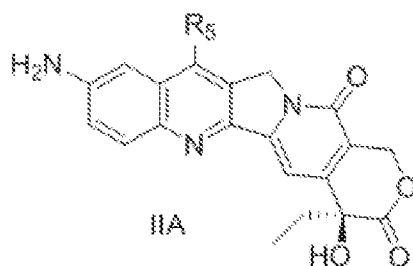


结构式 II

结构式 II 中, 基团 G、R<sub>5</sub>、X、n 与权利要求 3 中基团 G、R<sub>5</sub>、X、n 的定义相同;

优选地, CPT 为结构式 IIA 所示的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂

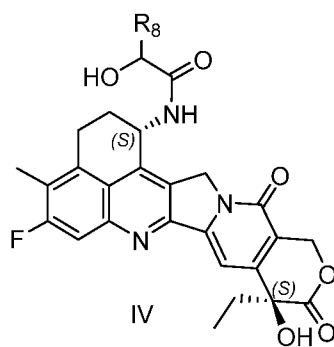
5 化物或前药:



结构式 IIA

结构式 IIA 中, 基团 R<sub>5</sub> 与权利要求 4 中 R<sub>5</sub> 基团的定义相同, 但是可以为正丁基。

10 10. 根据权利要求 6 或 7 所述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, 其特征在于, 结构式 III 或结构式 IIIA 中, CPT 为结构式 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:

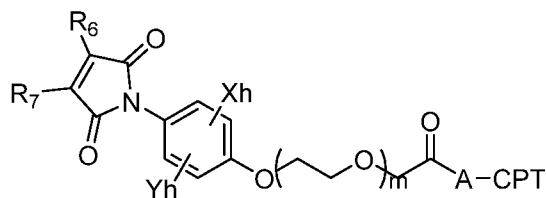


结构式 IV

15 结构式 IV 中, R<sub>8</sub> 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;

在结构式 III 或结构式 IIIA 中, 结构式 IV 所示的化合物经由其与 R<sub>8</sub> 连接于同一个碳的羟基与 A 的羧基通过自释放结构相连。

11. 根据权利要求6至10中任一项所述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,其特征在于,结构式III或结构式IIIA所示的化合物进一步为结构式V所示的化合物:

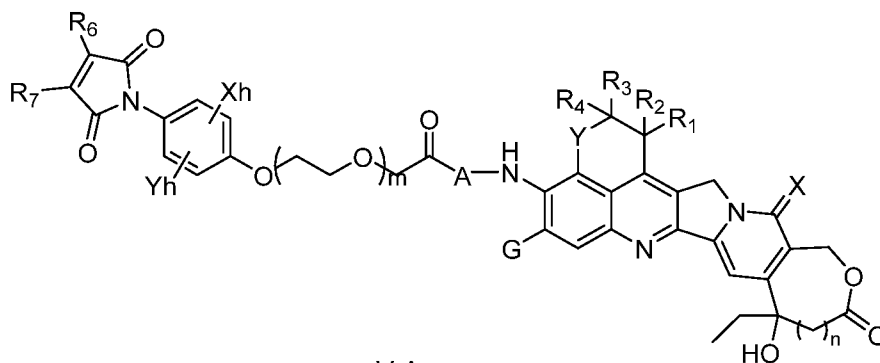


V

结构式 V

结构式 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;  
 $Xh$  和  $Yh$  独立地为氢、卤素、卤代烷基或烷氧基。

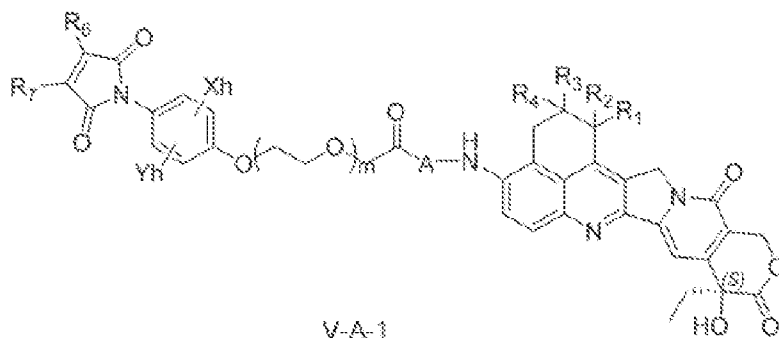
12. 根据权利要求11所述的化合物或其药学可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药,其特征在于,结构式V所示的化合物进一步为结构式V-A所示的化合物:



V-A

结构式 V-A;

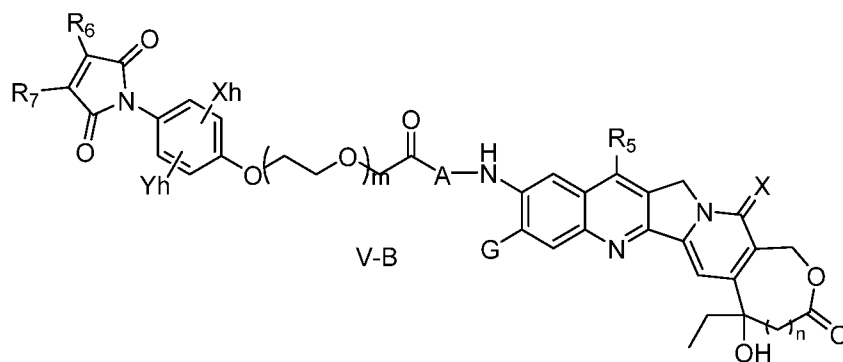
优选地,结构式V-A所示的化合物进一步为结构式V-A-1所示的化合物:



V-A-1

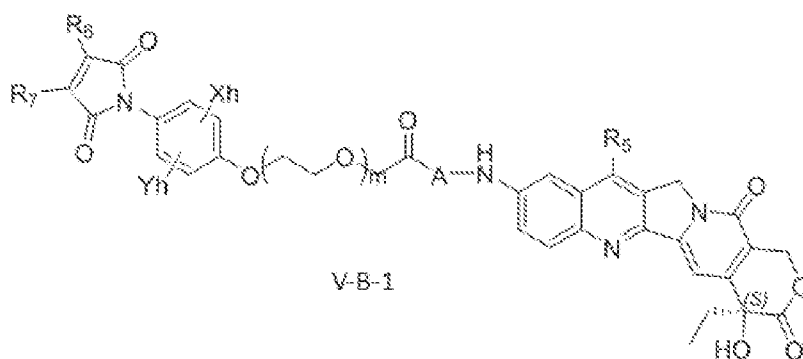
结构式 V-A-1

或者,结构式V所示的化合物进一步为结构式V-B所示的化合物:



结构式 V-B;

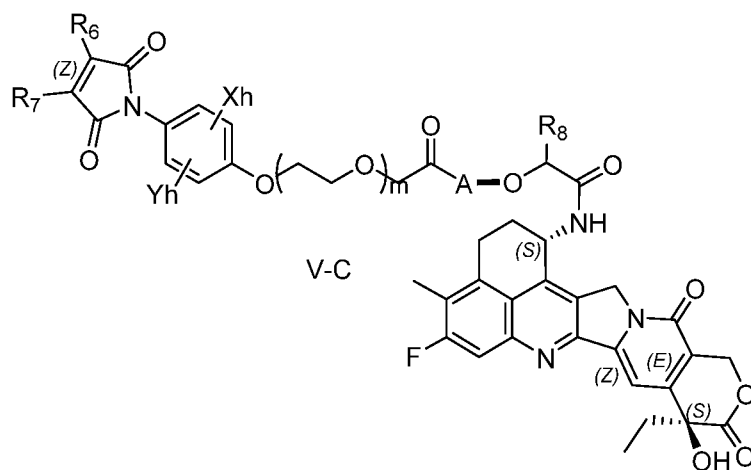
优选地, 结构式 V-B 所示的化合物进一步为结构式 V-B-1 所示的化合物:



5

结构式 V-B-1;

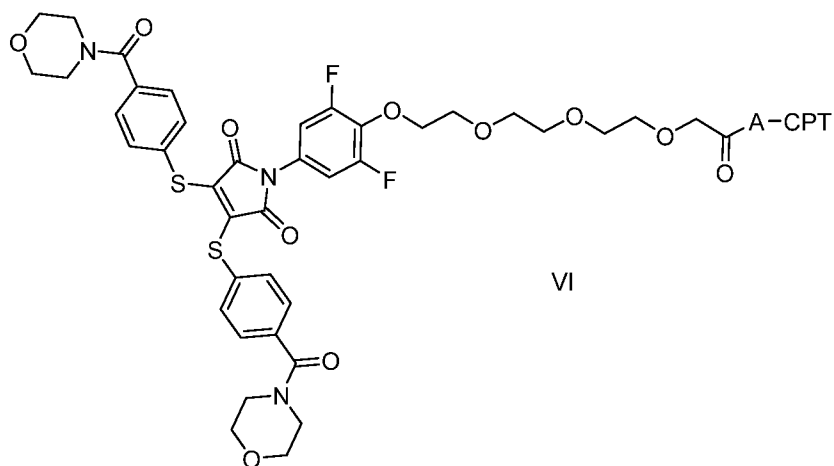
或者, 结构式 V 所示的化合物进一步为结构式 V-C 所示的化合物:



结构式 V-C

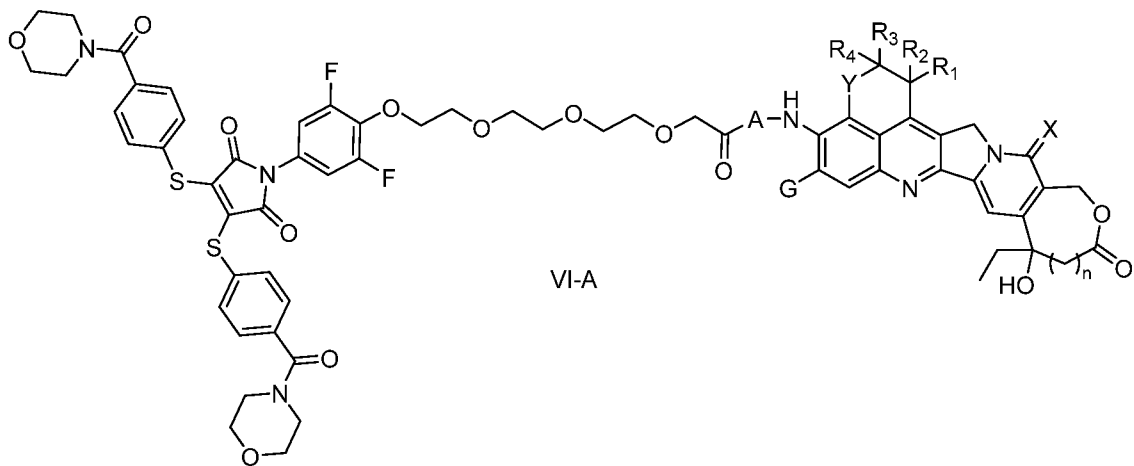
10

13. 根据权利要求 6 至 12 中任一项所述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, 其特征在于, 所述化合物为结构式 VI 所示的化合物:



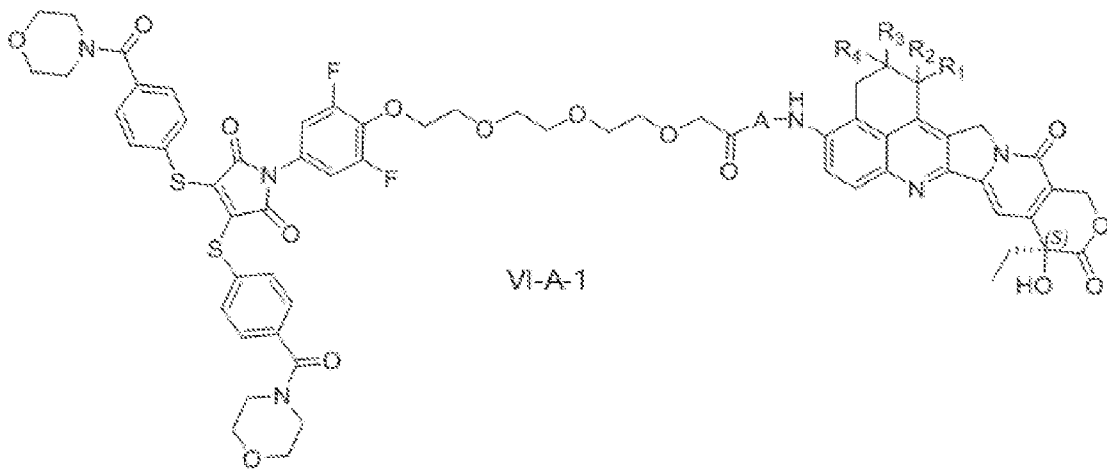
结构式 VI

优选地，结构式 VI 所示的化合物进一步为结构式 VI-A 所示的化合物：



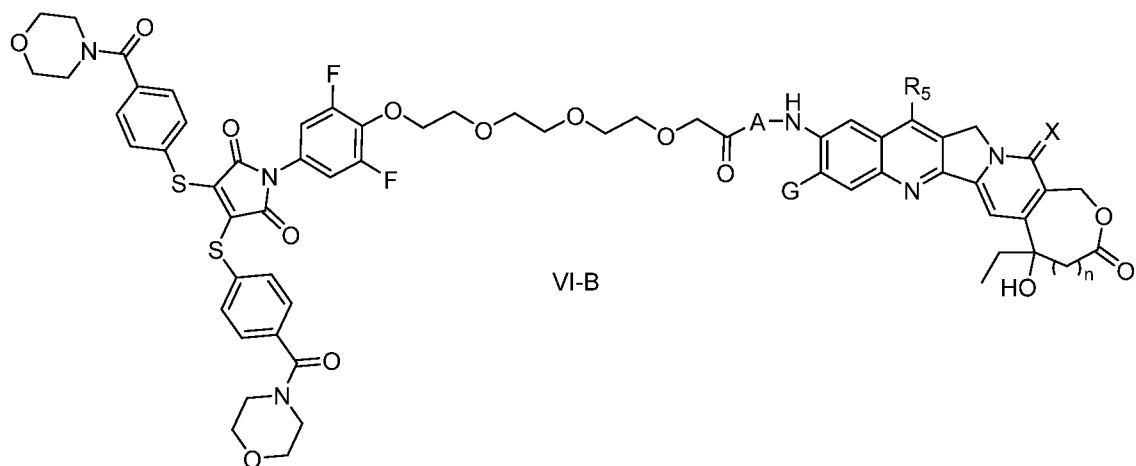
结构式 VI-A:

