202241521

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202241521 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：111103218 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 01 月 25 日

(51)Int. Cl.： *A61K47/68 (2017.01)* *C07D491/22 (2006.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/02/09 中國大陸 202110178136.1

2021/03/30 中國大陸 202110340806.5

2021/07/21 中國大陸 202110825932.X

2021/07/21 中國大陸 202110825922.6

2021/07/21 中國大陸 202110825906.7

(71)申請人：大陸商蘇州宜聯生物醫藥有限公司 (中國大陸) MEDILINK THERAPEUTICS (SUZHOU) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：蔡 家強 CAI, JIAQIANG (GB)

(74)代理人：李彥慶；林宗武

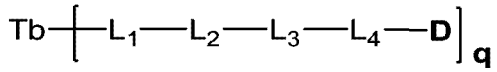
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：51 項 圖式數：19 共 646 頁

(54)名稱

生物活性物偶聯物及其製備方法和用途

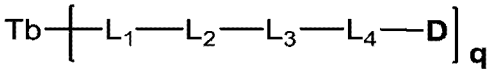
(57)摘要

本公開涉及生物活性物偶聯物及其製備方法和用途，具體公開了式 XV 所示的配體藥物偶聯物、其製備方法，以及其在預防和/或治療與細胞活動異常相關的疾病，包括但不限於在預防和/或治療腫瘤疾病中的用途。



式XV

The present invention relates to a biologically active conjugate and preparation method and use thereof. Specifically, a ligand-drug conjugate as represented by formula XV, and a preparation method and use thereof in preventing and/or treating diseases associated with abnormal cellular activity are disclosed, the use includes but is not limited to preventing and/or treating tumor diseases.



Formula XV

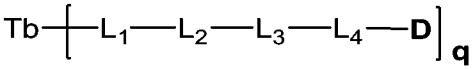
20224527
202241921
專利案號：111103218

【發明摘要】

【中文發明名稱】生物活性物偶聯物及其製備方法和用途

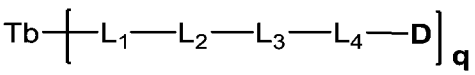
【英文發明名稱】BIOLOGICALLY ACTIVE CONJUGATE AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

【中文】 本公開涉及生物活性物偶聯物及其製備方法和用途，具體公開了式XV所示的配體藥物偶聯物、其製備方法，以及其在預防和/或治療與細胞活動異常相關的疾病，包括但不限於在預防和/或治療腫瘤疾病中的用途。



式XV

【英文】The present invention relates to a biologically active conjugate and preparation method and use thereof. Specifically, a ligand-drug conjugate as represented by formula XV, and a preparation method and use thereof in preventing and/or treating diseases associated with abnormal cellular activity are disclosed, the use includes but is not limited to preventing and/or treating tumor diseases.



Formula XV

【指定代表圖】　　無

【代表圖之符號簡單說明】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】生物活性物偶聯物及其製備方法和用途

【英文發明名稱】BIOLOGICALLY ACTIVE CONJUGATE AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】本公開屬於醫藥技術領域，涉及生物活性物偶聯物（配體藥物偶聯物）、化合物、藥物連接體偶聯物及其製備方法，以及其在預防和/或治療與細胞活動異常相關的疾病，包括但不限於在預防和/或治療腫瘤疾病中的用途。

【0002】本申請要求申請日為2021/2/9的中國專利申請2021101781361的優先權；要求申請日為2021/3/30的中國專利申請2021103408065的優先權；要求申請日為2021/7/21的中國專利申請202110825932X的優先權；要求申請日為2021/7/21的中國專利申請2021108259226的優先權，序列表txt的檔也於2021/7/21與中國專利申請2021108259226同時提交；要求申請日為2021/7/21的中國專利申請2021108259067的優先權，序列表txt的檔也於2021/7/21與中國專利申請2021108259067同時提交。本申請引用上述中國專利申請的全文。本申請包含的序列列表是說明書的一部分，並且本文通過引用整體併入本文。

【先前技術】

【0003】利用細胞毒的化療一度是癌症的標準療法，但高殺傷力的細胞毒

素分子會殺傷正常細胞，引起嚴重的毒副作用。靶向抗腫瘤藥物由於同時具有靶向性和抗腫瘤活性，已成為當今腫瘤研究領域的熱點，但經常由於靶向藥物的靶點選擇性問題產生比較大的毒副作用，從而限制了靶向藥物的治療效果。生物大分子藥物，如抗體或抗體片段，雖然靶向性強，但對實體瘤的治療效果有限，或者根本不具有治療效果。ADC是抗體和小分子藥物的偶聯體，融合了抗體的靶向作用和生物活性分子的活性，成為一種生物導彈，具有非常可期待的療效和安全性優勢。抗體引導ADC結合到靶細胞，隨後被細胞內化，小分子藥物在細胞內通過特定酶作用下發生的酶解釋放，治療疾病。

【0004】ADC藥物近幾年發展非常迅速，已經上市的ADC有14種：（1）Mylotarg（Gemtuzumab Ozogamicin，吉妥珠單抗（CD33）-卡齊黴素），CD33陽性急性髓性白血病（AML），2000年FDA批准上市，2010年下市，2017年重新上市；（2）Adcetris（Brentuximab Vedotin，CD30單抗-MMAE），經典霍奇金淋巴瘤和間變性大細胞淋巴瘤，2011年FDA批准上市；（3）Kadcyla（Trastuzumab Emtansine，曲妥珠單抗（Her2）-美登素生物鹼TM1），HER2陽性乳腺癌，2013年FDA批准上市；（4）Besponsa（Inotuzumab ozogamicin，CD22單抗-卡奇黴素），成人復發或難治性B細胞淋巴細胞白血病，2017年批准上市；（5）Lumoxiti（Moxetumomab pasudotox-tdfk, CD22-假單胞菌外毒素），復發性或難治性毛細胞白血病（HCL），2018年上市；（6）Polivy（Polatuzumab vedotin-piiq, CD79b-MMAE），復發性或難治性彌漫性大B細胞淋巴瘤（R/R DLBCL），2019年上市；（7）Padcev（Enfortumab vedotin-ejfv, Nectin 4-MMAE），局部晚期

或轉移性尿路上皮癌（UC），2019年上市；（8）Enhertu（Famtrastuzumab deruxtecan-nxki, Her2-拓撲異構酶I抑制劑），乳腺癌，2019年上市；（9）Trodelvy（Trop2-拓撲異構酶I抑制劑 ADC），三陰乳腺癌，2020年4月FDA批准上市；（10）BCMA ADC Belantamab mafodotin（GSK2857916）；(11) CD19 ADC Zynlonta (loncastuximab tesirine); (12) EGFR ADC Akalux; (13) Her2 ADC 維迪西妥單抗RC48；（14）Tissue Factor ADC Tivadak（tisotumab vedotin）。

【0005】ADC藥物由抗體、生物活性分子（藥物分子）及連接體（Linker）三部分組成。生物活性分子通過連接體共價偶聯到抗體上。除了靶向性和生物活性，生物活性分子與抗體的偶聯方式也是ADC藥物的核心之一，其決定了藥品的均一性和穩定性，極大地影響ADC的藥代動力學性質和毒性等。生物活性分子與抗體連接部分的穩定性的提高，會增加ADC體循環穩定性，減少藥物在非靶向組織的脫落，從而相對增加了帶入靶細胞內和靶細胞附近周圍的藥物，增加生物活性分子在靶細胞內及附近的釋放量，可以進一步的增效減毒。因此，增加生物活性分子與抗體連接穩定性是ADC藥物研究中極為重要的技術領域之一。

【0006】目前上市的10種ADC抗體和連接體的偶聯方式主要有兩種：（1）離胺酸是抗體中最常見的連接位點，其ε-胺基可以與連接體的活化羧基反應，形成醯胺鍵。目前已有可以實現定點偶聯的技術，即以活化基團活化連結子的羧基，再與抗體中特定的離胺酸ε-胺基形成醯胺鍵，完成偶聯。一方面，通過此類醯胺鍵實現定點定量偶聯還不具有廣譜實用性，只能在某些特定情況下使用；另一方面，在體內酶的作用下，易發生水解，導致

生物活性分子與抗體在未達到靶細胞時即發生脫落，增加了毒性。(2) 抗體半胱胺酸的巯基（SH），都是以二硫鍵的形式存在。打開抗體中的二硫鍵，可以提供多個自由的巯基作為偶聯位點。與抗體巯基進行偶聯，一種方法是抗體上自由的巯基與馬來醯亞胺發生Michael加成反應，也可以是特定的基質與抗體上自由的巯基通過兩次Michael加成反應，形成一個結構獨特的硫橋鍵。但有較多文獻報導，通過巯基Michael加成方法得到的ADC，會有30%或更多的ADC在體循環中發生逆Michael加成，產生毒素提前脫落而發生毒性反應。

【0007】抗體偶聯藥物根據發展歷程可以分為四代：

【0008】第一代抗體偶聯藥物是基於鼠源抗體，這類抗體由於可以產生複雜的免疫原性，從而具有很強的毒副作用；

【0009】第二代抗體偶聯藥物是在第一代的基礎上使用人源化或全人源抗體，第二代抗體偶聯藥物的成藥性質得到了巨大改善。第一代和第二代抗體偶聯藥物在抗體和藥物的連接上是相對隨意的，因而最終抗體偶聯藥物產品為一個多組份混合物，這類藥物不但毒性大，其品質也難以控制；

【0010】第三代抗體偶聯藥物在使用人源化或全人源抗體的基礎上，同時實現毒素-連接體（linker）和抗體的定點-定量偶聯，從而生成均一性的單分子抗體偶聯藥物，這類抗體偶聯藥物的毒性和品質控制比第二代抗體偶聯藥物有很大改進；

【0011】第四代抗體偶聯藥物是在第三代的基礎上，對毒素-連接體（linker）進行了革新。第四代抗體偶聯藥物一改過去以高毒性毒素為基礎的抗體偶聯藥物策略，選用相對低毒性的喜樹鹼類分子作為生物活性成

分，同時採用高毒素-抗體比（DAR），如DAR值8，這類ADC對腫瘤表面抗原低表達的腫瘤也能產生很好的治療效果。第四代抗體偶聯藥物儘管起步晚，但由於其顯著的療效，異軍突起，很快獲得了臨床認可，其代表性藥物Enhertu和Trodelvy已被FDA批准上市。但目前第四代ADC依然存在穩定性差或溶解度低的問題，已有技術缺乏普適性，仍然需要進一步開發新的毒素-linker來解決這些問題。

【0012】已有的抗體偶聯藥物一般是通過ADC中的抗體和腫瘤細胞表面抗原結合，然後發生細胞內吞進入核內體（endosome），再從核內體向溶酶體轉化，然後在溶酶體中水解酶的作用下將生物活性分子（毒素或payload）從ADC解離下來，解離下來的生物活性分子從溶酶體進入胞漿後殺傷腫瘤細胞，從殺傷腫瘤細胞後逃逸的生物活性分子可以進一步殺傷其周圍抗原不表達或低表達的腫瘤細胞（即所謂的旁觀者效應，by-stander effect）。在這整個過程中，任何一個環節的變化都可以使ADC產生耐藥性而失去治療效果，如治療過程中抗原表達發生變化，內吞減弱甚至失去內吞，核內體或溶酶體功能發生變化等等。因此尋找一種能在體內血液循環體系中穩定的ADC、同時這種ADC又能在腫瘤微環境中不需要細胞內吞而產生胞外裂解將毒素解離脫落來殺傷腫瘤，這種ADC將能克服傳統ADC存在的多種耐藥機制，因而在臨床治療上將具有非常重大的意義。

【0013】儘管有證據表明Immunomedics和Gilead的Trodelvy可以不需要內吞而在腫瘤細胞外裂解，但由於Trodelvy在血漿和水溶液中非常不穩定，其血漿半衰期小於24小時，因而這類ADC只能用於生物活性低的毒素組成的ADC去避免ADC毒素提前脫落產生的非靶向毒副作用。

【0014】此外傳統ADC的連接體的功能是完成細胞內的酶切或利用其調節水溶性等，如何能讓連接體在滿足酶切要求的同時，利用連接體實現ADC在腫瘤組織中的富集，對降低ADC在正常組織中的毒副作用也具有重要意義。

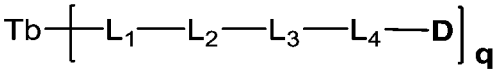
【0015】另外，B7H3為B7家族的I型跨膜蛋白，在人體中具有兩種同種型2Ig-B7H3和4Ig-B7H3。B7H3在正常組織中廣泛的表達，僅組成型表達於非免疫靜息期纖維細胞、內皮細胞、成骨細胞和羊水幹細胞，誘導性表達於活化的T、NK、DC和巨噬細胞上，未在淋巴器官檢測到陽性表達（Chapoval, A.I., et al., B7H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN production. Nature Immunology, 2001. 2(3): p. 269-274）。研究表明，約76.5%的早期肝癌患者血清中的B7H3較正常人高3倍左右（60.79 ± 19.45 Vs 20.52 ± 8.46ng/mL），但與疾病進程的相關性尚不清（Zhao, L., et al., Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatocirrhosis by Soluble B7H3. Journal of Gastrointestinal Surgery. 21(5): p. 807-812）。

【0016】目前，臨床前研究中有針對B7H3靶點的治療策略。例如，針對小鼠B7H3的抗體將增強腫瘤中浸潤的CD8陽性T細胞並抑制腫瘤生長（Mod Pathol . 2010 Aug;23(8):1104-12.）。此外，WO2008/066691顯示識別B7H3變體B7H3a的抗體在體內對腺癌具有抗腫瘤作用。在臨床研究中，小鼠B7H3抗體和放射性碘131的結合藥物可以顯著抑制患者神經母細胞瘤的生長[Jneufoocol 97（3）：409-18（2010）]。

【發明內容】

【0017】為了改進抗體藥物偶聯物（ADC）或其它配體藥物偶聯物（PDC）的治療效果，降低藥物毒副作用，提高治療範圍(therapeutic window)，本公開提供一種式（XV）所示的配體藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其含有生物活性分子（藥物分子）、連接體和靶向部分，所述靶向部分通過活性基團（例如巯基）與所述連接體連接形成配體藥物偶聯物。本公開還開發了包含結合B7H3分子的可變輕鏈結構域和/或可變重鏈(VH)結構域，所述可變輕鏈結構域和/或可變重鏈(VH)結構域抗體來自人源抗體。

【0018】為此，在本公開的第一方面，本公開提供了式XV所示的配體藥物偶聯物，



式 XV

或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，

其中：

Tb為和靶點結合的配體或靶向部分；

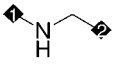
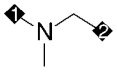
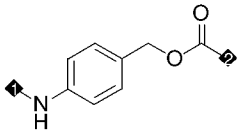
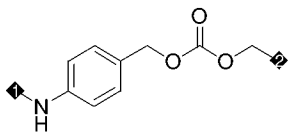
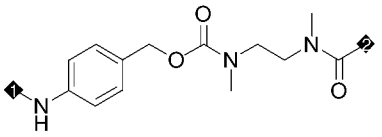
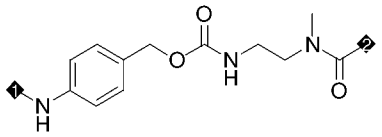
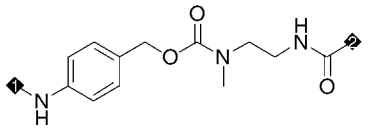
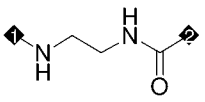
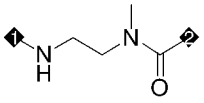
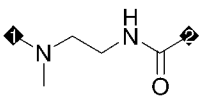
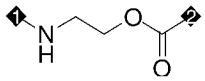
q為藥物配體偶聯比；

D為生物活性分子片段；

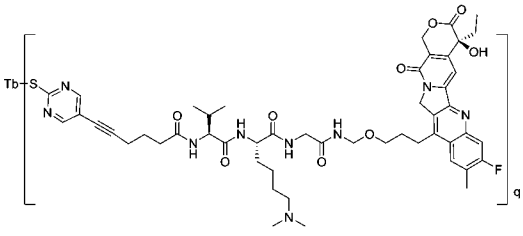
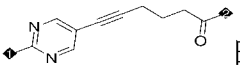
L_1為延伸單元；

L_2不存在或為連接單元；

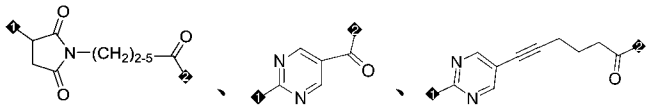
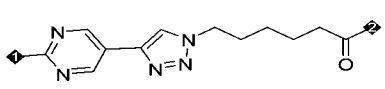
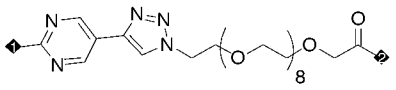
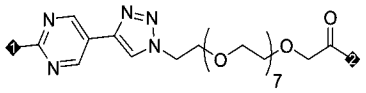
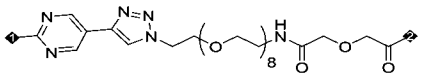
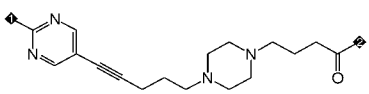
L_3選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽；

L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

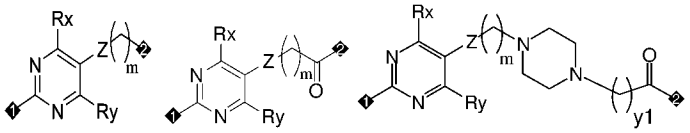
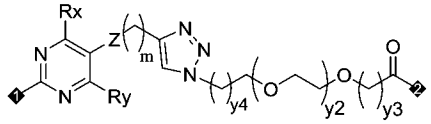
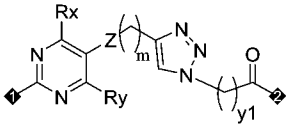
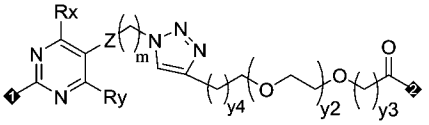
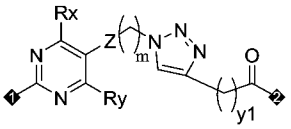
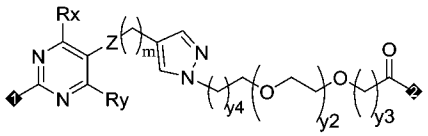
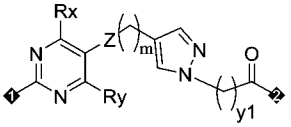
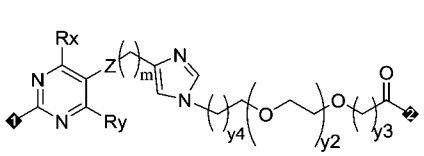
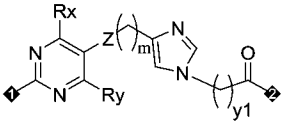
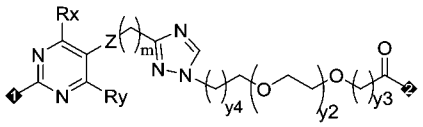
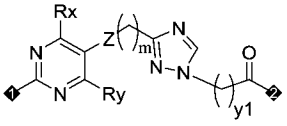
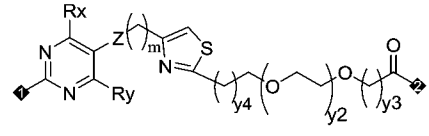
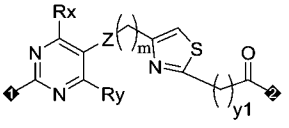
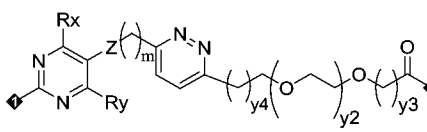
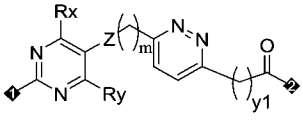
【0019】另外，還需要說明的是，對於“L_1的1位通過S原子與Tb相連”，本發明所屬技術領域具有通常知識者可以理解的是，L_1的1位是與打開二硫鍵（例如，通過還原劑TCEP還原二硫鍵可以打開二硫鍵，生成巰基-SH）後的Tb（如抗體）自身所含有巰基進行連接，也就是說，L_1與Tb之間的-S-並非另外再外接的硫原子。

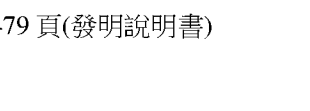
例如，  中，-S-並非另外外接的硫原子，而是打開雙硫鍵後的Tb自身所含有巰基與L_1例如  的1位進行連接後形成的-S-。

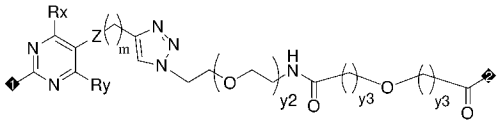
【0020】延伸單元為配體藥物偶聯物或藥物連接體偶聯物或連接體的組分，其作用是將和靶點結合的配體或靶向部分與配體藥物偶聯物的其餘部分或連接體的其餘部分相連。延伸單元能夠將Tb單元連接於L_2（如果存在）或L_3，具體實例包括但不限於(其中1位與靶點結合的配體或靶向部分

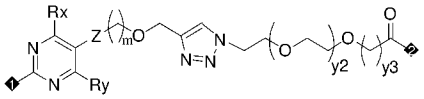
相連、2位與L_2或L_3相連)：  、  、  、  、  、  。

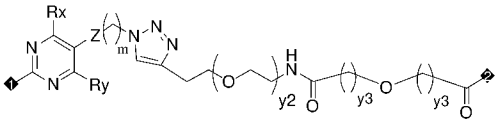
【0021】在一些實施方案中，L_1選自：

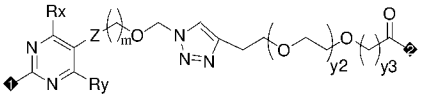
















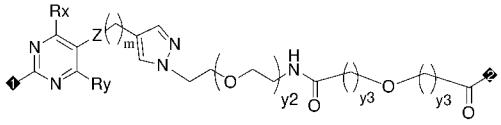


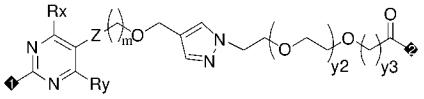


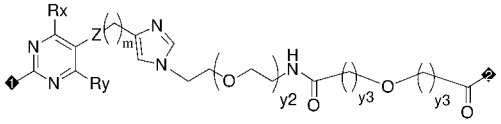


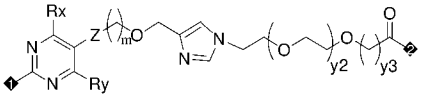


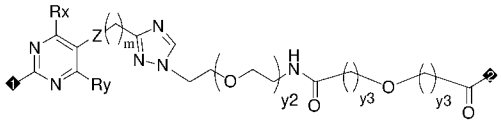


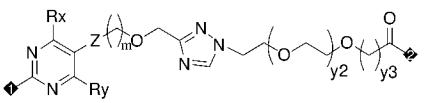


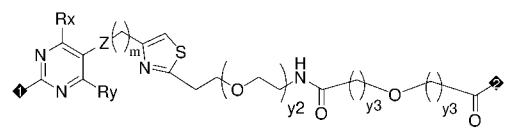


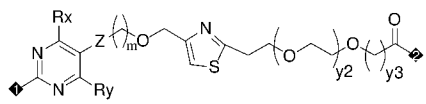


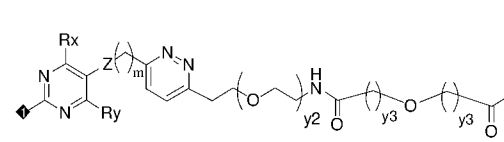


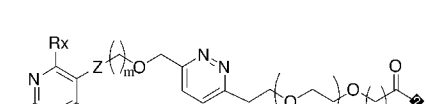


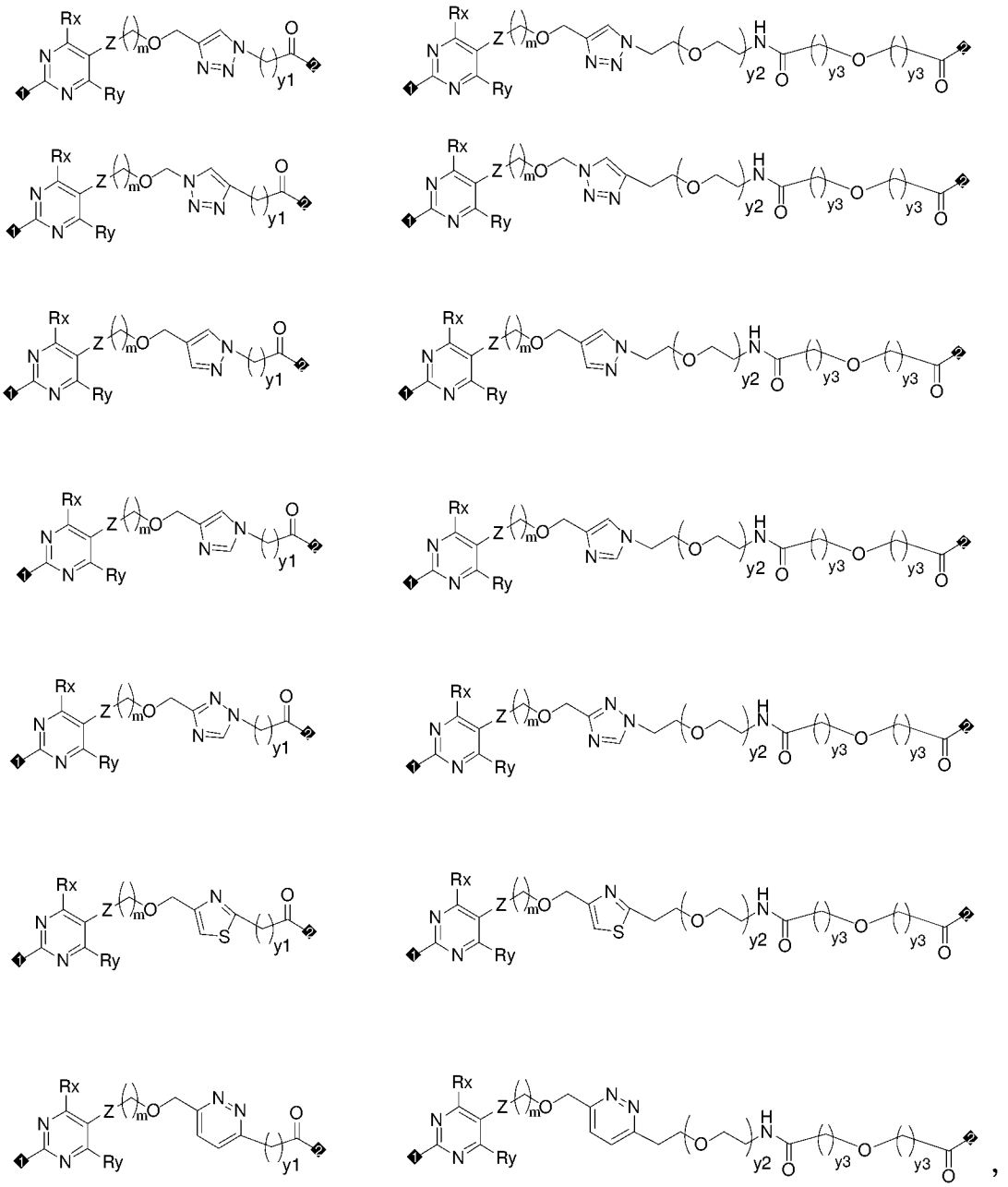












各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10芳基、5-10元雜芳基、醯胺基、磺醯胺基、亞胺基和CF_2；

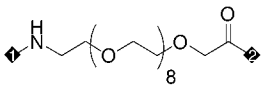
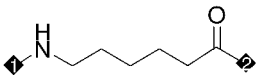
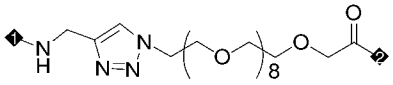
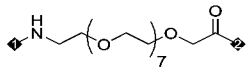
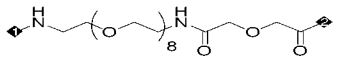
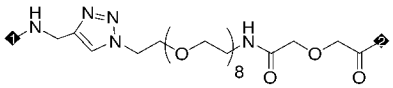
Rx和Ry獨立地選自H和C1-4烷基；

各m獨立地選自0、1、2、3、4、5和6；

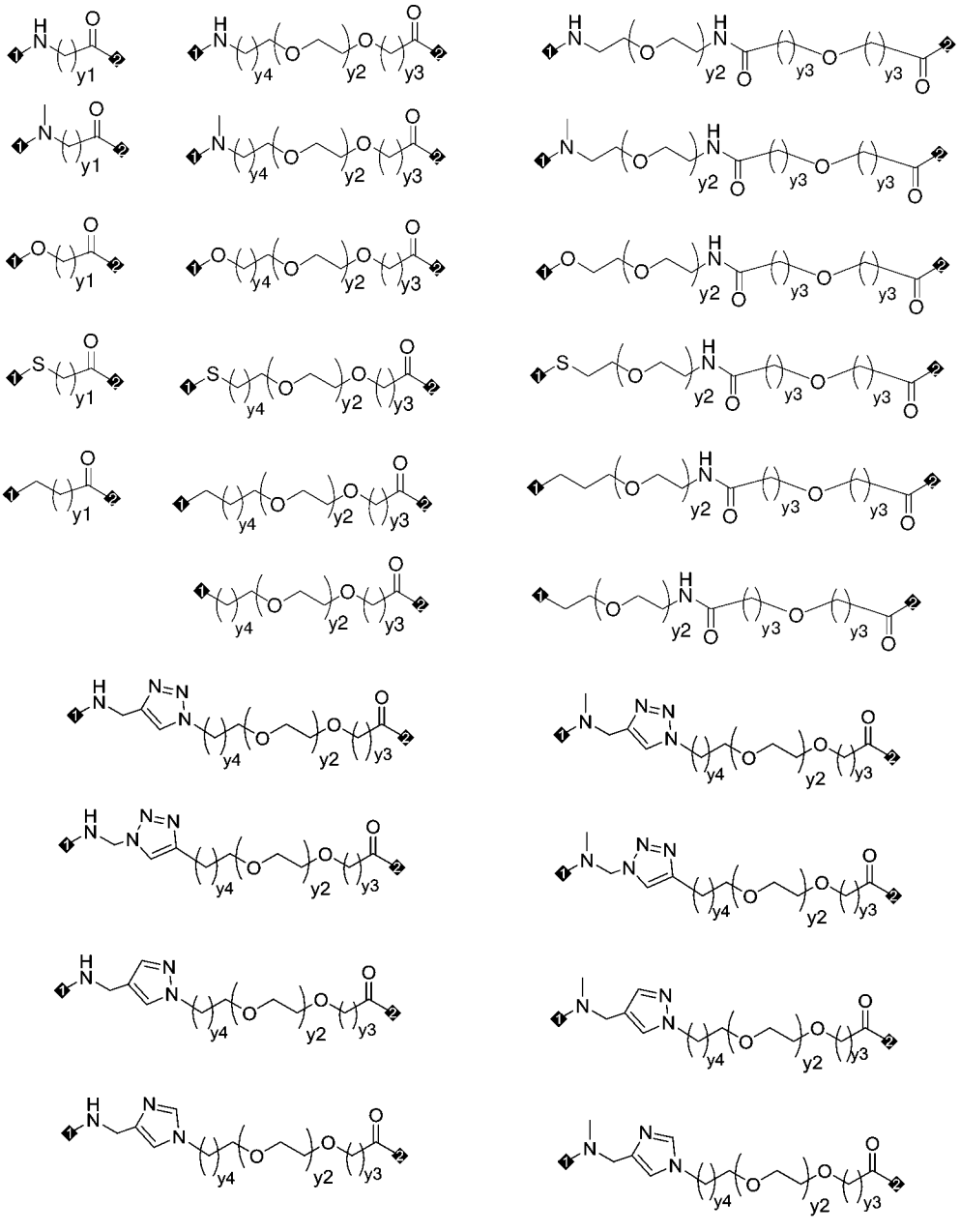
y1、y2、y3和y4獨立地選自0-20之間的任意整數；

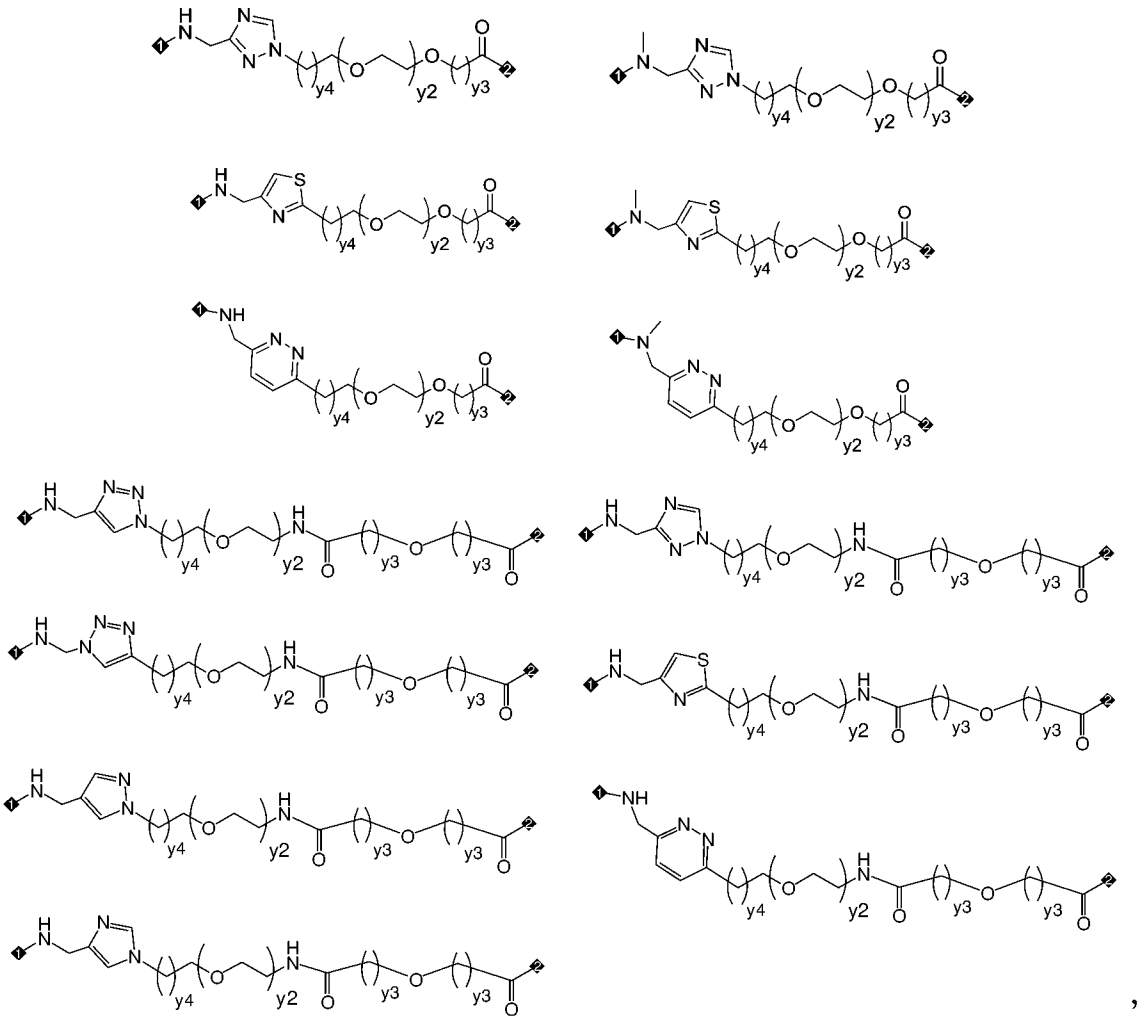
1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

【0022】連接單元為配體藥物偶聯物或藥物連接體偶聯物或連接體的組

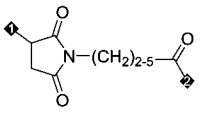
分，其作用是用來結合延伸單元與胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽。連接單元存在時能夠將L_1連接於L_3。具體實例包括但不限於(其中1位與延伸單元相連、2位與L_3相連)：  、  、  、  、  和  。

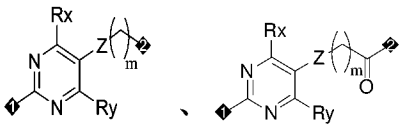
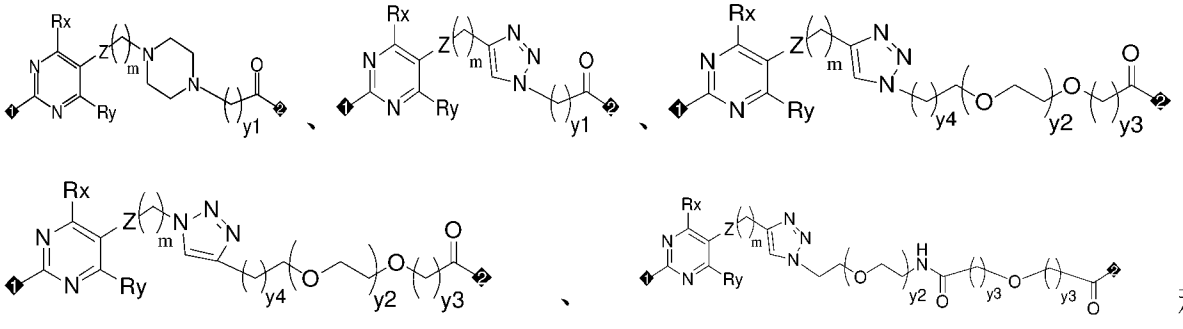
【0023】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自：

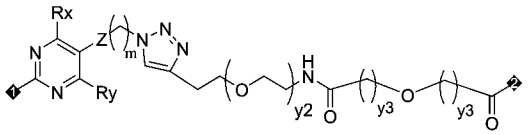


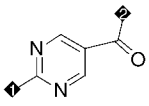
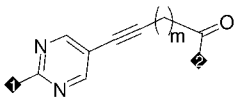
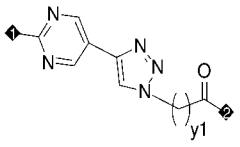
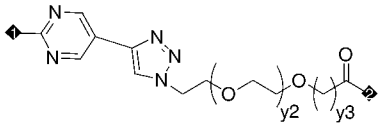
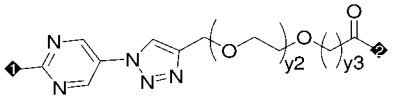
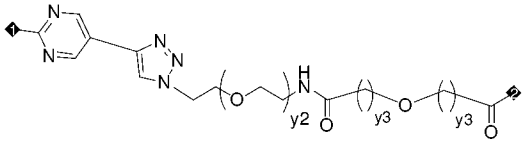
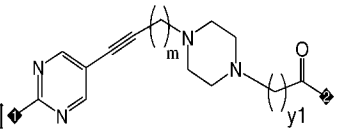


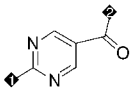
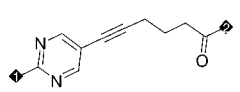
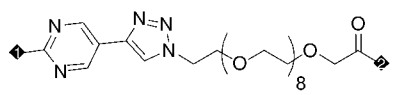
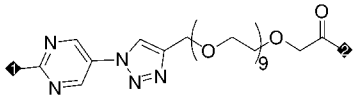
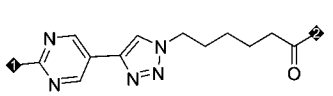
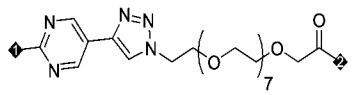
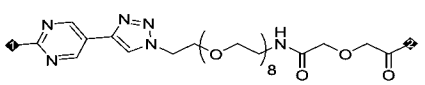
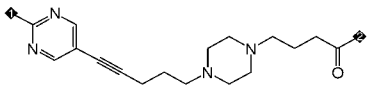
y1、y2、y3和y4獨立地選自0-20之間的任意整數，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

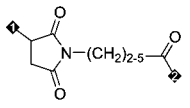
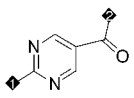
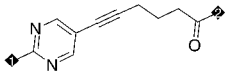
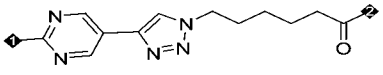
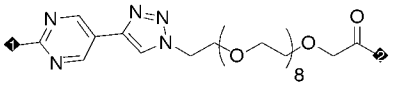
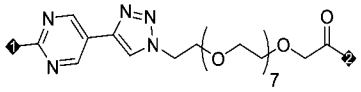
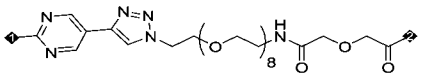
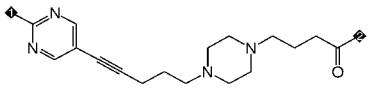
【0024】在一些實施方案中，L_1為  。

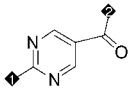
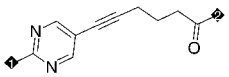
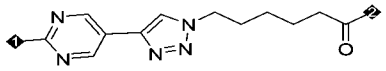
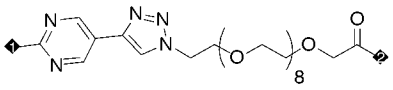
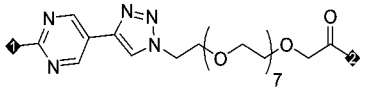
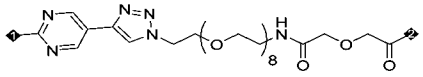
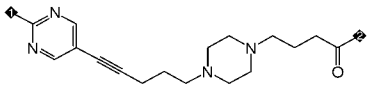
【0025】在一些實施方案中，L_1選自  、  、 和

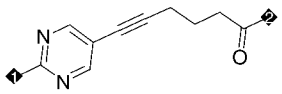
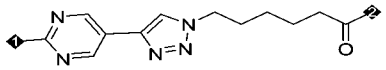
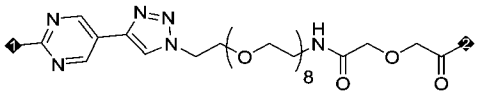
 ，各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10芳基、5-10元雜芳基和醯胺基（優選選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵）；Rx、Ry獨立地選自H和C1-4烷基；各m獨立地選自0、1、2、3、4、5和6；y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6）；各y2獨立地選自0-15（如6-15）之間任意整數；各y3獨立地選自1、2和3；各y4獨立地選自0和1；1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

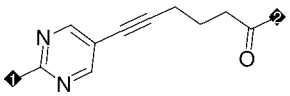
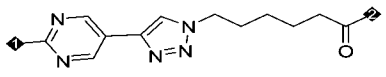
【0026】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  和  ，m選自2、3、4，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-10（如6-10）之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

【0027】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

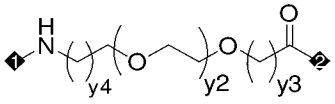
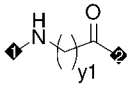
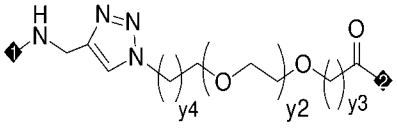
【0028】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  、  。

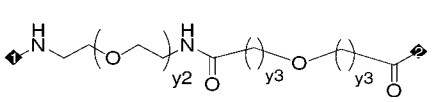
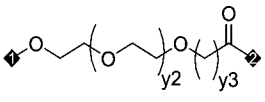
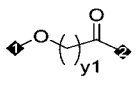
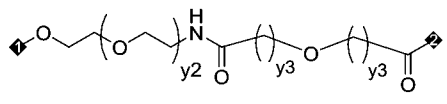
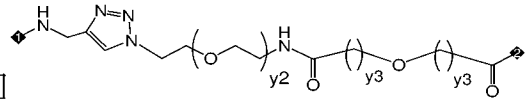
【0029】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

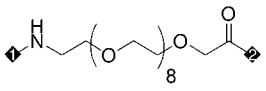
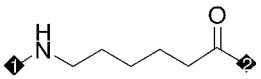
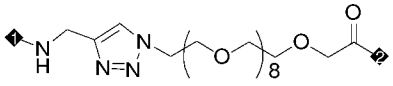
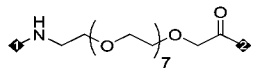
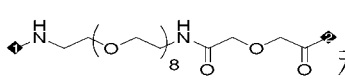
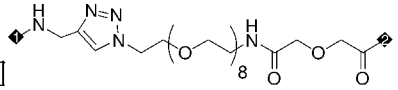
【0030】在一些實施方案中，L_1選自  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

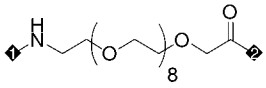
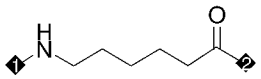
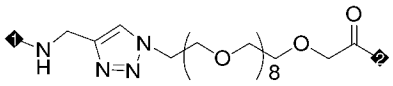
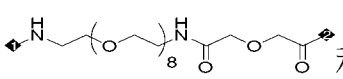
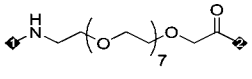
【0031】在一些實施方案中，L_1選自  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

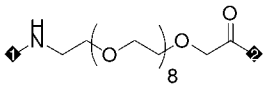
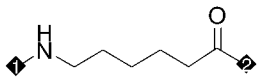
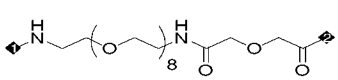
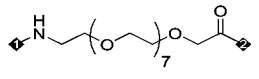
【0032】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自

 、  、  、

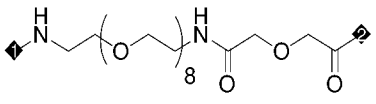
 、  、  、  和  ，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-10（如6-10）之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，各y4獨立地選自0或1，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0033】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0034】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0035】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0036】在一些實施方案中，L_2不存在。

【0037】在一些實施方案中，L_2選自  。

【0038】在一些實施方案中，L_3選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組

成的短肽；所述的胺基酸殘基選自天然胺基酸殘基、非天然胺基酸殘基、或選自AA_1所示胺基酸殘基或其立體異構體。

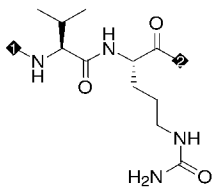
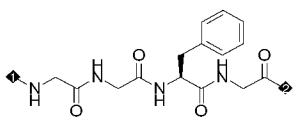
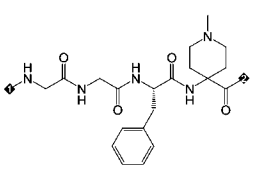
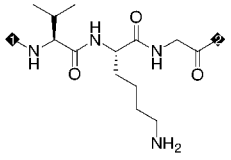
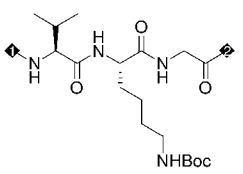
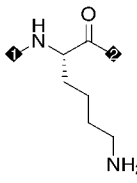
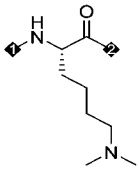
【0039】在一些實施方案中，L_3選自胺基酸殘基Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1或由2-10個選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1的胺基酸殘基組成的短肽。

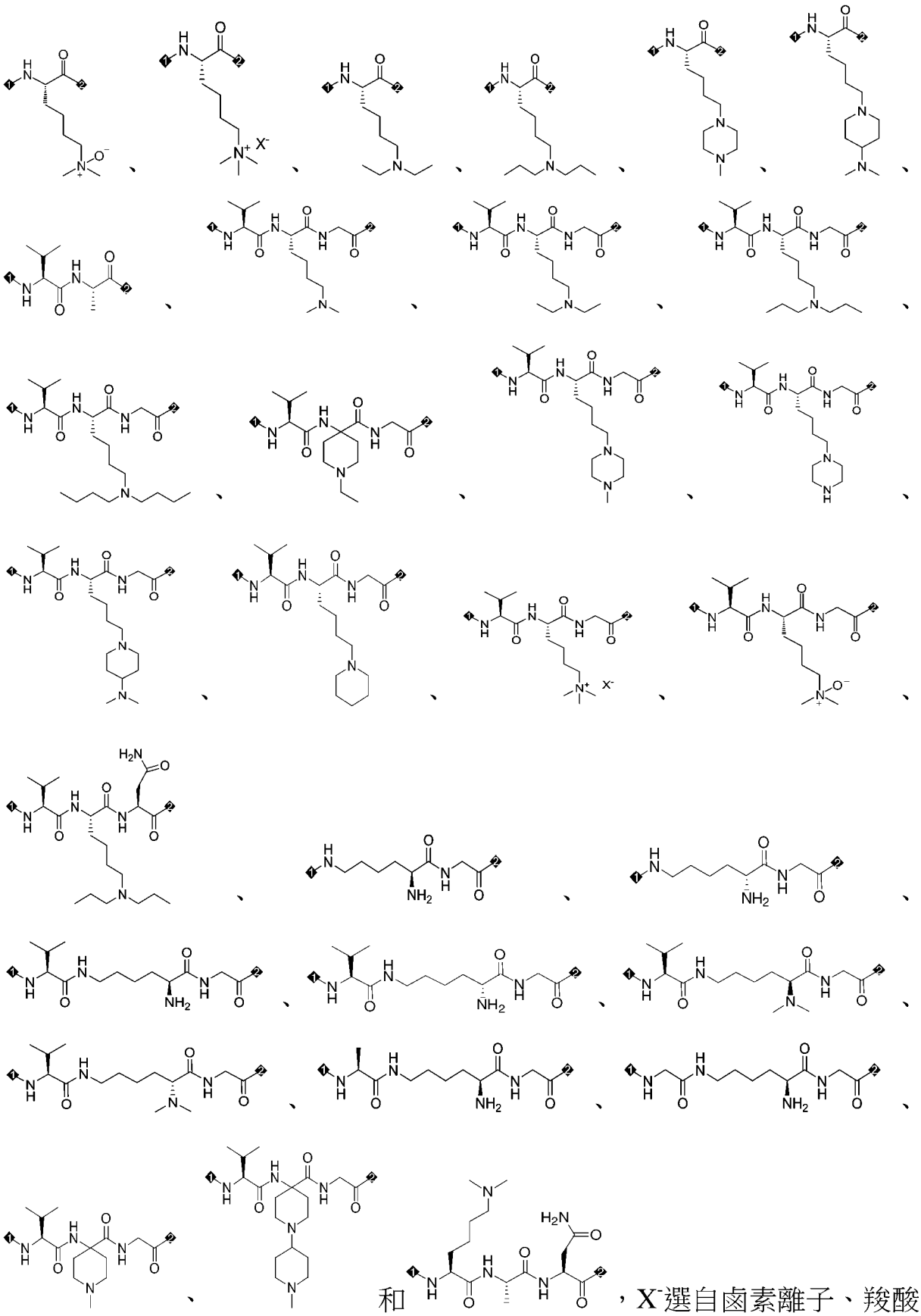
【0040】在一些實施方案中，L_3選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys和Lys-Ala-Asn。

【0041】在一些實施方案中，L_3選自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn和Gly-Gly-Phe-Gly。

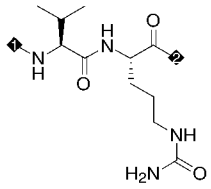
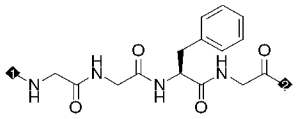
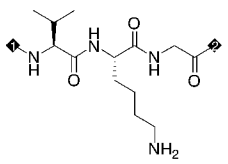
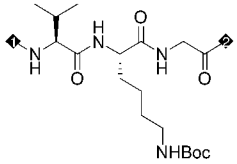
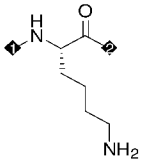
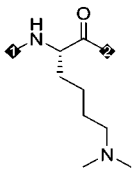
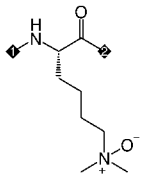
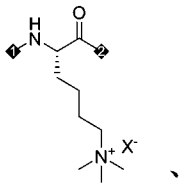
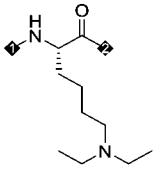
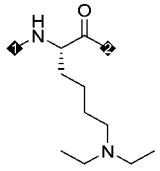
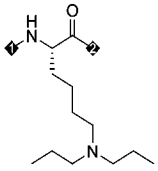
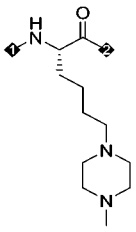
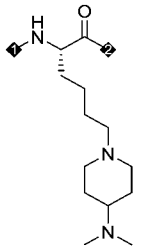
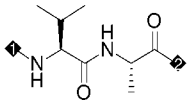
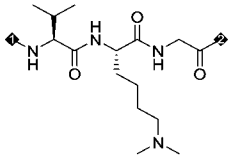
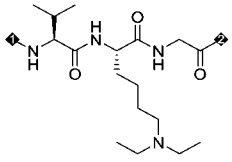
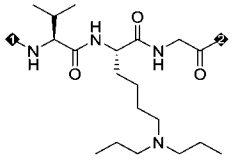
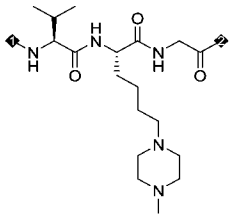
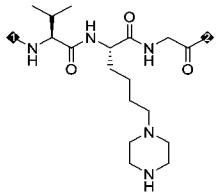
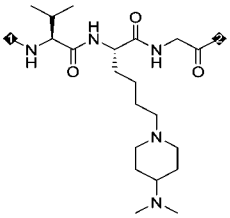
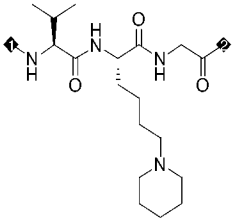
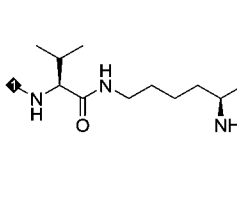
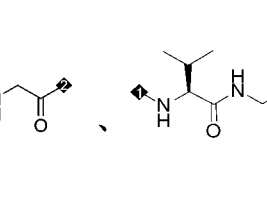
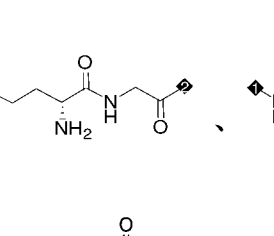
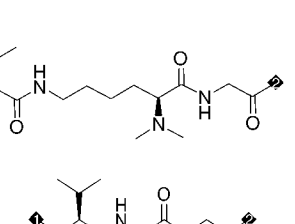
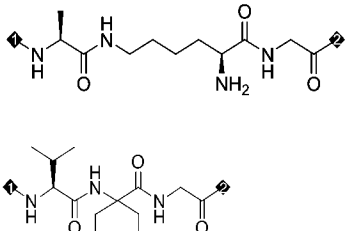
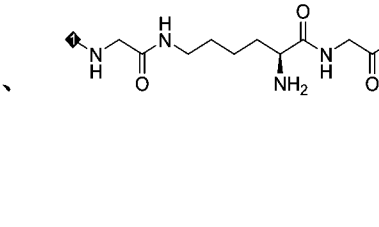
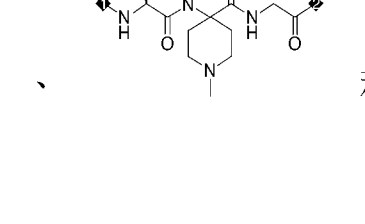
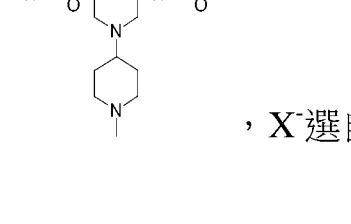
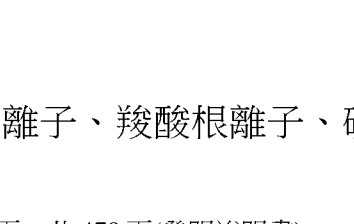
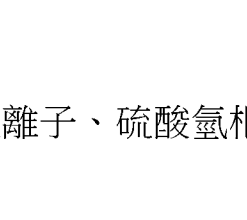
【0042】在一些實施方案中，L_3選自AA^1和Val-AA^1-Gly。

【0043】在一些實施方案中，L_3選自Val-AA^1-Gly。

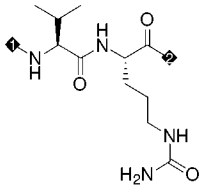
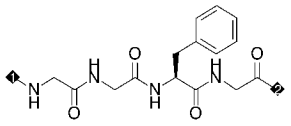
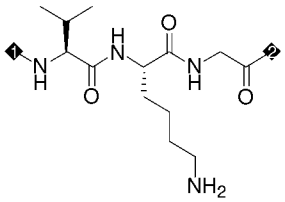
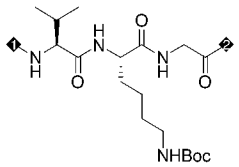
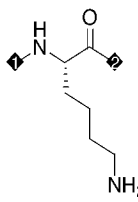
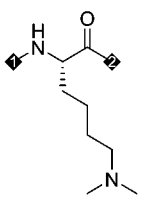
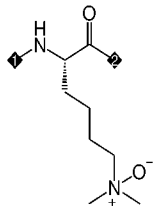
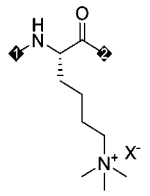
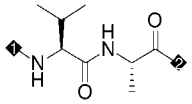
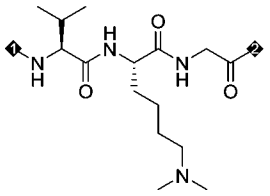
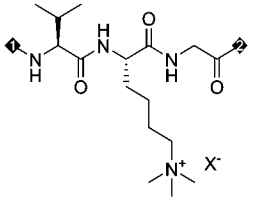
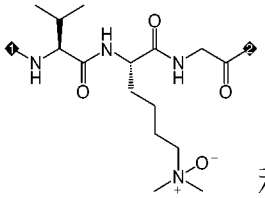
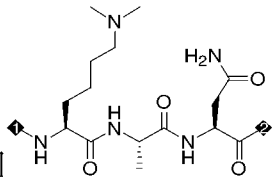
【0044】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、

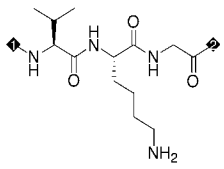
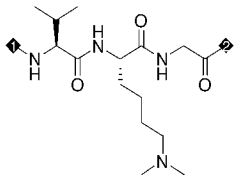
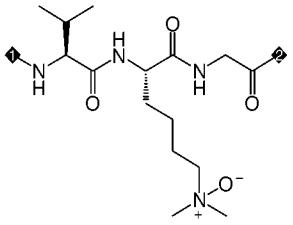
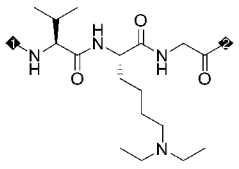
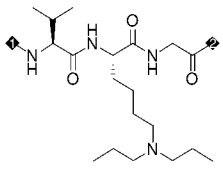
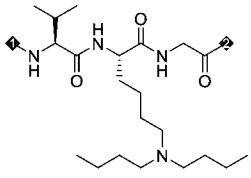
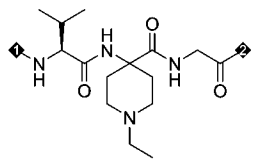
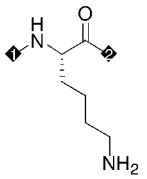
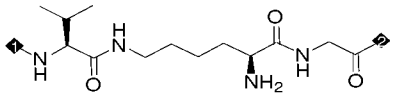
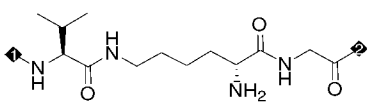


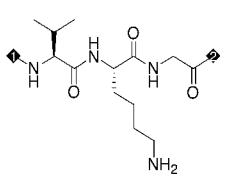
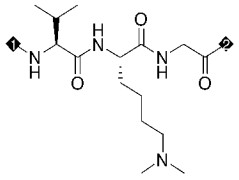
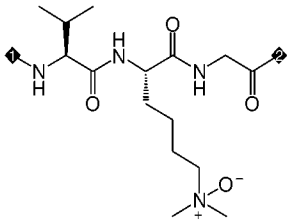
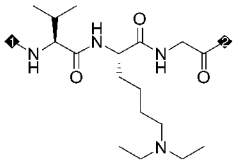
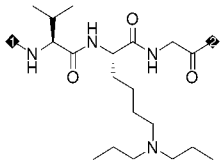
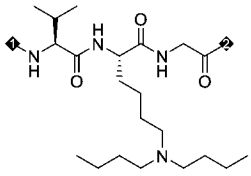
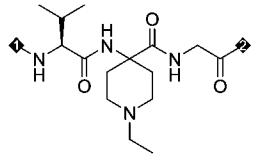
和 ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

【0045】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、、、、、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和 ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離

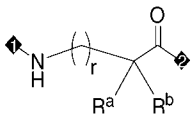
子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

【0046】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

【0047】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

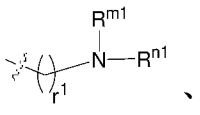
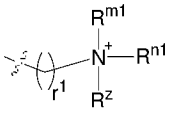
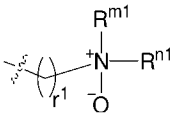
【0048】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

【0049】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基的結構如下所示，



AA^1

其中：

R^a、R^b各自獨立地選自H、  、  和  ，且R^a、R^b不同時為H；

或者，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成4-10元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代；

r、r^1各自獨立地選自0到20的任意整數；

R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基和-$COOR^{x1}$；

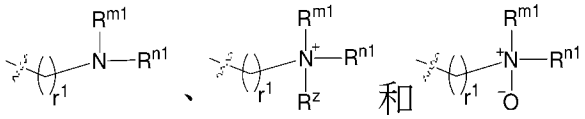
R^{x1}選自C1-6烷基；

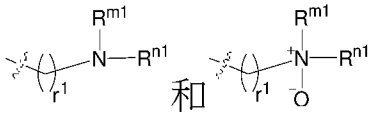
或者，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成4-10元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個$R^{0'}$所取代；

R^z選自C1-6烷基；

R^0、$R^{0'}$各自獨立地選自C1-6烷基、C3-6環烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$和任選被C1-6烷基取代的4-10元雜環基；

R^{m2}、R^{n2}各自獨立地選自H和C1-6烷基。

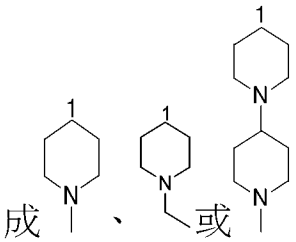
【0050】在一些實施方案中，R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自  。

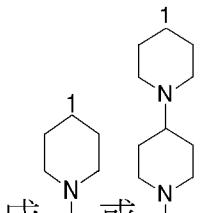
【0051】在一些實施方案中，R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自  。

【0052】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環。

【0053】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶環或哌咔環。

【0054】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶環。

【0055】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成  ，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【0056】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成  ，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【0057】在一些實施方案中，r、r^1各自獨立地選自0、1、2、3、4和5。

【0058】在一些實施方案中，r、r^1各自獨立地選自0和4。

【0059】在一些實施方案中，r、r^1中，任一個為0，另一個為4。

【0060】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3和-COOCH2CH2CH2CH3。

【0061】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基和第三丁氧羰基。

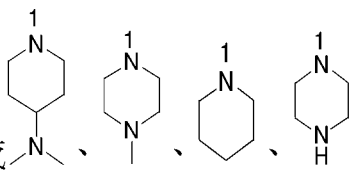
【0062】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H和C1-6烷基。

【0063】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基和正丙基。

【0064】在一些實施方案中，r、r^1中，r為4，r^1為0時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基（如H、甲基）；r為0，r^1為4時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自C1-6烷基（如甲基、乙基、正丙基），優選選自C2-6烷基（如乙基、正丙基）。

【0065】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成任選被$R^{0'}$取代的5-6元雜環。

【0066】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成任選被$R^{0'}$取代的哌啶環或哌啡環。

【0067】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成  ，1號氮原子為與R^{m1}和R^{n1}共同相連的氮原子。

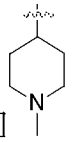
【0068】在一些實施方案中，R^z為甲基。

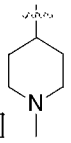
【0069】在一些實施方案中，R^0、$R^{0'}$各自獨立地選自C1-6烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$和任選被C1-6烷基取代的5-6元雜環基。

【0070】在一些實施方案中，R^0選自C1-6烷基和被C1-6烷基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基選自哌啶基和哌啡基。

【0071】在一些實施方案中，R^0選自甲基、乙基和被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基。

【0072】在一些實施方案中，R^0選自甲基和被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基。

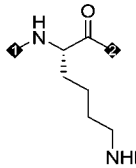
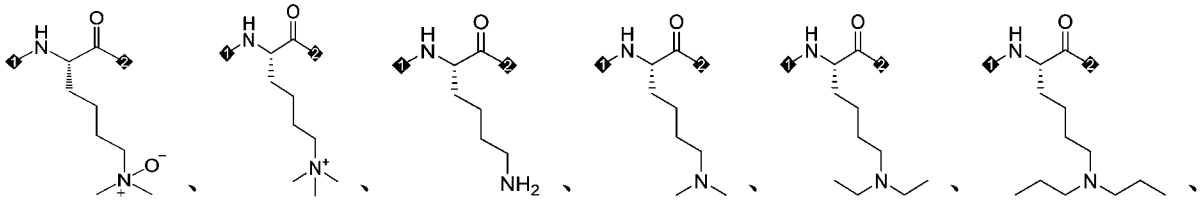
【0073】在一些實施方案中，R^0選自甲基、乙基和  。

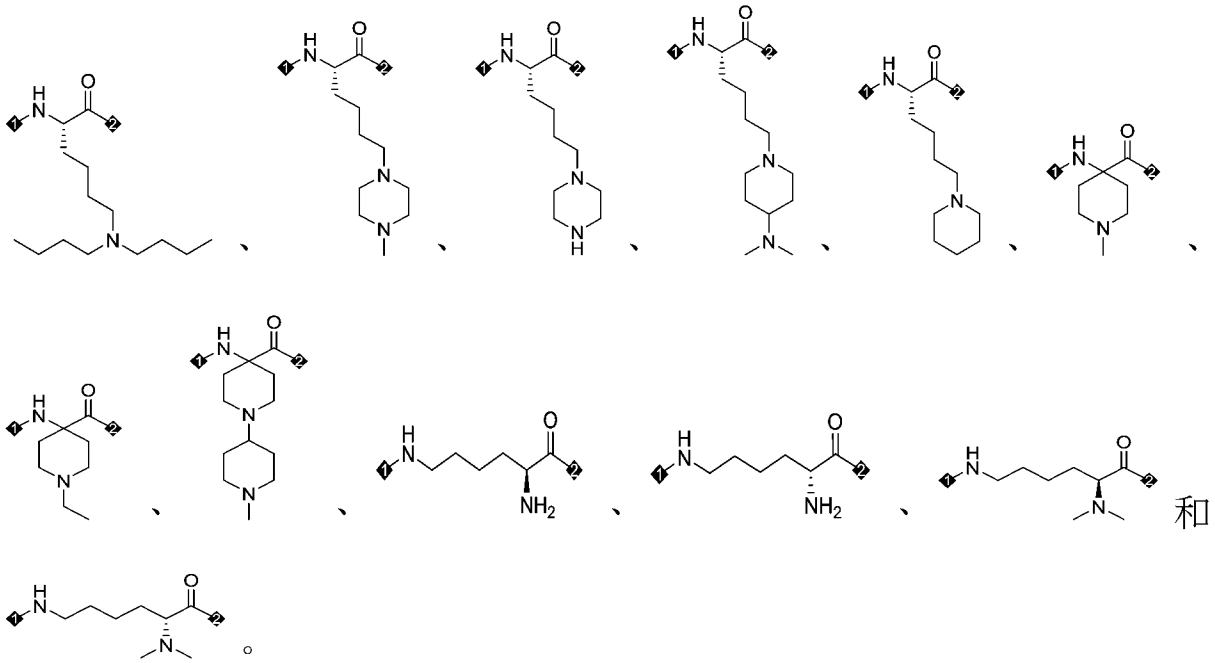
【0074】在一些實施方案中，R^0選自甲基和  。

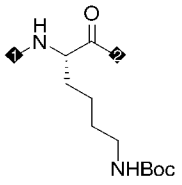
【0075】在一些實施方案中，$R^{0'}$選自C1-6烷基和$-NR^{m2}R^{n2}$。

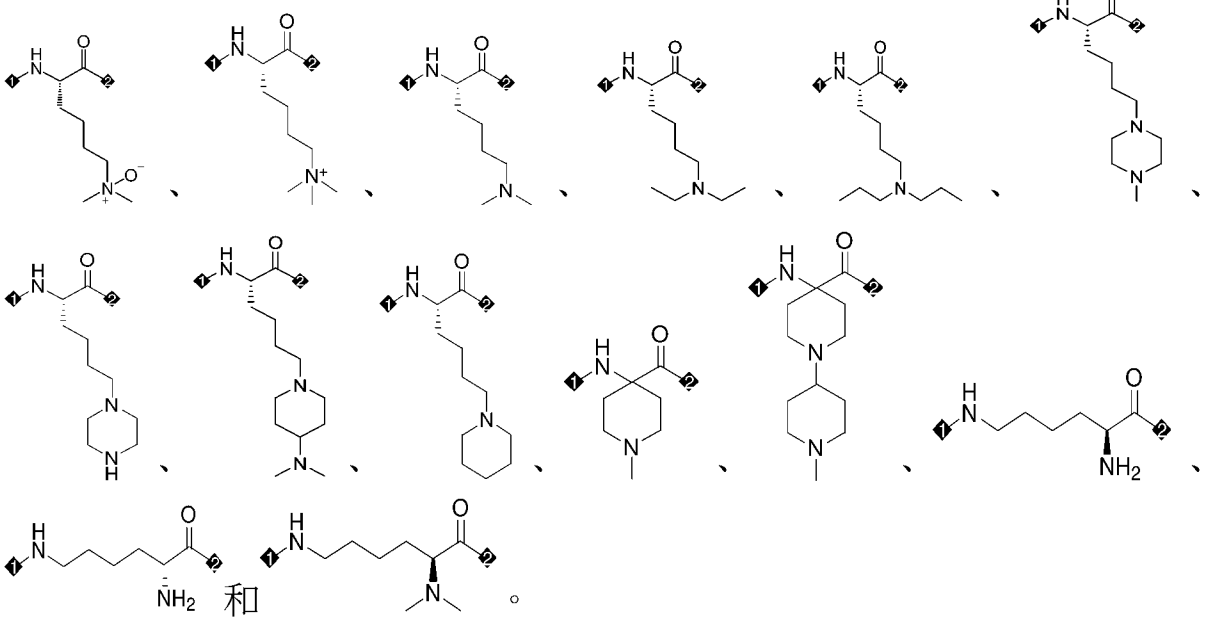
【0076】在一些實施方案中，$R^{0'}$選自甲基和$-NR^{m2}R^{n2}$。

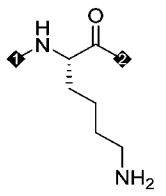
【0077】在一些實施方案中，R^{m2}、R^{n2}為甲基。

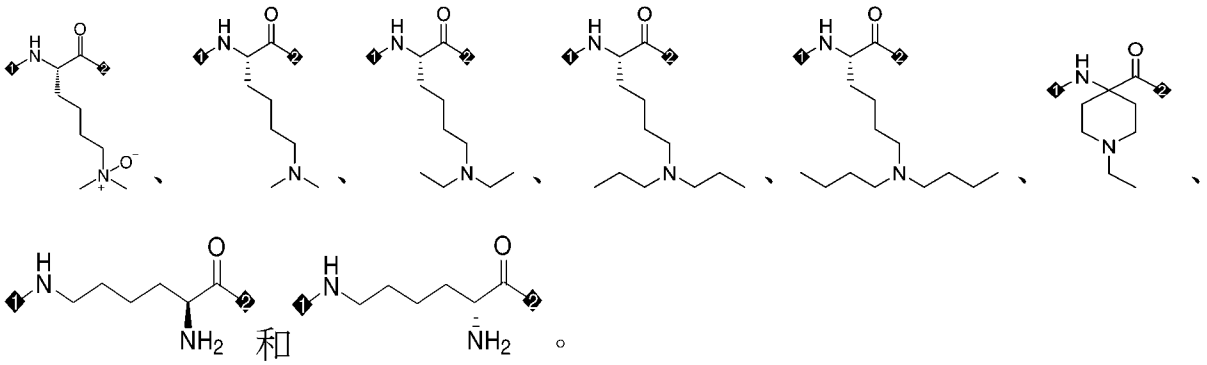
【0078】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  。

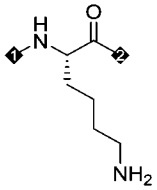


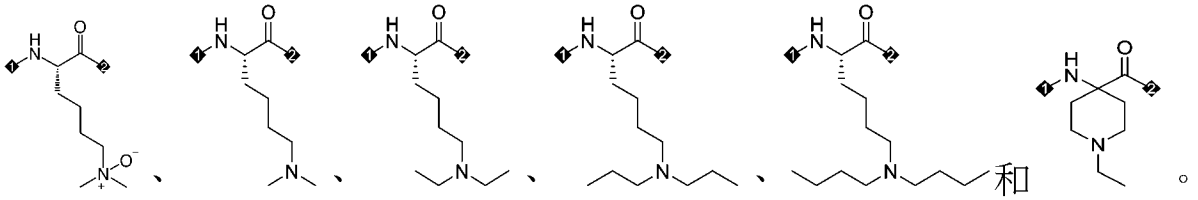
【0079】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、



【0080】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、

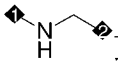


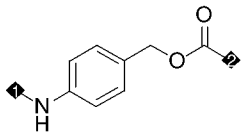
【0081】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、



【0082】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自

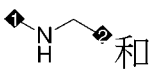
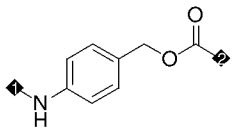
，1位與L_3相連，2位與D相連。

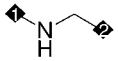
【0083】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4為  或

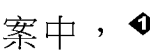


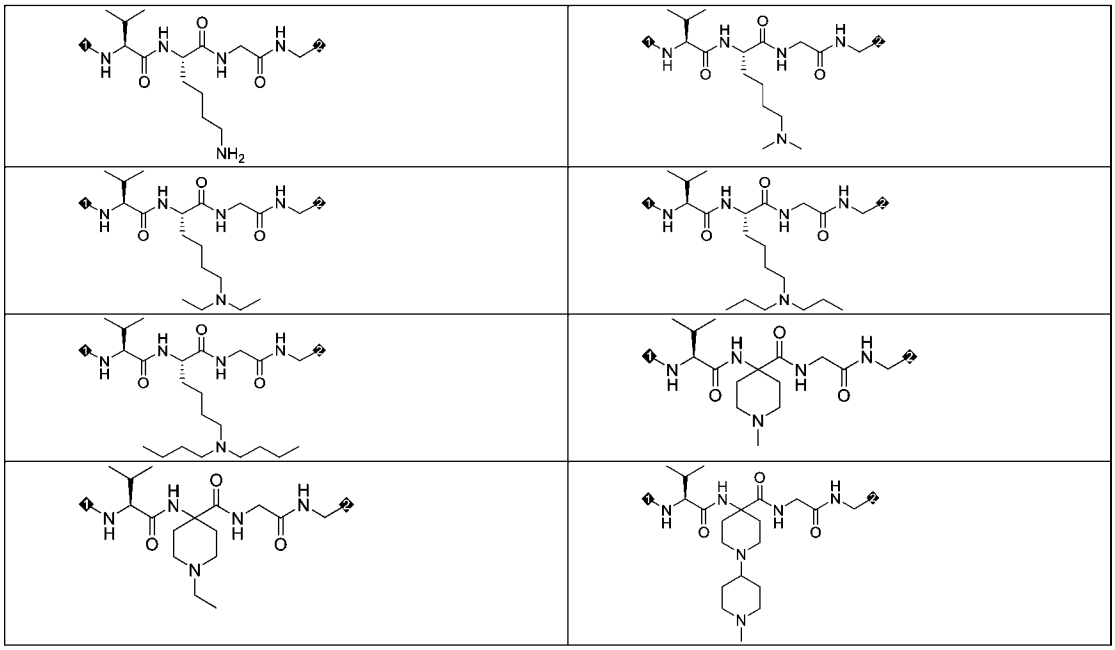
，1位與L_3相連，2位與D相連。

【0084】在一些實施方案中，L_4不存在。

【0085】在一些實施方案中，L_4選自  和  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

【0086】在一些實施方案中，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

【0087】在一些實施方案中，  的結構選自以下結構片段：



。

【0088】在一些實施方案中，Tb為抗體或其抗原結合片段。

【0089】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段以及單克隆抗體或其抗原結合片段包括：Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv（例如，scFv)、dAb、互補決定區片段、非人抗體、人源化抗體、嵌合抗體、全人抗體、前抗（Probody）、單克隆抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0090】在一些實施方案中，Tb為具有內吞或不內吞活性的抗體或其抗原結合片段。

【0091】在一些實施方案中，Tb為具有內吞活性的抗體或其抗原結合片段。

【0092】在一些實施方案中，Tb為具有結合腫瘤組織中游離抗原和/或腫瘤細胞表面抗原腫瘤細胞表面抗原活性的抗體或其抗原結合片段。

【0093】在一些實施方案中，Tb為具有被腫瘤細胞內吞的活性，且有腫瘤組織中游離抗原或者腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0094】在一些實施方案中，Tb為具有被腫瘤細胞內吞的活性，且有腫瘤組織中游離抗原以及腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0095】在一些實施方案中，Tb為具有被腫瘤細胞內吞的活性，且沒有腫瘤組織中游離抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0096】在一些實施方案中，Tb為具有被腫瘤細胞內吞的活性，且沒有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0097】在一些實施方案中，Tb為沒有內吞活性的、或內吞活性弱的抗體或其抗原結合片段。

【0098】在一些實施方案中，Tb為不具有結合腫瘤組織中游離抗原和/或腫瘤細胞表面抗原腫瘤細胞表面抗原活性的抗體或其抗原結合片段。

【0099】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的、或內吞活性弱的，且有腫瘤組織中游離抗原或者腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0100】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的、或內吞活性弱的，且有腫瘤組織中游離抗原以及腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0101】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的、或內吞活性弱的，且沒有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體其抗原結合片段。

【0102】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的、或內吞活性弱的，且沒有腫瘤組織中游離抗原結合活性的抗體其抗原結合片段。

【0103】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的，且人體內沒有對應抗原的抗體或其抗原結合片段。

【0104】在一些實施方案中，Tb為沒有腫瘤細胞相關抗原結合的抗體。

【0105】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段，選自IgG同型抗體。

【0106】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段，選自同型IgG1，同型IgG2，同型IgG3或同型IgG4。

【0107】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段，為抗雞溶菌酶人IgG1同型抗體。

【0108】在一些實施方案中，Tb為具有結合腫瘤細胞表面非內吞（例如ALCAM/CD166）抗原活性的抗體其抗原結合片段。

【0109】在一些實施方案中，Tb為具有腫瘤細胞相關抗原結合的抗體。

【0110】在一些實施方案中，Tb為具有腫瘤組織中游離抗原或者腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0111】在一些實施方案中，Tb為具有腫瘤組織中游離抗原以及腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0112】在一些實施方案中，Tb為具有B7H3-2Ig和/或B7H-4Ig的抗體或其抗原結合片段。

【0113】在一些實施方案中，Tb為具有B7H3-4Ig結合活性高於B7H3-2Ig結合活性抗體或其抗原結合片段。

【0114】在本公開的部分實施方案中，Tb為和靶點結合的配體或靶向部分。

【0115】在一些實施方案中，所述Tb的靶點選自腫瘤細胞表達高於正常細胞的靶點。

【0116】在一些實施方案中，所述Tb的靶點選自腫瘤細胞高表達，而正常細胞低表達的靶點。

【0117】在一些實施方案中，所述Tb的靶點選自：B7H3、CD20、CD19、CD30、GPNMB、Her2、Trop-2、EGFR、Her3、GD-2，CD79b和BCMA等。

【0118】在一些實施方案中，所述Tb為抗體或其抗原結合的片段。

【0119】在一些實施方案中，Tb為非人抗體、人源化抗體、嵌合抗體、全人抗體。

【0120】在一些實施方案中，Tb為單克隆抗體，雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0121】在一些實施方案中，Tb為單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0122】在一些實施方案中，Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段、抗Trop-2抗體或其抗原結合片段、抗Her2抗體或其抗原結合片段、抗Her3抗體或其抗原結合片段或抗EGFR抗體或其抗原結合片段。

【0123】在一些實施方案中，Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，例如1D1、1D1-01、2E3，2E3-02抗體、enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab或其抗原結合片段。

【0124】所述1D1的序列如SEQ ID NO:1所示。所述1D1-01的VH序列如

SEQ ID NO:3所示，VL序列如SEQ ID NO:13所示。所述1D1-01的重鏈序列如SEQ ID NO:45所示，輕鏈序列如SEQ ID NO:46所示。所述2E3的序列如SEQ ID NO:2所示。所述2E3-02的VH序列如SEQ ID NO:23所示，VL序列如SEQ ID NO:33所示。所述2E3-02的重鏈序列如SEQ ID NO:47所示，輕鏈序列如SEQ ID NO:48所示。

【0125】在一些實施方案中，Tb為抗B7H3單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0126】在一些實施方案中，Tb為抗Trop-2抗體或其抗原結合片段，例如datopotamab , sacituzumab或其抗原結合片段。

【0127】在一些實施方案中，Tb為抗Trop-2單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0128】在一些實施方案中，Tb為抗Her2抗體或其抗原結合片段，例如anbenitamab ， coprelotamab ， disitamab ， gancotamab ， margetuximab ，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab，Pertuzumab或其抗原結合片段。

【0129】在一些實施方案中，Tb為抗Her2單克隆抗體或其抗原結合片段，例如曲妥珠單抗、帕妥珠單抗或其抗原結合片段。

【0130】在一些實施方案中，Tb為抗Her3抗體或其抗原結合片段，例如barecetamab ， duligotuzumab ， elgemtumab ， istiratumab ， lumretuzumab ，patritumab ， seribantumab ， zenocutuzumab ， 202-2-1抗體或其抗原結合片段。

【0131】在一些實施方案中，Tb為抗Her3單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0132】在一些實施方案中，Tb為抗EGFR抗體或其抗原結合片段，例如demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab或其抗原結合片段。

【0133】在一些實施方案中，Tb為抗EGFR單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0134】在一些實施方案中，所述抗體具有結合抗原但不具有內吞活性的抗體。

【0135】在一些實施方案中，所述抗體具有結合B7H3、CD20、CD19、CD30、GPNMB、Her2、Trop-2、EGFR、Her3、GD-2、CD79b和BCMA等抗原但不具有內吞活性的抗體。

【0136】在一些實施方案中，所述抗體具有結合B7H3抗原但不具有內吞活性的抗體。比如WO2021168379A1的INV721和I7-01。更具體的，Anti-B7H3的抗體具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:2的VH和SEQ ID NO:1的VL。

【0137】在一些實施方案中，所述抗體具有結合GD2抗原但不具有內吞活性的抗體。比如WO2021168379A1的INV721和GD2-5。更具體的，Anti-GD2的抗體具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:3的VL。

【0138】在一些實施方案中，所述抗體具有結合HER3抗原但不具有內吞活性的抗體，比如US10808032B2的SEQ ID NO: 22所示的ANTI-HER3的

21F06 抗體。

【0139】在一些實施方案中，所述抗體具有結合CD20抗原但不具有內吞活性的抗體。儘管已顯示所謂的“II 型”CD20 特異性抗體很難被 CD20 陽性靶細胞內化，但已發現其他所謂的“I 型”CD20 特異性抗體某種程度上被內化並降解,這取決於與其相互作用的靶細胞上啟動和抑制 Fc γR 的表達水準。在一些實施方案中，所述抗體具有結合CD20抗原但不具有內吞活性的抗體為II 型”CD20 特異性抗體，例如obinutuzumab。

【0140】在一些實施方案中，所述抗體具有結合非內吞（例如ALCAM/CD166）抗原活性的抗體。在一些實施方案中，所述抗體為包含EP3911682A1中SEQ ID No:73的VH和SEQ ID No:74的VL, SEQ ID No:75的VH和SEQ ID No:76的VL, SEQ ID No:77的VH和SEQ ID No:78的VL, 或，SEQ ID No:79的VH和SEQ ID No:88的VL所示的抗體。

【0141】在一些實施方案中，所述Tb為靶向部分，例如配體、蛋白質、多肽、非蛋白質試劑(例如糖、RNA或DNA)，抗體類似物等。

【0142】在一些實施方案中，q選自0.1-16.0之間的任意數值；在優選地實施方案中，q選自0.1-16.0之間的任意整數。

【0143】在一些實施方案中，q選自0.1-8.0之間的任意數值，在優選地實施方案中，q選自0.1-8.0之間的任意整數。

【0144】在一些實施方案中，q選自2-8之間的任意數值。

【0145】在一些實施方案中，q選自3-8之間的任意數值。

【0146】在一些實施方案中，q選自4-8之間的任意數值。

【0147】在一些實施方案中，q選自6-8之間的任意數值。

【0148】在一些實施方案中，q選自2-8之間的任意整數。

【0149】在一些實施方案中，q選自3-8之間的任意整數。

【0150】在一些實施方案中，q選自4-8之間的任意整數。

【0151】在一些實施方案中，q選自6-8之間的任意整數。

【0152】在一些實施方案中，q選自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12。

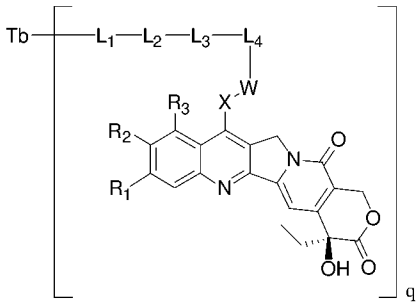
【0153】在一些實施方案中，q選自2、4、6和8。

【0154】本公開中，所述的生物活性分子片段是指本領域中均知的，抗體-藥物偶聯物（或稱抗體偶聯藥物（antibody-drug conjugate, ADC））中，在腫瘤組織間或腫瘤細胞內連接體裂解/降解/酶切後，能夠形成具有生物活性的藥物（例如小分子細胞毒藥物，所述藥物包括其失去一個原子或原子團後的基團）或其衍生物（例如其前體）的部分（片段或基團）。為了避免歧義，“藥物”並非僅指已獲得醫藥監管部門審批的“藥品”，還包括臨床中，或者研發和學術研究中任何有潛在治療生物活性的分子。

【0155】在一些實施方案中，D為具有抗腫瘤生物活性分子片段。

【0156】在一些實施方案中，D為具有抗腫瘤生物活性分子片段，其中所述的生物活性分子選自細胞毒性劑或其衍生物，例如DNA拓撲異構酶抑制劑（例如喜樹鹼類生物活性分子，例如喜樹鹼、DXD、取代基被修飾的喜樹鹼或取代基被修飾的DXD）或微管蛋白抑制劑(例如MMAF類微管蛋白抑制劑，MMAE類微管蛋白抑制劑)。

【0157】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I所式結構：



其中，

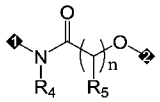
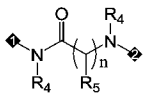
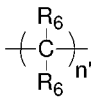
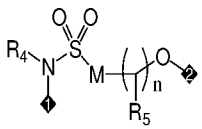
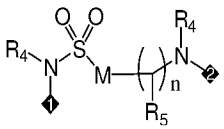
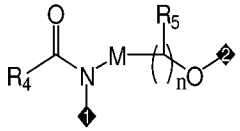
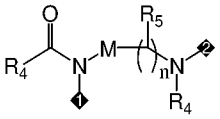
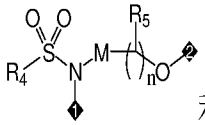
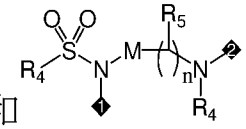
R_1、R_2各自獨立地選自 H、鹵素、-OH、任選取代的 C1-6 烷基和任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_1和 R_2和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

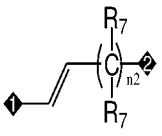
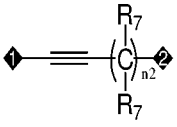
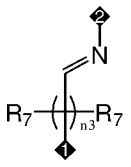
R_3選自 H、鹵素、-OH、$-NH_2$、任選取代的 C1-6 烷基和任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3和 X 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合，或者，

R_3和 R_2和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

W 不存在或存在，W 存在時，W 選自-O-、-S-、$-NR_4$-、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位與 X 相連，2 位與 L_4或 L_3相連；

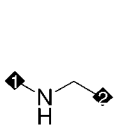
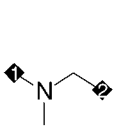
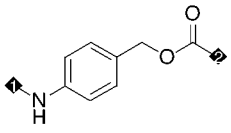
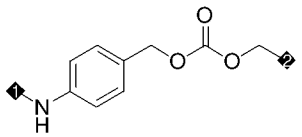
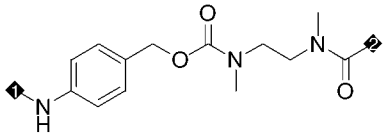
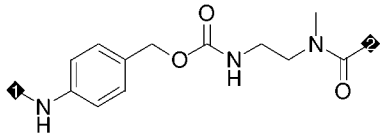
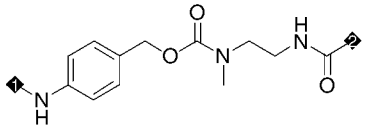
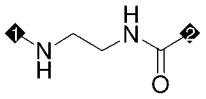
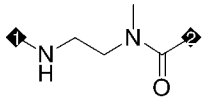
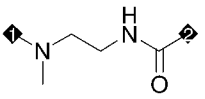
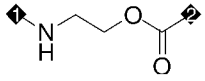
X 選自直接鍵，任選取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-N(R_4)-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰

基-$(CH_2)_{n3}$、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、  、  、  、-$(CH_2)_{n1}$-、C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 元雜芳基和 4-10 元雜環基，1 位和母環相連，2 位和 W 或 L_4 相連；所述取代基選自一個或多個 C1-4 烷基、C3-6 環烷基，或者多個 C1-4 烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成 C3-6 環烷基；

各 M 獨立地選自直接鍵和-$CR^{5a}R^{5b}$-；

R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R_7各自獨立地選自 H、任選取代的 C1-4 烷基、任選取代的 C1-4 烷氧基和任選取代的 C3-6 環烷基；

n、n'、n1、n2、n3 各自獨立地選自 0 到 6 之間的任意整數；

L_4 不存在或存在，L_4 存在時，L_4 選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  ，1 位與 L_3 相連，2 位與 W 或 X 相連。

【0158】Tb、L_1、L_2、L_3和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0159】在一些實施方案中，R_1、R_2各自獨立地選自H、鹵素和C1-4烷基。

【0160】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-6元雜

環，所述雜環含有1個、2個或3個O，S或N或其任意組合。

【0161】在一些實施方案中，R_1選自H和鹵素，R_2選自H和C1-4烷基。

【0162】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成 、 、 或 ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的位置。

【0163】在一些實施方案中，R_1為H或F，R_2為H或甲基。

【0164】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基或R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

【0165】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基。

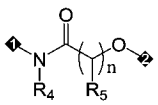
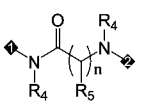
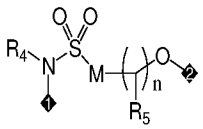
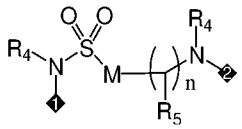
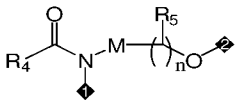
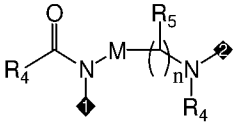
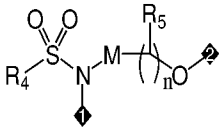
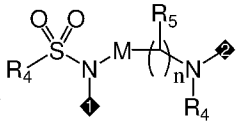
【0166】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

【0167】在一些實施方案中，R_3選自H和C1-4烷基。

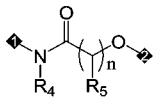
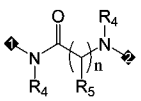
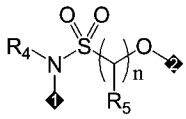
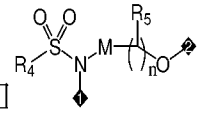
【0168】在一些實施方案中，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成5-6元碳環。

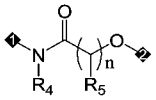
【0169】在一些實施方案中，R_3為H或R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位置。

【0170】在一些實施方案中，R_3為H。

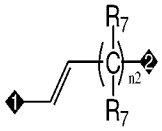
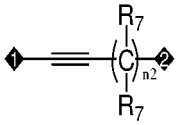
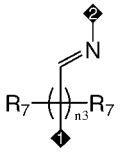
【0171】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連。

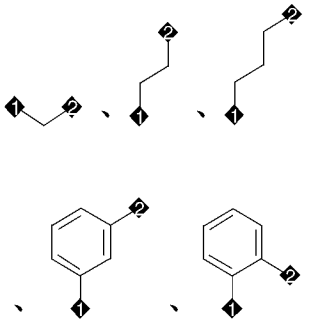
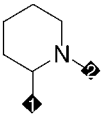
【0172】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-

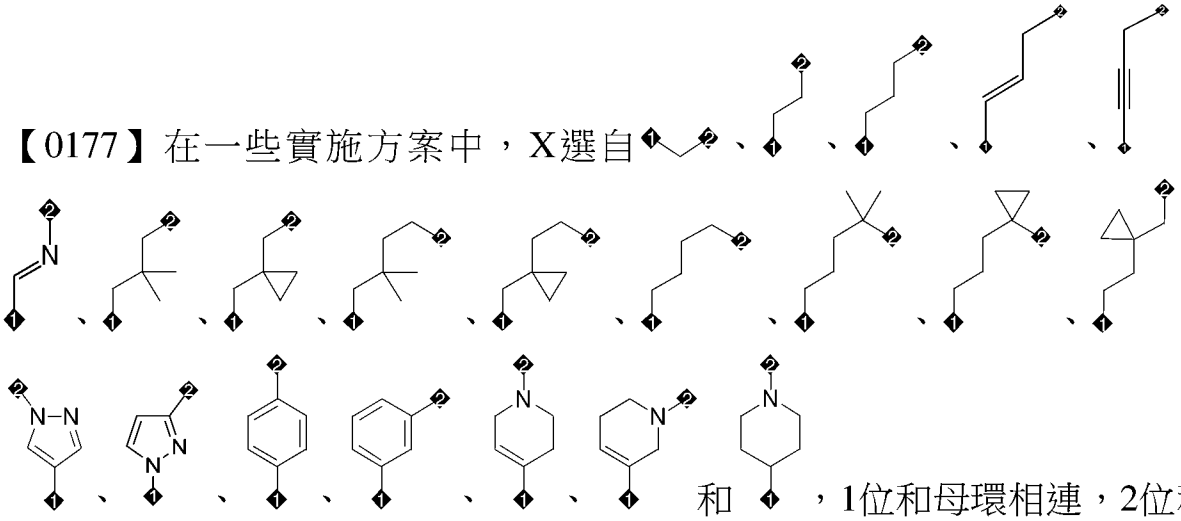
S-、-NR_4-、  、  、  和  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連。

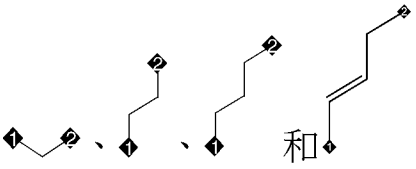
【0173】在一些實施方案中，W選自-O-、-NR_4-和  ，1位X相連，2位與L_4或L_3相連。

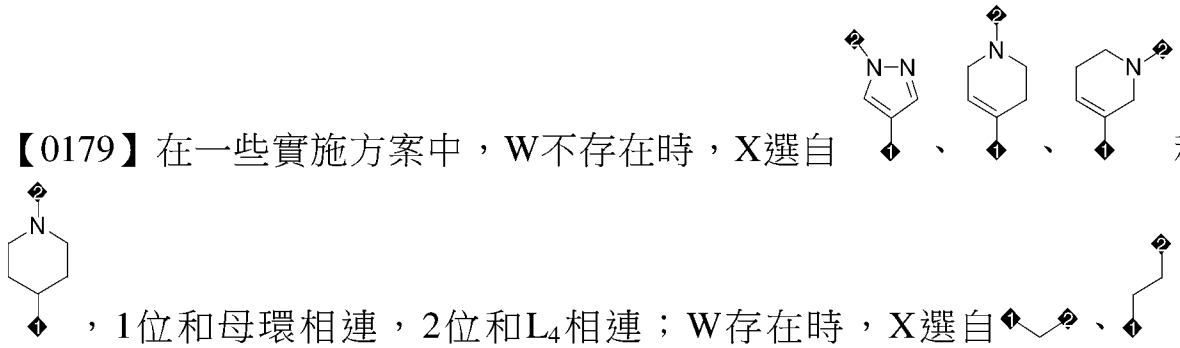
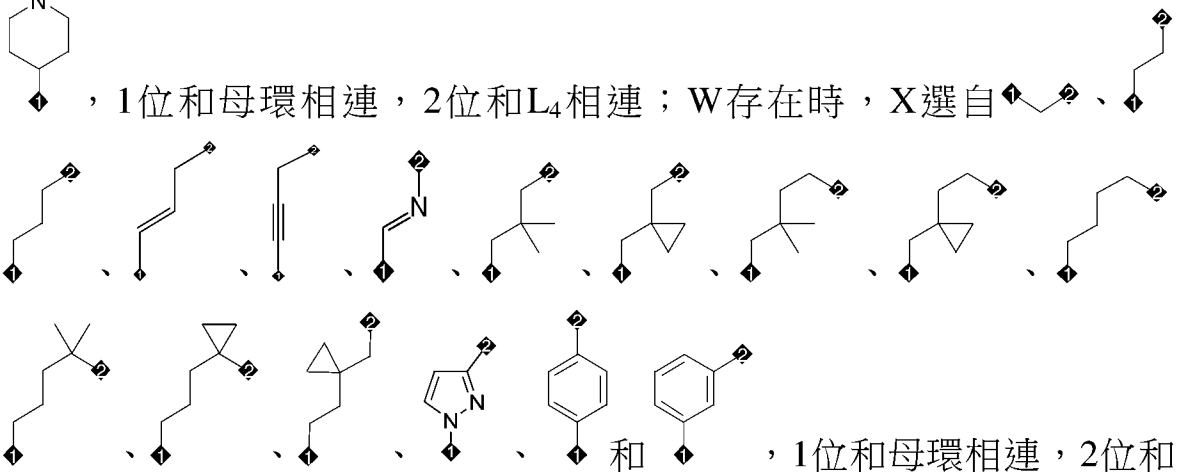
【0174】在一些實施方案中，W選自-O-和-NR_4-，1位X相連，2位與L_4或L_3相連。

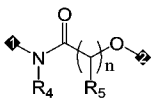
【0175】在一些實施方案中，X選自任選取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C6-10芳基、5-10元雜芳基和4-10元雜環基，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基，或者2個C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基。

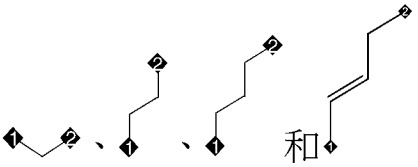
【0176】在一些實施方案中，X選自任選取代的  和  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基（如甲基），或者2個C1-4烷基（如甲基）和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基（如環丙基）。

【0177】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連。

【0178】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0179】在一些實施方案中，W不存在時，X選自  ，1位和母環相連，2位和L_4相連；W存在時，X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0180】在一些實施方案中，W選自-O-、-NR_4-和  ，1位X相連，

2位與L_4或L_3相連；X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0181】在一些實施方案中，R_4、R_5各自獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基。

【0182】在一些實施方案中，各R_4獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基，R_5為H。

【0183】在一些實施方案中，各R_4獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、異丙基、第三丁基和環丙基，R_5為H。

【0184】在一些實施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H和C1-4烷基。

【0185】在一些實施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H和甲基。

【0186】在一些實施方案中，各R_7獨立地選自H和C1-4烷基。

【0187】在一些實施方案中，R_7為H。

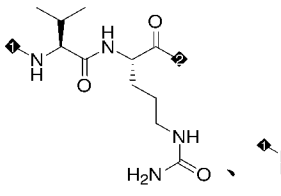
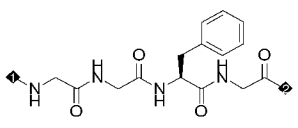
【0188】在一些實施方案中，n選自1、2和3。

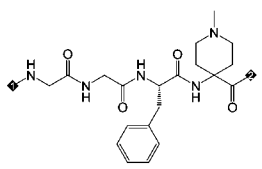
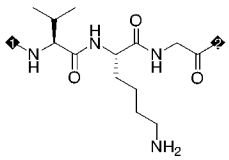
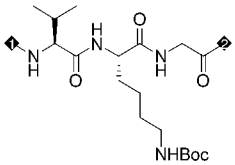
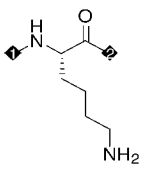
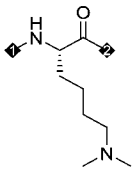
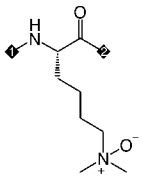
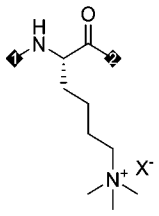
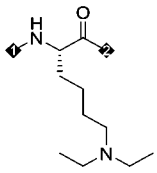
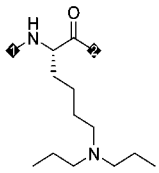
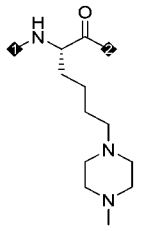
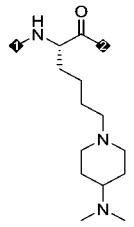
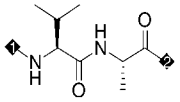
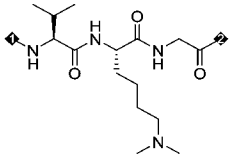
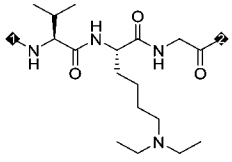
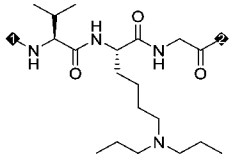
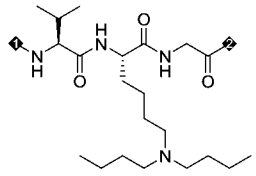
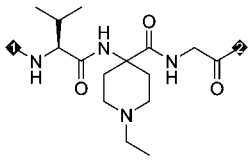
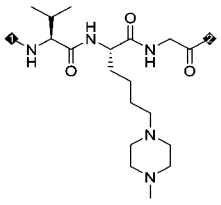
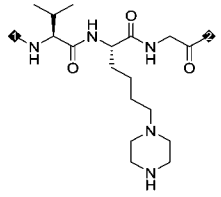
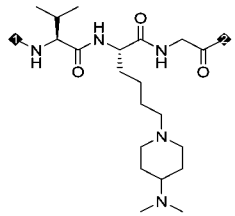
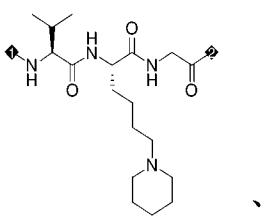
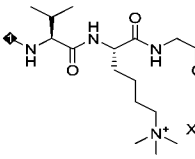
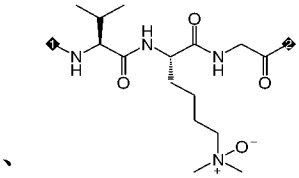
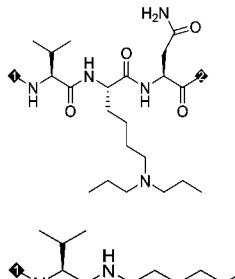
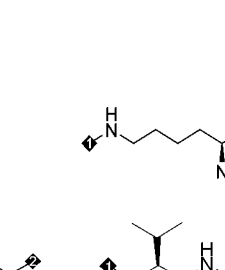
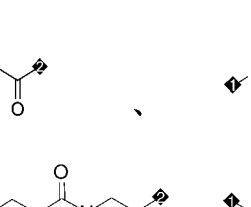
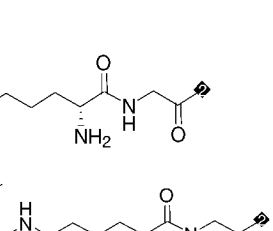
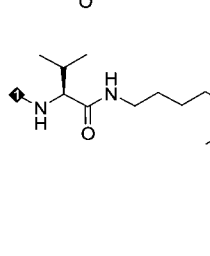
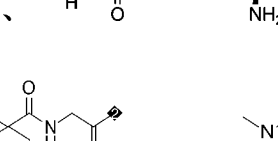
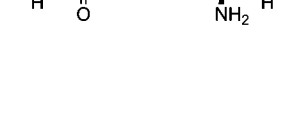
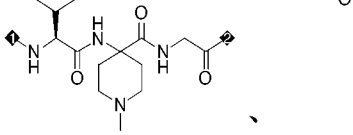
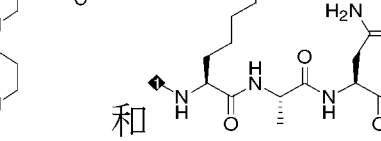
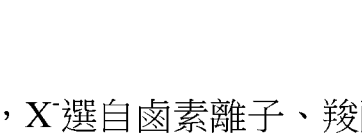
【0189】在一些實施方案中，n為1。

【0190】在一些實施方案中，n1選自1、2、3和4。

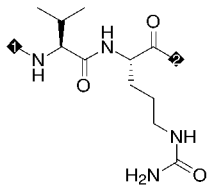
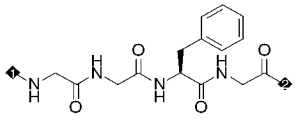
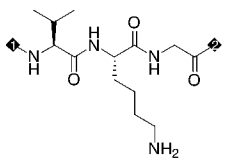
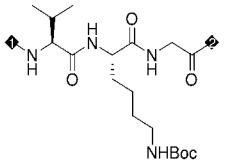
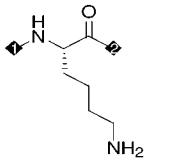
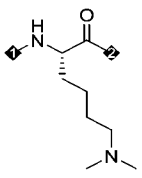
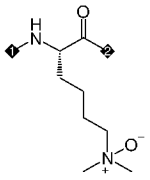
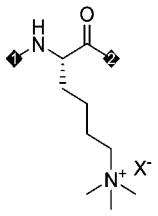
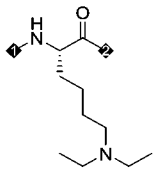
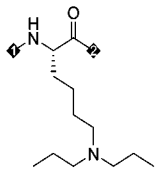
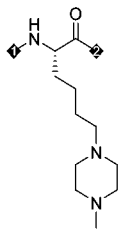
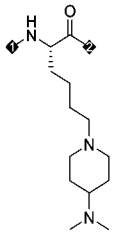
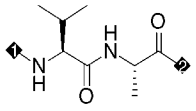
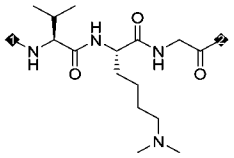
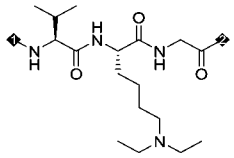
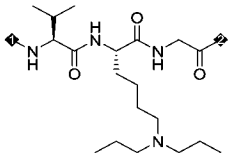
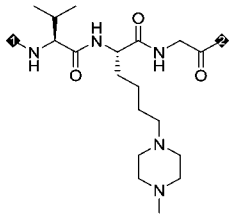
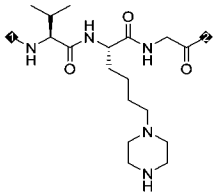
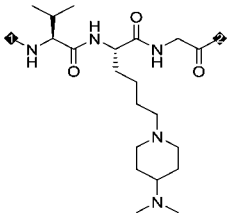
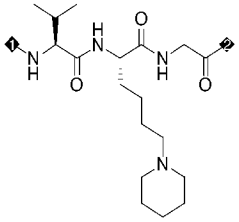
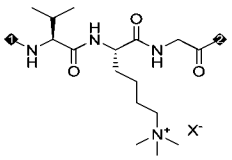
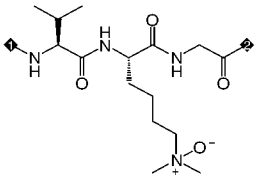
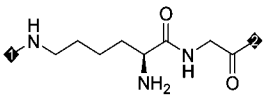
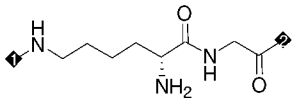
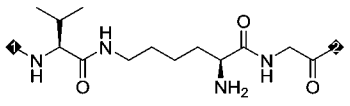
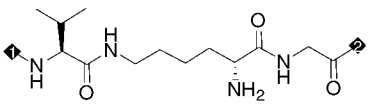
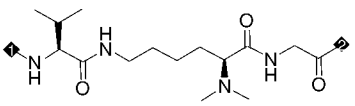
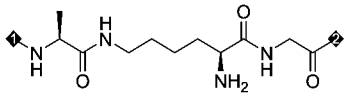
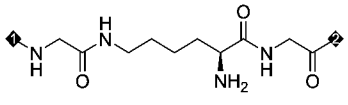
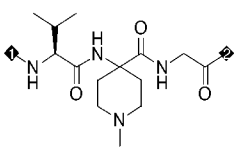
【0191】在一些實施方案中，n2為1。

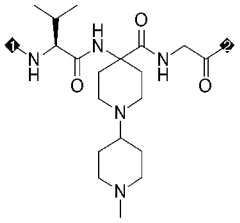
【0192】在一些實施方案中，n3為0。

【0193】在一些實施方案中，L_3選自  、  、

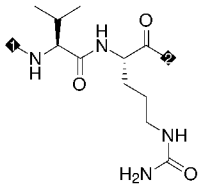
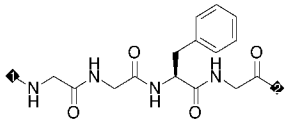
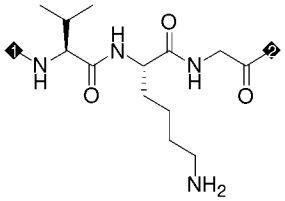
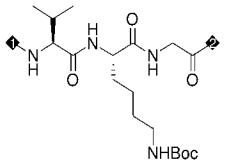
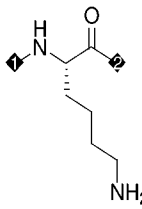
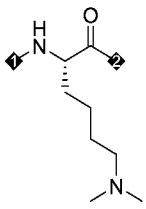
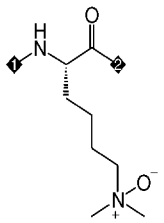
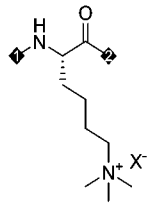
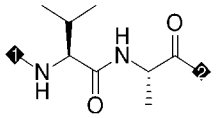
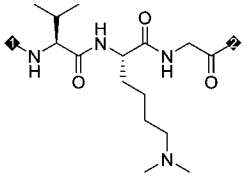
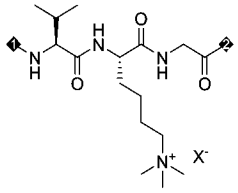
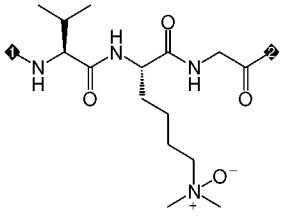
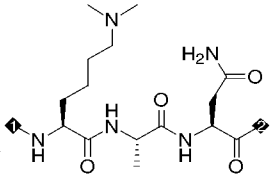

、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、
、
、
、
、
、
和
，X^-選自鹵素離子、羧酸

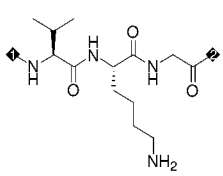
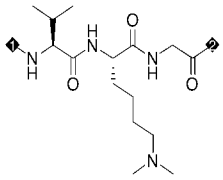
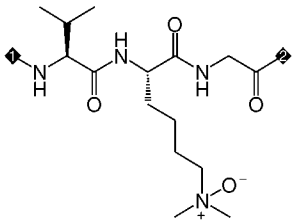
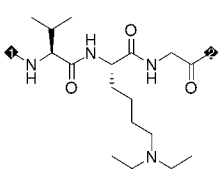
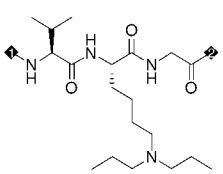
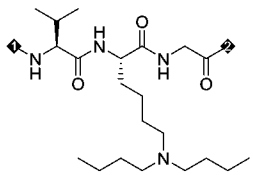
根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

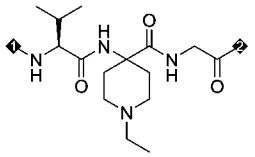
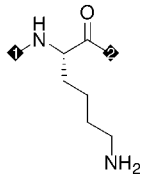
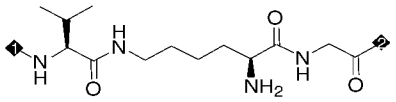
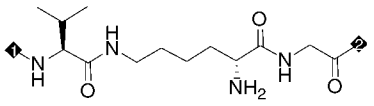
【0194】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和

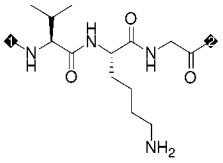
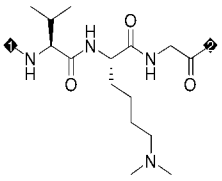
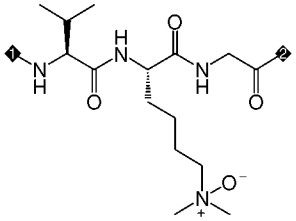
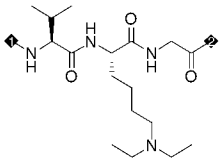
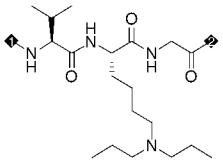
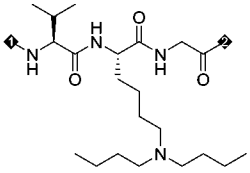
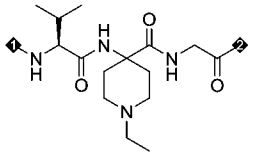


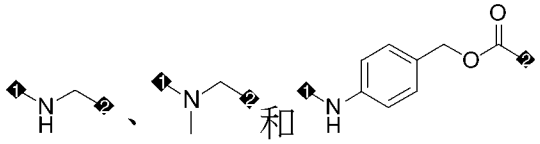
，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

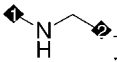
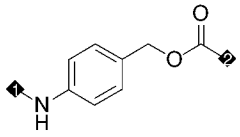
【0195】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子和硫酸氫根離子、OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

【0196】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、

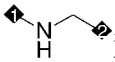
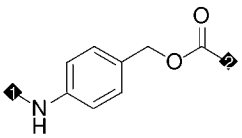
 、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

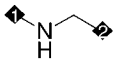
【0197】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

【0198】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

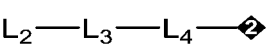
【0199】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4為  或  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

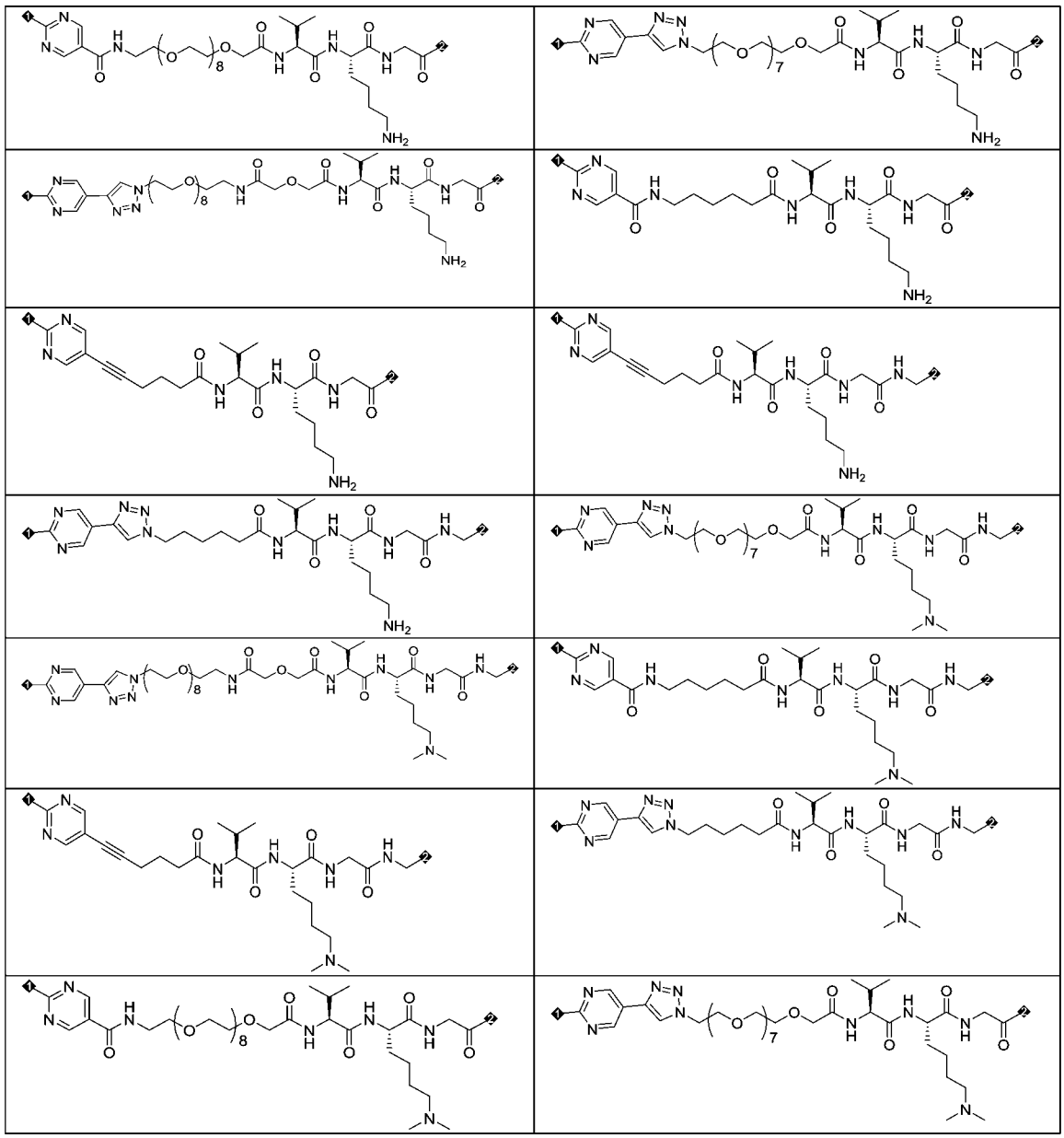
【0200】在一些實施方案中，L_4不存在。

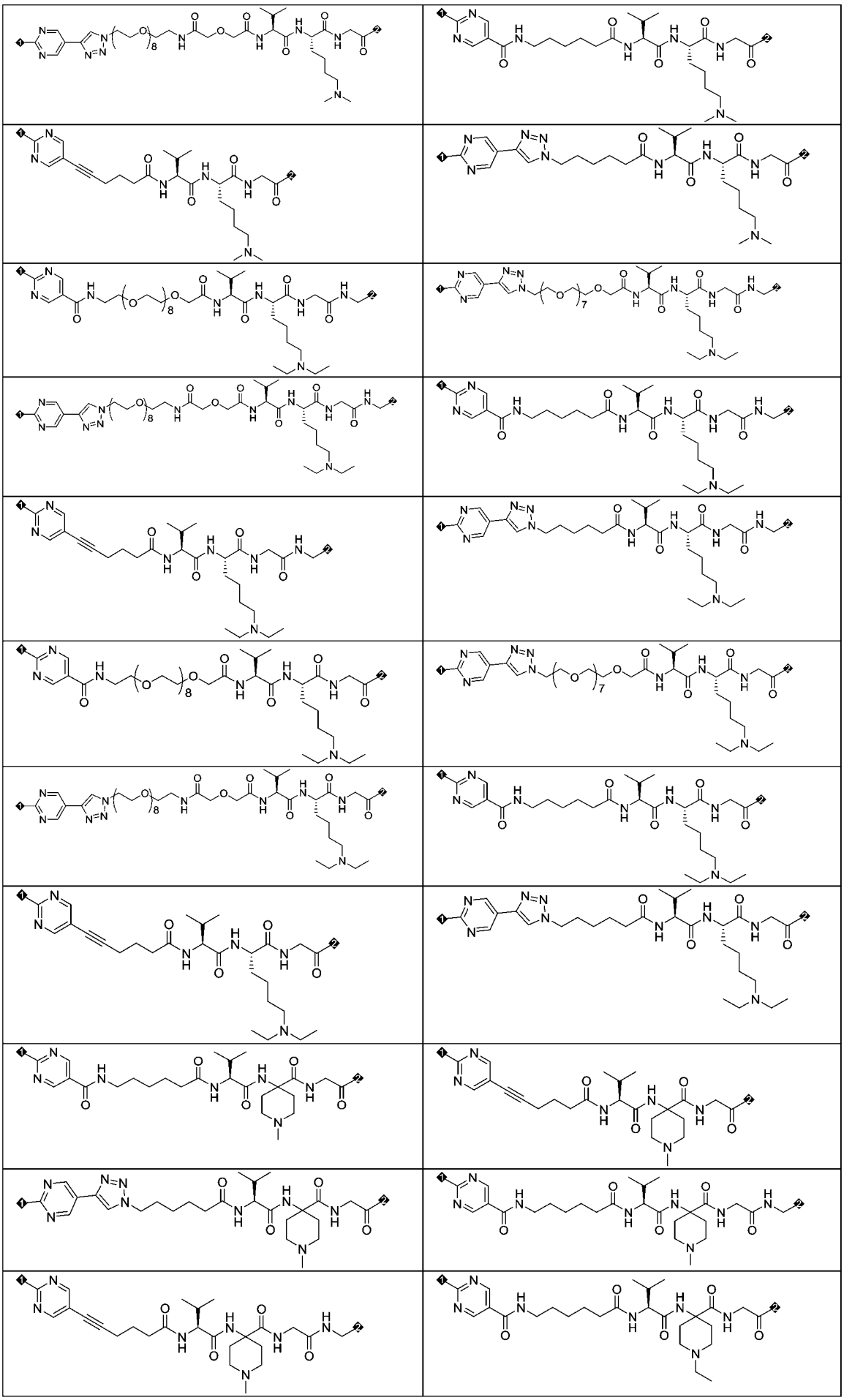
【0201】在一些實施方案中，L_4選自  和  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

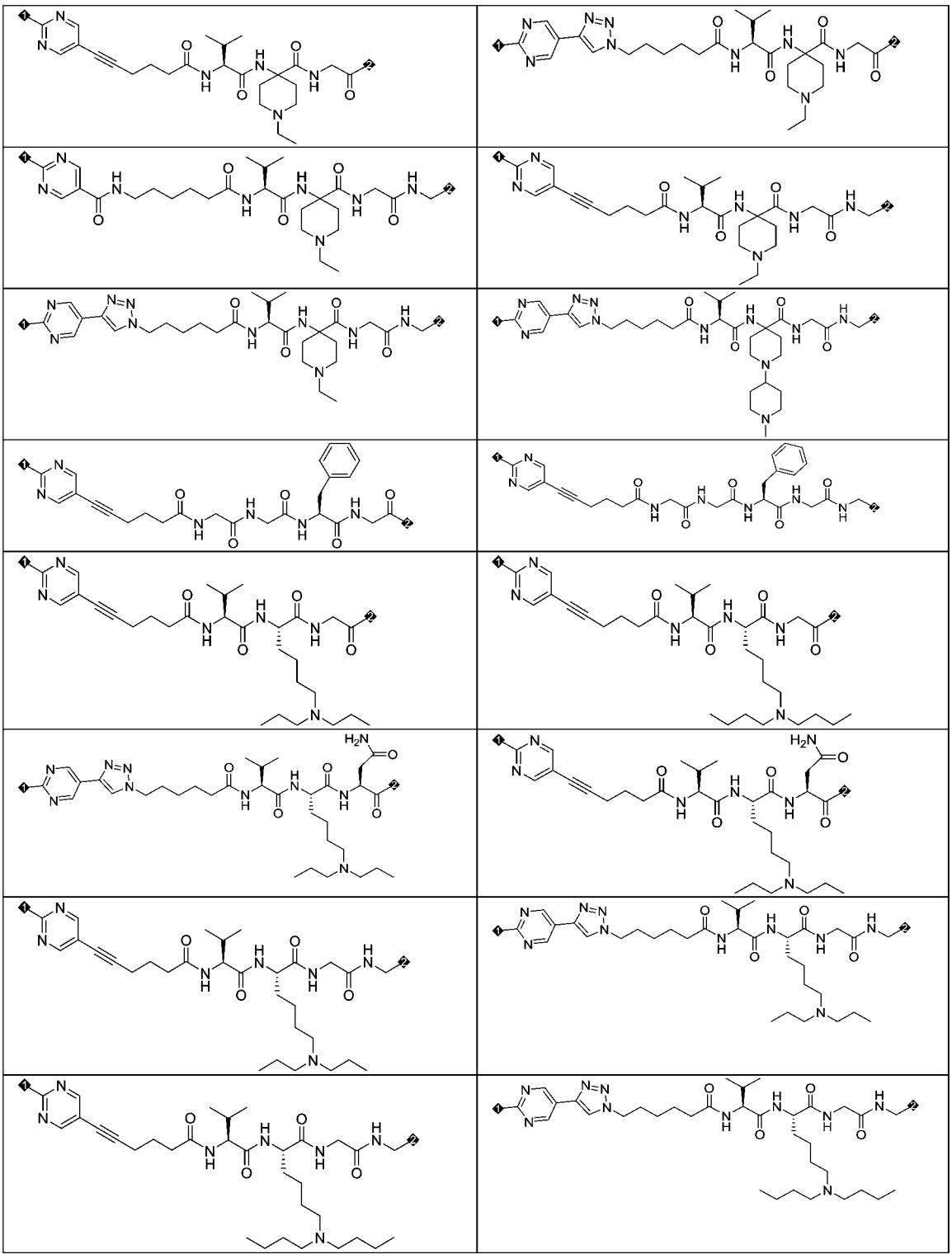
【0202】在一些實施方案中，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

【0203】需要說明的是，如前所述，W不存在或存在，由此，W不存在時，L_4的1位與L_3相連，2位與X相連；W存在時，L_4的1位與L_3相連，2位與W相連。以下關於L_4的連接關係可參照前述內容進行理解。

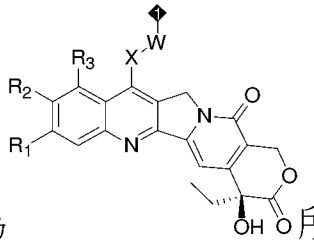
【0204】在一些實施方案中，  的結構選自以下結構片段：

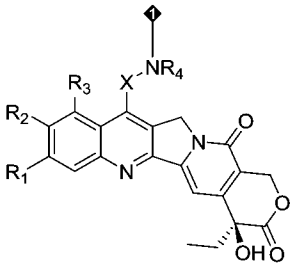
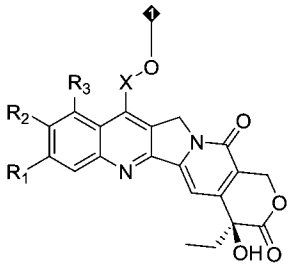
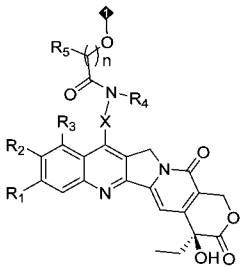


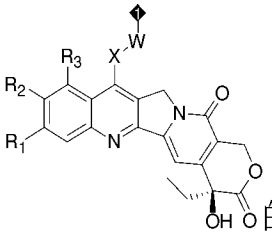


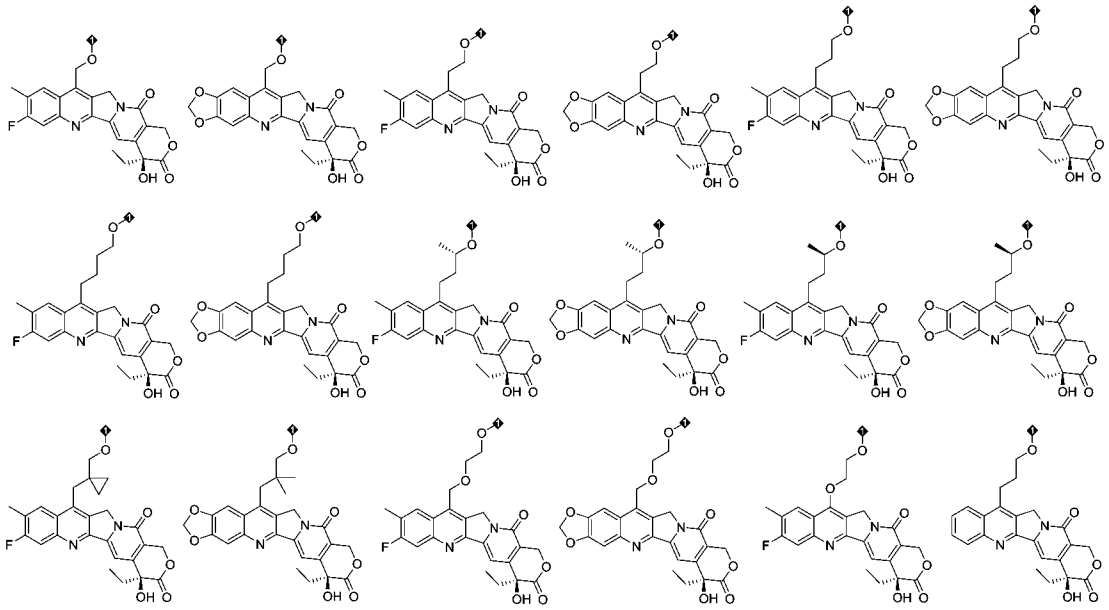


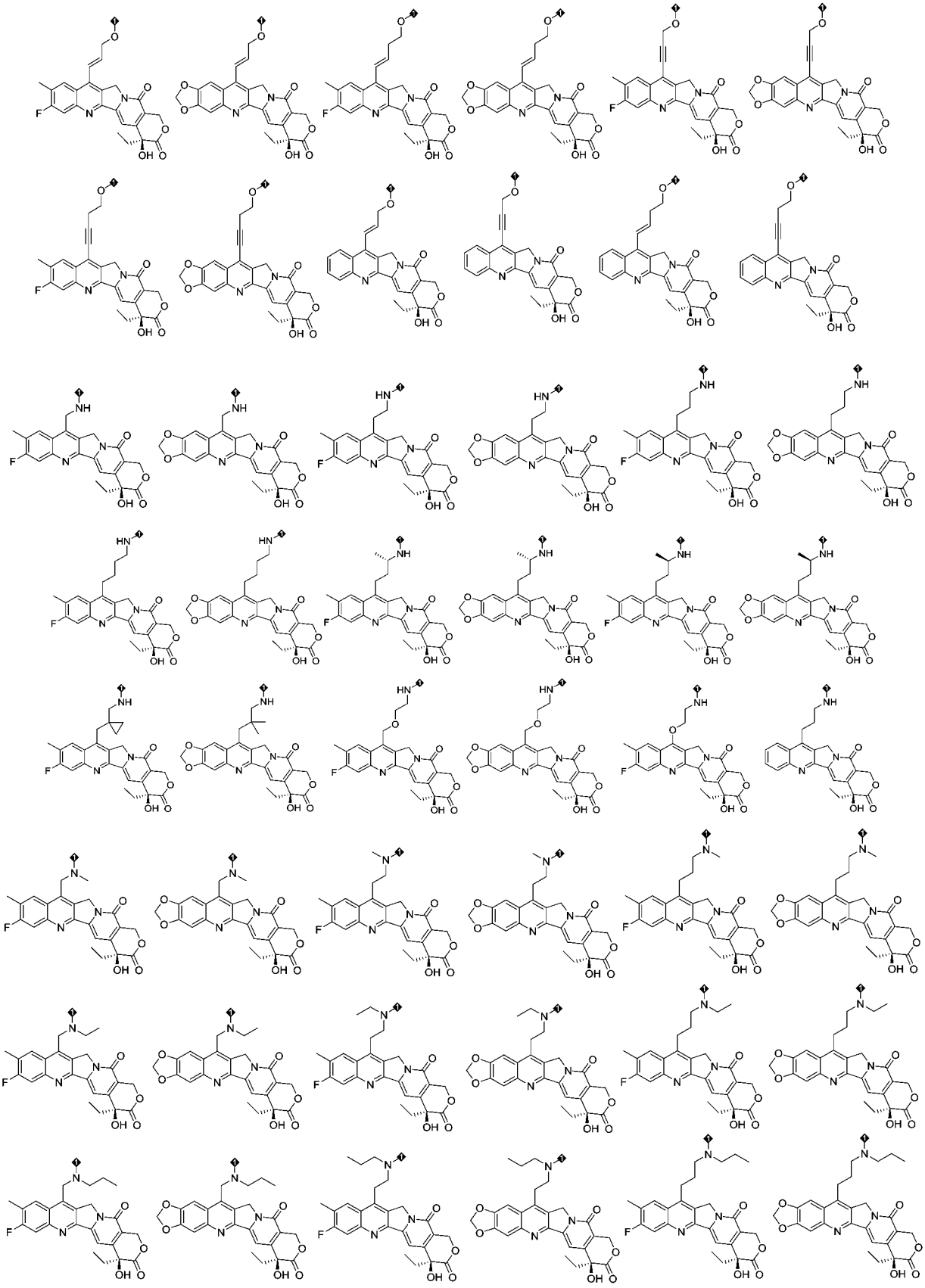
其中，1位與Tb相連，2位與W相連。

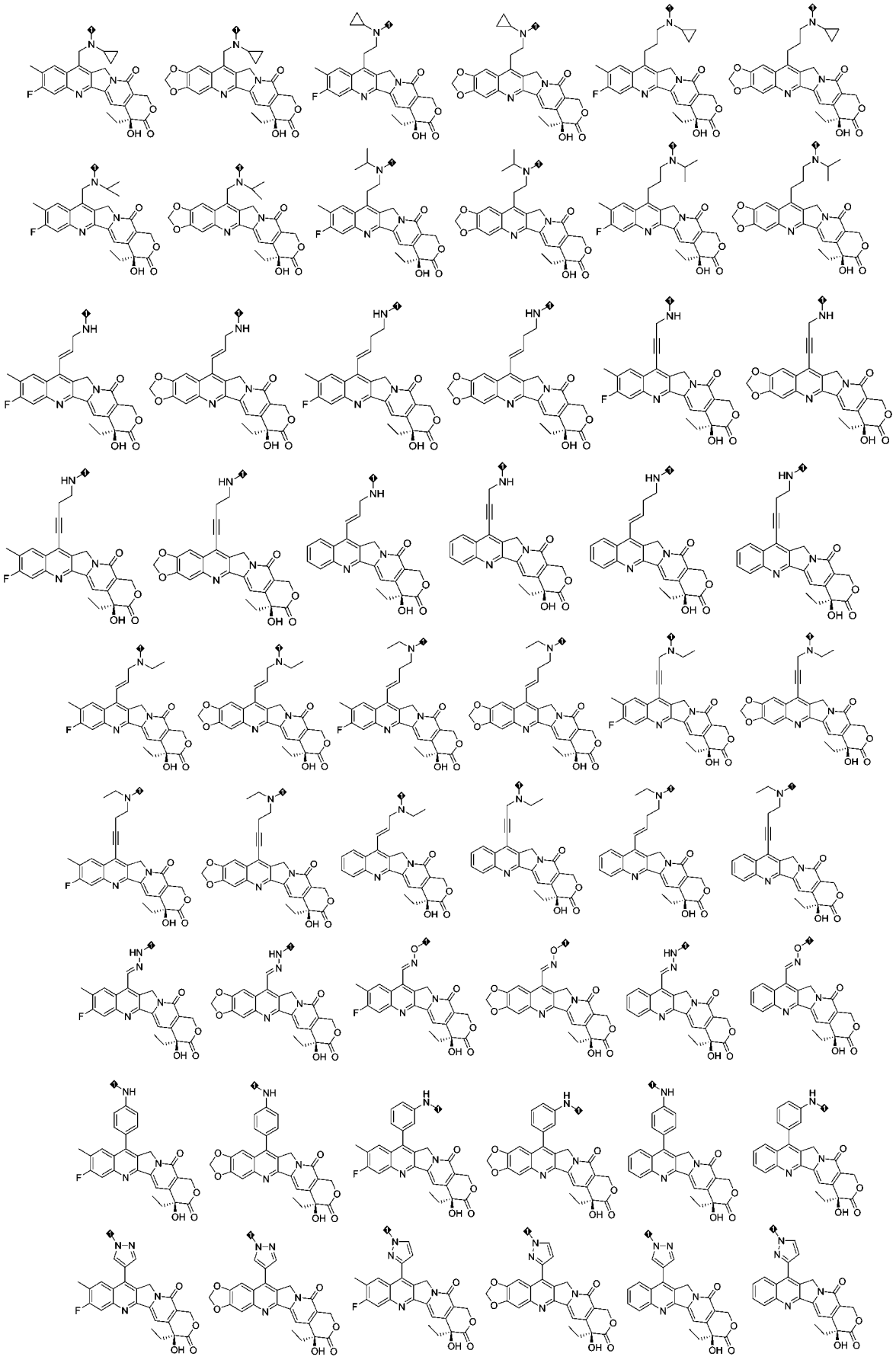
【0205】在一些實施方案中，D為  所示的結構片段；1位

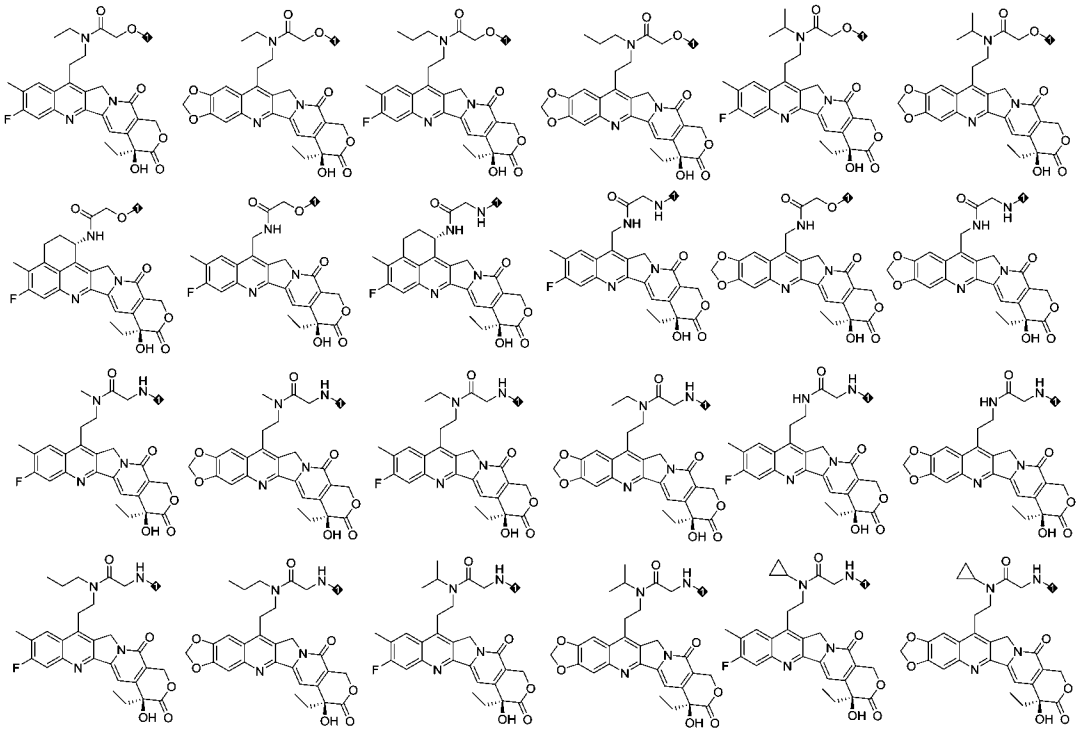
與 L_3 或 L_4 連接；例如  、  、  。

【0206】在一些實施方案中，  的結構選自以下結構片段：

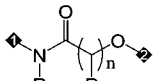
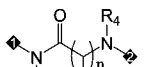
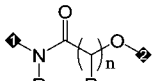


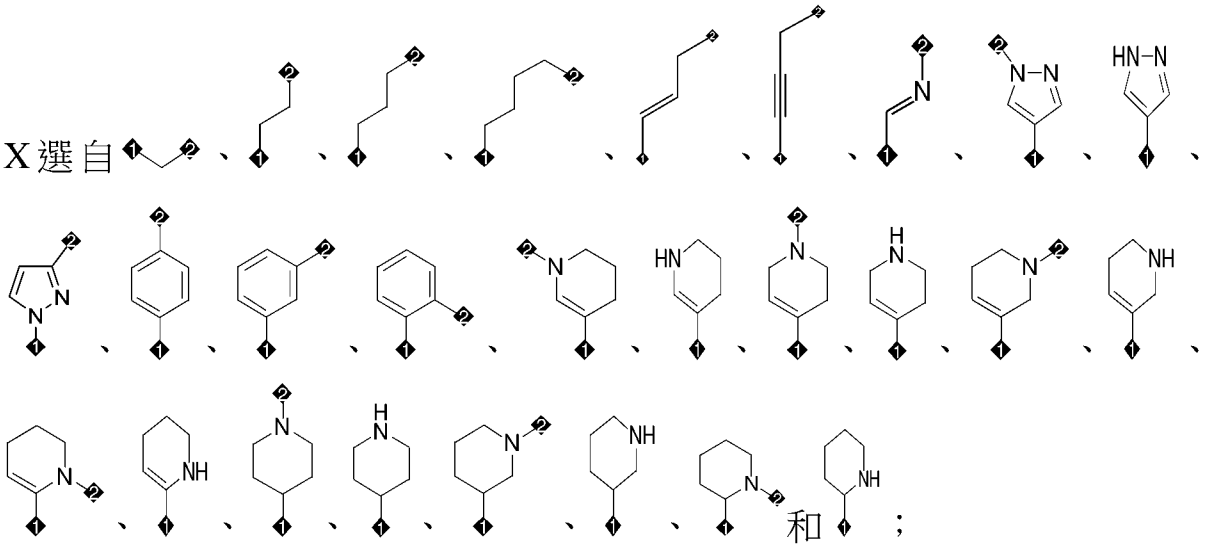


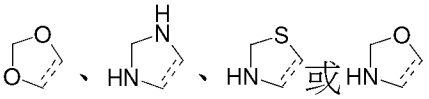




其中，1位與L_4相連；當L_4不存在時，1位與L_3相連。

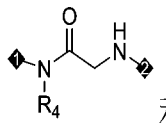
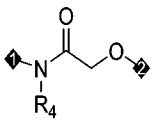
【0207】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  和  ；例如不存在、-O-、-NR_4-或  ；R_4和R_5各自獨立地選自H和C1-4烷基；n獨立地選自0、1、2、3和4；

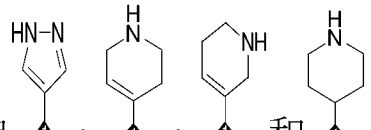
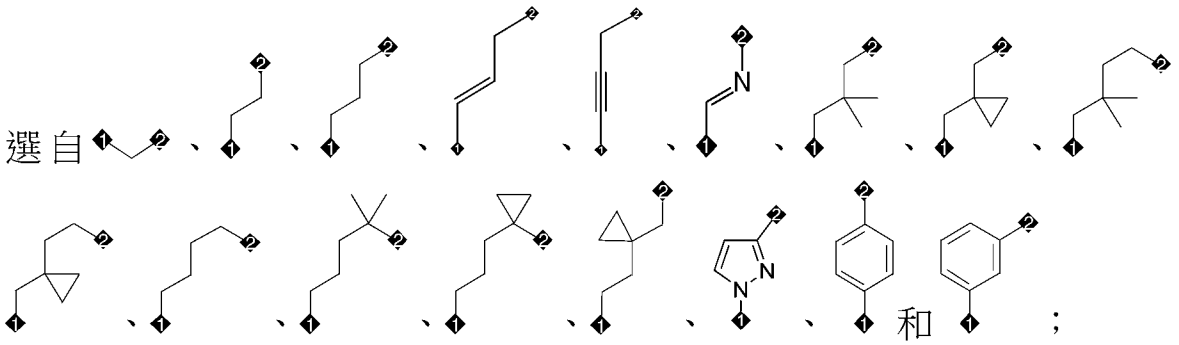
X選自  ；

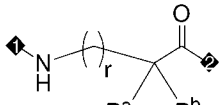
【0208】R_1選自H、鹵素，R_2選自H、C1-4烷基，或，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成  ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的

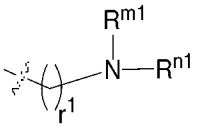
位置；

R_3選自H和C1-4烷基，或，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成5-6元碳環；

優選地，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-NR_4-（例如-NH-、-$N(CH_3)$-、-$N(C_2H_5)$-）、  和  ；R_4獨立地選自H、甲基、乙基、異丙基、正丙基、第三丁基和環丙基；

W不存在時，X選自  ，1位和母環相連；W存在時，X選自  ；

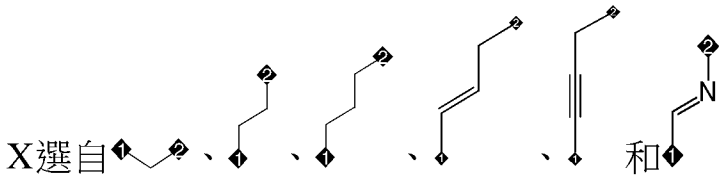
AA_1  中，r選自0、1、2、3、4和5；

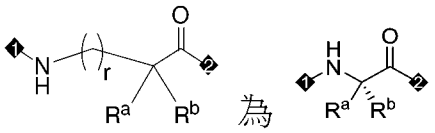
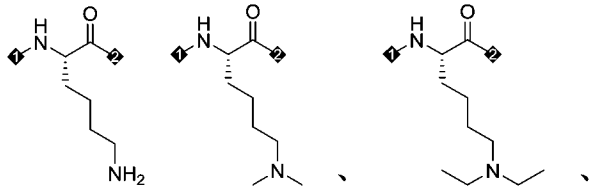
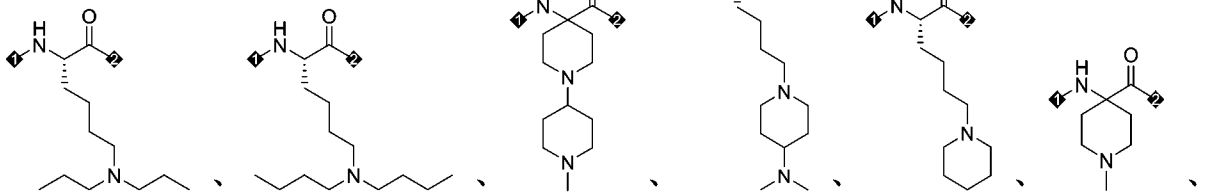
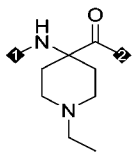
R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自  ；或者，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環；

R_1選自H、鹵素，R_2選自H、C1-4烷基，或，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成 ；

R_3選自H和C1-4烷基，或，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ；

更優選地，W 選自-O-和-NR_4-，1 位 X 相連，2 位與 L_4 或 L_3 相連；

X選自  和，1位和母環相連，2位和W相連；

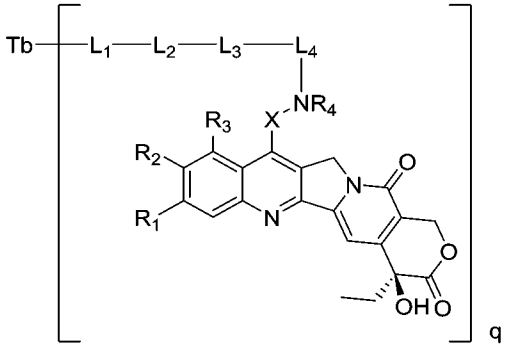
 為，例如  、  、  ；

R_1為F，

R_2為甲基或R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 ；

R_3為H。

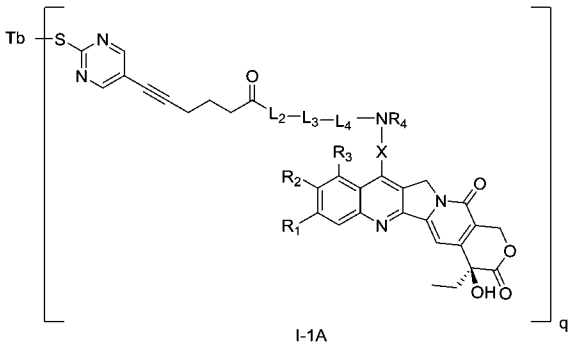
【0209】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-1所式結構：



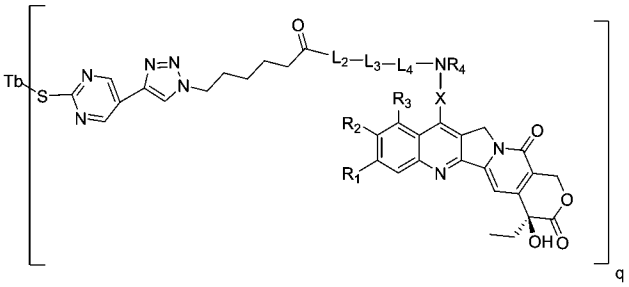
I-1 ，

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0210】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-1A或I-1B所式結構：



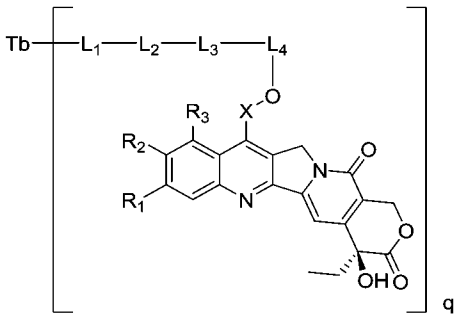
I-1A



I-1B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

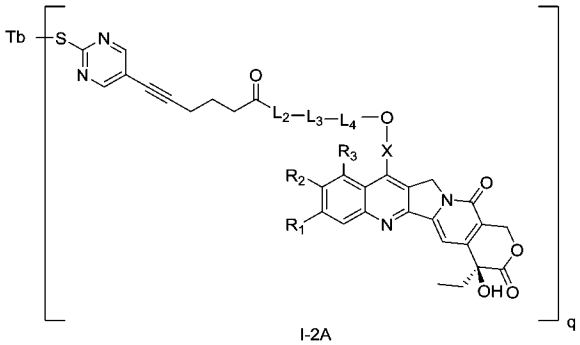
【0211】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-2所式結構：



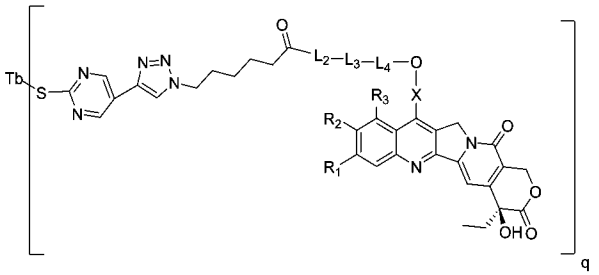
I-2

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0212】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-2A或I-2B所式結構：



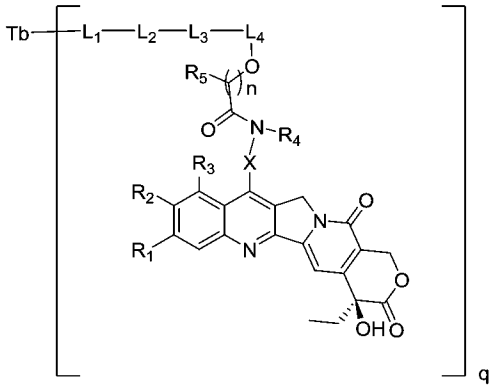
I-2A、



I-2B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

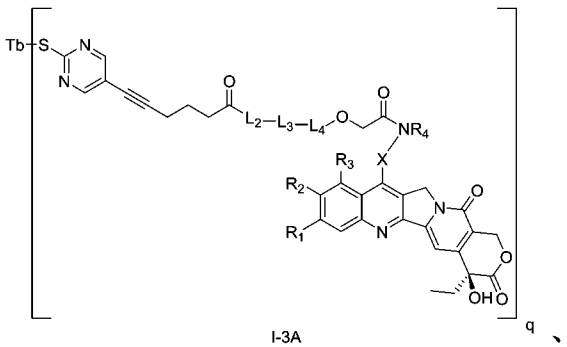
【0213】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-3所式結構：



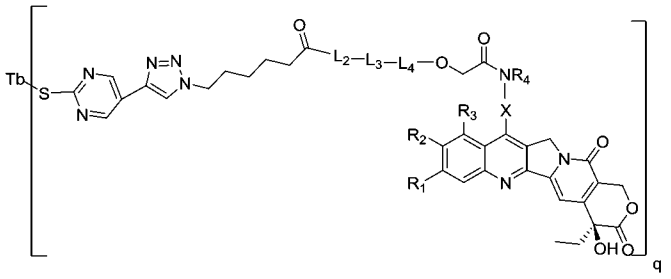
I-3

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0214】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-3A或I-3B所式結構：



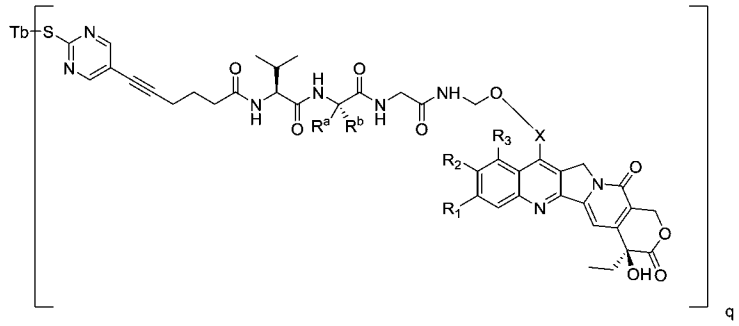
I-3A、



I-3B ，

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

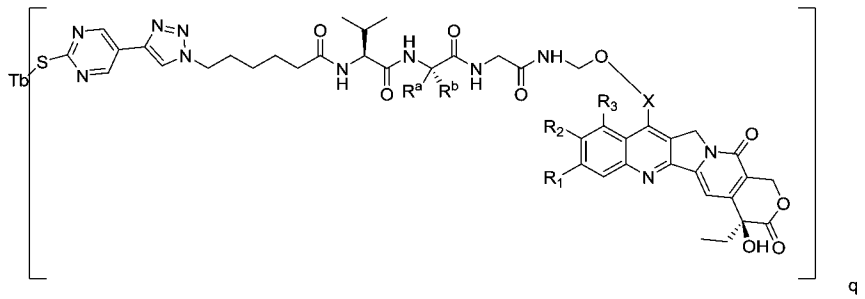
【0215】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-A所式結構：



I-A ，

其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

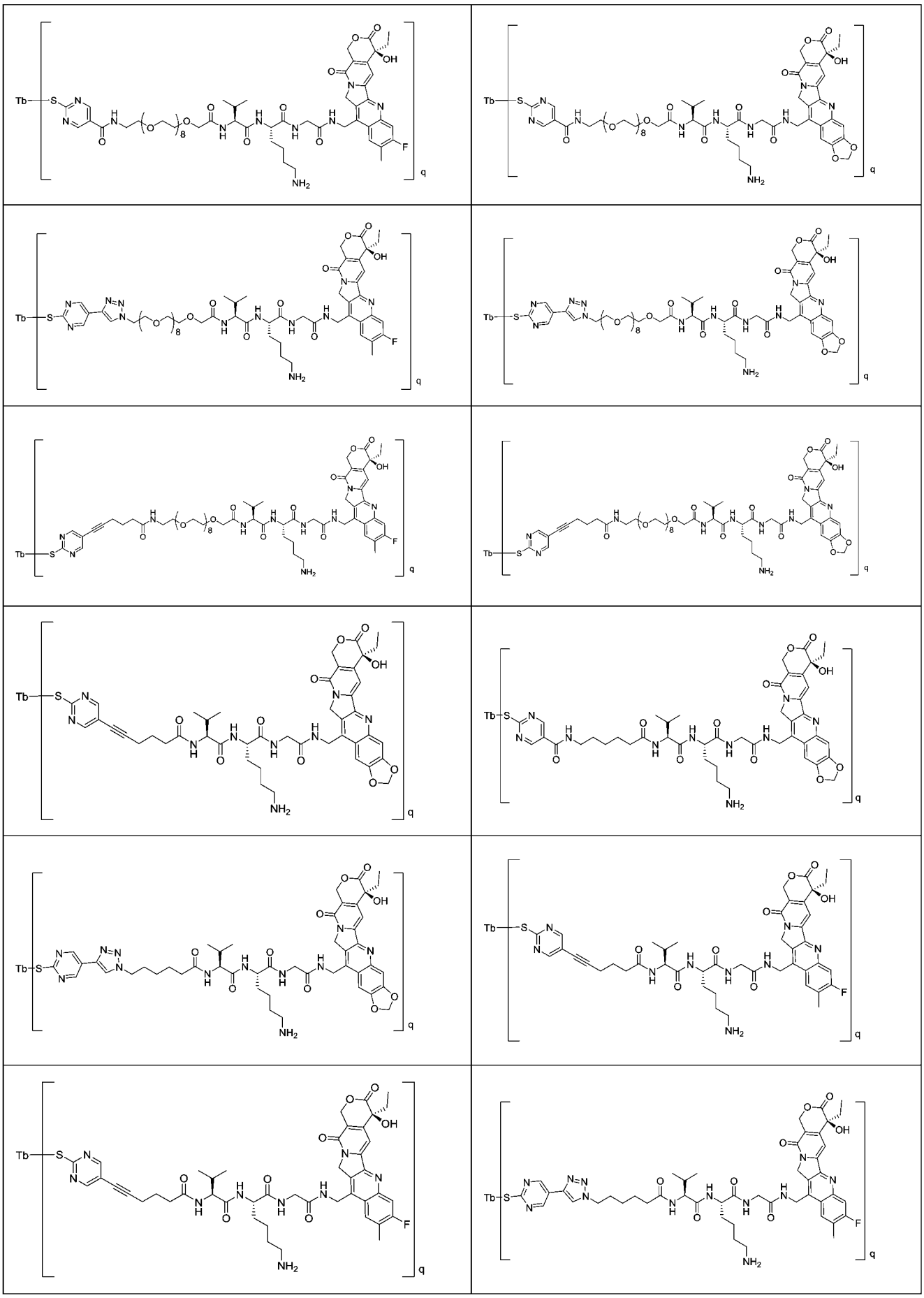
【0216】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-B所式結構：

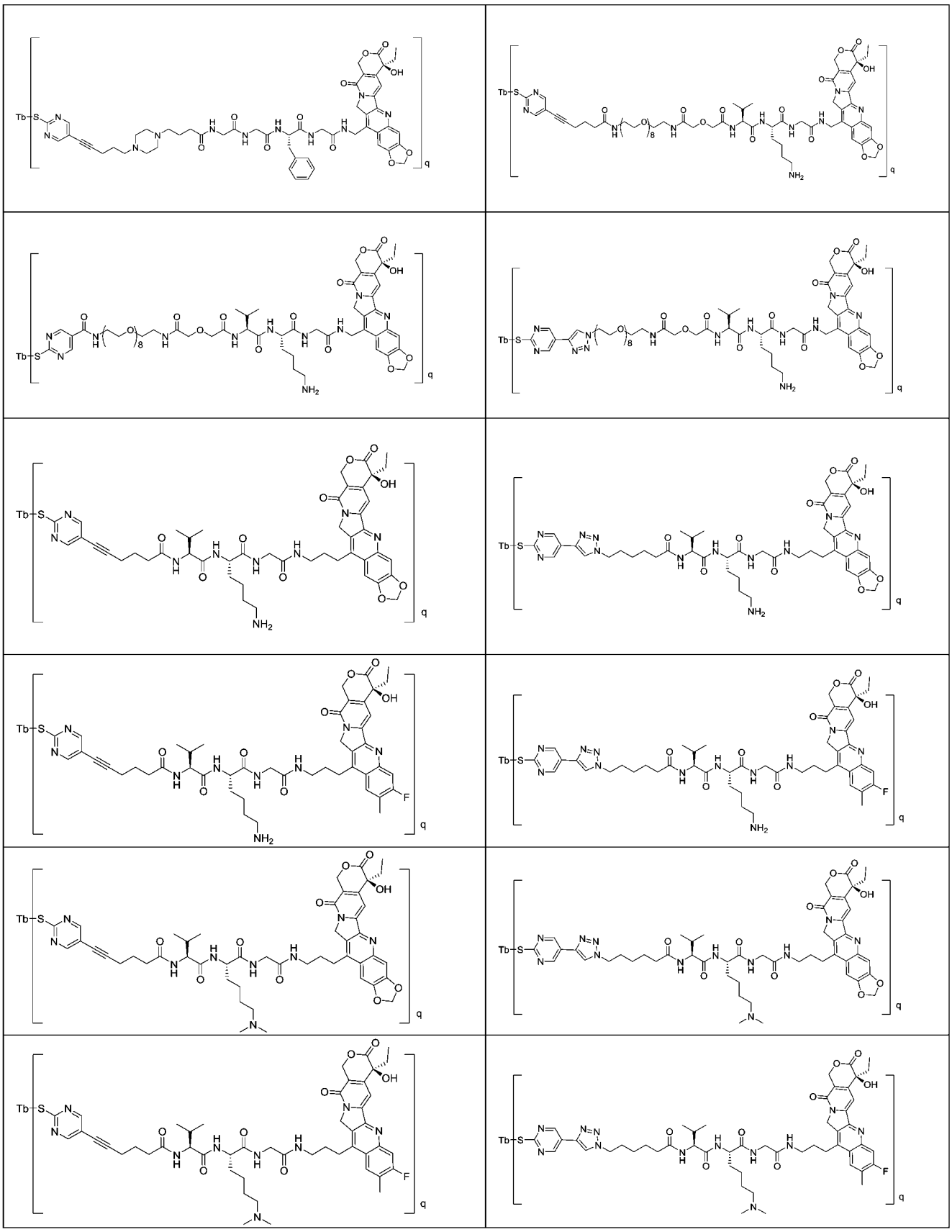


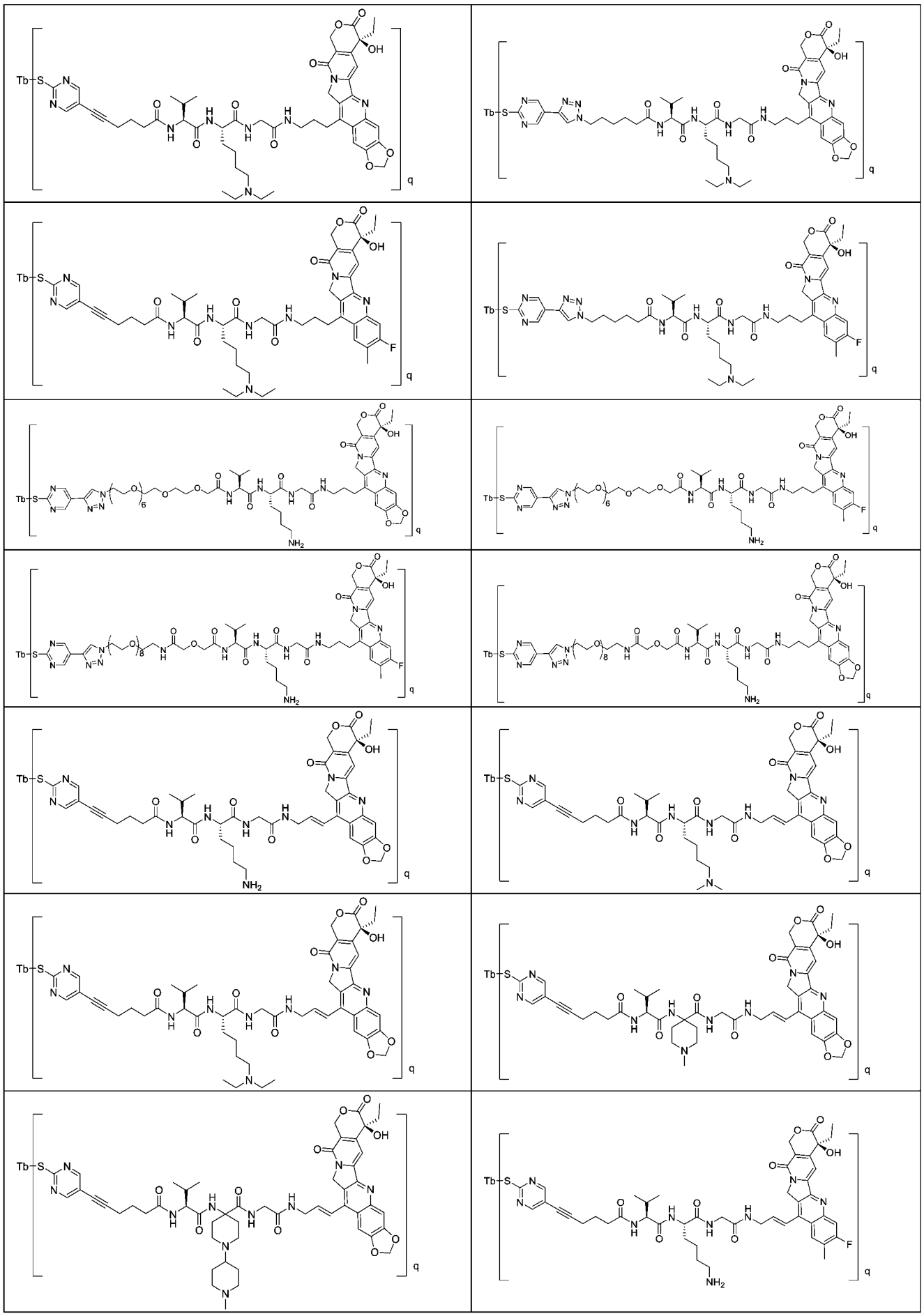
I-B ，

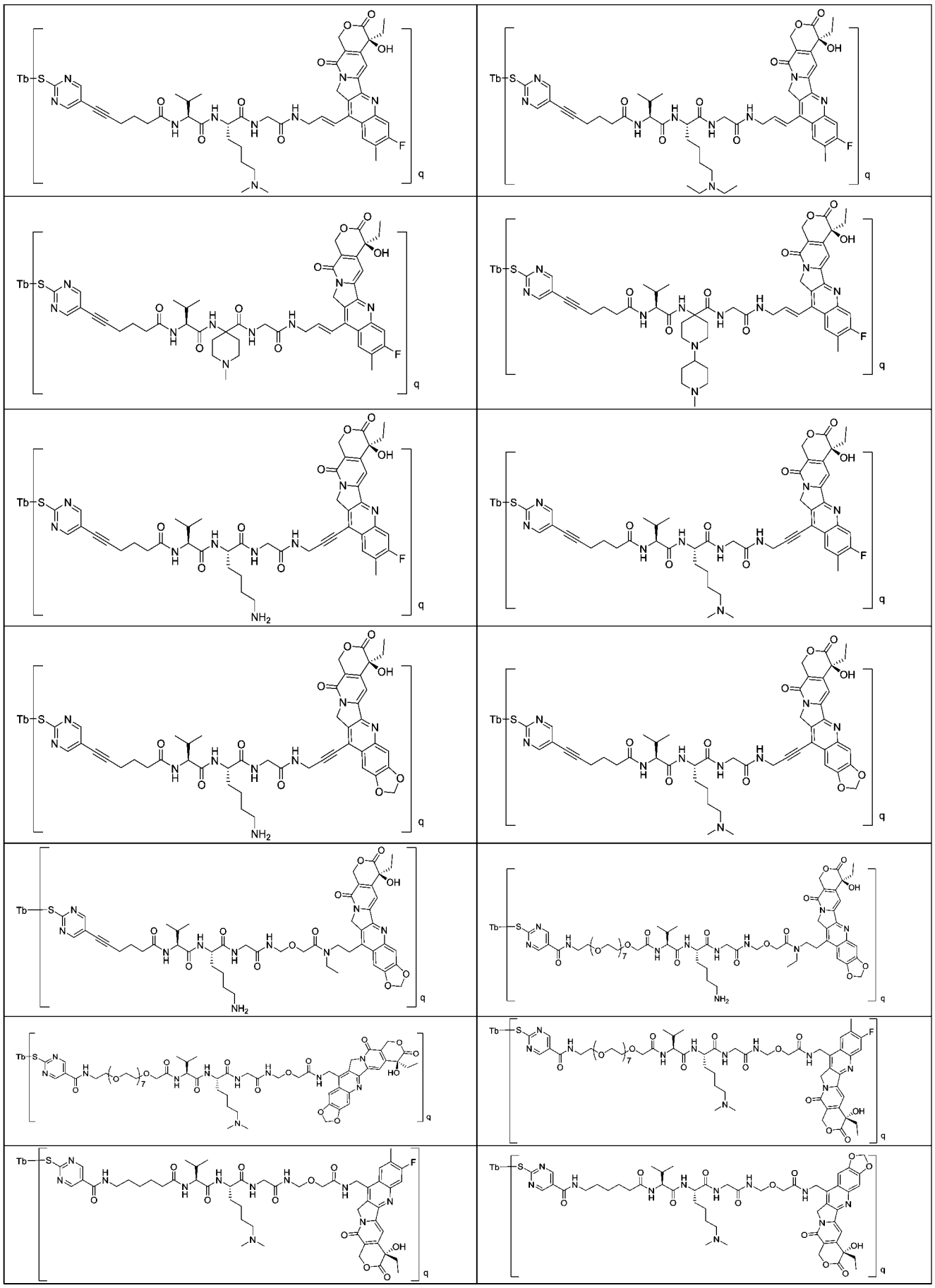
其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

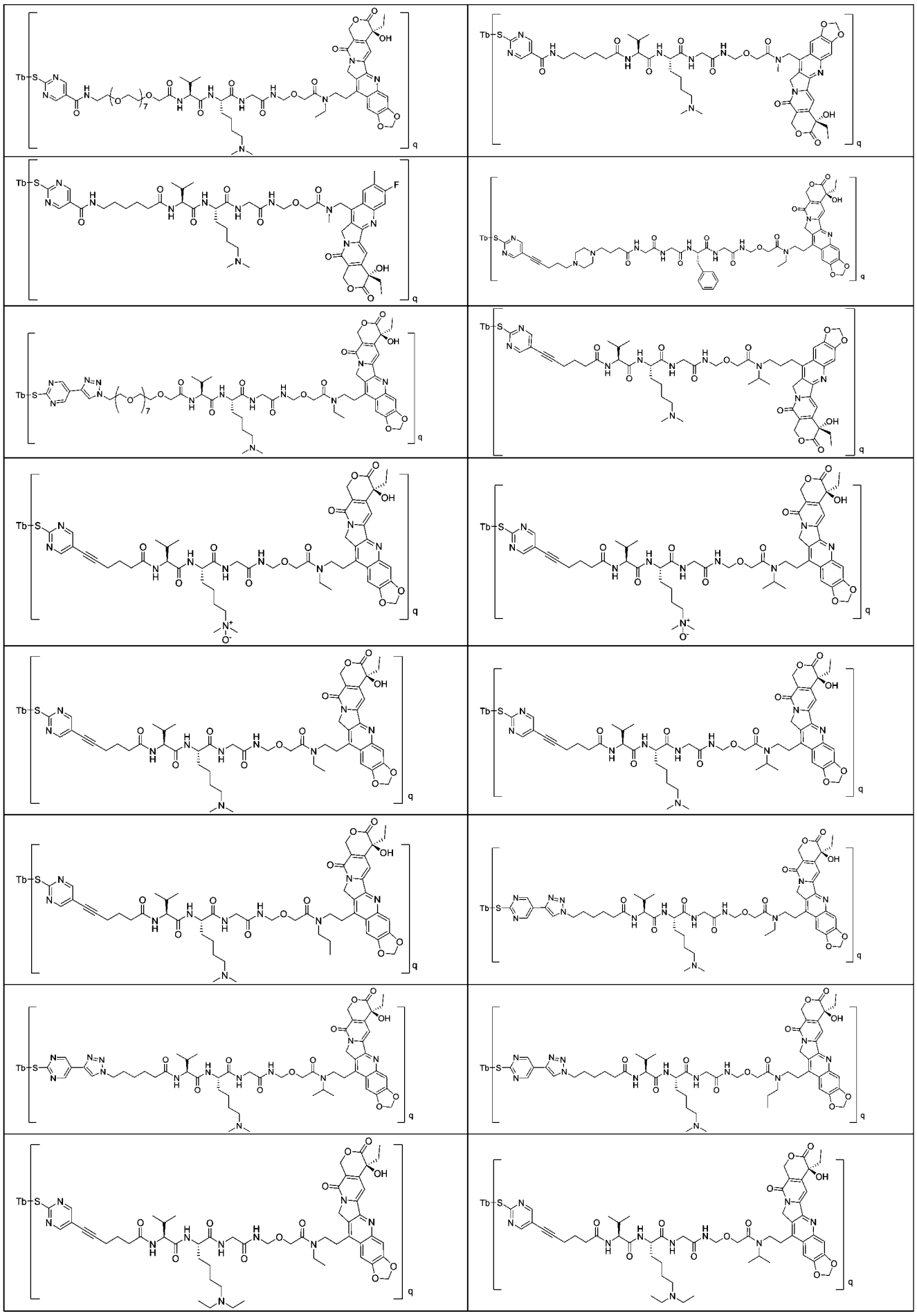
【0217】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自以下：