优选地，结构式 VI-A 所示的化合物进一步为结构式 VI-A-1 所示的化合物：



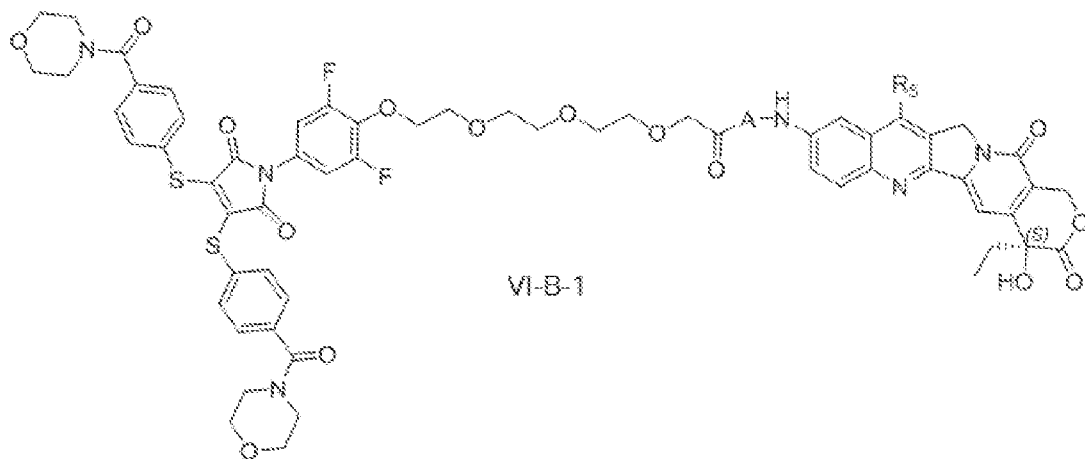
结构式 VI-A-1

或者, 结构式 VI 所示的化合物进一步为结构式 VI-B 所示的化合物:



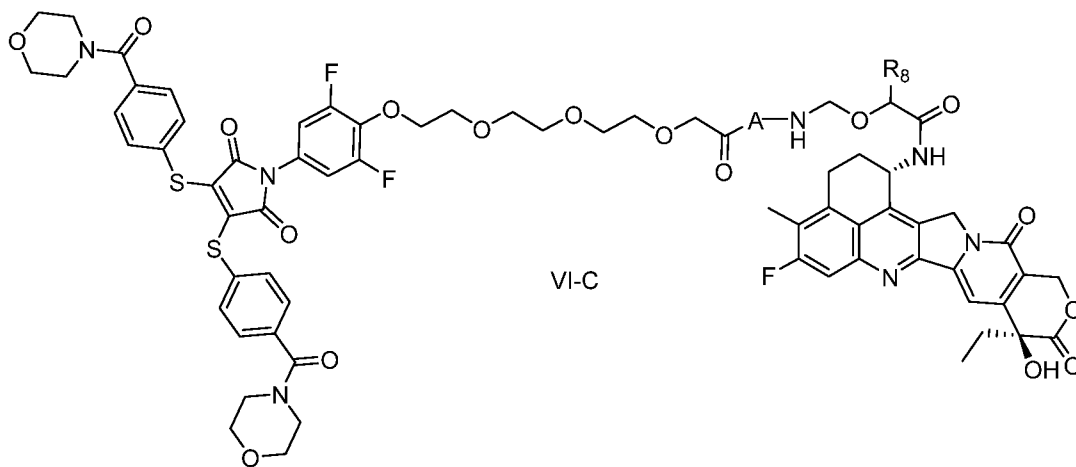
结构式 VI-B;

优选地, 结构式 VI-B 所示化合物进一步为结构式 VI-B-1 所示的化合物:



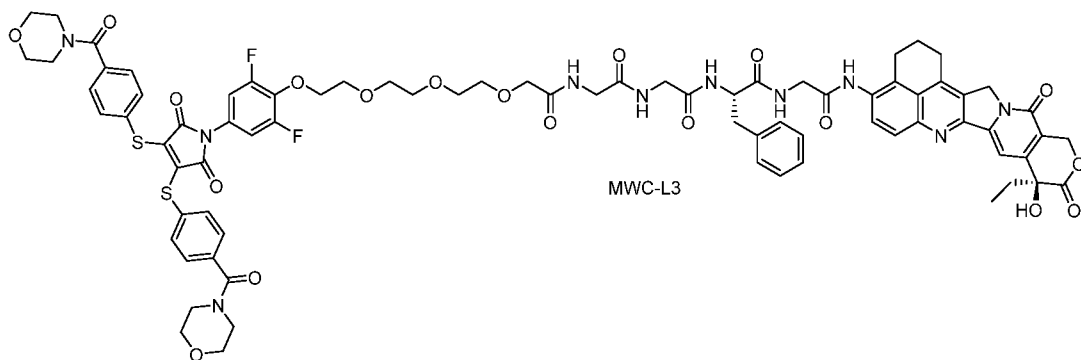
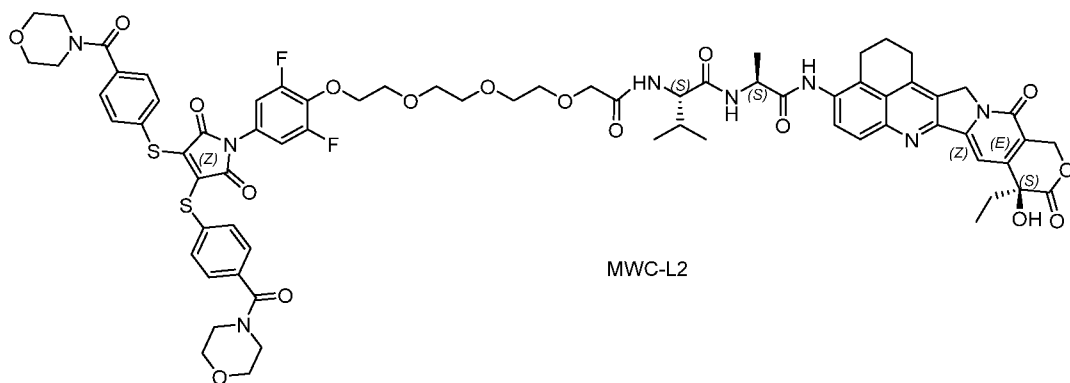
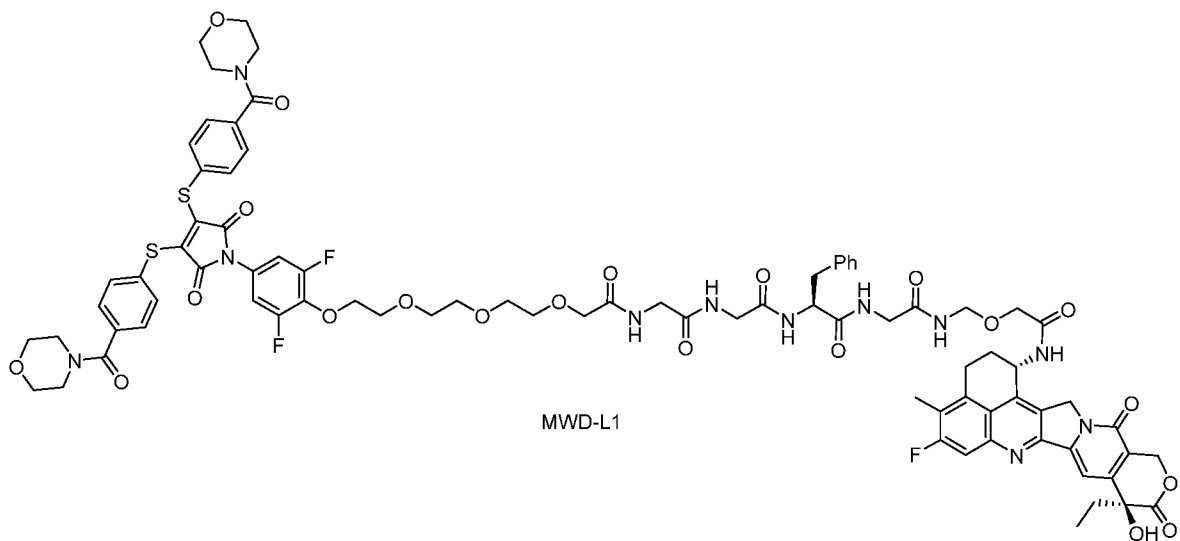
结构式 VI-B-1

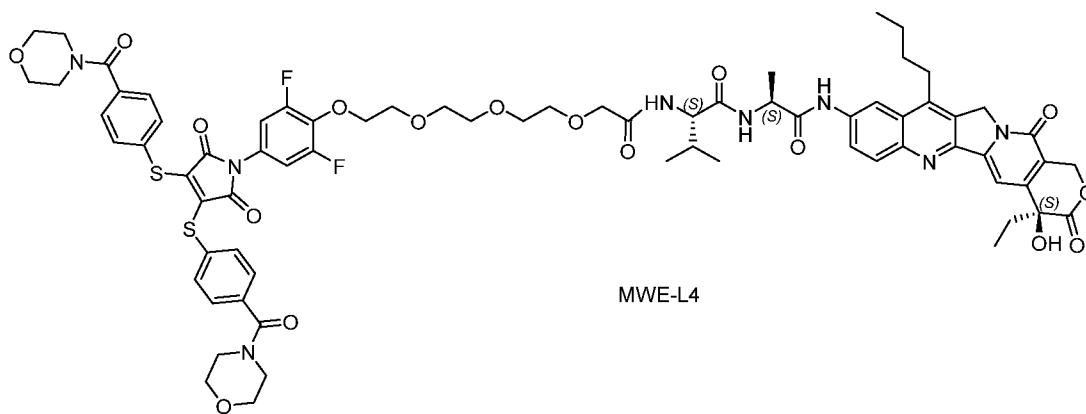
或者, 结构式 VI 所示的化合物进一步为结构式 VI-C 所示的化合物:



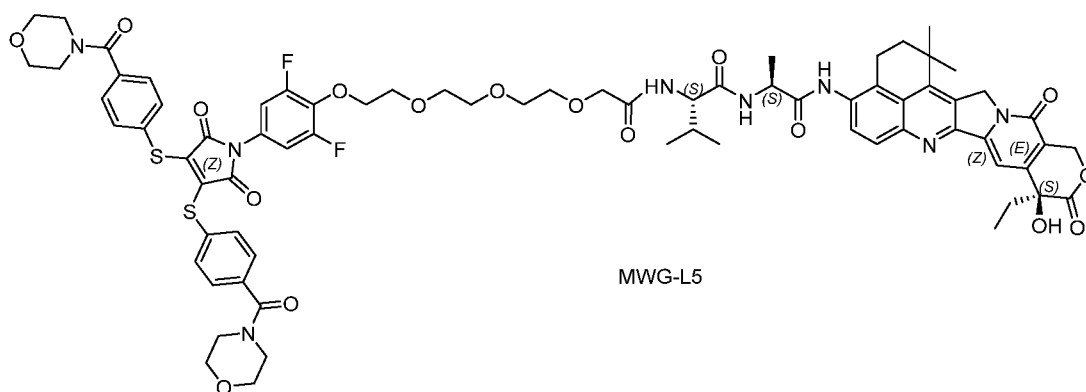
结构式 VI-C

体、溶剂化物或前药，其特征在于，所述化合物具有如下结构：

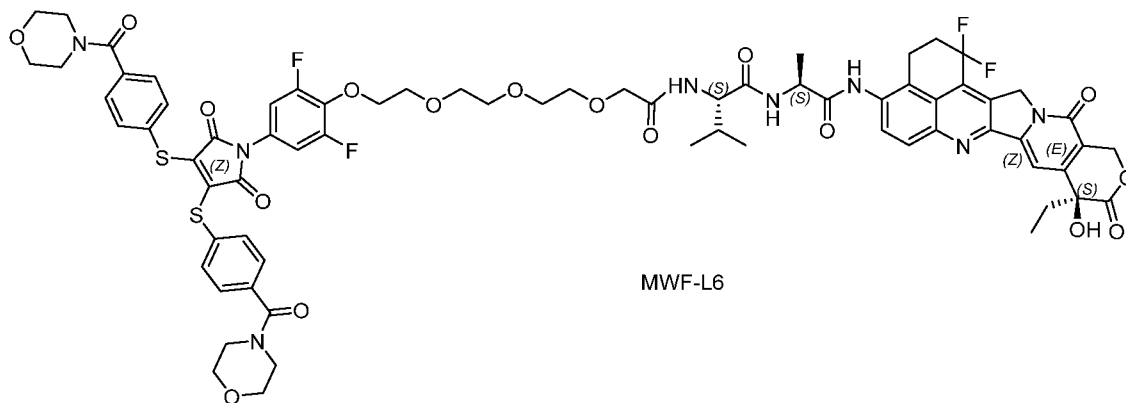




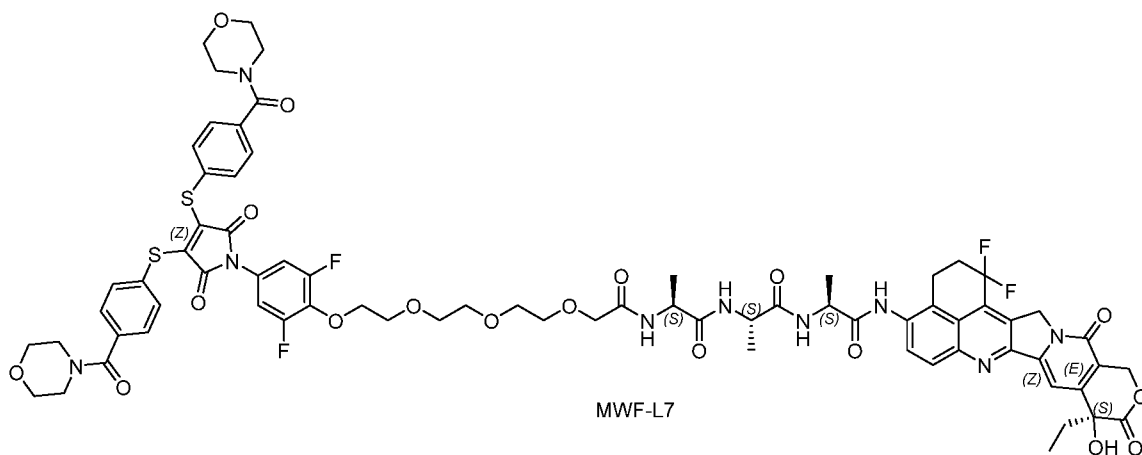
MWE-L4



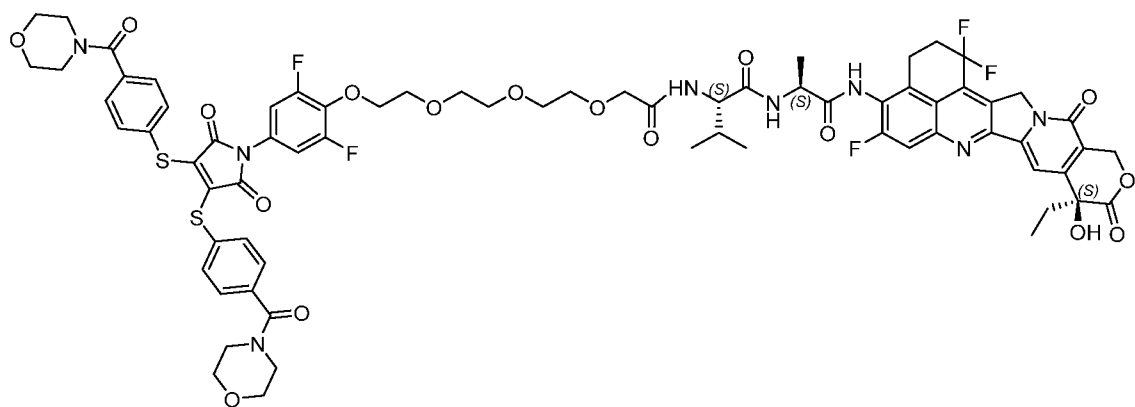
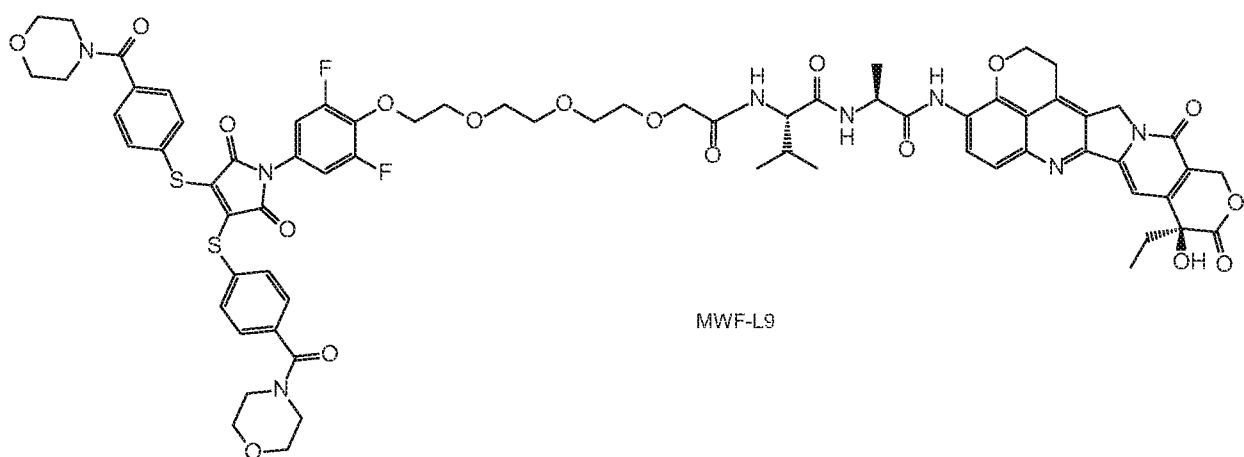
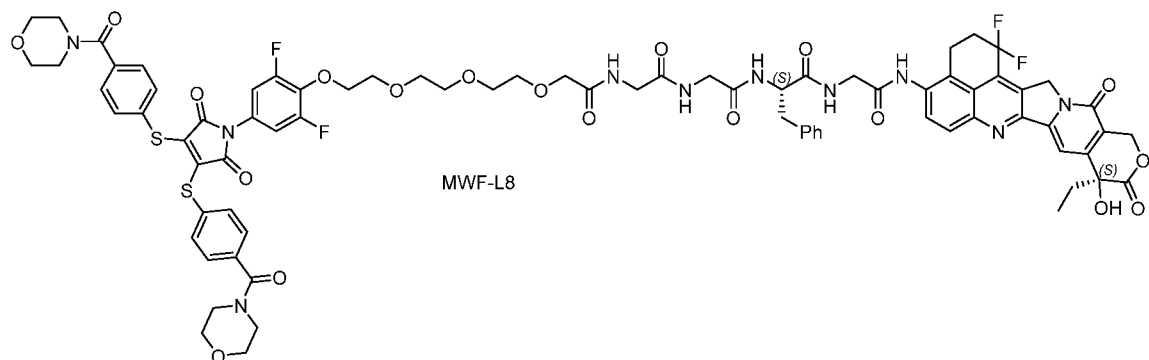
MWG-L5

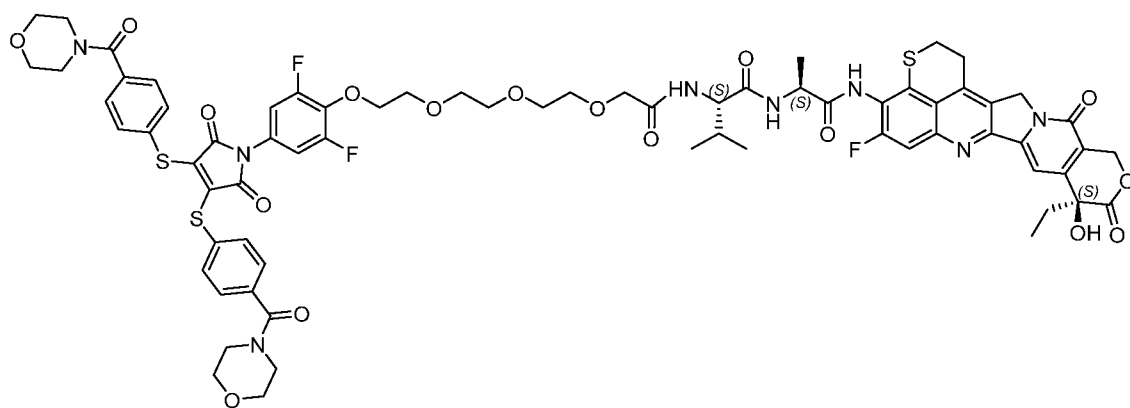


MWF-L6

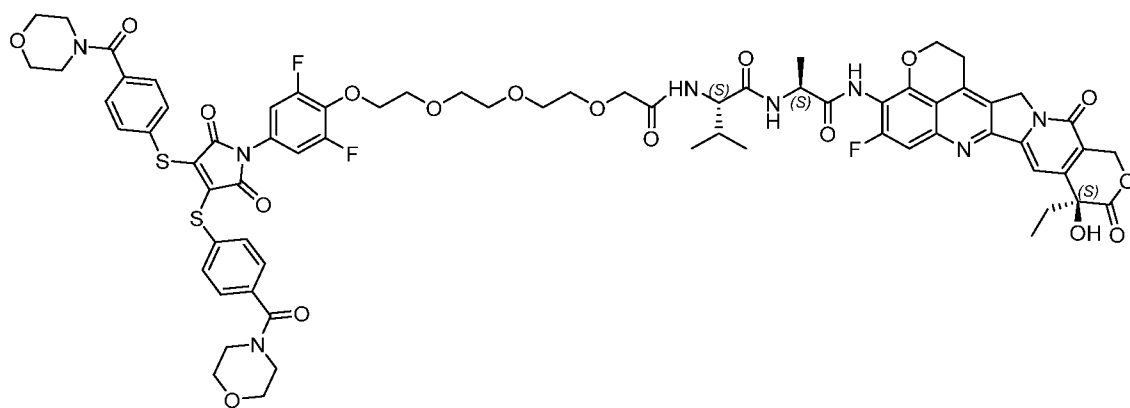


MWF-L7



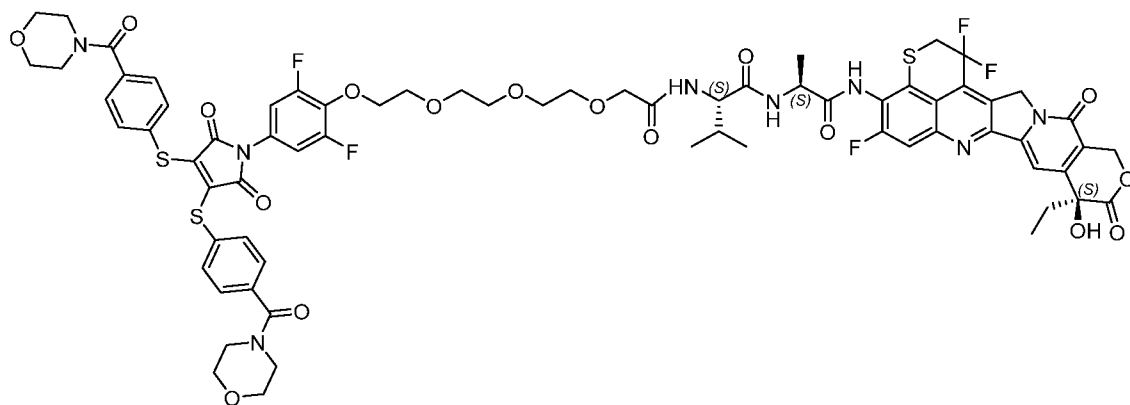


MWF-L11

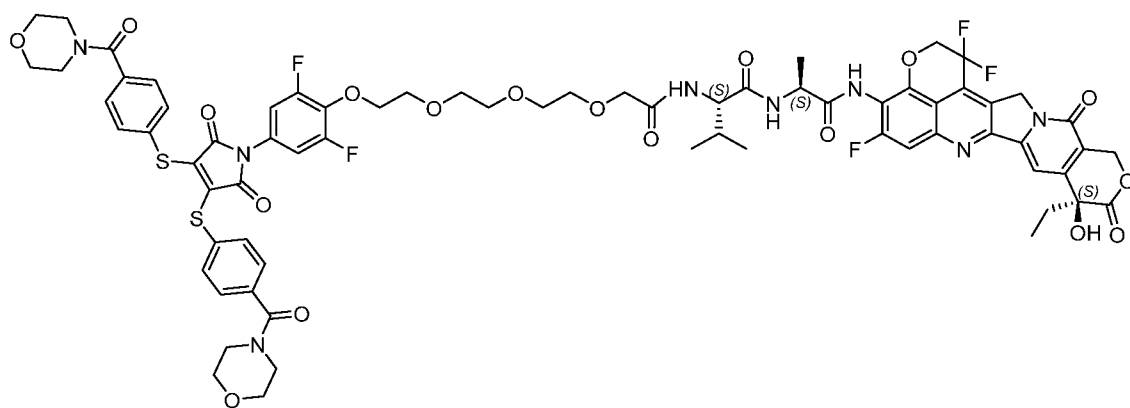


MWF-L12

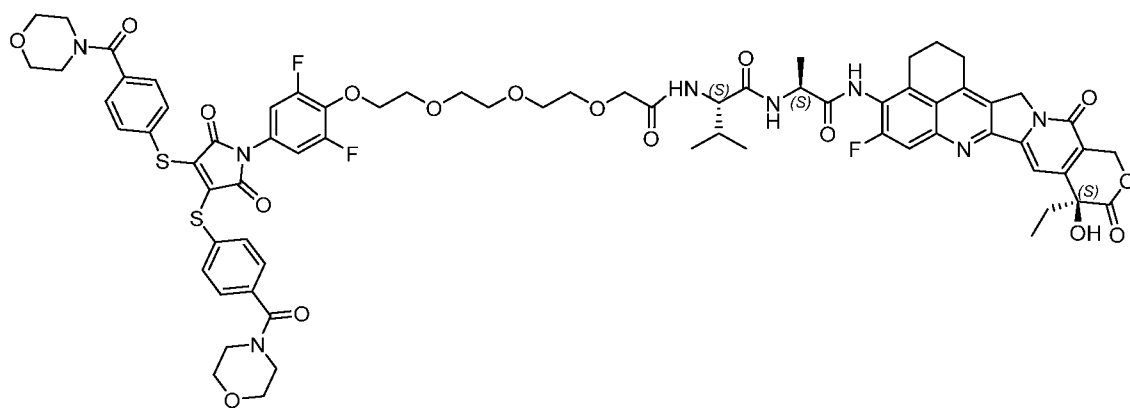
5



MWF-L13

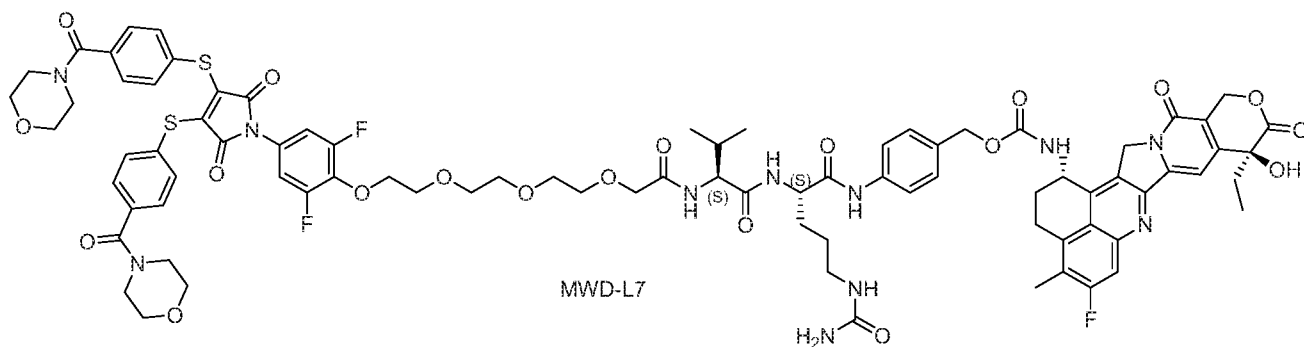


MWF-L14

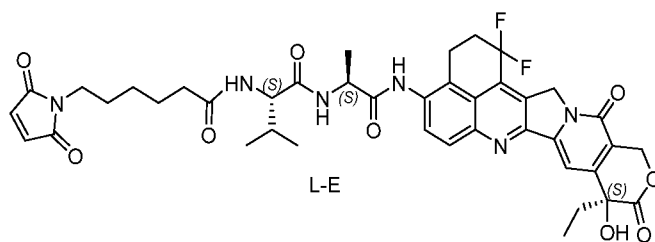
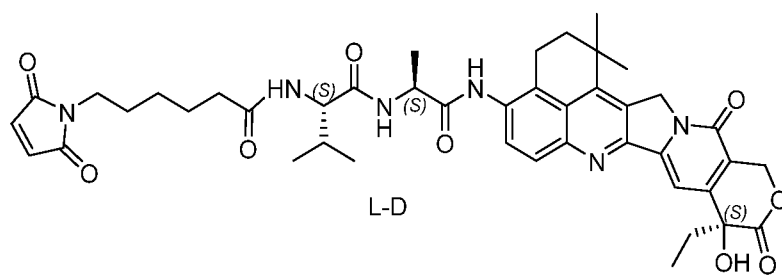
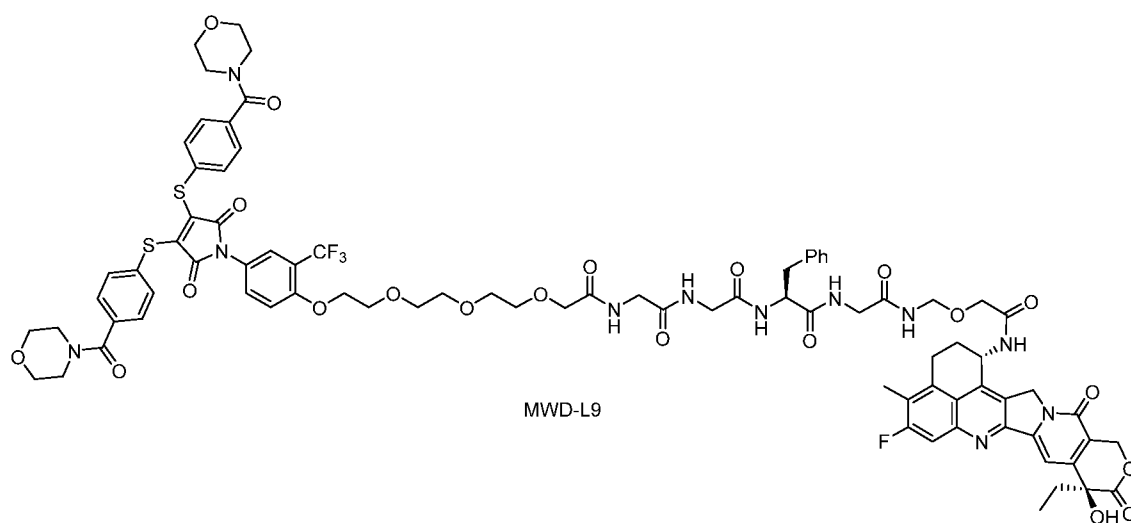
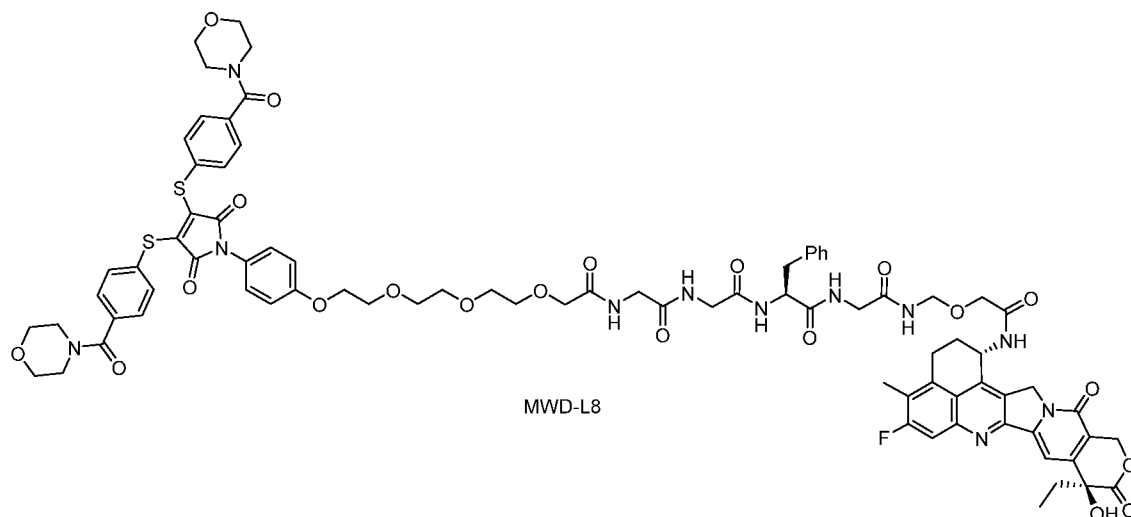


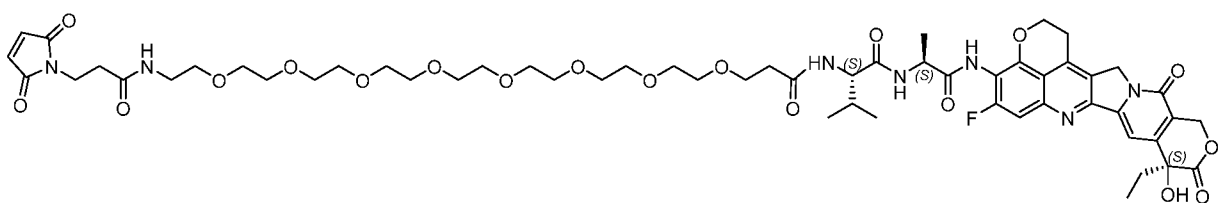
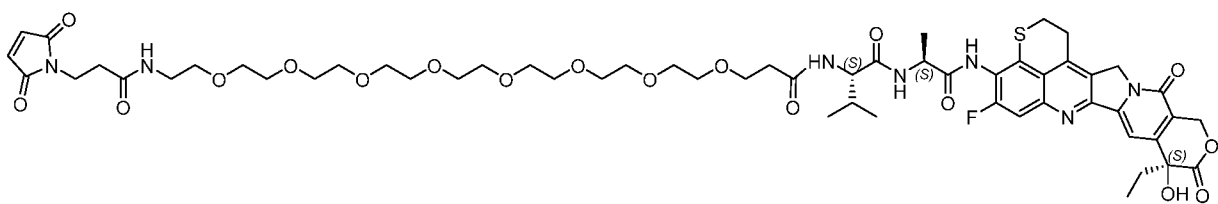
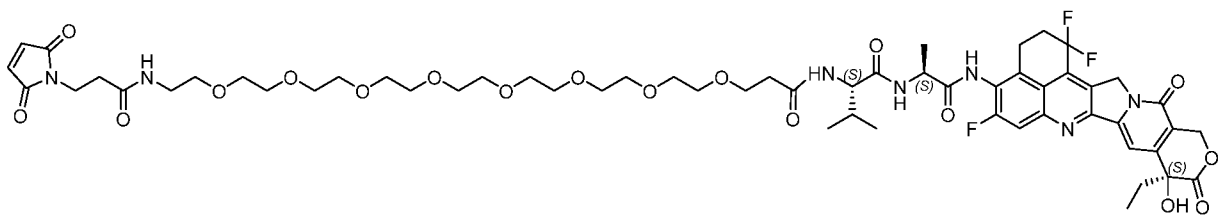
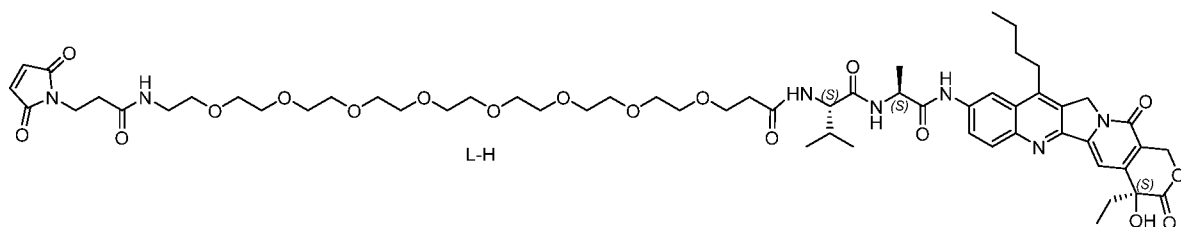
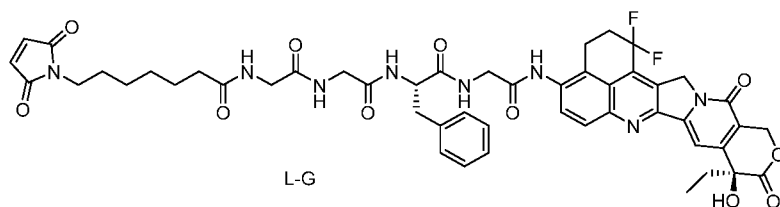
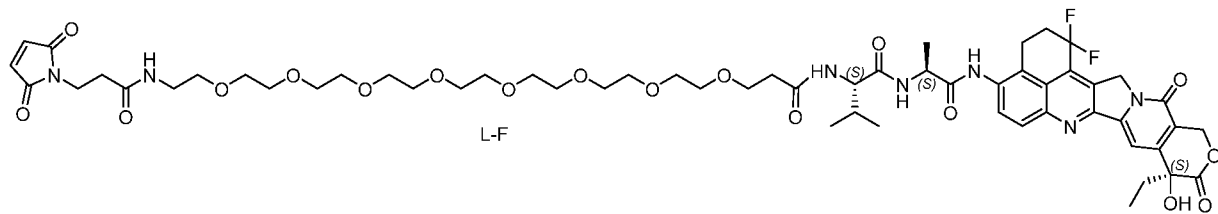
MWF-L15