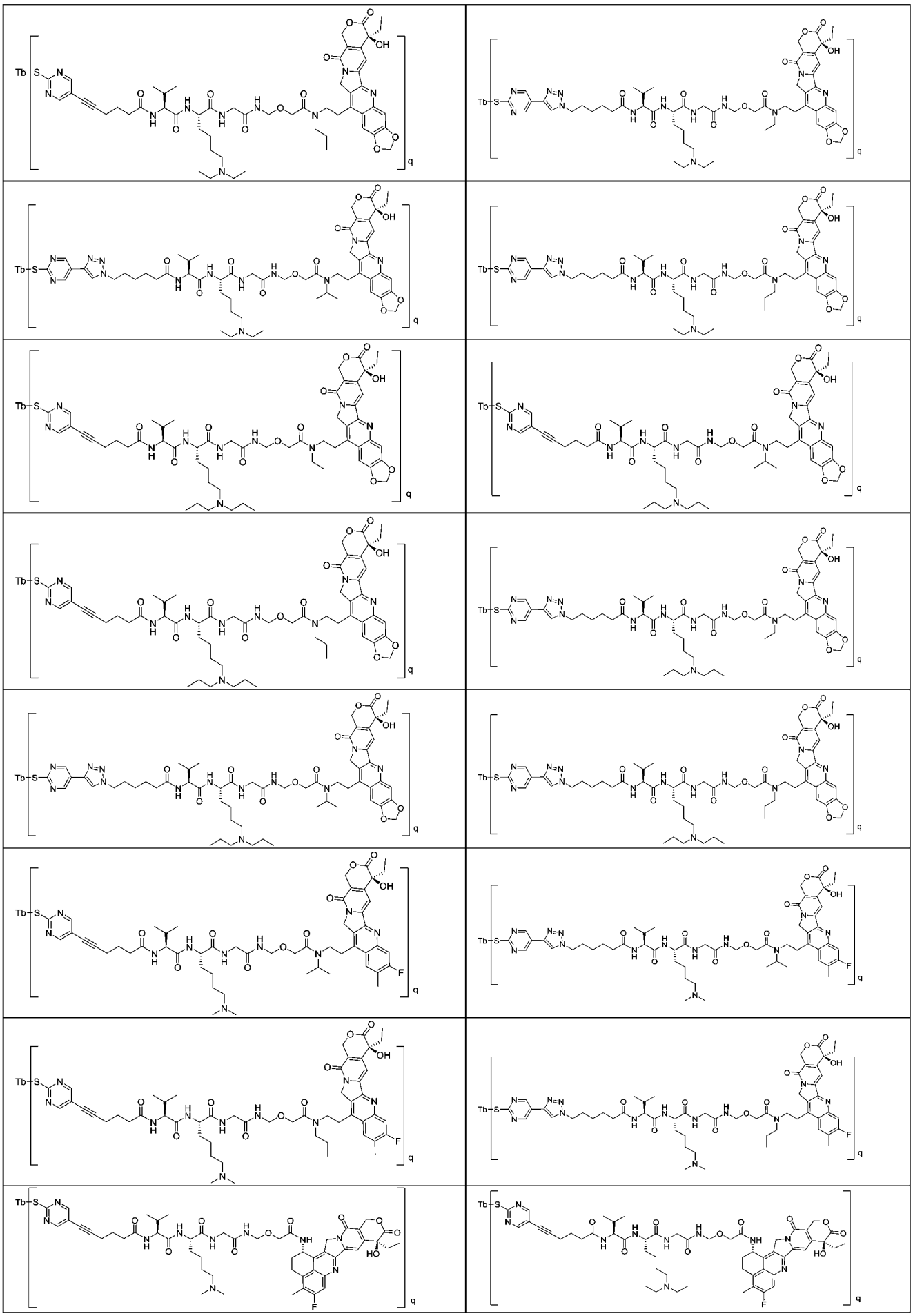


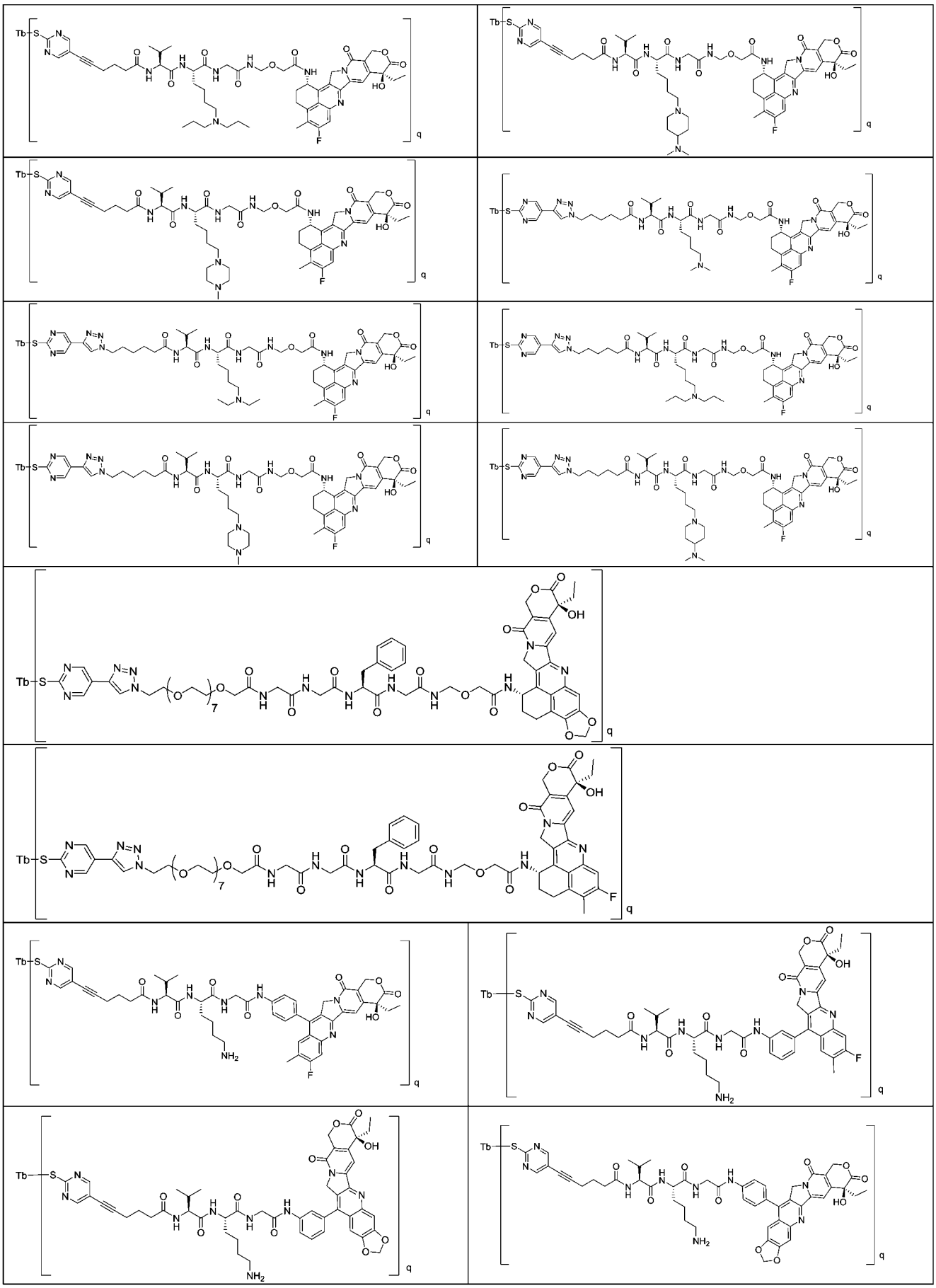


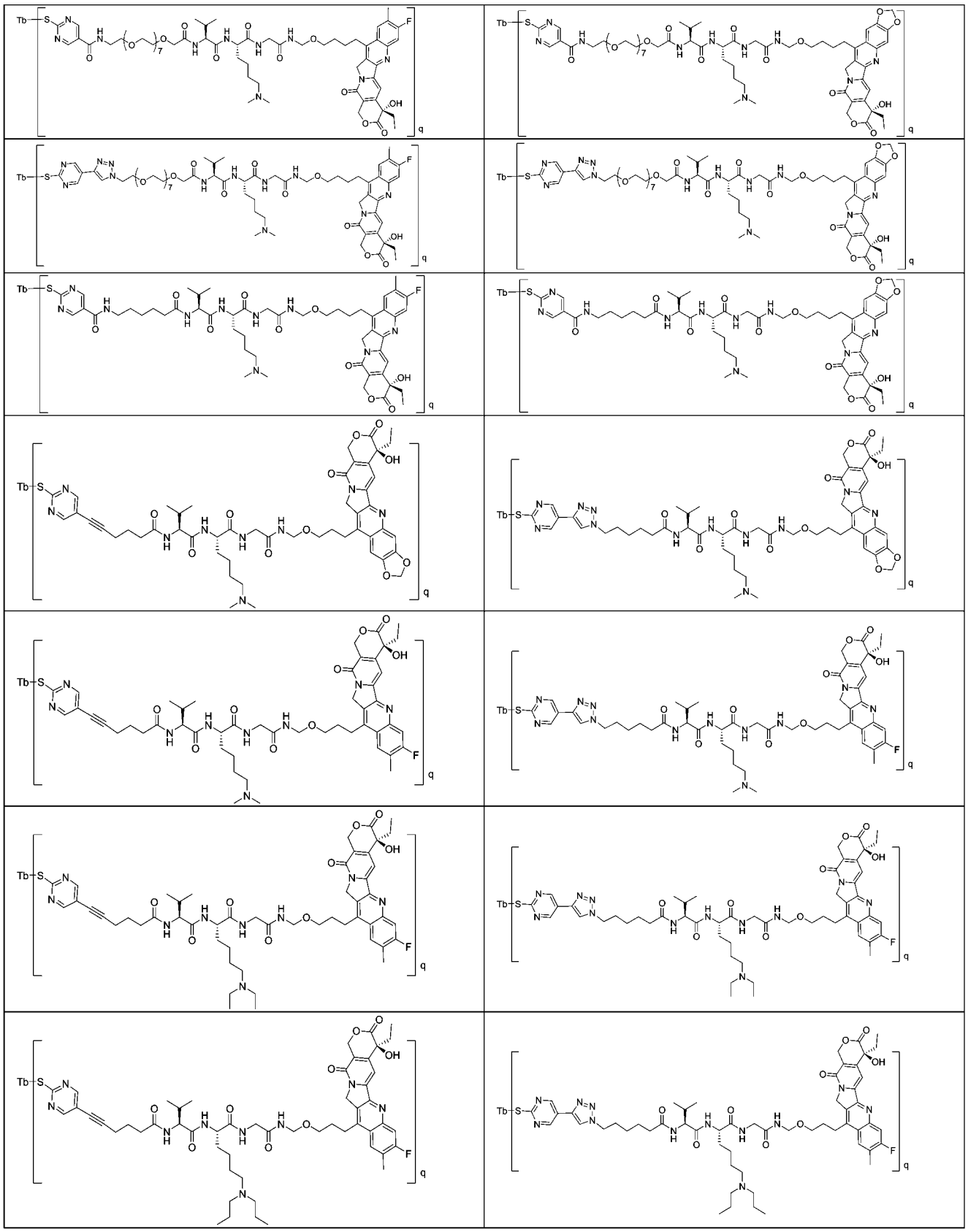


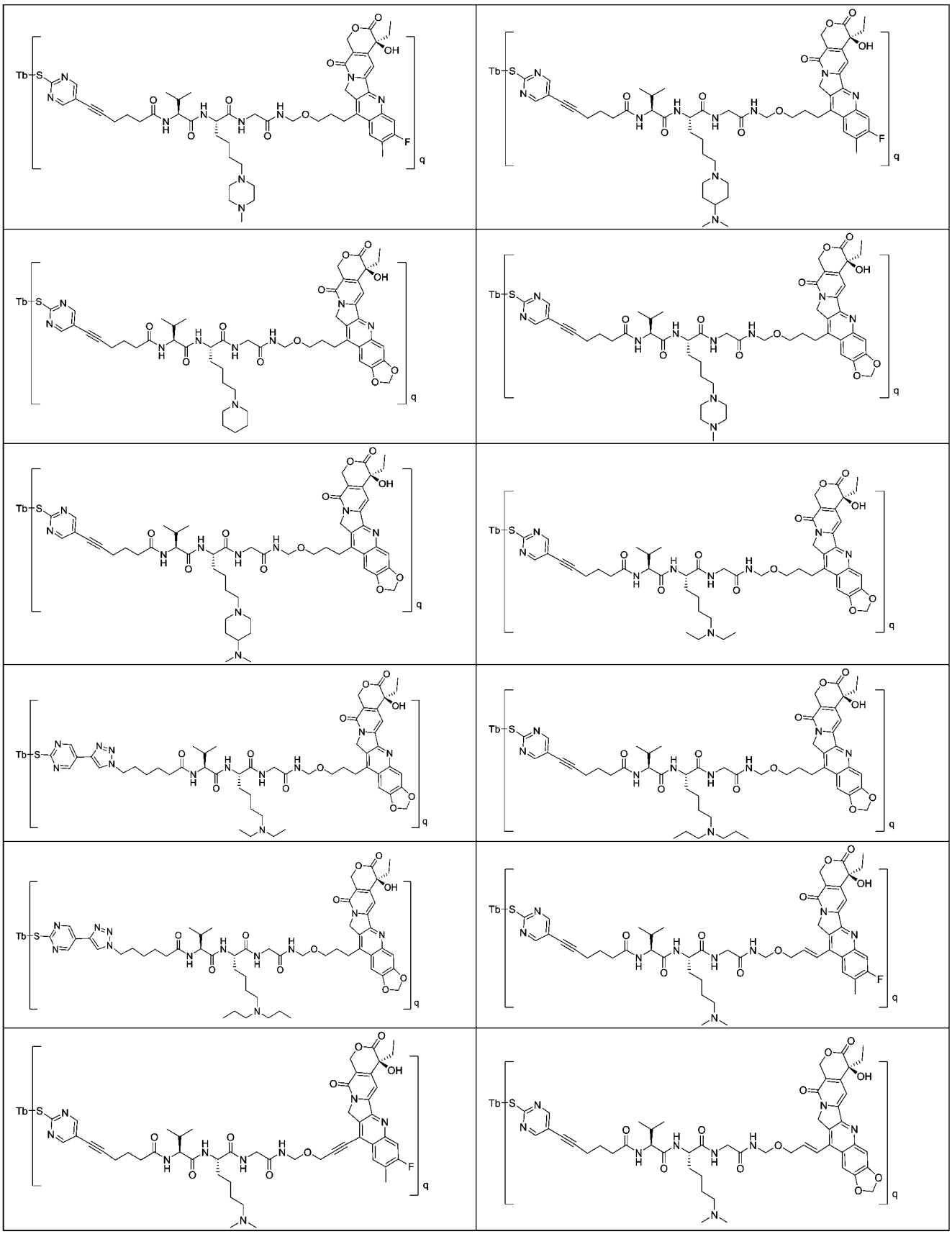


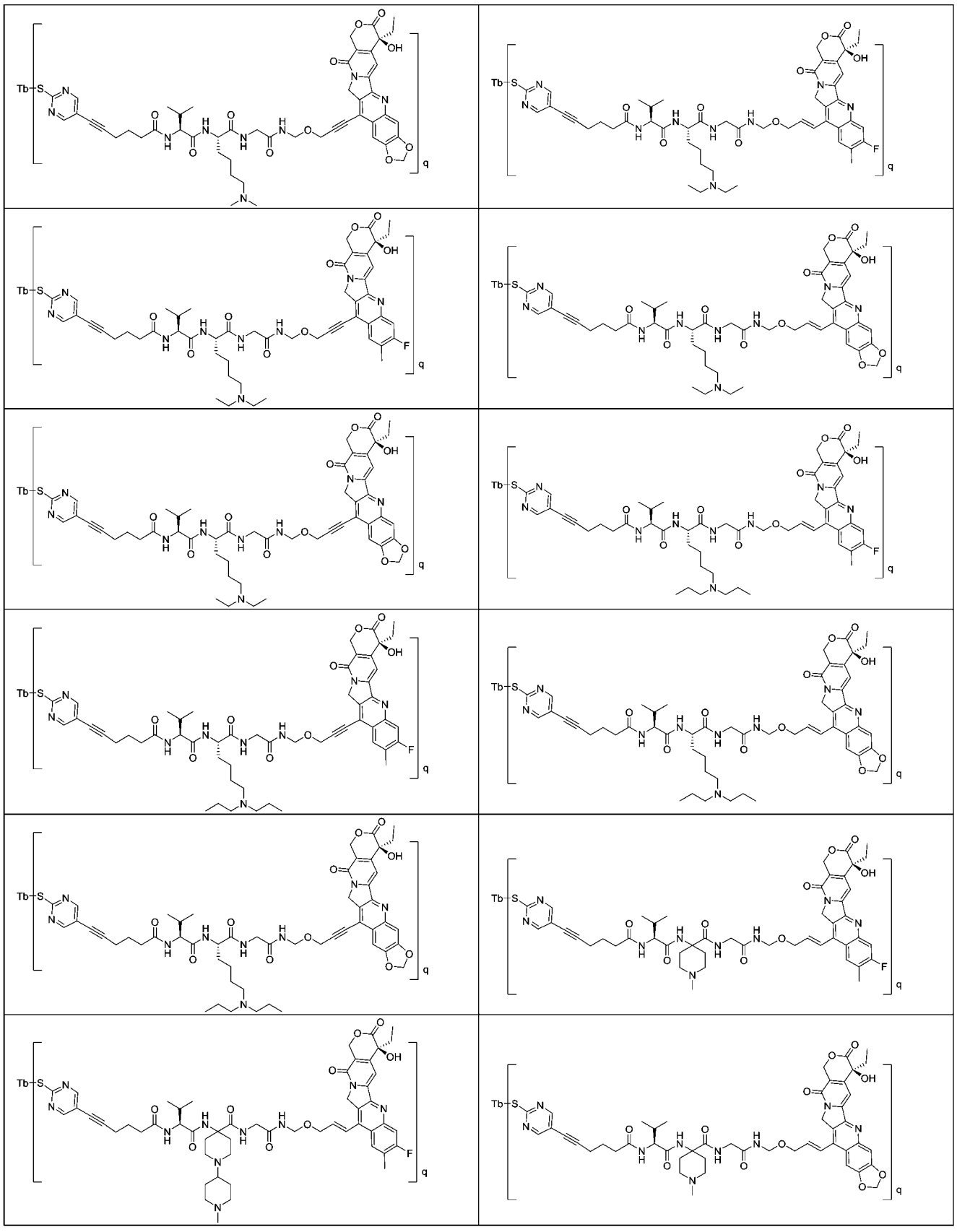


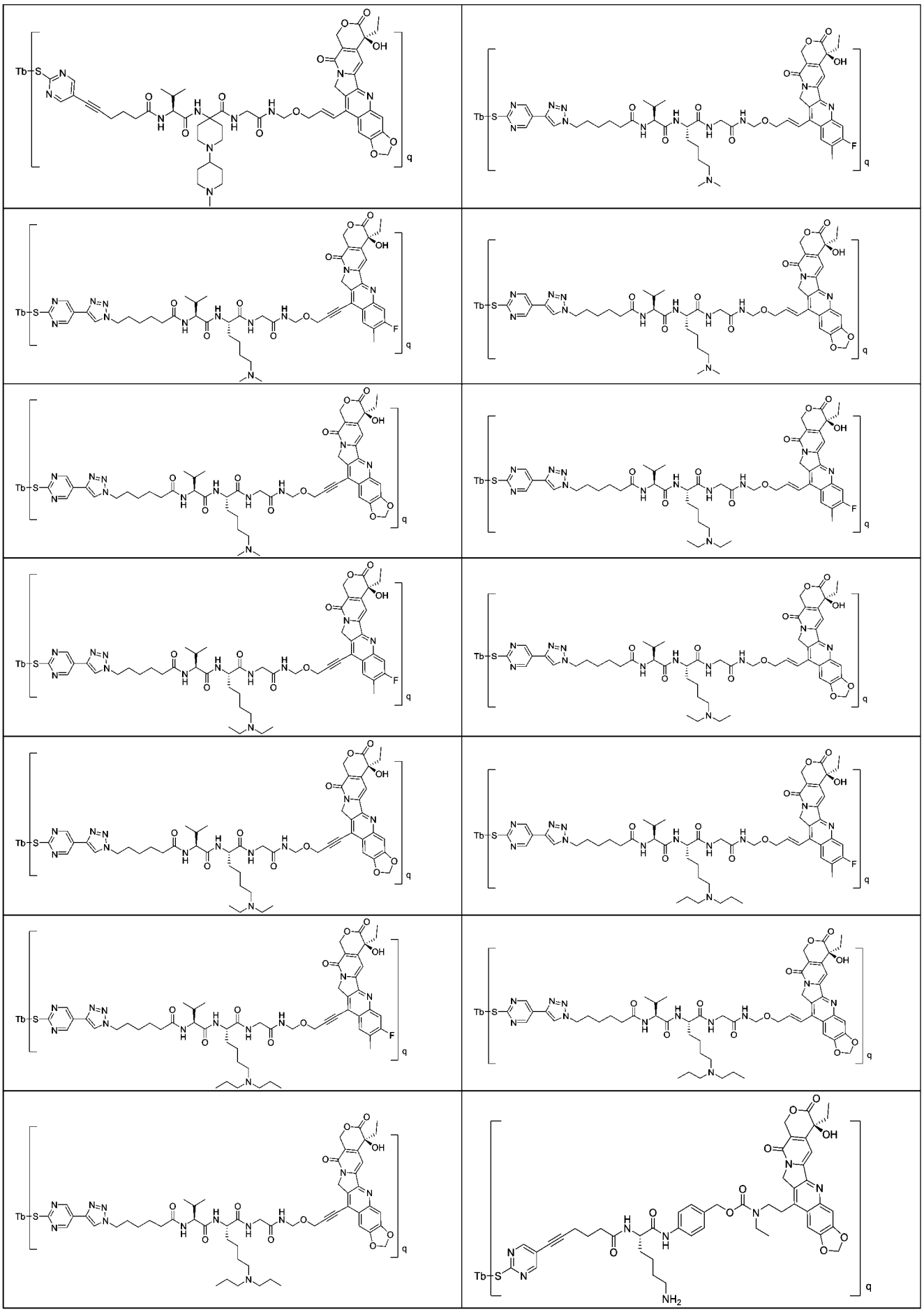


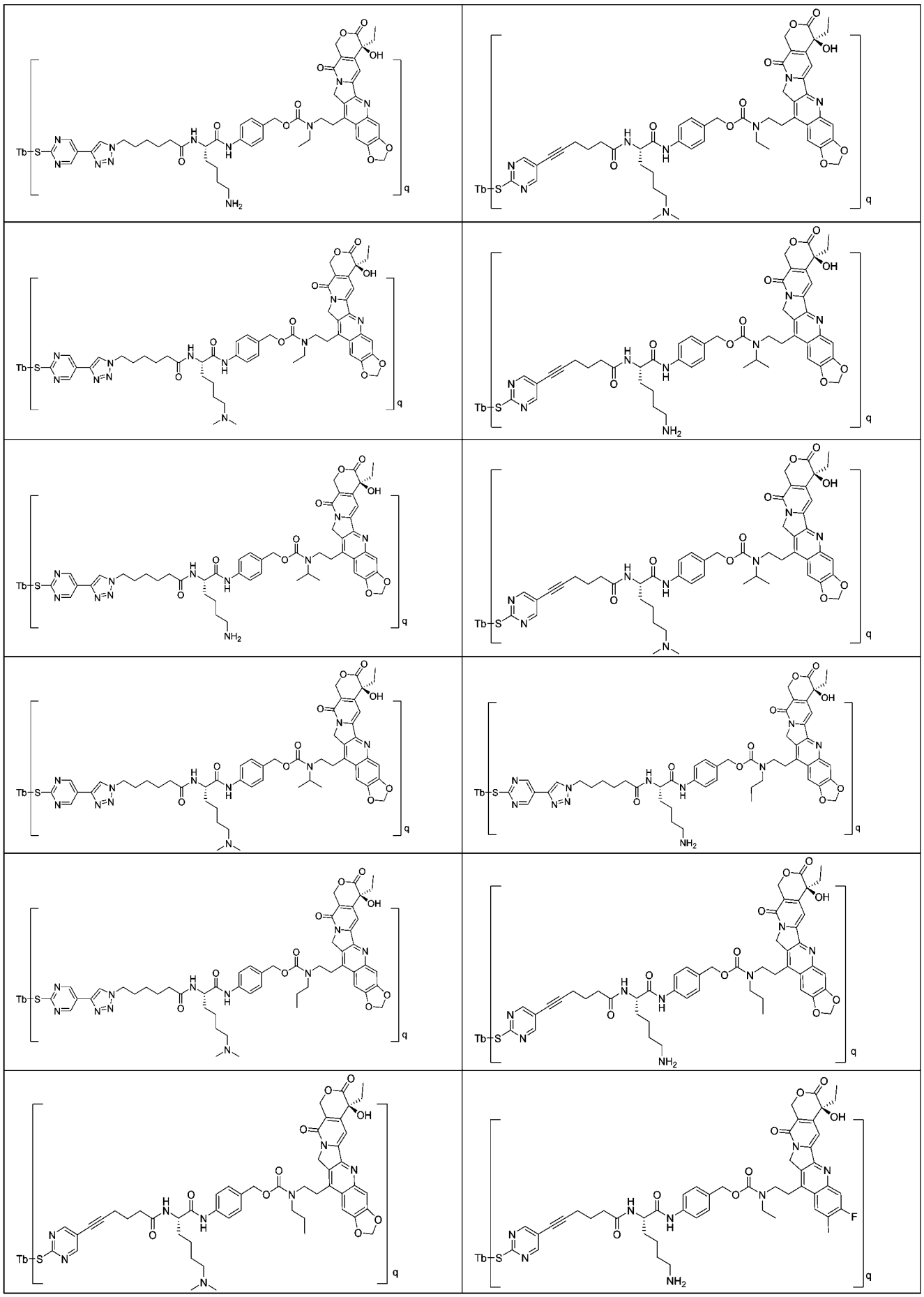


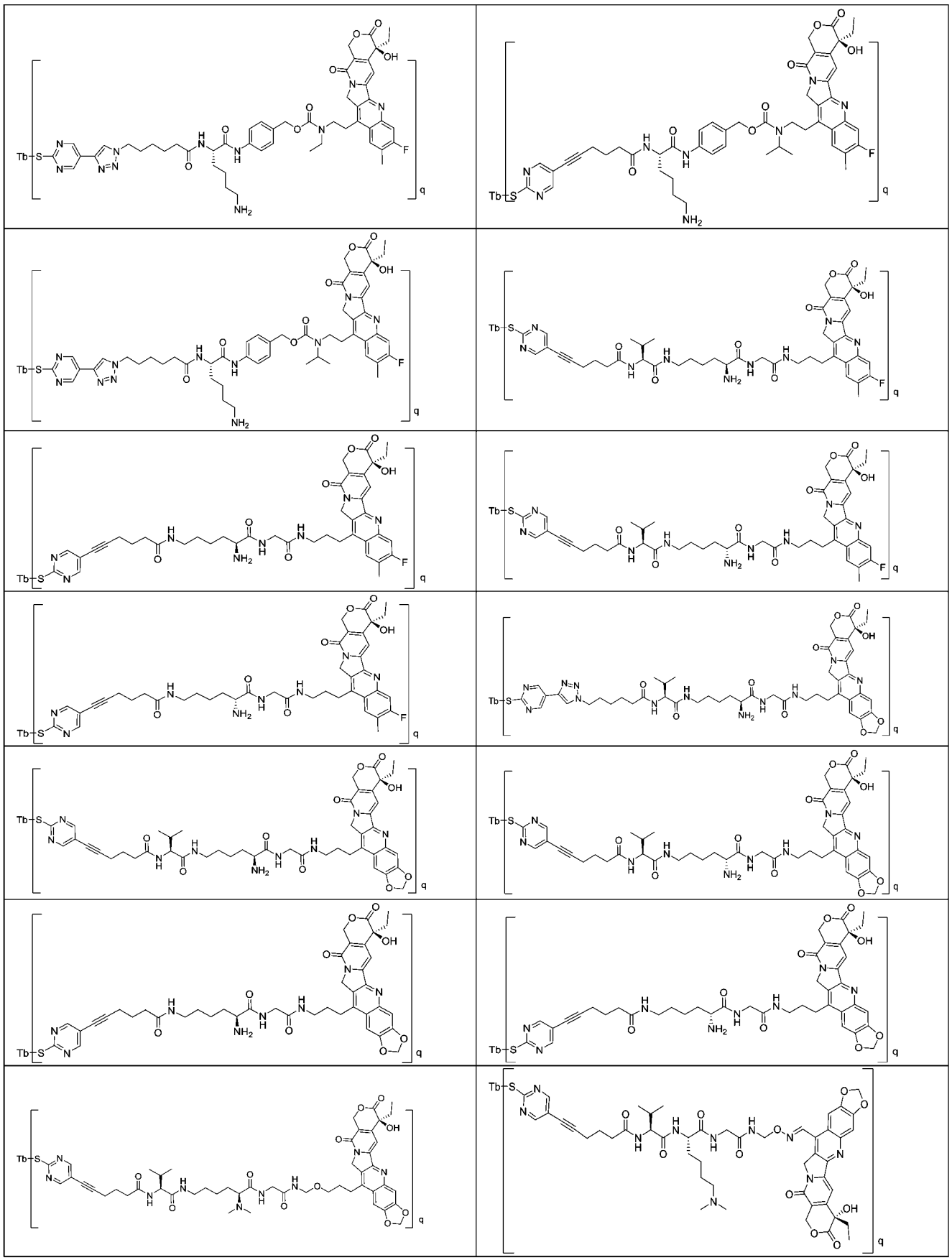


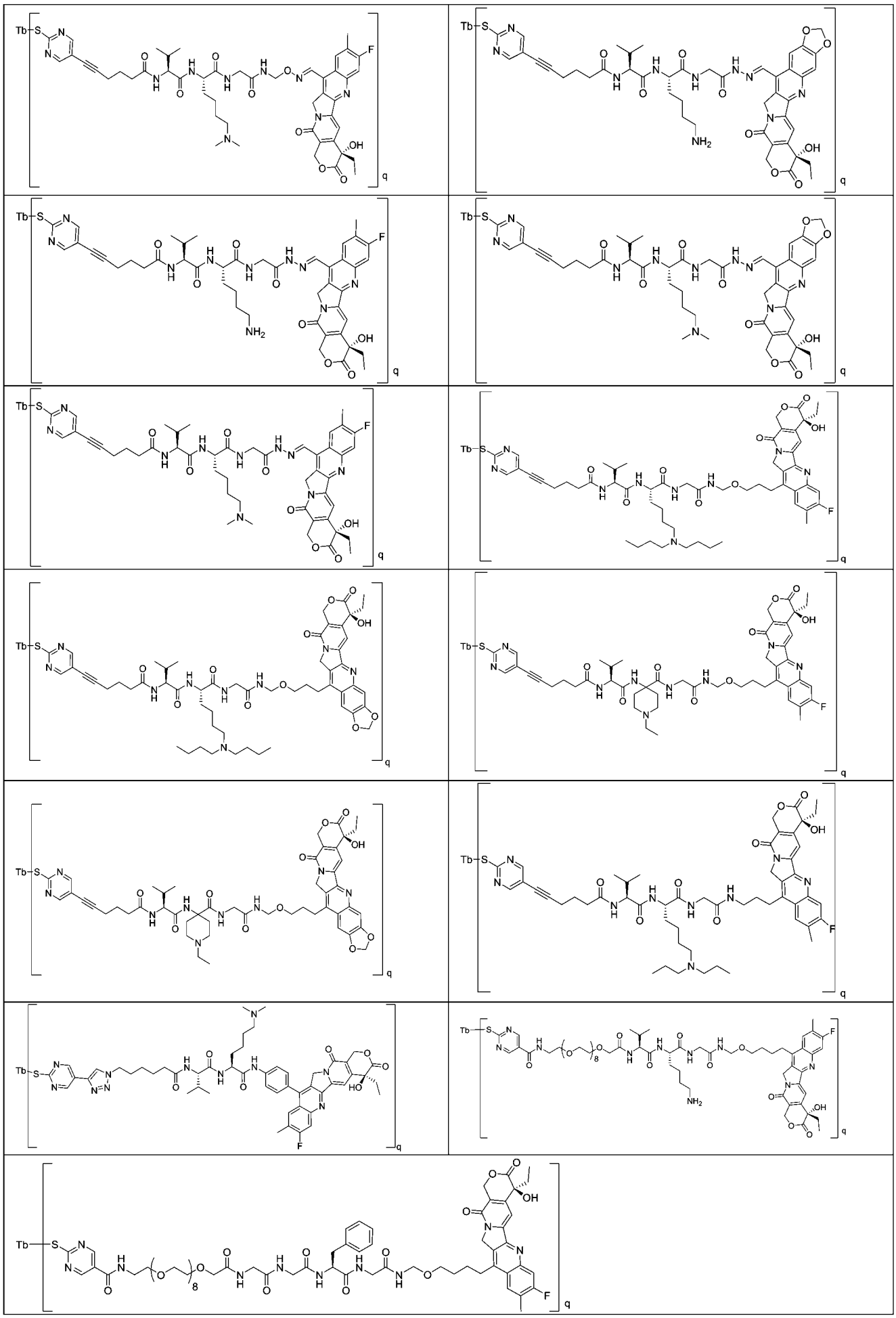


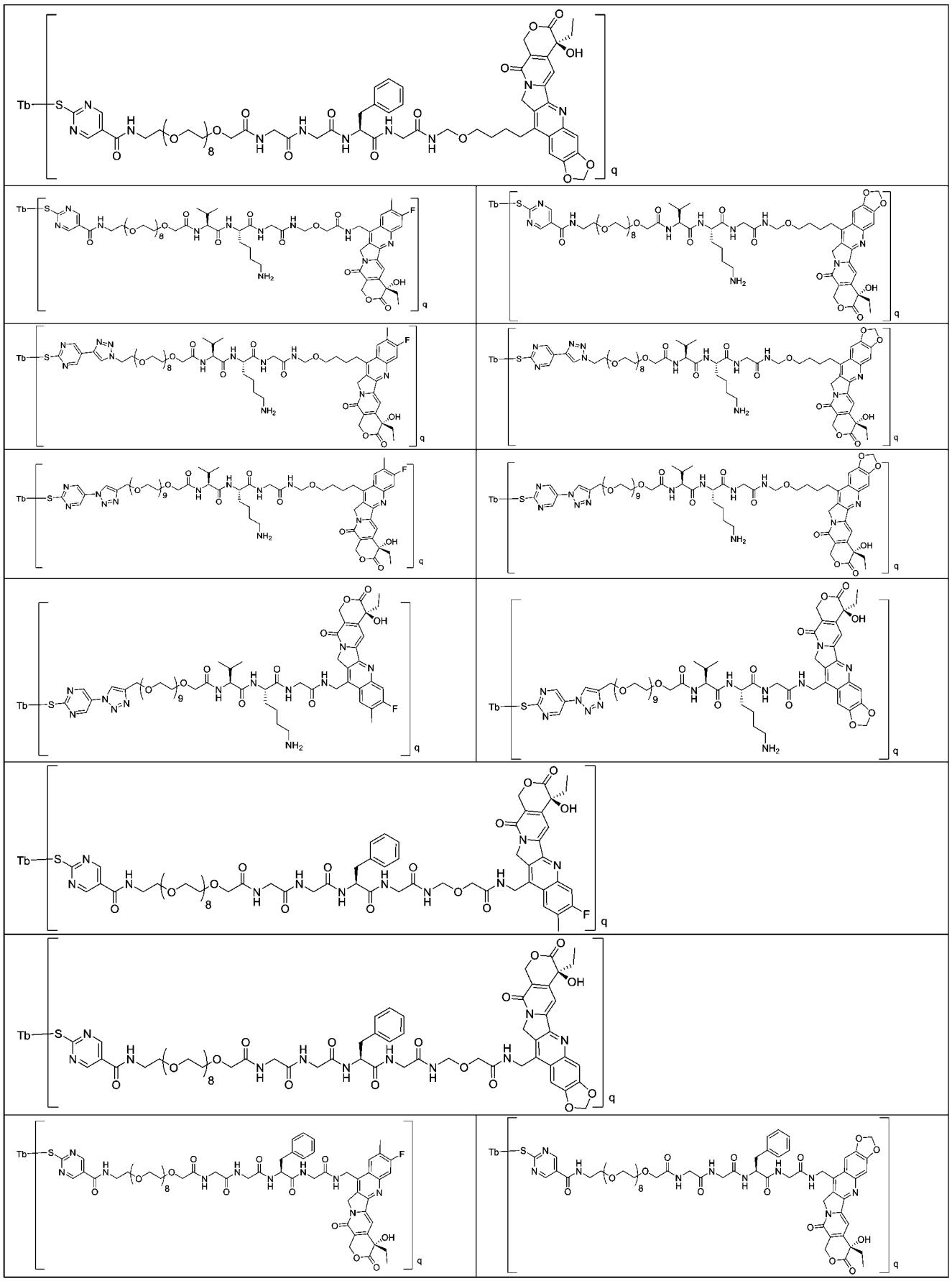


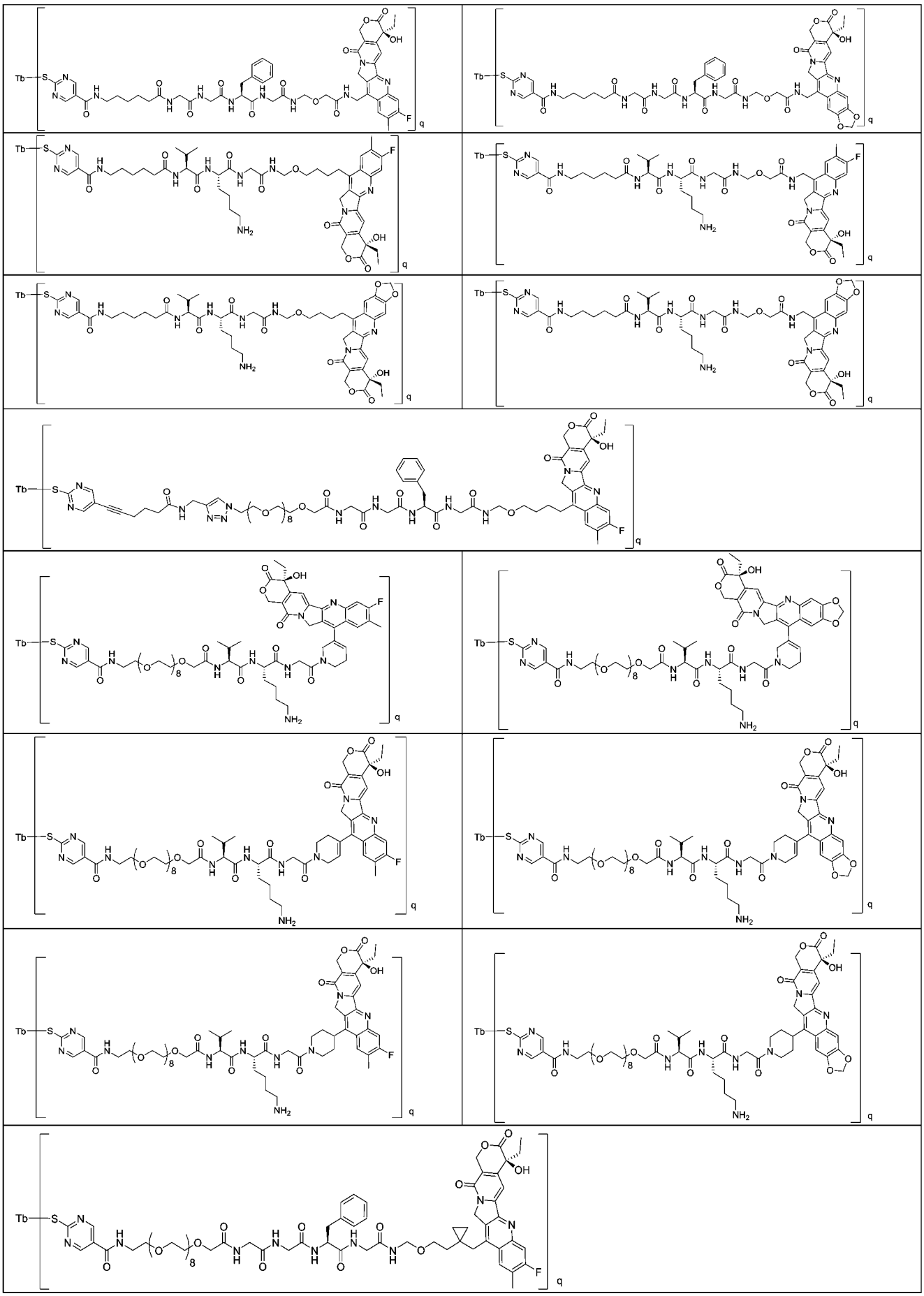


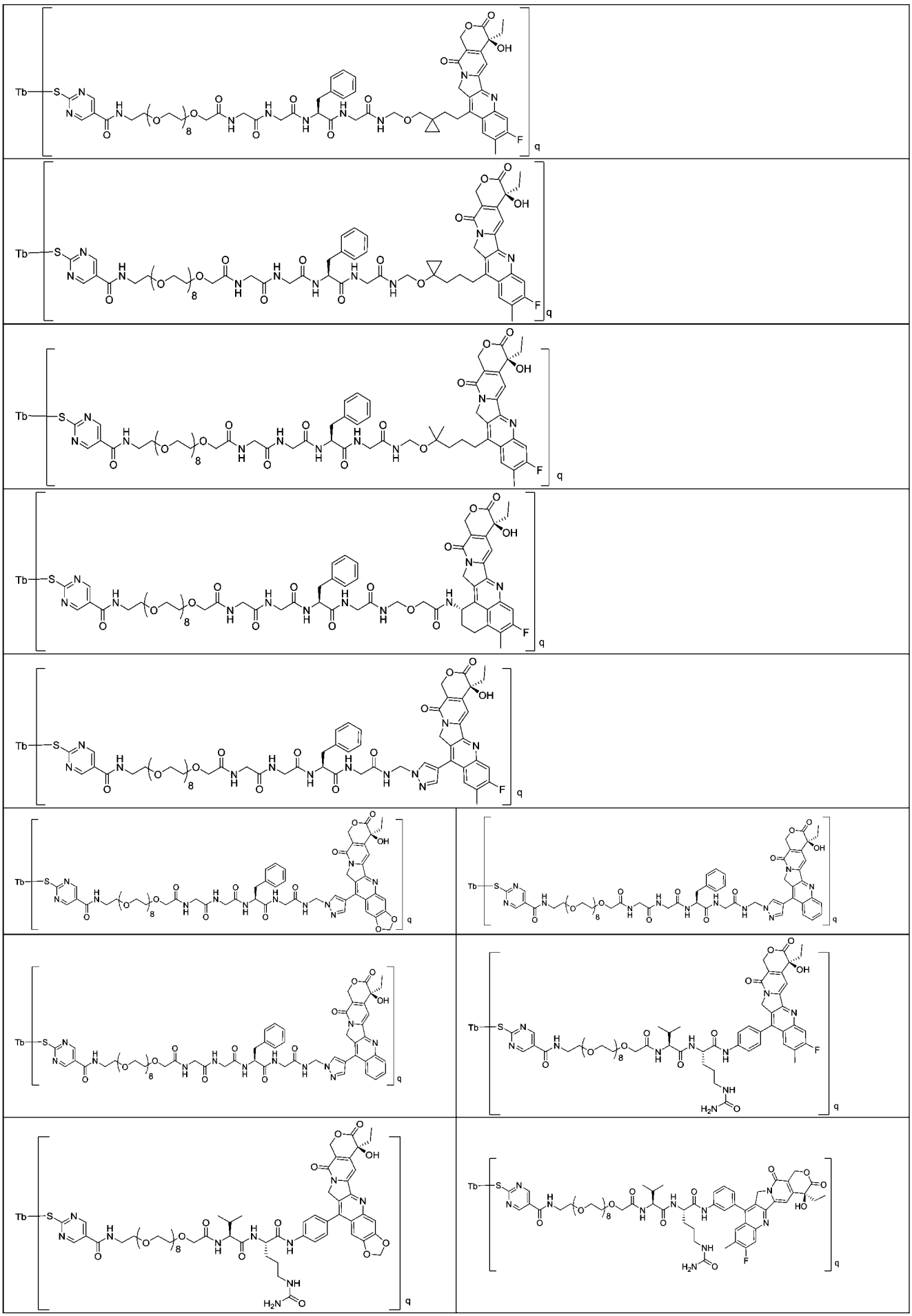


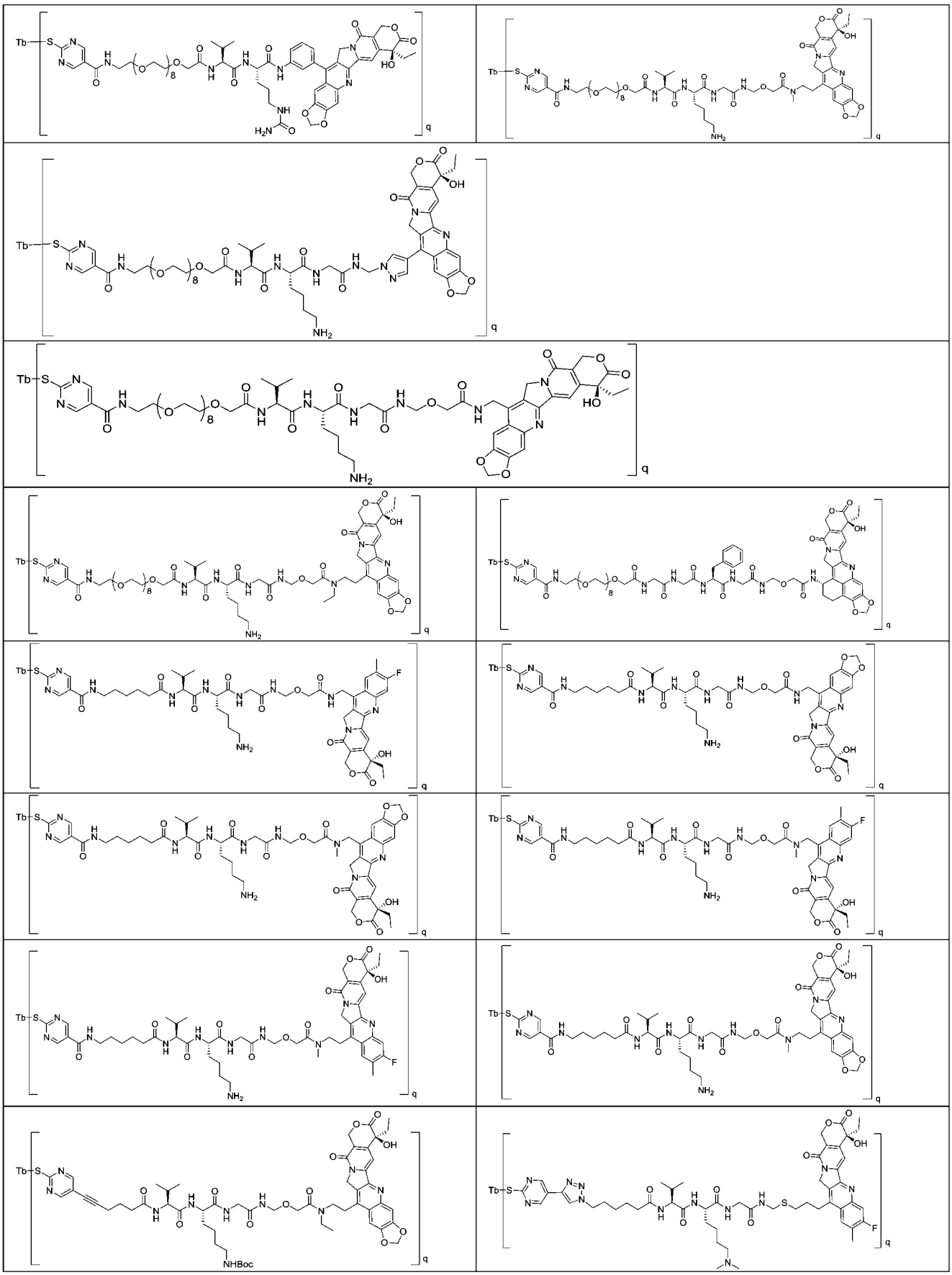


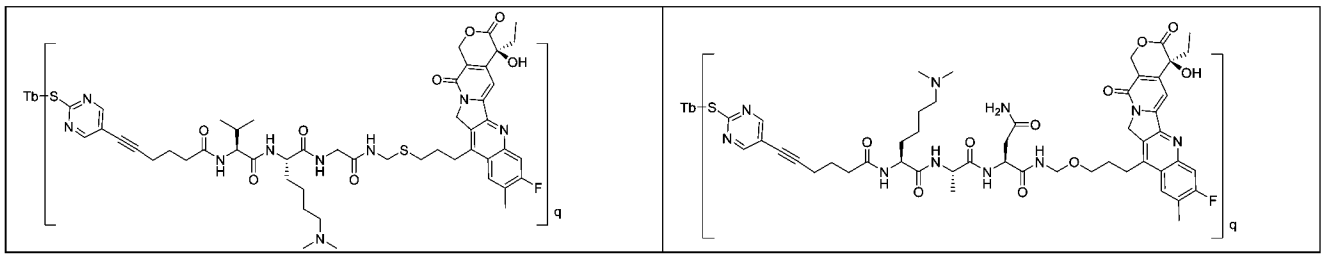












。

【0218】所述Tb的抗體或其抗原結合的片段可以本領域已知的各種方法來製備，例如通過基因工程重組技術來獲得。例如，通過化學合成或PCR擴增獲得編碼本公開抗體的重鏈和輕鏈基因的DNA分子。將所得DNA分子插入表達載體內，然後轉染宿主細胞。然後，在特定條件下培養轉染後的宿主細胞，並表達本公開的抗體。

【0219】在本公開的部分實施方案中，靶向部分為抗B7H3抗體或其抗原結合的片段。在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體包括所有現有技術中的抗B7H3抗體，例如enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab，以及參見CN112521512，WO2021027674，WO2021021543，WO2021006619，CN111662384，CN111454357，WO2020151384，WO2020140094，WO2020103100，WO2020102779，WO2020063673，WO2020047257，WO2020041626，CN110684790，CN110642948，WO2019225787，WO2019226017，US20190338030，CN110305213，WO2018209346，WO2018177393，US9150656，WO2016106004，WO2016044383，WO2016033225，WO2015181267，US20120294796，WO2011109400，CN101104639，WO2004093894，WO2002010187，WO2001018021中的抗B7H3抗體。在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段選自：CN103687945B中編號M30-H1-L4抗體和CN109069633A中編號mAb-C-

DUBA的抗體。

【0220】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR）的抗體或其抗原結合片段，其中CDR按IMGT編號系統定義：

(a)序列為SEQ ID NO:10的HCDR1，序列為SEQ ID NO:11的HCDR2，序列為SEQ ID NO:12的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:20的LCDR1，序列為GTF的LCDR2，序列為SEQ ID NO:22的LCDR3；

(b)序列為SEQ ID NO:10的HCDR1，序列為SEQ ID NO:11的HCDR2，序列為SEQ ID NO:12的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:40的LCDR1，序列為GAS的LCDR2，序列為SEQ ID NO:42的LCDR3；

(c)序列為SEQ ID NO:30的HCDR1，序列為SEQ ID NO:31的HCDR2，序列為SEQ ID NO:32的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:40的LCDR1，序列為GAS的LCDR2，序列為SEQ ID NO:42的LCDR3；

或

(d)序列為SEQ ID NO:30的HCDR1，序列為SEQ ID NO:31的HCDR2，序列為SEQ ID NO:32的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:20的LCDR1，序列為GTF的LCDR2，序列為SEQ ID NO:22的LCDR3。

【0221】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段，按

IMGT編號系統定義，包含：

含有（a）中重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有（a）輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL；

含有（b）中重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有（b）輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL；

含有（c）中重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有（c）輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL；或

含有（d）中重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有（d）輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL。

【0222】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR），其中CDR按Chothia編號系統定義：

(a)序列為SEQ ID NO:4的HCDR1，序列為SEQ ID NO:5的HCDR2，序列為SEQ ID NO:6的HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 的 LCDR3；

(b)序列為 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

(c)序列為 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列

為 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

或

(d)序列為 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 的 LCDR3。

【0223】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段，按Chothia編號系統定義，包含：

含有（a）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（a）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（b）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（b）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（c）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（c）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；或

含有（d）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（d）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

【0224】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR），其中CDR按kabat編號系統定義：

(a)序列為 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

(b)序列為 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c)序列為 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或

(d)序列為 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 的 LCDR3。

【0225】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段，按kabat編號系統定義，包含：

含有（a）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（a）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（b）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（b）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（c）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（c）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；或

含有（d）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（d）輕鏈

LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

【0226】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈可變區（VH），其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列；

(ii) 與 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 輕鏈可變區（VL），其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列；

(v)與 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0227】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ

ID NO:3所示的VH，和/或，SEQ ID NO:13所示的VL。

【0228】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH，和/或，SEQ ID NO:33所示的VL。

【0229】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH，和/或，SEQ ID NO:33所示的VL。

【0230】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH，和/或，SEQ ID NO:13所示的VL。

【0231】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(e) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)至(f)任一組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0232】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體的重鏈包含人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。在某些實施方案中，所述抗B7H3抗體輕鏈包含人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。

【0233】在一些實施方案中，恆定區被改變，例如被突變，以修飾抗B7H3抗體分子的性質（例如改變下列中的一個或多個特性：Fc受體結合、抗體醣基化、半胱胺酸殘基的數目、效應細胞功能或補體功能）。可以通過將抗體恆定區中的至少一個胺基酸殘基替換為不同殘基，產生功能改變，例如，改變抗體對效應子配體（如FcR或補體C1q）的親和力，從而改變效應子功能（例如降低）。抗體的Fc區介導幾種重要的效應子功能，例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

【0234】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段具有重鏈恆定區（CH），其選自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重鏈恆定區；特別地選自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重鏈恆定區，更特別地選自IgG1（例如是人IgG1）的重鏈恆定區。在一

些實施方案中，人IgG1重鏈恆定區如SEQ ID NO:43所示。在一些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段具有輕鏈恆定區，其選自例如κ或λ輕鏈恆定區，優選κ輕鏈恆定區（例如人κ輕鏈恆定區）。在一些實施方案中，輕鏈恆定區具有如SEQ ID NO:44所示的序列。

【0235】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:43所示的CH或其變體，所述變體與SEQ ID NO:43相比具有至多20個胺基酸的保守置換（例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換），或者與SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

【0236】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含輕鏈恆定區或其變體。在一些實施方案中，所述輕鏈恆定區包含κ輕鏈恆定區。在一些實施方案中，所述輕鏈恆定區包含SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與SEQ ID NO:44相比具有至多20個胺基酸的保守置換（例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換），或者與SEQ ID NO:44相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

【0237】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ

ID NO:43所示的重鏈恆定區（CH）和SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）。

【0238】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii)與(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 輕鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:13 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）

的序列；或

(vi)　與(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0239】在一些實施方案中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0240】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii)與(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 輕鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv)　包含 SEQ ID NO:33 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30

個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0241】在一些實施方案中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0242】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:45 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:46 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0243】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:47 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至

少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:48 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0244】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段是嵌合抗體，人源化抗體或全人源抗體。

【0245】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段選自scFv、Fab、Fab’、(Fab’)2、Fv片段、二硫鍵連接的Fv(dsFv)、雙抗體(diabody)。

【0246】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段是scFv。

在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(e) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0247】在一些實施方案中，本公開的抗體是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(i) SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)中所述的置換是保守置換。

【0248】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含SEQ ID NO:1或2所示的序列。

【0249】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段選自：1D1抗體、1D1-01抗體、2E3抗體和2E3-02抗體。

【0250】在本公開的部分實施方案中，靶向部分為曲妥珠單抗或帕妥珠單抗（Pertuzumab）。曲妥珠單抗是抗Her2的單克隆抗體，其胺基酸序列是本發明所屬技術領域具有通常知識者已知的，其示意性序列可參見，例如CN103319599，末位Lys是容易缺失的但不影響生物活性，參見Dick, L. W. 等人，Biotechnol. Bioeng.，100: 1132-1143。

【0251】曲妥珠單抗的示例性的重鏈序列和輕鏈序列可參見例如IMGT /mAb-DB ID 97 。帕妥珠單抗的示例性的重鏈序列和輕鏈序列可參見US7560111的SEQ ID No. 16和SEQ ID No. 15，也可參見IMGT /mAb-DB ID 80。

【0252】在本公開的部分實施方案中，靶向部分為抗Her3抗體或其抗原結合的片段。在一些實施方案中，所述抗Her3抗體包括所有現有技術中的抗Her3抗體，例如，參見抗體barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，istiratumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，zenocutuzumab，202-2-1抗體、抗體CN 103189392 B中重鏈SEQ ID NO:10和輕鏈SEQ ID

NO:14所示的抗體和IMGT/mAb-DB NO:546所示的抗體。

【0253】在一些實施方案中，靶向部分為抗Her3抗體，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR）的抗體或其抗原結合片段，其中CDR按IMGT編號系統定義：

序列為SEQ ID NO:56的HCDR1，序列為SEQ ID NO:57的HCDR2，序列為SEQ ID NO:58的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:41的LCDR1，序列為AAS的LCDR2，序列為SEQ ID NO:21的LCDR3。

【0254】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段，按IMGT編號系統定義，包含：上述含有上述重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有上述輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL。

【0255】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR）的抗體或其抗原結合片段，其中CDR按kabat編號系統定義：

序列為SEQ ID NO:53的HCDR1，序列為SEQ ID NO:54的HCDR2，序列為SEQ ID NO:55的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:59的LCDR1，序列為SEQ ID NO:60的LCDR2，序列為SEQ ID NO:21的LCDR3。

【0256】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段，按kabat編號系統定義，包含：上述含有上述重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有上述輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL。

【0257】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈可變區（VH），其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) SEQ ID NO:49 所示的序列；

(ii) 與 SEQ ID NO:49 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與 SEQ ID NO:49 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 輕鏈可變區（VL），其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:50 所示的序列；

(v) 與 SEQ ID NO:50 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與 SEQ ID NO:50 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0258】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) SEQ ID NO:49 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:50 所示序列的 VL；

(b) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）

和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(c) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0259】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體的重鏈包含人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。在某些實施方案中，所述抗B7H3抗體輕鏈包含人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。

【0260】在一些實施方案中，恆定區被改變，例如被突變，以修飾抗Her3抗體分子的性質（例如改變下列中的一個或多個特性：Fc受體結合、抗體

醣基化、半胱胺酸殘基的數目、效應細胞功能或補體功能）。可以通過將抗體恆定區中的至少一個胺基酸殘基替換為不同殘基，產生功能改變，例如，改變抗體對效應子配體（如FcR或補體C1q）的親和力，從而改變效應子功能（例如降低）。抗體的Fc區介導幾種重要的效應子功能，例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

【0261】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段具有重鏈恆定區（CH），其選自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重鏈恆定區；特別地選自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重鏈恆定區，更特別地選自IgG1（例如是人IgG1）的重鏈恆定區。在一些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段具有輕鏈恆定區，其選自例如κ或λ輕鏈恆定區，優選κ輕鏈恆定區（例如人κ輕鏈恆定區）。

【0262】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:43所示的重鏈恆定區（CH）和SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）。

【0263】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:51 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6

個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:52 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0264】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段是嵌合抗體，人源化抗體或全人源抗體。

【0265】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段選自scFv、Fab、Fab’、(Fab’)2、Fv片段、二硫鍵連接的Fv(dsFv)、雙抗體(diabody)。

【0266】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(a) SEQ ID NO:49 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:50 所示序列的 VL；

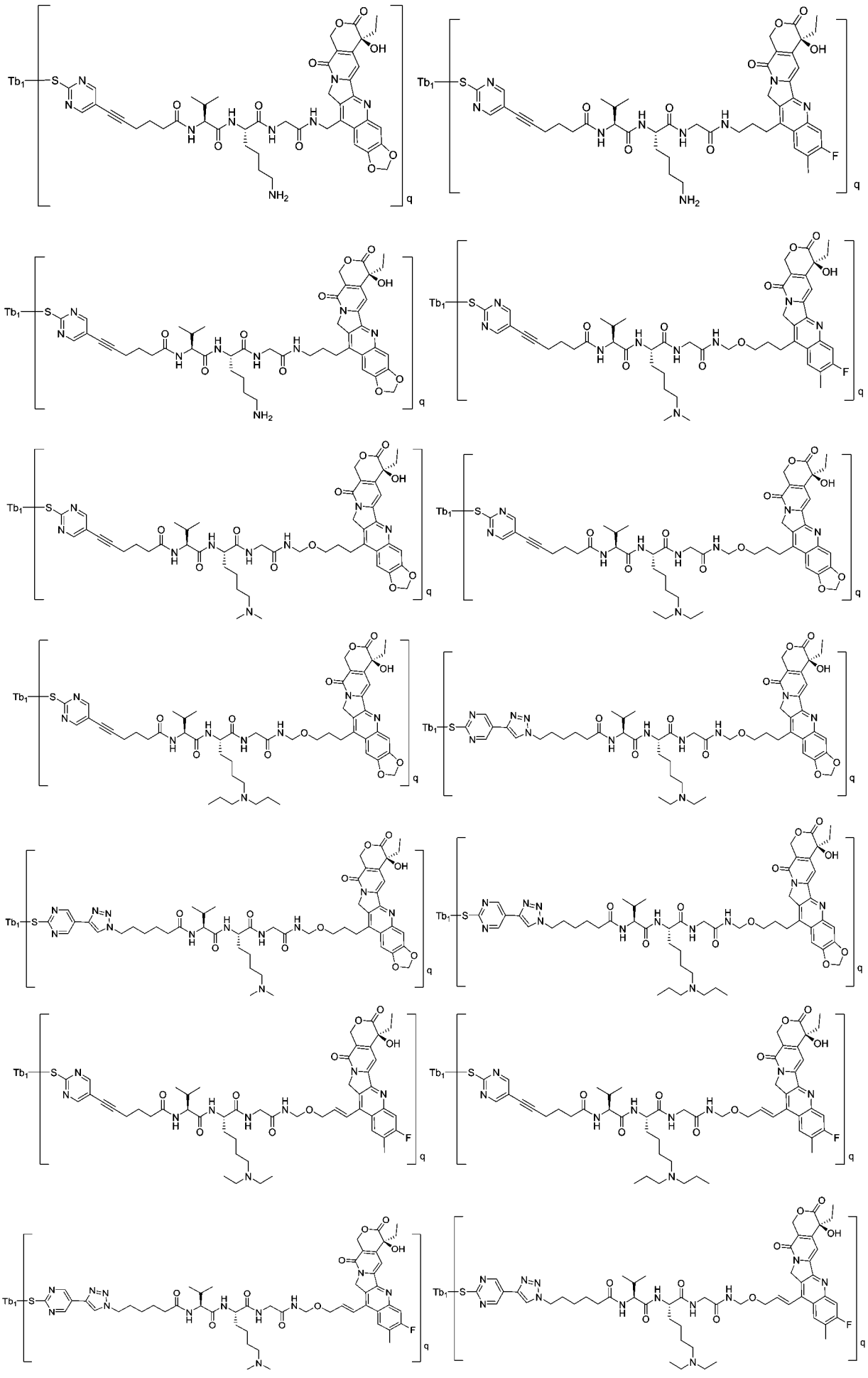
(b) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

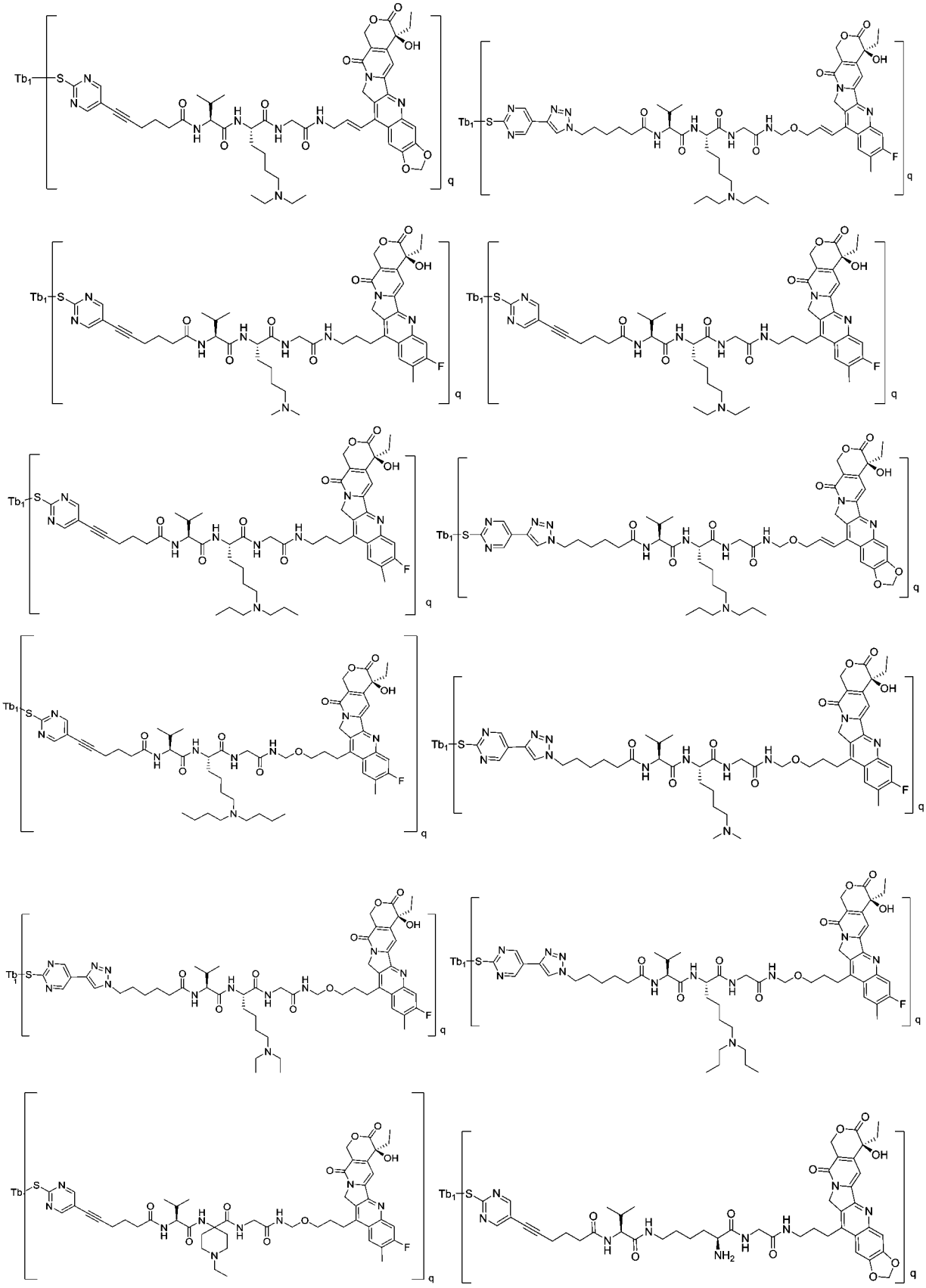
(c) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0267】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段選自：202-2-1抗體。

【0268】在本公開的部分實施方案中，靶向部分為西妥昔單抗（Cetuximab）。西妥昔單抗是抗EGFR的單克隆抗體，其胺基酸序列是本發明所屬技術領域具有通常知識者已知的，其示意性序列可參見，IMGT/mAb-DB ID 151所示的抗體。

【0269】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：

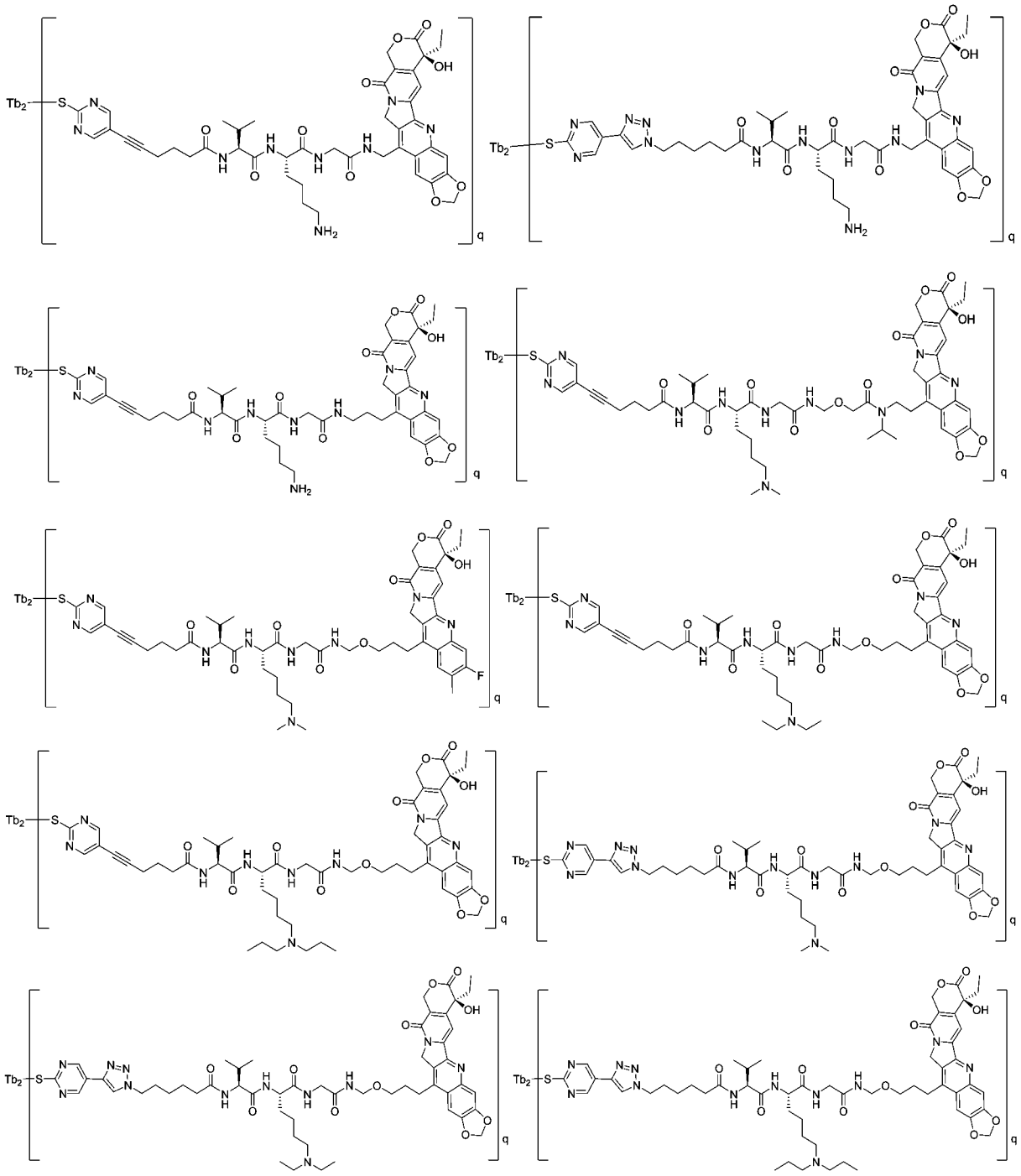




其中，Tb_1 為抗 B7H3 抗體或其抗原結合片段，例如 enoblituzumab，mirzotamab， omburtamab，1D1-01，2E3-02 抗體，優選 1D1-01 或 2E3-02

抗體；q 選自 0.1-16.0 之間的任意數值，優選 2-8 之間的任意數值。在一些實施方案中，q 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些優選地實施方案中，q 為 2、4、6 或 8。

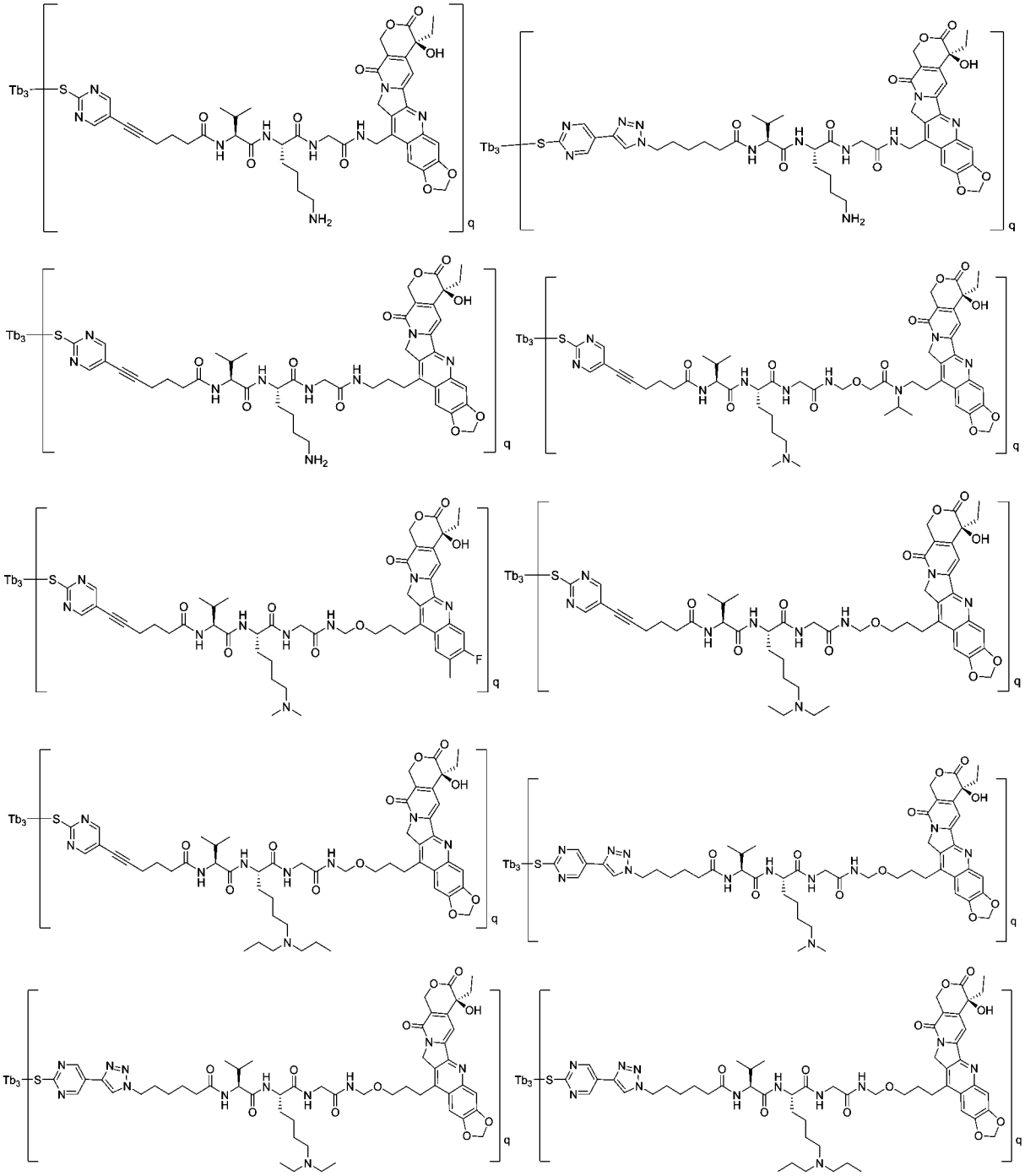
【0270】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_2 為抗 Trop-2 抗體或其抗原結合片段，例如 datopotamab，sacituzumab，優選 sacituzumab；q 選自 0.1-16.0 之間的任意數值，優選 2-8

之間的任意數值。在一些實施方案中，q 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些優選地實施方案中，q 為 2、4、6 或 8。

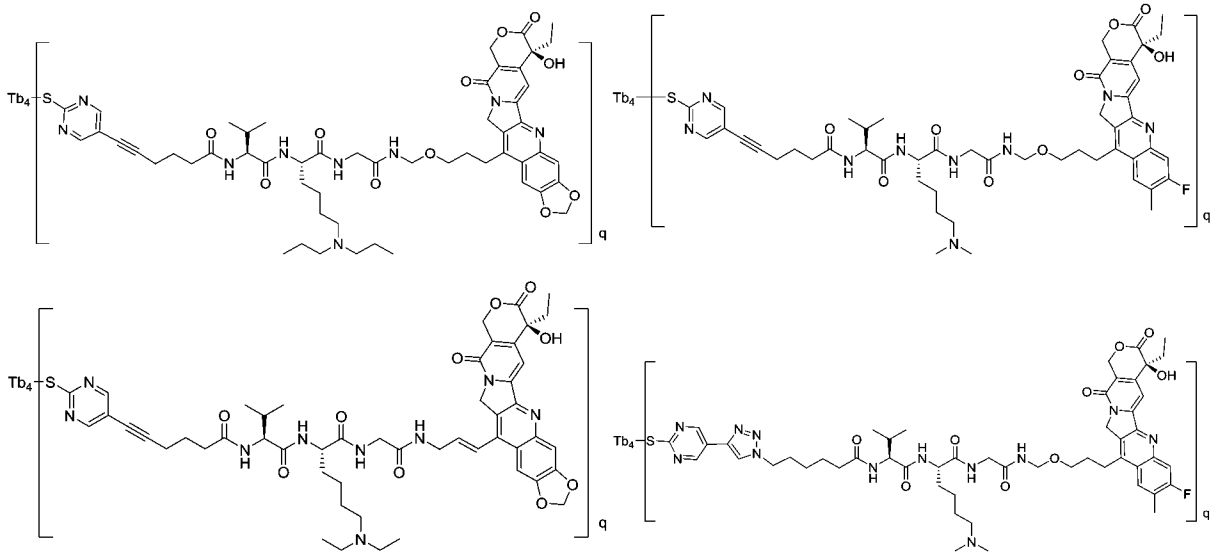
【0271】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_3 為抗 Her2 抗體或其抗原結合片段，例如 anbenitamab，coprelotamab，disitamab，gancotamab，margetuximab，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab，Pertuzumab，優選

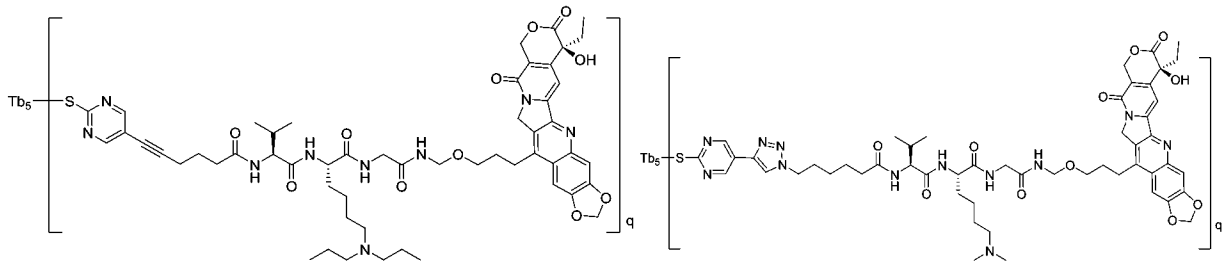
Trastuzumab 或 Pertuzumab；q 選自 0.1-16.0 之間的任意數值，優選 2-8 之間的任意數值。在一些實施方案中，q 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些優選地實施方案中，q 為 2、4、6 或 8。

【0272】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



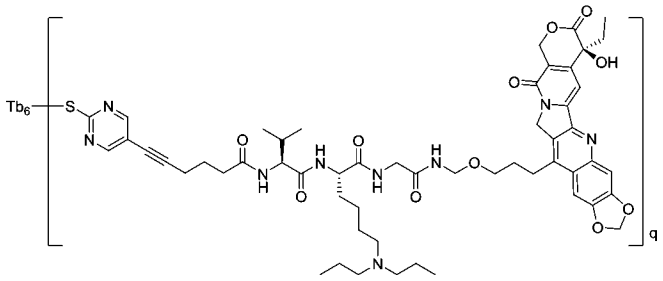
其中，Tb_4 為抗 Her3 抗體或其抗原結合片段，例如，抗體 barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，istiratumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，zenocutuzumab, 202-2-1 抗體，CN 103189392 B 中重鏈 SEQ：10 和輕鏈 SEQ：14 所示的抗體，IMGT/mAb-DB ID：564 所示的抗體，202-2-1 抗體；優選 202-2-1 抗體；q 選自 0.1-16.0 之間的任意數值，優選 2-8 之間的任意數值。在一些實施方案中，q 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些優選地實施方案中，q 為 2、4、6 或 8。

【0273】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



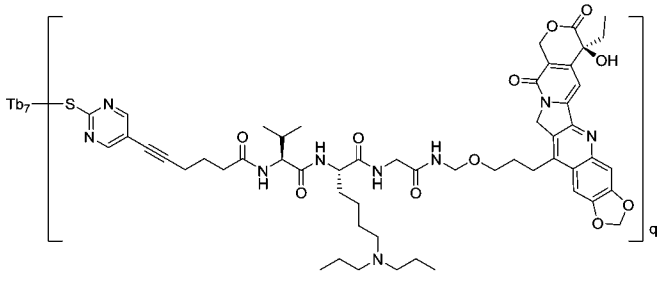
其中，Tb_5為抗EGFR抗體或其抗原結合片段，例如demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab；優選Cetuximab；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值。在一些實施方案中，q為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些優選地實施方案中，q為2、4、6或8。

【0274】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_6為無腫瘤細胞內吞活性的抗體或者結合非內吞（例如ALCAM/CD166）抗原活性的抗體，例如：人體內沒有相應細胞表面抗原的IgG同型抗體，抗CD166的抗體，優選地，為抗雞溶菌酶人IgG1同型抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值。在一些實施方案中，q為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些優選地實施方案中，q為2、4、6或8。

【0275】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_7為腫瘤細胞內吞活性較弱或無，但有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值。在一些實施方案中，q為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些優選地實施方案中，q為2、4、6或8。

【0276】在一些實施方案中，所述抗體具有結合B7H3抗原但不具有內吞活性的抗體。比如WO2021168379A1的INV721和I7-01。更具體的，Anti-B7H3的抗體具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:2的VH和SEQ ID NO:1的VL。

【0277】在一些實施方案中，所述抗體具有結合GD-2抗原但不具有內吞活性的抗體。比如WO2021168379A1的INV721和GD2-5。更具體的，Anti-GD-2的抗體具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:3的VL。

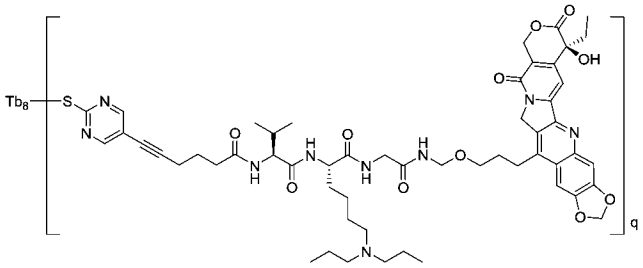
【0278】在一些實施方案中，所述抗體具有結合Her3抗原但不具有內吞活性的抗體，比如US10808032B2的SEQ ID NO: 22所示的ANTI-Her3的21F06抗體。

【0279】在一些實施方案中，所述抗體具有結合CD20抗原但不具有內吞活性的抗體。 儘管已顯示所謂的“II 型”CD20 特異性抗體很難被 CD20 陽性靶細胞內化，但已發現其他所謂的“I 型”CD20 特異性抗體某種程度上被內化並降解,這取決於與其相互作用的靶細胞上啟動和抑制 Fc γR 的表達水準。在一些實施方案中，所述抗體具有結合CD20抗原但不具有內吞活性的抗體為II 型”CD20 特異性抗體，例如obinutuzumab。

【0280】在一些實施方案中，所述抗體具有結合非內吞（例如

ALCAM/CD166）抗原活性的抗體。在一些實施方案中，所述抗體為包含EP3911682A1中SEQ ID No:73的VH和SEQ ID No:74的VL, SEQ ID No:75的VH和SEQ ID No:76的VL, SEQ ID No:77的VH和SEQ ID No:78的VL, 或，SEQ ID No:79的VH和SEQ ID No:88的VL所示的抗體。

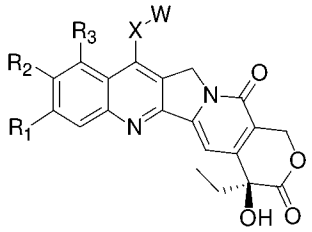
【0281】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_8為具有腫瘤細胞內吞活性的且有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體，例如1D1-01，2E3-02抗體，sacituzumab，pertuzumab，Trastuzumab或Cetuximab抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值。在一些實施方案中，q為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些優選地實施方案中，q為2、4、6或8。

【0282】另外，還需要說明的是，本發明所屬技術領域具通常知識者可以理解的是，L是與打開二硫鍵（例如，通過還原劑TCEP還原二硫鍵可以打開二硫鍵，生成巰基-SH）後Tb（如抗體）自身所含有巰基進行連接，也就是說，L與Tb之間的-S-並非另外再外接的硫原子。例如，其中，-S-並非另外外接的硫原子，而是打開雙硫鍵後的Tb自身所含有巰基與L進行連接後形成的-S-。

【0283】在本公開的第二方面，本公開提供了式II所示化合物：



式 II

或所述化合物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽、其藥學上可接受的溶劑合物或其配體藥物偶聯物，

其中：

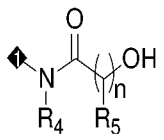
R_1、R_2 各自獨立地選自 H、鹵素、-OH、任選取代的 C1-6 烷基、任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

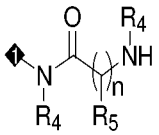
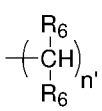
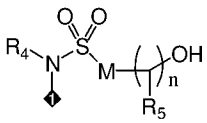
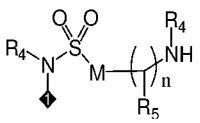
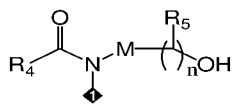
R_1 和 R_2 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

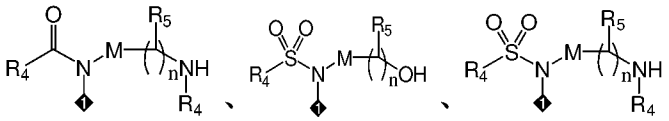
R_3 選自 H、鹵素、-OH、$-NH_2$、任選取代的 C1-6 烷基、任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

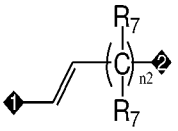
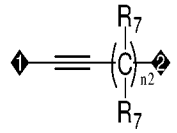
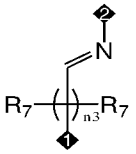
R_3 和 X 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

R_3 和 R_2 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

W 不存在或存在，W 存在時，W 選自-OH、-SH、$-NHR_4$、  、

 、  、  、  、  、


、
、
，1 位與 X 相連；

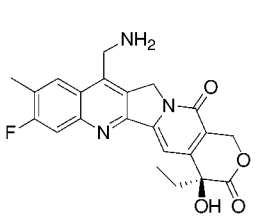
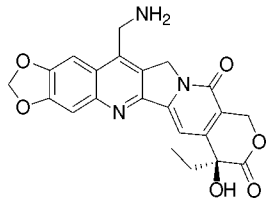
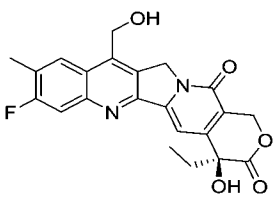
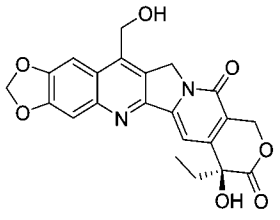
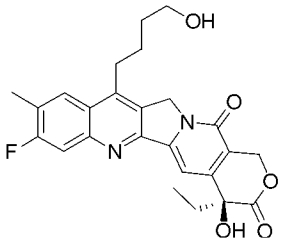
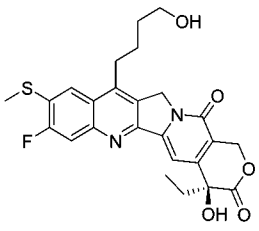
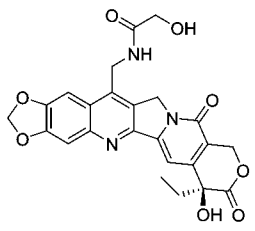
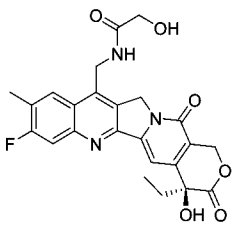
X 選自直接鍵，任選取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-N(R_4)-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 元雜芳基和 4-10 元雜環基，1 位和母環相連，2 位和 W 相連；所述取代基選自一個或多個 C1-4 烷基、C3-6 環烷基，或者多個 C1-4 烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成 C3-6 環烷基；

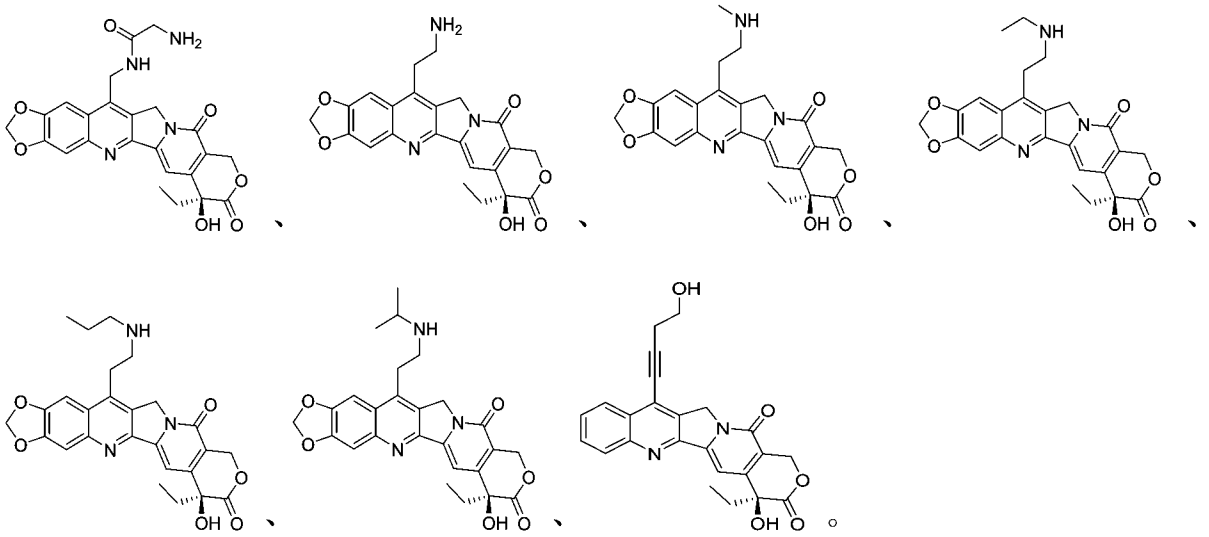
各 M 獨立地選自直接鍵、-$CR^{5a}R^{5b}$-；

R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R^7 各自獨立地選自 H、任選取代的 C1-4 烷基、任選取代的 C1-4 烷氧基、任選取代的 C3-6 環烷基；

n、n’、n1、n2、n3 各自獨立地選自 0 到 6 之間的任意整數；

其中，當 R_1、R_2 同時為 H，且 X 為-$(CH_2)_{n1}$-時，n1 為 1、2、3、4 時，W 不為-OH 或-NHR_4；且式 II 所示化合物不包含


、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、



【0284】在一些實施方案中，R_1和R_2各自獨立地選自H、鹵素或C1-4烷基。

【0285】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-6元雜環，所述雜環含有1個、2個或3個O，S或N或其任意組合。

【0286】在一些實施方案中，R_1選自H和鹵素，R_2選自H和C1-4烷基。

【0287】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成 、 、 或 ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的位置。

【0288】在一些實施方案中，R_1為H或F，R_2為H或甲基。

【0289】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

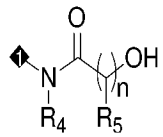
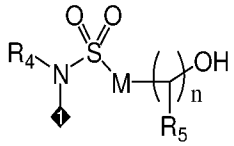
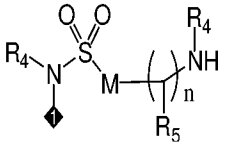
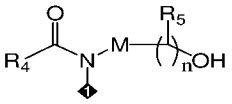
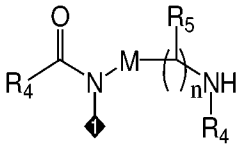
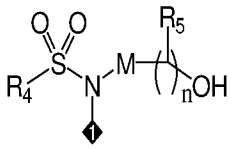
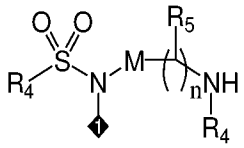
【0290】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基；或R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

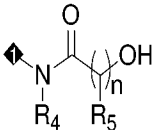
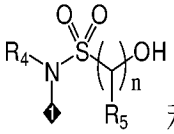
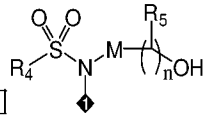
【0291】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基。

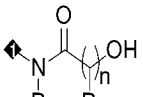
【0292】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

【0293】在一些實施方案中，R_3選自H和C1-4烷基。

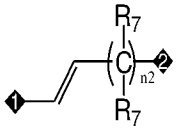
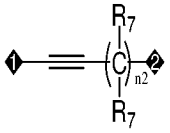
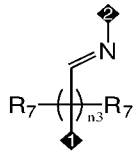
【0294】在一些實施方案中，R_3為H。

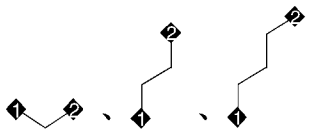
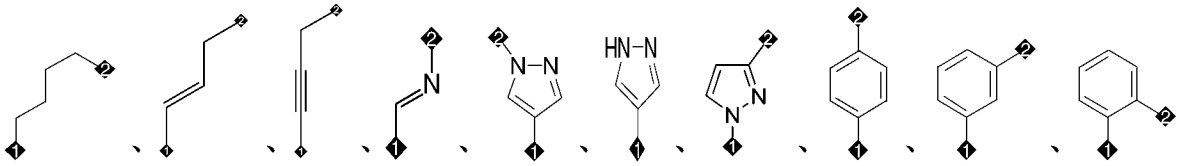
【0295】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-OH、-SH、-NHR_4、  、  、  、  、  、  、  ，1位與X相連。

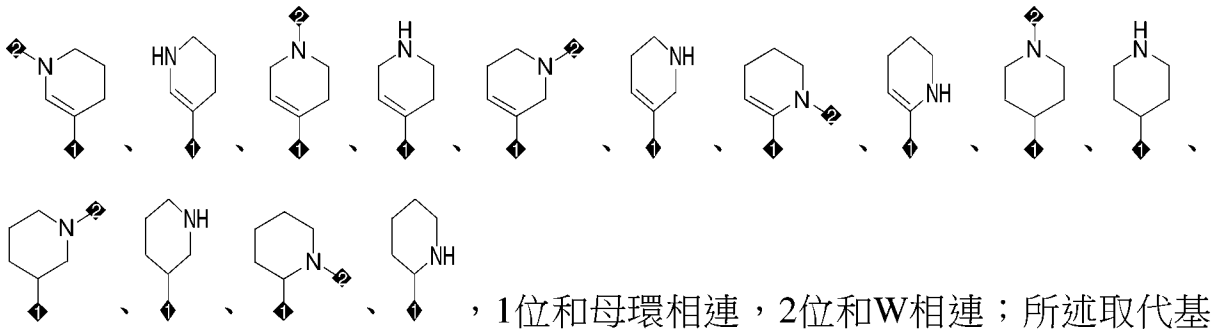
【0296】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-OH、-SH、-NHR_4、  、  和  ，1位與X相連。

【0297】在一些實施方案中，W選自-OH、-NHR_4和  ，1位與X相連。

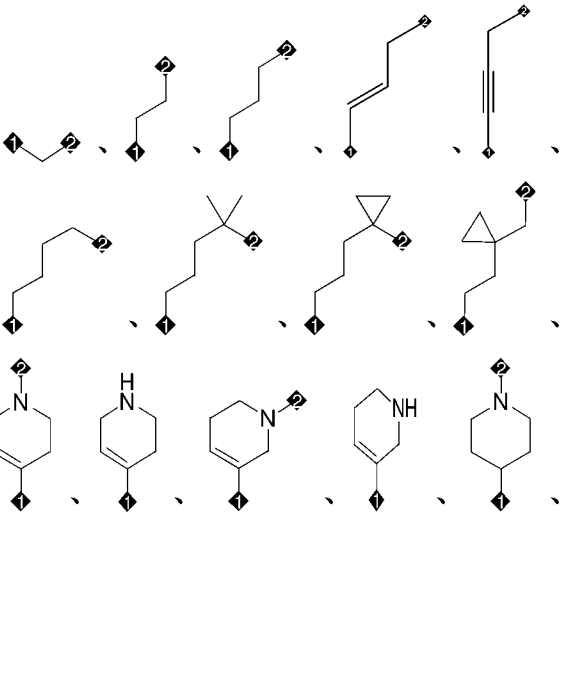
【0298】在一些實施方案中，W選自-OH和-NHR_4，1位與X相連。

【0299】在一些實施方案中，X選自任選取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C6-10芳基、5-10元雜芳基和4-10元雜環基，1位和母環相連，2位和W相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基，或者2個C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基。

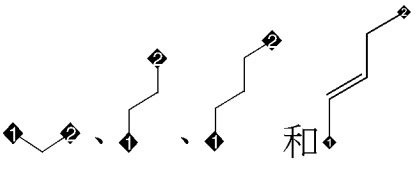
【0300】在一些實施方案中，X選自任選取代的  、  、

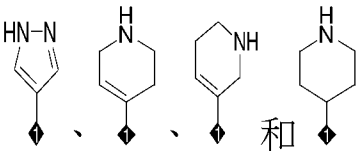
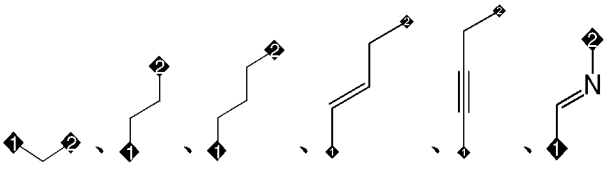


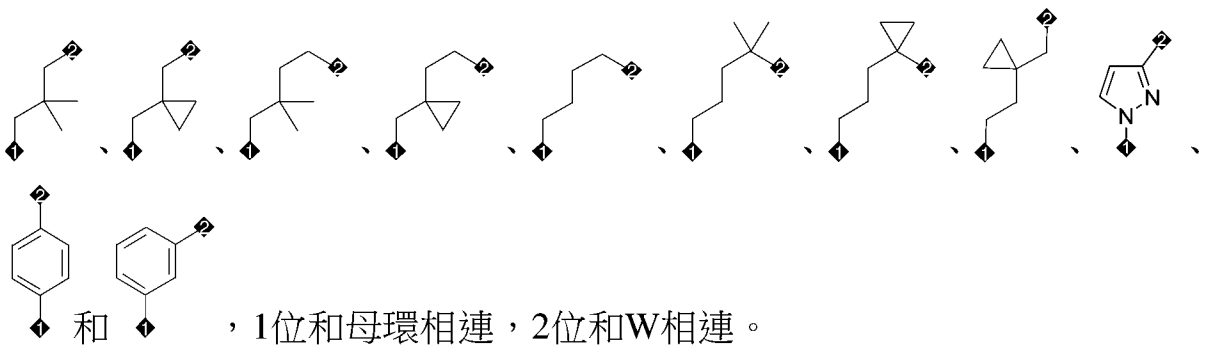
，1位和母環相連，2位和W相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基（如甲基），或者2個C1-4烷基（如甲基）和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基（如環丙基）。

【0301】在一些實施方案中，X選自 

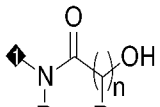
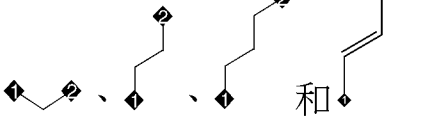
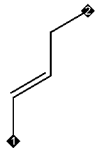
，1位和母環相連，2位和W相連。

【0302】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0303】在一些實施方案中，W不存在時，X選自  ，1位和母環相連；W存在時，X選自 



和 ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0304】在一些實施方案中，W選自-OH、-NHR$_4$和  ，1位X相連，2位與L$_4$或L$_3$相連；X選自  和  ，1位和母環相連，2位和W相連。在一些實施方案中，R$_4$和R$_5$各自獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基。

【0305】在一些實施方案中，各R$_4$獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基，R$_5$為H。

【0306】在一些實施方案中，各R$_4$獨立地選自H、甲基、乙基、異丙基、正丙基、第三丁基和環丙基，R$_5$為H。

【0307】在一些實施方案中，R^{5a}和R^{5b}各自獨立地選自H和C1-4烷基；

【0308】在一些實施方案中，R^{5a}和R^{5b}各自獨立地選自H和甲基；

【0309】在一些實施方案中，各R^{7}獨立地選自H和C1-4烷基；

【0310】在一些實施方案中，R^{7}為H。

【0311】在一些實施方案中，n為1、2或3。

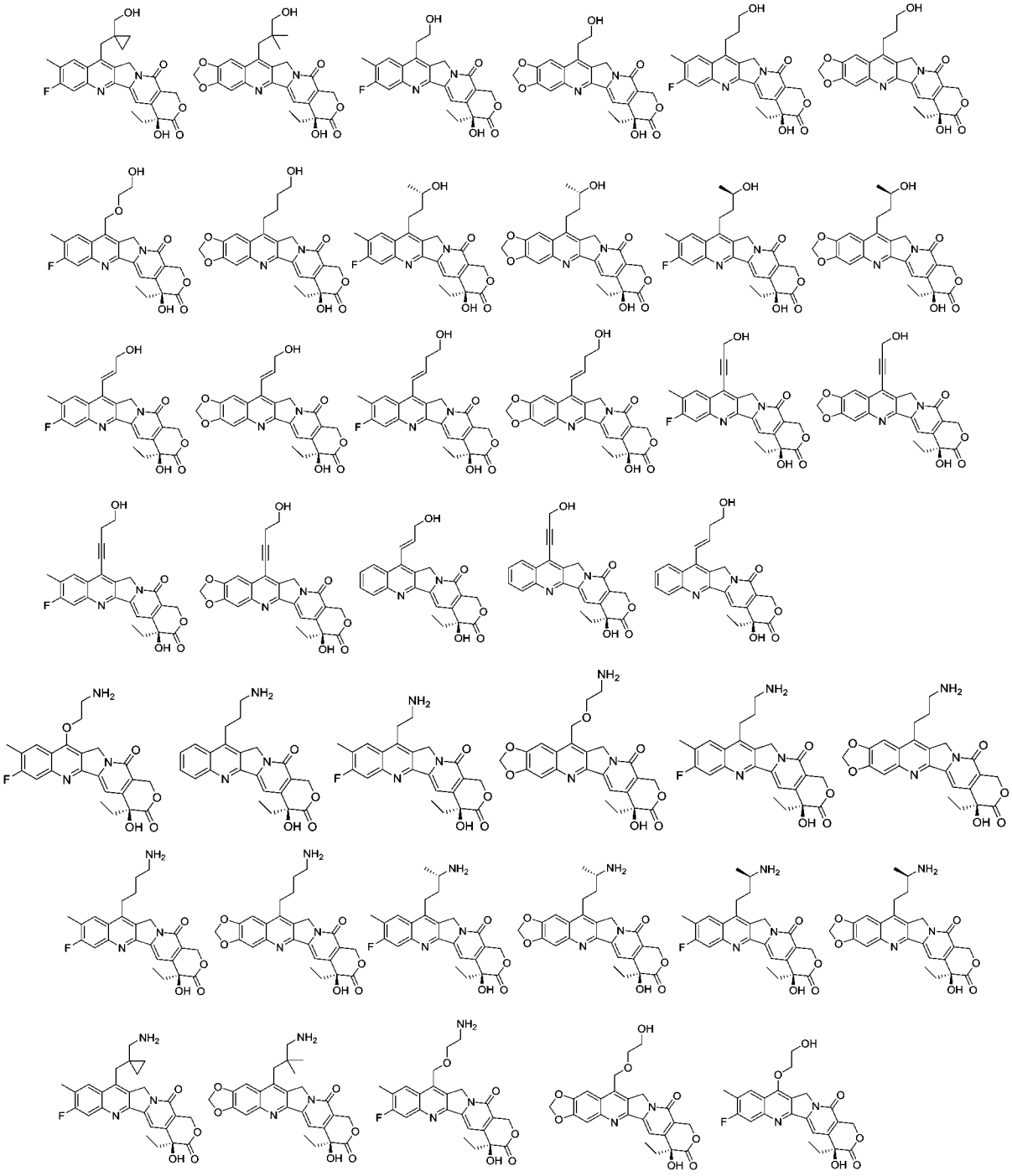
【0312】在一些實施方案中，n為1。

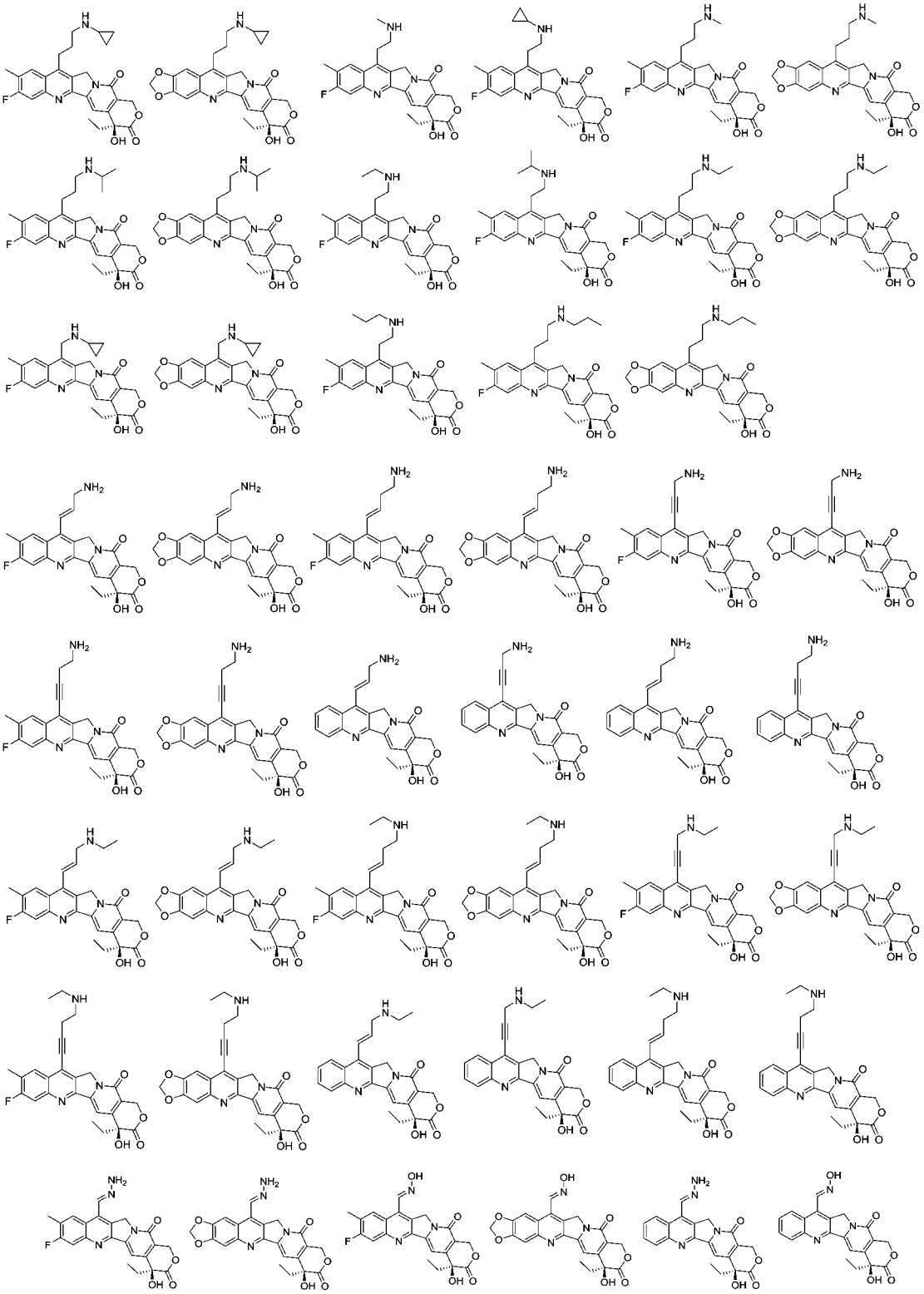
【0313】在一些實施方案中，n1為1、2、3或4。

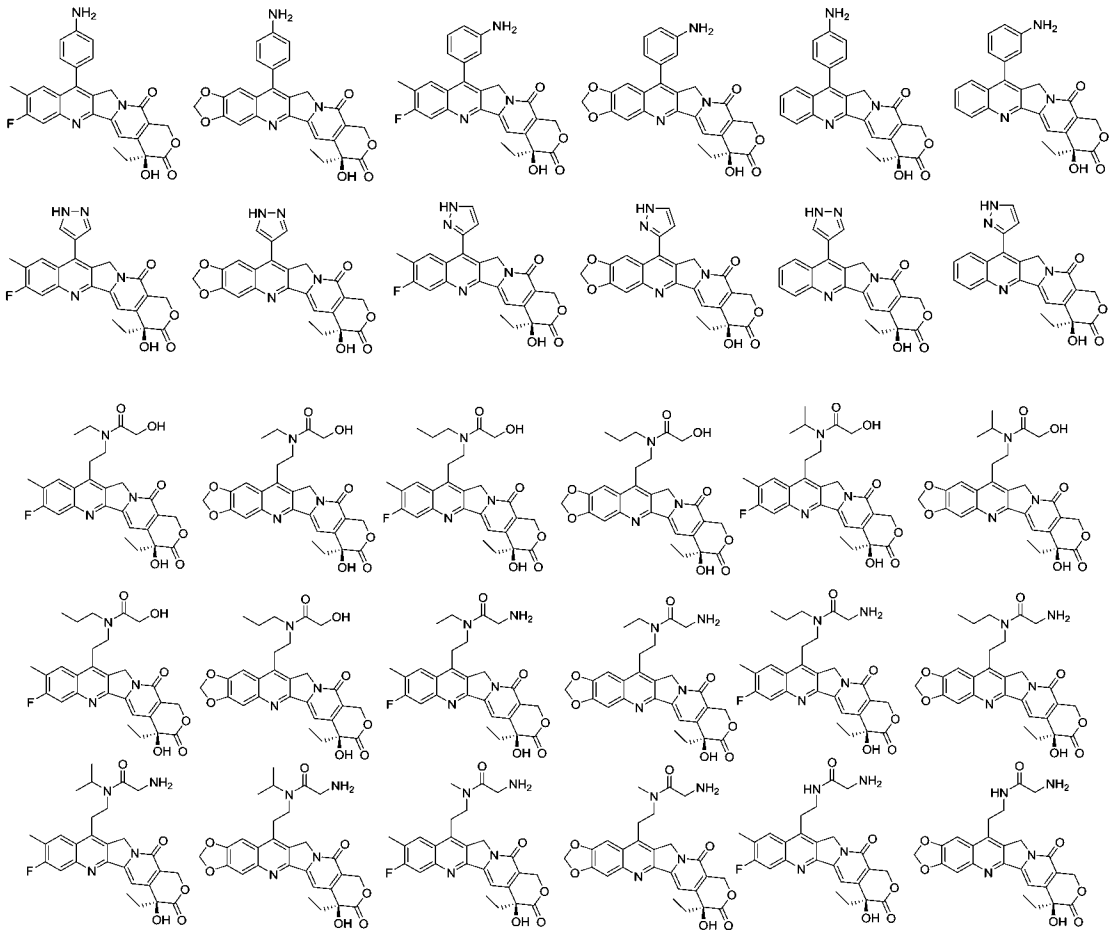
【0314】在一些實施方案中，n2為1；

【0315】在一些實施方案中，n3為0。

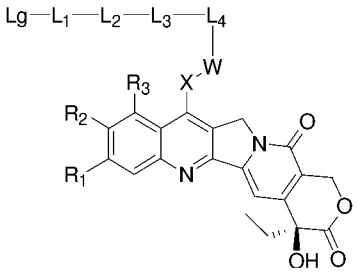
【0316】在一些實施方案中，式II所示化合物選自以下任一化合物：







【0317】在本公開的的第三方面，本公開提供了式III所示的藥物連接體偶聯物，



式 III

或所述藥物連接體偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，

其中：

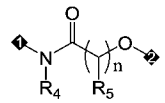
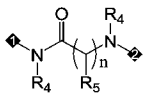
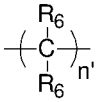
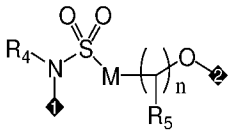
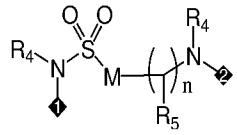
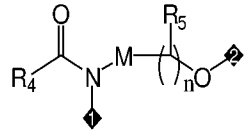
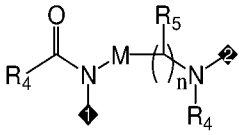
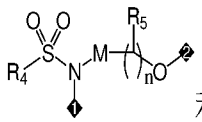
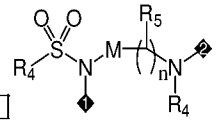
R_1 和 R_2 各自獨立地選自 H、鹵素、-OH、任選取代的 C1-6 烷基或任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

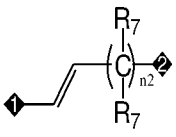
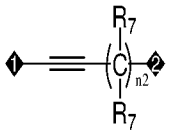
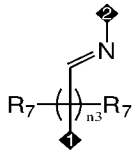
R_1和 R_2和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

R_3選自 H、鹵素、-OH、$-NH_2$、任選取代的 C1-6 烷基和任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3和 X 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合，或者，

R_3和 R_2和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

W 不存在或存在，W 存在時，W 選自-O-、-S-、$-NR_4-$、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位與 X 相連，2 位與 L_4或 L_3相連；

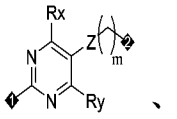
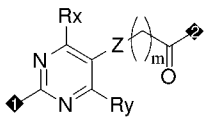
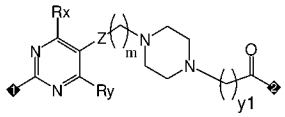
X 選自直接鍵，任選取代的$-O-(CH_2)_{n3}-$、$-N(R_4)-(CH_2)_{n3}-$、$-S-(CH_2)_{n3}-$、羰基$-(CH_2)_{n3}$、$-SO_2-(CH_2)_{n3}-$、  、  、  、$-(CH_2)_{n1}-$、C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 元雜芳基和 4-10 元雜環基，1 位和母環相連，2 位和 W 或 L_4相連；所述取代基選自一個或多個 C1-4 烷基、C3-6 環烷基，或者多個 C1-4 烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成 C3-6 環烷基；

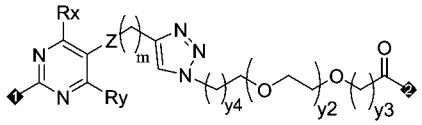
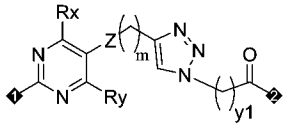
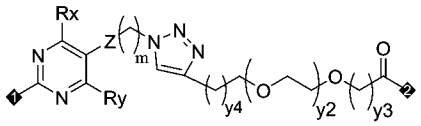
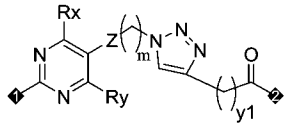
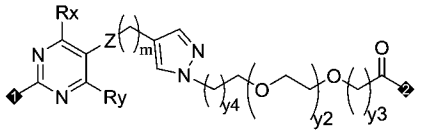
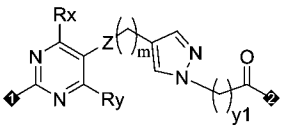
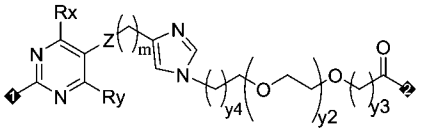
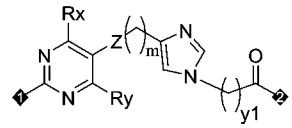
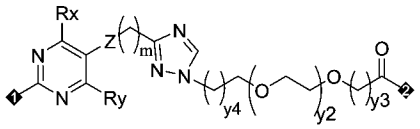
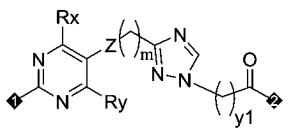
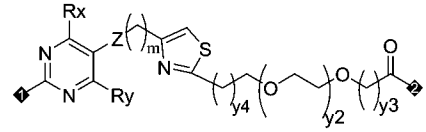
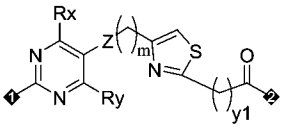
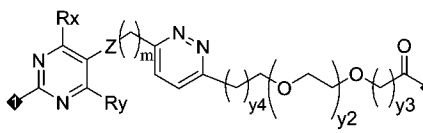
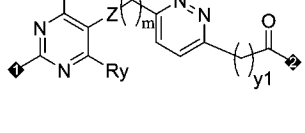
各 M 獨立地選自直接鍵、-$CR^{5a}R^{5b}$-；

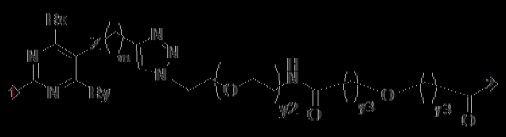
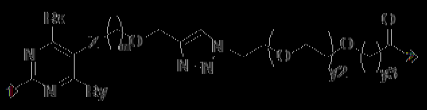
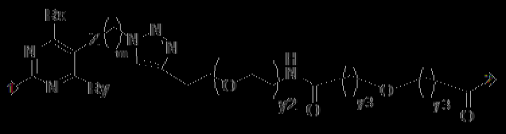
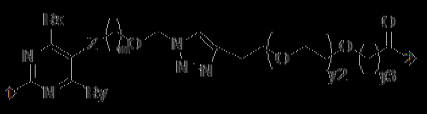
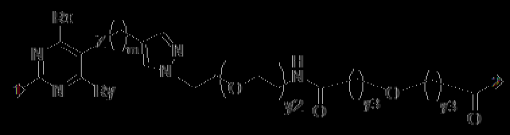
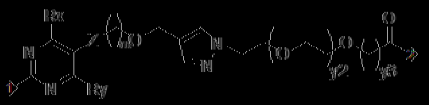
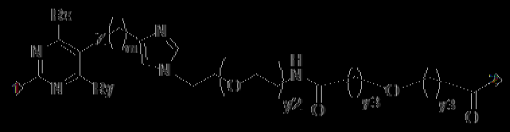
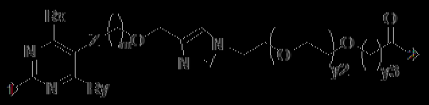
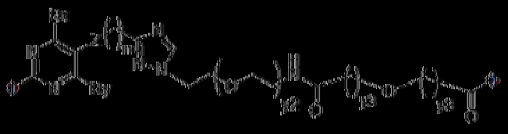
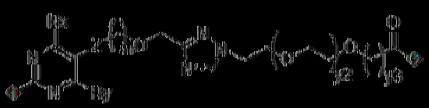
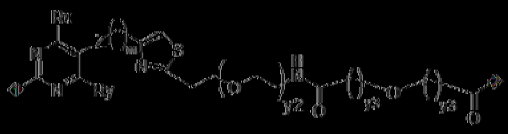
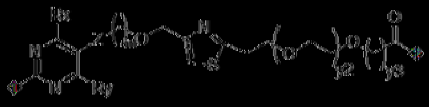
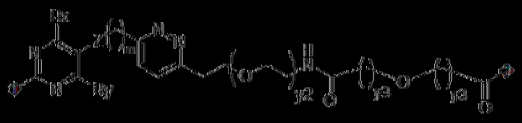
R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6 和 R_7 各自獨立地選自 H、任選取代的 C1-4 烷基、任選取代的 C1-4 烷氧基和任選取代的 C3-6 環烷基；

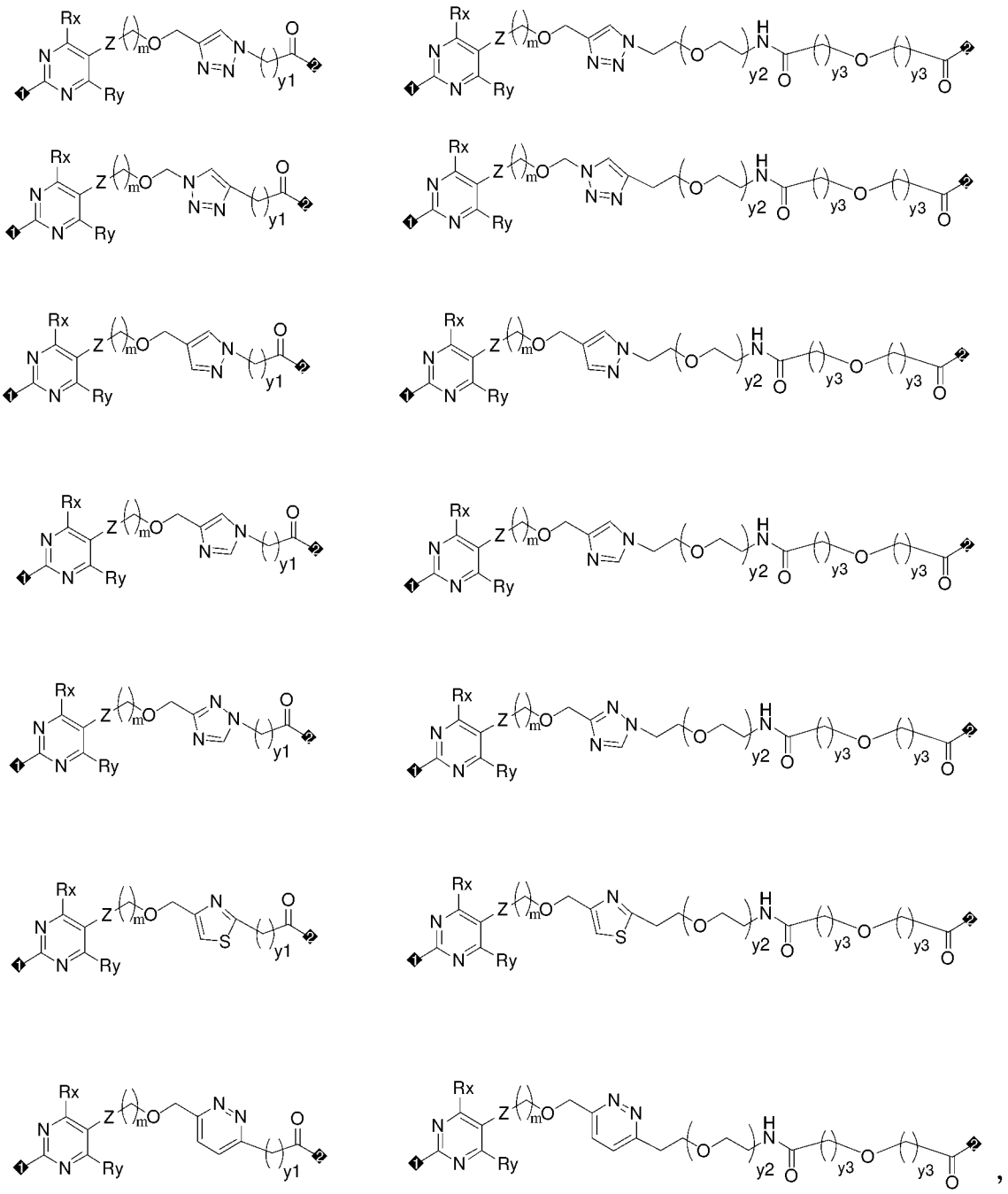
n、n'、n1、n2、n3 各自獨立地選自 0 到 6 之間的任意整數；

L_1 選自：


、

、


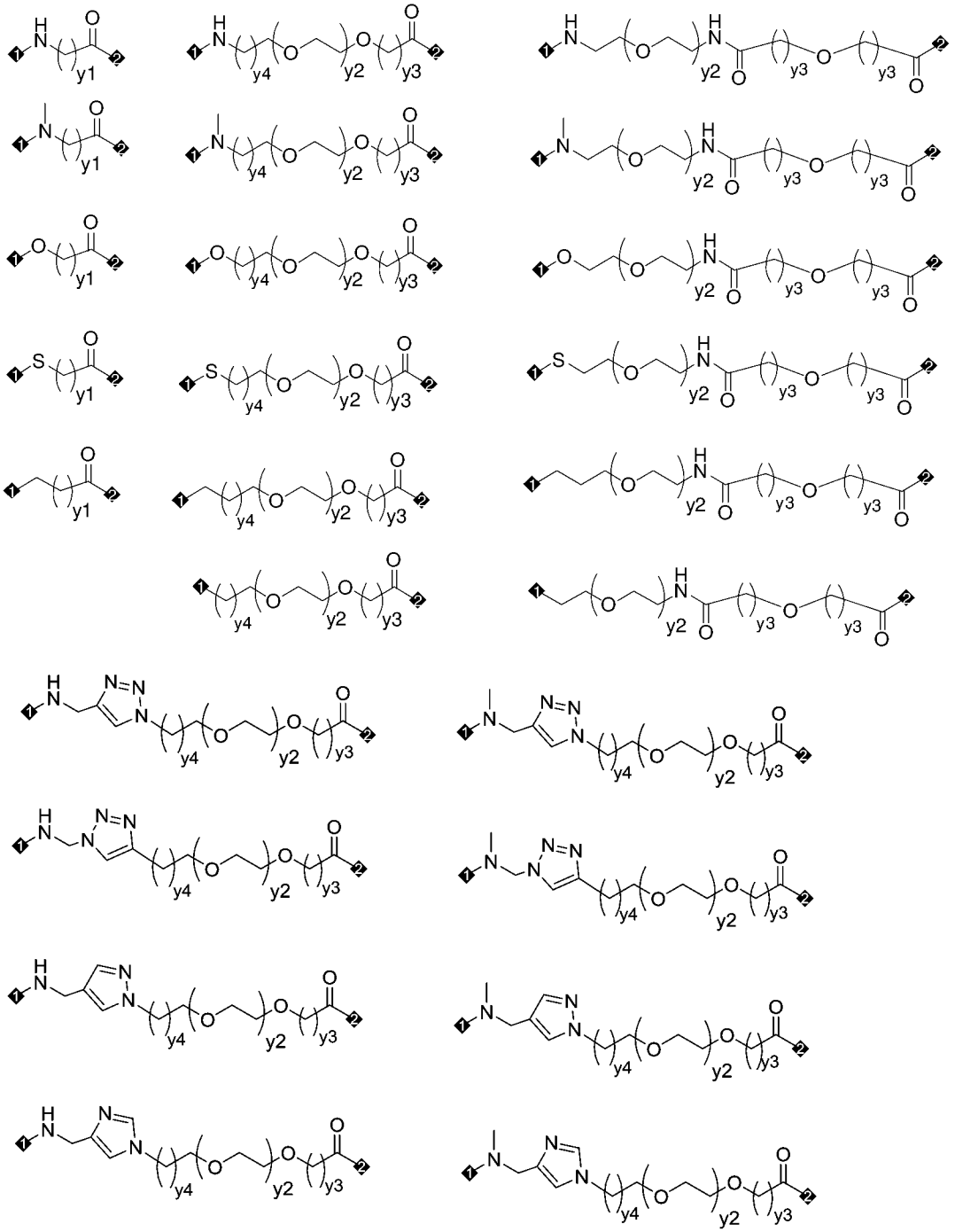















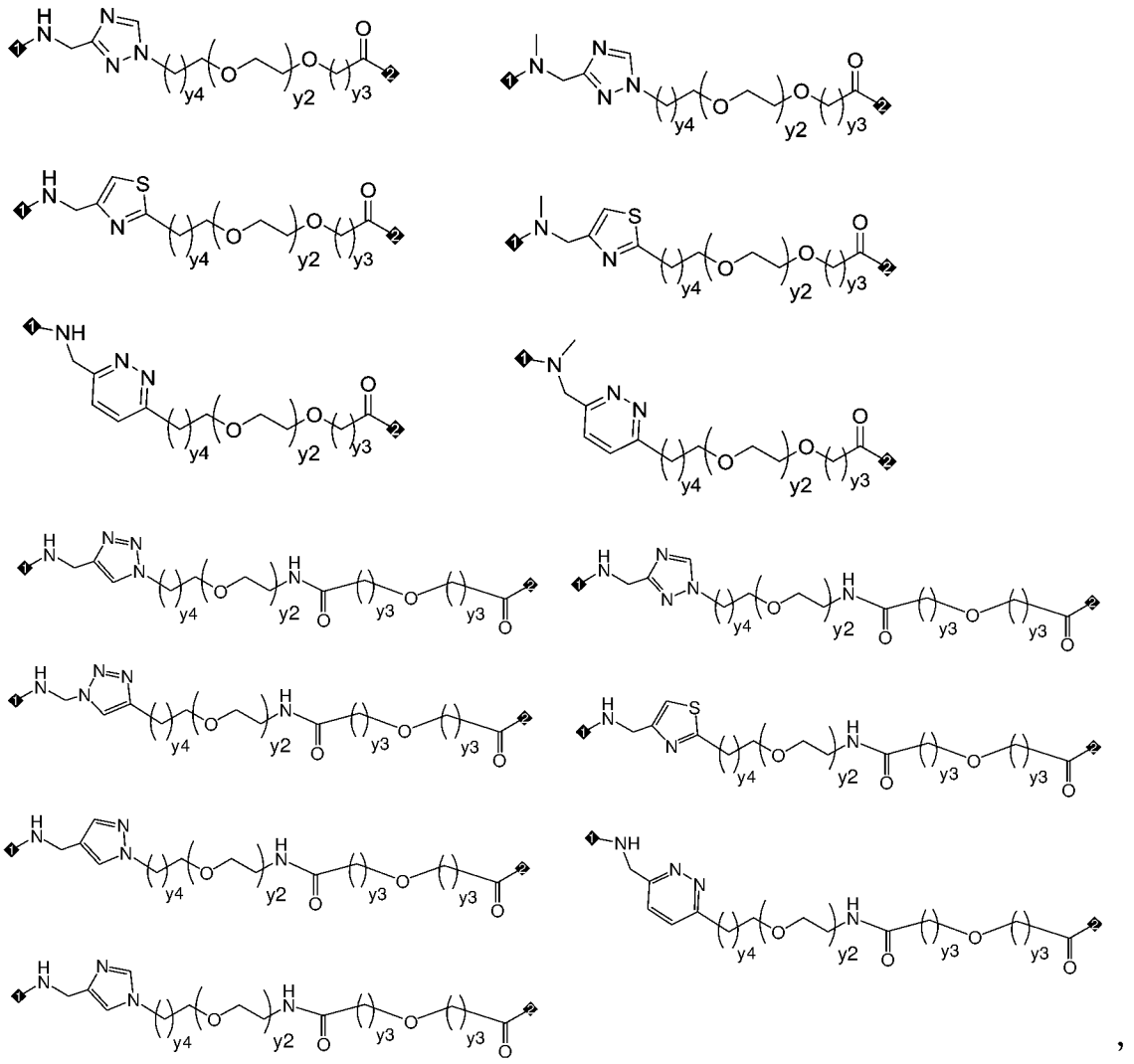
















各 Z 獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10 芳基、5-10 元雜芳基、醯胺基、磺醯胺基、亞胺基、CF_2，Rx、Ry 各自獨立地選自 H、C1-4 烷基，各 m 獨立地選自 0、1、2、3、4、5、6，y1、y2、y3、y4 各自獨立地選自 0-20 之間的任意整數，1 位與 Lg 相連，2 位與 L_2 或 L_3 相連；

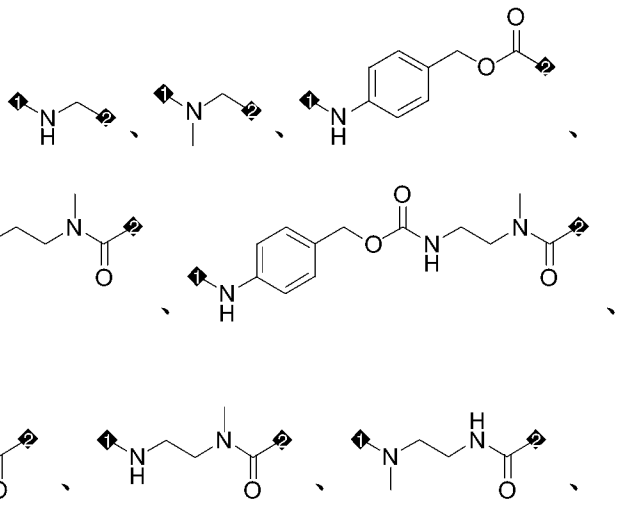
L_2 不存在或存在，L_2 存在時，L_2 選自：

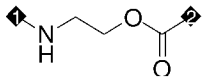




y1、y2、y3、y4 各自獨立地選自 0-20 之間的任意整數，1 位與 L_1 相連，2 位與 L_3 相連；

L_3 選自胺基酸殘基或由 2-10 個胺基酸殘基組成的短肽；

L_4 不存在或存在，L_4 存在時，L_4 選自 

 ，1位與L_3相連，2位與W或X相連；

Lg為離去基團，Lg選自鹵素、碸基、三級胺鹽基（Me_3N^+、Et_3N^+）、重氮鹽基、-OMs、$MeSO_2$-、CF_3SO_3-。

【0318】在一些實施方案中，R_1、R_2各自獨立地選自H、鹵素、C1-4烷基。

【0319】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-6元雜環，所述雜環含有1個、2個或3個O，S或N或其任意組合。

【0320】在一些實施方案中，R_1選自H、鹵素，R_2選自H、C1-4烷基。

【0321】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成 、 、 或 ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的位置。

【0322】在一些實施方案中，R_1為H或F，R_2為H或甲基。

【0323】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基或R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

【0324】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基。

【0325】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

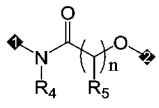
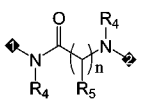
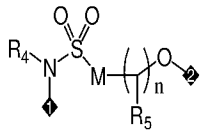
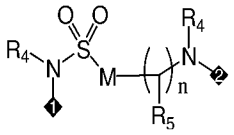
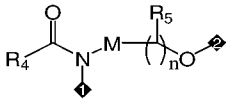
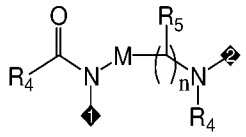
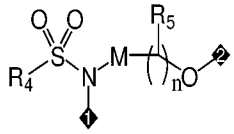
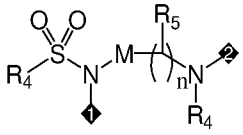
【0326】在一些實施方案中，R_3選自H、C1-4烷基。

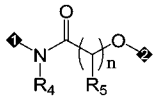
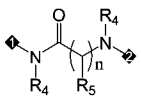
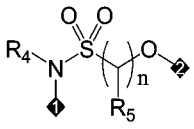
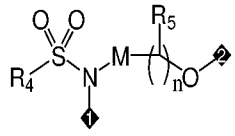
【0327】在一些實施方案中，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成5-6元碳環。

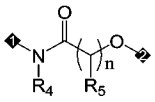
【0328】在一些實施方案中，R_3為H或R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位置。

【0329】在一些實施方案中，R_3為H。

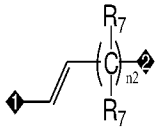
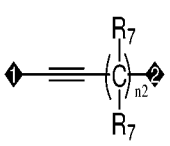
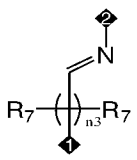
【0330】在一些實施方案中，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位置。

【0331】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、$-NR_4-$、  、  、  、  、  、  、  、  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連。

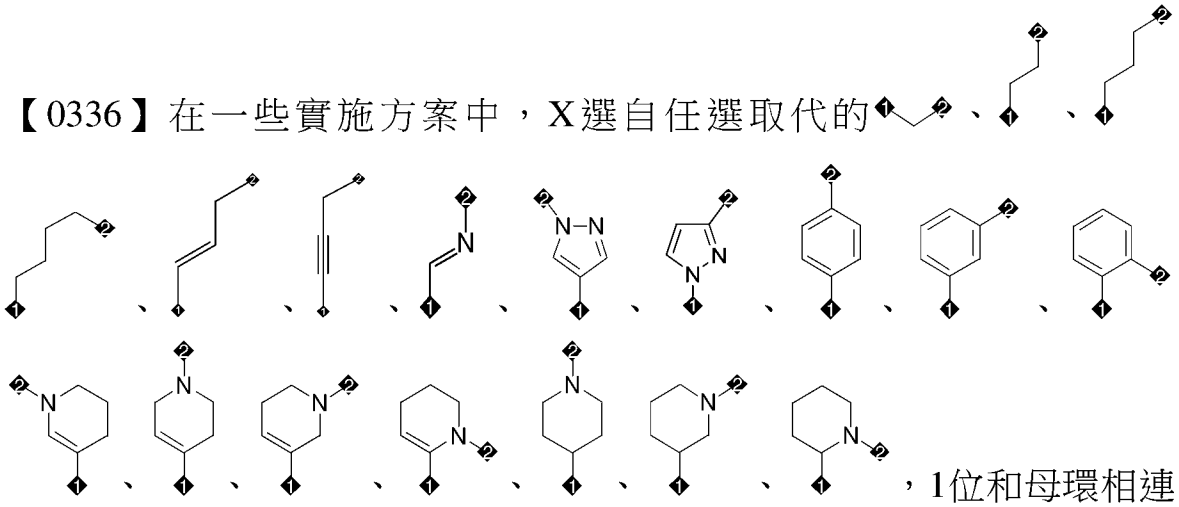
【0332】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、$-NR_4-$、  、  、  、  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連。

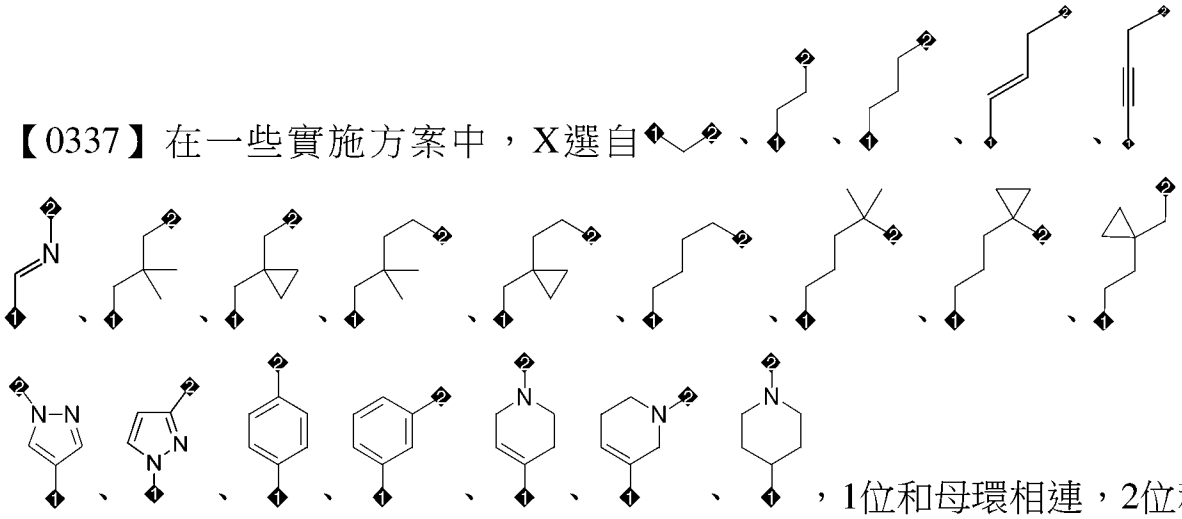
【0333】在一些實施方案中，W選自-O-、$-NR_4-$、  ，1位X相連，2位與L_4或L_3相連。

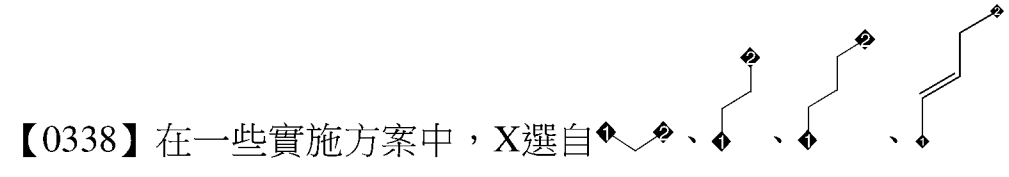
【0334】在一些實施方案中，W選自-O-、$-NR_4-$，1位X相連，2位與L_4或L_3相連。

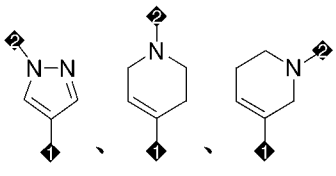
【0335】在一些實施方案中，X選自任選取代的$-(CH_2)_{n1}-$、  、  、  、C6-10芳基、5-10元雜芳基和4-10元雜環基，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基，或者2個

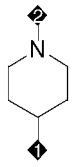
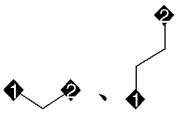
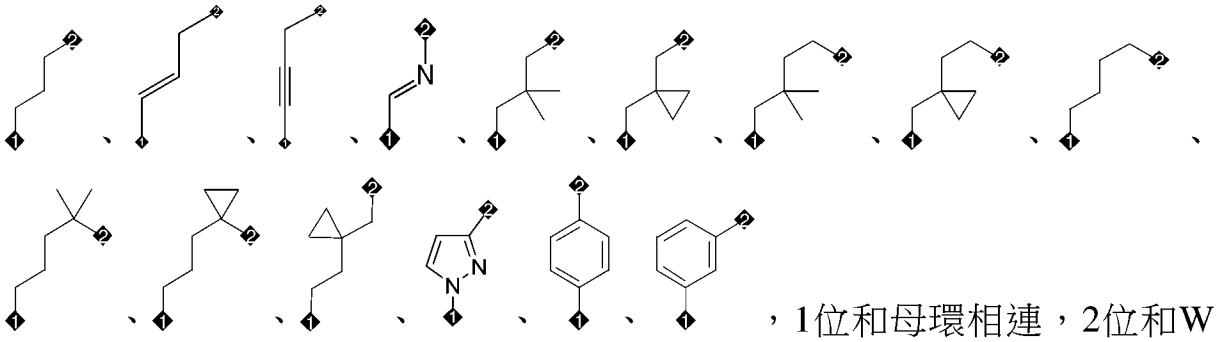
C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基。

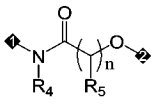
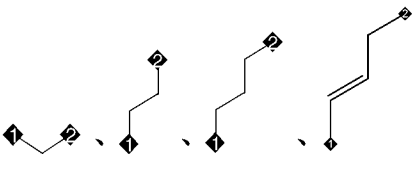
【0336】在一些實施方案中，X選自任選取代的  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基（如甲基），或者2個C1-4烷基（如甲基）和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基（如環丙基）。

【0337】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連。

【0338】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0339】在一些實施方案中，W不存在時，X選自  、

 ，1位和母環相連，2位和L_4相連；W存在時，X選自  、  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0340】在一些實施方案中，W選自-O-、-NR_4-、  ，1位X相連，2位與L_4或L_3相連；X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0341】在一些實施方案中，R_4、R_5各自獨立地選自H、C1-4烷基、C3-6環烷基。

【0342】在一些實施方案中，各R_4獨立地選自H、C1-4烷基、C3-6環烷基，R_5為H。

【0343】在一些實施方案中，各R_4獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、異丙基、第三丁基、環丙基，R_5為H。

【0344】在一些實施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H、C1-4烷基。

【0345】在一些實施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H、甲基。

【0346】在一些實施方案中，各R^7獨立地選自H、C1-4烷基。

【0347】在一些實施方案中，R^7為H。

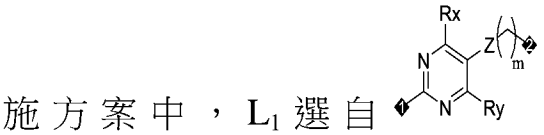
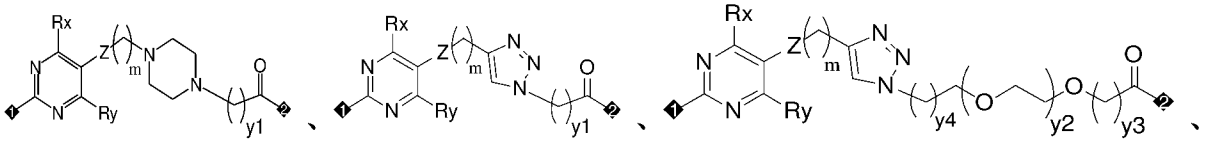
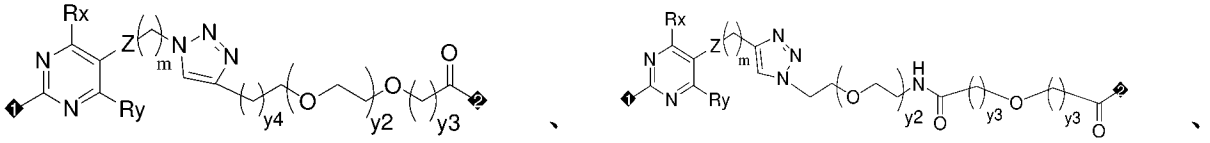
【0348】在一些實施方案中，n選自1、2或3。

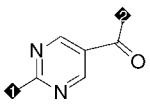
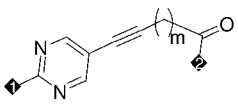
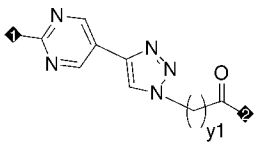
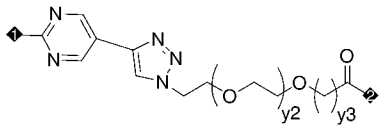
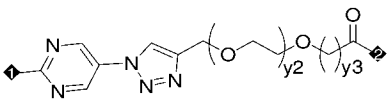
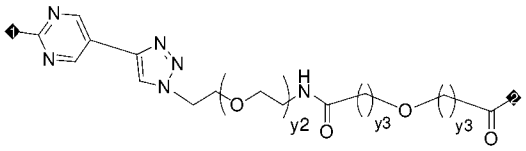
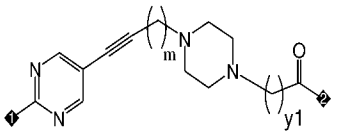
【0349】在一些實施方案中，n為1。

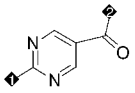
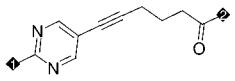
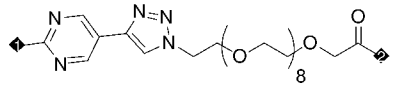
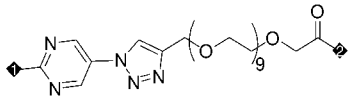
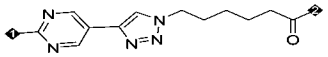
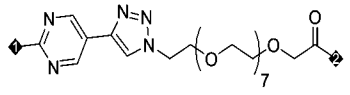
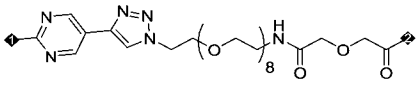
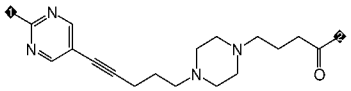
【0350】在一些實施方案中，n1選自1、2、3或4。

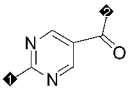
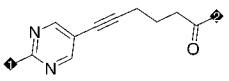
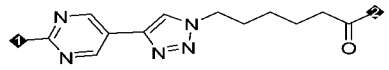
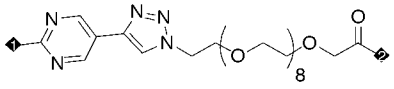
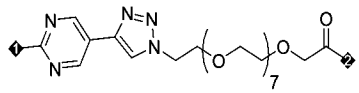
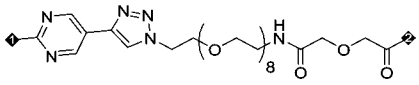
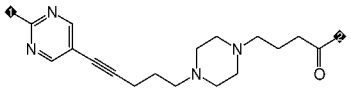
【0351】在一些實施方案中，n2為1。

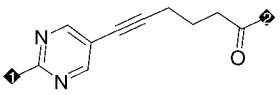
【0352】在一些實施方案中，n3為0。

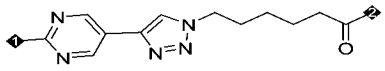
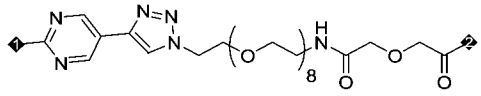
【0353】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、

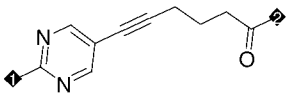
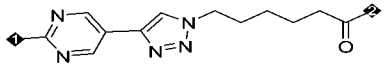
【0354】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  ，m選自2、3、4，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-10（如6-10）之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

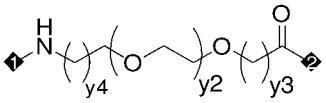
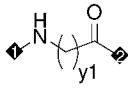
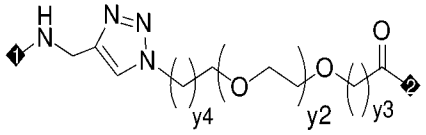
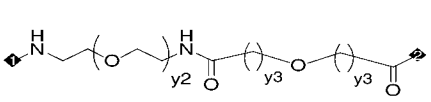
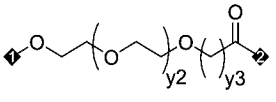
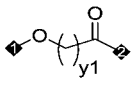
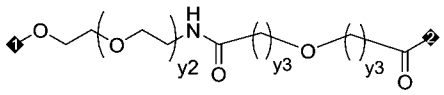
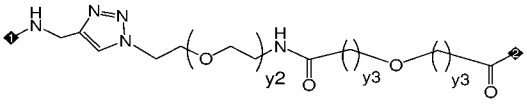
【0355】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  、  ，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

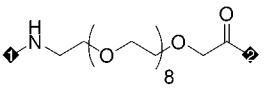
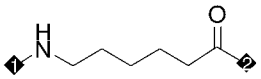
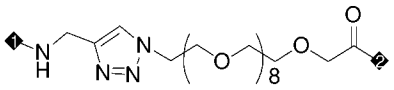
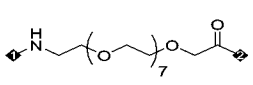
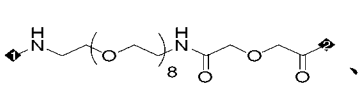
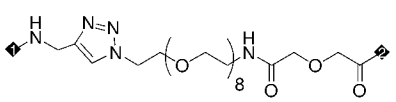
【0356】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  ，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

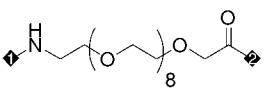
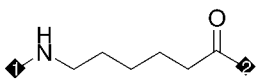
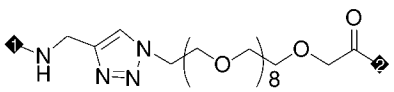
【0357】在一些實施方案中，L_1選自  、

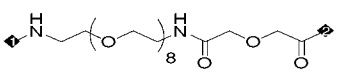
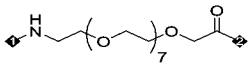
 、  ，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

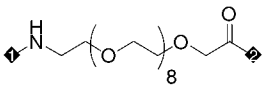
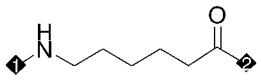
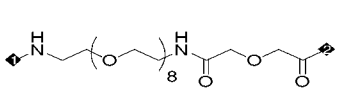
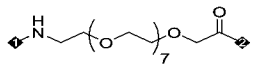
【0358】在一些實施方案中，L_1選自  、  ，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

【0359】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  、  、  、  、  ，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-10（如6-10）之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，各y4獨立地選自0或1，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

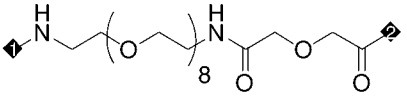
【0360】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  、  、  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0361】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、

 、  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0362】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0363】在一些實施方案中，L_2不存在。

【0364】在一些實施方案中，L_2選自  。

【0365】在一些實施方案中，L_3選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽；所述的胺基酸殘基選自天然胺基酸殘基、非天然胺基酸殘基、AA^1所示胺基酸殘基或其立體異構體。

【0366】在一些實施方案中，L_3選自胺基酸殘基Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1或由2-10個選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1的胺基酸殘基組成的短肽。

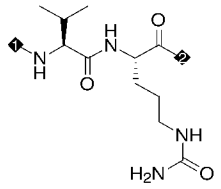
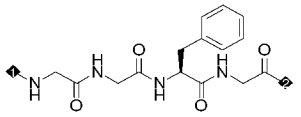
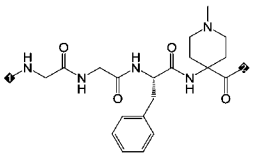
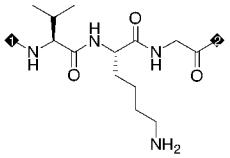
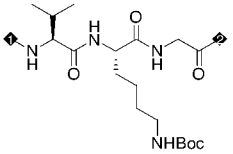
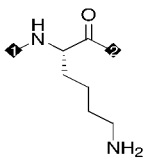
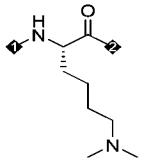
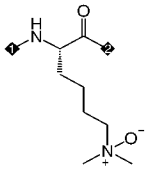
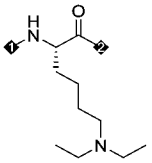
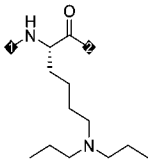
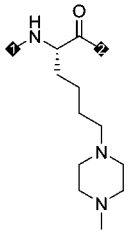
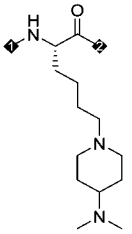
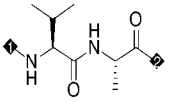
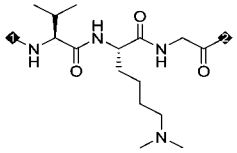
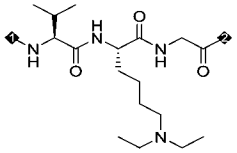
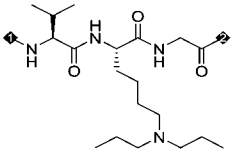
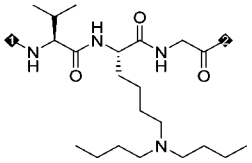
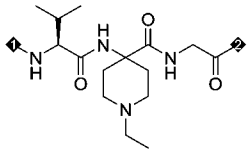
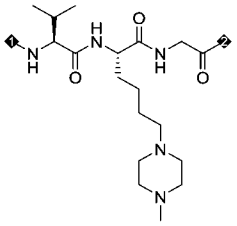
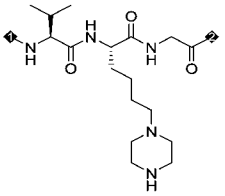
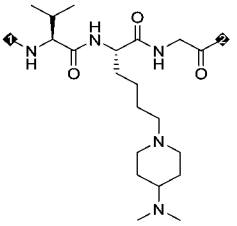
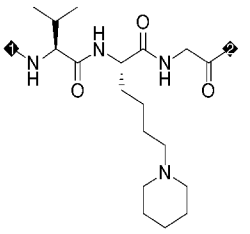
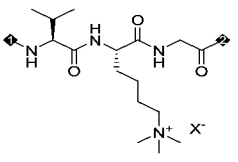
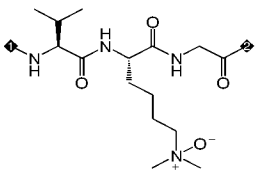
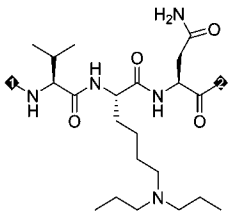
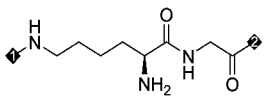
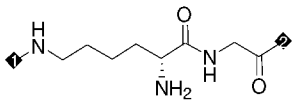
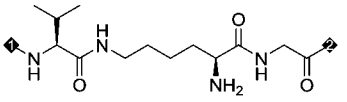
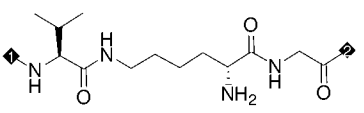
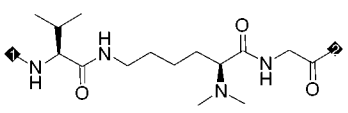
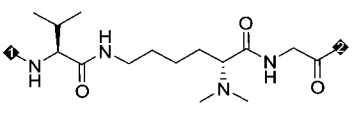
【0367】在一些實施方案中，L_3選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys、Lys-Ala-Asn。

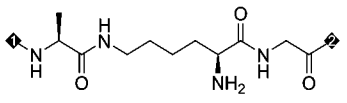
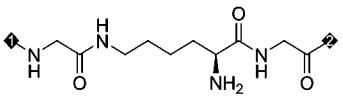
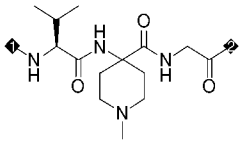
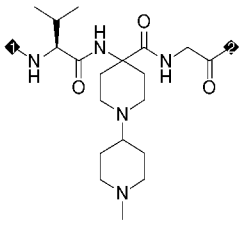
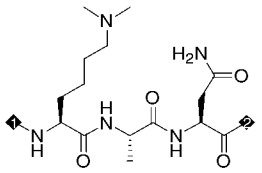
【0368】在一些實施方案中，L_3選自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-

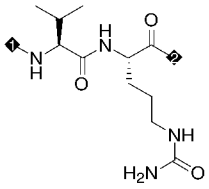
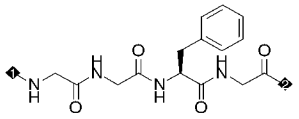
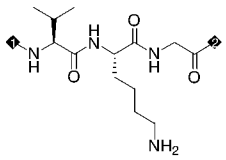
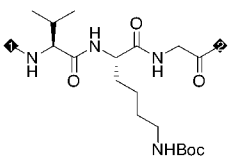
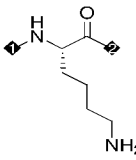
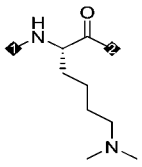
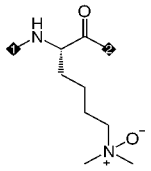
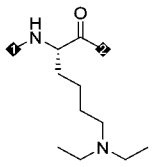
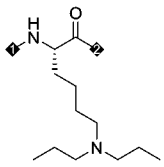
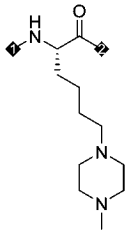
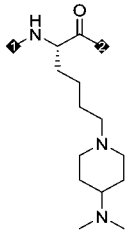
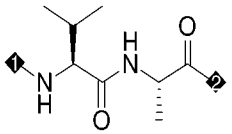
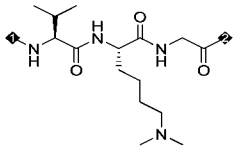
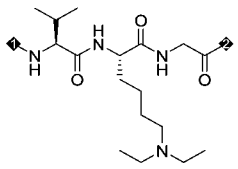
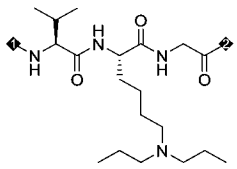
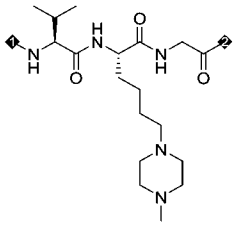
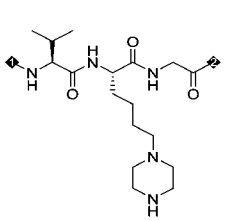
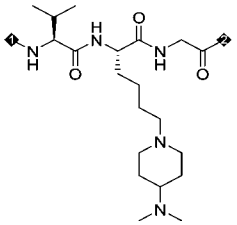
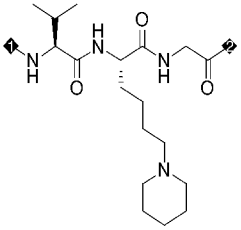
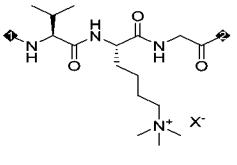
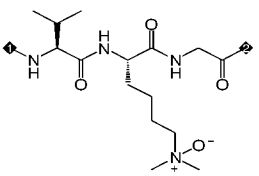
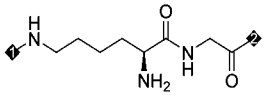
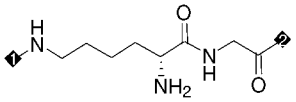
Gly、AA[1]-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe-Gly。

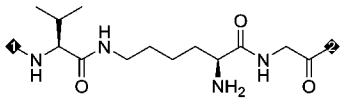
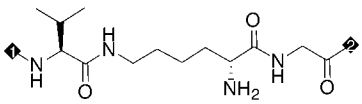
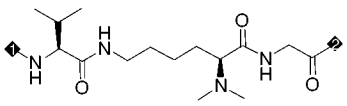
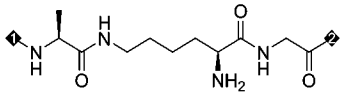
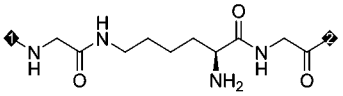
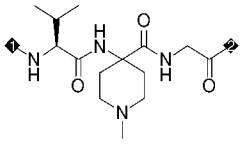
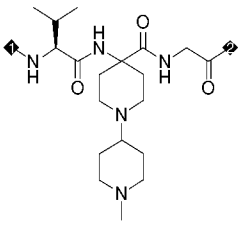
【0369】在一些實施方案中，L_3選自AA[1]、Val-AA[1]-Gly。

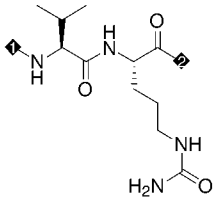
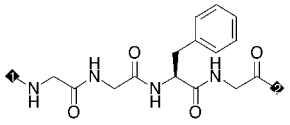
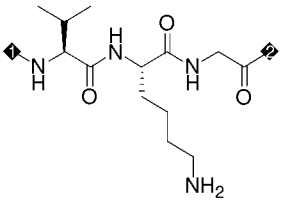
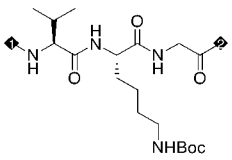
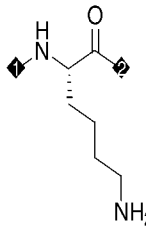
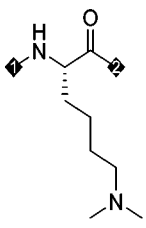
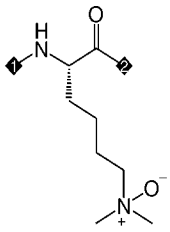
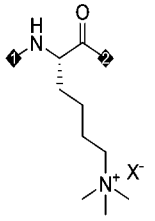
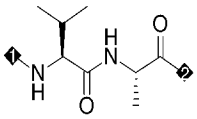
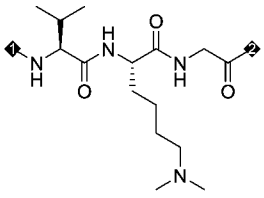
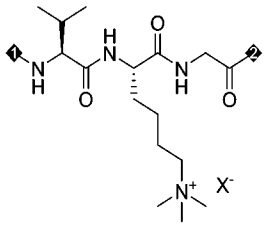
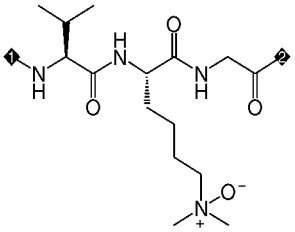
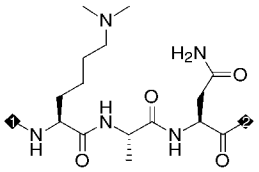
【0370】在一些實施方案中，L_3選自Val-AA[1]-Gly。

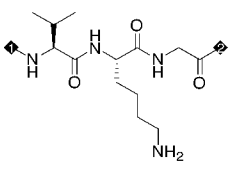
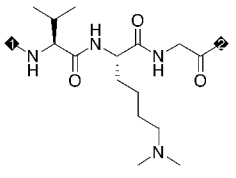
【0371】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、

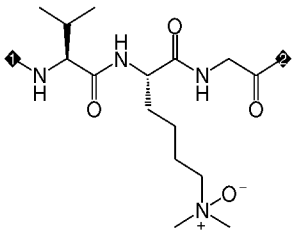
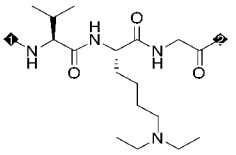
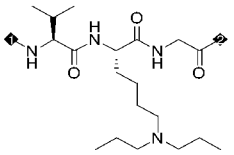
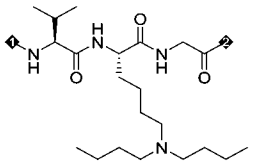
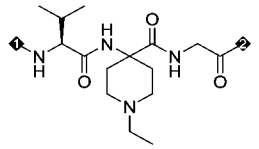
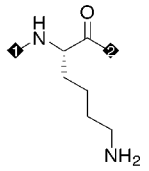
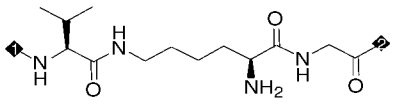
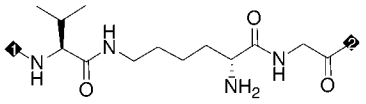
 、  、  、  、  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子、OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

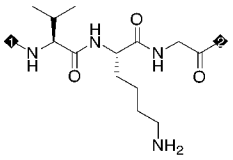
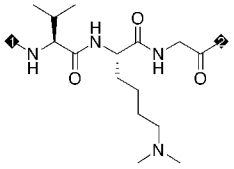
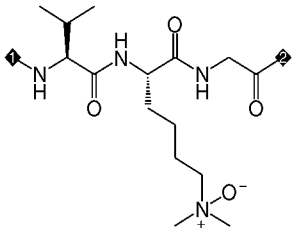
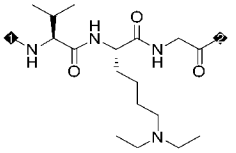
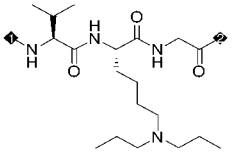
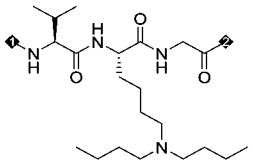
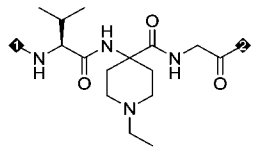
【0372】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、

 、  、  、  、  、  、  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子、OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

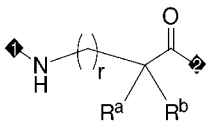
【0373】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子、OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

【0374】在一些實施方案中，L_3選自  、  、

 、  、  、  、  、  、  、  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

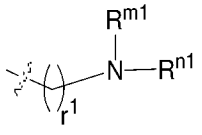
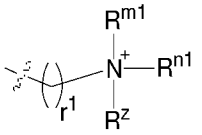
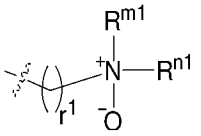
【0375】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

【0376】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基的結構如下所示，



AA^1

其中：

R^a、R^b 各自獨立地選自 H、  、  、  ，且

R^a、R^b 不同時為 H；

或者，R^a 與 R^b 和與它們共同相連的碳原子一起，形成 4-10 元雜環，所述

4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代；

r、r^1各自獨立地選自0到20的任意整數；

R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基、-$COOR^{x1}$；

R^{x1}選自C1-6烷基；

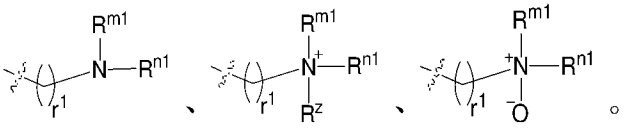
或者，R^{m1}與 R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成 4-10 元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個$R^{0'}$所取代；

R^z選自C1-6烷基；

R^0、$R^{0'}$各自獨立地選自 C1-6 烷基、C3-6 環烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$、任選被 C1-6烷基取代的4-10元雜環基；

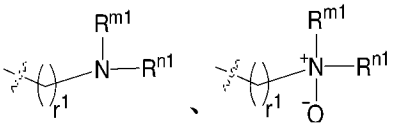
R^{m2}、R^{n2}各自獨立地選自H、C1-6烷基。

【0377】在一些實施方案中，R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自



。

【0378】在一些實施方案中，R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自



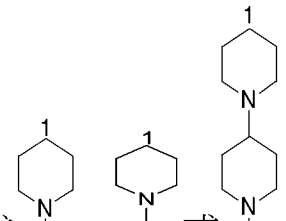
。

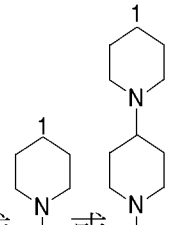
【0379】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環。

【0380】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶環或哌啉環。

【0381】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶環。

【0382】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形

成  、或，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【0383】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成  或，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【0384】在一些實施方案中，r、r^1各自獨立地選自0、1、2、3、4、5。

【0385】在一些實施方案中，r、r^1各自獨立地選自0、4。

【0386】在一些實施方案中，r、r^1中，任一個為0，另一個為4。

【0387】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3、-COOCH2CH2CH2CH3。

【0388】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基、第三丁氧羰基。

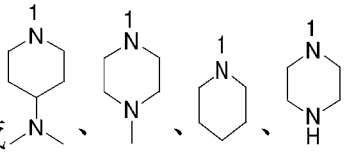
在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基。

【0389】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基。

【0390】在一些實施方案中，r、r^1中，r為4，r^1為0時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基（如H、甲基）；r為0，r^1為4時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自C1-6烷基（如甲基、乙基、正丙基），優選選自C2-6烷基（如乙基、正丙基）。

【0391】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成任選被$R^{0'}$取代的5-6元雜環。

【0392】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成任選被$R^{0'}$取代的哌啶環或哌咔環。

【0393】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成  ，1號氮原子為與R^{m1}和R^{n1}共同相連的氮原子。

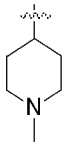
【0394】在一些實施方案中，R^{z}為甲基。

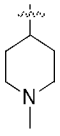
【0395】在一些實施方案中，R^{0}、$R^{0'}$各自獨立地選自C1-6烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$、任選被C1-6烷基取代的5-6元雜環基。

【0396】在一些實施方案中，R^{0}選自C1-6烷基、被C1-6烷基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基選自哌啶基、哌咔基。

【0397】在一些實施方案中，R^{0}選自甲基、乙基、被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基。

【0398】在一些實施方案中，R^{0}選自甲基、被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基。

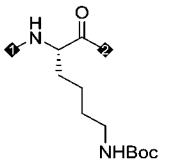
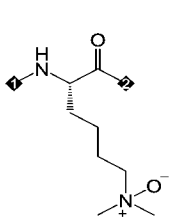
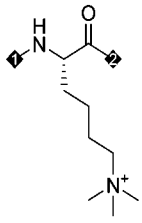
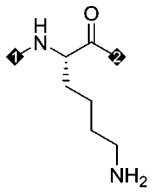
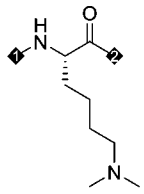
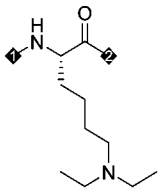
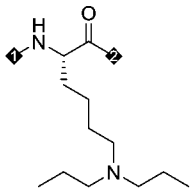
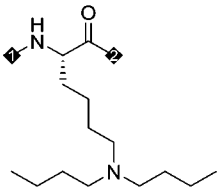
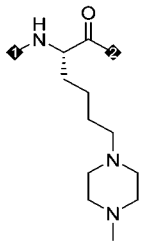
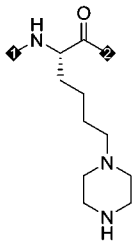
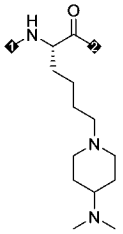
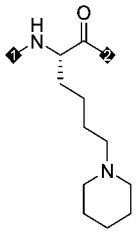
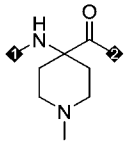
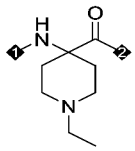
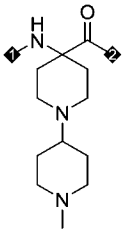
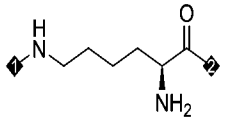
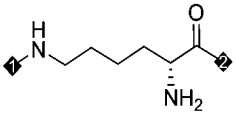
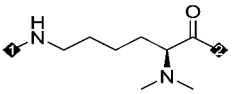
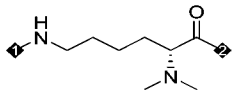
【0399】在一些實施方案中，R^{0}選自甲基、乙基、  。