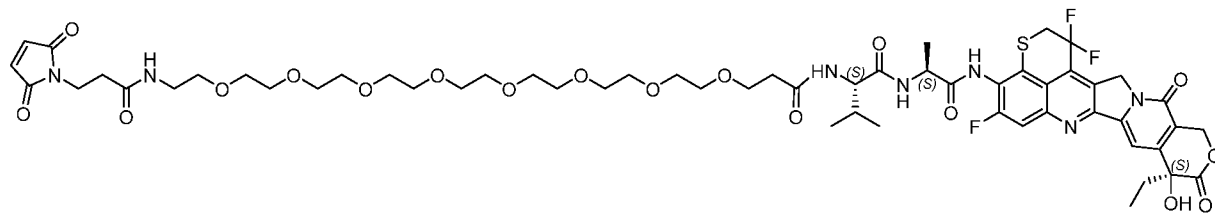
5



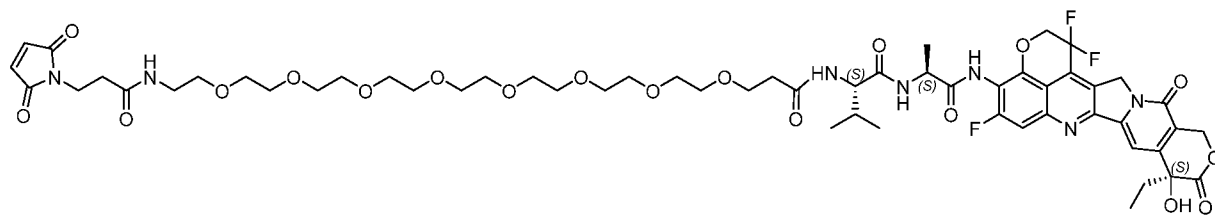
MWD-L7





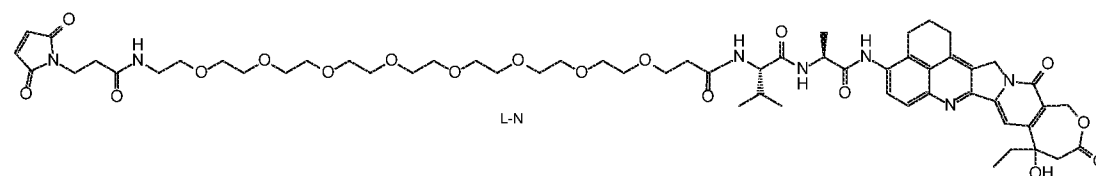


L-L



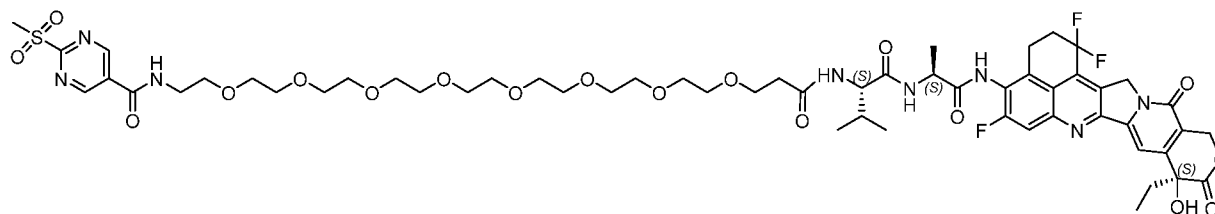
5

L-M



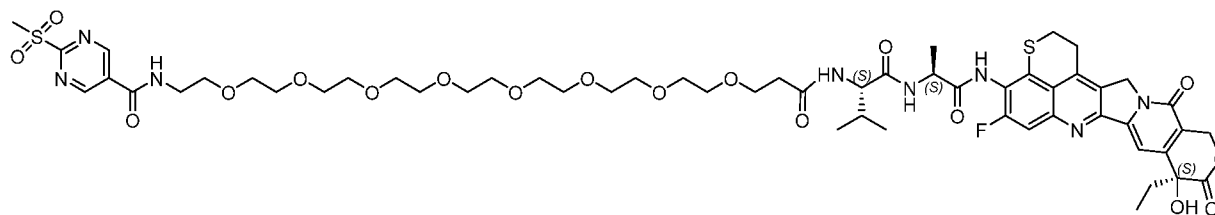
L-N

L-N



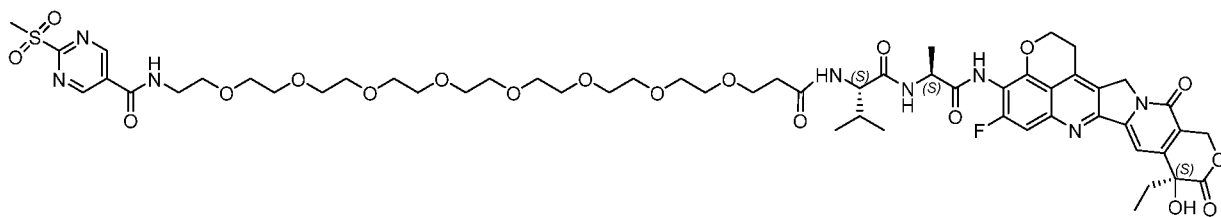
10

MWS-L1

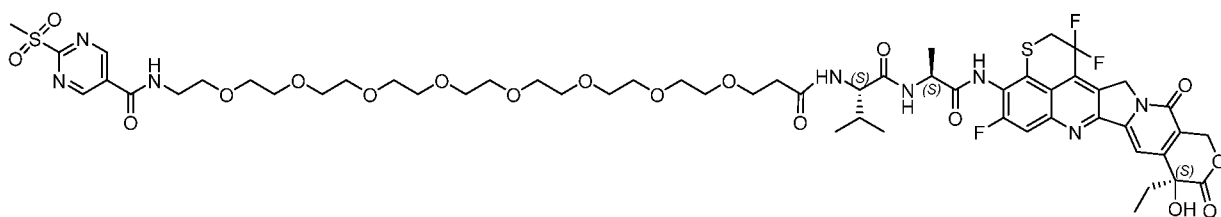


15

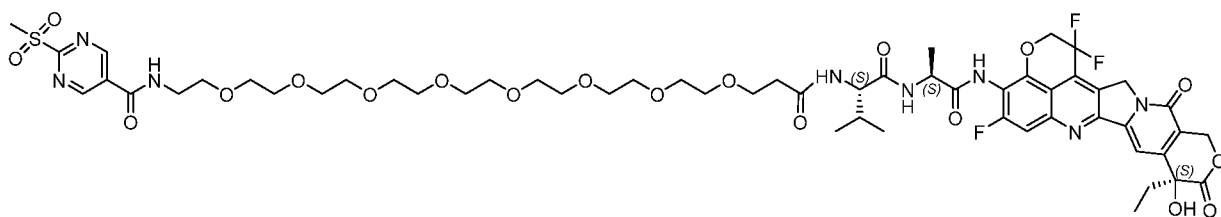
MWS-L2



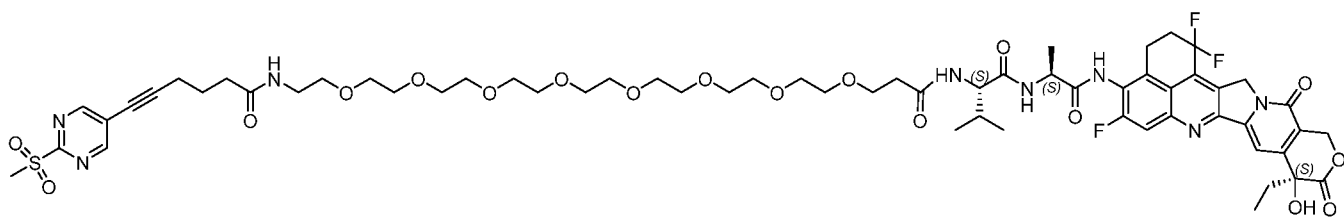
MWS-L3



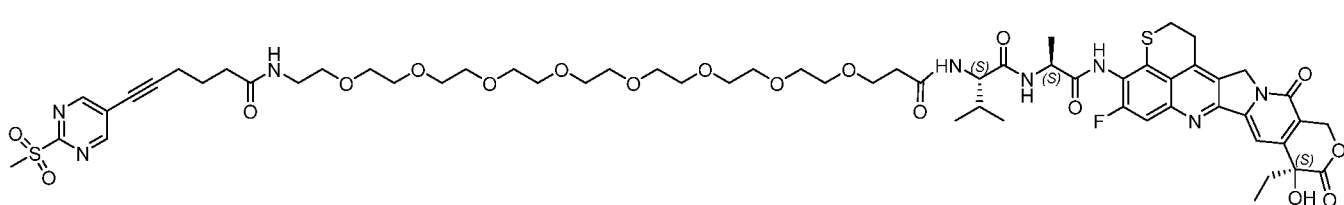
MWS-L4



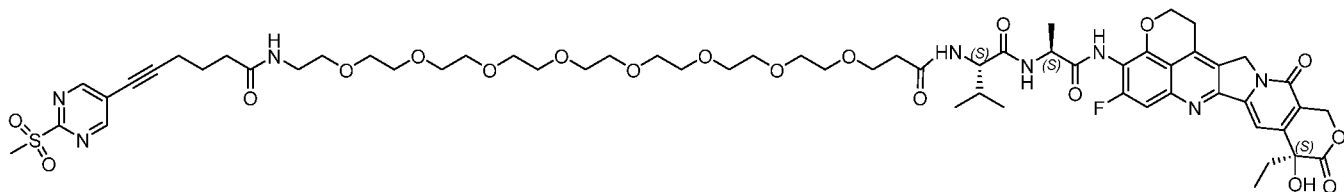
MWS-L5



MWS-L6

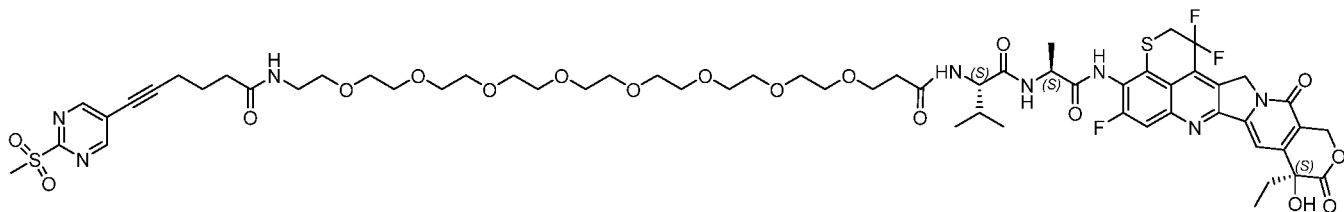


MWS-L7



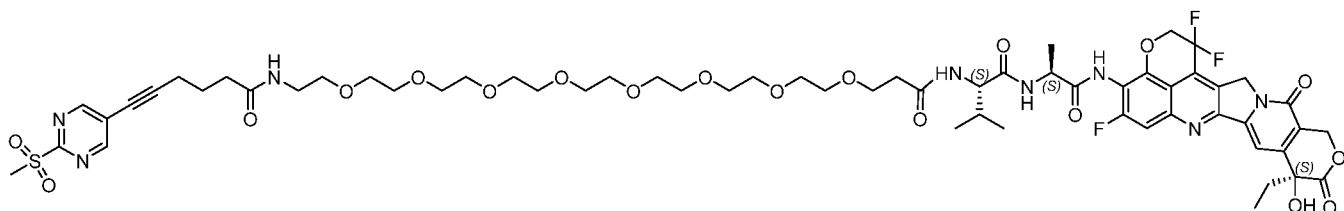
5

MWS-L8



10

MWS-L9



MWS-L10

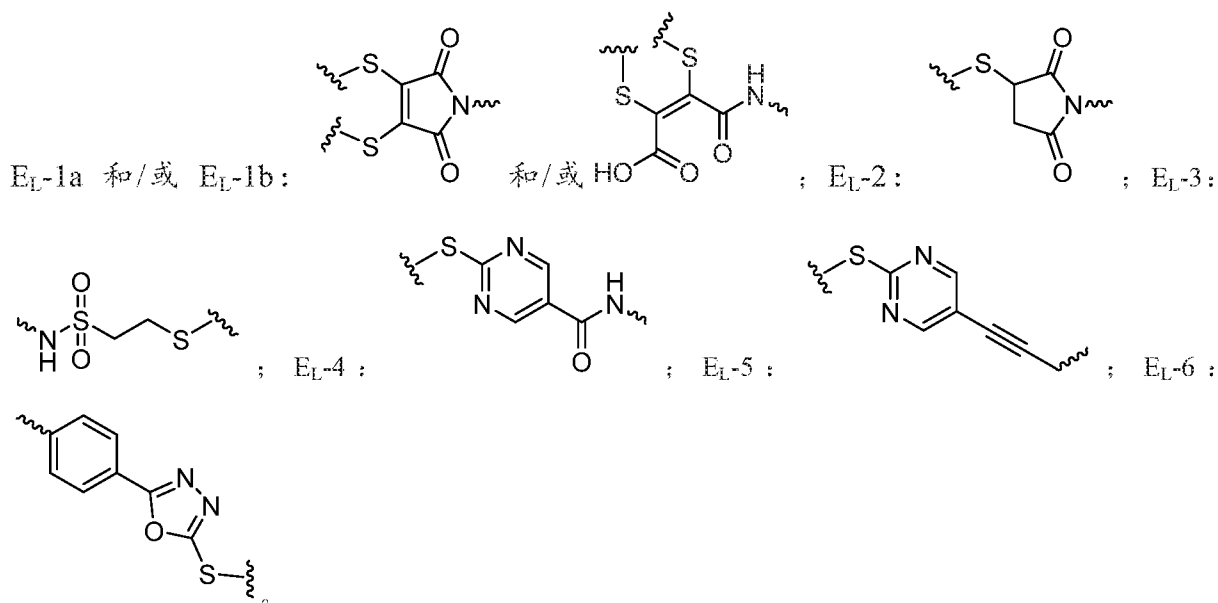
15 15. 根据权利要求1至14中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药与抗体或抗体片段制得的抗体药物偶联物；

优选地，所述抗体药物偶联物具有通式 
$$\text{(mAb)} \left[ \text{E}_L \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{SP}_1 \text{---} \text{M} \text{---} \text{SP}_2 \text{---} \text{A} \text{---} \text{CPT} \right]_N$$
 所示结构，

其中 mAb 表示抗体或抗体片段，基团 M、SP<sub>1</sub>、SP<sub>2</sub>、A 及 CPT 与权利要求6至14中任一项中基团 M、SP<sub>1</sub>、SP<sub>2</sub>、A 及 CPT 的定义相同；N 为 1~10、优选 1~8、更优选 3~8；

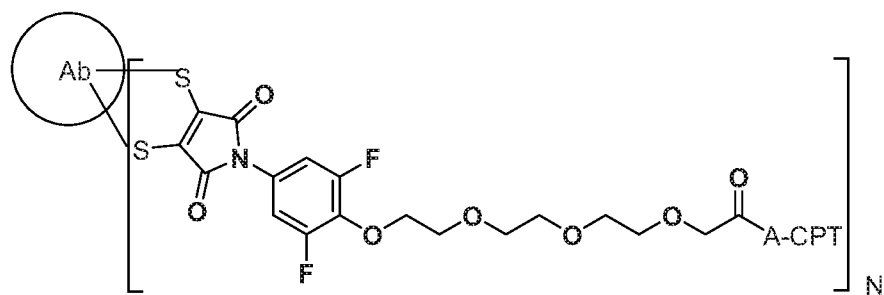
20 其中，E<sub>L</sub> 选自如下基团，其中  $\text{---} \text{S} \text{---}$  表示与 mAb 中半胱氨酸相连， $\text{---}$  表示与 M 相

连：



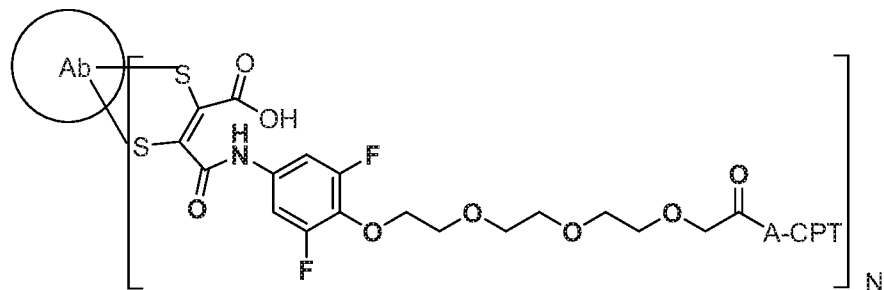
5

16. 根据权利要求 15 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述抗体药物偶联物具有通式 VII 或通式 VIII 所示的结构:



通式 VII

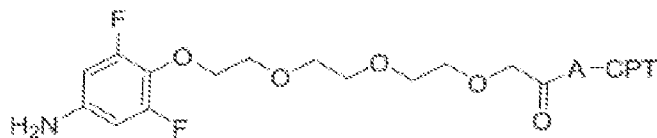
10 和/或



通式 VIII

其中 N 为 1~10、优选 1~8、更优选 3~8。

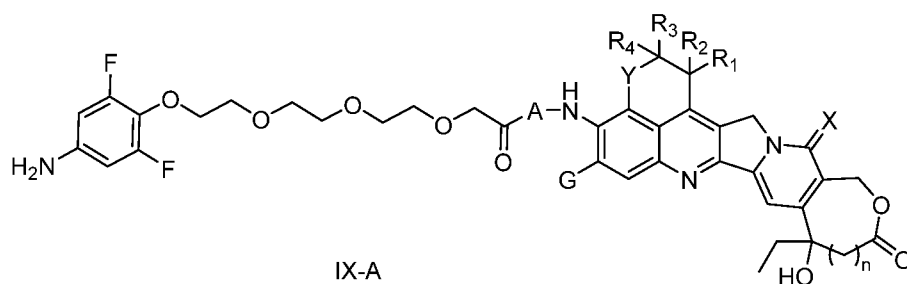
17. 权利要求 15 或 16 的抗体药物偶联物的前药代谢产物, 所述前药代谢产物为结构式 IX 所示的化合物:



结构式 IX

结构式 IX 中, 基团 A、CPT 与权利要求 6 至 14 中任一项中基团 A、CPT 的定义相同。

18. 根据权利要求 17 所述的前药代谢产物, 其特征在于, 所述化合物为结构式 IX-A 所示的化合物:

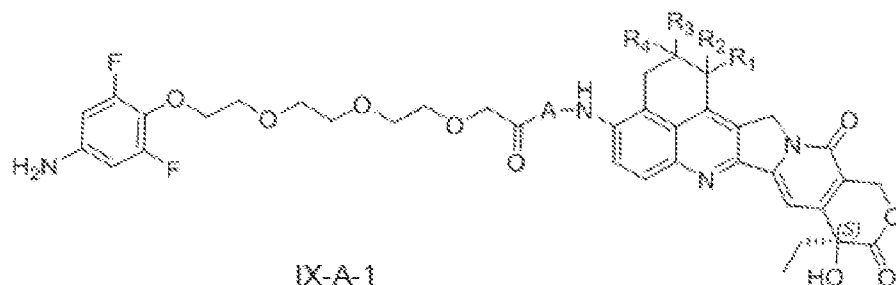


IX-A

结构式 IX-A

结构式 IX-A 中, 基团 A、G、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、n 与权利要求 6 至 14 中任一项中基团 A、G、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、n 的定义相同;

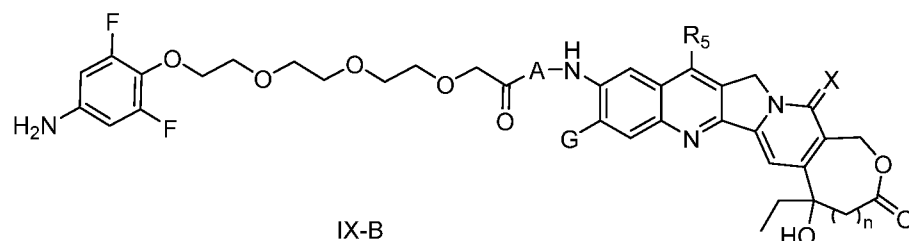
优选地, 结构式 IX-A 所示的化合物进一步为结构式 IX-A-1 所示的化合物:



IX-A-1

结构式 IX-A-1

或者, 所述化合物为结构式 IX-B 所示的化合物:

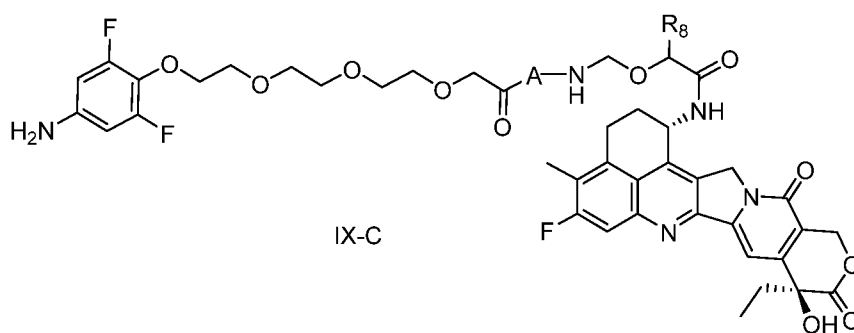


IX-B

结构式 IX-B

结构式 IX-B 中，基团 A、G、R<sub>5</sub>、X、n 与权利要求 6 至 14 中任一项中基团 A、G、R<sub>5</sub>、X、n 的定义相同。

5 或者，所述化合物为结构式 IX-C 所示的化合物：



IX-C

结构式 IX-C

结构式 IX-C 中，基团 A、R<sub>8</sub> 与权利要求 6 至 14 中任一项中基团 A、R<sub>8</sub> 的定义相同。

10

19. 权利要求 1 至 18 中任一项所述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、抗体药物偶联物或前药代谢产物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

15

20. 采用权利要求 1 至 16 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药或抗体药物偶联物治疗肿瘤的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用所述化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂化物或前药或抗体药物偶联物。