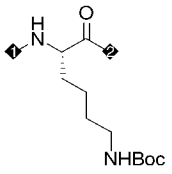
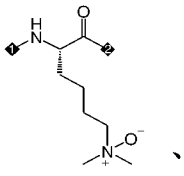
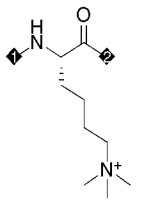
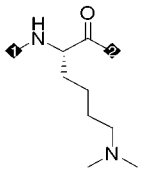
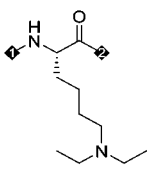
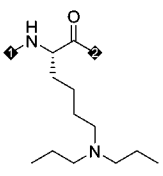
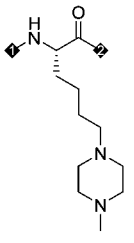
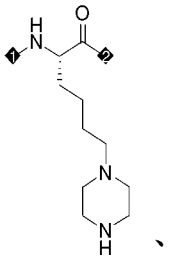
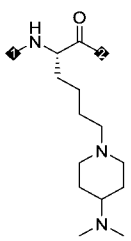
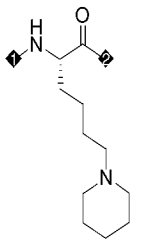
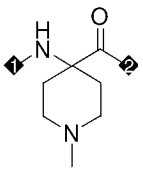
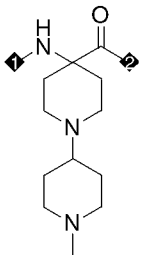
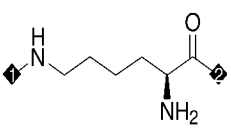
【0400】在一些實施方案中，R^{0}選自甲基、  。

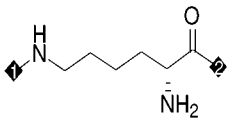
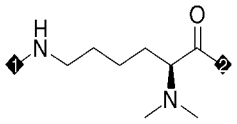
【0401】在一些實施方案中，$R^{0'}$選自C1-6烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$。

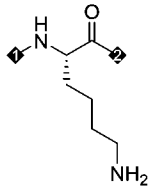
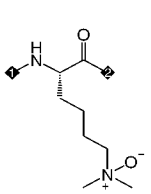
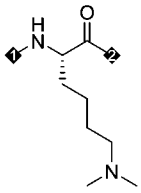
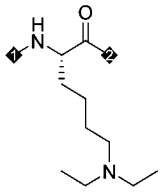
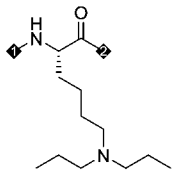
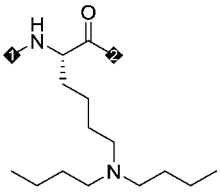
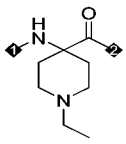
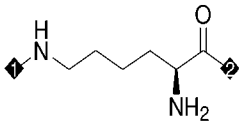
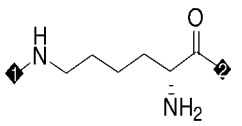
【0402】在一些實施方案中，$R^{0'}$選自甲基、-$NR^{m2}R^{n2}$。

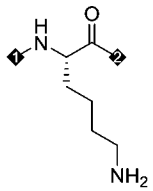
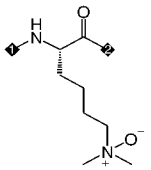
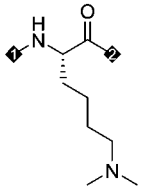
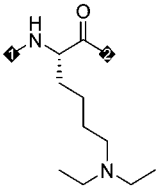
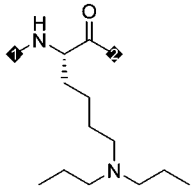
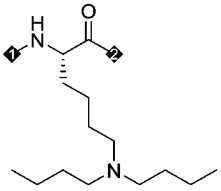
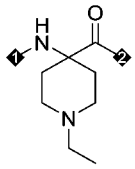
【0403】在一些實施方案中，R^{m2}、R^{n2}為甲基。

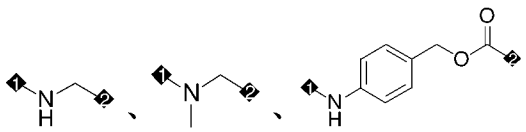
【0404】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  或  。

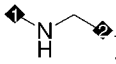
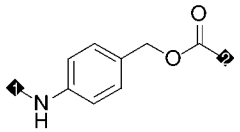
【0405】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、


、

。

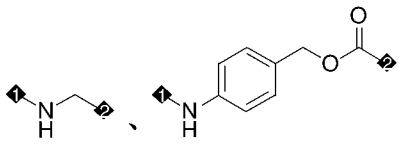
【0406】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自

、

、

、

、

、

、

、

、

。

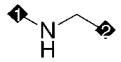
【0407】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自

、

、

、

、

、

、

。

【0408】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自

，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

【0409】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4為

或

，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

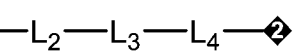
【0410】在一些實施方案中，L_4不存在。

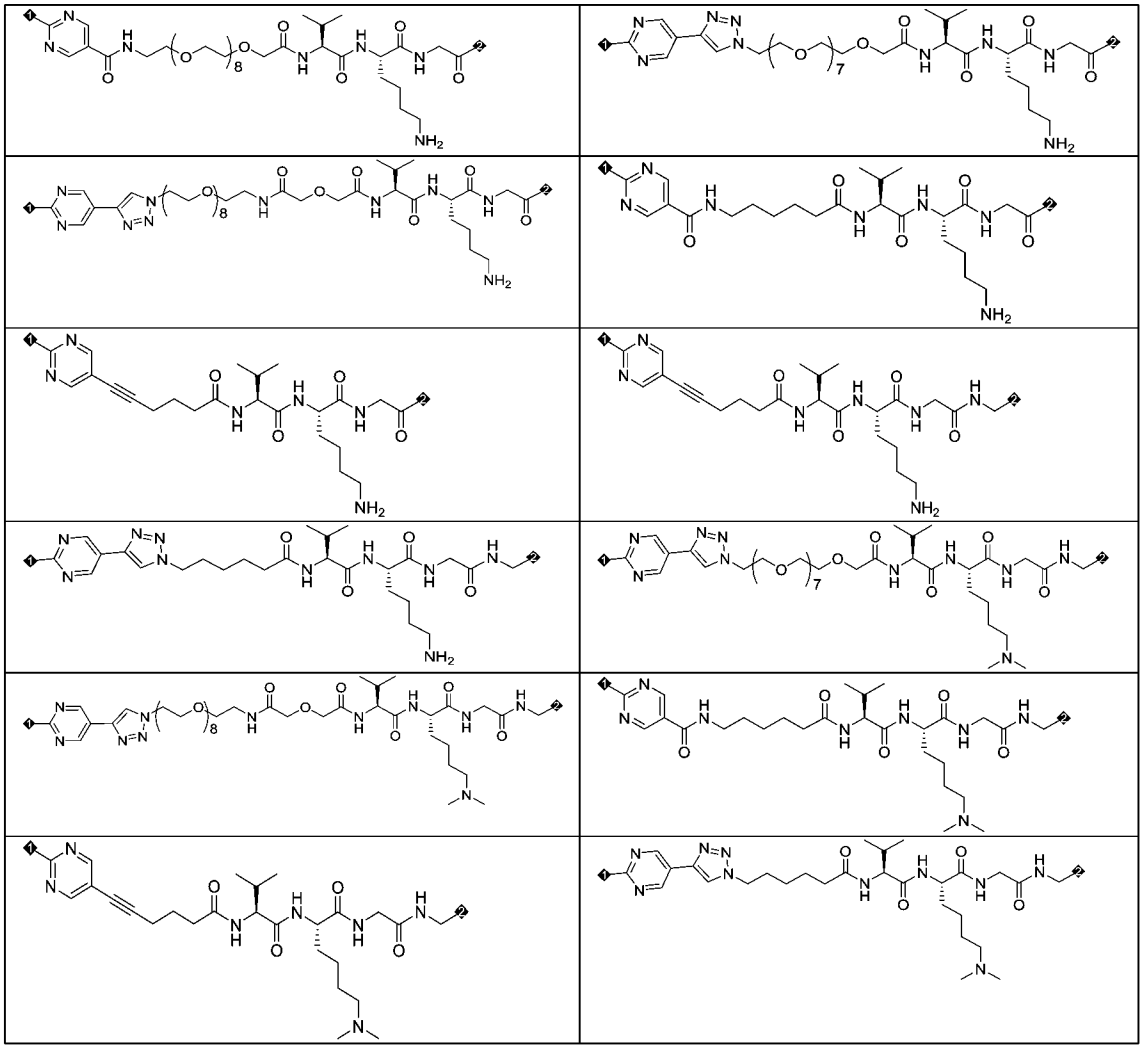
【0411】在一些實施方案中，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

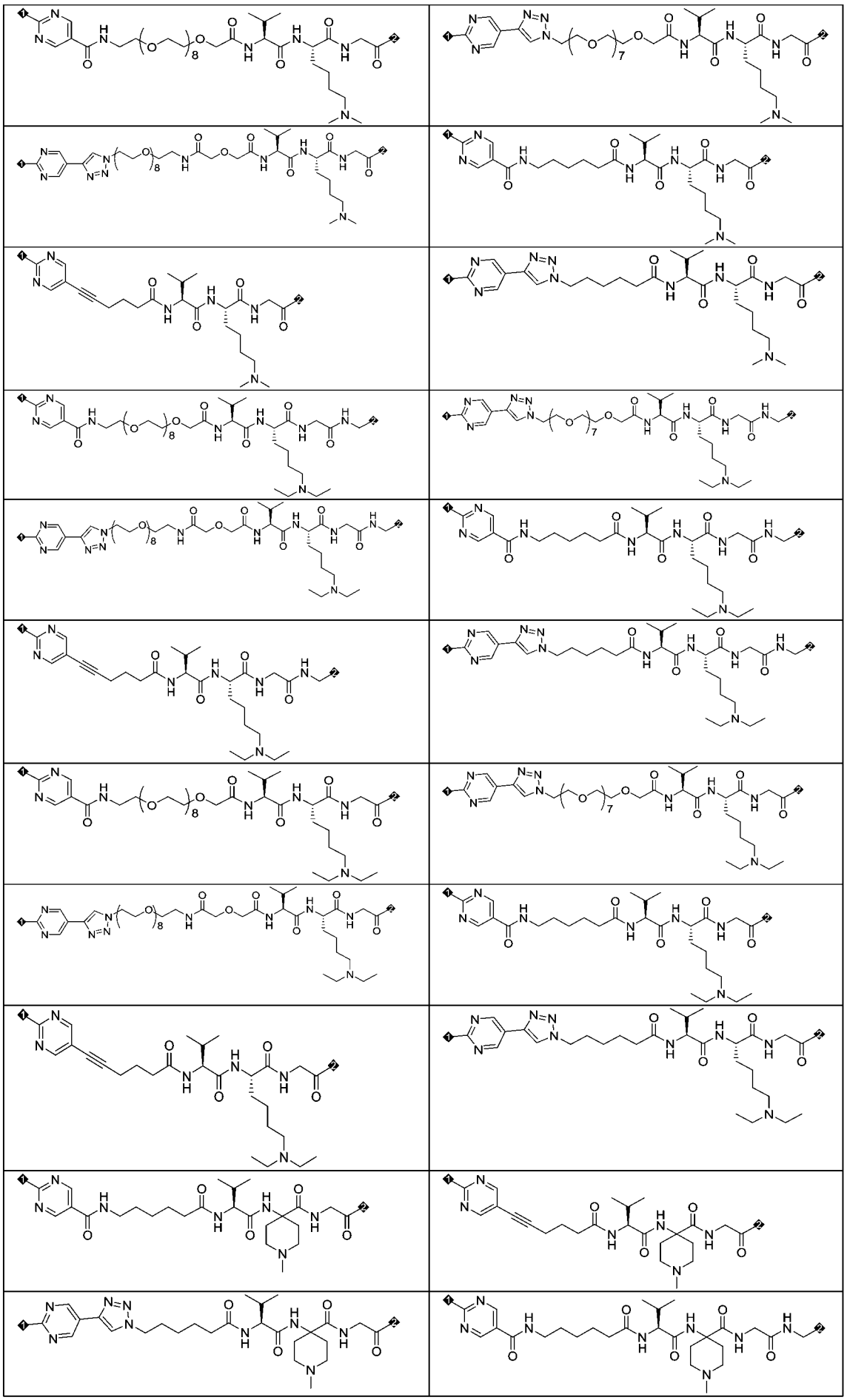
【0412】在一些實施方案中，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

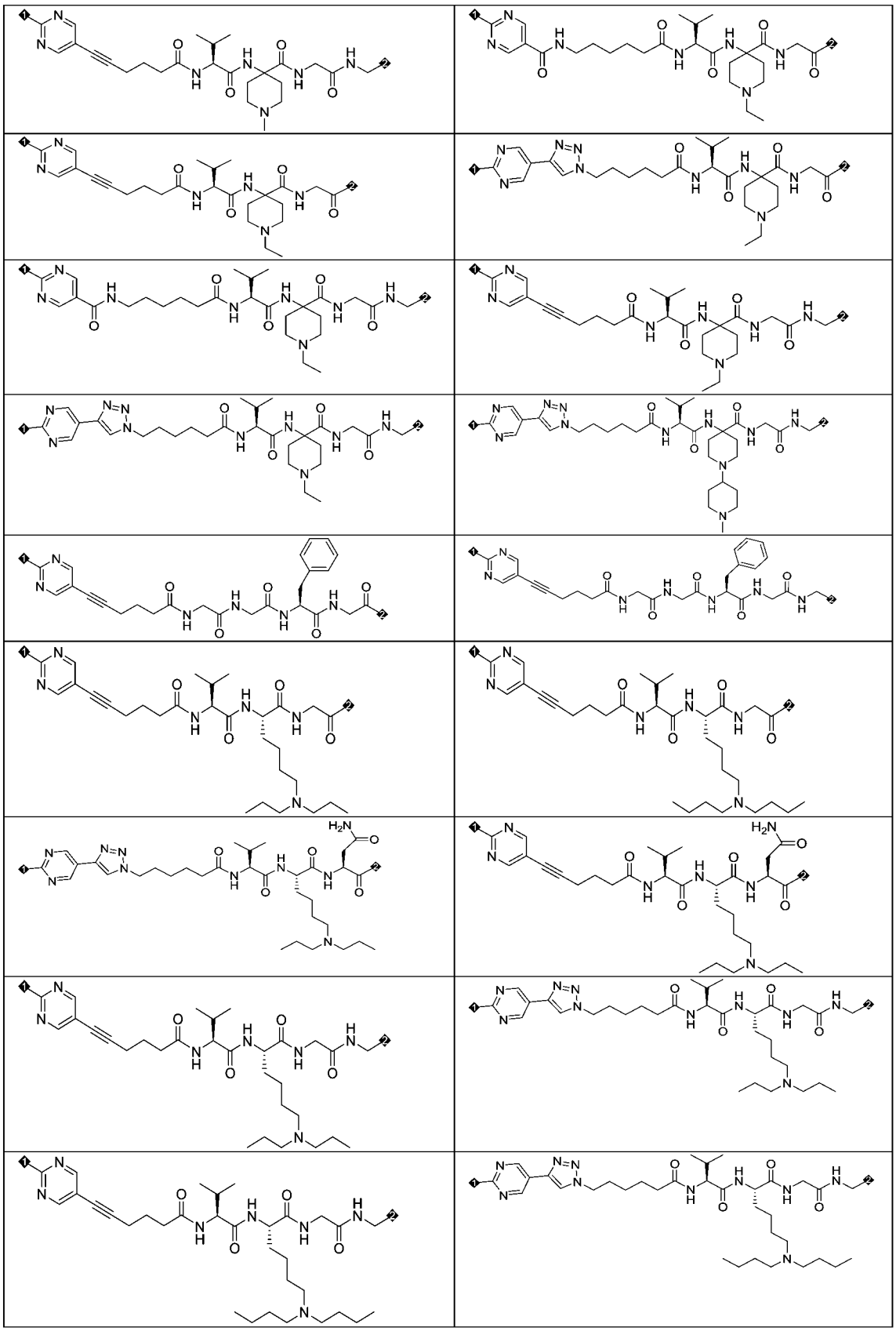
【0413】在一些實施方案中，Lg選自F、Cl、$MeSO_2$-。

【0414】在一些實施方案中，Lg選自F、$MeSO_2$-。

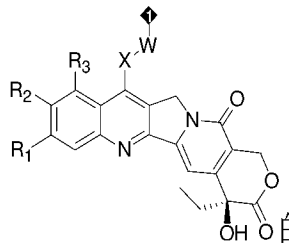
【0415】在一些實施方案中，  的結構選自以下：



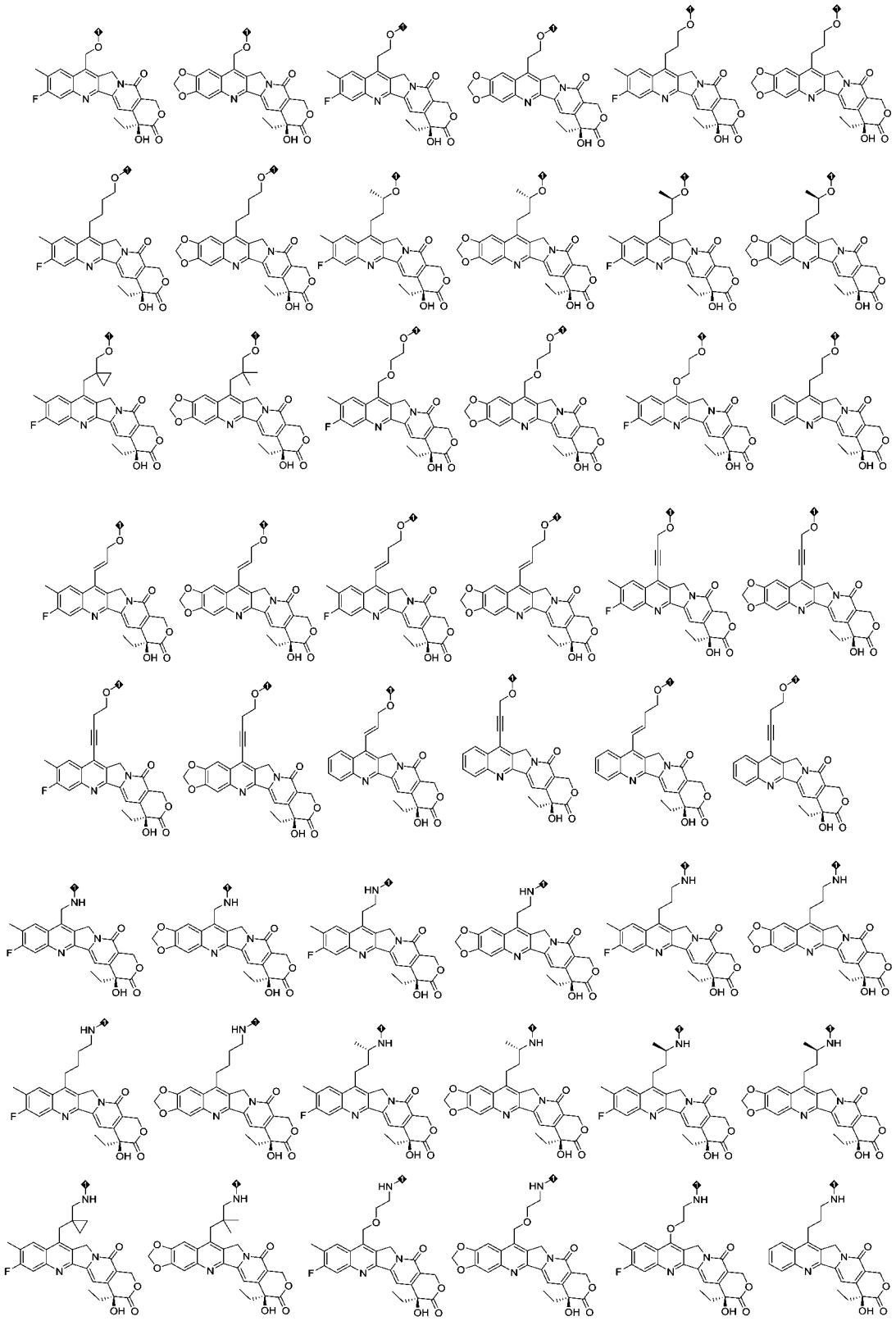


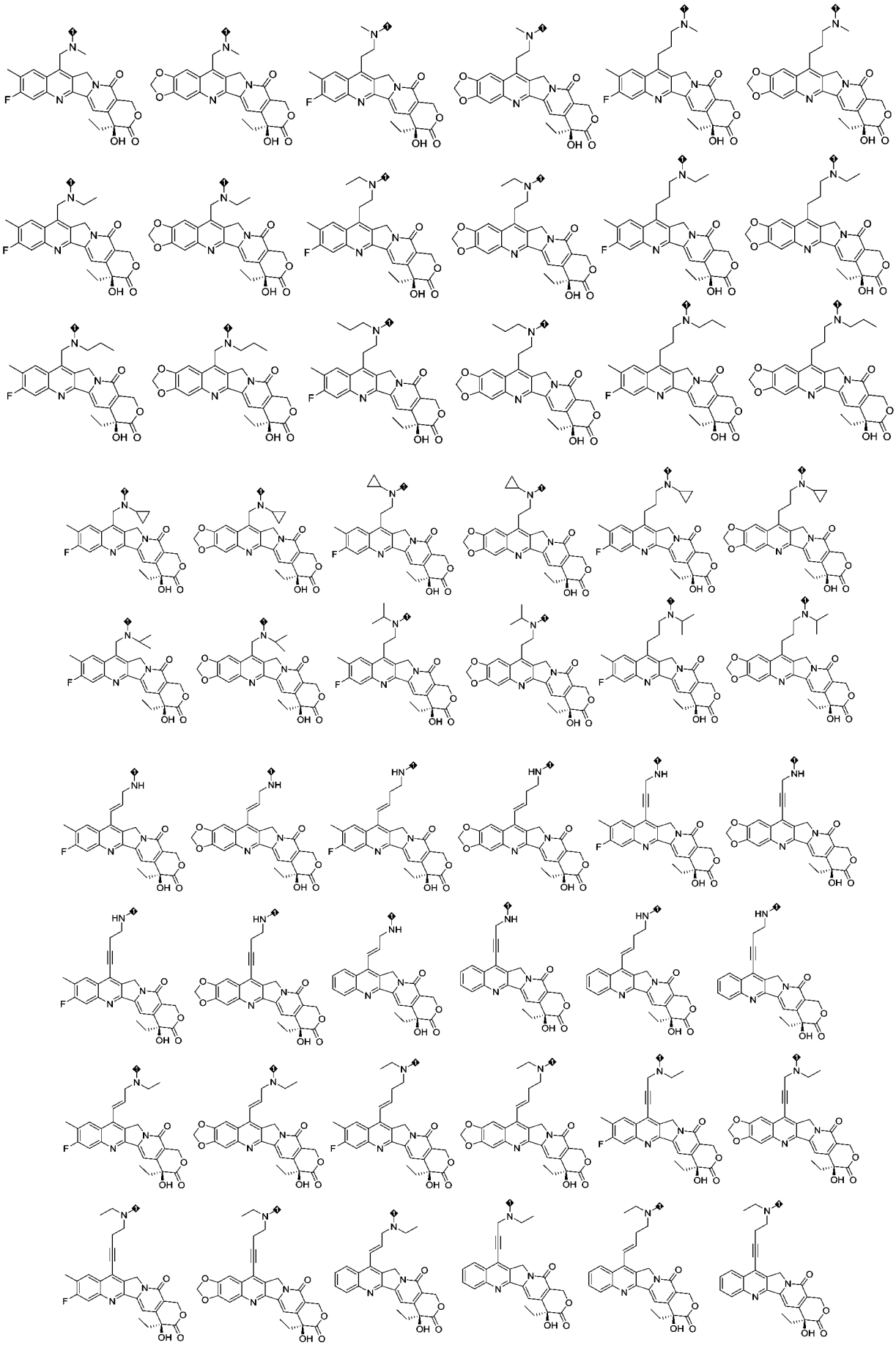


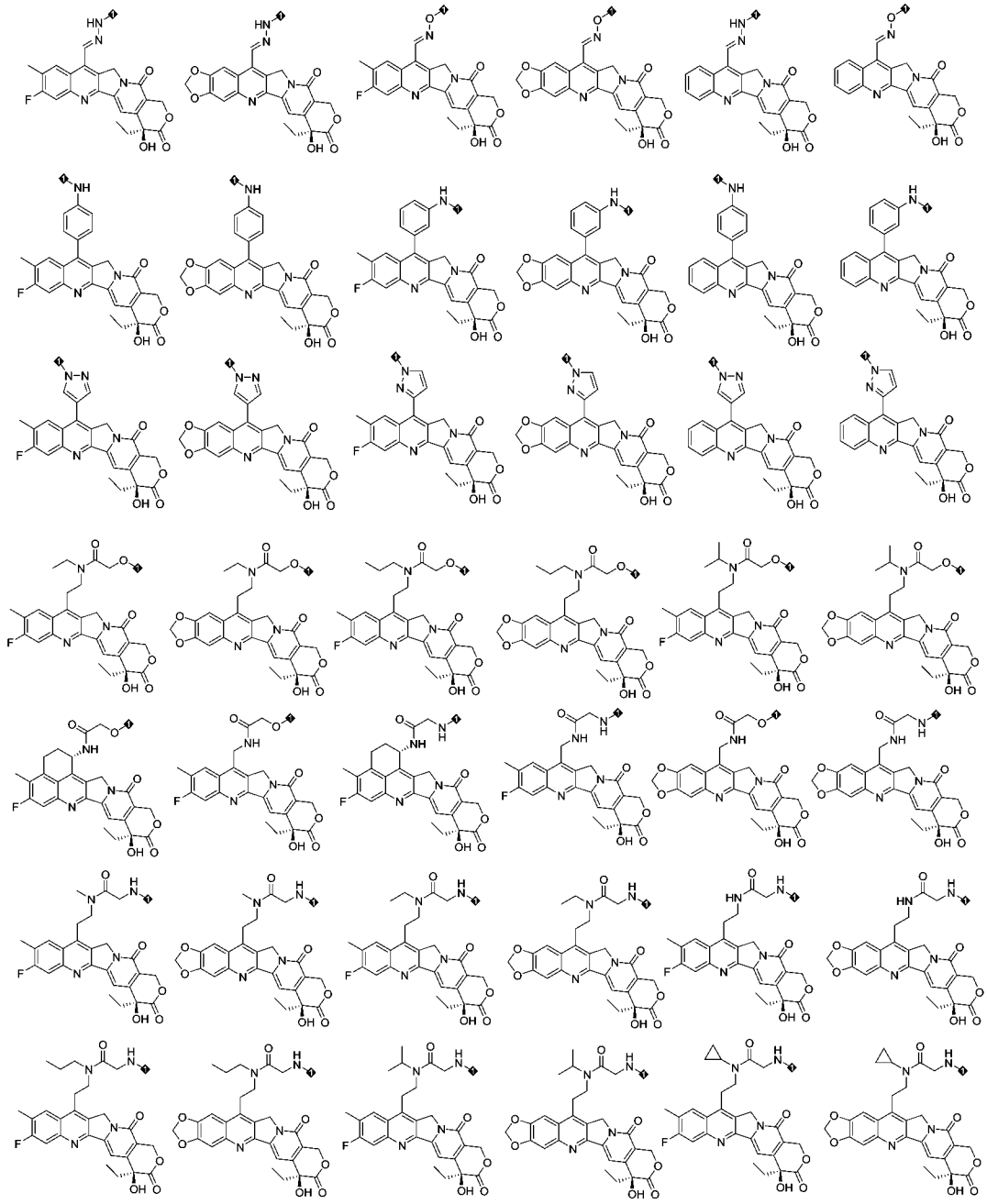
其中，1 位與 Lg 相連，2 位與 W 相連。



【0416】在一些實施方案中，的結構選自以下：

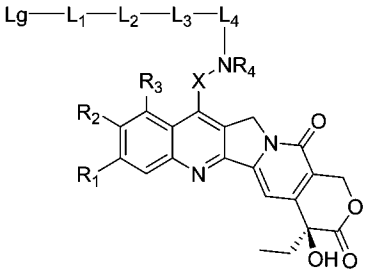






其中，1位與L_4相連；當L_4不存在時，1位與L_3相連。

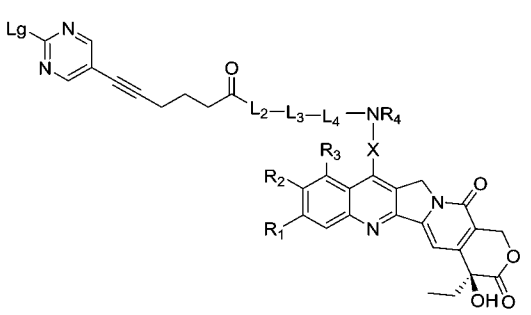
【0417】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(1)所式結構：



III-(1)　　，

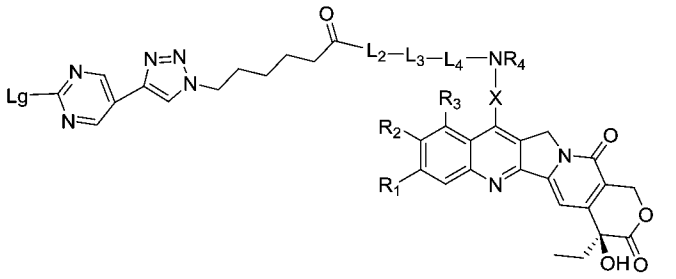
其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0418】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(1A)或III-(1B)所式結構：



III-(1A)

、

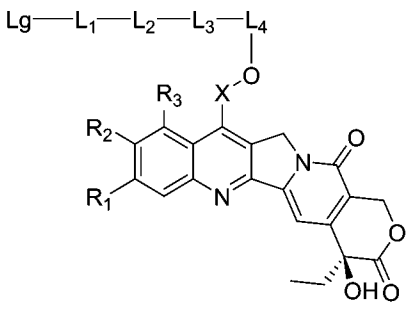


III-(1B)

，

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0419】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(2)所式結構：

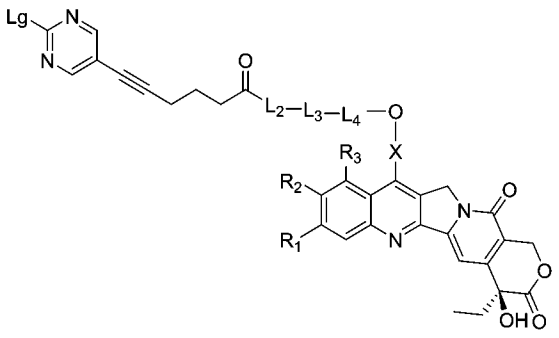


III-(2)

，

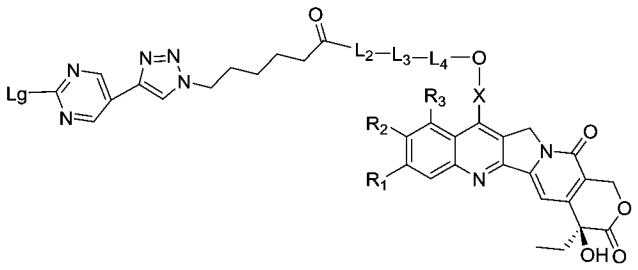
其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0420】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(2A)或III-(2B)所式結構：



III-(2A)

、

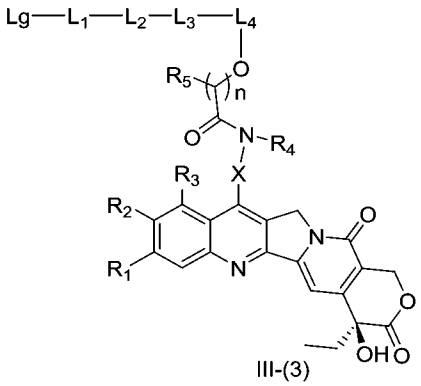


III-(2B)

，

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0421】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(3)所式結構：

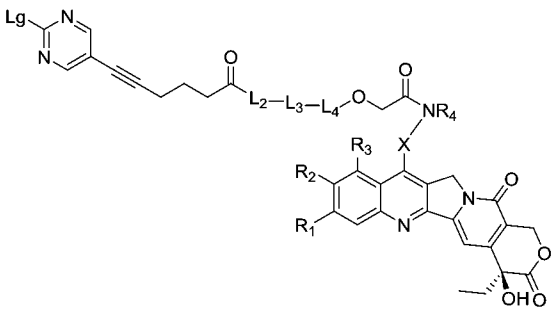


III-(3)

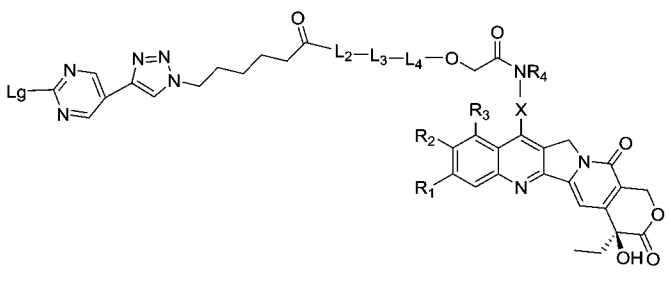
，

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0422】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(3A)或III-(3B)所式結構：



III-(3A)

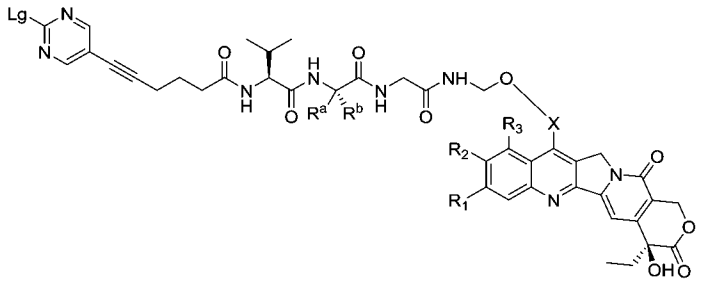


III-(3B)

，

其中，Lg、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

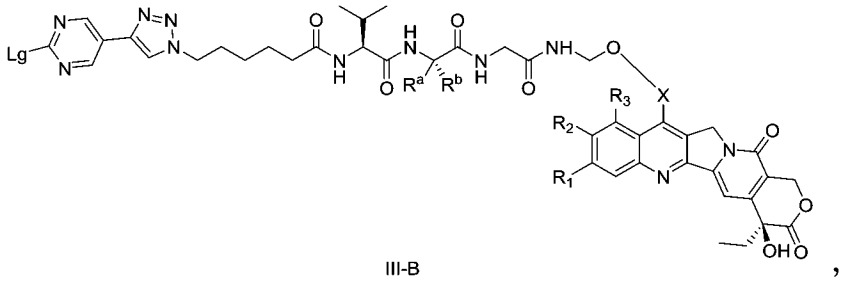
【0423】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-A所式結構：



III-A ，

其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

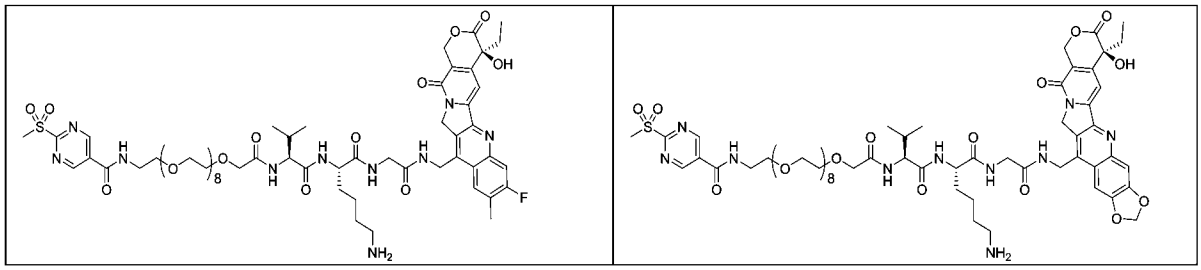
【0424】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-B所式結構：

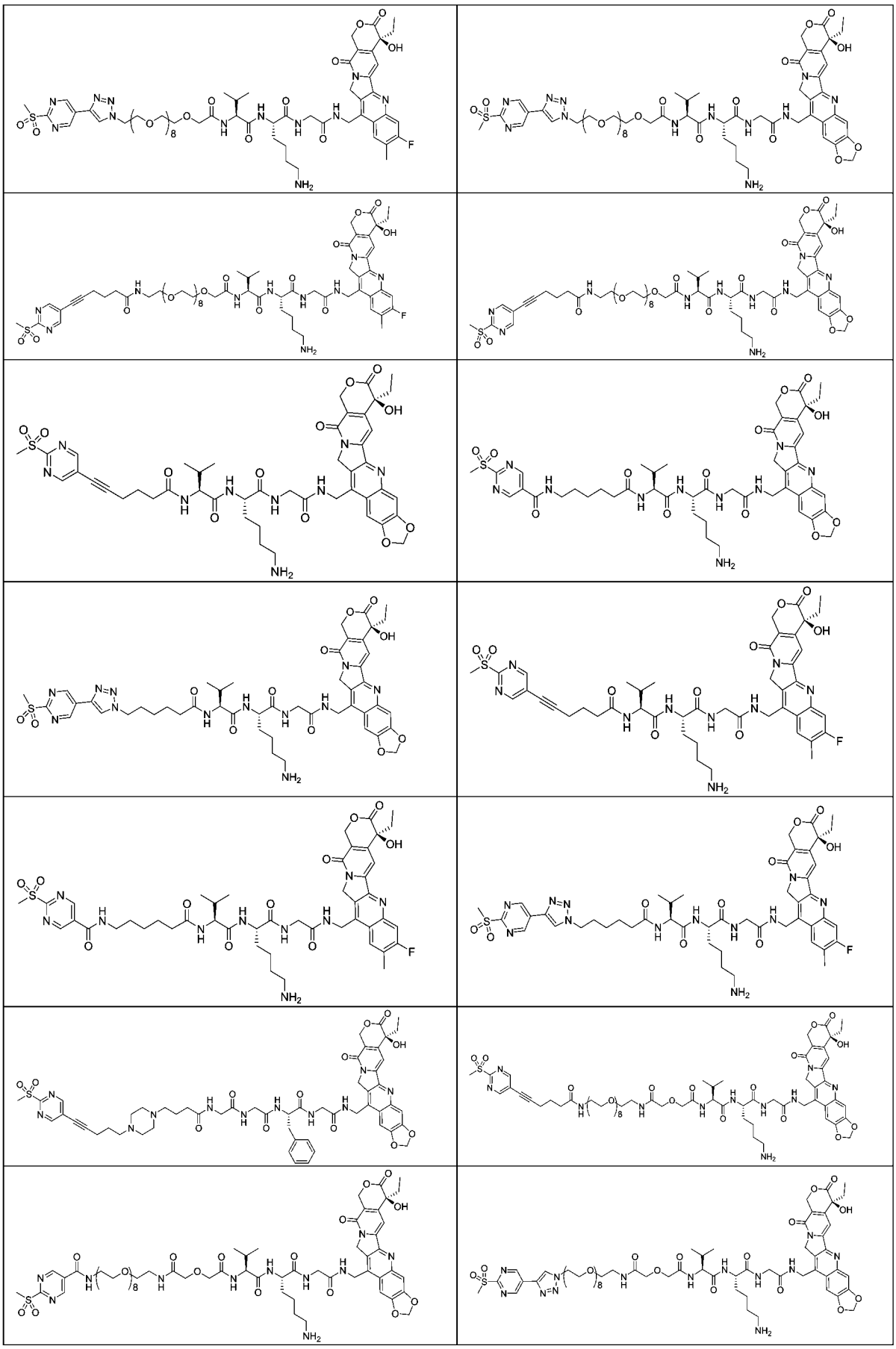


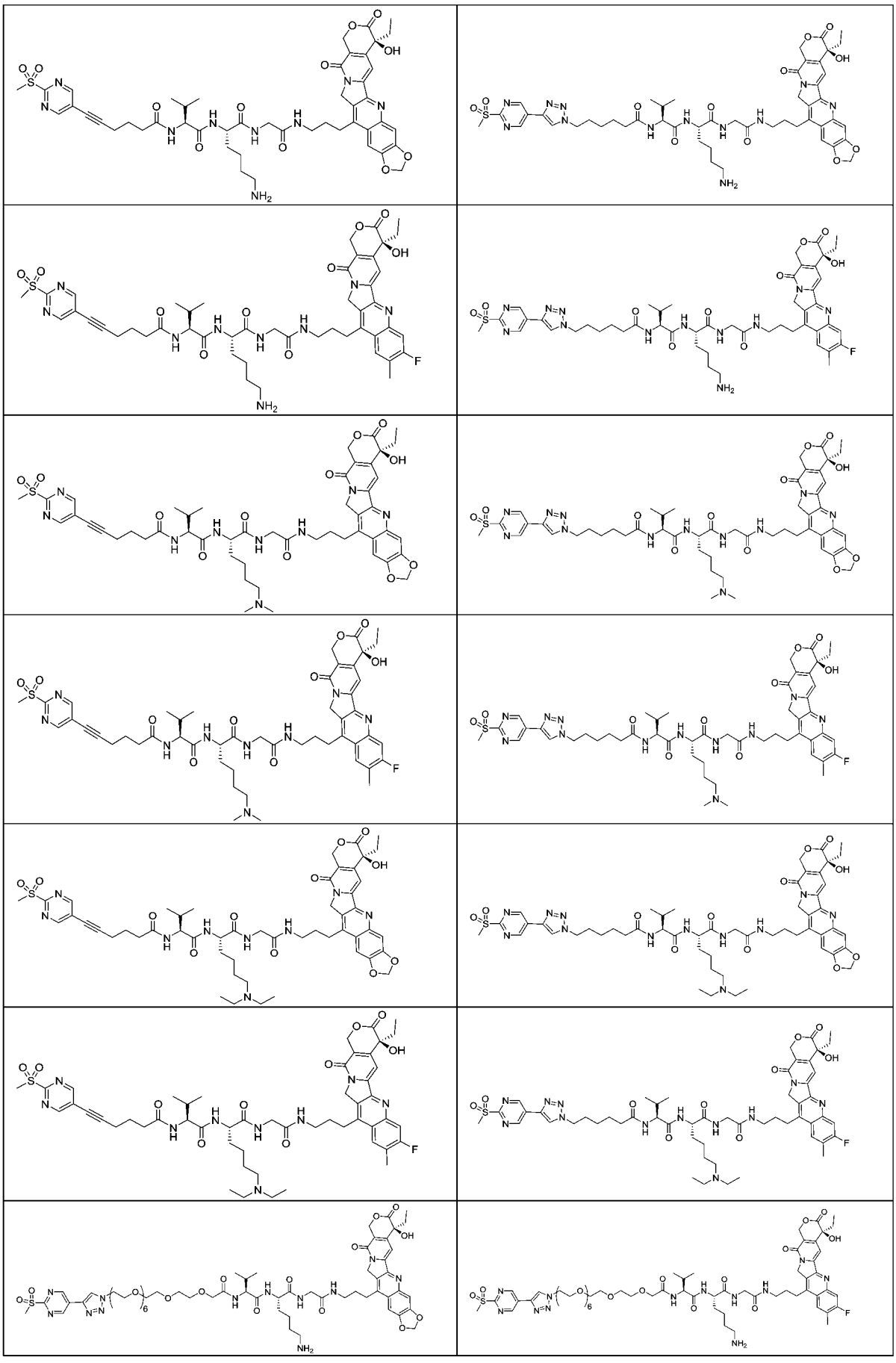
III-B ，

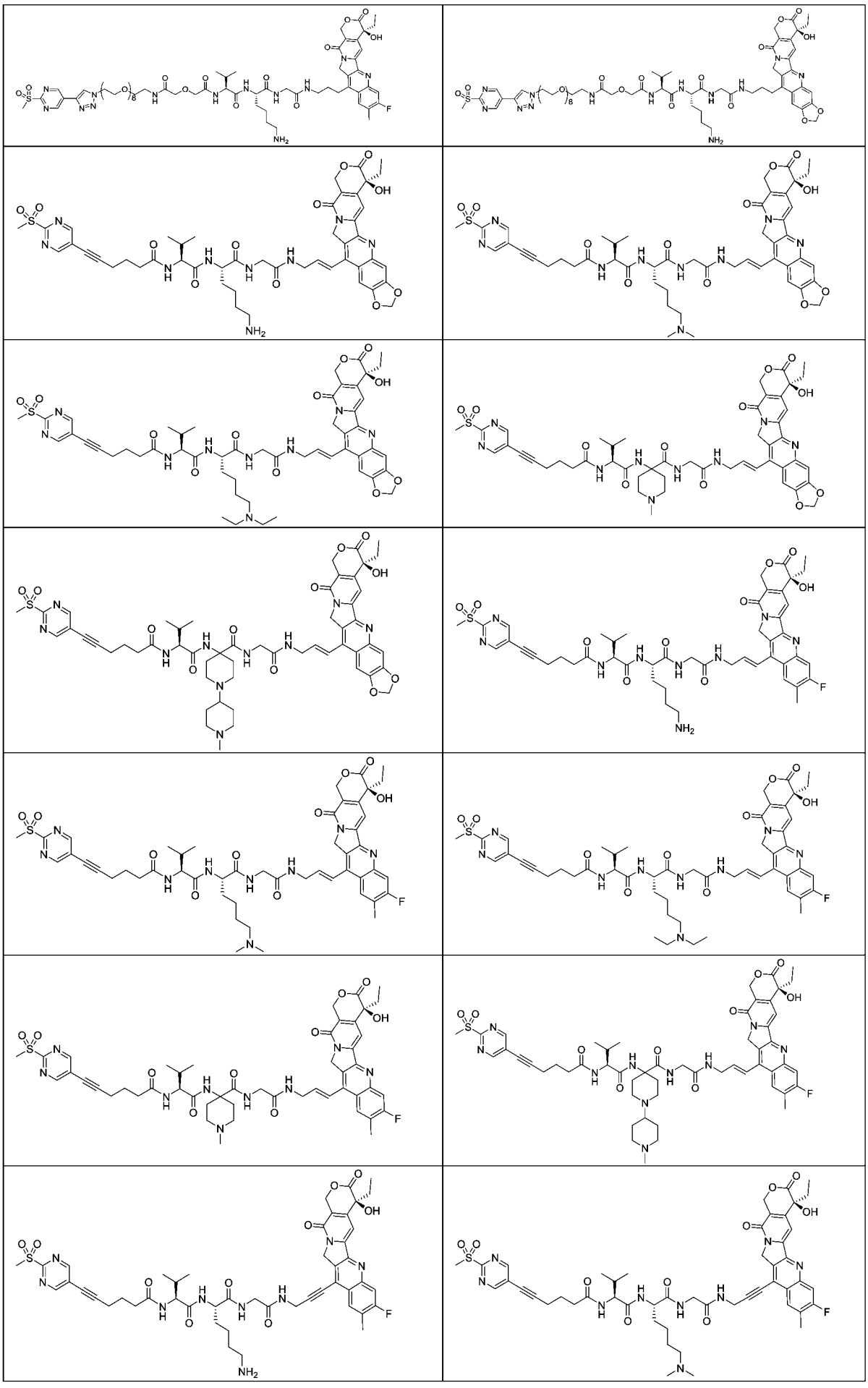
其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

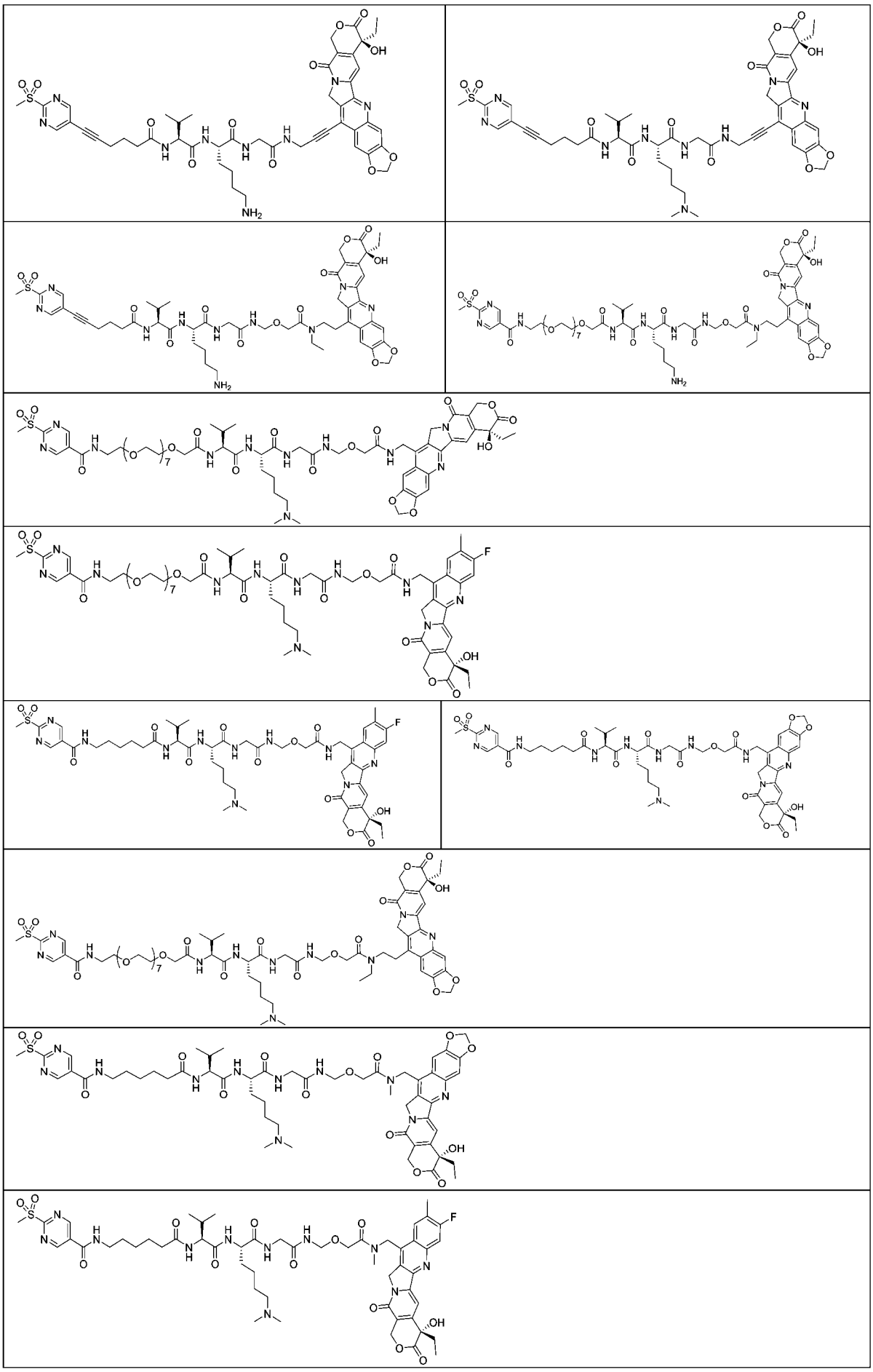
【0425】在一些實施方案中，式III所示的藥物連接體偶聯物選自以下結構：

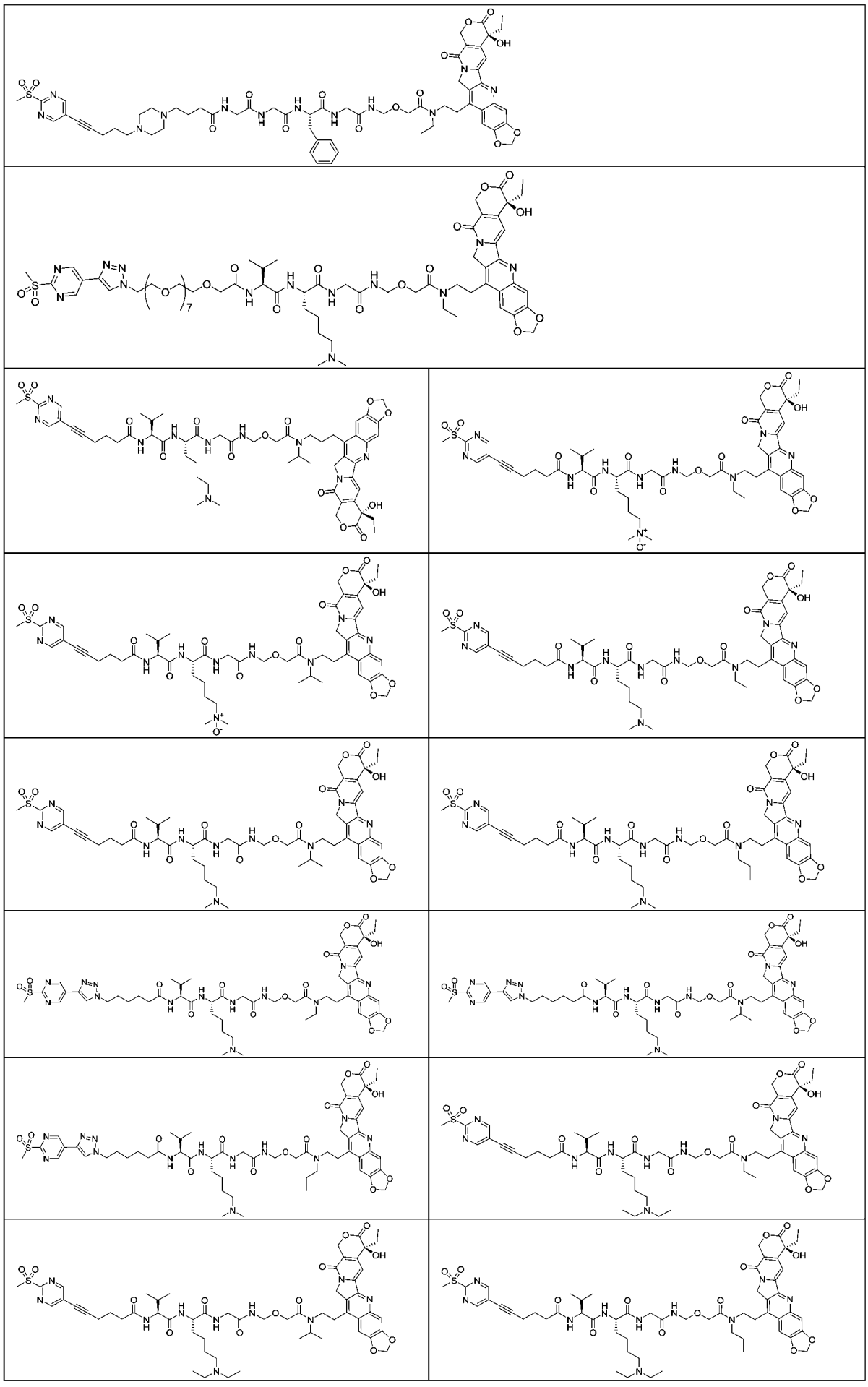


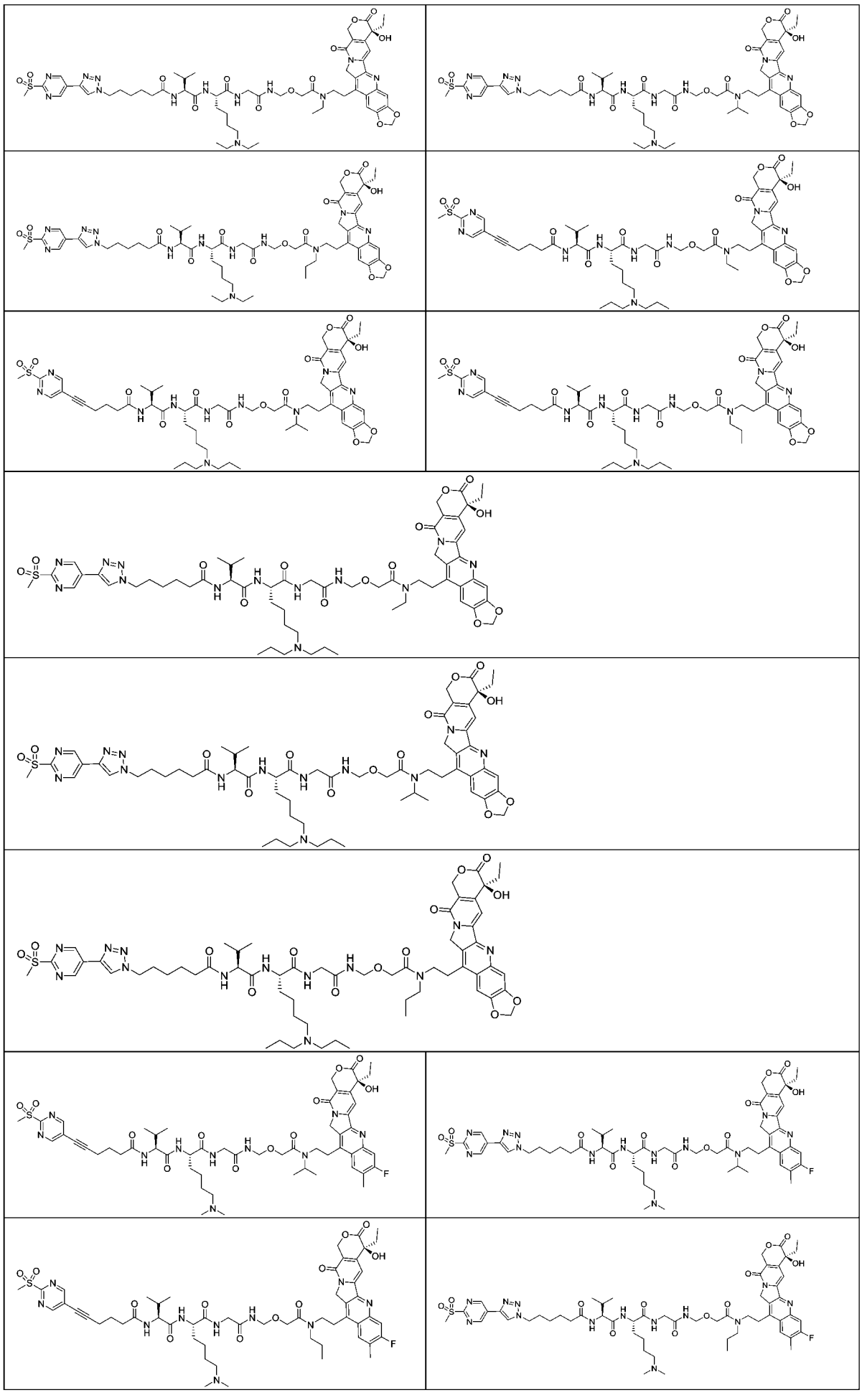


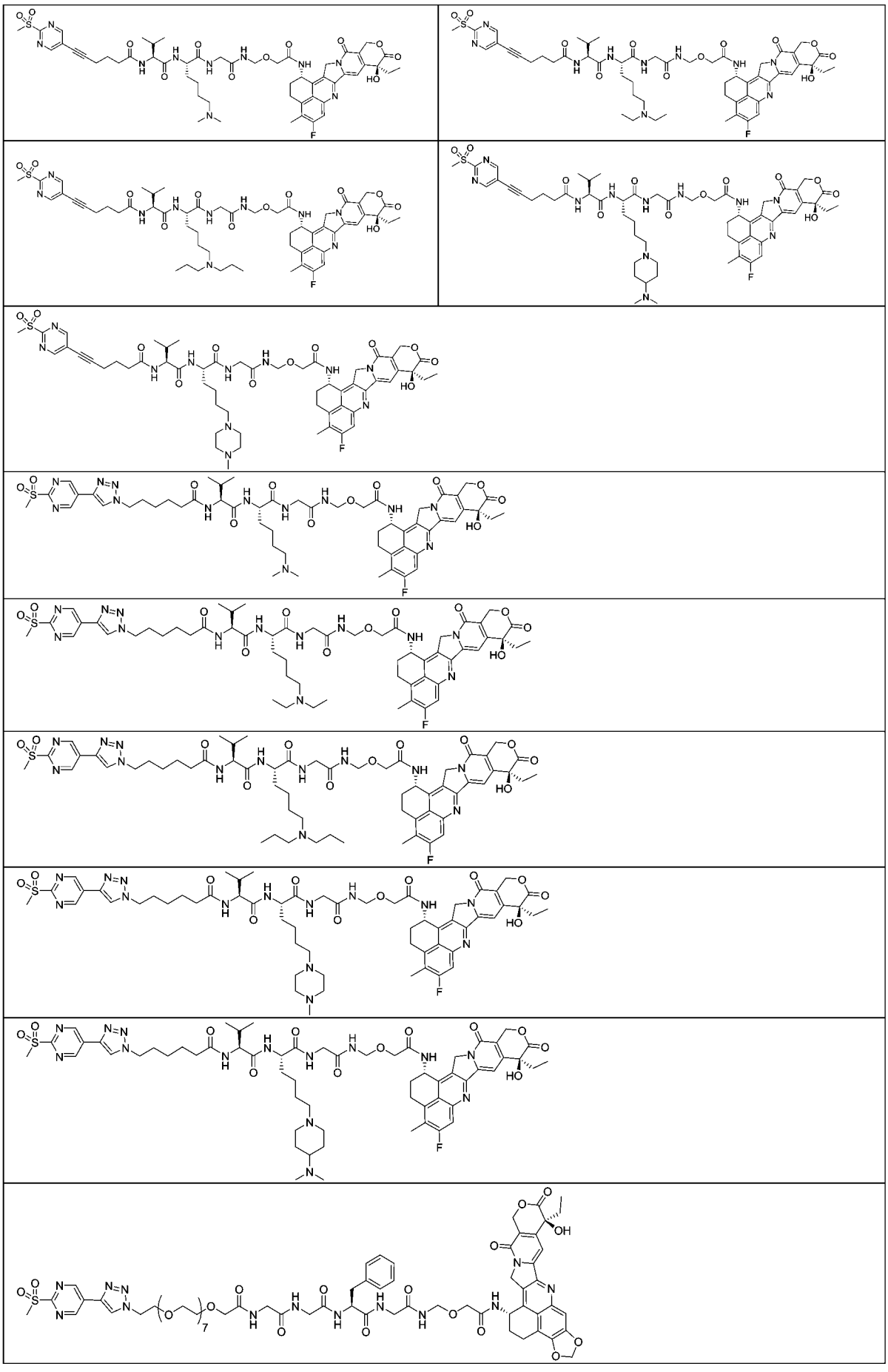


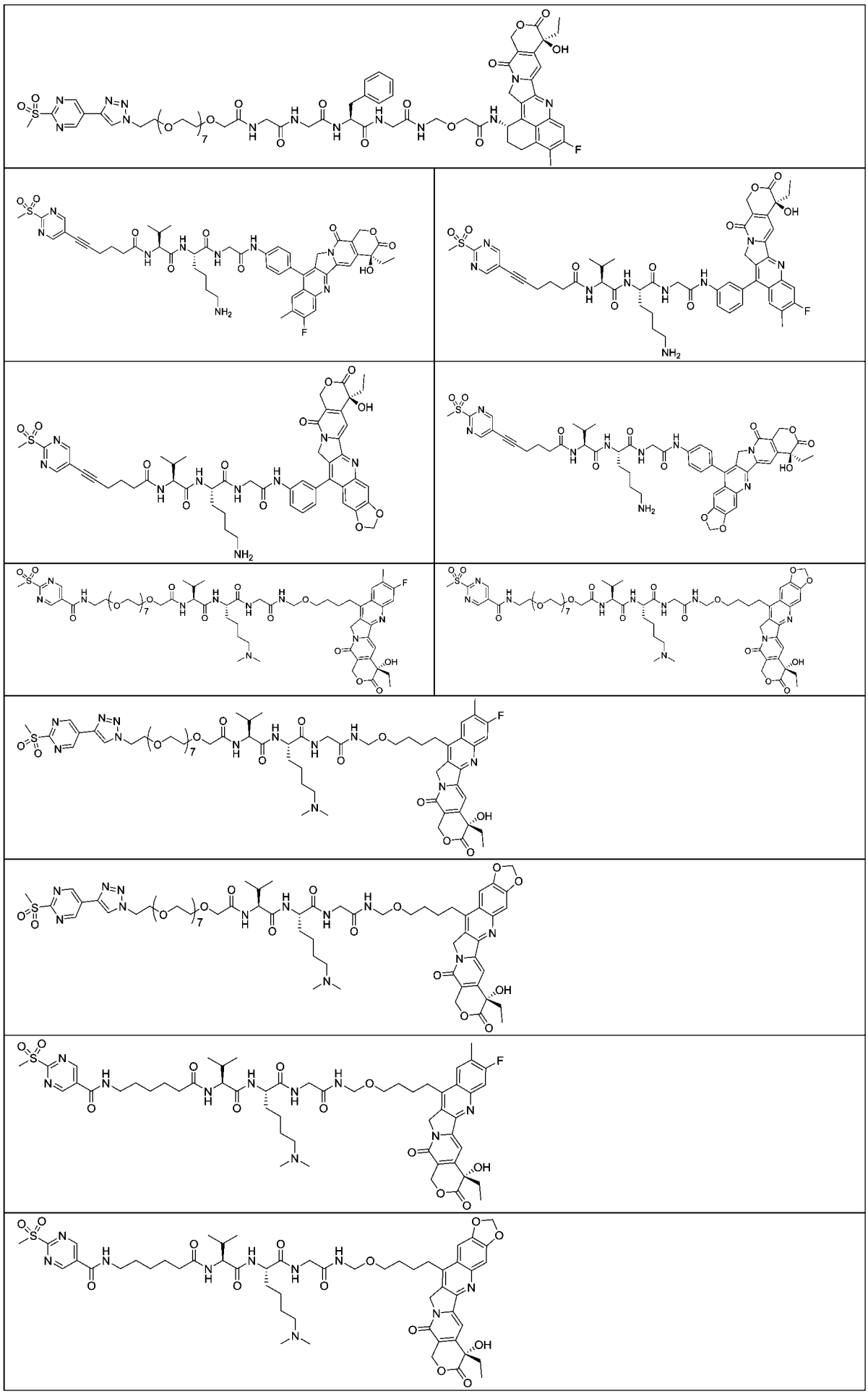


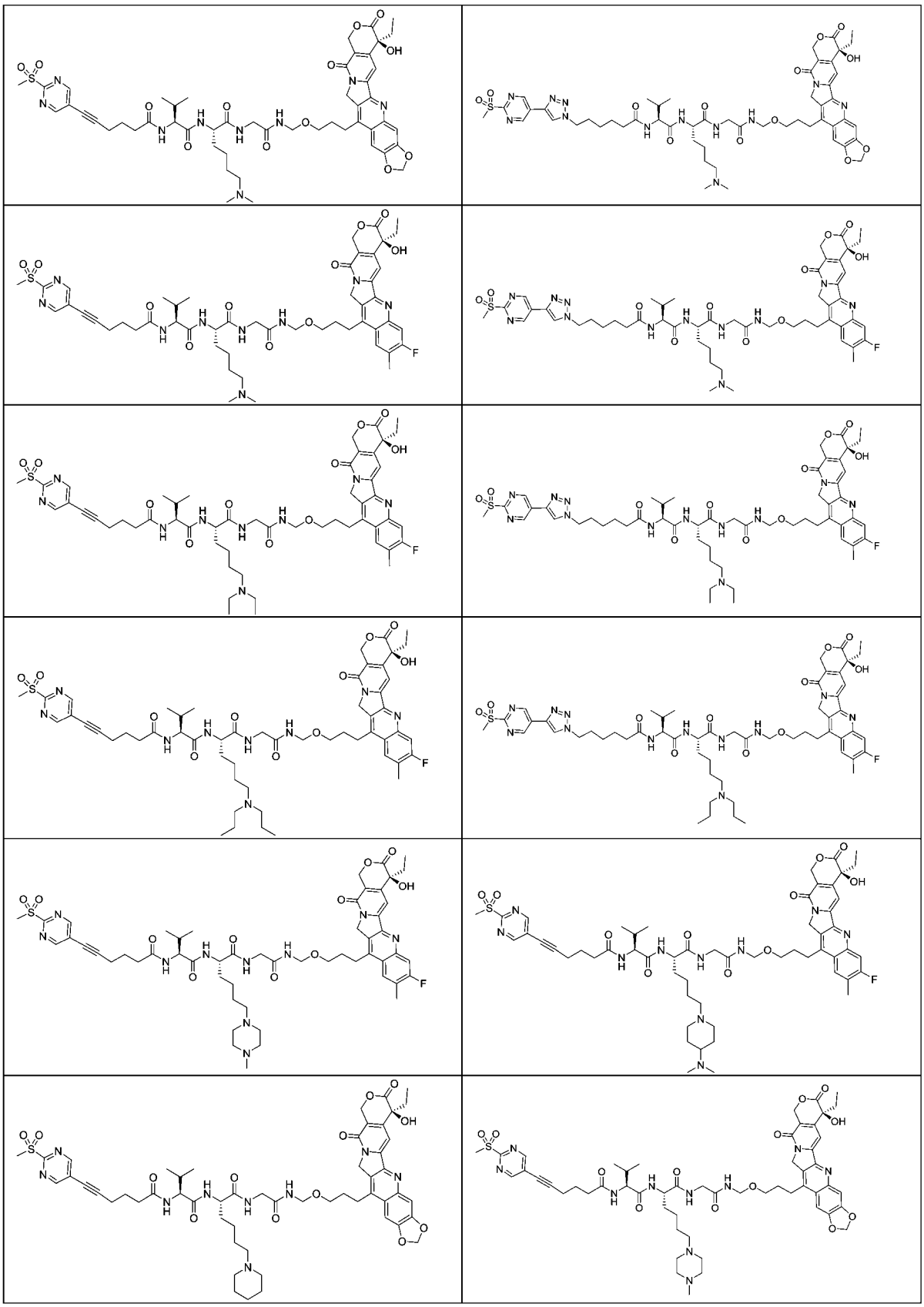


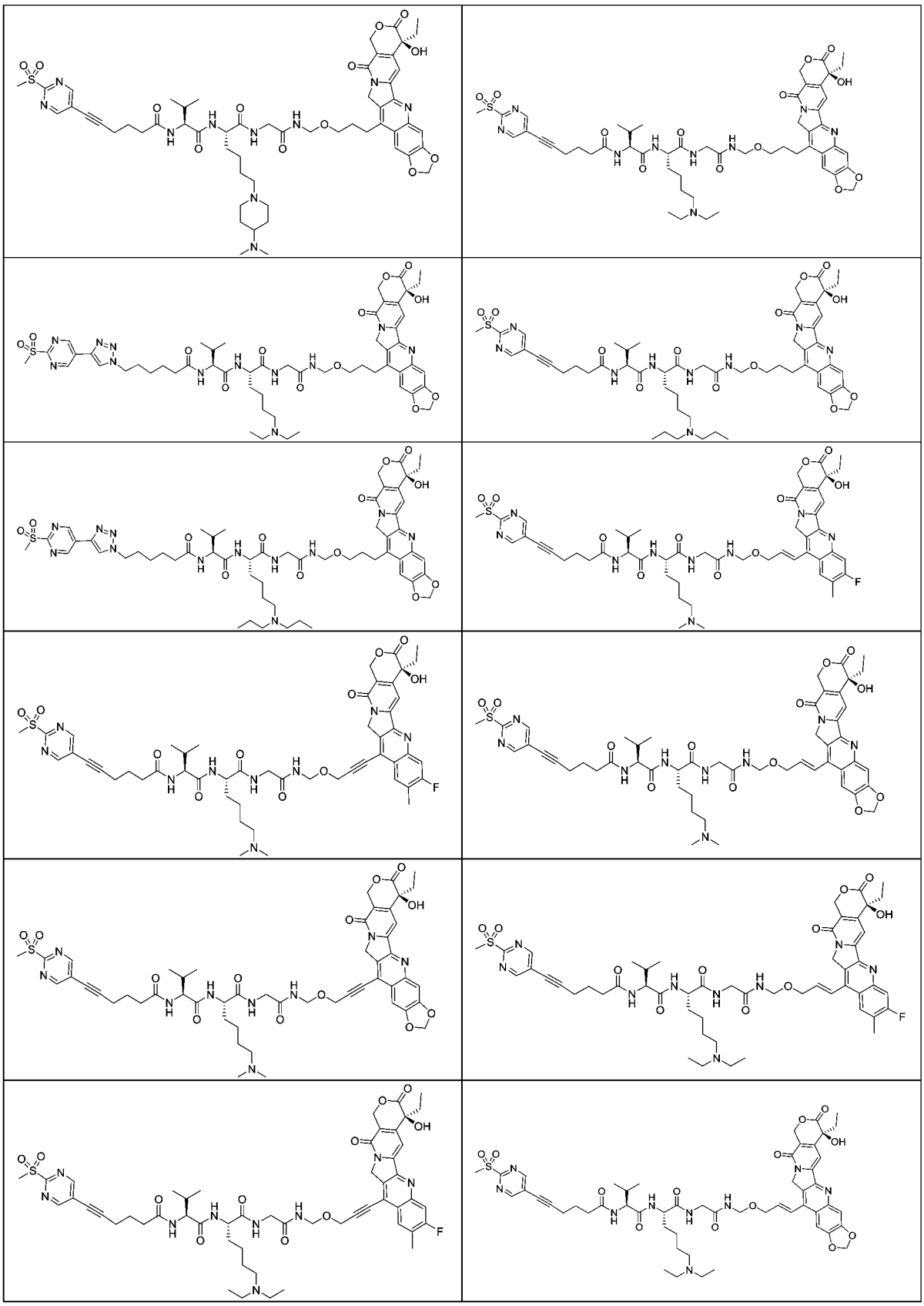


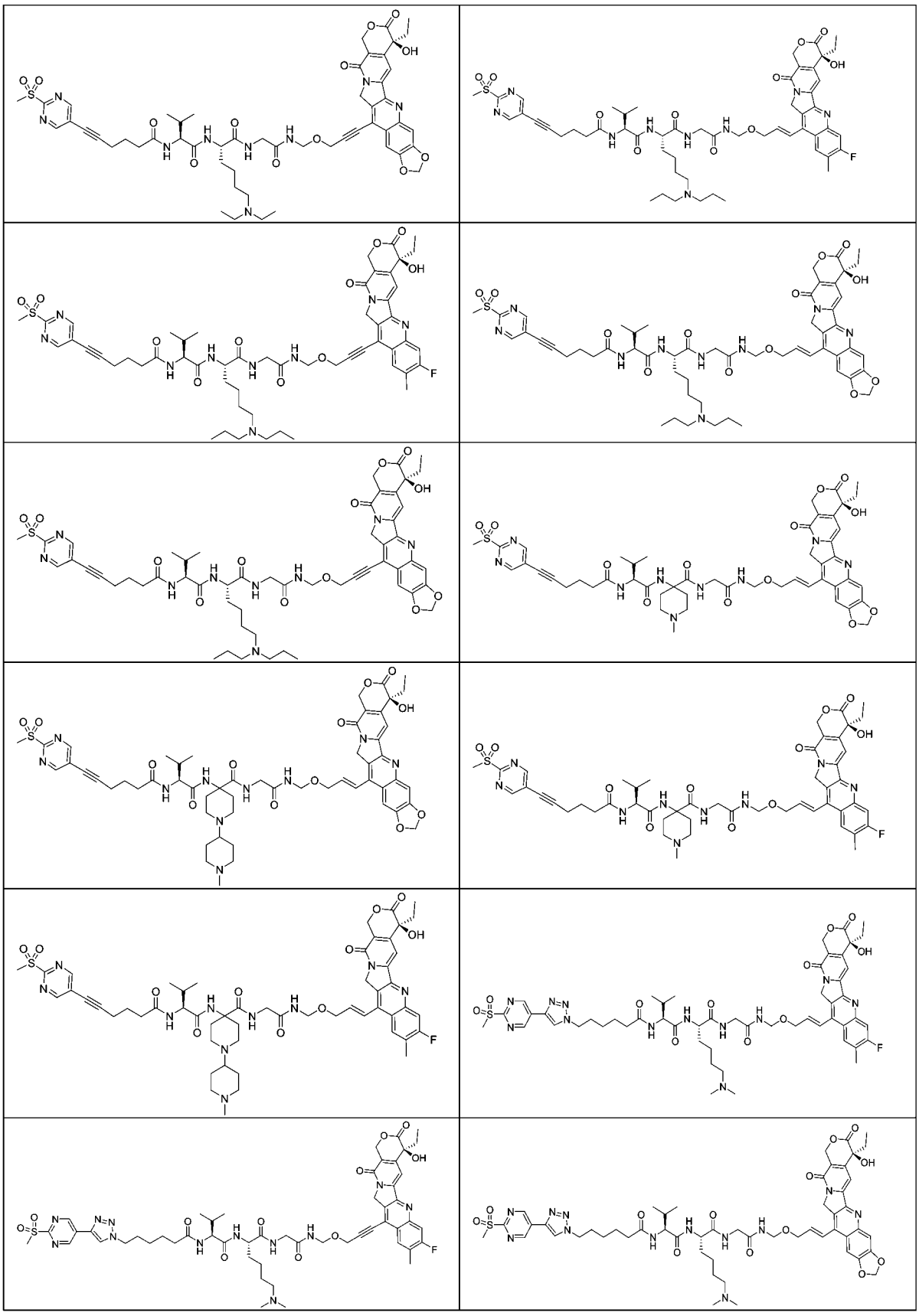


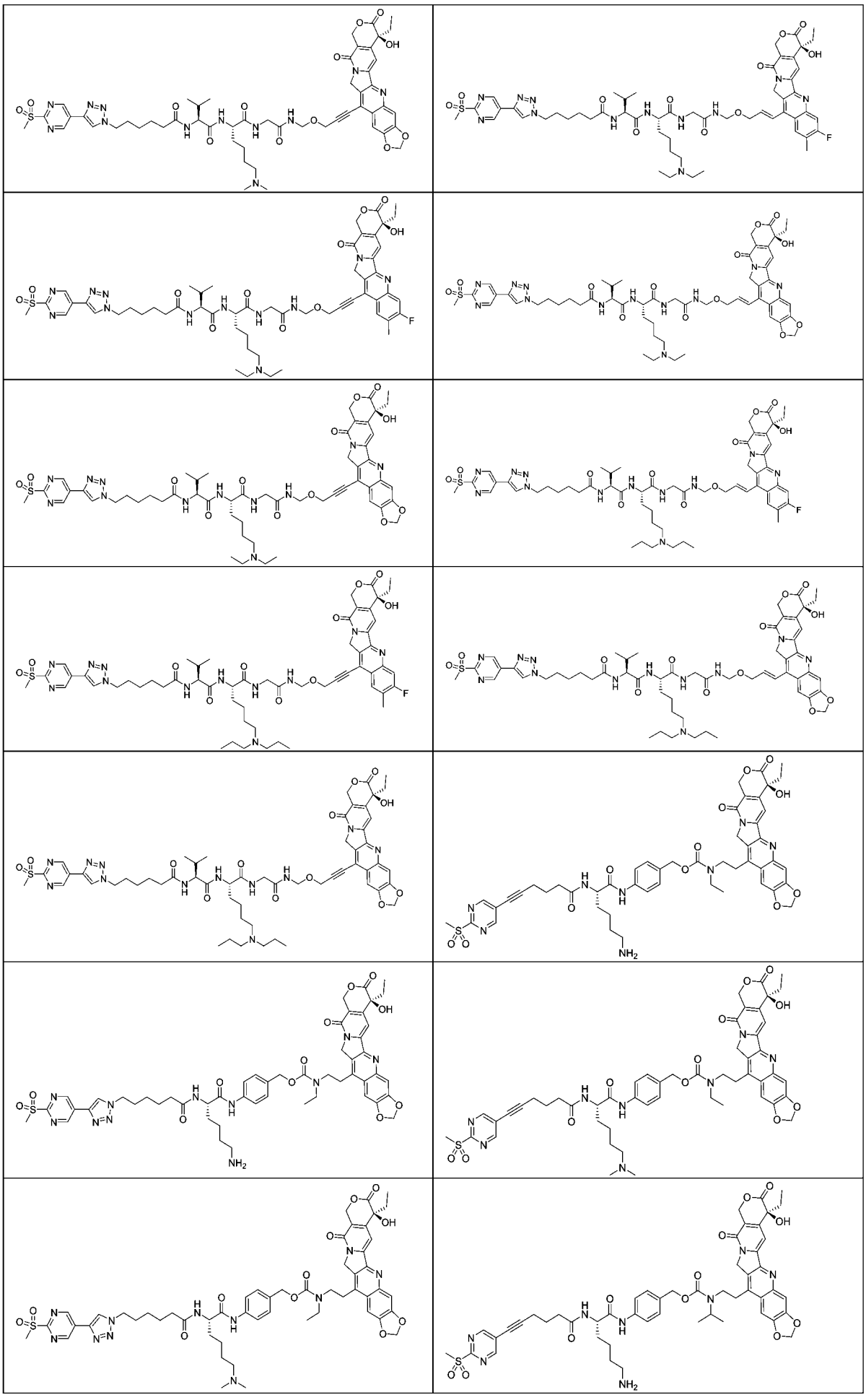


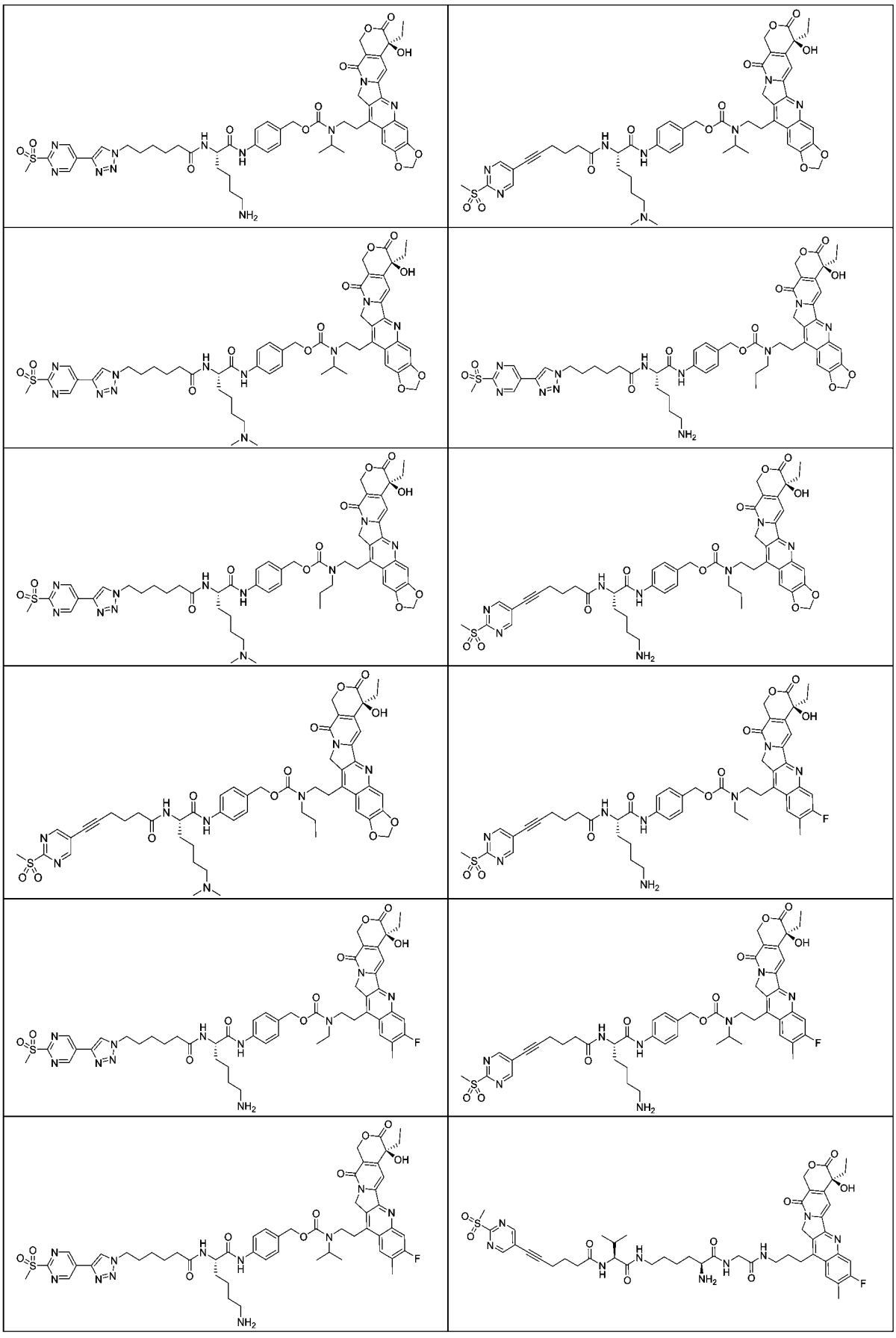


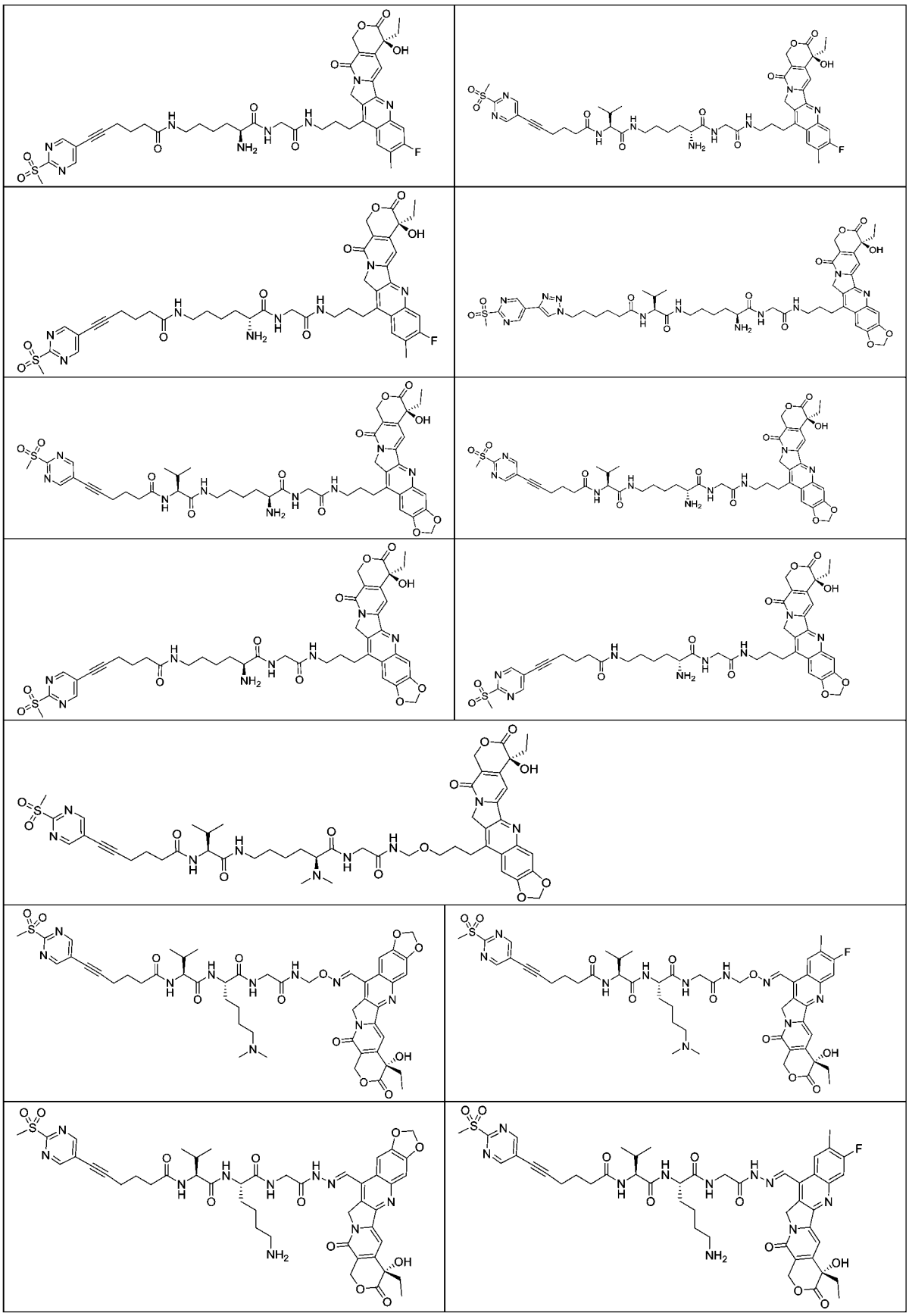


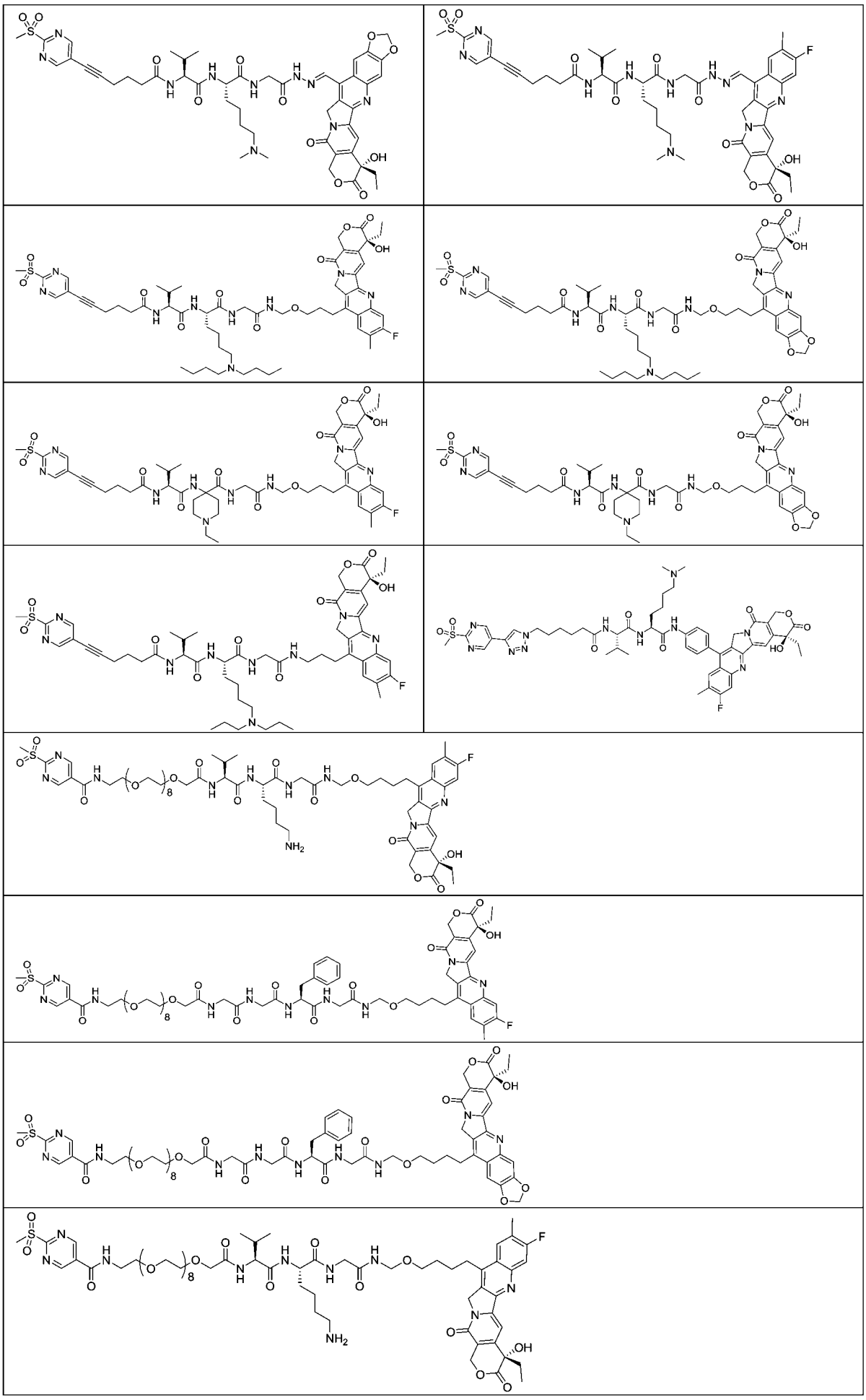


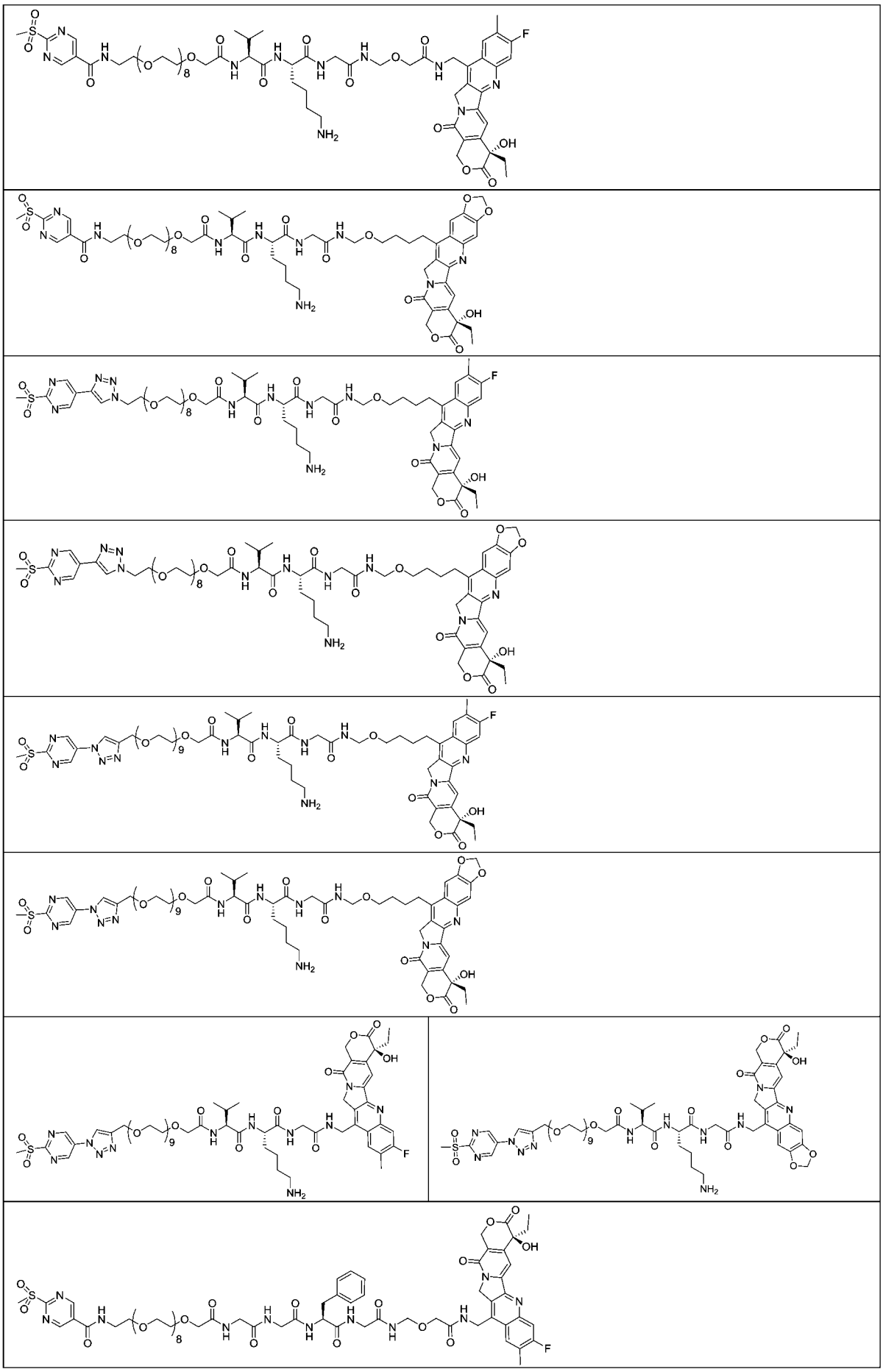


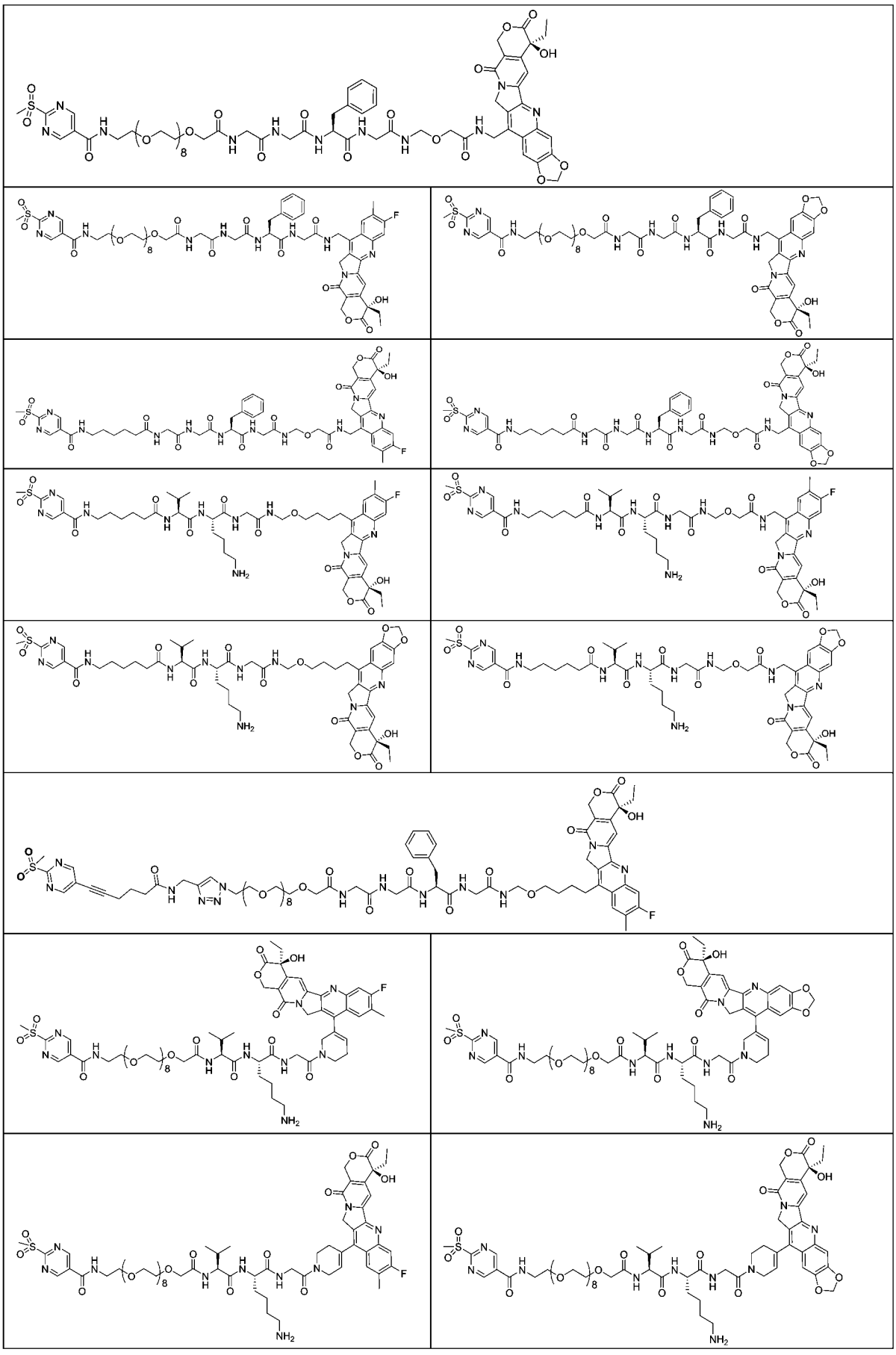


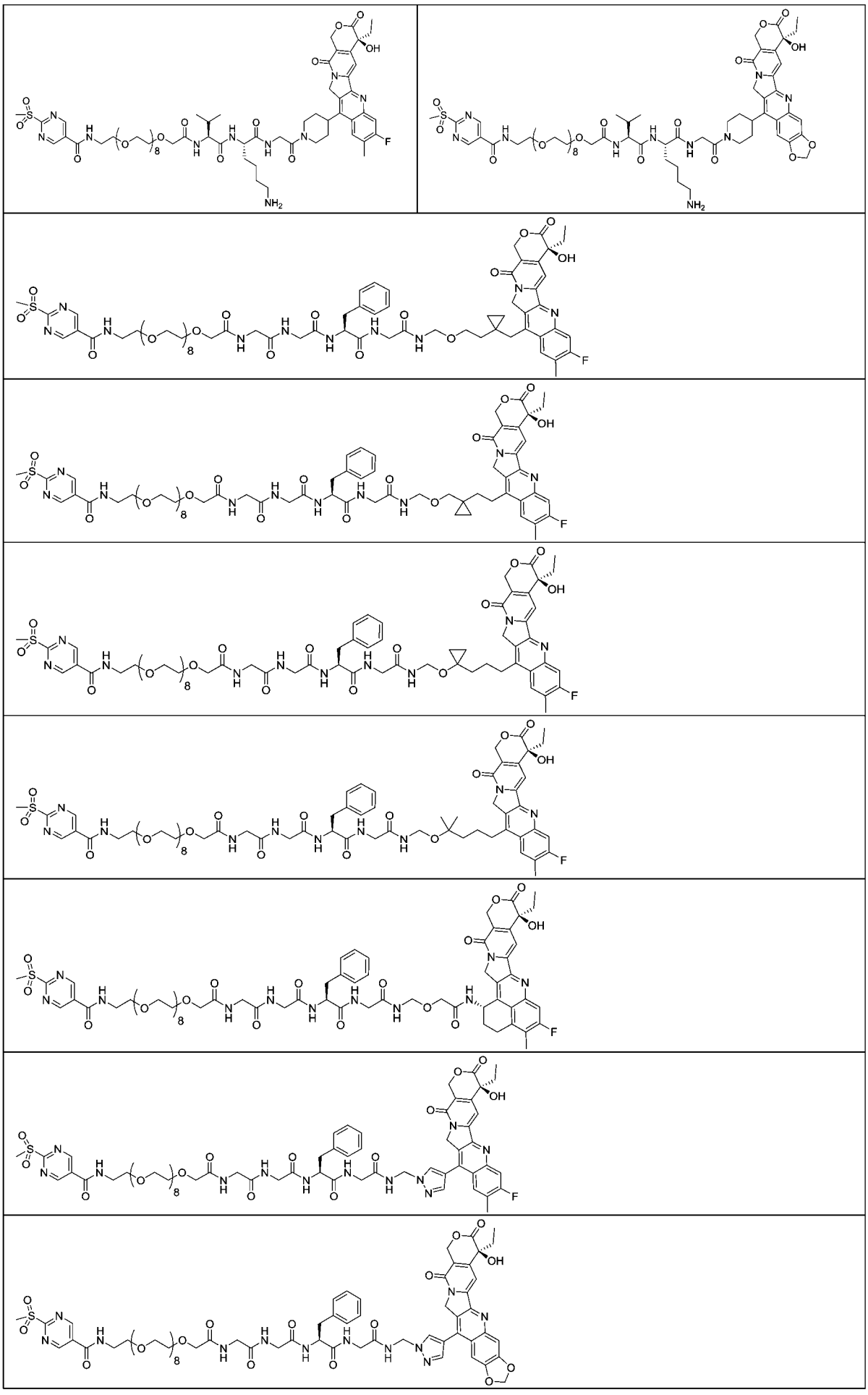


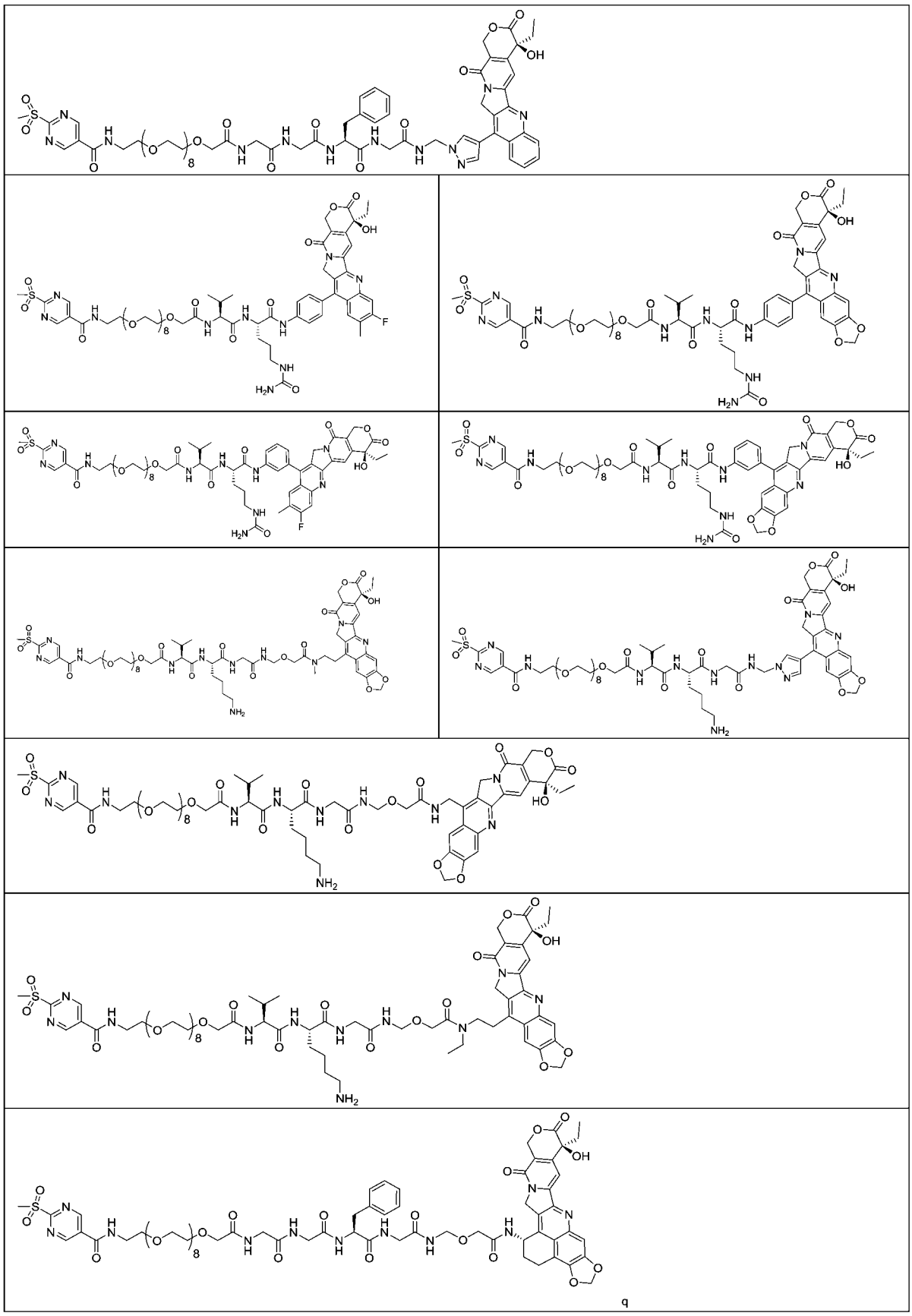




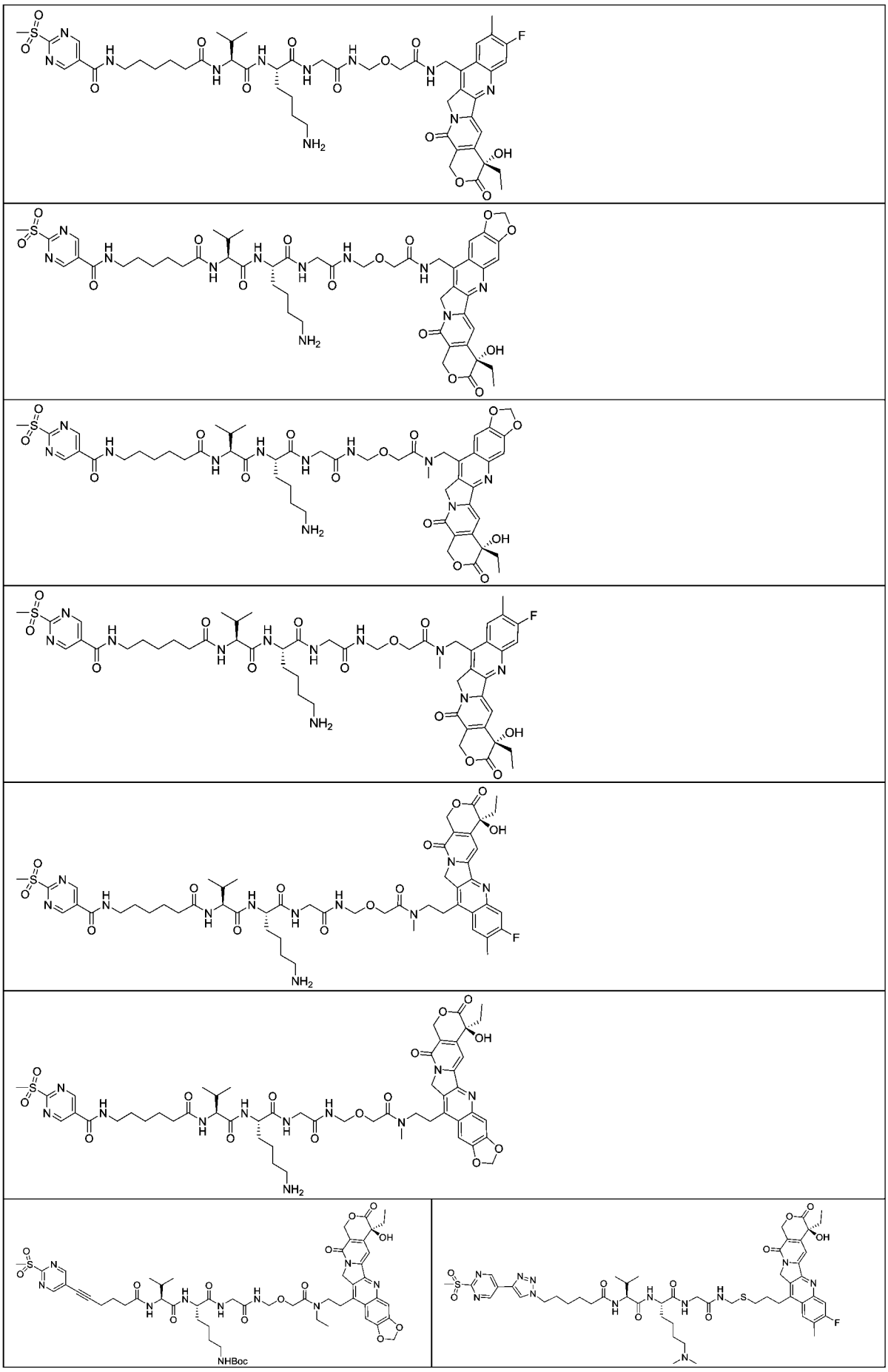


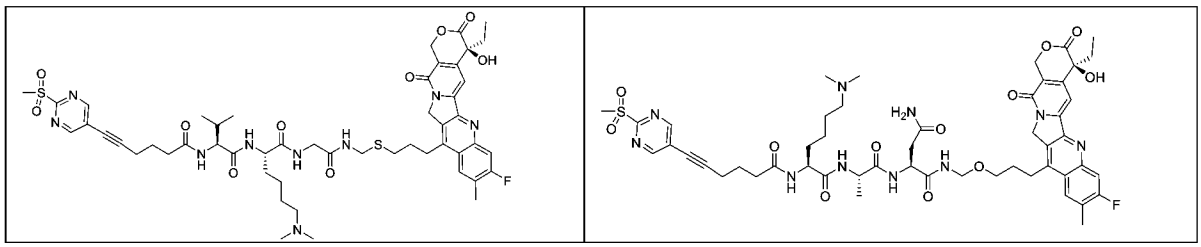






q

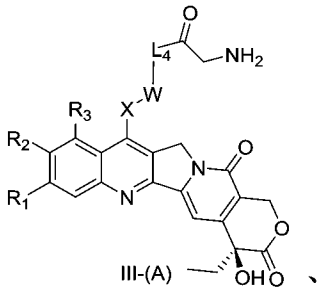




。

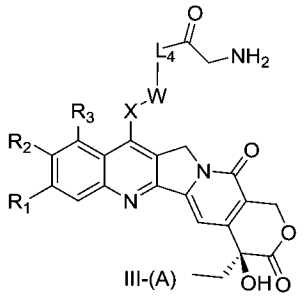
【0426】在一些實施方案中提供了化合物，其中式III所示的藥物連接體偶聯物中的L1-L2-L3單元已被部分裂解，從而留下與之鍵合的胺基酸殘基的藥物部分。

【0427】在一些實施方案中，部分釋放的游離藥物為式III-(A)的化合物：

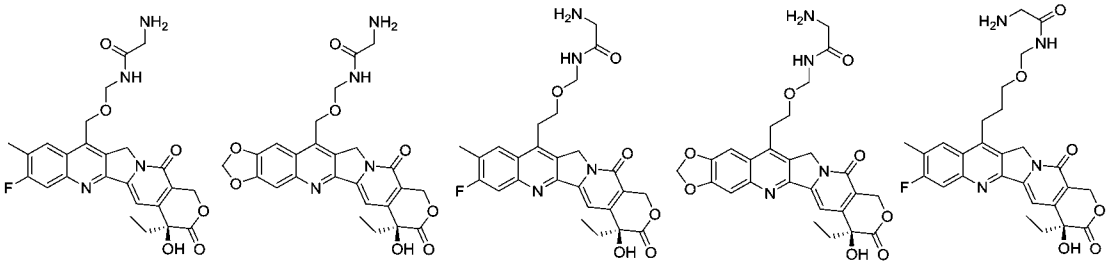


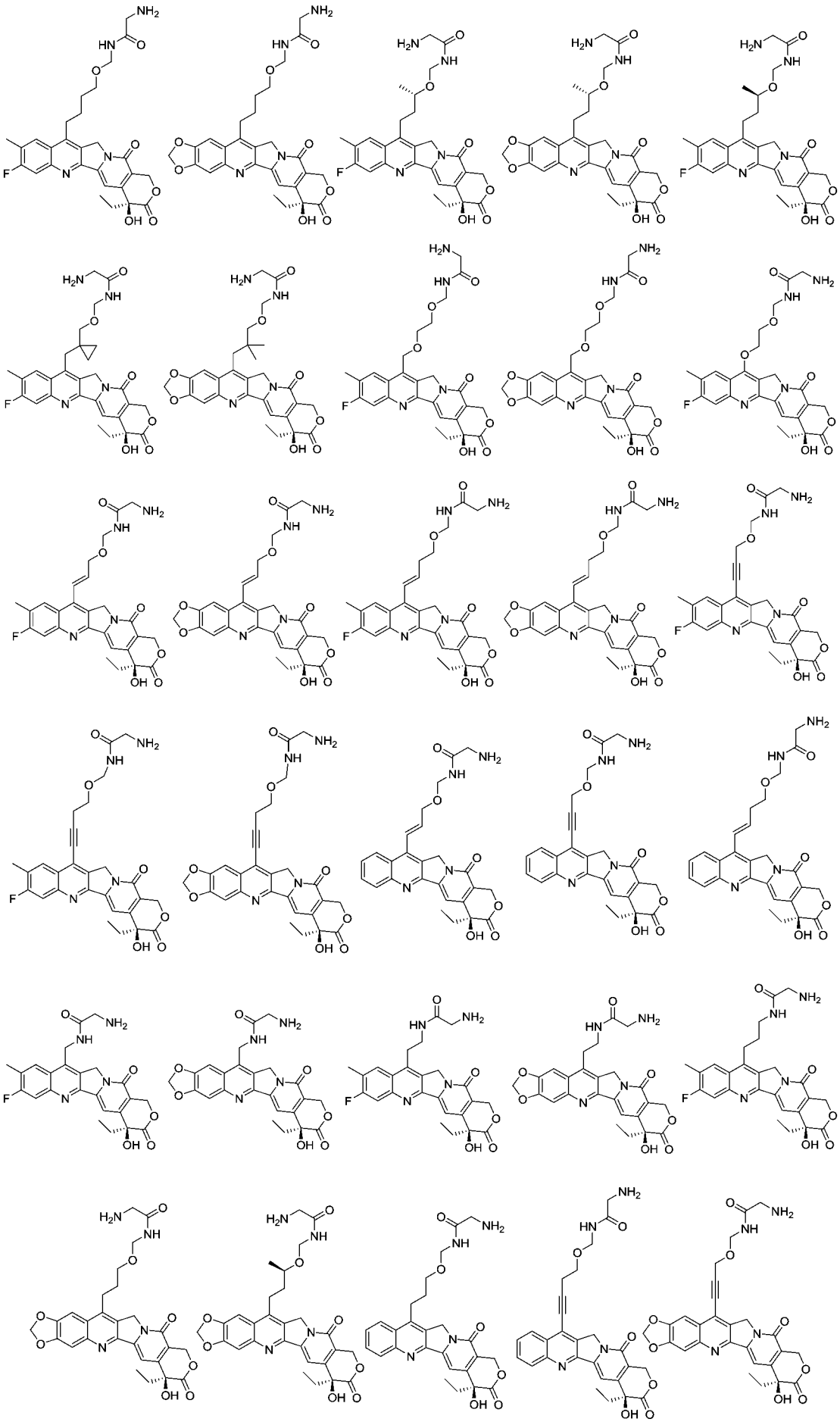
或其立體異構體或立體異構體的混合物，或其藥學上可接受的鹽，其中L_4、X、W、R_1、R_2和R_3具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

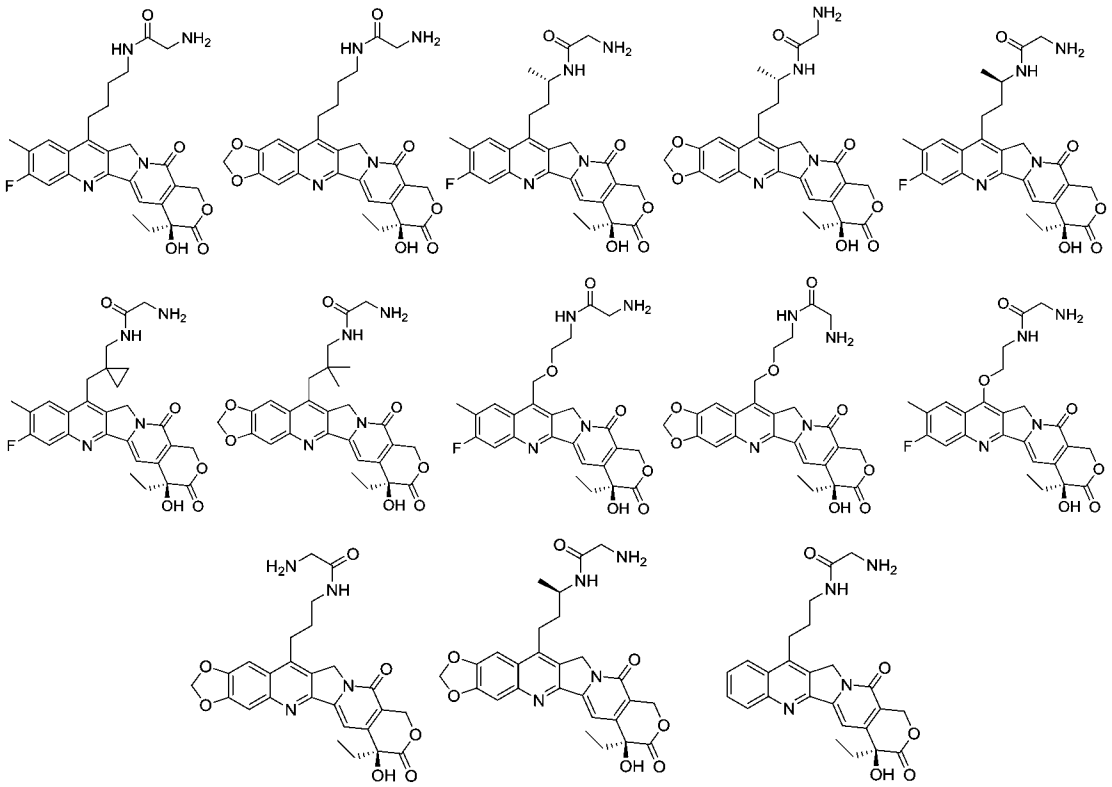
【0428】在一些實施方案中，

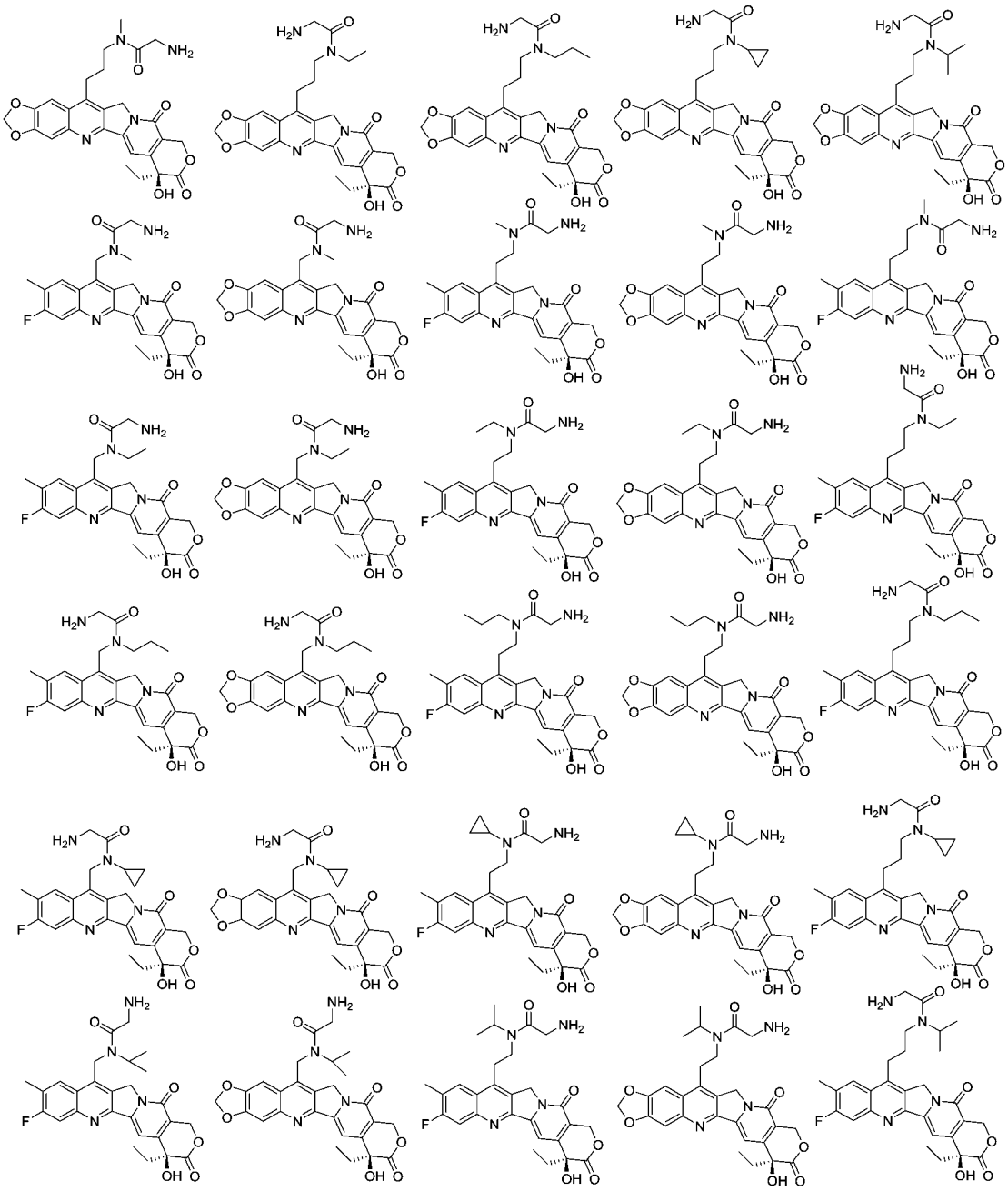


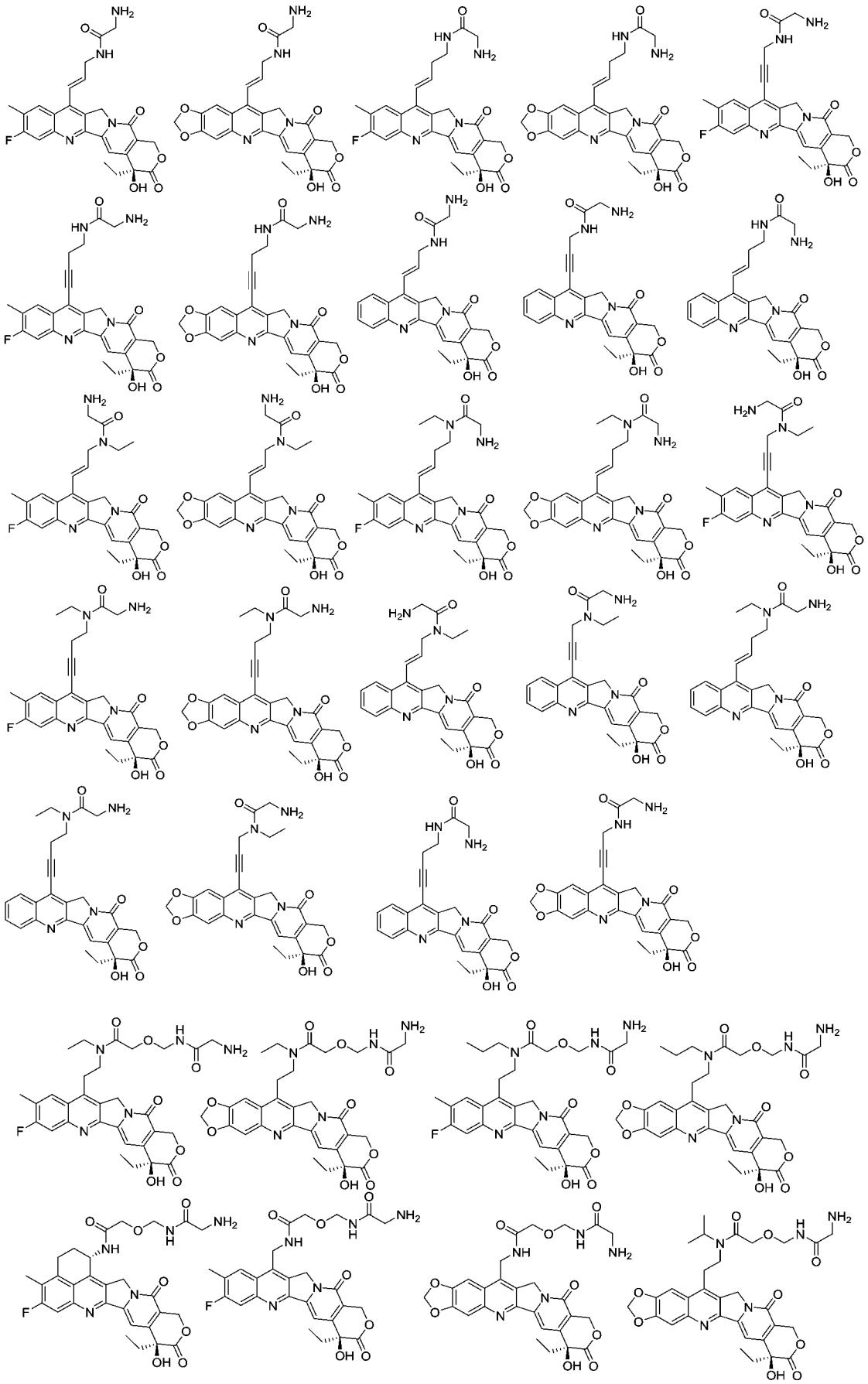
III-(A)的結構選自以下：

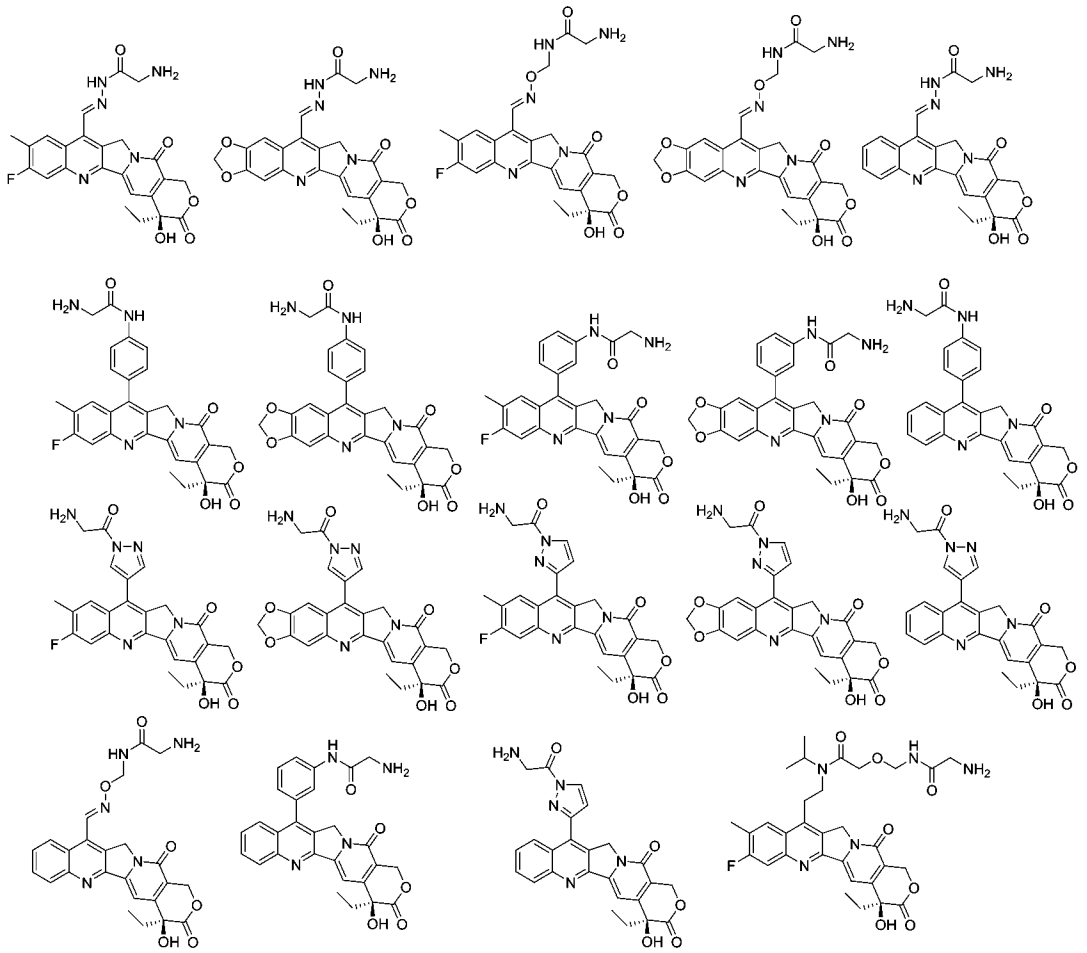




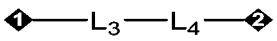






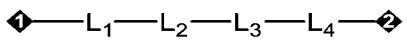


【0429】本公開還提供了一種配體藥物偶聯物中的連接體，其結構含如下所示片段：



其中，2位與生物活性分子片段相連；（1位與配體端相連，例如，當其與連接單元(例如L_2)相連，再通過延伸單元(例如L_1)與配體或靶向部分(Tb)相連；或者，當連接單元不存在時，直接與延伸單元相連，再進一步與配體相連）；

L_3、L_4的定義如本公開中任一方案所述。

【0430】在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物中的連接體，其結構如下所示： 

其中，1位與和靶點結合的配體或靶向部分相連，2位與生物活性分子片段

相連；

L_1、L_2、L_3、L_4的定義如本公開中任一方案所述；

較佳地，所述的靶點結合的配體或靶向部分和所述的生物活性分子片段的定義分別如本公開中任一方案中的Tb和D所述。

【0431】在一些實施方案中，所述連接體1位與和抗體或其抗原結合片段相連，2位與生物活性分子片段相連。

【0432】在一些實施方案中，所述連接體1位與和抗體或其抗原結合片段上的半胱胺酸或離胺酸相連，2位與生物活性分子片段相連；

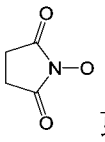
較佳地，所述的抗體或其抗原結合片段如本公開中任一方案所述。

【0433】在本公開的第四方面，本公開還提供了式III-1所示的連接體：

$$Lg—L_1—L_2—L_3—L_4—Lg1$$

III-1

Lg、L_1、L_2、L_3和L_4具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義；Lg1為和藥物分子反應時的離去基團。

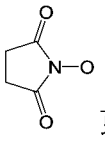
【0434】在一些實施方案中，Lg1優選為-OH、  或鹵素。

【0435】在本公開的第五方面，本公開還提供了式III-2所示的連接體：

$$Lg—L_1—L_2—L_3—Lg2$$

III-2

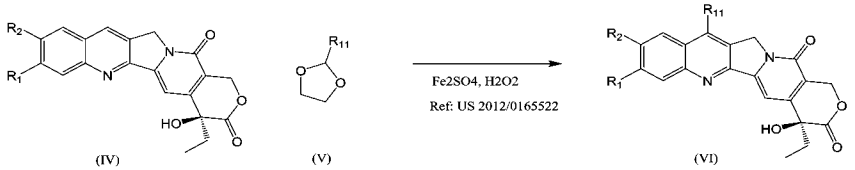
Lg、L_1、L_2和L_3具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義；Lg2為和L4或含有藥物分子的片段反應時的離去基團。

【0436】在一些實施方案中，Lg2優選為-OH、  或鹵素。

【0437】在本公開的第六方面，本公開提供了式II所示化合物（藥物分子、生物活性分子）、式III所示藥物連接體偶聯物的製備方法。

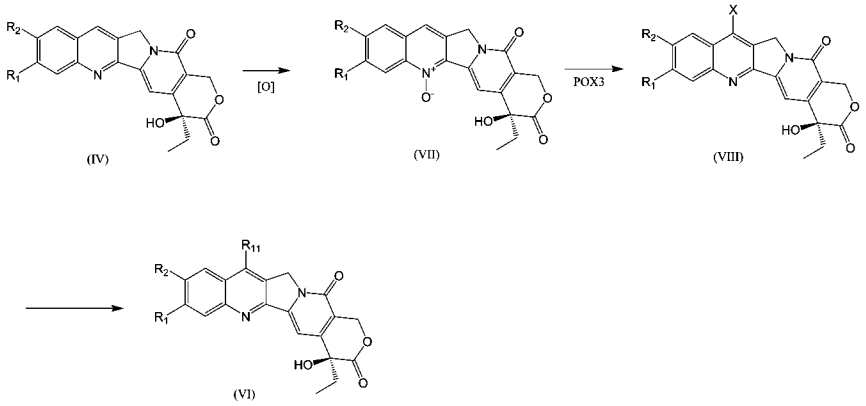
【0438】一方面，本公開提供了式II所示化合物（藥物分子、生物活性分子）的製備方法。具體地：

通式所示化合物（IV）通過和化合物（V）在鐵化合物催化下的烷基化反應或其它相關的Minisci反應可以獲得化合物（VI）。



(IV) (V) (VI)

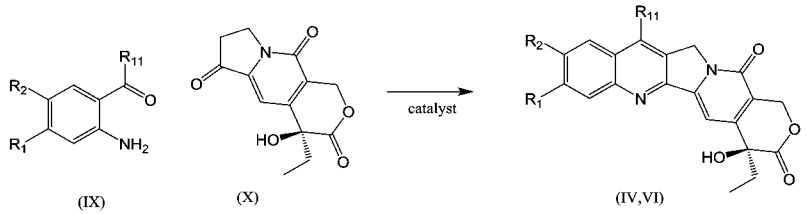
或者，化合物（IV）通過氮氧化反應生成化合物（VII），化合物（VII）通過三鹵氧磷處理後生成化合物（IV）的鹵代產物化合物（VIII）。化合物（VIII）可以通過多種形式的反應，如Heck反應，Suzuki反應，Buchwald反應，Nigishi反應，Stille反應等獲得化合物（VI）。



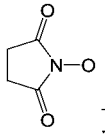
(IV) (VII) (VIII) (VI)

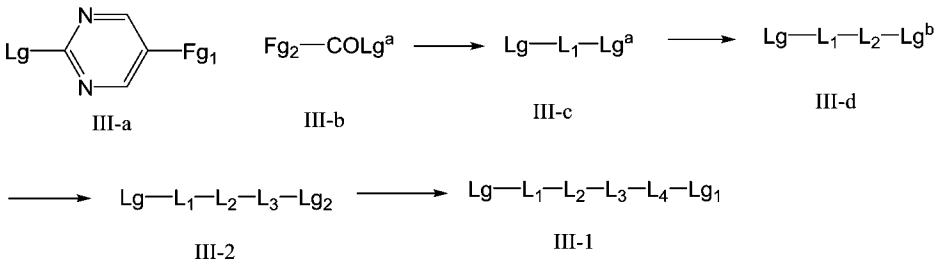
化合物（VI）中R_{11}可以通過多種化學轉化，如氧化，還原，取代等多種教科書中常見的方法合成不同的或更加複雜的分子。

或者，化合物（VI）和化合物（IV）也可以通過如下所示的化合物（IX）和化合物（X）通過關環反應獲得。



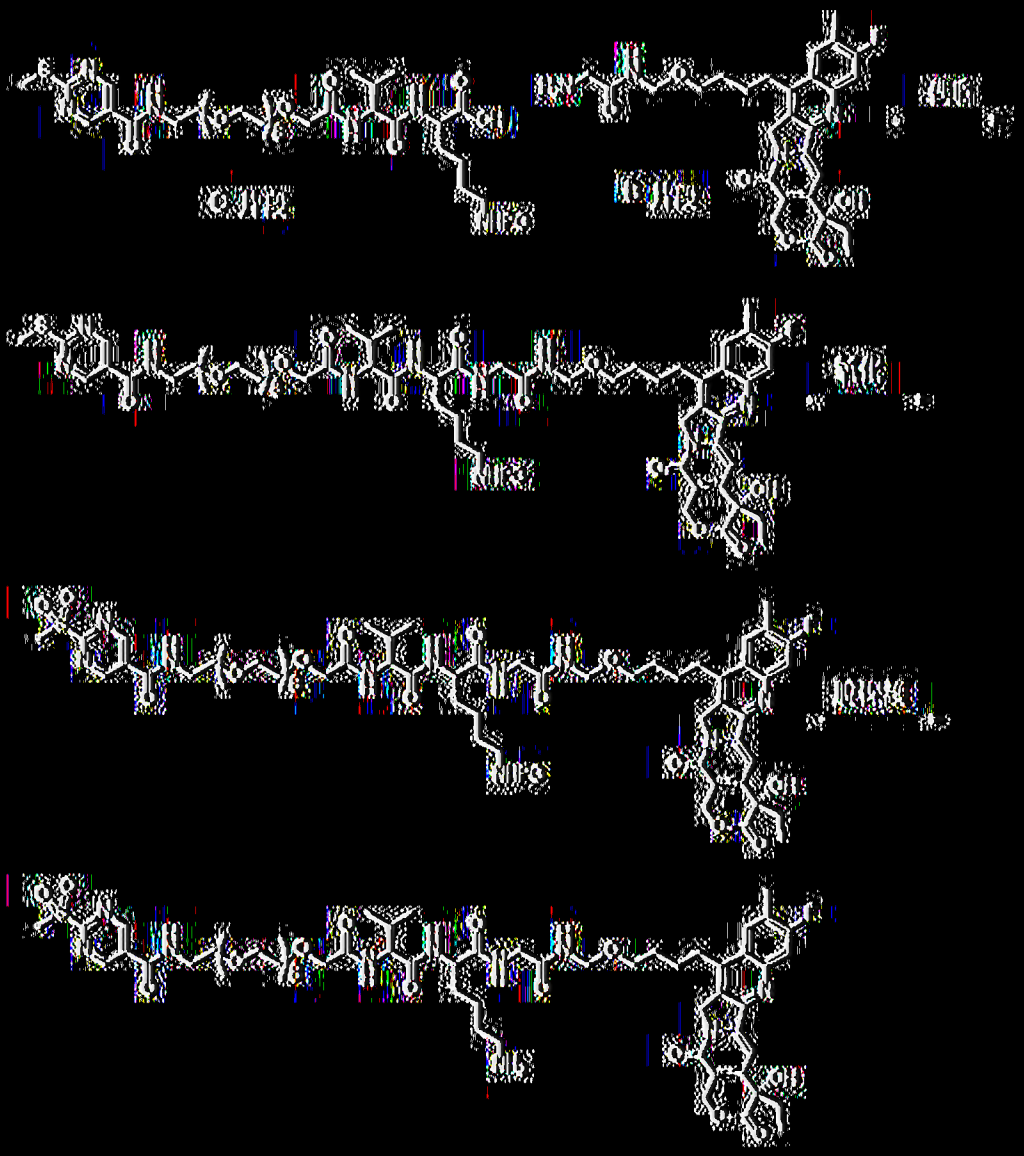
【0439】另一方面，本公開提供了式III-1和式III-2所示片段的製備方法。具體地：

化合物 III-a 通過其功能機團 Fg_1 和化合物 III-b 的功能機團 Fg_2 反應可以得到化合物 III-c， 化合物 III-c 通過其功能機團 Fg^a 可以獲得化合物 III-d，類似轉化可以獲得通式化合物 III-2 和 III-1。Lg^a，Lg^b，Lg_1，Lg_2 為可反應的離去機團，如-OH、  或鹵素等。

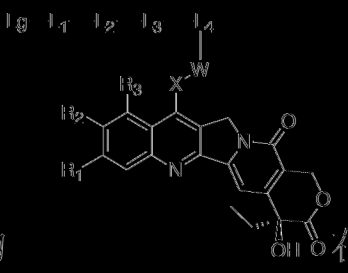


【0440】再另一方面，本公開提供了式III所示藥物連接體偶聯物的製備方法。具體地：

目標產物可以通過如下反應式所示的 B 片段和 C 片段的偶聯得到，偶聯產物經過一些常用的化學修飾，如氧化，脫保護等，即可得到通式 III 所示的藥物連接體偶聯物。



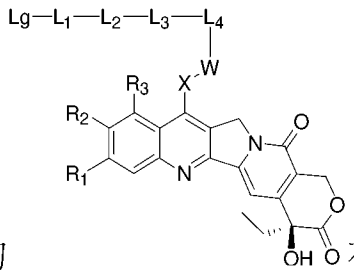
[0041] 在本公開的第七方面，本公開提供了製備前述抗體藥物偶聯物的方法，其包括：

將 Tb 與式 III 所示的藥物連接體偶聯物  在合適的溶劑和條件下進行偶聯反應；

其中：

Tb 具有上文以及本文其他各處所述的任何實施方案中所提供的含義；

R_1、R_2、R_3、X、W、L_1、L_2、L_3、L_4、Lg 具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0442】在一些實施方案中，所述方法包括將Tb與式III所示的藥物連接體偶聯物  在合適的溶劑和條件下進行偶聯反應形成C-S鍵的步驟。

【0443】在一些實施方案中，所述Tb與所述藥物連接體偶聯物的物質的量的比為1:（1-20），如1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:14、1:16、1:18、1:（10-20）、1:（12-20）、1:（14-20）、1:（16-20）或1:（18-20）。

【0444】在一些實施方案中，所述偶聯反應在水和/或有機溶劑中進行。

【0445】在一些實施方案中，所述有機溶劑選自N,N-二甲基甲醯胺、二甲基亞碸、N-甲基吡咯烷酮、腈類(例如乙腈)、醇類(例如甲醇、乙醇)或其任意組合。

【0446】在一些實施方案中，所述方法進一步包括將偶聯產物進行純化的步驟。

【0447】在一些實施方案中，通過層析方法對所述偶聯產物進行純化。

【0448】在一些實施方案中，所述層析方法包括離子交換層析、疏水層析、反相層析或親和層析中的一種或多種。

【0449】在本公開的第八方面，本公開提供了一種結合B7H3的抗體或其抗

原結合片段，所述抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR）：

【0450】SEQ ID NO:3或23所示的重鏈可變區（VH）中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體；和/或SEQ ID NO: 13或33所示的輕鏈可變區（VL）中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0451】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 3所示的VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體; 和/或 SEQ ID NO: 13所示的VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0452】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 3所示的VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體; 和/或 SEQ ID NO: 33所示的VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0453】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 23所示的VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體; 和/或 SEQ ID NO: 33所示的VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0454】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 23所示的VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體; 和/或 SEQ ID NO: 13所示的VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0455】在某些優選實施方案中，所述序列的變體為與其來源CDR相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如1個，2個或3個胺基酸的置換、缺失或添加）的CDR。

【0456】在某些優選實施方案中，所述的置換為保守置換。

【0457】優選地，所述CDR根據AbM、Chothia、Kabat或IMGT編號系統定義。

【0458】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段的VH和/或VL中包括來自人的免疫球蛋白的構架區(FR)。

【0459】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人B7H3和/或猴B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人2Ig B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人4Ig B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合猴4Ig B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人2Ig B7H3和人4Ig B7H3，並且更優先結合人4Ig B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人4Ig B7H3，而不結合人2Ig B7H3。

【0460】在一個方面，本公開提供了一種能夠結合B7H3的抗體或其抗原結合片段，所述抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL）。

【0461】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按IMGT編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:10 或與其

相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:11 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:12 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:20 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 GTF 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:22 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:30 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:31 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:32 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:40 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺

基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 GAS 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:42 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:10 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:11 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:12 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:40 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 GAS 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:42 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:30 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3

個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:31 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:32 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:20 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 GTF 的 LCDR2 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，序列為 SEQ ID NO:22 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

【0462】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按IMGT編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:12 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列為 GTF 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:22 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:12 的

HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列為 GAS 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列為 GAS 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列為 GTF 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:22 的 LCDR3。

【0463】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按Chothia編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:4 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6

或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:14 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:4 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:34 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個

或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:24 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:34 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:24 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，

2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:14 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，序列為 SEQ ID NO:16 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

【0464】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按chothia編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:4 的

HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 的 LCDR3。

【0465】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按kabat編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:7 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:17 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺

基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:27 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:37 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:7 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 或

與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:37 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:27 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:17 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的

LCDR2 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，序列為 SEQ ID NO:19 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

【0466】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按kabat編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 的 LCDR3。

【0467】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中，與前述IMGT、chothia或kabat定義的CDR相比，所述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL）中至少一個CDR含有突變，所述突變為一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如1個，2個或3個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。

【0468】優選地，本公開所述的置換為保守置換。

【0469】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的VH包含來源於人免疫球蛋白的重鏈可變區（VH）的構架區（FR），和/或所述抗體或其抗原結合片段的VL包含來源於人免疫球蛋白的輕鏈可變區（VL）的構架區（FR）。因此，在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段是人源化的。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段是全人源的。

【0470】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的VH包含來源於人免疫球蛋白的重鏈可變區（VH）的構架區（FR），和/或所述抗體或其抗原結合片段的VL包含來源於人免疫球蛋白的輕鏈可變區（VL）

的構架區（FR）。因此，在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段是人源化的。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段是全人源的。

【0471】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 人免疫球蛋白的重鏈構架區或其變體，所述變體與其所源自的胚系抗體基因編碼的胺基酸序列相比具有至多 20 個胺基酸的保守置換（例如至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的保守置換；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的保守置換）；和/或

(b) 人免疫球蛋白的輕鏈構架區或其變體，所述變體與其所源自的胚系抗體基因編碼的胺基酸序列相比具有至多 20 個胺基酸的保守置換（例如至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的保守置換；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的保守置換）。

【0472】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的人源化程度為至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

【0473】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈可變區（VH），其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列；

(ii) 與 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、

缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 輕鏈可變區（VL），其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列；

(v)與 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0474】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH，和/或, SEQ ID NO:13所示的VL。

【0475】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH，和/或, SEQ ID NO:33所示的VL。

【0476】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH，和/或, SEQ ID NO:33所示的VL。

【0477】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH，和/或, SEQ ID NO:13所示的VL。

【0478】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL.

(e) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)至(f)任一組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0479】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的重鏈包含人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8

個，9個或10個胺基酸的保守置換）。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的輕鏈包含人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。

【0480】在一些實施方案中，恆定區被改變，例如被突變，以修飾抗B7H3抗體分子的性質（例如改變下列中的一個或多個特性：Fc受體結合、抗體醣基化、半胱胺酸殘基的數目、效應細胞功能或補體功能）。可以通過將抗體恆定區中的至少一個胺基酸殘基替換為不同殘基，產生功能改變，例如，改變抗體對效應子配體（如FcR或補體C1q）的親和力，從而改變效應子功能（例如降低）。抗體的Fc區介導幾種重要的效應子功能，例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

【0481】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段具有重鏈恆定區（CH），其選自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重鏈恆定區；特別地選自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重鏈恆定區，更特別地選自IgG1（例如是人IgG1）的重鏈恆定區。在一些實施方案中，人IgG1重鏈恆定區如SEQ ID NO:43所示。在一些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段具有輕鏈恆定區，其選自例如κ或λ輕鏈恆定區，優選κ輕鏈恆定區（例如人κ輕鏈恆定區）。在一些實施方案中，輕鏈恆定區具有如SEQ ID NO:44所示的序列。

【0482】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID

NO:43所示的CH或其變體，所述變體與SEQ ID NO:43相比具有至多20個胺基酸的保守置換（例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換），或者與SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

【0483】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含輕鏈恆定區或其變體。在一些實施方案中，所述輕鏈恆定區包含κ輕鏈恆定區。在一些實施方案中，所述輕鏈恆定區包含SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與SEQ ID NO:44相比具有至多20個胺基酸的保守置換（例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換），或者與SEQ ID NO:16相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;

【0484】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:43所示的重鏈恆定區（CH）和SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）。

【0485】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii)與(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 輕鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:13 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0486】在某些實施方案中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0487】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii)與(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 輕鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:33 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、

至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0488】在某些實施方案中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0489】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:45 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:46 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）

的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0490】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:47 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:48 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30

個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0491】在某些實施方案中，本公開的抗體是嵌合抗體，人源化抗體或全人源抗體。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段選自 scFv、Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv片段、二硫鍵連接的Fv(dsFv)、雙抗體(diabody)。

【0492】在某些實施方案中，本公開的抗體是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL.

(e) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至

少 99%的序列同一性；或

(f) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0493】在某些實施方案中，本公開的抗體是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(i) SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)中所述的置換是保守置換。

【0494】在某些實施方案中，本公開的抗體是scFv。

【0495】在某些實施方案中，本公開的scFv包含SEQ ID NO:1或2所示的序列。

【0496】抗體衍生物

【0497】本公開的抗體或其抗原結合片段可進行衍生化，例如被連接至另一個分子（例如另一個多肽或蛋白）。通常，抗體或其抗原結合片段的衍生化（例如，標記）不會對其與B7H3（特別是人B7H3）的結合產生不利影響。因此，本公開的抗體或其抗原結合片段還意欲包括此類衍生化的形式。例如，可以將本公開的抗體或其抗原結合片段連接（通過化學偶合、基因融合、非共價連接或其它方式）於一個或多個其它分子基團，例如另一個抗體（例如，形成雙特異性抗體），檢測試劑，藥用試劑，和/或能夠介導抗體或其抗原結合片段與另一個分子結合的蛋白或多肽（例如，抗生物素蛋白或多組胺酸標籤）。

【0498】一種類型的衍生化抗體（例如，雙特異性抗體）是通過交叉連接2個或更多個抗體（屬於同一類型或不同類型）而產生的。獲得雙特異性抗體的方法是本領域公知的，其實例包括但不限於，化學交聯法、細胞工程法（雜交瘤法）或基因工程法。

【0499】另一種類型的衍生化抗體是標記的抗體。例如，可以將本公開的抗體或其抗原結合片段連接至可檢測的標記。本公開所述的可檢測的標記可以是可通過螢光、光譜、光化學、生物化學、免疫學、電學、光學或化學手段檢測的任何物質。這類標記是本領域熟知的，其實例包括但不限於，酶（例如，辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如，3H、125I、35S、14C或32P）、螢光染料（例如，異硫氰酸螢光素（FITC）、螢光素、異硫氰酸四甲基羅丹明（TRITC）、藻紅蛋白（PE）、德克薩斯紅、羅丹明、量子點或花菁染料

衍生物（例如Cy7、Alexa 750））、吖啶酯類化合物、磁珠（例如，Dynabeads®）、測熱標記物例如膠體金或有色玻璃或塑膠（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳膠，等）珠、以及用於結合上述標記物修飾的親和素（例如，鏈黴親和素）的生物素。教導該標記物的使用的專利包括，但不限於，美國專利3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；及4,366,241（全部通過引用併入本文）。如上所述的可檢測的標記可通過本領域已知的方法檢測。例如，放射性標記可使用攝影膠片或閃爍計算器檢測，螢光標記物可使用光檢測器檢測，以檢測發射的光。酶標記物一般通過給酶提供基質及檢測通過酶對基質的作用產生的反應產物來檢測，及測熱標記物通過簡單視覺化著色標記物來檢測。在某些實施方案中，此類標記能夠適用於免疫學檢測（例如，酶聯免疫測定法、放射免疫測定法、螢光免疫測定法、化學發光免疫測定法等）。在某些實施方案中，可通過不同長度的連接體（linker）將如上所述的可檢測的標記連接至本公開的抗體或其抗原結合片段，以降低潛在的位阻。

【0500】此外，本公開的抗體或其抗原結合片段還可以用化學基團進行衍生，例如聚乙二醇（PEG），甲基或乙基，或者醣基。這些基團可用於改善抗體的生物學特性，例如增加血清半衰期。

【0501】本公開的抗原結合片段可以通過水解完整的抗體分子獲得（參見Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)）。另外，這些抗原結合片段也可以直接由重組宿主細胞產生（reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)）。比如，Fab'片段可

以直接從宿主細胞中獲得；可以將Fab'片段化學偶聯形成$F(ab')_2$片段(Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。另外，Fv、Fab或$F(ab')_2$片段也可以直接從重組宿主細胞培養液中直接分離得到。本領域的具有通常知識者完全知曉製備這些抗原結合片段的其它技術。

【0502】本公開的IgG同型對照抗體是本領域的具有通常知識者完全知曉並可以購買或製備獲得的。例如人抗雞蛋溶酶體抗體(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG，anti-HEL，如human IgG1，簡稱hIgG1)，其序列來自於Acierno等人發表的Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies研究中Fab F10.6.6序列的可變區序列(Acierno等人.J Mol Biol.2007；374(1):130-46.)。製備方法如下：委託南京金斯瑞生物對human IgG抗體的重輕鏈(全序列或可變區)基因進行胺基酸的密碼子優化和基因合成，參照《分子克隆實驗指南(第三版)》介紹的標準技術，採用PCR、酶切、DNA膠回收、連接轉化、菌落PCR或酶切鑒定等標準的分子克隆技術將重輕鏈基因分別亞克隆到哺乳動物表達系統的抗體重鏈表達載體和抗體輕鏈表達載體，並進一步對重組表達載體的重輕鏈基因進行測序分析。測序驗證正確後，大量製備去內毒素級別的表達質粒並將重輕鏈表達質粒暫態共轉染HEK293細胞進行重組抗體的表達。培養7天後收集細胞培養液，進行rProtein A柱(GE)親和純化，收穫的抗體樣品用SDS-PAGE和SEC-HPLC標準分析技術對其進行品質鑒定。

【0503】在第九方面，本公開提供了一種多特異性抗體，其包含本公開第八方面任一項所述的抗體或其抗原結合片段，和另外的抗體或其片段或抗體類似物。

【0504】在某些實施方案中，所述多特異性抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體或四特異性抗體。

【0505】因此，在第十方面，本公開提供了一種分離的核酸分子，包含編碼本公開的抗體或其抗原結合片段、或其重鏈可變區和/或輕鏈可變區、或其一個或多個CDR的核苷酸序列。根據本領域已知的密碼子簡併性，在某些實施方案中，所述核苷酸序列是可以根據密碼子簡併性進行替換的。在某些實施方案中，所述核苷酸序列是密碼子最優化的。

【0506】在某些實施方案中，本公開所述分離的核酸分子包含：（i）分別編碼本公開的抗體或其抗原結合片段的重鏈可變區和輕鏈可變區的第一核酸和第二核酸，或（ii）分別編碼本公開的抗體或其抗原結合片段的重鏈可變區和重鏈恆定區的第一核酸，和輕鏈可變區和輕鏈恆定區的第二核酸，或（iii）分別編碼本公開的抗體或其抗原結合片段的重鏈和輕鏈的第一核酸和第二核酸。在某些實施方案中，所述第一核酸和第二核酸包含與上述（i）-（iii）中任一第一核酸和第二核酸的簡並序列或基本上相同序列的核酸。在某些實施方案中，所述簡並序列或基本上相同序列指與（i）-（iii）中所述核酸分子相比具有至少大約85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列或具有一個或更多個核苷酸取代的序列，或相差不超過3、6、15、30或45個核苷酸的序列。

【0507】在第十一方面，提供了一種載體（例如克隆載體或表達載體），其包含本公開的分離的核酸分子。在某些實施方案中，本公開的載體是例如質粒，粘粒，噬菌體，慢病毒等。在某些實施方案中，所述載體能夠在受試者（例如哺乳動物，例如人）體內表達本公開的抗體或其抗原結合片

段。

【0508】第十二方面，提供了一種宿主細胞，其包含本公開的分離的核酸分子或本公開的載體。宿主細胞可以是真核細胞（例如哺乳動物細胞、昆蟲細胞、酵母細胞）或原核細胞（例如大腸桿菌）。合適的真核細胞包括但不限於NS0細胞、Vero細胞、Hela細胞、COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞、BHK細胞、和MDCKII細胞。適宜的昆蟲細胞包括但不限於Sf9細胞。在某些實施方案中，本公開的宿主細胞是哺乳動物細胞，例如CHO（例如CHO-K1、CHO-S、CHO DXB11、CHO DG44）。

【0509】第十三方面，提供了製備本公開的抗體或其抗原結合片段、或多特異性抗體的方法，其包括，在允許所述抗體或其抗原結合片段、或多特異性抗體表達的條件下，培養本公開的宿主細胞，和從培養的宿主細胞培養物中回收所述抗體或其抗原結合片段。

【0510】第十四方面，提供一種抗體-藥物偶聯物，其中抗體為上述抗B7H3的抗體, 其通過連接體與偶聯部分連接。所述偶聯部分選自：可檢測的標記、放射性同位素、螢光物質、發光物質、有色物質、酶、聚乙二醇（PEG）、核素、核酸、小分子毒素、具有結合活性多肽、蛋白、受體、配體，以及其它抑制腫瘤細胞生長、促進腫瘤細胞凋亡或壞死的活性物質。

【0511】在一些實施例中，抗體-藥物偶聯物包含下式的抗B7H3抗體藥物綴合物(B7H3-ADC)：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)n,$$

其中：

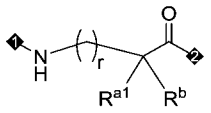
Ab 是在第八方面抗體或其抗原結合片段，並且；

D 是小分子毒素藥物部分；

L 是鍵或連接分子，其共價連接 Ab 和 D；

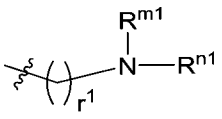
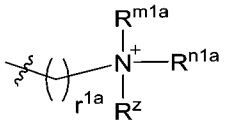
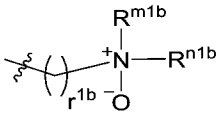
n 是 1-16 之間的整數，且表示共價連接至 Ab 的 L-D 的數目。

【0512】在一些實施例中，抗體-藥物偶聯物的L包含選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽；所述的胺基酸殘基選自天然胺基酸殘基、非天然胺基酸殘基、AA^1所示胺基酸殘基或其立體異構體；



AA^1

AA^1 所示的胺基酸殘基中：

R^{a1} 和 R^b 各自獨立地選自 H、  、  和  ；

或者，R^{a1} 與 R^b 和與它們共同相連的碳原子一起形成 4-10 元雜環，所述的 4-10 元雜環中，雜原子選自 O、N 和 S 中的 1 個、2 個、3 個或 4 個；所述的 4-10 元雜環任選地被一個或多個 R^0 所取代；

r、r^1、r^{1a} 和 r^{1b} 各自獨立地為 0 到 20 的任意整數；

R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b} 和 R^{n1b} 各自獨立地為 H、C_{1-6} 烷基、C_{3-6} 環烷基或-$COOR^{x1}$，其中，R^{x1} 為 C_{1-6} 烷基；

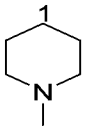
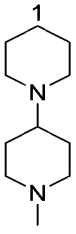
或者，R^{m1} 和 R^{n1}、R^{m1a} 和 R^{n1a}、以及 R^{m1b} 和 R^{n1b} 和與它們共同相連的氮原子一起，形成 4-10 元雜環，所述的 4-10 元雜環中，雜原子選自 O、N 和 S 中的 1 個、2 個、3 個或 4 個；所述的 4-10 元雜環任選地被一個或多個 $R^{0'}$

所取代；

R^z選自 C_{1-6}烷基；

R^0、$R^{0'}$各自獨立地選自 C_{1-6}烷基、C_{3-6}環烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$和任選被 C_{1-6}烷基取代的 4-10 元雜環基；所述的 4-10 元雜環中，雜原子選自 O、N 和 S 中的 1 個、2 個、3 個或 4 個；

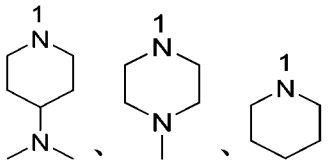
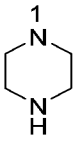
R^{m2}和 R^{n2}各自獨立地選自 H 和 C_{1-6}烷基。

【0513】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基中，R^{a1}與R^b和與它們共同相連的碳原子一起形成5-6元雜環，所述的5-6元雜環中，雜原子為N，雜原子數為1個或2個；所述的5-6元雜環任選地被一個或多個R^0所取代。所述的5-6元雜環優選為哌啶環或哌咔環，進一步優選為哌啶環，例如  或  ，1號碳原子為與R^{a1}和R^b共同相連的碳原子。

【0514】在一些實施方案中，r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自獨立地為0、1、2、3、4或5；優選為地，r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自獨立地為0或4；進一步優選為地，r為0，r^1、r^{1a}和r^{1b}為4；或者r為4，r^1、r^{1a}和r^{1b}為0。

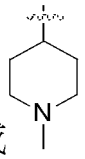
【0515】在一些實施方案中，r、r^1、r^{1a}和r^{1b}不同時為0。

【0516】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b}和R^{n1b}各自獨立地為H、C_{1-6}烷基或$-COOR^{x1}$，其中，R^{x1}為C_{1-6}烷基；優選為各自獨立地為H、甲基、乙基、正丙基、$-COOCH_3$、$-COOCH_2CH_3$、$-COOCH_2CH_2CH_3$、$-COOCH(CH_3)_2$、$-COOC(CH_3)_3$或$-COOCH_2CH_2CH_2CH_3$。

【0517】在一些實施方案中，R^{m1}和R^{n1}、R^{m1a}和R^{n1a}、以及R^{m1b}和R^{n1b}和與它們共同相連的氮原子一起形成5-6元雜環，所述的5-6元雜環中，雜原子選自1個或2個N原子；所述的5-6元雜環任選地被一個或多個$R^{0'}$所取代；所述的5-6元雜環優選為哌啶環或哌啡環；進一步優選為  、、或  ，1號氮原子為與R^{m1}和R^{n1}共同相連的氮原子。

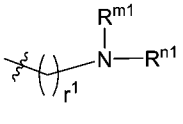
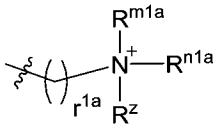
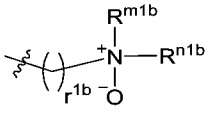
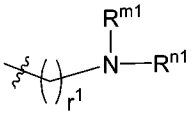
【0518】在一些實施方案中，R^{z}優選為C_{1-6}烷基；更優選為甲基。

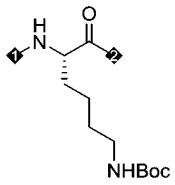
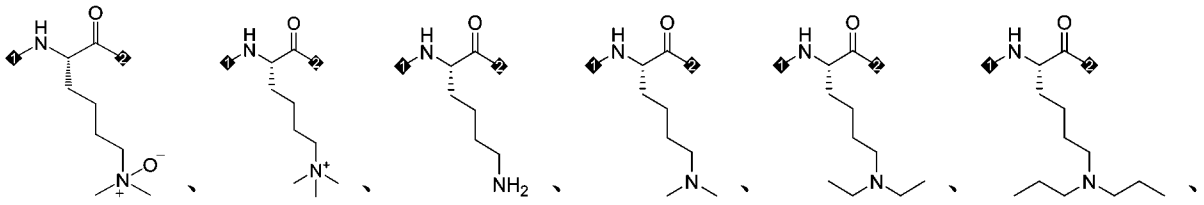
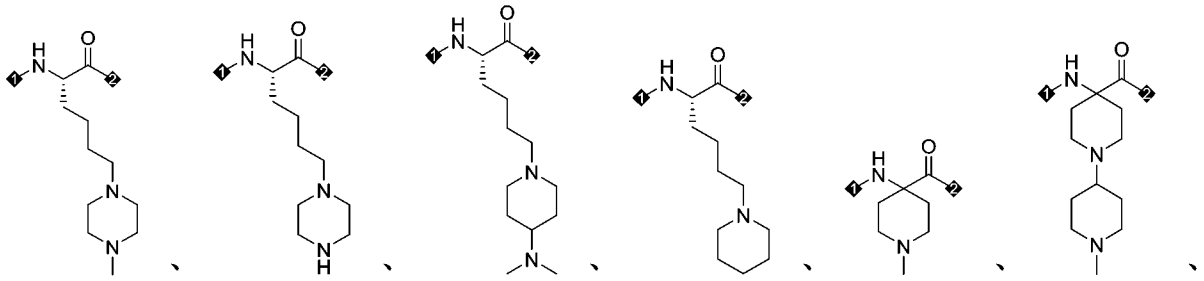
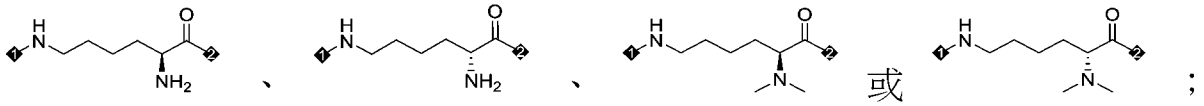
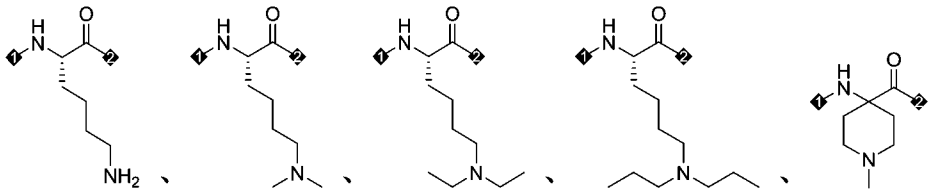
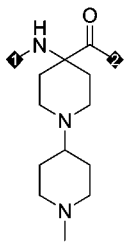
【0519】在一些實施方案中，R^{0}和$R^{0'}$各自獨立地為C_{1-6}烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$或任選被C_{1-6}烷基取代的5-6元雜環基；所述的5-6元雜環中，雜原子選自1個或2個N原子。

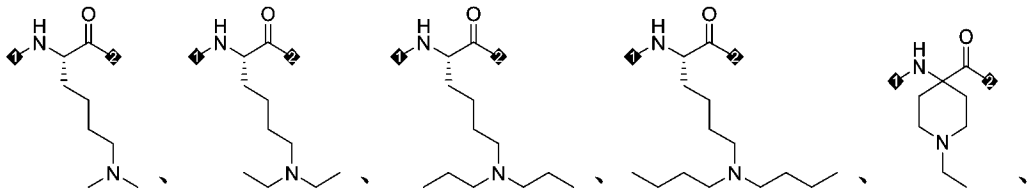
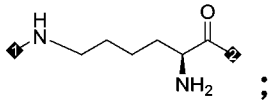
【0520】在一些實施方案中，R^{0}優選為C_{1-6}烷基或被C_{1-6}烷基取代的5-6元雜環基，所述的5-6元雜環基為哌啶基或哌啡基；進一步優選為甲基或被甲基取代的哌啶基；例如甲基或  。

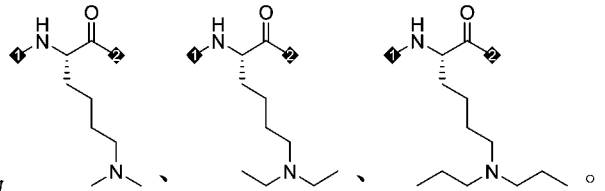
【0521】在一些實施方案中，$R^{01'}$各自獨立地優選為C_{1-6}烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$或任選被C_{1-6}烷基取代的5-6元雜環基；所述的5-6元雜環中，雜原子為1個或2個N；進一步優選為C_{1-6}烷基或$-NR^{m2}R^{n2}$；更優選為甲基或$-NR^{m2}R^{n2}$，其中，R^{m2}和R^{n2}各自獨立地優選為H或C_{1-6}烷基，更優選為甲基。

【0522】在一些實施方案中，$R^{0'}$優選為C_{1-6}烷基或$-NR^{m2}R^{n2}$；R^{m2}和R^{n2}各自獨立地優選為H或C_{1-6}烷基（例如甲基）。

【0523】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基中，R^{a1}和R^b中任一個為H，另一個為  、  和  ；優選為地，R^{a1}和R^b中的任一個為H，另一個選自  。

【0524】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基優選為  、  、  、  或；進一步優選為  、  或；

更優選為  、  ；

最優選為  。

【0525】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自：微管阻斷藥物，DNA損傷藥物，Bcl-xL抑制劑等。

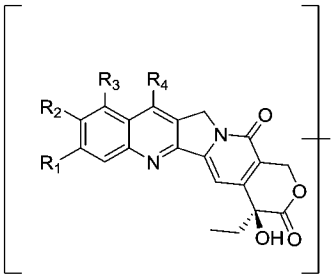
【0526】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自：金盞花素Auristatins（例如MMAF，MMAE），美登素衍生物（例如DM1，DM4），微管溶素，隱粘菌素，抗有絲分裂抑制劑，吡咯苯並氮卓類和吲哚氯苯並氮卓類，杜卡黴素，喜樹鹼, 卡奇黴素等。