20

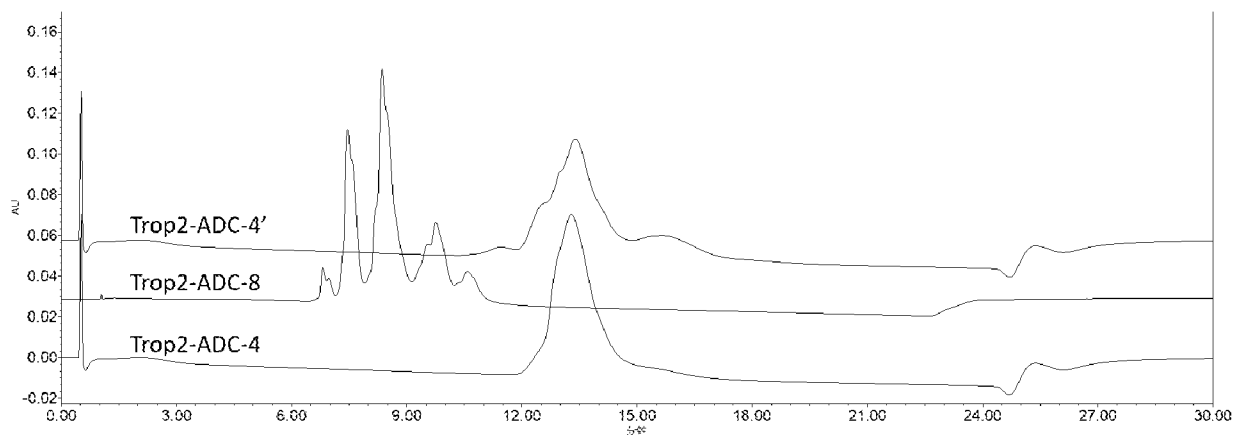


图 1

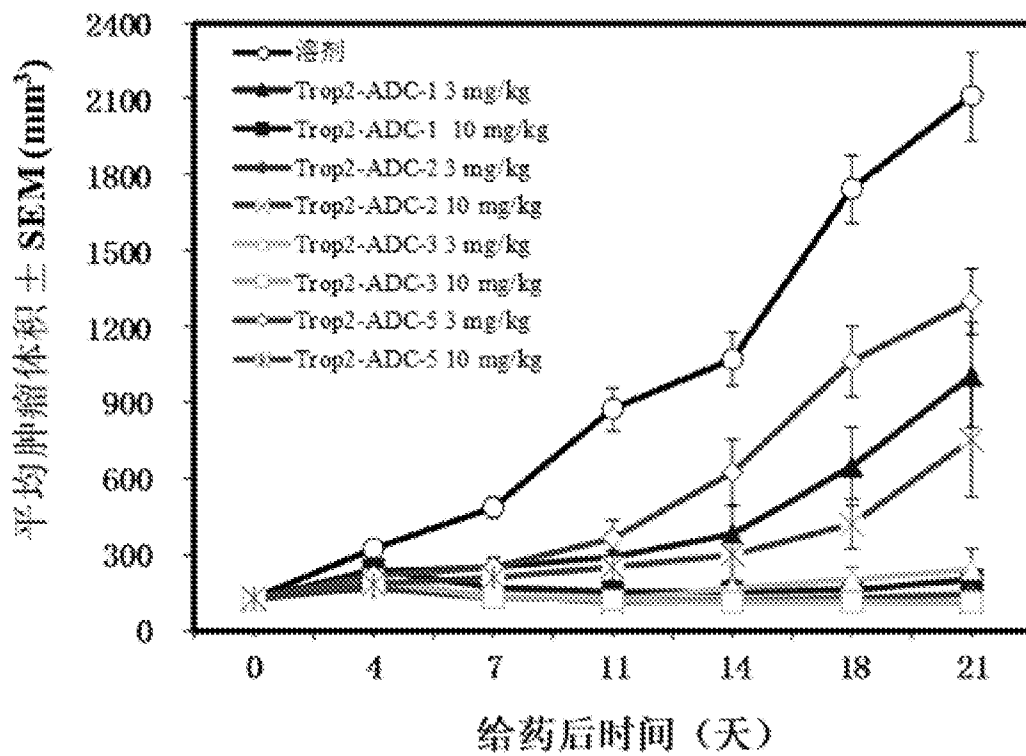


图 2

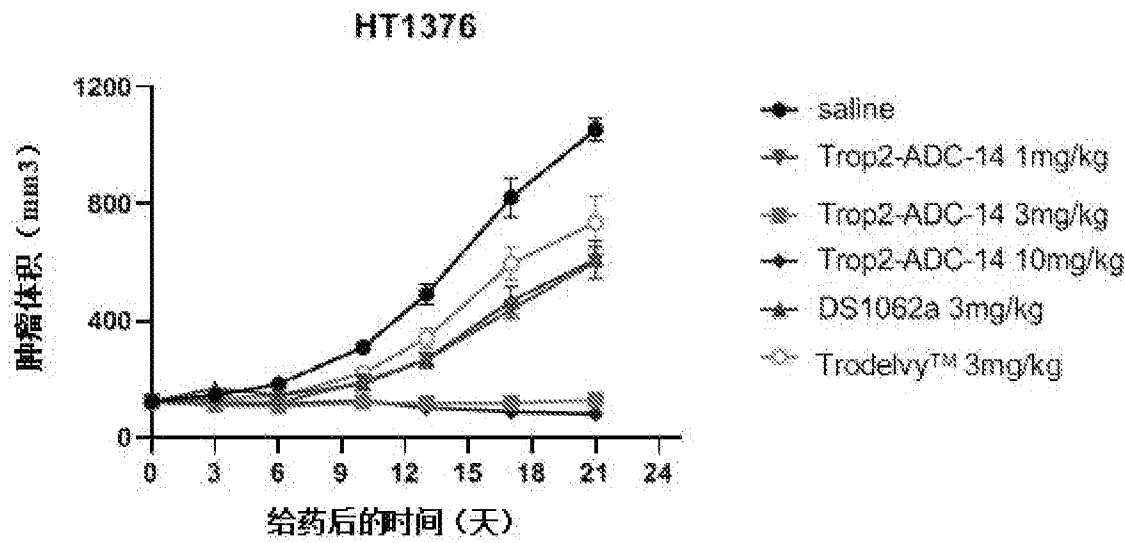


图 3

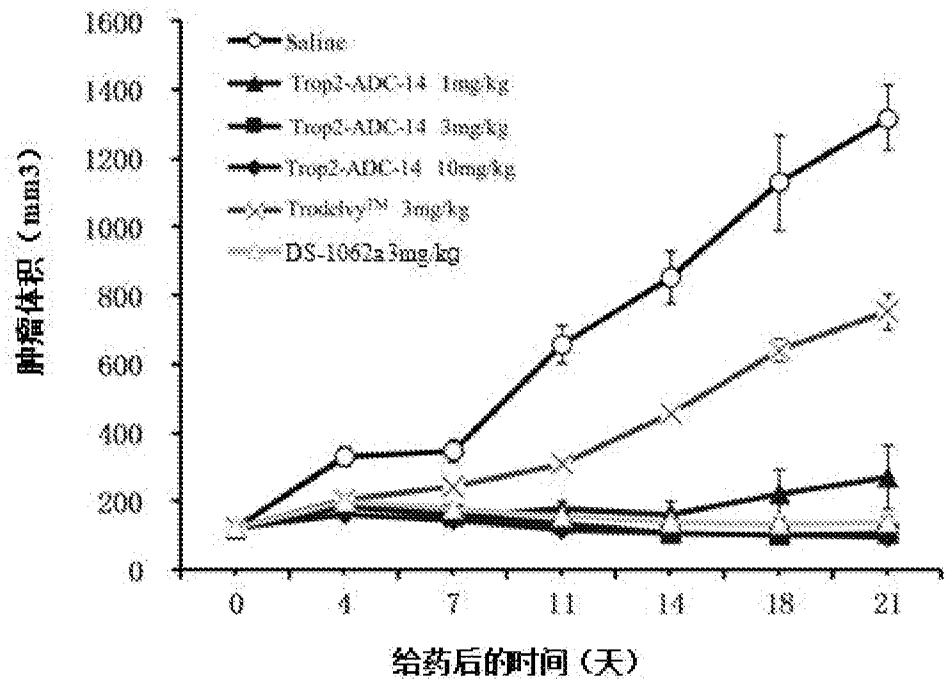


图 4

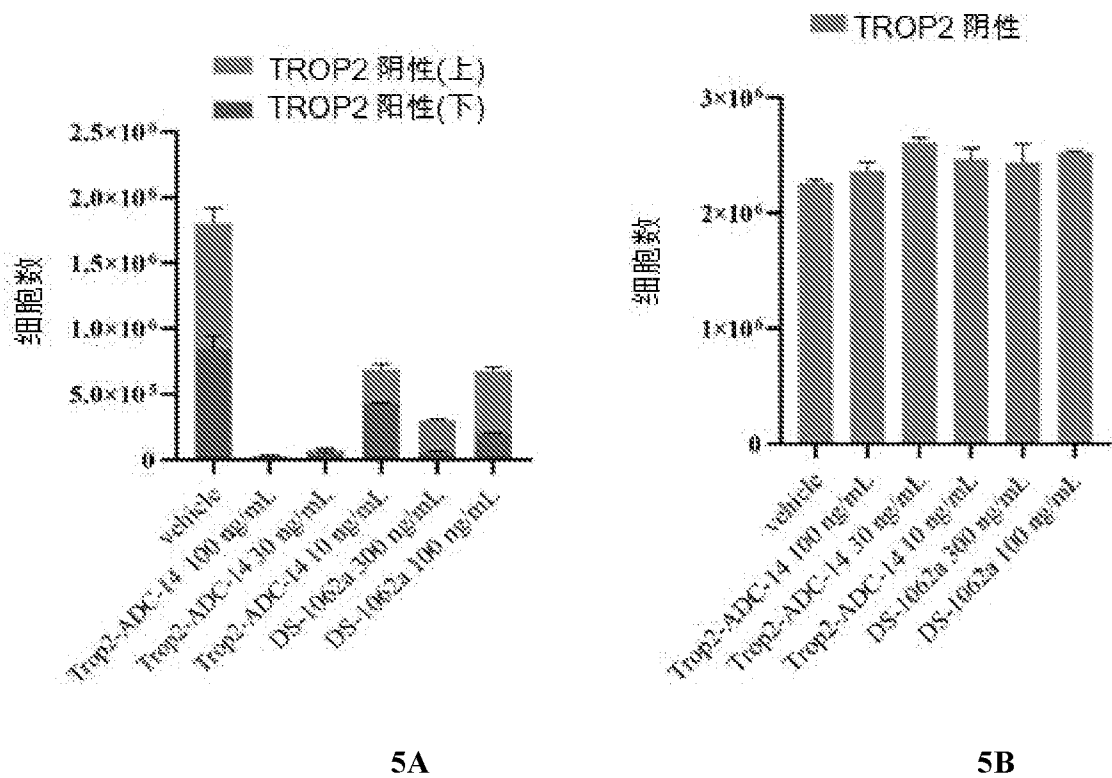


图 5

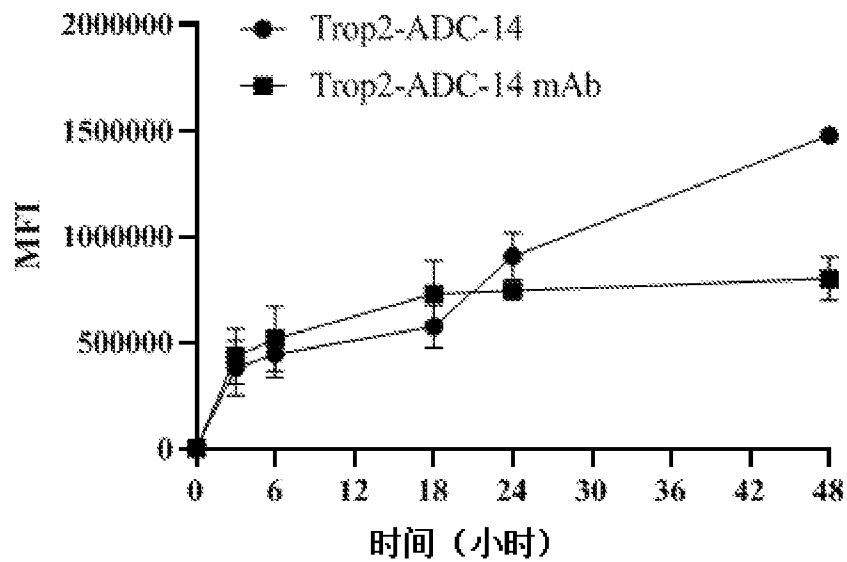


图 6

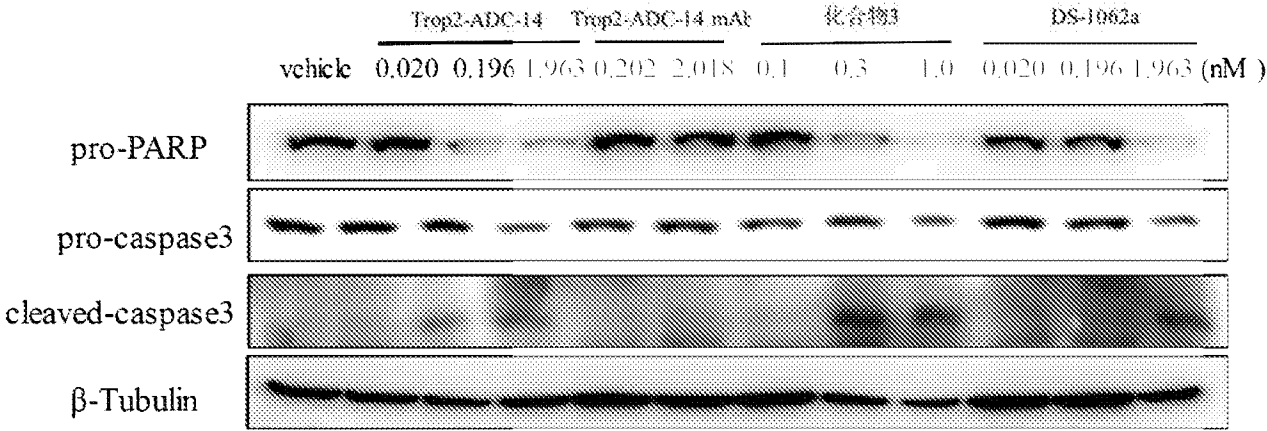


图 7

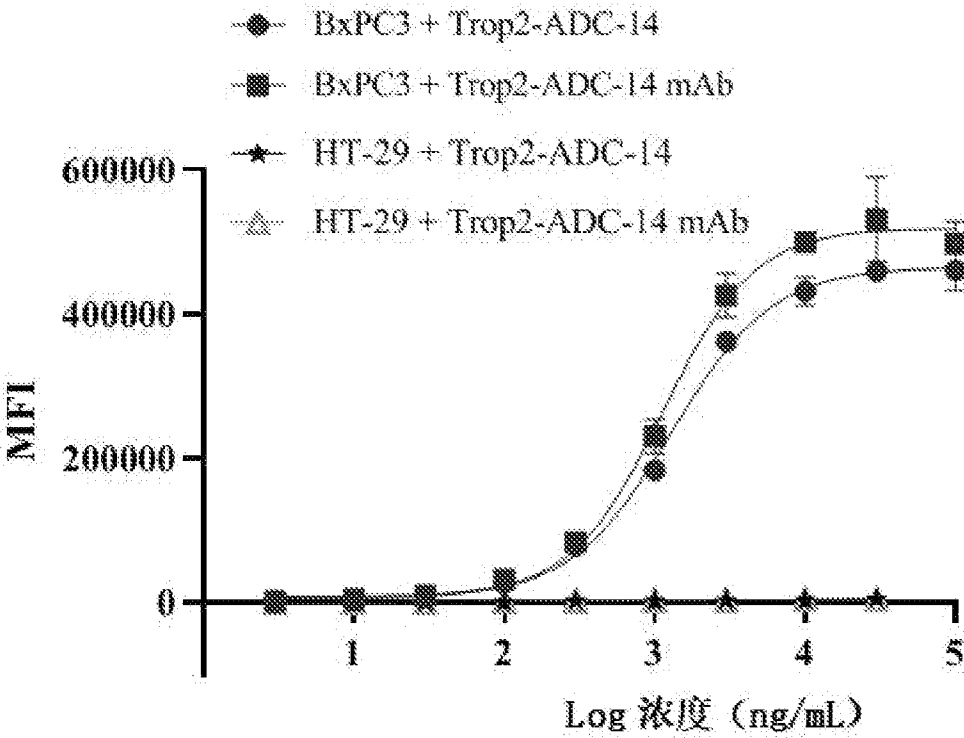


图 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139765

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07D491/22(2006.01)i;C07D495/22(2006.01)i;A61K47/68(2017.01)i;A61P35/00(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)

C07D,A61K,A61P

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)

WPI, CNPAT, CAPLUS(STN), REGISTRY(STN), MARPAT(STN), CNKI, 万方, WANFANG: 喜树碱, 类似物, 衍生物, 偶联物, 缀合物, 连洁子, 拓扑异构酶, 抑制剂, 肿瘤, 癌, camptothecin, analog+, derivative?, tumor?, antitumor?, cancer?, conjugate, topoisomerase inhibitor?, 结构式检索, search for structural formula

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | EP 0495432 A1 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 22 July 1992 (1992-07-22)<br>embodiments 26 and 30-31, claim 1, and description, page 1 | 1-5, 19-20            |
| X         | CN 113631196 A (MEDIMMUNE LIMITED) 09 November 2021 (2021-11-09)<br>claims 1, 10 and 20-25, and example 1                                       | 1, 6-10, 12, 14-20    |
| Y         | CN 113631196 A (MEDIMMUNE LIMITED) 09 November 2021 (2021-11-09)<br>claims 1, 10 and 20-25, and example 1                                       | 6-20                  |
| X         | WO 2021148501 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 29 July 2021 (2021-07-29)<br>claims 1 and 21-25, and example 2                                             | 1, 19-20              |
| X         | WO 2021148500 A1 (MEDIMMUNE LTD.) 29 July 2021 (2021-07-29)<br>description, pages 46-48, and claim 1                                            | 1, 19-20              |
| Y         | CN 108101825 A (SHANGHAI QINGRUN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 01 June 2018 (2018-06-01)<br>claims 1-4                                   | 6-20                  |



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

10 February 2023

Date of mailing of the international search report

20 February 2023

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139765

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | CN 1352646 A (UNIVERSITY OF PITTSBURGH) 05 June 2002 (2002-06-05)<br>embodiment 22, and claims 18 and 56                                                                                                                                                                                      | 3-4, 19-20            |
| X         | SUGIMORI, Masamichi et al. "Synthesis and Antitumor Activity of Ring A- and F-Modified Hexacyclic Camptothecin Analogues"<br><i>Journal of Medicinal Chemistry</i> , Vol. 41, No. (13), 06 March 1998 (1998-03-06),<br>pp. 2308-2318                                                          | 1, 5, 19-20           |
| X         | ADAMS, David J. et al. "Camptothecin Analogs with Enhanced Activity against Hyman Breast Cancer cells. I. Correlation of Potency with Lipophilicity and Persistence in the Cleavage Complex"<br><i>Cancer Chemother Pharmacol</i> , Vol. vol. 57, 20 August 2005 (2005-08-20),<br>pp. 135-144 | 3-4, 19-20            |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2022/139765**

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **20**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claim 20 relates to a method for treating a disease, and therefore does not comply with PCT Rule 39.1(iv).  
The search is carried out on the basis that the designation of the subject matter of claim 20 is amended to a corresponding pharmaceutical use.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/139765**

| Patent document<br>cited in search report |           |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |              |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------|----|--------------------------------------|-------------------------|--------------|----|--------------------------------------|
| EP                                        | 0495432   | A1 | 22 July 1992                         | DE                      | 69211023     | D1 | 04 July 1996                         |
|                                           |           |    |                                      | DE                      | 69211023     | T2 | 09 January 1997                      |
|                                           |           |    |                                      | CA                      | 2059305      | A1 | 17 July 1992                         |
|                                           |           |    |                                      | CA                      | 2059305      | C  | 31 July 2001                         |
|                                           |           |    |                                      | NO                      | 920201       | D0 | 15 January 1992                      |
|                                           |           |    |                                      | NO                      | 920201       | L  | 17 July 1992                         |
|                                           |           |    |                                      | NO                      | 180448       | B  | 13 January 1997                      |
|                                           |           |    |                                      | NO                      | 180448       | C  | 23 April 1997                        |
|                                           |           |    |                                      | EP                      | 0495432      | B1 | 29 May 1996                          |
|                                           |           |    |                                      | ES                      | 2090366      | T3 | 16 October 1996                      |
|                                           |           |    |                                      | HK                      | 1001561      | A1 | 26 June 1998                         |
|                                           |           |    |                                      | AU                      | 1018592      | A  | 23 July 1992                         |
|                                           |           |    |                                      | AU                      | 640549       | B2 | 26 August 1993                       |
|                                           |           |    |                                      | GR                      | 3020395      | T3 | 30 September 1996                    |
|                                           |           |    |                                      | KR                      | 920014816    | A  | 25 August 1992                       |
|                                           |           |    |                                      | KR                      | 100191193    | B1 | 15 June 1999                         |
|                                           |           |    |                                      | AT                      | 138661       | T  | 15 June 1996                         |
|                                           |           |    |                                      | FI                      | 920194       | A0 | 16 January 1992                      |
|                                           |           |    |                                      | FI                      | 920194       | A  | 17 July 1992                         |
|                                           |           |    |                                      | FI                      | 103047       | B  | 15 April 1999                        |
|                                           |           |    |                                      | JPH                     | 0559061      | A  | 09 March 1993                        |
|                                           |           |    |                                      | JP                      | 3008226      | B2 | 14 February 2000                     |
|                                           |           |    |                                      | IE                      | 920079       | A1 | 29 July 1992                         |
|                                           |           |    |                                      | RU                      | 2071476      | C1 | 10 January 1997                      |
|                                           |           |    |                                      | DK                      | 0495432      | T3 | 21 October 1996                      |
| CN                                        | 113631196 | A  | 09 November 2021                     | RS                      | 63715        | B1 | 30 November 2022                     |
|                                           |           |    |                                      | JP                      | 2022528851   | A  | 16 June 2022                         |
|                                           |           |    |                                      | US                      | 2022211863   | A1 | 07 July 2022                         |
|                                           |           |    |                                      | LT                      | 3946464      | T  | 10 November 2022                     |
|                                           |           |    |                                      | PT                      | 3946464      | T  | 16 November 2022                     |
|                                           |           |    |                                      | TW                      | 202104235    | A  | 01 February 2021                     |
|                                           |           |    |                                      | HRP                     | 20221280     | T1 | 23 December 2022                     |
|                                           |           |    |                                      | IL                      | 286291       | A  | 31 October 2021                      |
|                                           |           |    |                                      | US                      | 2021322401   | A1 | 21 October 2021                      |
|                                           |           |    |                                      | US                      | 11446292     | B2 | 20 September 2022                    |
|                                           |           |    |                                      | CA                      | 3133757      | A1 | 08 October 2020                      |
|                                           |           |    |                                      | AU                      | 2020252034   | A1 | 11 November 2021                     |
|                                           |           |    |                                      | PL                      | 3946464      | T3 | 19 December 2022                     |
|                                           |           |    |                                      | DK                      | 3946464      | T3 | 31 October 2022                      |
|                                           |           |    |                                      | BR                      | 112021018986 | A2 | 18 January 2022                      |
|                                           |           |    |                                      | EP                      | 3946464      | A1 | 09 February 2022                     |
|                                           |           |    |                                      | EP                      | 3946464      | B1 | 31 August 2022                       |
|                                           |           |    |                                      | CR                      | 20210541     | A  | 20 December 2021                     |
|                                           |           |    |                                      | ECSP                    | 21078204     | A  | 30 November 2021                     |
|                                           |           |    |                                      | CO                      | 2021014566   | A2 | 19 November 2021                     |
|                                           |           |    |                                      | WO                      | 2020200880   | A1 | 08 October 2020                      |
|                                           |           |    |                                      | SG                      | 11202110524  | VA | 28 October 2021                      |
|                                           |           |    |                                      | CL                      | 2021002498   | A1 | 03 June 2022                         |
|                                           |           |    |                                      | ES                      | 2930295      | T3 | 09 December 2022                     |
|                                           |           |    |                                      | US                      | 2020306243   | A1 | 01 October 2020                      |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/139765**