【0527】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自喜樹鹼（CPT）及其衍生物。

【0528】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自拓撲異構酶I抑制劑。

【0529】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自: SN-38, DXd。

【0530】在一些實施方案中，所述抗體-藥物偶聯物的，D為具有式II所示的藥物單元：



II 、

其中，

R_1 為 H 或 F，

R_2 為 H 或甲基；

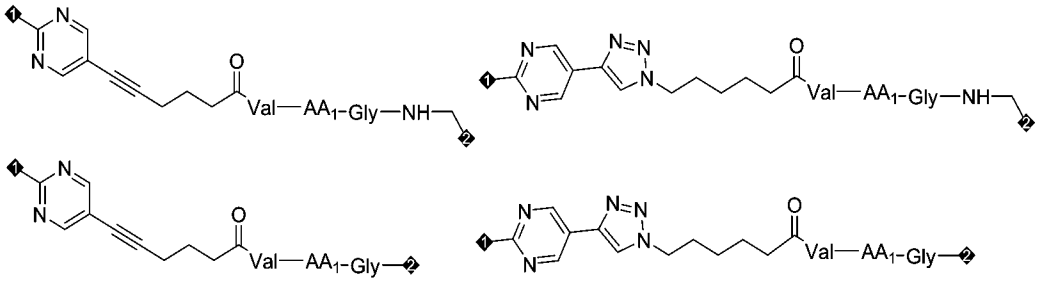
或者 R1 和 R2 和與其相連的碳原子一起形成 ；

R_3 為 H；

R_4 選自 H、-(C1-C4 烷基)-OH，-(C1-C4 烯基)-OH，-(C1-C4 烷基)-NH2，或-(C1-C4 烯基)-NH2；

其中 L 通過 D 上存在的羥基或胺基連結。

【0531】在一些實施方案中，所述抗體-藥物偶聯物的L選自；

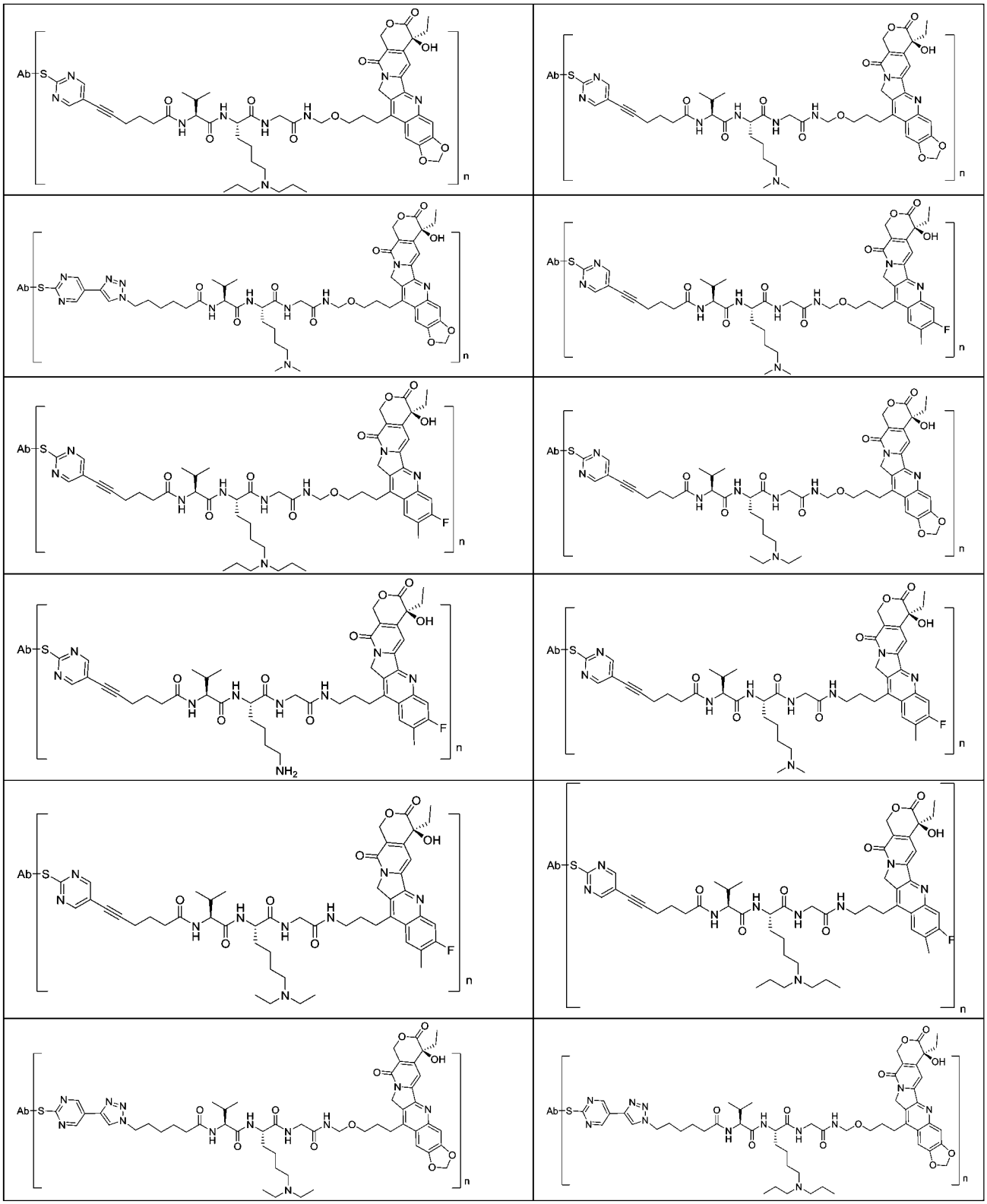


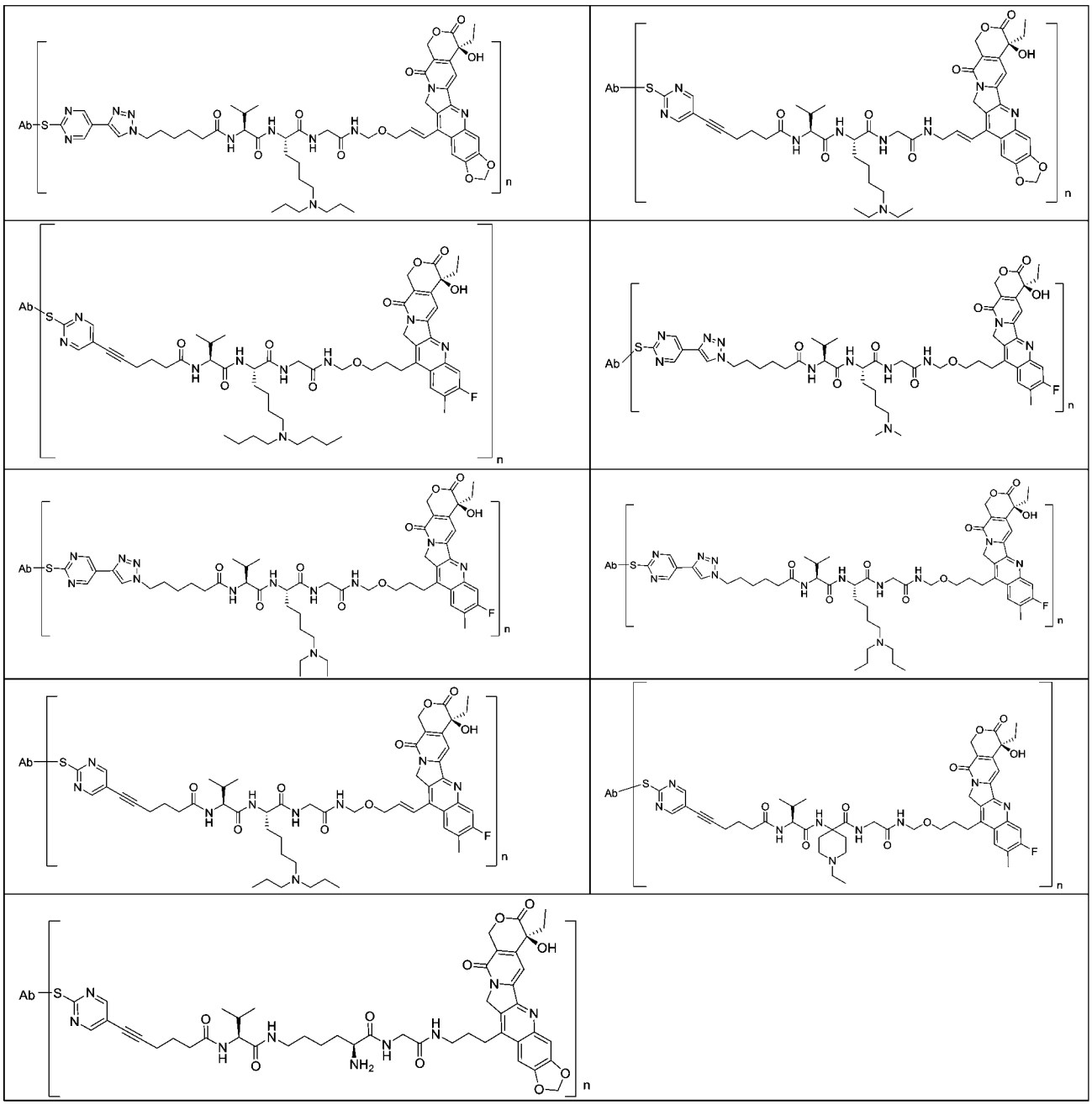
其中，1位與Ab相連，2位與D相連；AA1如上文所定義。

【0532】另外，還需要說明的是，本發明所屬技術領域具有通常知識者可以理解的是，L是與打開二硫鍵（例如，通過還原劑TCEP還原二硫鍵可以打開二硫鍵，生成巯基-SH）後Ab（如抗體）自身所含有巯基進行連接，也就是說，L與Ab之間的-S-並非另外再外接的硫原子。例如， 中，-S-並非另外外接的硫原子，而是打開雙硫鍵後的Tb自身所含有巯基與L進行連

接後形成的-S-。

【0533】在一些優選的實施方案中，所述抗體-藥物偶聯物，選自：





其中Ab為B7H3抗體1D1-01或2E3-02，n為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16，q優選1、2、3、4、5、6、7、8。

【0534】在本公開的第十五方面，本公開提供了一種配體藥物偶聯物，其包含本公開上前述的配體藥物偶聯物或前述的抗體-藥物偶聯物，所述的配體藥物偶聯物具有兩種或多種q值，所述的抗體-藥物偶聯物具有兩種或多種n值。所述配體藥物偶聯物是指包含異質DAR分佈的配體藥物偶聯物或抗體-藥物偶聯物(ADC)。

【0535】在一些實施方案中，當所述的配體藥物偶聯物中的一種q值或n值的配體藥物偶聯物占大部分時，q值或n值和DAR接近。

【0536】在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物中的藥物與抗體的比例（DAR）選自1-10中的整數或小數。

【0537】在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物中的藥物與抗體的比例（DAR）選自2、2.5、3、3.5、4、4.5,5、5.5、6、6.5、7、7.2、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.7、8.9和9。

【0538】在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物ADC含有具有1至8的DAR的分佈的ADC，例如，1.5、2、4、6、和8(即，1.5、2、4、6、 和8的載藥種類)。值得注意的是，可以產生降解產物，使得所述的配體藥物偶聯物中也可以包含1、3、5和7的DAR。此外，所述的配體藥物偶聯物中的ADC也可具有大於8的DAR。所述的配體藥物偶聯物由鏈間二硫化物還原然後偶聯產生。在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物包含如下兩者：DAR為4或更低(即，載藥種類為4或更低)的所述的配體藥物偶聯物以及DAR為6或更高(即，載藥種類為6或更高)的所述的配體藥物偶聯物。

【0539】在另一個方面，提供了本公開的抗體或其抗原結合片段在製備試劑盒中的用途，所述試劑盒用於檢測B7H3在樣品中的存在或其水準。在另一個方面，本公開提供了診斷性或治療性試劑盒，其包括一個或多個以下物質：本公開所述的抗體或其抗原結合片段、核酸、載體、宿主細胞、多特異性抗體、綴合物或者藥物組合物。可選地，所述診斷性或治療性試劑盒還包括使用說明書。

【0540】在本公開的第十六方面，本公開提供了藥物組合物，其包含物質

A，以及任選的一種或多種藥用輔料；所述的物質A為前述的配體藥物偶聯物、或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物、或前述的抗體或其抗原結合片段、核酸分子、載體、宿主細胞、多特異性抗體、和/或配體藥物偶聯物、綴合物，或前述的抗體-藥物偶聯物，或者前述的化合物、或所述化合物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物。所述的物質A可為治療有效量的。

【0541】在某些實施方案中，本公開的藥物組合物包含本公開的抗體或其抗原結合片段，以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【0542】在某些實施方案中，本公開的藥物組合物包含本公開的宿主細胞，以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑，其中所述宿主細胞包含如前所述的分離的核酸分子或載體。

【0543】在某些實施方案中，本公開的藥物組合物包含本公開的多特異性抗體，以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【0544】在某些實施方案中，本公開的藥物組合物包含本公開的綴合物以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【0545】在本公開的第十七方面，本公開提供了前述的物質A或者前述的藥物組合物在製備治療和/或預防與細胞活動異常相關的疾病（例如癌症疾病）的藥物中的用途。所述的物質A或者前述的藥物組合物可為治療有效量的。

【0546】在一些實施例中，提供本公開的抗體或其抗原結合片段、核酸、載體、宿主細胞、抗體藥物偶聯物，或者多特異性抗體在製備藥物中的用

途，所述藥物用於調整（抑制或阻斷）B7H3的活性。

【0547】在一些實施例中，提供本公開的抗體或其抗原結合片段、核酸、載體、宿主細胞、抗體藥物偶聯物，或者多特異性抗體在製備藥物中的用途，所述藥物用於治療或預防與B7H3的活性有關的疾病。

【0548】在一些實施例中，提供本公開的抗體或其抗原結合片段、核酸、載體、宿主細胞、抗體藥物偶聯物，或者多特異性抗體在製備藥物中的用途，所述藥物用於治療或預防與B7H3的活性有關的腫瘤。

【0549】在一些實施方案中，所述癌症疾病選自食管癌（例如食管腺癌和食管鱗狀細胞癌）、腦瘤、肺癌（例如小細胞性肺癌，非小細胞性肺癌或肺腺癌）、鱗狀上皮細胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、頭頸癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸癌（例如人結腸腺癌）、直腸癌、結直腸癌、肝癌、腎癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中樞神經系統腫瘤（例如神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、膠質瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲狀腺癌。

【0550】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2、Her2、B7H3、Her3、EGFR相關的癌症疾病。在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2或Her2相關的癌症疾病。

【0551】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2相關的癌症疾病。

【0552】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Her3相關的癌症疾病。

【0553】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與EGFR相關的癌症疾病。

【0554】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與B7H3相關的癌症疾病。

【0555】在一些實施方案中，所述癌症疾病為實體腫瘤。

【0556】在一些實施方案中，所述癌症疾病為乳腺癌或肺癌（優選非小細胞肺癌）。

【0557】在本公開的第十七方面，本公開提供了前述的物質A或者前述的藥物組合物，其用於治療和/或預防與細胞活動異常相關的疾病（例如癌症疾病）。

【0558】在一些實施方案中，所述癌症疾病選自食管癌（例如食管腺癌和食管鱗狀細胞癌）、腦瘤、肺癌（例如小細胞性肺癌、非小細胞性肺癌或肺腺癌）、鱗狀上皮細胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、頭頸癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸癌（例如人結腸腺癌）、直腸癌、結直腸癌、肝癌、腎癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中樞神經系統腫瘤（例如神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、膠質瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲狀腺癌。

【0559】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2、Her2、B7H3、Her3 、EGFR相關的癌症疾病。在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2或Her2相關的癌症疾病。

【0560】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2相關的癌症疾病。

【0561】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Her3相關的癌症疾病。

【0562】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與EGFR相關的癌症疾病。

【0563】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與B7H3相關的癌症疾病。

【0564】在一些實施方案中，所述癌症疾病為實體腫瘤。在一些實施方案中，所述癌症疾病為乳腺癌或肺癌（優選非小細胞肺癌）。

【0565】在本公開的第十八方面，本公開提供了預防和/或治療與細胞活動

異常相關的疾病（例如癌症疾病）的方法，其包括：給予有需要的個體預防和/或治療有效量的前述的物質A，或者前述的藥物組合物。

【0566】在一些實施方案中，所述癌症疾病選自食管癌（例如食管腺癌和食管鱗狀細胞癌）、腦瘤、肺癌（例如小細胞性肺癌、非小細胞性肺癌或肺腺癌）、鱗狀上皮細胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、頭頸癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸癌（例如人結腸腺癌）、直腸癌、結直腸癌、肝癌、腎癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中樞神經系統腫瘤（例如神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、膠質瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲狀腺癌。

【0567】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2、Her2、B7H3、Her3、EGFR相關的癌症疾病。

【0568】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2或Her2相關的癌症疾病。

【0569】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2相關的癌症疾病。

【0570】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Her3相關的癌症疾病。

【0571】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與EGFR相關的癌症疾病。

【0572】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與B7H3相關的癌症疾病。

【0573】在一些實施方案中，所述癌症疾病為實體腫瘤。

【0574】在一些實施方案中，所述癌症疾病為乳腺癌或肺癌（優選非小細胞肺癌）。

【0575】在本公開中，除非另有說明，否則本文中使用的科學和技術名詞具有本發明所屬技術領域具有通常知識者所通常理解的含義。並且，本文

中所用的細胞培養、分子遺傳學、核酸化學、免疫學實驗室操作步驟均為相應領域內廣泛使用的常規步驟。同時，為了更好地理解本公開，下面提供相關術語的定義和解釋。

【0576】如本文所使用，術語“藥學上可接受的鹽”的例子是由形成藥學上可以接受的陰離子的有機酸形成的有機酸加合鹽，包括但不限於甲酸鹽、乙酸鹽、丙酸鹽、苯甲酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、檸檬酸鹽、抗壞血酸鹽、α-酮戊二酸鹽、α-甘油磷酸鹽、烷基磺酸鹽或芳基磺酸鹽；優選地，所述烷基磺酸鹽為甲基磺酸鹽或乙基磺酸鹽；所述芳基磺酸鹽為苯磺酸鹽或對甲苯磺酸鹽。也可形成合適的無機鹽，包括但不限於鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硝酸鹽、碳酸氫鹽和碳酸鹽、硫酸鹽或磷酸鹽等。

【0577】如本文所使用的，術語“藥學上可接受的載體和/或賦形劑”是指在藥理學和/或生理學上與受試者和活性成分相容的載體和/或賦形劑，其是本領域公知的(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，並且包括但不限於：pH調節劑，表面活性劑，佐劑，離子強度增強劑，稀釋劑，維持滲透壓的試劑，延遲吸收的試劑，防腐劑。

【0578】藥學上可接受的鹽可使用本領域熟知的標準程式獲得，例如，通過將足量的鹼性化合物和提供藥學上可以接受的陰離子的合適的酸反應。

【0579】本公開中，所述藥用輔料是指生產藥品和調配處方時，使用的賦形劑和附加劑，是指除活性成分外，在安全性方面已進行了合理的評估，並且包含在藥物製劑中的物質。藥用輔料除了賦型、充當載體、提高穩定

性外，還具有增溶、助溶、緩控釋等重要功能，是可能會影響到藥品的品質、安全性和有效性的重要成分。根據其來源可分為天然物、半合成物和全合成物。根據其作用與用途可分為：溶劑、拋射劑、增溶劑、助溶劑、乳化劑、著色劑、黏合劑、崩解劑、填充劑、潤滑劑、濕潤劑、滲透壓調節劑、穩定劑、助流劑、矯味劑、防腐劑、助懸劑、包衣材料、芳香劑、抗黏著劑、抗氧劑、螯合劑、滲透促進劑、pH調節劑、緩衝劑、增塑劑、表面活性劑、發泡劑、消泡劑、增稠劑、包合劑、保濕劑、吸收劑、稀釋劑、絮凝劑與反絮凝劑、助濾劑、釋放阻滯劑等；根據其給藥途徑可分為口服、注射、黏膜、經皮或局部給藥、經鼻或口腔吸入給藥和眼部給藥等。同一藥用輔料可用於不同給藥途徑的藥物製劑，且有不同的作用和用途。

【0580】所述藥物組合物可根據給藥途徑製成各種適宜的劑型。例如片劑、膠囊劑、顆粒劑、口服溶液劑、口服混懸劑、口服乳劑、散劑、酊劑、糖漿劑、注射劑、栓劑、軟膏劑、乳膏劑、糊劑、眼用製劑、丸劑、植入劑、氣霧劑、粉霧劑、噴霧劑等。其中，所述的藥物組合物或適宜的劑型可以含有0.01mg至1000mg的本公開的化合物或其藥學上可接受的鹽或偶聯物，適宜含有0.1mg至800mg，優選含有0.5-500mg，優選含有0.5至350mg，特別優選1-250mg。

【0581】所述藥物組合物可以注射劑形式用藥，包括注射液、注射用無菌粉末與注射用濃溶液。其中，可使用的載體和溶劑包括水、林格氏溶液和等滲氯化鈉溶液。另外，滅菌的非揮發油也可用作溶劑或懸浮介質，如單甘油酯或二甘油酯。

【0582】本文使用的術語“治療”一般是指獲得需要的藥理和/或生理效應。該效應根據完全或部分地預防疾病或其症狀，可以是預防性的；和/或根據部分或完全穩定或治癒疾病和/或由於疾病產生的副作用，可以是治療性的。本文使用的“治療”涵蓋了對患者疾病的任何治療，包括：(a)預防易感染疾病或症狀但還沒診斷出患病的患者所發生的疾病或症狀；(b)抑制疾病的症狀，即阻止其發展；或(c)緩解疾病的症狀，即，導致疾病或症狀退化。

【0583】在本公開中，術語“個體”包括人或非人動物。示例性人個體包括患有疾病(例如本文所述的疾病)的人個體(稱為患者)或正常個體。本公開中術語“非人動物”包括所有脊椎動物，例如非哺乳動物(例如鳥類、兩棲動物、爬行動物)和哺乳動物，例如非人靈長類、家畜和/或馴化動物(例如綿羊、犬、貓、奶牛、豬等)。

【0584】本公開中，術語“有效劑量”指被給藥後會在一定程度上緩解所治療病症的一種或多種症狀的化合物的量。

【0585】本公開中，術語“配體藥物偶聯物”是指生物活性分子（藥物分子）與靶向部分連接得到的物質。在本公開的部分實施方案中，生物活性分子與靶向部分通過連接體相連。所述連接體在特定環境（例如腫瘤內的水解酶和/或低pH值環境）中或特定作用（例如溶酶體蛋白酶的作用）下能夠斷裂，從而使生物活性分子與靶向部分分離。在本公開的部分實施方案中，所述連接體包含可切割或不可切割的單元，例如肽或二硫鍵。在本公開的部分實施方案中，生物活性分子與靶向部分直接通過共價鍵相連，所述共價鍵在特定環境或作用下能夠斷裂，從而使生物活性分子與靶向部

分分離。在本公開的部分實施方案中，所述配體藥物偶聯物包含靶向部分、連接體以及本公開的式II化合物片段。

【0586】本公開中，術語“生物活性物”、“生物活性分子”或“藥物分子”指抑制或防止細胞的功能和/或引起細胞死亡或破壞的物質，在本公開的部分實施方案中，偶聯物中的生物活性物、生物活性分子或藥物分子為具有抗腫瘤生物活性的分子。例如：放射性同位素，例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}和Lu的放射性同位素；金屬配合物，例如金屬鉑配合物、金屬金配合物，奧沙利鉑等；糖肽類抗生素，例如博來黴素、平陽黴素；DNA拓撲異構酶抑制劑，例如拓撲異構酶I抑制劑，喜樹鹼、羥基喜樹鹼、9-胺基喜樹鹼、SN-38、伊立替康、拓撲替康、貝洛替康、盧比替康，拓撲異構酶II抑制劑，放線菌素D、阿黴素、多柔比星、多卡米星，柔紅黴素、米托蒽醌、鬼臼毒素、依託泊苷等；干擾DNA合成藥物，例如甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他濱、巰嘌呤、噴司他丁、氟達拉濱、克拉屈濱、奈拉濱等；作用於結構蛋白的藥物，例如微管蛋白抑制劑，長春花生物鹼類、長春新鹼、長春鹼、紫杉醇、多西他賽、卡巴他賽等；腫瘤訊號通路抑制劑，例如絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑、天冬胺酸激酶抑制劑或組胺酸激酶抑制劑等；還包括蛋白酶體抑制劑、組蛋白去乙醯化酶抑制劑、腫瘤新生血管生成抑制劑、細胞週期蛋白抑制劑、美登素衍生物、卡裡奇黴素衍生物、奧瑞他汀衍生物、Pyrrolobenzodiazepines（PBD）衍生物、美法侖、絲裂黴素C、苯丁酸氮芥、或其它抑制腫瘤細胞生長、促進腫瘤細胞凋亡和壞死的活性物質；酶及其片段，諸如核溶酶；抗生素；毒素，諸如小分子毒素

或者細菌、真菌、植物或動物起源的酶活性毒素，包括其片段和/或變體；生長抑制劑；藥物模組。術語“毒素”指能夠對細胞的生長或增殖產生有害效果的物質。

【0587】本公開中，術語“小分子”是指具有生物活性的小分子藥物。術語小分子毒素具有細胞損傷活性，即以某種形式造成細胞的病理學變化的狀態，並且細胞損傷不限於直接損傷，包括對細胞的結構和功能的所有種類的損傷，諸如DNA 裂解、鹼基-二聚體形成、染色體裂解、對細胞分裂機制的損傷和不同酶促活性的下降。

【0588】本公開中，術語“連接體”是指將生物活性分子（藥物分子）與靶向部分連接起來的片段。

【0589】本公開中，術語“靶向部分”是指偶聯物中能夠與細胞表面的靶標（或靶標的部分）特異性結合的部分。通過靶向部分與靶標的相互作用，偶聯物可以被遞送至特定的細胞群。

【0590】本公開中，當偶聯物中的靶向部分為抗體時，偶聯物可被稱為“藥物-抗體偶聯物”。

【0591】本公開中，抗體或其抗原結合片段包括衍生化的抗體或其抗原結合片段，例如具有巰基的抗體或其抗原結合片段，其中所述衍生化使得抗體具有與藥物連接體偶聯物反應的基團或能力。所述巰基-SH可以打開二硫鍵（例如，通過還原劑TCEP還原）衍生獲得。

【0592】本文中使用的術語“癌症”和“腫瘤”以相同的含義使用。

【0593】本文中使用的術語“基因”不僅包括DNA，而且包括其mRNA、其cDNA和其cRNA。

【0594】本文中使用的術語“多核苷酸”以與核酸相同的含義使用，並且還包括DNA、RNA、探針、寡核苷酸和引物。

【0595】本文中使用的術語“Tb”為“target binding”的縮寫，包括抗體或與靶標結合的任意分子，術語“Ab”為“antibody”的縮寫，與“抗體”無區別地使用。

【0596】本文中使用的術語“多肽”和“蛋白”無區別地使用。

【0597】本文中使用的術語“細胞”也包括動物個體內的細胞和培養的細胞。

【0598】本公開中所述的抗B7H3抗體中涉及的B7H3可為本領域常規的B7H3，例如可溶性B7H3、膜形式B7H3等，並且還表示B7H3變體1和/或B7H3變體2。

【0599】KD指獲得自Kd(具體結合分子-靶蛋白相互作用的解離速率)與Ka(具體結合分子-靶蛋白相互作用的結合速率)之比(或Kd/Ka，以莫耳濃度(M)表示)的解離常數。可使用本領域充分建立的方法測定KD值。測定結合分子的KD的優選方法是通過使用表面等離子共振，例如生物感測器系統，如Biacore TM(GE Healthcare Life Sciences)系統。

【0600】術語“B7H3變體”是指一種多肽，其與B7H3多肽，B7H3片段，抗B7H3抗體或其抗體片段具有相似或相同的功能，但非必需包含相似或相同的B7H3多肽，B7H3片段，抗B7H3抗體或其片段的胺基酸序列，或具有相似或相同的B7H3多肽，B7H3片段，抗B7H3抗體或其片段的結構。

【0601】術語“Her3變體”是指一種多肽，其與Her3多肽，Her3片段，抗Her3抗體或其抗體片段具有相似或相同的功能，但非必需包含相似或相同

的Her3多肽，Her3片段，抗Her3抗體或其片段的胺基酸序列，或具有相似或相同的Her3多肽，Her3片段，抗Her3抗體或其片段的結構。

【0602】如本文所用，兩個胺基酸序列之間的百分比同源性等於兩個序列之間的百分比同一性(identity)。兩個序列之間的序列百分比同一性是序列共用的相同位置的數目的函數(即，%同源性＝相同位置的數目/位置總數目X100)，其中考慮缺口(gap)的數目和每一缺口的長度，需要將其引入用於兩個序列的最優對比。可用本領域通常所知的方法進行序列比較和確定序列間的百分比同一性，可用數學演算法實現這種序列比較和百分比同一性的確定。例如，可用Meyers和Miller，1988Comput.Appl.Biosci.4：11-17的演算法(已整合入ALIGN程式(版本2.0))來確定胺基酸序列之間和/或核苷酸序列之間的百分比同一性。此外，可用從Accelrys線上獲得的GCG套裝軟體中的GAP程式(使用其缺省參數)來確定胺基酸序列之間或核苷酸序列之間的百分比同一性。在一個實施方案中，所述兩個序列是等長的。

【0603】術語“表位”是指在動物體優選哺乳動物體內具有抗原性或免疫原性活性的B7H3多肽或蛋白的一部分。B7H3本公開的抗體或其抗原結合片段的表位可以通過現有技術測定，例如合成肽法，免疫資訊學預測，多肽活性的測定，表位元肽掃描法，噬菌體展示技術，X射線衍射和核磁共振分析，抗體同源建模蛋白對接預測法。本文中使用的短語“結合相同表位的抗體”表示，結合共同表位的不同抗體。如果第二抗體結合第一抗體所結合的部分肽或部分三級結構，那麼可以確定，所述第一抗體和所述第二抗體結合相同表位。

【0604】本公開中，術語“抗體”取其最廣義的解釋，包括完整的單克隆抗

體、多克隆抗體以及由至少兩個完整抗體形成的多特異性抗體(例如雙特異性抗體)，只要它們具有所需的生物學活性。在本公開中，“抗體”和“免疫球蛋白”可以互換使用。如本文所述的“抗體分子”或“抗體”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即含有免疫特異性結合抗原的抗原結合位點的分子。因此，術語抗體廣義上不僅涵蓋完整抗體分子，還包括所述抗體的片段以及所述抗體和抗體片段的變體(包括衍生物)。當“抗體分子”或“抗體”與抗原結合片段在同一語境下使用時，“抗體分子”或“抗體”指完整抗體分子或全長抗體。在本說明書中所述術語抗體分子例如包括但非限於單鏈Fv(scFv)，Fab片段，Fab’片段，F(ab’)2，二硫鍵連接的Fv(sdFv)，Fv，及完整抗體或全長抗體。術語“單鏈Fv”或“scFv”是指一種多肽，其包含與抗體VH結構域連接的抗體的VL結構域。例如免疫特異性結合B7H3的抗體可以與其它抗原發生交叉反應。優選地，免疫特異性結合B7H3的抗體與其它抗原不發生交叉反應。免疫特異性結合B7H3的抗體可以例如通過免疫測定或其它本發明所屬技術領域具有通常知識者已知的方法鑒別。“完整”抗體或“全長”抗體指包含兩條重鏈(H)和兩條輕鏈(L)的蛋白，所述重鏈和輕鏈通過二硫鍵相互連接，所述蛋白包含：(1)就重鏈而言，包含可變區(本文縮寫為“VH”)和含有三個結構域CH1、CH2、CH3的重鏈恆定區；和(2)就輕鏈而言，包含輕鏈可變區(本文縮寫為“VL”)和含有一個結構域CL的輕鏈恆定區。本公開的抗體包括但非限於單克隆，多特異性，人或嵌合抗體，單鏈抗體，Fab片段，F(ab′)片段，抗獨特型(抗-Id)抗體(包括例如本公開抗體的抗-Id抗體)，和上述任何抗體的表位結合片段。本公開的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白的任何類型(例如IgG，IgE，

IgM，IgD，IgA和IgY)，類別(例如IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA1和IgA2)或亞類。優選地，本公開的抗體包含或由具有序列及其具體資訊表所述任一胺基酸序列或其片段或變體的VH結構域，VH CDR（本文中多用HCDR表示），VL結構域，或VL CDR（本文中多用LCDR表示）組成。

【0605】在本公開中，術語“單克隆抗體”指抗體來自一群基本均一的抗體，即構成該集群的各抗體完全相同，除了可能存在的少量天然突變。單克隆抗體具有針對抗原的一個決定簇(表位)的高特異性，而與其相對的多克隆抗體則包含針對不同決定簇(表位)的不同抗體。除了特異性之外，單克隆抗體的優點還在於合成時可以不受其他抗體的污染。此處修飾語“單克隆”表示該抗體的特徵在於來自一個基本均一的抗體群，而不應理解成需由特殊方法制得。

【0606】在本公開的部分實施方案中，單克隆抗體還特別包括嵌合抗體，即重鏈和/或輕鏈的一部分與某種、某類或某亞類抗體相同或同源，其餘部分則與另一種、另一類或另一亞類抗體相同或同源，只要它們具有所需的生物學活性(參見例如US 4,816,567；和Morrison等人，1984，PNAS，81:6851-6855)。可用於本公開的嵌合抗體包括靈長類化(primatized)抗體，其包含來自非人靈長類(例如古猴、猩猩等)的可變區抗原結合序列和人恆定區序列。

【0607】術語“抗原結合片段”是指抗體的一部分，優選是抗原結合區或可變區。抗體片段的實例包括Fab、Fab’、F(ab’)2、Fd、Fv、dAb和互補決定區片段，二抗體(diabody)，線性抗體和單鏈抗體分子。本文中使用的術語“抗原結合片段”表示抗體的具有抗原結合活性的部分片段，其中所述片段

具有抗體的完全或部分功能，包括非限於單鏈Fv(scFv)，Fab，Fab’，F(ab’)2，二硫鍵連接的Fv(sdFv)，Fv，di-scFv等。該術語也包括Fab’，其為在還原條件下處理F(ab’)2得到的抗體的可變區的單價片段。但是，該術語不限於這些分子，只要所述片段具有與抗原的結合親和力即可。此外，這些功能片段不僅包括用適當的酶處理抗體蛋白的全長分子得到的片段，而且包括使用遺傳修飾的抗體基因在適當宿主細胞中生產的蛋白。

【0608】本文中使用的術語“Fab’”表示如上所述在還原條件下處理F(ab’)2得到的抗體的可變區的單價片段。但是，本公開的Fab’也包括使用遺傳修飾的抗體基因生產的Fab’。

【0609】如本文中所使用的，術語“scFv”是指，包含VL和VH結構域的單個多肽鏈，其中所述VL和VH通過連接體（linker）或直接相連（參見，例如, Bird等人, Science 242:423-426 (1988)；Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)；和Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷， Roseburg 和Moore 編，Springer-Verlag，紐約，第269-315頁(1994)）。此類scFv分子可具有一般結構：NH2-VL-連接體-VH-COOH或NH2-VH-連接體-VL-COOH。合適的現有技術連接體由重複的GGGGS胺基酸序列或其變體組成。例如，可使用具有胺基酸序列(GGGGS)4的連接體，但也可使用其變體（Holliger等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448）。可用於本公開的其他連接體由Alfthan等人(1995)，Protein Eng. 8:725-731，Choi等人(2001)，Eur. J. Immunol. 31: 94-106，Hu等人(1996)，Cancer Res. 56:3055-3061，Kipriyanov等人(1999)，J. Mol. Biol. 293: 41-56和Roovers等人(2001)，Cancer Immunol.描述。在一些

情況下，scFv的VH與VL之間還可以存在二硫鍵。如本文中所使用的，術語“di-scFv”是指，由兩個scFv連接形成的抗體片段。

【0610】如本文所用，在所述抗體或其抗原結合片段中的即使含有變體、胺基酸的置換、缺失或添加，也仍然具有結合所述抗原的活性。

【0611】術語“雙特異性抗體”亦稱為“雙功能抗體偶聯物”，是指由第一抗體(片段)和第二抗體(片段)通過偶聯臂所形成的偶聯物，該偶聯物保留了各自抗體的活性，故具有雙功能和雙特異性。

【0612】術語“多特異性抗體”包括例如三特異性抗體和四特異性抗體，前者是具有三種不同抗原結合特異性的抗體，而後者是具有四種不同抗原結合特異性的抗體。

【0613】術語“完整抗體”或“全長抗體”指包含抗原結合可變區和輕鏈恆定區(CL)、重鏈恆定區(CH1、CH2和CH3)的抗體。恆定區可以是天然序列(例如人天然恆定區序列)或其胺基酸序列變體。完整抗體優選是具有一種或多種效應功能的完整抗體。

【0614】術語“前抗（Probody）”是一種修飾的抗體，包括一種抗體或一種抗體片段，能專門與其靶點結合，能夠與掩蔽基團耦合，其中掩蔽基團指對抗體或抗體片段與其靶點的結合能力的裂解常數比沒有耦合掩蔽基團的抗體或抗體片段與其靶點的結合能力的裂解常數至少大100倍或1000倍、或者10000倍。

【0615】在本公開中，非人(例如鼠)抗體的“人源化”形式指包含最少量非人免疫球蛋白序列的嵌合抗體。大多數人源化抗體是人接受者免疫球蛋白的超變區殘基被置換成具有所需特異性、親和力和功能的非人(例如小鼠、

大鼠、兔或非人靈長類)超變區殘基(供者抗體)。在一些實施方案中，人免疫球蛋白的框架區(FR)殘基也被置換成非人殘基。而且，人源化抗體還可以包含受者抗體或供者抗體中沒有的殘基。這些修飾是為了進一步優化抗體的性能。人源化抗體一般包含至少一個，通常是兩個可變區，其中所有或幾乎所有超變環(hypervanable loops)與非人免疫球蛋白的相對應，而FR則完全或幾乎完全是人免疫球蛋白的序列。人源化抗體還可以包含免疫球蛋白恆定區(Fc，通常是人免疫球蛋白Fc)的至少一部分。有關細節參見例如Jones等人，1986，Nature，321: 522-525；Riechmann等人，1988，Nature，332: 323-329；和Presta，1992，Curr Op Struct Bwl 2: 593-596。

[0616] 完整抗體可根據重鏈恆定區的胺基酸序列分為不同的"類"。主要的五類是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中幾類還可以分為不同的"亞類"(同種型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。抗體不同類的重鏈恆定區分別稱為α、β、ε、γ和μ。免疫球蛋白不同類的亞基結構和三維構型是本領域中公知的。

[0617] 在本文中，本公開的抗體或其抗原結合片段含有的CDR可根據本領域已知的各種編號系統確定。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段含有的CDR優選地通過Kabat、Chothia或，AbM或IMGT編號系統確定。其中根據IMGT編號系統，其CDR和FR對應的編號如下：

	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CDR2-IMGT	FR3-IMGT	For germline V GENE (*) CDR3-IMGT	For rearranged V-J GENEs and V-D-J GENEs		
						Germline CDR3-IMGT	Rearranged CDR3-IMGT	FR4-IMGT	

胺基酸編號	1 -> 26 (C 23)	27 -> 38	39 -> 55 (W 41)	56 -> 65	66 -> 104 (C 104)	105 -> 116	105 -> 117 (112.1, 111.1, 112.2, 111.2, etc.)	118 -> 129
胺基酸個數	25 26 aa	5 12 aa	16 17 aa	0 10 aa	36 39 aa	2 12 aa	2 13 aa (more than 13 aa)	10 12 aa

〔0618〕如本文中所使用的，術語“構架殘基區”或“FR殘基”是指，抗體可變區中除了如此定義的CDR殘基以外的那些胺基酸殘基。

〔0619〕如本文中所使用的，術語“胚系抗體基因”是非淋巴細胞表達的免疫球蛋白的編碼基因，它沒有經歷導致表達特異免疫球蛋白的遺傳學重排及成熟的成熟過程。本公開的各種實施方案所提供的一個優點來源於一種認識，那就是胚系抗體基因編碼的胺基酸序列比成熟抗體基因編碼的胺基酸序列更多地保留了動物物種個體的特徵性的重要胺基酸序列結構。因此當被治療性應用於該物種時，更少地被該物種識別為外源物質。

〔0620〕作為胺基酸取代，在本說明書中，保守的胺基酸取代是優選的。保守的胺基酸取代表示，在與胺基酸側鏈有關的胺基酸集合內發生的取代。優選的胺基酸集合如下：酸性集合(天冬胺酸和麩胺酸)；鹼性集合(離胺酸、精胺酸和組胺酸)；非極性集合(丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、異亮胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸和色胺酸)；和不帶電荷的極性家族(甘胺酸、天冬醯胺、麩胺醯胺、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸和酪胺酸)。更優選的胺基酸集合如下：脂族羥基(絲胺酸和蘇胺酸)；含有醯胺的集合(天冬醯胺和麩氨醯胺)；脂族集合(丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸和異亮胺酸)；和芳族集合(苯丙胺酸、色胺酸和酪胺酸)。這樣的胺基酸取代優選地在不會損

害具有原始胺基酸序列的物質的性能的集合內進行。

【0621】此外，已知的是，缺失在培養的哺乳動物細胞中生產的抗體的重鏈的羧基端的離胺酸殘基(Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995))，還已知的是，缺失在培養的哺乳動物細胞中生產的抗體的重鏈的羧基端的2個胺基酸殘基(甘胺酸和離胺酸)，並且新位於羧基端處的脯胺酸殘基被醯胺化(Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007))。但是，重鏈序列的這樣的缺失和修飾不會影響抗體的抗原結合親和力和效應子功能(補體的活化、抗體依賴性的細胞的細胞毒性等)。

【0622】本文涉及的二十個常規胺基酸的編寫遵循常規用法。參見例如，Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates , Sunderland, Mass. (1991))，其以引用的方式併入本文中。在本文中，術語“多肽”和“蛋白質”具有相同的含義且可互換使用。並且在本公開中，胺基酸通常用本領域公知的單字母和三字母縮寫來表示。例如，丙胺酸可用A或Ala表示；精胺酸可用R或Arg表示；甘胺酸可用G或Gly表示；穀胺醯胺可用Q或Gln表示。

【0623】如本文中所使用的，術語“預防”是指，為了阻止或延遲疾病或病症或症狀（例如，腫瘤和傳染病）在受試者體內的發生而實施的方法。如本文中所使用的，術語“治療”是指，為了獲得有益或所需臨床結果而實施的方法。為了本公開的目的，有益或所需的臨床結果包括但不限於，減輕症狀、縮小疾病的範圍、穩定（即，不再惡化）疾病的狀態，延遲或減緩疾病的發展、改善或減輕疾病的狀態、和緩解症狀（無論部分或全部），無論是可檢測或是不可檢測的。此外，“治療”還可以指，與期望的存活期

相比（如果未接受治療），延長存活期。

【0624】如本文中使用的，術語“受試者”是指哺乳動物，例如靈長類哺乳動物，例如非人靈長類哺乳動物或人。在某些實施方式中，所述受試者（例如人）腫瘤和傳染病，或者，具有患有上述疾病的風險。

【0625】如本文中所使用的，術語“有效量”是指足以獲得或至少部分獲得期望的效果的量。例如，預防疾病（例如，腫瘤和傳染病）有效量是指，足以預防，阻止，或延遲疾病（例如，腫瘤和傳染病）的發生的量；治療疾病有效量是指，足以治癒或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其併發症的量。測定這樣的有效量完全在本發明所屬技術領域具有通常知識者的能力範圍之內。例如，對於治療用途有效的量將取決於待治療的疾病的嚴重度、患者自己的免疫系統的總體狀態、患者的一般情況例如年齡，體重和性別，藥物的施用方式，以及同時施用的其他治療等等。

【0626】如本文中所使用的，術語“效應子功能（effector function）”是指，那些可歸因於抗體Fc區（天然序列Fc區或胺基酸序列變體Fc區）的生物學活性，且其隨抗體同種型而變化。

【0627】術語“藥學上可接受的”指當分子本體、分子片段或組合物適當地給予動物或人時，它們不會產生不利的、過敏的或其他不良反應。可作為藥學上可接受的載體或其組分的一些物質的具體示例包括糖類（如乳糖）、澱粉、纖維素及其衍生物、植物油、明膠、多元醇（如丙二醇）、海藻酸等。

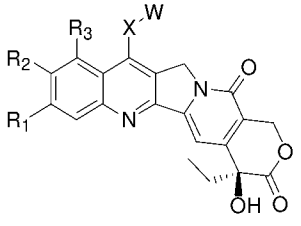
【0628】使用實驗動物可以確定抗體和抗體-藥物偶聯物對癌症的體內治療效果，例如，將抗體施用給植入了表達B7H3的腫瘤細胞系的裸鼠，並測量

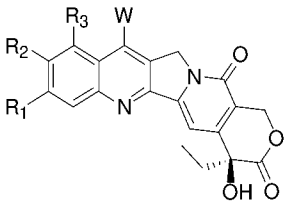
癌細胞的任何變化。

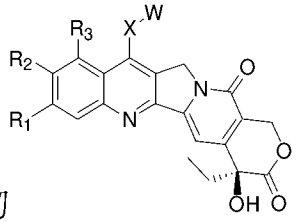
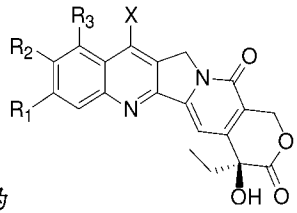
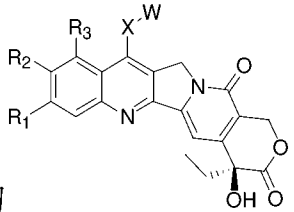
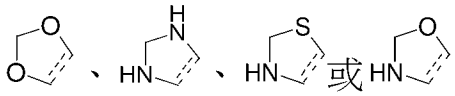
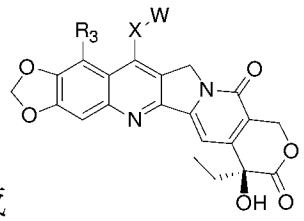
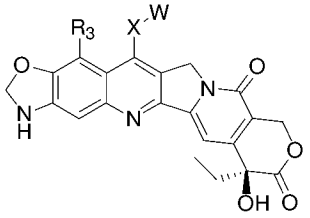
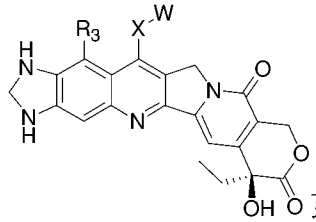
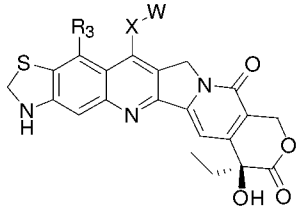
【0629】在本公開中，儘管大多數情況下抗體中的胺基酸取代是被L-胺基酸取代，但也不限於此。在一些實施方案中，抗體肽鏈中可以包括一個或多個D-胺基酸。包含D-胺基酸的肽在口腔、腸道或血漿中比僅包含L-胺基酸的肽更加穩定而不易降解。

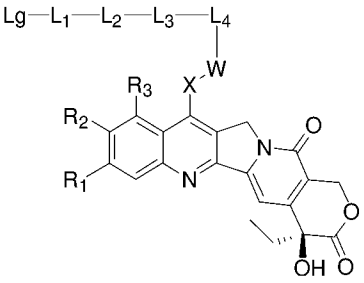
【0630】本公開所用的單克隆抗體可以由許多方法生產。例如，用於本公開的單克隆抗體可以通過雜交瘤方法，使用許多物種(包括小鼠、倉鼠、大鼠和人的細胞)獲得(參見例如Kohler等人，1975，Nature，256: 495)，或者通過重組DNA技術制得(參見例如US 4,816,567)，或者從噬菌體抗體庫中分離得到(參見例如Clackson等人，1991，Nature，352: 624-628；和Marks等人，1991，Journal of Molecular Biology，222: 581-597)。

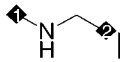
【0631】本文中，除非以其他方式明確指出，在本文中通篇採用的描述方式“各…獨立地選自”和“…各自獨立地選自”可以互換，均應做廣義理解，其既可以是指在不同基團中，相同或不同的符號之間所表達的具體選項之間互相不影響，也可以表示在相同的基團中，相同或不同的符號之間所表達的具體選項之間互相不影響。

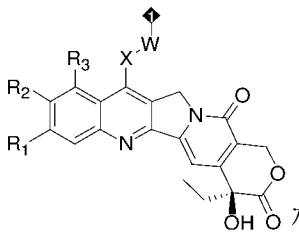
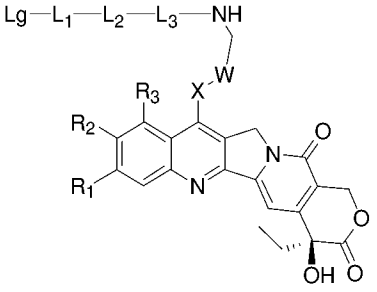
【0632】本文中，術語“直接鍵”表示其兩側的基團直接相連，例如，式II所示的化合物  中，若X為直接鍵，則其結構式為

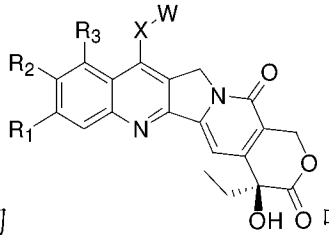
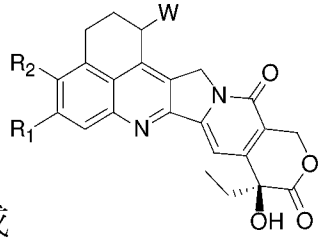
 。其餘直接鍵可參照前述內容進行理解。

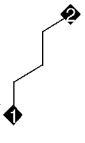
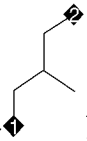
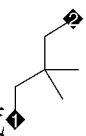
【0633】本文中，術語“不存在”表示該基團不存在，例如，式II所示的化合物  中，若W不存在，則其結構式為  。式II所示的化合物  中，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成  或 ，“虛線”鍵表示所述雜環與苯環稠合的位置，例如，形成  、  、  或  。

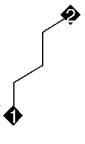


【0634】本文中，式III所示的藥物連接體偶聯物中，L_4為  時，其中的標號1、2表示L_4與其餘基團的連接位置，具體

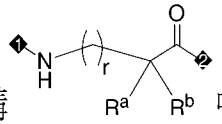
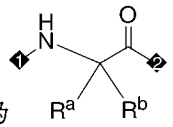
地，1位與L_3相連，2位與藥物分子即  相連時，形成  。其餘標號1、2可參照前述內容進行理解。

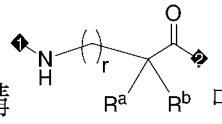
【0635】本文中，式II所示的化合物  中，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位置，形成  。

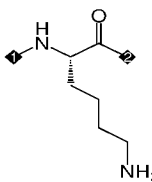
【0636】本文中，X的定義例如為，“X選自任選取代的  ，所述取代基選自1個或2個C1-4烷基（如甲基）”，則X例如可以為  或  。X其餘類似的定義可參照前述內容進行理解。

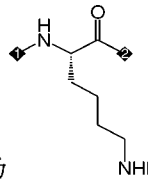
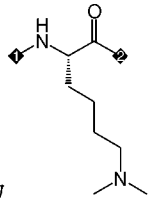
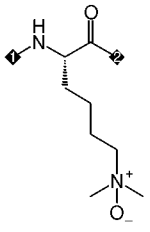
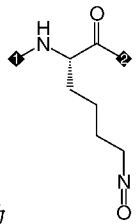
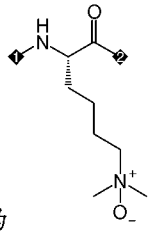
【0637】本文中，X的定義例如為，“X選自任選取代的  ，所述取代基選自2個C1-4烷基（如甲基）和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環

烷基（如環丙基）”，則X例如可以為 。X其餘類似的定義可參照前述內容進行理解。

【0638】AA^1所示胺基酸殘基的結構  中，若r為0，則本發明所屬技術領域具有通常知識者可以理解的是，AA^1所示胺基酸殘基的結構將變為  。

【0639】AA^1所示胺基酸殘基的結構  中，若R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成4-10元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代，其中，術語“所述4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代”的含義為，所述4-10元雜環可以不被取代，也可以被一個或多個R^0所取代，且所述多個R^0中，各R^0的定義可以相同，也可以不同。其餘類似的定義可以參照前述內容進行理解。

【0640】本文中，例如，L_3選自Lys、Val-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Ala、Lys-Ala-Asn時，“所述離胺酸（Lys）的遠端胺基任選地被1個、2個或3個選自第三丁氧羰基、C1-6烷基（優選甲基）、O的取代基所取代”的含義為，所述L_3各選項中的Lys的遠端胺基任選地被1個、2個或3個選自第三丁氧羰基、C1-6烷基（優選甲基）、O的取代基所取代。其中，“Lys的遠端胺基”指的是離胺酸殘基  中裸露的胺基-NH_2。“所述離胺酸（Lys）的遠端胺基任選地被1

個、2個或3個選自第三丁氧羰基、C1-6烷基（優選甲基）、O的取代基所取代”表示所述離胺酸（Lys）的遠端胺基可以不被取代，也可以被1個、2個或3個選自第三丁氧羰基、C1-6烷基（優選甲基）、O的取代基所取代，例如，可以被1個第三丁氧羰基取代，即變為  ，或者，可以被2個甲基取代，即變為  ，或者被2個甲基和1個O同時取代，即變為  。需要說明的是，“所述離胺酸（Lys）的遠端胺基被O取代”指的是所述離胺酸（Lys）的遠端胺基被氧代，即變為  ，若該遠端胺基進一步被兩個甲基所取代，則其變為  。

【0641】在本說明書的各部分，本公開化合物的取代基按照基團種類或範圍公開。特別指出，本公開包括這些基團種類和範圍的各個成員的每一個獨立的次級組合。例如，術語“C1-6烷基”特別指獨立公開的甲基、乙基、C3烷基、C4烷基、C5烷基和C6烷基。

【0642】在本文中，術語“C1-6烷基”表示直鏈或支鏈的含有1-6個碳原子的

烷基，包括例如 “C1-3烷基”或 “C1-4烷基”，甲基，乙基等，具體實例包括但不限於：甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、己基。

【0643】在本文中，術語“C_{1-4}烷基”表示直鏈或支鏈的含有1-4個碳原子的烷基，包括例如 “C_{1-3}烷基”，甲基，乙基等，具體實例包括但不限於：甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基。

【0644】在本文中，術語“C_{2-6}烯基”是指含有至少一個雙鍵且碳原子數為2-6的直鏈、支鏈或環狀的烯基，包括例如“C_{2-4}烯基”等。其實例包括但不限於：乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、1,3-丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,4-己二烯基、環戊烯基、1,3-環戊二烯基、環己烯基、1,4-環己二烯基等。

【0645】在本文中，術語“C_{2-6}炔基”是指含有至少一個三鍵且碳原子數為2-6的直鏈或支鏈的炔基，包括例如“C_{2-4}炔基”等。其實例包括但不限於：乙炔基、丙炔基、2-丁炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-甲基-2-戊炔基、2-己炔基、3-己炔基、5-甲基-2-己炔基等。

【0646】在本文中，術語“鹵素”包括氟、氯、溴、碘。

【0647】在本文中，術語“3-6元環烷基”或“C_{3-6}環烷基”是指含有3-6個碳原子的飽和環狀烷基，包括環丙烷基（即環丙基）、環丁烷基（即環丁基）、環戊烷基（即環戊基）、環己基。

【0648】在本文中，術語“3-7元碳環烷基”或“C_{3-7}環烷基”是指含有3-7個碳原子的飽和環狀烷基，包括環丙烷基、環丁烷基、環戊烷基、環己基、環

庚基。

【0649】在本文中，術語“C1-6烷氧基”是指通過氧原子連接至母體分子部分的如上文所定義的烷基。具體實例包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、異丁氧基、第三丁氧基、戊氧基、己氧基等。

【0650】在本文中，術語“C_{1-4}烷氧基”是指通過氧原子連接至母體分子部分的如上文所定義的烷基。具體實例包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、異丁氧基、第三丁氧基等。

【0651】在本文中，術語“4-10元雜環基”是指含有4-10個環原子(其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的環狀基團。術語“4-6元雜環基”是指含有4-6個環原子(其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的環狀基團。任選地，環狀結構中的環原子（例如碳原子、氮原子或硫原子）可以被氧代。“4-8元雜環基”包括例如“4-8元含氮雜環基”、“4-8元含氧雜環基”、“4-7元雜環基”、“4-7元含氧雜環基”、“4-7元雜環基”、“4-6元雜環基”、“5-7元雜環基”、“5-6元雜環基”、“5-6元含氮雜環基”，包括但不限於氧代環丁烷基、吡咯烷基、四氫呋喃基、哌啶基、哌啡基、四氫吡喃基、高哌啡基等。

【0652】在本文中，術語“4-10元雜環”是指含有4-10個環原子(其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的環。術語“5-6元雜環”是指含有5-6個環原子(其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的環，包括但不限於吡咯烷、四氫呋喃、哌啶、哌啡、四氫

吡喃等環。

【0653】在本文中，術語“芳基”是指具有芳香性的單環或多環烴基，例如6-10元芳基、5-8元芳基等。具體的實例包括但不限於苯基、萘基、蒽基、菲基等。所述“6-10元芳基”是指含有6-10個環原子的芳基。所述“C6-10芳基” 是指含有6-10個碳原子的芳基。

【0654】在本文中，術語“雜芳基”是指具有芳香性的環狀基團，其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子。任選地，環狀結構中的環原子（例如碳原子、氮原子或硫原子）可以被氧代。具體實例包括但不限於5-10元雜芳基、5-6元雜芳基、5-10元含氮雜芳基、6-10元含氧雜芳基、6-8元含氮雜芳基、5-8元含氧雜芳基等，例如呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、異噻唑基、噻二唑基、噁唑基、異噁唑基、噁二唑基、咪唑基、吡唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、吡啶基、2-吡啶酮基、4-吡啶酮基、嘧啶基、1,4-二氧雜環己二烯基、2*H*-1,2-噁嗪基、4*H*-1,2-噁嗪基、6*H*-1,2-噁嗪基、4*H*-1,3-噁嗪基、6*H*-1,3-噁嗪基、4*H*-1,4-噁嗪基、噠嗪基、吡嗪基、1,2,3-三嗪基、1,3,5-三嗪基、1,2,4,5-四嗪基、氮雜環庚三烯基、1,3-二氮雜環庚三烯基、氮雜環辛四烯基等。

【0655】本文用波浪線“~~”表示的結構式中的鍵意在表示，該結構表示順式或反式異構體，或任意比例的順式和反式異構體的混合物。

【0656】術語“藥物與抗體比”或“DAR”是指藥物的數量，例如，與ADC的抗體附接的小分子毒素。ADC的DAR可以在1到16的範圍內，但是取決於抗體上的連接位點的數量，更高的負載(例如20)也是可能的。提及負載到

單個抗體上的藥物的數量時，或可替代地，提及一組ADC的平均或均值DAR時，可以使用術語DAR。

【0657】發明的有益效果

【0658】本公開通過大量研究獲得高活性和高細胞滲透性的生物活性藥物（生物活性分子或payload）、高體內迴圈穩定性和高化學穩定性的連接體、通過調節連接體的理化性質（如鹼性和親油性）實現抗體偶聯藥物（ADC）對腫瘤微環境的富集、連接體特有的體內酶切特性以及與靶向部分的偶聯方式、結合大量體內體外藥效的篩選驗證，獲得一類新穎的抗體生物活性分子偶聯物。利用上述方式獲得的偶聯物，能夠實現多種下述的驚奇的技術效果：

【0659】根據上述方式得到的偶聯物具有更好的溶解度和優異的化學穩定性，如不發生傳統ADC中馬來醯亞胺連接方式引起的可逆Michael加成反應，因此可以獲得高藥物-抗體比，在一些實施方案中，所述偶聯物的DAR值能夠達到6-8；

具有極高的偶聯效率，在一些實施方案中，所述偶聯效率能夠達到或超過90%；

通過大量研究發現了一類具有高血漿穩定性，但同時又能在腫瘤微環境中（腫瘤細包內和腫瘤細胞外均可）裂解的連結子，因此可以在抗原低表達或者抗原不表達腫瘤中產生好的抗腫瘤效果；

根據上述方式得到的偶聯物（ADC）通過對連接體和整體 ADC 分子的理化性質的調整，提高了整個 ADC 分子在相對酸性腫瘤環境中的暴露量，因而 ADC 具有更好的腫瘤組織靶向性，即在腫瘤微環境中的富集能力，

增加了生物活性分子在瘤內和血液濃度比，降低了 ADC 分子的機理相關的毒性（ADC 結合非腫瘤組織中細胞表面抗原並內吞後產生的毒性，或者又叫“on-target 毒性”），因此具有更高的治療指數；

根據上述方式得到的偶聯物具有很高的在體內迴圈中的穩定性，減少了藥物分子在非靶組織中的脫落，減少了非靶組織中毒素脫落引起的“off-target”毒性；

所述偶聯物的生物活性分子具有更高的抗腫瘤細胞活性，因此具有優異的旁觀者效應（by-stander effect），ADC 能夠更有效地殺死抗原高表達腫瘤細胞以及腫瘤組織中抗原低表達或抗原不表達的腫瘤細胞；

本公開的毒素-連接體，利用其連接體在腫瘤微環境中的胞外裂解能力，可以和沒有細胞內吞能力的抗體組成抗體偶聯藥物，這類抗體偶聯藥物依然具有高抗腫瘤活性；

本公開的毒素-連接體，利用其連接體在腫瘤微環境中的胞外裂解能力以及其在腫瘤微環境中的富集能力，可以和沒有細胞內吞能力的抗體以及沒有腫瘤細胞外抗原結合能力的抗體組成抗體偶聯藥物，這類抗體偶聯藥物依然具有高抗腫瘤活性；

本公開提供的抗體具有極高的人源化程度或者全人源抗體，從而可安全地施用給人受試者，而不引發免疫原性反應。具有能夠很高的結合人和非人 B7H3 的能力，尤其涉及與非人靈長類動物(例如食蟹猴)的 B7H3 具有交叉反應性的抗體的分子；

綜上，本發明的連接體、抗體和ADC具有重大的臨床價值。

【圖式簡單說明】

【0660】

圖1A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與人B7H3-4IgG-His蛋白ELISA結合檢測。

圖1B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與人B7H3-4IgG-His蛋白ELISA結合檢測。

圖2A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與猴B7H3-4IgG-His蛋白ELISA結合檢測。

圖2B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與猴B7H3-4IgG-His蛋白ELISA結合檢測。

圖3A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與MCF-7腫瘤細胞流式結合檢測。

圖3B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與MCF-7腫瘤細胞流式結合檢測。

圖4A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與A549腫瘤細胞流式結合檢測。

圖4B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與A549腫瘤細胞流式結合檢測。

圖5所示為抗B7H3抗體2E3-02與PC-3腫瘤細胞流式結合檢測。

圖6A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與B7H3蛋白特異性結合檢測。

圖6B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與B7H3蛋白特異性結合檢測。

圖7A 所示為腫瘤細胞A549對候選抗體1D1-01內吞檢測。

圖7B 所示為腫瘤細胞A549對候選抗體2E3-02內吞檢測。

圖7C 所示為腫瘤細胞A549對候選抗體202-2-1內吞檢測。

圖8 所示為偶聯前後的SEC圖譜。

圖9 所示為抗B7H3-ADC在NCI-HT29移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試之一。

圖10 所示為抗B7H3-ADC在NCI-HT29移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試之二。

圖11 所示為抗B7H3-ADC在 NCI-H358移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試。

圖12 所示為抗B7H3-ADC在 食管鱗癌PDX模型中抑制腫瘤生長的測試。

圖13 所示為抗B7H3-ADC在 前列腺PDX模型中抑制腫瘤生長的測試。

圖14 所示為抗Her3-ADC在 NCI-H358移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試。

圖15所示為抗Her3-ADC在 SW480移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試之一。

圖16所示為抗Her3-ADC在 SW480移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試之二。

圖17 所示為HT29模型中A1.9在血漿和腫瘤中的分佈比。

圖18 所示為HT29模型中ADC在血漿和腫瘤中的分佈比。

圖19A 所示為抗體-藥物偶聯物在腫瘤勻漿中孵育並檢測結果。

圖19B 所示為抗體-藥物偶聯物在肌肉組織勻漿中孵育結果。

【實施方式】

【0661】以下通過具體實施方式的描述對本公開作進一步說明，但這並非是對本公開的限制。本發明所屬技術領域具有通常知識者根據本公開的教導，可以做出各種修改或改進，而不脫離本公開的基本思想和範圍。所用試劑或儀器未注明生產廠商者，均為可以通過市購獲得的常規產品。

【0662】本公開中的縮寫具有以下含義：

OMs	甲磺酸酯基	FA	甲酸
OTs	對甲苯磺酸酯基	ACN	乙腈
OTf	三氟甲磺酸酯基	CCK8 試劑	2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑單鈉鹽
TBS	第三丁基二甲基矽基	FBS	胎牛血清
MMT	對甲氧基苯基二苯甲基	DMSO	二甲基亞碸
PB/PBS	磷酸鹽緩液	HBTU	O-苯並三氮唑-四甲基脲六氟磷酸鹽

HOBT	1-羥基苯並三唑	HATU	2-(7-氮雜苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽
NBS	N-溴代琥珀醯亞胺	TFA	三氟乙酸
PPTS	吡啶對甲苯磺酸鹽	DCM	二氯甲烷
THF	四氫呋喃	DMF	N,N-二甲基甲醯胺
EDC	1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽	IgG	免疫球蛋白 G
CDR	免疫球蛋白可變區中的互補決定區	HRP	辣根過氧化物酶
FR	抗體構架區：抗體可變區中除 CDR 殘基以外的胺基酸殘基	hFc	人 IgG 抗體 Fc 段
VH	抗體重鏈可變區	KD	平衡解離常數
VL	抗體輕鏈可變區	HCDR1	免疫球蛋白重鏈可變區中的互補決定區 1
AbM	AbM CDR 定義方式來源於 Martin 的相關研究（Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86:9268–9272），此定義方法整合了 Kabat 及 Chothia 兩者的部分定義。	HCDR2	免疫球蛋白重鏈可變區中的互補決定區 2
Kabat	由 Elvin A. Kabat 提出的免疫球蛋白比對及編號系統 (參見，例如 Kabat et al., Sequences of Proteins	HCDR3	免疫球蛋白重鏈可變區中的互補決定區 3

	of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。		
Chothia	由 Chothia 等人提出的免疫球蛋白編號系統，其是基於結構環區的位置鑒定 CDR 區邊界的經典規則(參見，例如 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883)。	LCDR1	免疫球蛋白輕鏈可變區中的互補決定區 1
IMGT	基於由 Lefranc 等人發起的國際免疫遺傳學資訊系統 (The international ImMunoGeneTics information system ® (IMGT))的編號系統，可參閱 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003。	LCDR2	免疫球蛋白輕鏈可變區中的互補決定區 2
mAb	單克隆抗體	LCDR3	免疫球蛋白輕鏈可變區中的互補決定區 3
EC50	產生 50%功效或結合的濃度	SEC-HPLC	分子排阻高效液相色譜
ELISA	酶聯免疫吸附測定	HC	疫球蛋白重鏈
PCR	聚合酶鏈式反應	LC	疫球蛋白輕鏈

【0663】序列及其具體資訊：

SEQ ID NO	序列名稱	胺基酸序列

1	scFv 1D1	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMN WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVQGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRMYSSG WYWGAFDMWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLA WNQQKPGQAPRLLIYGTFKRATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRLEIK
2	scFv 2E3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVQGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARSGYD YFFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWYQQKP GQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTKVEIK
3	1D1-01 VH	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMN WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVQGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRMYSSG WYWGAFDMWGQGTMVTVSS
4	1D1-01 chothia HCDR1	GFTISSY
5	1D1-01 chothia HCDR2	KQDGSE
6	1D1-01 chothia HCDR3	RMYSSGWYWGAFDM
7	1D1-01 kabat HCDR1	SYWMN
8	1D1-01 kabat	NIKQDGSEKYYVDSVQG

	HCDR2	
9	1D1-01 kabat HCDR3	RMYSSGWYWGAFDM
10	1D1-01 IMGT HCDR1	GFTISSYW
11	1D1-01 IMGT HCDR2	IKQDGSEK
12	1D1-01 IMGT HCDR3	ARRMYSSGWYWGAFDM
13	1D1-01 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWN QQKPGQAPRLLIYGTFKRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRLEIK
14	1D1-01 chothia LCDR1	RASQSVSSIYLA
15	1D1-01 chothia LCDR2	GTFKRAT
16	1D1-01 chothia LCDR3	QQYDTSSIT
17	1D1-01 kabat LCDR1	RASQSVSSIYLA
18	1D1-01 kabat LCDR2	GTFKRAT
19	1D1-01	QQYDTSSIT

	kabat LCDR3	
20	1D1-01 IMGT LCDR1	QSVSSIY
\	1D1-01 IMGT LCDR2	GTF
21	202-2-1 kabat/IMGT LCDR3	QQLNSYPLT
22	1D1-01 IMGT LCDR3	QQYDTSSIT
23	2E3-02 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVQGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARSGYD YFFDYWGQGTLVTVSS
24	2E3-02 chothia HCDR1	GFTFSSY
25	2E3-02 chothia HCDR2	SGSGGS
26	2E3-02 chothia HCDR3	ARSGYDYFFDY
27	2E3-02 kabat HCDR1	SYAMN
28	2E3-02	GISGSGGSTYYADSVQG

	kabat HCDR2	
29	2E3-02 kabat HCDR3	ARSGYDYFFDY
30	2E3-02 IMGT HCDR1	GFTFSSYA
31	2E3-02 IMGT HCDR2	ISGSGGST
32	2E3-02 IMGT HCDR3	AKARSGYDYFFDY
33	2E3-02 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWY QQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTKVEIK
34	2E3-02 chothia LCDR1	RASQRISSSFLA
35	2E3-02 chothia LCDR2	GASSRAT
36	2E3-02 chothia LCDR3	QQYSNSPLT
37	2E3-02 kabat LCDR1	RASQRISSSFLA
38	2E3-02 kabat LCDR2	GASSRAT

39	2E3-02 kabat LCDR3	QQYSNSPLT
40	2E3-02 IMGT LCDR1	QRISSSF
\	2E3-02 IMGT LCDR2	GAS
41	202-2-1 IMGT LCDR1	QGISSY
42	2E3-02 IMGT LCDR3	QQYSNSPLT
43	IgG1 CH，即 IgG1 恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
44	Kappa CL，即 kappa 恆定區	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

45	1D1-01 HC，即 1D1-01 重鏈	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMN WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVQGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRMYSSG WYWGAFDMWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	1D1-01 LC，即 1D1-01 輕鏈	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWN QQKPGQAPRLLIYGTFKRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
47	2E3-02 HC，即 2E3-02 重鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVQGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARSGYD YFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

48	2E3-02 LC，即 2E3-02 輕鏈	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWY QQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
49	202-2-1 VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWYDVSHKYYADSVKGRF TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGDP DAFDIWGQGTMVTVSS
50	202-2-1 VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK
51	202-2-1 HC，即 202-2-1 重鏈	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWYDVSHKYYADSVKGRF TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGDP DAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	202-2-1 LC，即 202-2-1 輕鏈	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

53	202-2-1 kabat HCDR1	TYGMH
54	202-2-1 kabat HCDR2	VIWYDVSHKYYADSVKG
55	202-2-1 kabat HCDR3	DWGDPDAFDI
56	202-2-1 IMGT HCDR1	GFTFSTYG
57	202-2-1 IMGT HCDR2	IWYDVSHK
58	202-2-1 IMGT HCDR3	ARDWGDPDAFDI
59	202-2-1 kabat LCDR1	RASQGISSYLA
60	202-2-1 kabat LCDR2	AASTLQS
\	202-2-1 IMGT LCDR2	AAS

【0664】現參照下列意在舉例說明本公開(而非限定本公開)的實施例來描述本公開。

【0665】除非特別指明，本公開中所使用的分子生物學實驗方法和免疫檢測法，基本上參照J. Sambrook等人，分子克隆：實驗室手冊，第2版，

冷泉港實驗室出版社，1989，以及F. M. Ausubel等人，精編分子生物學實驗指南，第3版，John Wiley & Sons, Inc.，1995中所述的方法進行。本發明所屬技術領域具有通常知識者知曉，實施例以舉例方式描述本公開，且不意欲限制本公開所請求保護的範圍。

【0666】製備方案

【0667】以下的實施例中記載的化合物的結構通過核磁共振(^{1}H NMR)或質譜(MS)來確定。

【0668】核磁共振(^{1}H NMR)的測定儀器使用Bruker 400 MHz核磁共振儀；測定溶劑為氘代甲醇(CD_3OD)、氘代氯仿($CDCl_3$)或六氘代二甲基亞碸(DMSO-d_6)；內標物質為四甲基矽烷(TMS)。

【0669】實施例中使用的核磁共振(NMR)圖譜中的縮寫示於以下。

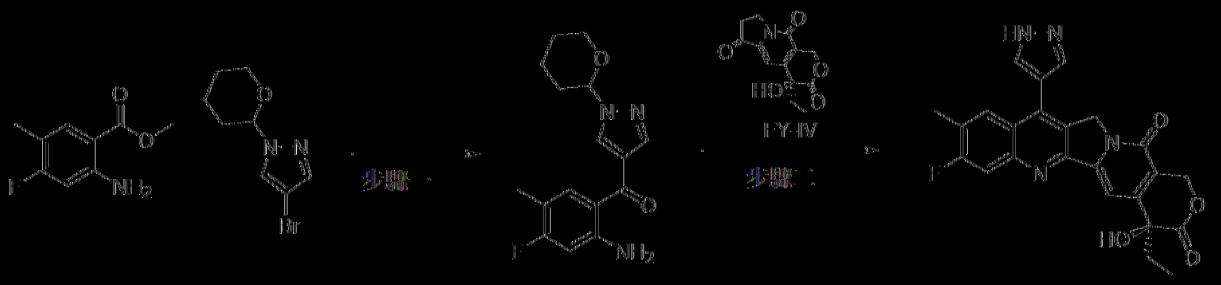
【0670】s：單峰(singlet)、d：二重峰(doublet)、t：三重峰(triplet)、q：四重峰(quartet)、dd：雙二重峰(double doublet)、qd：四二重峰(quartet doublet)、ddd：雙雙二重峰(double double doublet)、ddt：雙雙三重峰(double double triplet)、dddd：雙雙雙二重峰(double double double doublet)、m：多重峰(multiplet)、br：寬峰(broad)、J：偶合常數、Hz：赫茲、DMSO-d_6：氘化二甲基亞碸。δ值用ppm值表示。

【0671】質譜(MS)的測定儀器使用Agilent (ESI)質譜儀，型號為Agilent 6120B。

【0672】一、生物活性分子和合成“藥物-連接體化合物”過程使用的中間體的合成

【0673】A、生物活性分子的合成

[06/4] 實施例A1.1： (S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-側氧基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]-吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.1）的合成

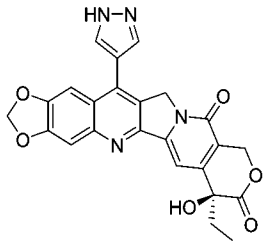


步驟一：4-溴-1-(四氫-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑（4.6g）溶於無水四氫呋喃中（50ml），上述溶液在氮氣保護下乾冰-丙酮冷卻到-78°C，然後滴加正丁基鋰（12ml, 2M），反應液在-78°C攪拌20分鐘，然後加入2-胺基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯（1.83g），加完後，反應自然升至室溫，並連續攪拌反應5小時。反應中甲醇（3ml）猝滅後加入乙酸乙酯（200ml），溶液用水洗（100ml x 3），有機相乾燥後除去有機溶劑，用矽膠柱色譜分離得到目標產物(2-胺基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氫-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮，ESI-MS (m/z): 304 [M+H]+。

步驟二： (S)-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃[3,4-f]中氮茚並-3,6,10(4H)-三酮（2.63g），(2-胺基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氫-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮 (3.03g), 對-甲苯磺酸（1.74g）溶於二氯甲烷（50ml）中，然後除去溶劑，混合物在氮氣保護下加熱至120°C反應4小時。混合物溶於乙酸乙酯（300ml），有機相水洗（100ml x 2），乾燥後除去有機溶劑，殘留物用矽膠柱層析分離得到目標產物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-側氧基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]-吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮

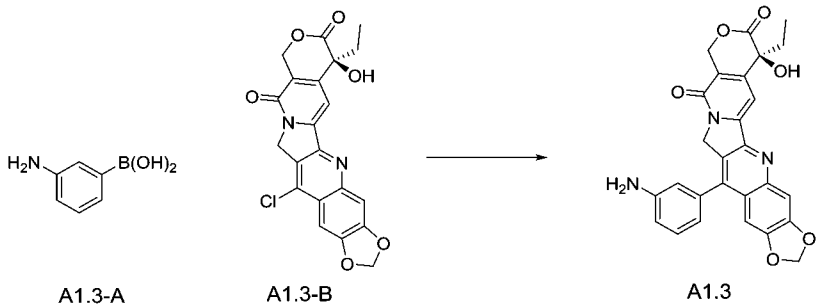
（A1.1）。ESI-MS (m/z): 447 $[M+H]^+$。

【0675】實施例A1.2： (S)-7-乙基-7-羥基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7] 吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.2）的合成



用實施例A1.1相同的方法和反應條件，用6-胺基苯並[d][1,3]二氧環戊烷-5-羧酸甲酯代替2-胺基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯，得到目標產物 (S)-7-乙基-7-羥基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.2）。ESI-MS (m/z): 459 $[M+H]^+$。

【0676】實施例A1.3：(S)-14-(3-胺基苯基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.3）的合成

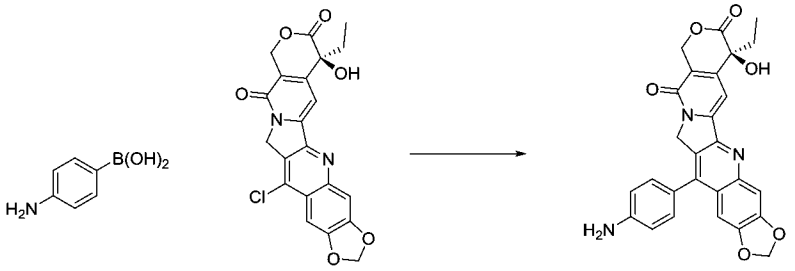


A1.3-A　　A1.3-B　　A1.3

化合物（A1.3-A）（1.4g），化合物（A1.3-B）（2.2g），$Pd_2(DBA)_3$ (300 mg)，三環已基磷（300 mg），醋酸鉀（1.1g）依次加入二氧六環（30ml）和水（5ml）的混合溶劑中，混合物在氮氣保護下100°C加熱攪拌反應12小時。冷卻後加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml），乾燥後，矽膠柱層析分離

得到目標產物 (S)-14-(3-胺基苯基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.3）。ESI-MS (m/z): 484 $[M+H]^+$。

【0677】實施例A1.4：(S)-14-(4-胺基苯基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.4）的合成



A1.4-A　　A1.4-B　　A1.4

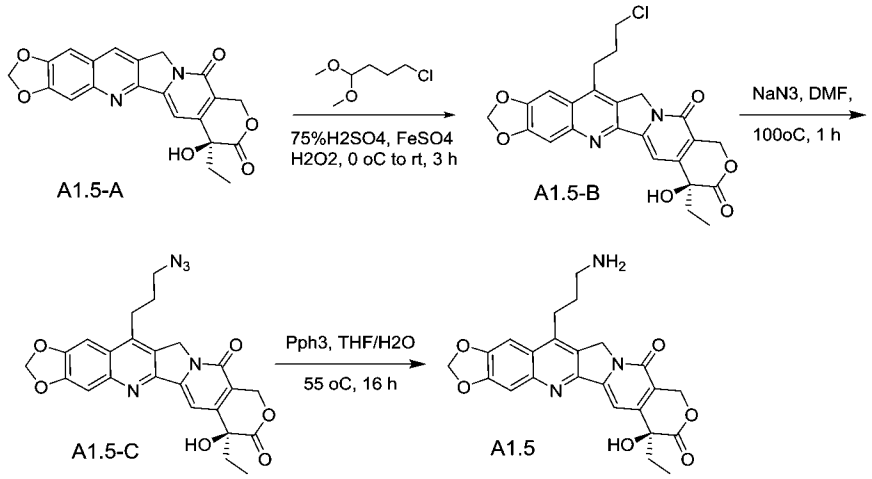
化合物（A1.4-A）（1.4g），化合物（A1.4-B）（2.2g），$Pd_2(DBA)_3$(300mg)，三環己基磷（300mg），醋酸鉀（1.1g）依次加入二氧六環（30ml）和水（5ml）的混合溶劑中，混合物在氮氣保護下100°C加熱攪拌反應12小時。冷卻後加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml），乾燥後，矽膠柱層析分離得到目標產物 (S)-14-(4-胺基苯基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.4）。

ESI-MS (m/z): 484 $[M+H]^+$；

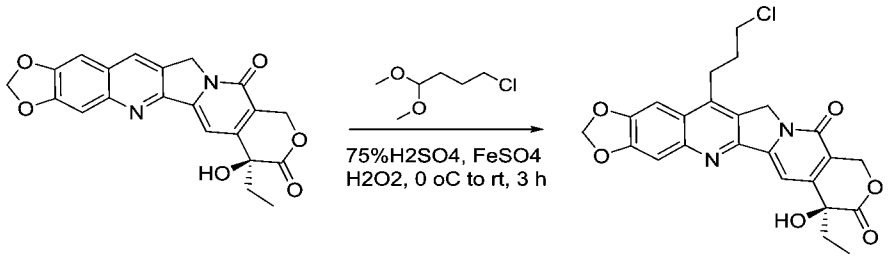
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.56 (s, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.26 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 1.96 – 1.78 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

【0678】實施例A1.5：(S)-14-(3-胺基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-

[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.5）的合成



步驟一：(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

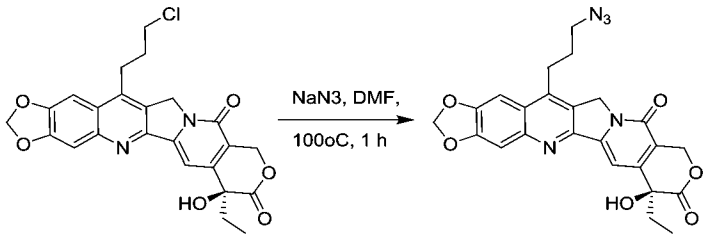


冰浴條件下，向化合物（*S*） 7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]茚並[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.5-A，500 mg）的75%硫酸溶液（5 mL）中加入七水合硫酸亞鐵（570 mg七水合硫酸亞鐵溶於1mL水中)，和4,4-二甲氧基氯丁烷（3.89 g），反應液攪拌三分鐘後滴加雙氧水（29%，2.5 mL）。反應液在0 °C下攪拌反應5分鐘後升至室溫，並攪拌反應3小時。反應液加入水（50 mL）稀釋，乙酸乙酯（80 mL×2）萃取，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗產品，粗產品用C18柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物（黃色固體，400 mg，收率：67%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：468.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

步驟二：(S)-14-(3-疊氮基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成



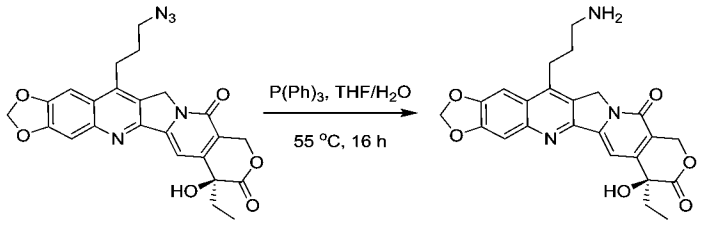
向化合物(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（200 mg）的N, N-二甲基甲醯胺溶液（3 mL）中，加入疊氮化鈉（284 mg），反應液在100 ℃下攪拌反應1小時。向反應液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（60 mL×2）萃取，有機相用經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物(S)-14-(3-疊氮基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（黃色固體，180 mg ，收率：88%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：476；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.53 – 3.49 (m, 2H), 3.16 – 3.12 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

步驟三：(S)-14-(3-胺基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環

戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

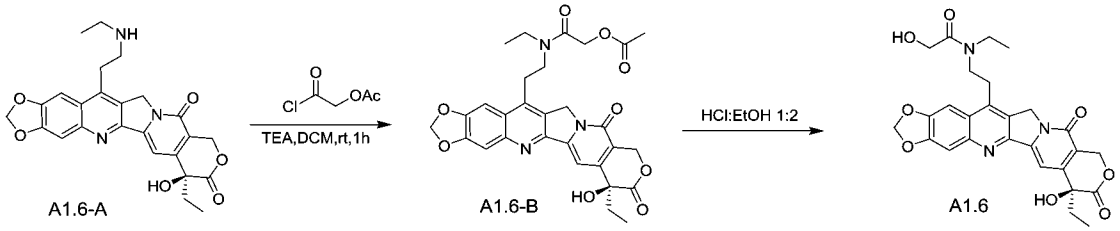


向化合物(S)-14-(3-疊氮基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成（130 mg，0.274 mmol）的四氫呋喃（3 mL）和水（1 mL）混合溶液中加入三苯基膦（108 mg，0.411 mmol），在 55 ℃下反應 16 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入水（5 mL），用 2N 鹽酸（3 mL）調至酸性，用乙酸乙酯（10 mL）萃取。水相經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物(S)-14-(3-胺基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成 (A1.5，黃色固體，15 mg, 收率：12%)。

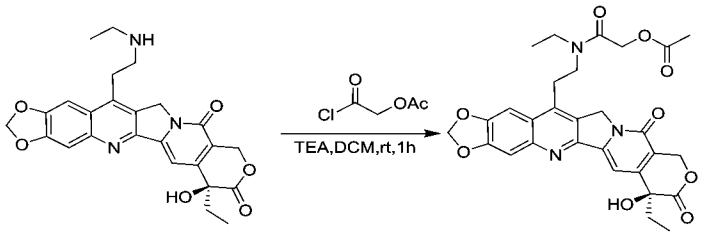
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：449.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 3.15 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.03 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.96 – 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0679】實施例A1.6：(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.6）的合成



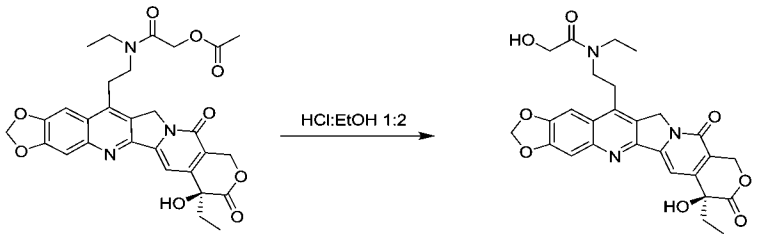
步驟一：（S） -2-（乙基（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）胺基）-2-氧乙基乙酸酯（A1.6-B）的製備：



將化合物（S） -7-乙基-14-（2-（乙胺基）乙基）-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.6-A，50 mg），乙醯氧基乙醯氯，（73 mg），三乙胺（50 mg）依次加入二氯甲烷（5 mL）中，室溫攪拌反應 1 小時。反應液旋蒸除去溶劑，得到粗品油狀化合物 75mg。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：564.2。

步驟二：(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.6）的合成



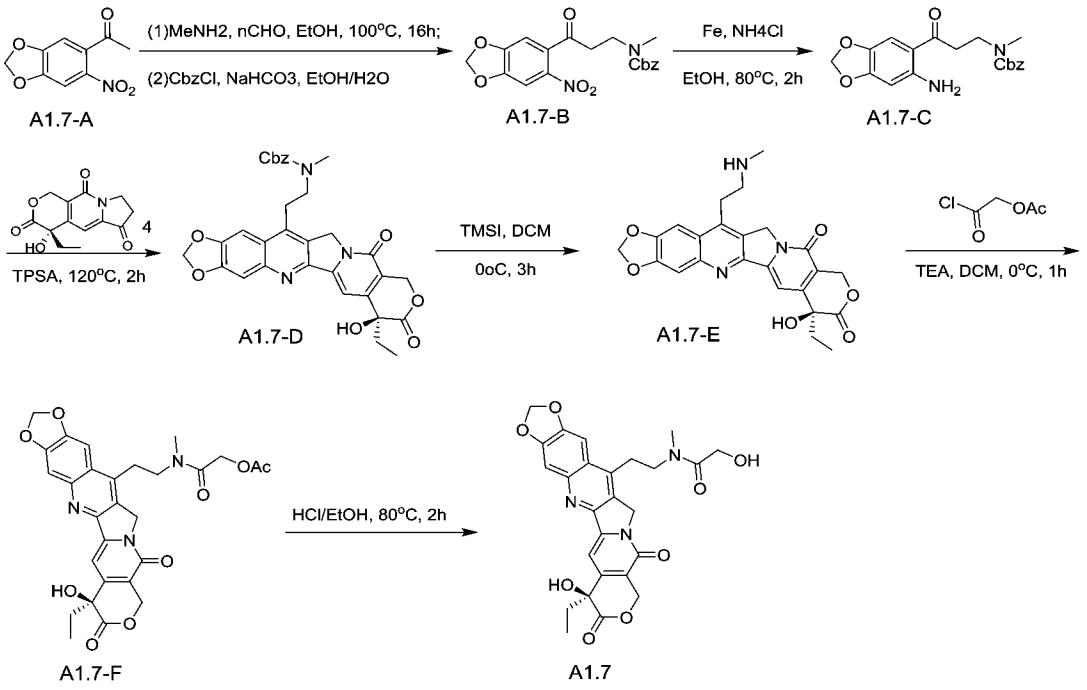
將粗品化合物（S）-2-（乙基（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四

氫-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）胺基）-2-氧乙基乙酸酯（75mg，0.13 mmol）溶在濃鹽酸和無水乙醇混合溶液（體積比為 1/2，3 mL）中，然後反應液 85 ℃回流反應 1 小時。LCMS 顯示反應完成。反應液濃縮，粗產品經製備色譜(0.01% 三氟乙酸的水溶液，乙腈)純化得到目標化合物(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.6）（15 mg，收率：26%）為白色固體。

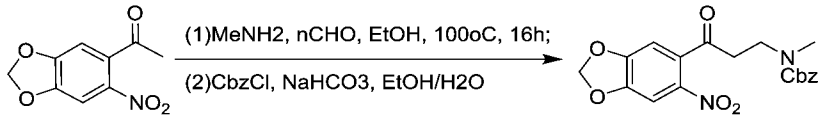
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：522.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.92 (s, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.34 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.07 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 2.00 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.16 – 1.04 (m, 3H), 0.89 – 0.83 (m, 3H)。

【0680】實施例A1.7：(S)-N-甲基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.7）的合成



步驟一：化合物甲基苄基（3-（6-硝基苯並[d][1,3]二氧雜環-5-基）-3-氧丙基）胺基甲酸酯的製備



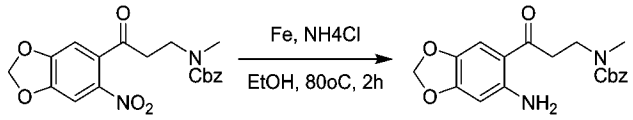
將化合物1-（6-硝基苯並[*d*][1,3]二噁英-5-基）乙烷-1-酮（A1.7-A，500 mg），甲胺鹽酸鹽（1.6 g）和多聚甲醛（714 mg）溶在乙醇（8 mL）中，100°C下悶罐反應16小時。反應液降至室溫並減壓濃縮，所得殘渣用二氯甲烷（80 mL）溶解，有機相經水（50 mL × 3）萃取。所得水相用碳酸氫鈉調至PH=9，然後加入氯甲酸苄酯（513 mg, 3.0 mmol），在室溫下反應16小時。反應液用乙酸乙酯（30 mL × 3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濃縮得到粗品，粗產品經C18分離純化 (乙腈/水含0.05%甲酸=5~95%)得到目標化合物（A1.7-B，180 mg，收率23%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：387.1.