| Patent document<br>cited in search report |            |    |              | Publication date<br>(day/month/year) |              | Patent family member(s) | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|------------|----|--------------|--------------------------------------|--------------|-------------------------|--------------------------------------|
| WO                                        | 2021148501 | A1 | 29 July 2021 | ZA                                   | 202106612    | B                       | 31 August 2022                       |
|                                           |            |    |              | KR                                   | 20210144845  | A                       | 30 November 2021                     |
|                                           |            |    |              | TW                                   | 202140076    | A                       | 01 November 2021                     |
|                                           |            |    |              | IL                                   | 294645       | A                       | 01 September 2022                    |
|                                           |            |    |              | KR                                   | 20220130191  | A                       | 26 September 2022                    |
|                                           |            |    |              | CO                                   | 2022011178   | A2                      | 30 August 2022                       |
|                                           |            |    |              | BR                                   | 112022013966 | A2                      | 11 October 2022                      |
|                                           |            |    |              | AU                                   | 2021211892   | A1                      | 08 September 2022                    |
|                                           |            |    |              | CA                                   | 3167373      | A1                      | 29 July 2021                         |
|                                           |            |    |              | ECSP                                 | 22064855     | A                       | 30 September 2022                    |
| WO                                        | 2021148500 | A1 | 29 July 2021 | EP                                   | 4093438      | A1                      | 30 November 2022                     |
|                                           |            |    |              | CR                                   | 20220393     | A                       | 16 September 2022                    |
|                                           |            |    |              | CA                                   | 3166732      | A1                      | 29 July 2021                         |
|                                           |            |    |              | AU                                   | 2021210570   | A1                      | 01 September 2022                    |
|                                           |            |    |              | KR                                   | 20220130749  | A                       | 27 September 2022                    |
|                                           |            |    |              | BR                                   | 112022014391 | A2                      | 13 September 2022                    |
|                                           |            |    |              | EP                                   | 4093439      | A1                      | 30 November 2022                     |
|                                           |            |    |              | None                                 |              |                         |                                      |
|                                           |            |    |              |                                      |              |                         |                                      |
|                                           |            |    |              |                                      |              |                         |                                      |
| CN                                        | 108101825  | A  | 01 June 2018 |                                      |              |                         |                                      |
| CN                                        | 1352646    | A  | 05 June 2002 | US                                   | 6136978      | A                       | 24 October 2000                      |
|                                           |            |    |              | JP                                   | 2002532505   | A                       | 02 October 2002                      |
|                                           |            |    |              | JP                                   | 4638987      | B2                      | 23 February 2011                     |
|                                           |            |    |              | KR                                   | 20010101250  | A                       | 14 November 2001                     |
|                                           |            |    |              | KR                                   | 100750693    | B1                      | 22 August 2007                       |
|                                           |            |    |              | NZ                                   | 512210       | A                       | 24 December 2004                     |
|                                           |            |    |              | AU                                   | 3123600      | A                       | 03 July 2000                         |
|                                           |            |    |              | AU                                   | 777786       | B2                      | 28 October 2004                      |
|                                           |            |    |              | EP                                   | 1140948      | A1                      | 10 October 2001                      |
|                                           |            |    |              | EP                                   | 1140948      | A4                      | 02 January 2008                      |
|                                           |            |    |              | WO                                   | 0035924      | A1                      | 22 June 2000                         |
|                                           |            |    |              | CA                                   | 2353822      | A1                      | 22 June 2000                         |
|                                           |            |    |              | CA                                   | 2353822      | C                       | 31 May 2011                          |
|                                           |            |    |              | HK                                   | 1044156      | A1                      | 11 October 2002                      |
|                                           |            |    |              | HK                                   | 1044156      | B                       | 08 April 2005                        |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/139765

## A. 主题的分类

C07D491/22 (2006. 01) i; C07D495/22 (2006. 01) i; A61K47/68 (2017. 01) i; A61P35/00 (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)

C07D, A61K, A61P

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))

WPI, CNPAT, CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MARPAT (STN), CNKI, 万方: 喜树碱, 类似物, 衍生物, 偶联物, 缀合物, 连洁子, 拓扑异构酶, 抑制剂, 肿瘤, 癌, camptothecin, analog+, derivative?, tumor?, antitumor?, cancer?, conjugate, topoisomerase inhibitor?, 结构式检索

## 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            |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X    | EP 0495432 A1 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. 等) 1992年7月22日 (1992 - 07 - 22)<br>实施例26, 30-31, 权利要求1, 说明书第1页 | 1-5, 19-20         |
| X    | CN 113631196 A (免疫医疗有限公司) 2021年11月9日 (2021 - 11 - 09)<br>权利要求1, 10, 20-25, 实例1                                | 1, 6-10, 12, 14-20 |
| Y    | CN 113631196 A (免疫医疗有限公司) 2021年11月9日 (2021 - 11 - 09)<br>权利要求1, 10, 20-25, 实例1                                | 6-20               |
| X    | WO 2021148501 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 2021年7月29日 (2021 - 07 - 29)<br>权利要求1, 21-25, 实例2                         | 1, 19-20           |
| X    | WO 2021148500 A1 (MEDIMMUNE LTD) 2021年7月29日 (2021 - 07 - 29)<br>说明书第46-48页, 权利要求1                             | 1, 19-20           |
| Y    | CN 108101825 A (上海青润医药科技有限公司) 2018年6月1日 (2018 - 06 - 01)<br>权利要求1-4                                           | 6-20               |



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

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2023年2月10日

国际检索报告邮寄日期

2023年2月20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

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王一婷

电话号码 (+86) 010-53962245

| 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     |
| X       | CN 1352646 A (匹兹堡大学) 2002年6月5日 (2002 - 06 - 05)<br>实施例22, 权利要求18, 56                                                                                                                                                                                                     | 3-4, 19-20  |
| X       | SUGIMORI, Masamichi等. "Synthesis and Antitumor Activity of Ring A- and F-Modified Hexacyclic Camptothecin Analogues"<br>《Journal of Medicinal Chemistry》,<br>第41卷, 第13期, 1998年3月6日 (1998 - 03 - 06),<br>第2308-2318页                                                      | 1, 5, 19-20 |
| X       | ADAMS, David J.等. "Camptothecin analogs with enhanced activity against hyman breast cancer cells. I. Correlation of potency with lipophilicity and persistence in the cleavage complex"<br>《Cancer Chemother Pharmacol》, 第57卷, 2005年8月20日 (2005 - 08 - 20),<br>第135-144页 | 3-4, 19-20  |

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 20  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
权利要求20涉及疾病的治疗方法，不符合PCT细则39.1(iv)的规定。本检索是基于权利要求20的主题名称修改为相应的制药用途作出的。
2. ☐ 权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/139765

| 检索报告引用的专利文件 |           |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |              |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-----------|----|----------------|------|--------------|----|----------------|
| EP          | 0495432   | A1 | 1992年7月22日     | DE   | 69211023     | D1 | 1996年7月4日      |
|             |           |    |                | DE   | 69211023     | T2 | 1997年1月9日      |
|             |           |    |                | CA   | 2059305      | A1 | 1992年7月17日     |
|             |           |    |                | CA   | 2059305      | C  | 2001年7月31日     |
|             |           |    |                | NO   | 920201       | D0 | 1992年1月15日     |
|             |           |    |                | NO   | 920201       | L  | 1992年7月17日     |
|             |           |    |                | NO   | 180448       | B  | 1997年1月13日     |
|             |           |    |                | NO   | 180448       | C  | 1997年4月23日     |
|             |           |    |                | EP   | 0495432      | B1 | 1996年5月29日     |
|             |           |    |                | ES   | 2090366      | T3 | 1996年10月16日    |
|             |           |    |                | HK   | 1001561      | A1 | 1998年6月26日     |
|             |           |    |                | AU   | 1018592      | A  | 1992年7月23日     |
|             |           |    |                | AU   | 640549       | B2 | 1993年8月26日     |
|             |           |    |                | GR   | 3020395      | T3 | 1996年9月30日     |
|             |           |    |                | KR   | 920014816    | A  | 1992年8月25日     |
|             |           |    |                | KR   | 100191193    | B1 | 1999年6月15日     |
|             |           |    |                | AT   | 138661       | T  | 1996年6月15日     |
|             |           |    |                | FI   | 920194       | A0 | 1992年1月16日     |
|             |           |    |                | FI   | 920194       | A  | 1992年7月17日     |
|             |           |    |                | FI   | 103047       | B  | 1999年4月15日     |
|             |           |    |                | JPH  | 0559061      | A  | 1993年3月9日      |
|             |           |    |                | JP   | 3008226      | B2 | 2000年2月14日     |
|             |           |    |                | IE   | 920079       | A1 | 1992年7月29日     |
|             |           |    |                | RU   | 2071476      | C1 | 1997年1月10日     |
|             |           |    |                | DK   | 0495432      | T3 | 1996年10月21日    |
| CN          | 113631196 | A  | 2021年11月9日     | RS   | 63715        | B1 | 2022年11月30日    |
|             |           |    |                | JP   | 2022528851   | A  | 2022年6月16日     |
|             |           |    |                | US   | 2022211863   | A1 | 2022年7月7日      |
|             |           |    |                | LT   | 3946464      | T  | 2022年11月10日    |
|             |           |    |                | PT   | 3946464      | T  | 2022年11月16日    |
|             |           |    |                | TW   | 202104235    | A  | 2021年2月1日      |
|             |           |    |                | HRP  | 20221280     | T1 | 2022年12月23日    |
|             |           |    |                | IL   | 286291       | A  | 2021年10月31日    |
|             |           |    |                | US   | 2021322401   | A1 | 2021年10月21日    |
|             |           |    |                | US   | 11446292     | B2 | 2022年9月20日     |
|             |           |    |                | CA   | 3133757      | A1 | 2020年10月8日     |
|             |           |    |                | AU   | 2020252034   | A1 | 2021年11月11日    |
|             |           |    |                | PL   | 3946464      | T3 | 2022年12月19日    |
|             |           |    |                | DK   | 3946464      | T3 | 2022年10月31日    |
|             |           |    |                | BR   | 112021018986 | A2 | 2022年1月18日     |
|             |           |    |                | EP   | 3946464      | A1 | 2022年2月9日      |
|             |           |    |                | EP   | 3946464      | B1 | 2022年8月31日     |
|             |           |    |                | CR   | 20210541     | A  | 2021年12月20日    |
|             |           |    |                | ECSP | 21078204     | A  | 2021年11月30日    |
|             |           |    |                | CO   | 2021014566   | A2 | 2021年11月19日    |
|             |           |    |                | WO   | 2020200880   | A1 | 2020年10月8日     |
|             |           |    |                | SG   | 11202110524  | VA | 2021年10月28日    |
|             |           |    |                | CL   | 2021002498   | A1 | 2022年6月3日      |
|             |           |    |                | ES   | 2930295      | T3 | 2022年12月9日     |
|             |           |    |                | US   | 2020306243   | A1 | 2020年10月1日     |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/139765

| 检索报告引用的专利文件 |            |    |            | 公布日<br>(年/月/日) |              | 同族专利 | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|------------|----------------|--------------|------|----------------|
| WO          | 2021148501 | A1 | 2021年7月29日 | ZA             | 202106612    | B    | 2022年8月31日     |
|             |            |    |            | KR             | 20210144845  | A    | 2021年11月30日    |
| WO          | 2021148501 | A1 | 2021年7月29日 | TW             | 202140076    | A    | 2021年11月1日     |
|             |            |    |            | IL             | 294645       | A    | 2022年9月1日      |
|             |            |    |            | KR             | 20220130191  | A    | 2022年9月26日     |
|             |            |    |            | CO             | 2022011178   | A2   | 2022年8月30日     |
|             |            |    |            | BR             | 112022013966 | A2   | 2022年10月11日    |
|             |            |    |            | AU             | 2021211892   | A1   | 2022年9月8日      |
|             |            |    |            | CA             | 3167373      | A1   | 2021年7月29日     |
|             |            |    |            | ECSP           | 22064855     | A    | 2022年9月30日     |
|             |            |    |            | EP             | 4093438      | A1   | 2022年11月30日    |
|             |            |    |            | CR             | 20220393     | A    | 2022年9月16日     |
|             |            |    |            |                |              |      |                |
| WO          | 2021148500 | A1 | 2021年7月29日 | CA             | 3166732      | A1   | 2021年7月29日     |
|             |            |    |            | AU             | 2021210570   | A1   | 2022年9月1日      |
|             |            |    |            | KR             | 20220130749  | A    | 2022年9月27日     |
|             |            |    |            | BR             | 112022014391 | A2   | 2022年9月13日     |
|             |            |    |            | EP             | 4093439      | A1   | 2022年11月30日    |
| CN          | 108101825  | A  | 2018年6月1日  | 无              |              |      |                |
| CN          | 1352646    | A  | 2002年6月5日  | US             | 6136978      | A    | 2000年10月24日    |
|             |            |    |            | JP             | 2002532505   | A    | 2002年10月2日     |
|             |            |    |            | JP             | 4638987      | B2   | 2011年2月23日     |
|             |            |    |            | KR             | 20010101250  | A    | 2001年11月14日    |
|             |            |    |            | KR             | 100750693    | B1   | 2007年8月22日     |
|             |            |    |            | NZ             | 512210       | A    | 2004年12月24日    |
|             |            |    |            | AU             | 3123600      | A    | 2000年7月3日      |
|             |            |    |            | AU             | 777786       | B2   | 2004年10月28日    |
|             |            |    |            | EP             | 1140948      | A1   | 2001年10月10日    |
|             |            |    |            | EP             | 1140948      | A4   | 2008年1月2日      |
|             |            |    |            | WO             | 0035924      | A1   | 2000年6月22日     |
|             |            |    |            | CA             | 2353822      | A1   | 2000年6月22日     |
|             |            |    |            | CA             | 2353822      | C    | 2011年5月31日     |
|             |            |    |            | HK             | 1044156      | A1   | 2002年10月11日    |
|             |            |    |            | HK             | 1044156      | B    | 2005年4月8日      |