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H), 7.35 (m, 5H), 7.32 (m, 1H), 6.17 (s,

2H), 5.13 (s, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.03 (m, 3H), 2.99 – 2.86 (m, 2H)。

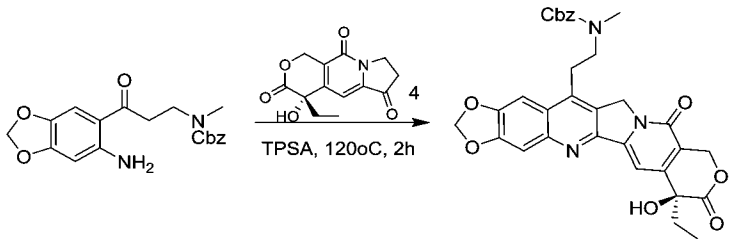
步驟二：化合物苄基（3-（6-胺基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）（甲基）胺基甲酸酯（A1.7-C）的製備



將化合物A1.7-B甲基苄基（3-（6-硝基苯並[d][1,3]二氧雜環-5-基）-3-氧丙基）胺基甲酸酯（180 mg, 0.47 mmol）溶於飽和氯化銨水溶液（8 mL）和乙醇（8 mL）混合溶液中，然後向反應液中加入鐵粉（130 mg），反應在80°C下攪拌2小時。將反應液過濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經TLC分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=2/1)得到目標化合物 A1.7-C（76 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：357.0。

步驟三：苄基（S）-（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）胺基甲酸酯（A1.7-D）的製備

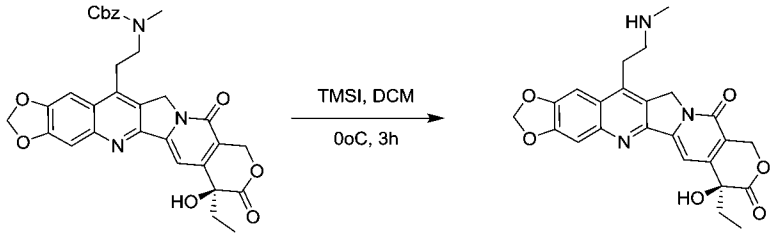


室溫下，將化合物A1.7-C苄基（3-（6-胺基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）（甲基）胺基甲酸酯（38 mg），化合物（S） -4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲哚啉-3,6,10（4H）-三酮（29 mg） 和對甲苯磺酸（23 mg）溶於二氯甲烷（5 mL）溶液中，溶液澄清混勻後減壓濃縮，用油泵抽至真空，反應在120°C真空下反應2小時。將反應液降至室溫，加入

水（30 mL）並用二氯甲烷（30 mL × 3）萃取。合併有機相依次經無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物A1.7-D（50 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 584.0。

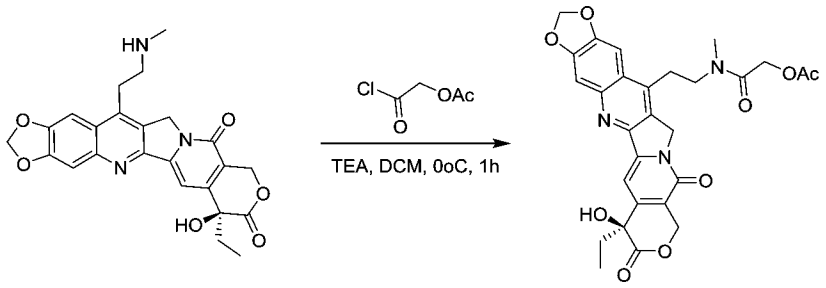
步驟四：（S） 7-乙基-7-羥基-14-（2-（甲胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.7-E）的製備



室溫下，將化合物 A1.7-D 苄基（S）-（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）胺基甲酸酯（50 mg）溶於二氯甲烷（5 mL）溶液中，於 0°C 下加入三甲基碘矽烷（51 mg，0.26 mmol），反應 3 小時。將反應液濃縮除去溶劑，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到褐色固體化合物 A1.7-E（15 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：450.0。

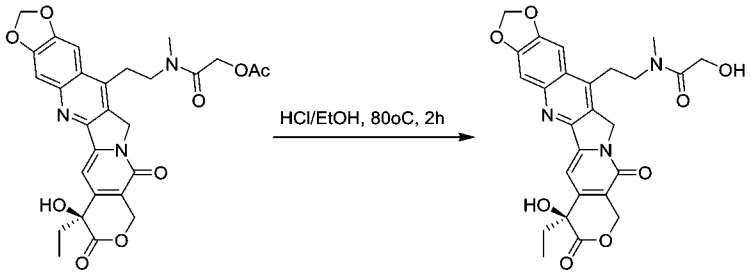
步驟五：化合物（S） -2-((2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）胺基）-2-氧乙基乙酸酯（A1.7-F）的製備



將化合物 A1.7-E（S） 7-乙基-7-羥基-14-（2-（甲胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（15 mg）和三乙胺（15 mg）溶於二氯甲烷（5 mL）溶液中，於 0°C 下加入乙醯氧基乙醯氯（20 mg）反應 1 小時。將反應液濃縮除去溶劑得到粗品，所得固體直接用於下一步，未做進一步純化。

LCMS (ESI) $[M5+H]^+$ = 550.1。

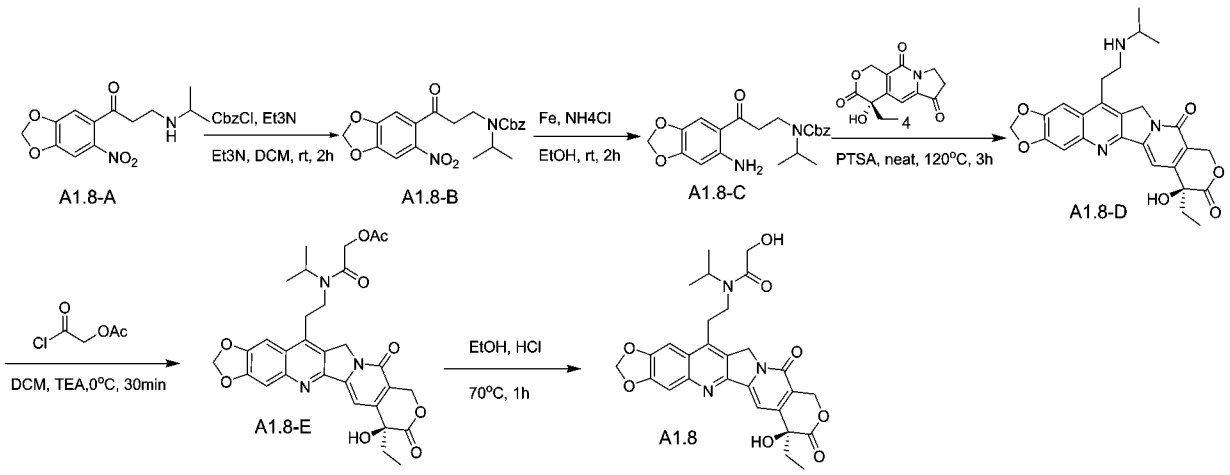
步驟六：化合物（S） -N-（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）-2-羥基-N-甲基乙醯胺（A1.7）的製備



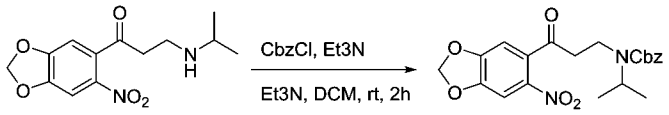
將化合物 A1.7-F（S） -2-((2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基）乙基)（甲基）胺基）-2-氧乙基乙酸酯（15 mg）溶於乙醇（5 mL）溶液中，加入濃鹽酸（1.5 mL），於 80°C 下反應 2 小時。將反應液濃縮除去溶劑，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到白色固體化合物 A1.7（1.6 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：508.2。

【0681】實施例A1.8：(S)-N-異丙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.8）的合



步驟一：化合物異丙基苄基（3-（6-硝基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）胺基甲酸酯（A1.8-B）的製備



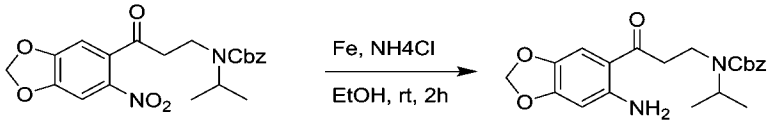
向化合物（A1.8-A）3-（異丙胺基）-1-（6-硝基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）丙-1-酮（900 mg）的二氯甲烷溶液（10 mL）中，依次加入三乙胺（1.8 g）和苄氧基碳醯氯（734 mg，4.3 mmol），在室溫下反應2小時。反應液加水（50 mL）稀釋，用二氯甲烷（50 mL×3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗品，粗產品經柱層析分離純化（石油醚：乙酸乙酯=3/1)得到目標化合物（A1.8-B）（600 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：414.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, 1H), 7.34 (br s, 6H), 6.31 (s, 2H),

5.08 (s, 2H), 4.14 – 4.10 (m, 1H), 3.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.03 (s, 2H), 1.13 - 1.11 (m, 6H)。

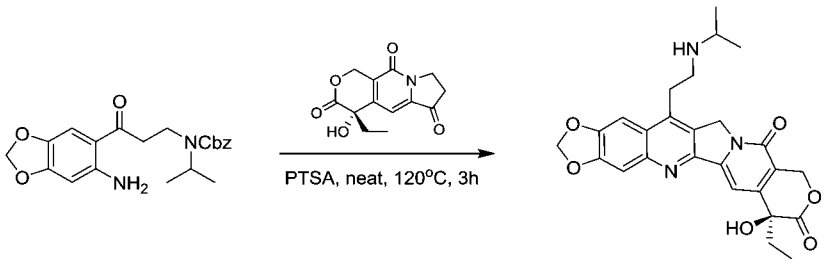
步驟二：化合物苄基（3-（6-胺基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）（異丙基）胺基甲酸酯（A1.8-C）的製備



將化合物（A1.8-B）異丙基苄基（3-（6-硝基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）胺基甲酸酯（200 mg, 0.48 mmol）溶於飽和氯化銨（3 mL）和乙醇（3 mL）混合溶液中，然後向反應液中加入鐵粉（135 mg），反應在室溫下攪拌 2 小時。將反應液過濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=3/1)得到目標化合物（A1.8-C）（65 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：395.2。

步驟三：（S） 7-乙基-7-羥基-14-（2-（異丙胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.8-D）的製備



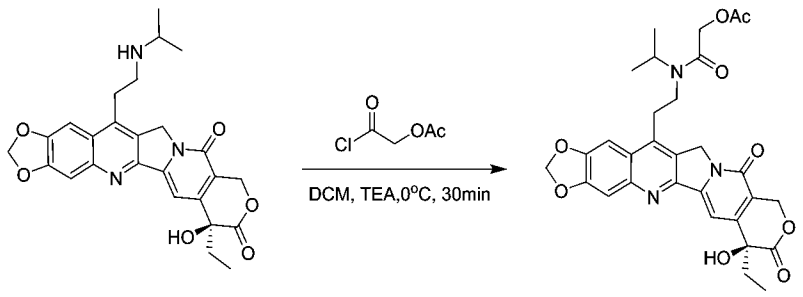
室溫下，將化合物（A1.8-C）苄基（3-（6-胺基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）（異丙基）胺基甲酸酯（65 mg），化合物（S） -4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲哚啉-3,6,10（4H）-三酮（45 mg）和對甲苯磺酸（33 mg，0.17 mmol）溶於二氯甲烷（10 mL）溶液中，溶液澄清混勻

後減壓濃縮，用油泵抽至真空，反應在 120°C 真空下反應 2 小時。將反應液降至室溫，加入水（50 mL），用二氯甲烷（30 mL×3）萃取，合併有機相依次並無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷/甲醇=10/1)得到目標化合物（A1.8-D）（40 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：478.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.46 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.33 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 3.41 (br s, 2H), 3.23 (br s, 3H), 1.94 – 1.78 (m, 2H), 1.25 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

步驟四：化合物（（S） -2-（（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（異丙基）胺基）-2-氧代乙酸乙酯（A1.8-E）的製備

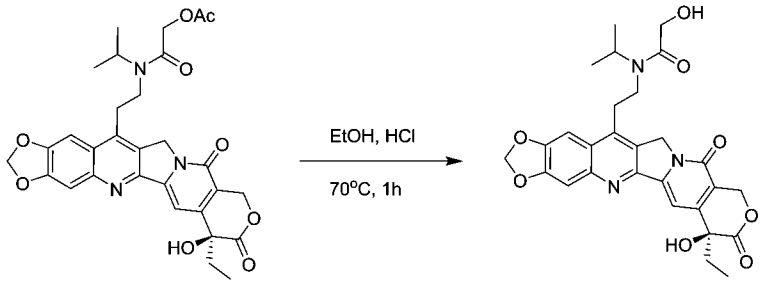


冰浴下，向化合物（S） -7-乙基-7-羥基-14-（2-（異丙胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.8-D）（40 mg）的二氯甲烷溶液（2 mL）中加入三乙胺（35 mg），2-氯-2-氧乙基乙酸酯（57 mg），在零度下反應 30 分鐘。將反應液減壓濃縮得到化合物 A1.8-E，直接應用於下一步。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：578.0。

步驟五：化合物（S） -N-（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-

10H-[1,3]二氧並[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）-2-羥基-N-異丙基乙醯胺（A1.8）的製備

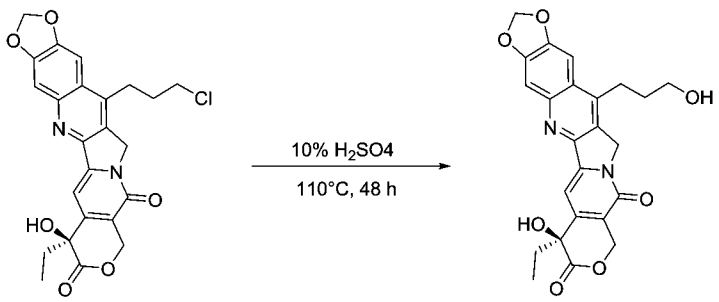


向化合物（S） -2-（（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（異丙基）胺基）-2-氧代乙酸乙酯（A1.8-E，50 mg）的乙醇溶液（3 mL）中，加入濃鹽酸（0.5 mL），在 70°C 下反應 1 小時。將反應液濃縮得到粗產品。再經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物（A1.8，3 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：464.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.99 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.99 – 3.94 (m, 1H), 3.44 (dd, *J* = 16.7, 7.8 Hz, 2H), 3.33 – 3.21 (m, 2H), 1.95 – 1.79 (m, 2H), 1.19 (dd, *J* = 16.4, 5.8 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

【0682】實施例A1.9：(S)-7-乙基-7-羥基-14-(3-羥基丙基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.9）的合成

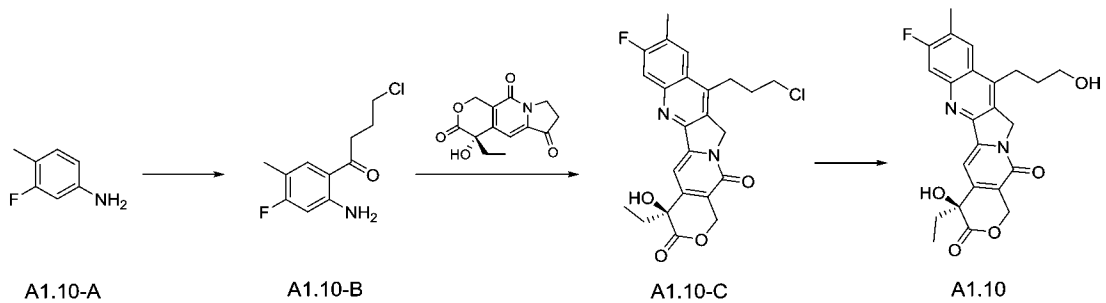


將化合物(S)-7-乙基-7-羥基-14-(3-氯丙基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（100 mg，0.213 mmol）溶於 10%硫酸（5 mL）溶液中，反應在 110°C 下反應 48 小時。向反應液中加入飽和碳酸氫鈉（30 mL）溶液，用二氯甲烷（10 mL X 5）萃取，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到粗產品。經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到(S)-7-乙基-7-羥基-14-(3-羥基丙基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.9，1.78 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：451.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.63 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.47 – 5.37 (m, 2H), 5.32 – 5.19 (m, 2H), 3.51 – 3.46 (m, 2H), 3.17 – 3.13 (m, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 4H), 0.90 – 0.84 (m, 3H)。

【0683】實施例A1.10：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-羥基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.10）的合成



步驟一：0°C 下，向化合物 A1.10-A（10 g ）的 1,2-二氯乙烷（200 mL）溶液，滴加 1mol/L 三氯化硼（96 mL），4-氯丁腈（9.9 g）。80 ℃下攪拌反應 2 小時。反應液降至室溫，加入 2 mol/L 鹽酸 (90 mL)並在 80 ℃下回流攪拌 0.5 小時。反應液降至室溫, 加入少量水稀釋，用二氯甲烷（200 mL X 3）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濃縮得到粗品，粗產品經柱層析分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=10/1)得到目標化合物 A1.10-B（4 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：230.0。

步驟二：向化合物 A1.10-B（50 mg）中加入（S） -4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲哚啡-3,6,10（4H）-三酮（35 mg），一水合對甲苯磺酸（41.4 mg），溶於二氯甲烷（30 mL）溶液中，溶液澄清混勻後減壓濃縮，用油泵抽至真空，反應在 120°C 真空下反應 3 小時。LCMS 顯示反應完全。將反應液降至室溫，加入水（20 mL），用二氯甲烷（20 mL X 3）萃取。合併有機相依次並無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到粗產品。粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷比甲醇=20 比 1)得到目標化合物 A1.10-C（80 mg）為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：457.0。

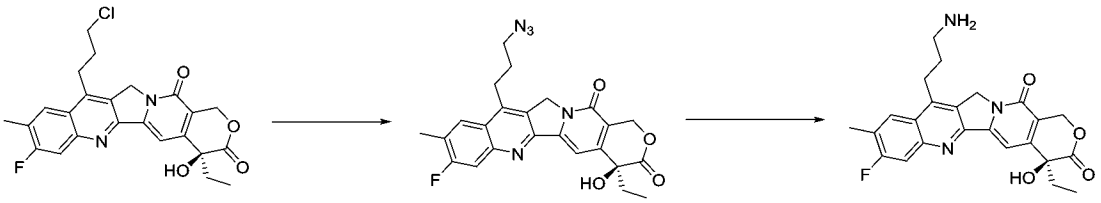
步驟三：將化合物 A1.10-C（75 mg）溶於六甲基磷醯三胺，加入純水（0.8 mL）反應液在 100 °C 下攪拌 72 小時。LCMS 檢測反應完成。經製備色譜(0.01% TFA in water，MeCN)純化得到目標化合物（10 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：439.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.67 (t, *J* = 4.9 Hz,

1H), 3.55 – 3.47 (m, 2H), 3.28 – 3.20 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.93 – 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0684】實施例 A1.11：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.11）的合成



步驟一：向 A1.10-C（395 mg）的 N'N-二甲基甲醯胺（10 mL）溶液中加入疊氮化鈉 (432 mg)，反應液 80 °C 反應 16 小時，然後冷卻至室溫，加入水（50 mL）稀釋，用乙酸乙酯（80 mL*3）萃取，合併有機相，無水硫酸鈉乾燥，抽濾濃縮得到目標產物 A1.11-A（290 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：464.0。

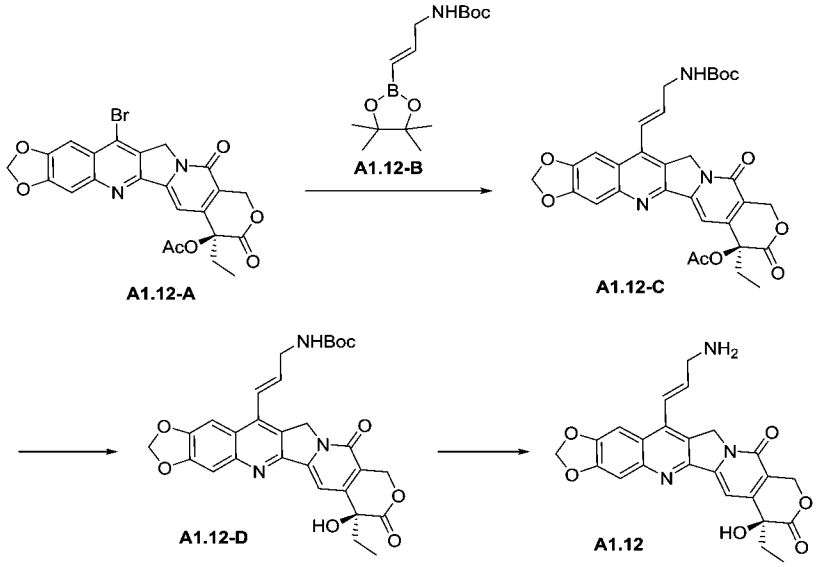
步驟二：將化合物 A1.11-A（93 mg）溶於四氫呋喃（5 mL）中，加入三苯基膦（78 mg），室溫反應 4 小時。然後向反應液中加入鹽酸（4M，1mL），反應液升至 55 °C 反應 16 小時，LCMS 監測反應完全。反應液直接濃縮，粗品經過反相柱（流動相 A 為 0.05%甲酸水溶液，B 為乙腈）提純得到目標產物 A1.11（28 mg，收率：36%）為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：438.4；

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.52 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 5.49 (ABq, *J* = 78.9, 16.3 Hz, 2H), 5.31 (br s, 2H), 3.35 – 3.32 (m, 2H), 3.22 – 3.10 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.13 – 2.11 (m, 2H),

1.96 – 1.94 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)。

【0685】實施例A1.12：(S,E)-14-(3-胺基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.12）的合成



步驟一：將化合物 A1.12-A（200 mg，0.39 mmol），化合物 A1.12-B（112 mg，0.39 mmol），氟化銫（152 mg，0.975 mmol）和四三苯基膦鈀（45 mg，0.039 mmol）加入 1,4-二氧六環溶液（8 mL）。在氮氣氣氛下 120°C 微波反應 0.5 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液加入二氯甲烷（20 mL）和甲醇（10 mL）混合溶液稀釋，過濾。濾液濃縮，粗品通過製備 TLC 純化（二氯甲烷：甲醇=30:1）得到目標化合物 (S,E)-14-(3-((第三丁氧羰基)胺基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-7-基 乙酸酯（A1.12-C，60 mg，收率：26%）為棕色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 590.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.63 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.09

(d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.45 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.34 – 5.24 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 2.21 (br s, 3H), 2.03 – 1.96 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.91 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H).

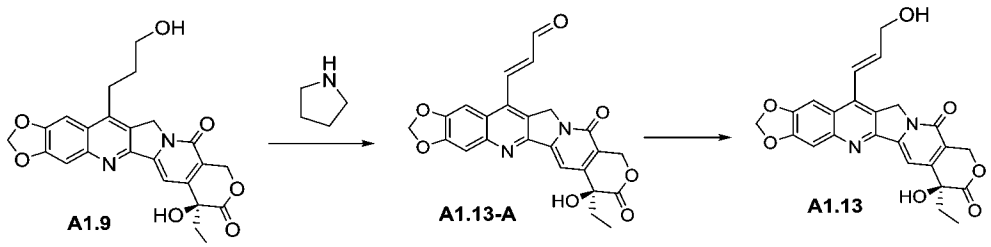
步驟二：向化合物(S,E)-14-(3-((第三丁氧羰基)胺基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-7-基乙酸酯（A1.12-C ，50 mg，0.085 mmol）的甲醇溶液（15 mL）和加入甲醇鈉（9.2 mg，0.17 mmol），在 50℃下攪拌反應 2 小時。LCMS 顯示反應完全。將反應液濃縮得到目標化合物(S,E)-14-(3-((第三丁氧羰基)胺基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.12-D，50 mg）粗品為棕色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 548；

步驟三：向化合物(S,E)-14-(3-((第三丁氧羰基)胺基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.12-D，50 mg，0.091 mmol）的二氯甲烷溶液（2 mL）中，加入三氟乙酸（1 mL），在室溫下攪拌反應 30 分鐘。LCMS 顯示反應完全。將反應液濃縮，粗品經高效液相製備純化（乙腈/0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物(S,E)-14-(3-胺基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.12）（8.1 mg，收率 21%）為棕色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 448.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.20 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 – 6.46 (m, 2H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H),

5.27 (s, 2H), 3.86 (br s, 2H), 1.90 – 1.83 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

【0686】實施例A1.13：(S,E)-14-(3-羥基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.13）的合成



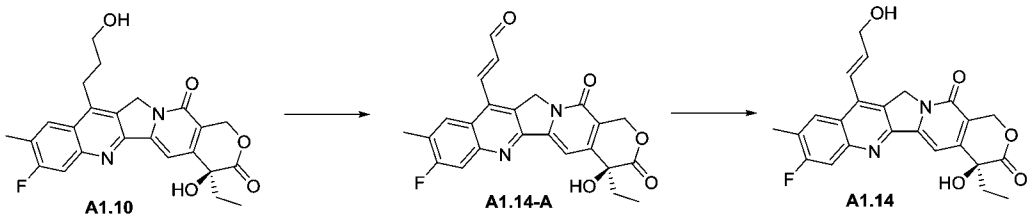
步驟一：將化合物 A1.9 (200 mg, 0.444 mmol) 溶在二甲亞碸 (2 mL) 中，加入 IBX (311 mg, 1.11 mmol)，室溫下攪拌 2 小時，然後補加入 IBX (186 mg, 0.666mmol) 於反應液中，再向反應液中加入四氫吡咯（6.3 mg, 0.089 mmol）和乙腈（3 mL）,反應液在室溫下攪拌過夜。LCMS 檢測反應完成, 用乙酸乙酯萃取 (20 mL x 3)，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，旋乾，得到粗產品，粗產品通過矽膠柱純化(DCM : MeOH = 50 : 1 to 10 : 1) 得到目標化合物(S,E)-14-(3-氧代-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.13-A，100 mg, 純度 50.0 %, 收率 25.0%) 為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 447.1。

步驟二：將化合物 A1.13-A (40 mg, 0.09 mmol) 溶在四氫呋喃 (1 mL) 中,然後向反應液中加入氰基硼氫化鈉(28 mg, 0.448mmol), 在室溫下攪拌過夜。LCMS 顯示反應完成。將反應液濃縮得粗產品，粗產品純化通過 prep-HPLC (HCl in water/MeCN) 得目標化合物 (3.56 mg, 純度 93.6 %, 收率 9.0 %) 為淡黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 449.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.61 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 6.69 – 6.59 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 5.16 (br s, 1H), 4.34 (br s, 2H), 1.93 – 1.81 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

【0687】實施例A1.14：(S,E)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-羥基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉--3,14(4H)-二酮（A1.14）的合成



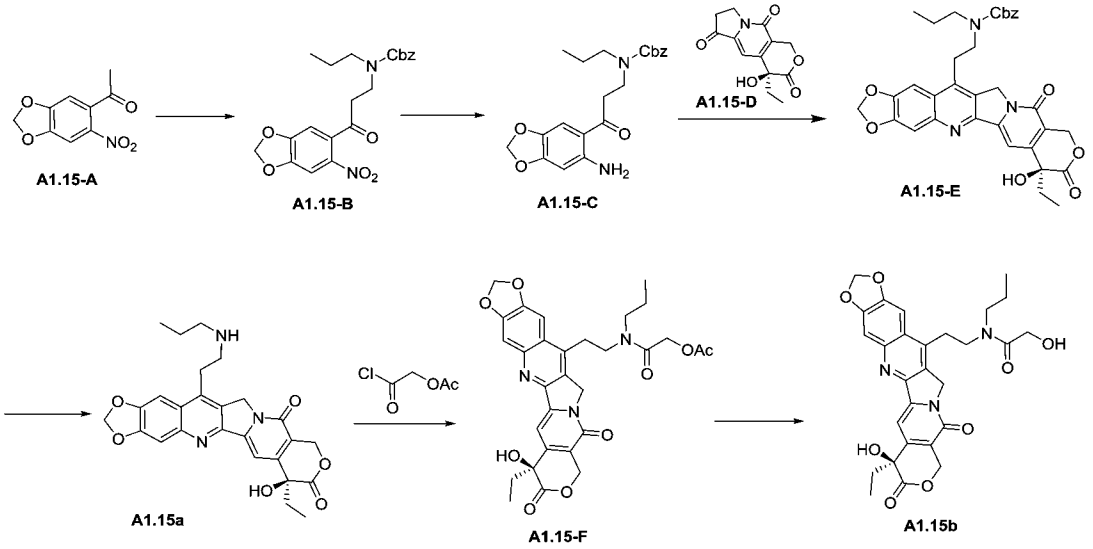
步驟一：向 25 mL 的單口瓶中加入化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-（3-羥丙基）-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮（A1.10，100 mg, 0.228 mmol)，DMSO(0.5 mL)和乙腈(0.75 mL)，依次加入 IBX(160 mg, 0.571 mmol)和(*R*)-二苯基(吡咯烷-2-基)甲醇 (12 mg, 0.047 mmol)，室溫下繼續攪拌反應 16 小時，然後向反應液中加入甲醇和二氯甲烷混合溶劑 (200 mL)（DCM:MeOH=10:1），飽和食鹽水(300 mL)萃取，合併有機相，水洗、乾燥、過濾，濾液減壓蒸乾溶劑得粗品，粗品用快速 Flash 純化（DCM:MeOH=10:1）得到目標化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-（3-氧代丙基）-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮 (A1.14-A, 40 mg，收率 40%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 435.1.

步驟二：向 50 mL 的三口瓶中加入化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-（3-氧代丙基）-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮 (A1.14-A, 40 mg, 0.228 mmol)，無水 THF(5 mL)，N_2 保護下降溫至-78℃，緩慢滴加三第二丁基硼氫化鋰的 THF 溶液(0.11 mL，1N)，保持-78℃繼續攪拌 1 小時。反應完成後加入飽和氯化銨水溶液淬滅反應，升至室溫，用飽和食鹽水稀釋(50 mL)，用乙酸乙酯萃取(20 mL X 3)，合併有機相水洗、乾燥、過濾，減壓蒸乾溶劑得到(S,E)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-羥基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉--3,14(4H)-二酮（A1.14，28 mg）為類白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 437.1。

【0688】實施例A1.15：(S)-7-乙基-7-羥基-14-(2-(正丙基胺基)乙基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.15a）和(S)-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基-N-正丙基乙醯胺（A1.15b）的合成



步驟一：將化合物 A1.15-A（5.0 g，23.9 mmol），丙基胺鹽酸鹽（22.8 g，239 mmol）和多聚甲醛（7.18 g，239 mmol）溶在乙醇（100 mL）中，110 °C 下悶罐反應 12 小時。LCMS 檢測反應完全。反應液降至室溫並減壓濃縮，向反應固體中加入二氯甲烷（100 mL），用水（80 mL X 3）洗滌，水相用碳酸氫鈉調至 pH = 9。向水溶液中加入苄氧基碳醯氯（3.7 g，21.8 mmol），在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。用二氯甲烷（100 mL X 3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濃縮得到粗品，粗產品經柱層析分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=10/1)得到目標化合物 A1.15-B（1.5 g，收率 20.1%）為黃色油狀液體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 415.1；

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H), 7.35 (m, 6H), 6.18 (s, 2H), 5.17 – 5.12 (m, 2H), 3.69 – 3.67 (m, 2H), 3.32 – 3.30 (m, 2H), 3.09 – 2.90 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 0.90 (m, 3H)。

步驟二：將化合物 A1.15-B（1.5 g, 3.63 mmol）溶在飽和氯化銨（20 mL）和乙醇（20 mL）混合溶液中，然後向反應液中加入鐵粉（1.02 g，18.1 mmol），反應在 80°C 下攪拌 1 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品用 C18 柱反相分離純化(乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 A1.15-C (600 mg, 收率 43.0%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 385.2, t_R = 1.329 min.

步驟三：室溫下，將化合物 A1.15-C（350 mg，0.91 mmol），化合物（S）-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲哚啡-3,6,10（4H）-三酮（A1.15-D，218 mg，0.83 mmol）和對甲苯磺酸（170 mg，0.87 mmol）溶

於二氯甲烷（5 mL）溶液中，溶液澄清混勻後減壓濃縮，用油泵抽至真空，反應在 120°C 真空下反應 2 小時。LCMS 顯示反應完全。將反應液降至室溫，加入水（50 mL），用二氯甲烷（30 mL X 3）萃取，合併有機相依次並無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到化合物 A1.15-E（390 mg，收率 76%）為褐色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 612.0。

步驟四：室溫下，將化合物 A1.15-E（390 mg，0.638 mmol）溶於二氯甲烷（5 mL）溶液中，0°C 氮氣保護下滴加三甲基碘矽烷（510 mg，2.55 mmol），反應體系室溫攪拌 2 小時。向反應液中加入乙醚（2 mL）和濃鹽酸（4 mL），攪拌 30 分鐘，用飽和碳酸氫鈉將反應體系調至 H = 9，用二氯甲烷（50 mL X 5）萃取，合併有機相經無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到粗產品。經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到化合物 A1.15a（200 mg，收率 66.1%）為米白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 478.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.30 (s, 1H, HCO_2H), 7.67 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.62 – 6.41 (m, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.27 – 3.25 (m, 2H), 2.91 – 2.79 (m, 2H), 2.58 – 2.56 (m, 2H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.44 – 1.42 (m, 2H), 0.90 – 0.84 (m, 6H)。

步驟五：室溫下，將化合物 A1.15a（120 mg，0.251 mmol）溶於二氯甲烷（5 mL）中，0°C 下滴加化合物乙醯氧基乙醯氯（167 mg，1.25 mmol）和三乙胺（133 mg，1.25 mmol），反應在 0°C 下攪拌反應 30 分鐘。LCMS 檢測反應完全。將反應液減壓濃縮得到粗品化合物 A1.15-F（120 mg，收率

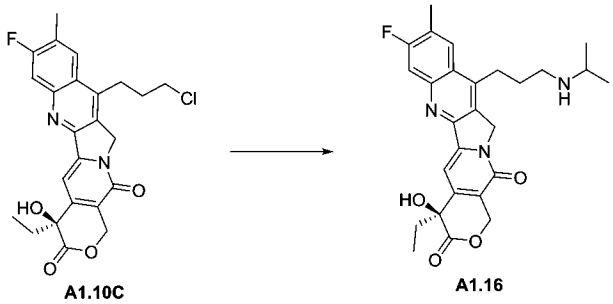
82.8%）為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 578.3。

步驟六：室溫下，將化合物 A1.15-F（120 mg，0.207 mmol）溶於乙醇（4 mL）中，然後向反應液中加入濃鹽酸（2 mL），反應在 70°C 下攪拌反應 1 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液加入水（20 mL），用二氯甲烷（30 mL X 5）萃取，合併有機相依次並無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到粗產品。經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到化合物 A1.15b（20 mg，收率 18.1%）為米白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 536.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.93 (s, 0.7H), 7.69 (s, 0.3H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.35 (s, 1.5H), 5.29 (s, 0.5H), 4.65 – 4.62 (m, 1H), 4.13 - 3.97 (m, 2H), 3.51 – 3.49 (m, 2H), 3.33 – 3.30 (m, 2H), 3.24 – 3.20 (m, 2H), 1.86 – 1.84 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 2H), 0.89 – 0.86 (m, 6H)。

【0689】實施例A1.16：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-異丙基胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.16）的合成



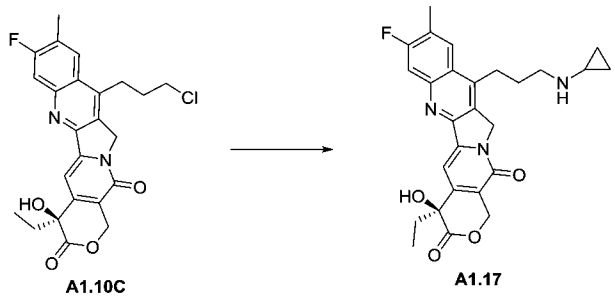
向 A1.10-C（200 mg，0.439 mmol）和異丙基胺（50 mg，0.877 mmol）的 DMF 溶液（10 mL）中加入二異丙基乙胺（170 mg，1.32 mmol）和碘化鈉（99 mg，0.659 mmol），反應在 50°C 封管下反應 2 小時。向反應液中加入

乙酸乙酯，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到粗品。粗品經 pre-TLC 分離純化 (二氯甲烷:甲醇=10:1)後得到黃色固體，化合物繼續經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到目標化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-異丙基胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.16，2.03 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 480.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H, HCO2H) 7.92 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 33.30 – 3.22 (m, 3H), 3.18 – 3.10 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.06 – 1.94 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 2H), 1.26 – 1.20 (m, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0690】實施例A1.17：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-環丙基胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.17）的合成



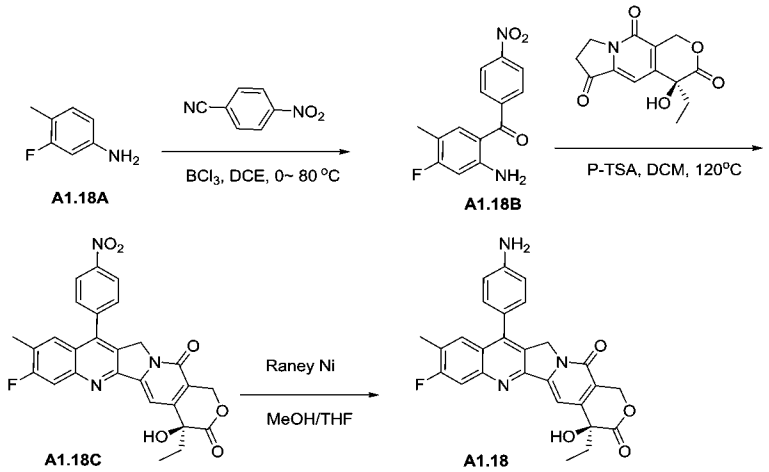
向 A1.10C（200 mg，0.439 mmol）和環丙基胺（52 mg，0.881 mmol）的 DMF 溶液（10 mL）中加入二異丙基乙胺（165 mg，1.28 mmol）和碘化鈉（96 mg，0.640 mmol），反應在 50°C 封管下反應 2 小時。 LCMS 監測反應完全。向反應液中加入乙酸乙酯，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到粗品。粗品經 TLC 分離純化 (二氯甲烷:甲醇=10:1)後繼續經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到目標化合

物(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-環丙基胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.17，5.12 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 478.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.22 (br s, 2H, one is HCO2H), 7.86 (br s, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.24 – 3.19 (m, 2H), 2.75 – 2.68 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.16 – 2.09 (m, 1H), 1.95 – 1.76 (m, 4H), 0.91 – 0.83(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.43 – 0.33 (m, 2H), 0.31 – 0.21 (m, 2H)。

【0691】實施例A1.18：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(4-胺基苯基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.18）的合成



步驟一：氮氣保護下，將3-氟-4-甲基苯胺 (A1.18A，2.0 g，16.3 mmol) 溶在1,2-二氯乙烷 (40 mL) 中，在0 °C下向其中滴加三氯化硼 (19.2 mL, 19.2 mmol) 後，再緩慢加入對硝基苯腈 (2.8 g, 19.2 mmol)，加入完畢將反應液升至80 °C攪拌過夜。將反應液冷卻至室溫向其中加入鹽酸 (40 mL, 2M)，後升溫至80 °C繼續攪拌30分鐘，經LCMS檢測反應完全後，向反應液中加入水 (80 mL)，用二氯甲烷萃取 (100 mL x 3)，合併有機相經無水硫酸鈉乾燥，過濾，旋乾，粗產品經矽膠柱色譜(PE:EA=10:1) 純化得目標化合物

(A1.18B，2.0 g, 收率46.5%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 275.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.39 (s, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H)。

步驟二：將化合物 A1.18B (620 mg，2.28 mmol)，(S)-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]中氮茚-3,6,10(4H)-三酮 (600 mg, 2.28 mmol), 對甲苯磺酸(560 mg, 2.96 mmol) 加入到反應瓶中, 用二氯甲烷將其溶解均勻，將二氯甲烷旋乾，抽真空，在真空狀態下將其加熱到 120 ℃，在此溫度下保持六個小時，經 LCMS 檢測反應完成後，向體系中加入甲醇 (10 mL)，再加入水 (80 mL) 有大量沉澱析出，沉澱過濾後乾燥得到目標化合物 (A1.18C，800 mg, 收率 80.0%) 為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 502.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.13 – 7.89 (m, 3H), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.06 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.94 – 1.84 (m, 2H), 0.87 (m, 3H)。

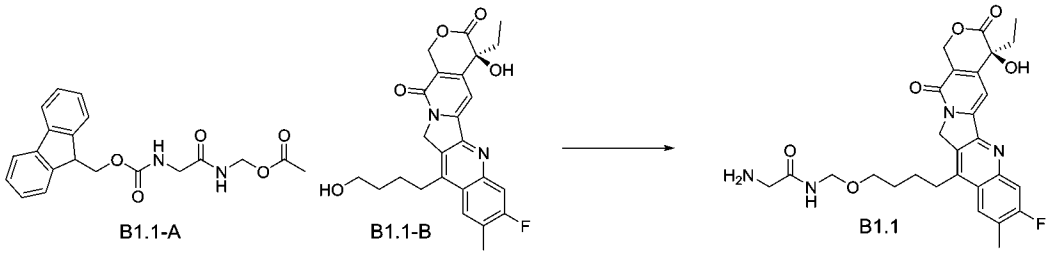
步驟三：將雷尼鎳 (609 mg, 10.5 mmol) 加入到化合物 A1.18C (1.0 g，2.1 mmol) 的甲醇 （25 mL) 和四氫呋喃 (50 mL) 混合溶液中，反應液在室溫氫氣氛圍下攪拌 5 小時。LCMS 檢測反應完全，將反應液過濾，濾液旋乾得到目標化合物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(4-胺基苯基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.18，650 mg，收率 67%) 為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 472.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.93 – 7.81 (m, 2H), 7.40 – 7.25 (m, 3H), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.93 – 1.80 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

【0692】B、含生物活性分子片段中間體的合成

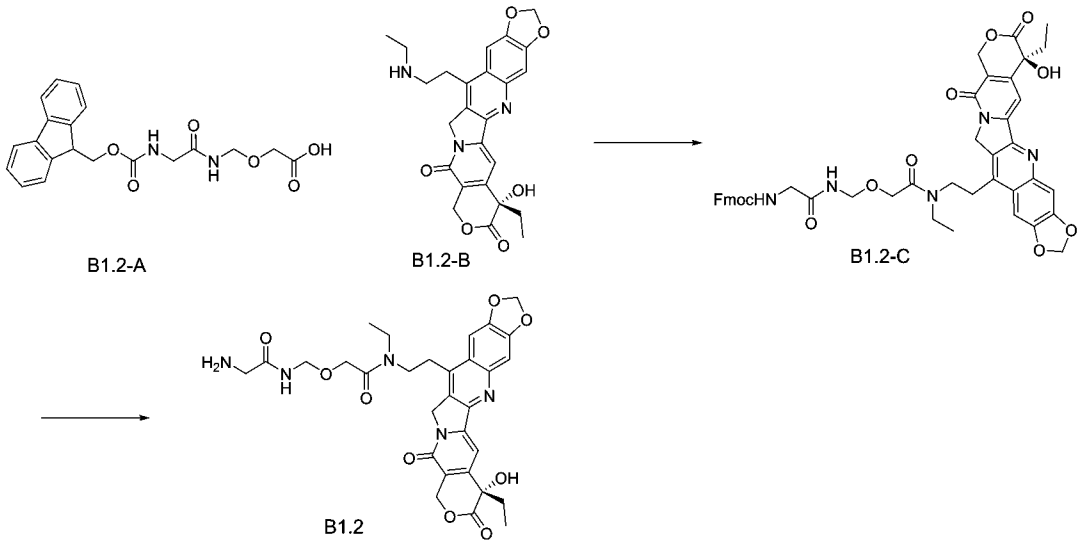
【0693】實施例B1.1：(S)-2-胺基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙醯胺（B1.1）的合成



化合物（B1.1-A）（368mg），化合物（B1.1-B）（452mg）和對甲苯磺酸吡啶鹽（PPTS）（25mg）在二氯甲烷（20ml）中回流 20 小時，然後用碳酸氫鈉水溶液和鹽酸水溶液分別洗滌，減壓除去有機溶劑，殘留物溶於 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物攪拌 20 分鐘，溶於減壓除去大部分低沸點組分，殘留物製備 HPLC 分離得到目標產物 (S)-2-胺基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙醯胺（B1.1）。

ESI-MS (m/z): 539 $[M+H]^+$。

【0694】實施例B1.2：(S)-2-((2-胺基乙醯胺基)甲氧基)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙醯胺（B1.2）的合成



步驟一：依次將化合物 B1.2-A（274 mg），二異丙基乙胺（334 mg）和 HBTU（369 mg）加入 N,N-二甲基甲醯胺（10 mL）中，隨後加入化合物 B1.2-B（300 mg）。反應液在室溫下攪拌 2 小時。向反應液中加入乙酸乙酯（50 mL），用飽和食鹽水（30 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物 B1.2-C（300 mg）。

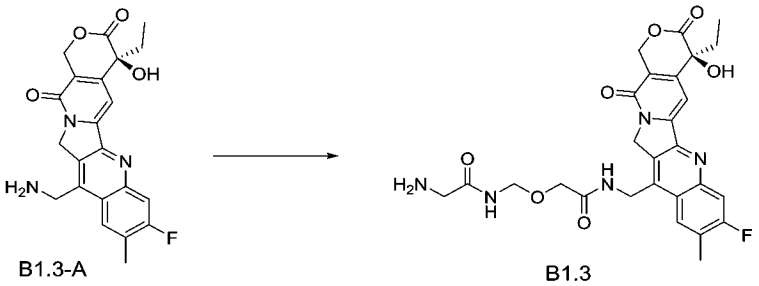
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：830.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.74 (s, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.80 – 7.67 (m, 2H), 7.65 – 7.54 (m, 2H), 7.53 – 7.46 (m, 1H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 7.25 – 7.23 (m, 1H), 6.57 – 6.44 (m, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.50 – 5.19 (m, 4H), 4.71 – 4.57 (m, 2H), 4.32 – 3.97 (m, 7H), 3.80 – 3.53 (m, 4H), 3.20 – 3.14 (m, 2H), 1.92 – 1.80 (m, 2H), 1.28 – 1.22 (m, 3H), 0.87 – 0.82 (m, 3H).

步驟二：向化合物 B1.2-C（300 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺（4 mL）溶液加入哌啶（1 mL），反應液在室溫下攪拌 20 分鐘。反應液除去低沸點組分後得到目標產物，直接用於下步合成。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 608.0。

【0695】實施例B1.3：(S)-2-胺基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基甲基胺基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙醯胺（B1.3）的合成

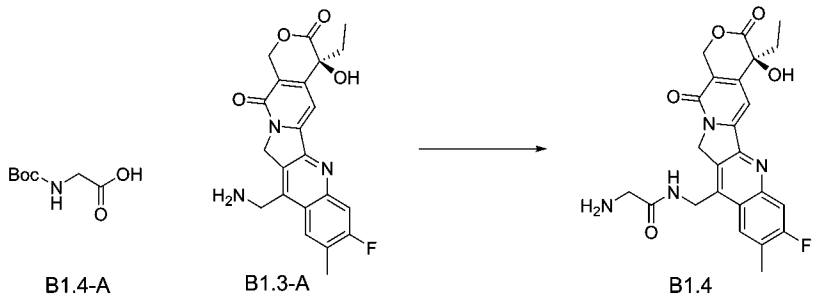


B1.3-A　　B1.3

用實施例 B1.1 相同的方法和反應條件，用化合物（B1.3-A）代替（B1.2-B），得到目標產物 (S)-2-胺基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)胺基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙醯胺（B1.3）。

ESI-MS (m/z): 554 $[M+H]^+$。

【0696】實施例B1.4： (S)-2-胺基-N-((4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙醯胺（B1.4）的合成



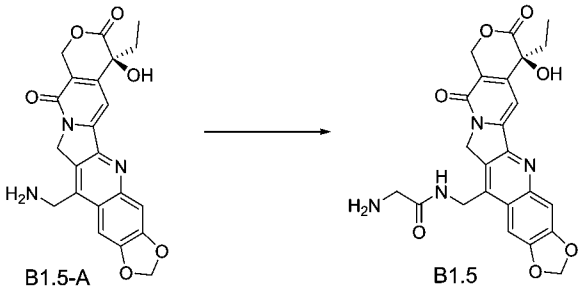
B1.4-A　　B1.3-A　　B1.4

向化合物（B1.4-A） (175mg)，化合物（B1.3-A） (409mg)的 DMF (5ml)溶液中加入 DIPEA（200ul），HBTU（420mg）。化合物室溫小攪拌反應 20 小時，混合物加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），減壓除去有機溶劑，然後向殘留物中加入 1:1 DCM/TFA（10ml），室溫放置 20 分鐘。減

壓除去低沸點組分，殘留物用製備 HPLC 分離得到目標產物 (S)-2-胺基-N-((4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙醯胺（B1.4）。

ESI-MS (m/z): 467 $[M+H]^+$。

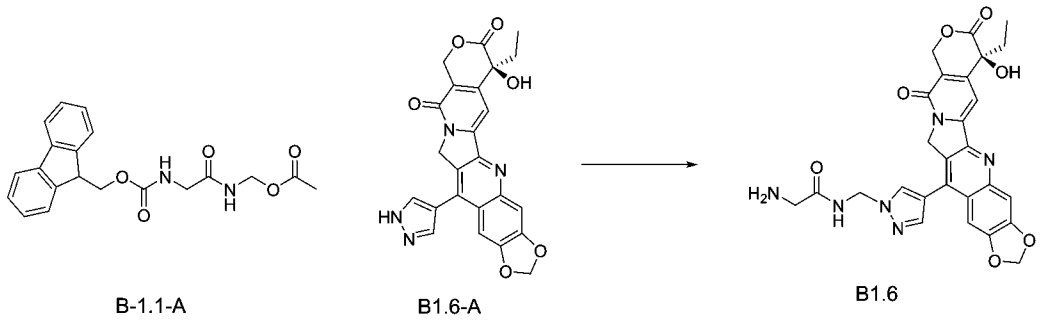
【0697】實施例B1.5：(S)-2-胺基-N-((7-乙基-7-羥基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙醯胺（B1.4）的合成



將 B1.5-A (200 mg)溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (5 mL)中，依次加入 N,N-二異丙基乙胺 (154.80 mg)，2, 5-二氧吡咯烷-1-基（第三丁氧羰基）甘胺酸(157mg)於反應液中，反應液在 25 ℃下攪拌 60 分鐘。向反應液中加入水（30 mL），抽濾，乾燥濾餅得到白色固體產物（ESI-MS (m/z): 579.4 $[M+H]^+$）。將上述白色固體產物溶於三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(體積比為 1：3；4 mL)中，反應液室溫下攪拌 1 小時。 然後將反應液濃縮得粗產品，粗產品用 C18 柱反相分離純化(乙腈/0.05%甲酸水溶液: 5%到 50%) 得到目標產物 (S)-2-胺基-N-((7-乙基-7-羥基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙醯胺（B1.5，110mg）。

ESI-MS (m/z): 479.3 $[M+H]^+$。

【0698】實施例B1.6：(S)-2-胺基-N-((4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)乙醯胺（B1.6）的合成

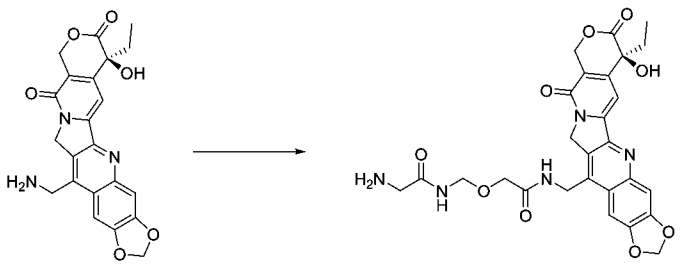


B-1.1-A　　B1.6-A　　B1.6

用實施例B1.1相同的方法和反應條件，用化合物（B1.6-A）代替化合物（B1.1-B），得到目標產物(S)-2-胺基-N-((4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)乙醯胺（B1.6）。

ESI-MS (m/z): 545 $[M+H]^+$。

【0699】實施例B1.7：(S)-2-胺基-N-((2-(((7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙醯胺（B1.7）的合成



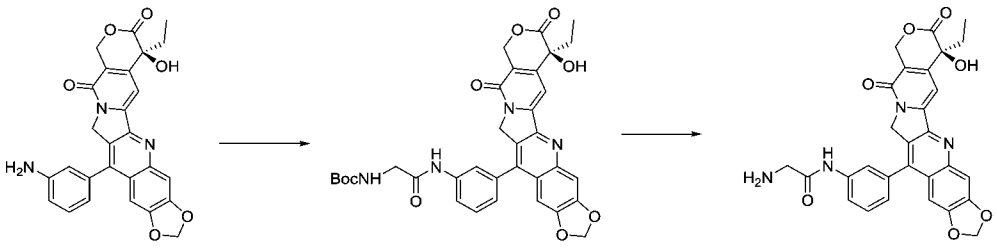
B1.5-A　　B1.7

用實施例B1.2相同的方法和反應條件，用化合物（B1.5-A）代替化合物（B1.2-B），得到含目標產物 (S)-2-胺基-N-((2-(((7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並

[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙醯胺（B1.7）的混合物，上述混合物直接用於下面合成反應。

ESI-MS (m/z): 566 [M+H]+。

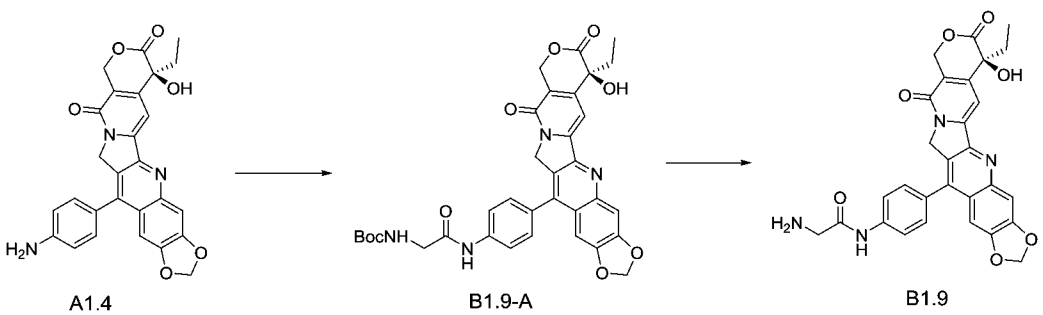
【0700】實施例B1.8：(S)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.8）的合成



用實施例B1.4相同的方法和反應條件，用化合物（A1.3）代替化合物（B1.3-A），得到目標產物(S)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.8）。

ESI-MS (m/z): 541 $[M+H]^+$。

【0701】實施例B1.9：(S)-2-胺基-N-(4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.9）的合成



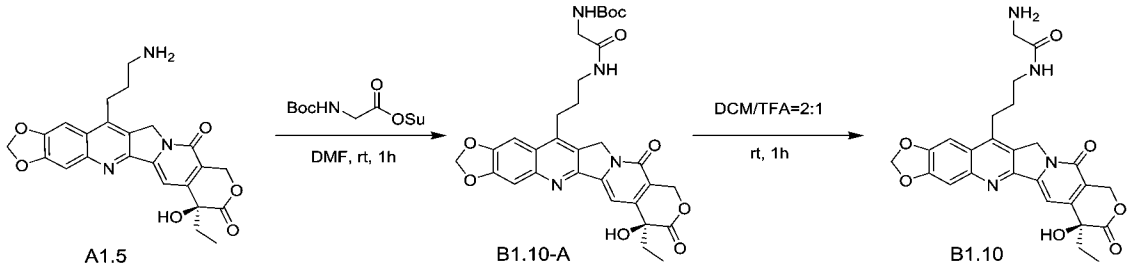
用實施例B1.4相同的方法和反應條件，用化合物（A1.4）代替化合物（B1.3-A），得到目標產物(S)-2-胺基-N-(4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.9）。或者採用下列反應條件得到目標產物。

將化合物A1.4 (60 mg，0.12 mmol) 溶在N,N-二甲基甲醯胺（3 mL），依次加入（第三丁氧羰基）甘胺酸 (26 mg，0.15 mmol)、HATU (56 mg, 0.15 mmol)，N,N-二異丙基乙胺 (48 mg, 0.37 mmol)，室溫下攪拌1小時，TLC檢測反應完成。然後直接向上述反應液中加入TFA(1.0 mL)。在室溫下繼續攪拌1小時，LCMS檢測反應完成，將反應液濃縮除去三氟乙酸得粗產物，粗產物經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 純化得到目標產物(S)-2-胺基-N-(4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.9）（26.3 mg, 收率38%）為黃色固體。

ESI-MS (m/z): 541 $[M+H]^+$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.71 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.67-7.58 (m, 3H), 7.29 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0702】實施例B1.10：(S)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙醯胺（B1.10）的合成



步驟一：室溫下，向化合物 A1.5（200 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（67 mg）和 2,5-二氧吡咯烷-1-基（第三丁氧羰基）甘胺酸（182 mg），在室溫下反應 1 小時。反應液加入水（30 mL）稀釋，乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗產品，粗產品用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物（B1.10-A，100 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：607。

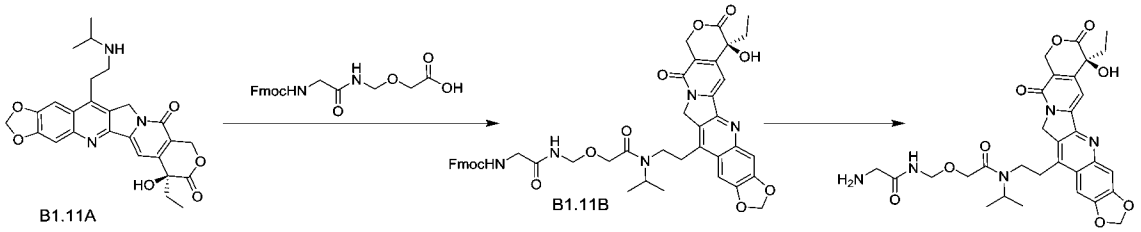
步驟二：向化合物 B1.10-A（100 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中，加入三氟乙酸（2 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液濃縮，粗品加入 N,N-二甲基甲醯胺溶液（3mL），用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物(S)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙醯胺（B1.10，80 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：507；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.26 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.30 – 3.27 (m, 2H), 3.13 – 3.07 (m, 2H), 2.04 – 1.76 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0703】實施例B1.11：(S)-2-((2-胺基乙醯胺基)甲氧基)-N-異丙基-N-(2-(7-

乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙醯胺（B1.11）的合成



步驟一： 將化合物 1-（9H-芴-9-基）-3,6-二氧-2,9-二氧-4,7-二氮雜環-11-甲酸 （242 mg），二異丙基乙胺（330 mg）和 N,N,N`,N`-四甲基脲六氟磷酸酯（359 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（10 mL）溶液中。隨後加入化合物（S）-7-乙基-7-羥基-14-（2-（異丙胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（300 mg），反應在室溫下反應 2 小時。向反應液中加入乙酸乙酯（50 mL），用飽和食鹽水（30 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物化合物 B1.11B（220 mg）。

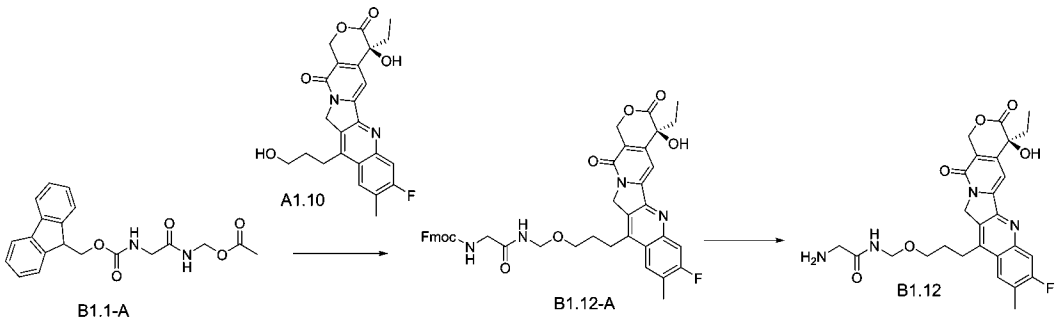
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：844.0。

步驟二：(S)-2-((2-胺基乙醯胺基)甲氧基)-N-異丙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙醯胺的製備

向化合物 B1.11B（220 mg，0.261 mmol）的 N,N-二甲基甲醯胺（4 mL）溶液中加入哌啶（1 mL），反應在室溫下攪拌 20 分鐘。LCMS 檢測反應反應完全。反應液減壓濃縮得到目標化合物（220 mg）為褐色固體，上述產物未經純化直接用於下步合成。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：622.1。

【0704】實施例B1.12：(S)-2-胺基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙醯胺（B1.12）的合成



步驟一： 將化合物 A1.10 (160 mg, 0.365 mmol) 溶在 N,N-二甲基甲醯胺 (3 mL) 中，加入(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)乙醯胺基)甲基乙酸酯（（B1.1-A，672 mg, 1.83 mmol)，然後加入鹽酸乙酸乙酯 (0.073mL, 3M) 於反應液中，反應液在室溫下攪拌過夜。LCMS 檢測反應完成。該反應液直接經反相色譜 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 純化後得目標化合物 (80 mg, 收率 29.0%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 747.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.74 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.28 – 8.17 (m, 1H), 7.99 – 7.88 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.63 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 6.58 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.32 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.26 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.71 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.29 – 3.20 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.00 – 1.86 (m, 4H), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

步驟二：B1.12-A （240mg）溶於 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物

攪拌 20 分鐘，溶於減壓除去低沸點組分，殘留物直接用於下步合成。

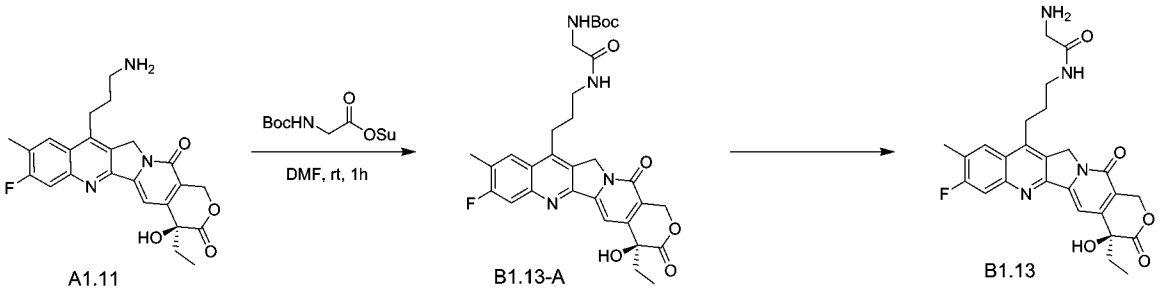
ESI-MS (m/z): 525.2 $[M+H]^+$。

少量粗產物經反相色譜 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 純化後得目標化合物。

ESI-MS (m/z): 525.1 $[M+H]^+$;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.13 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.02 (brs, 2H), 7.89 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.53 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.25-3.18 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.98-1.84 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0705】實施例B1.13：(S)-2-胺基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙醯胺（B1.13）的合成



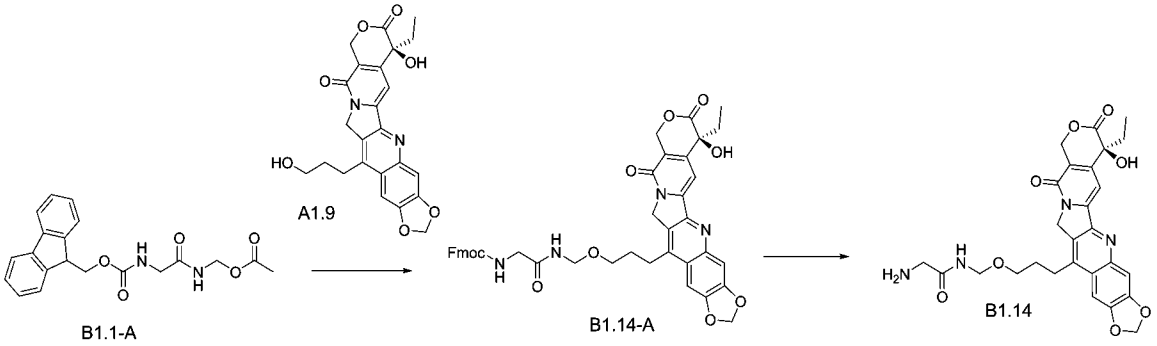
步驟一：室溫下，向化合物 A1.11（200 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（67 mg）和 2,5-二氧吡咯烷-1-基（第三丁氧羰基）甘胺酸（182 mg），在室溫下反應 1 小時。反應液加入水（30 mL）稀釋，乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗產品，粗產品用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物（B1.13-A，104 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：595。

步驟二：向化合物 B1.13-A（100 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中，加入三氟乙酸（2 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液濃縮，粗品加入N,N-二甲基甲醯胺溶液（3mL），用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物(S)-2-胺基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙醯胺（B1.13，88 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：495。

【0706】實施例B1.14： (S)-2-胺基-N-((3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙氧基)甲基)乙醯胺（B1.14）的合成



步驟一：化合物（B1.1-A）（368mg），化合物（A1.9）（440mg）和對甲苯磺酸吡啶鹽（PPTS）（25mg）在二氯甲烷（20ml）中回流 20 小時，然後用碳酸氫鈉水溶液和鹽酸水溶液分別洗滌，減壓除去有機溶劑，得到粗產物，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物化合物 B1.14A（240 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：747。

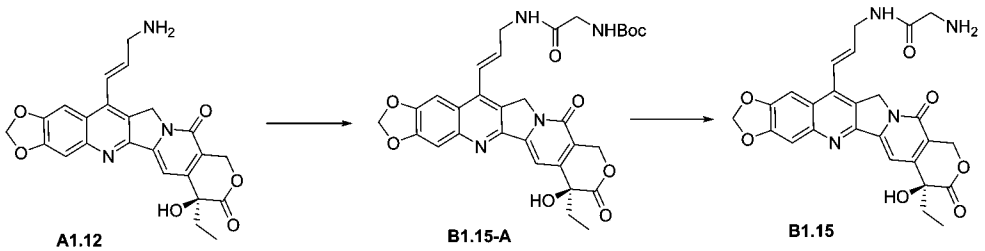
步驟二：B1.14-A （240mg）溶於 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物攪拌 20 分鐘，溶於減壓除去低沸點組分，殘留物直接用於下步合成。少

量粗產物經反相色譜 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 純化後得目標化合物。

ESI-MS (m/z): 525 $[M+H]^+$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (t, 1H)，8.04 (br, 2H), 7.58（s，1H），7.51（s，1H），7.25（s，1H），6.29（s，2H），5.43（S，2H），5.21（s, 2H），4.65（d，2H），3.63（m，2H），3.53（m，2H），3.11（m，2H），1.87（m，4H），0.88（t，3H）。

【0707】實施例B1.15：(S,E)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)乙醯胺



步驟一：室溫下，向化合物 A1.12（200 mg，0.447 mmol）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（135 mg，1.341 mmol）和 N-羥基-2,5-二氧吡咯烷第三丁氧羰基甘胺酸酯（183 mg，0.671 mmol），在室溫下反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入水（20 mL），用乙酸乙酯（20 mL×3）萃取，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物 B1.15A（130 mg ，收率：48%）為棕色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =605.6。

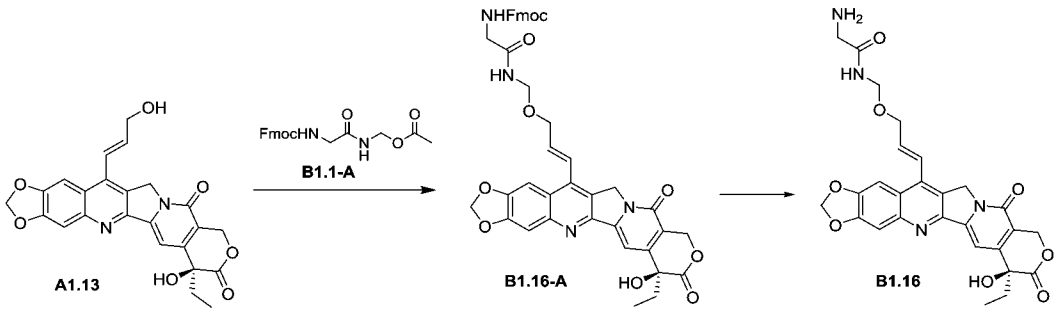
步驟二： 室溫下，將化合物 B1.15-A（130 mg，0.215mmol）用鹽酸 1，4-二氧六環溶液（5 mL）溶解，在室溫下反應 30 分鐘。LCMS 顯示反應完

全。反應液通過反向純化得到目標化合物（60 mg，收率：52%）為棕色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =505.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.85 (s, 1H), 8.15 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 1.86 – 1.82 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

【0708】實施例B1.16：(S,E)-2-胺基-N-(((3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)乙醯胺



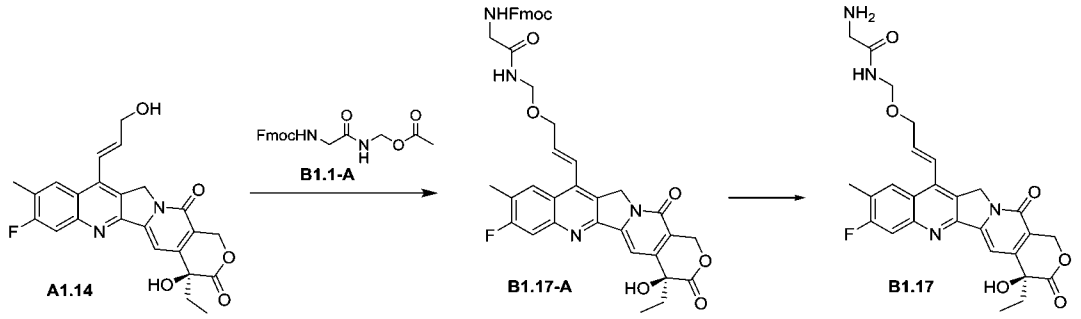
步驟一：在氮氣保護下，將原料 A1.13 (150 mg, 0.335 mmol) 溶在甲苯 (3 mL) 中，加入(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)乙醯胺基)甲基乙酸酯 (B1.1-A，308 mg, 0.84 mmol)，然後將醋酸鋅 (123 mg, 0.67 mmol) 加入到反應液中，反應液在 100°C 下攪拌過夜。LCMS 檢測反應完成。該反應液直接經反相色譜 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液: 5%到 50%) 純化後得目標化合物（9H-芴-9-基）甲基（S，E）-（2-（（（3-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）烯丙基）氧基）甲基）胺基）-2-氧代乙基）胺基甲酸酯 (B1.16-A，80 mg, 收率 31%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 757.4。

步驟二：將化合物 B1.16-A (80 mg, 0.11 mmol) 溶在 N,N-二甲基甲醯胺 (2 mL) 中,然後向反應液中加入哌啶(0.05 mL)，在室溫下攪拌 1 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液濃縮得粗產品，粗產品用 C18 柱反相分離純化(乙腈/0.05%氨水的水溶液: 5%到 50%)得到目標化合物(35 mg, 收率 62%)為棕色固體。

LCMS (ESI) [M+H]+ = 535.2, tR = 1.070 min.

【0709】實施例B1.17：(S,E)-2-胺基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)胺基)甲基)乙醯胺



步驟一：將化合物 A1.14 (80 mg, 0.183 mmol)和化合物(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)乙醯胺基)甲基乙酸酯 (B1.1-A，135 mg, 0.367 mmol)溶於甲苯 (4 mL), 加入醋酸鋅 (190 mg, 1.03 mmol)，反應液在 100 攝氏度下攪拌 48 小時。冷卻至室溫，向其中加入水 (10 mL)，用乙酸乙酯 (10 mL×3) 萃取。合併有機相經無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮得到粗產物，粗產物經反相色譜 (0.05% FA 的水溶液/乙腈: 5%到 100%) 純化後得到目標化合物 (S,E)-2-（Fmoc 胺基）-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)

甲基)乙醯胺 (B1.17-A，30mg)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 745.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.82 (m 1H), 8.21 (m, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.61 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 4H), 6.72 – 6.55 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.75 (m, 2H), 4.34 (m, 2H), 4.28 – 4.24 (m, 2H), 4.20 (m, 1H), 3.70 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

步驟二：將化合物 4 (25 mg, 0.034 mmol)， 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL) 中, 然後加入二乙胺(0.2 mL)，加畢，反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，將反應液直接減壓蒸乾溶劑得到粗產品目標化合物(S,E)-2-胺基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙醯胺為黃色粘稠狀產品。

LCMS (ESI) [M+H]+ = 523.2；

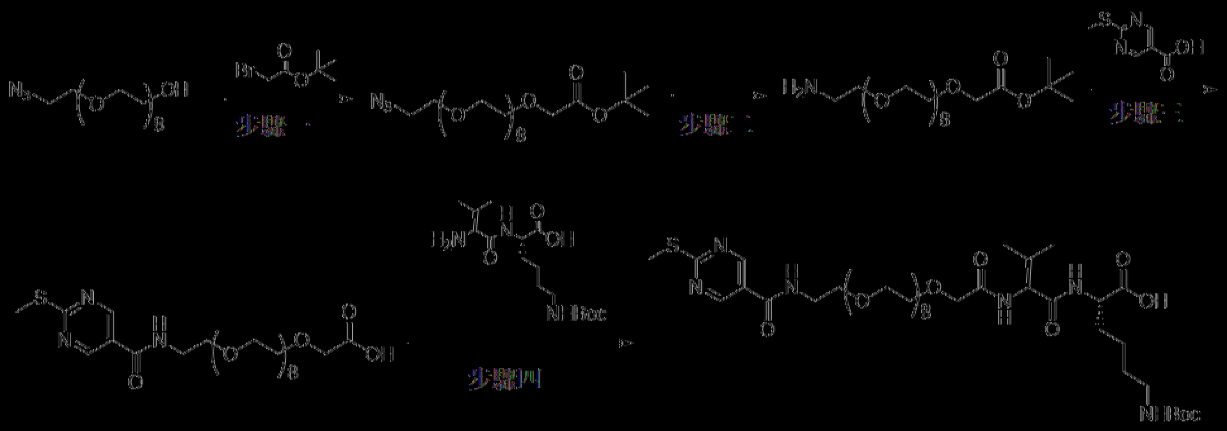
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 523.1, t_R = 0.446 min, 1.311 min.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.26 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.06 (s, 2H), 7.91 (m, 1H), 7.40 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.70 – 6.60 (m, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 3.68 (d, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.90 – 1.84 (m, 2H), 0.88 (m, 3H)。

【0710】C、含偶聯連接段分子片段中間體的合成

【0711】實施例C1.1：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離

胺酸（化合物C1.1）



步驟一：29-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-炔酸第三丁酯

向 26-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜-26-炔-1-醇（4.39g）的 DMF（40ml）溶液中加入 NaH（0.6g，60%）。上述混合物攪拌 30 分鐘後，加入溴乙酸第三丁酯（2.4g）。混合物在乾燥條件下攪拌 20 小時。然後向混合物中加入乙酸乙酯（200ml）和水（200ml，開始時慢慢加入），有機相水洗（100ml x 3），無水硫酸鈉乾燥，減壓除去溶劑，殘留物經過矽膠柱色譜分離得到目標產物，29-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-炔酸第三丁酯。

ESI-MS (*m/z*): 554 $[M+H]^+$。

步驟二：29-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-炔酸第三丁酯

向 29-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-炔酸第三丁酯（1.16g）的乙酸乙酯（20ml）溶液中加入鈀碳催化劑（Pd/C，10%，100mg）。上述溶液在氫氣氣氛下攪拌 5 小時，然後濾去鈀碳後，減壓除去溶劑得到目標產物。

ESI-MS (*m/z*): 528 $[M+H]^+$。

步驟三：1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷酸

29-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯（527mg）和 2-甲硫基-嘧啶-5-羧酸（170mg）加入乾燥 DMF (10ml), 然後在冰浴冷卻下向上述溶液中依次加入 DIPEA（0.2ml），HBTU（420mg）。上述混合物室溫小攪拌 20 小時。然後用乙酸乙酯（100ml）稀釋，水洗（100ml x 4）,有機相無水硫酸鈉乾燥後，減壓除去有機溶劑，殘留物溶於 DCM（10ml），然後加入 TFA（10ml），混合物室溫下攪拌 1 小時，然後減壓除去低沸點組分，殘留物經過製備 HPLC 分離得到 1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷酸。

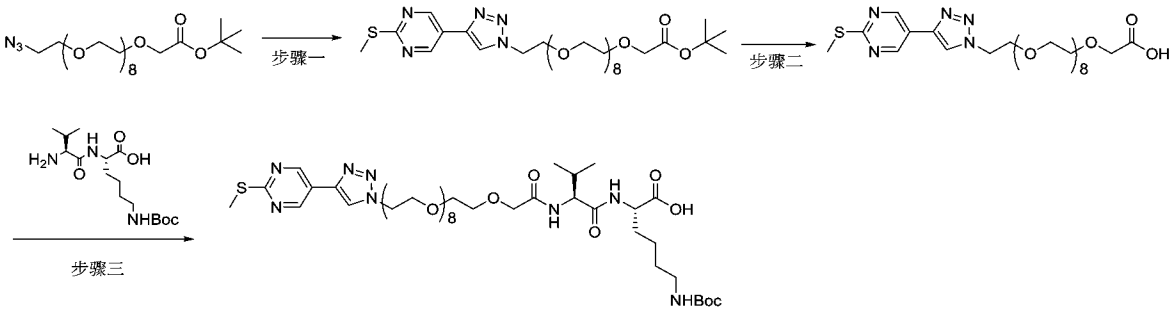
ESI-MS (*m/z*): 624 $[M + H]^+$。

步驟四：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸

【0712】1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷酸（623mg）溶於DMF（10ml），0°C下加入DIPEA（300ul），HBTU （420mg）。混合物攪拌30分鐘，然後加入纈胺酸-（Boc）離胺酸二肽化合物（345mg）。反應攪拌20小時，然後加入乙酸乙酯（100ml），稀鹽酸（20ml x 3）洗，有機相乾燥後減壓除去有機溶劑，粗產物通過製備HPLC分離得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.1）。

ESI-MS (*m/z*): 951 $[M + H]^+$。

【0713】實施例C1.2：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.2）



步驟一：29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯

29-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯 （1.7g），2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶（450mg）溶於 DMSO-水（20ml，4:1）中，向混合物中加入溴化亞銅（50mg）。反應液室溫下攪拌 2 小時，然後加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），乾燥後減壓除去有機溶劑，粗產物用矽膠柱層析分離得到目標產物 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯。

MS (*m/z*): 704 $[M + H]^+$。

步驟二：29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸

29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯（1g）溶於二氯甲烷（10ml），然後加入 TFA（5ml）。混合物室溫靜置 1 小時，然後減壓除去低沸點組分得到目標產物 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-

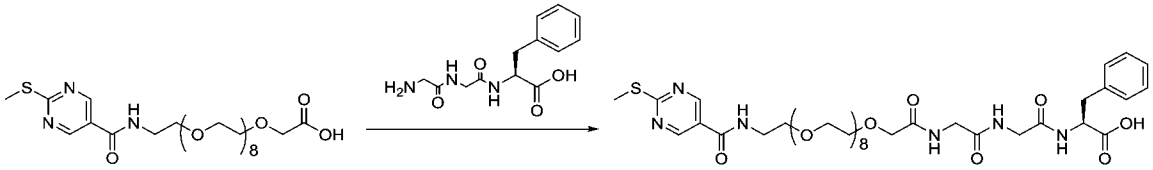
烷酸。

MS (*m/z*): 648 $[M + H]^+$。

步驟三：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸（647mg）溶於 DMF（10ml），0°C 下加入 DIPEA（300ul），HBTU （420mg）。混合物攪拌 30 分鐘，然後加入纈胺酸-離胺酸二肽化合物（345mg）。反應攪拌 20 小時，然後加入乙酸乙酯（100ml），稀鹽酸（20ml x 3）洗，有機相乾燥後減壓除去有機溶劑，粗產物通過製備 HPLC 分離得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物 C1.2）。

ESI-MS (*m/z*): 975 $[M + H]^+$。

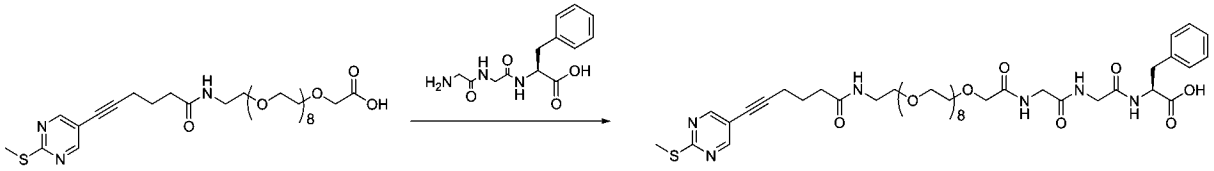
【0714】實施例 C1.3：(1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-甘胺酸-甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物C1.3）



用實施例 C1.1 步驟四相同的方法和反應條件，用相應的原料，得到目標產物 (1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-甘胺酸-甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物 C1.3）。

ESI-MS (m/z): 885 $[M+H]^+$。

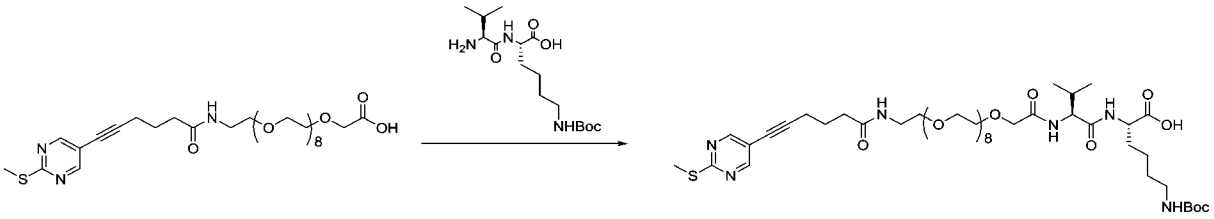
【0715】實施例C1.4：(36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-30-氮雜-三十六-(35-炔)-醯基)甘胺酸甘胺酸苯丙胺酸（化合物C1.4）



用實施例C1.1步驟四相同的方法和反應條件，用反應式所示的原料，得到目標產物(36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-30-氮雜-三十六-(35-炔)-醯基)甘胺酸甘胺酸苯丙胺酸（化合物C1.4）。

ESI-MS (m/z): 951 $[M+H]^+$。

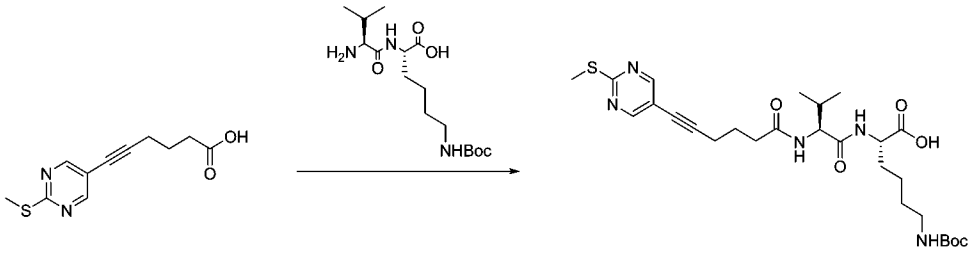
【0716】實施例C1.5：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-30-氮雜-三十六-(35-炔)-醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.5）



用實施例C1.1步驟四相同的方法和反應條件，用反應式所示的化合物作為原料，得到目標產物N6-(第三丁氧基羰基)-N2-((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-30-氮雜-三十六-(35-炔)-醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.5）。

ESI-MS (m/z): 1017 $[M+H]^+$。

【0717】實施例C1.6：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.6）

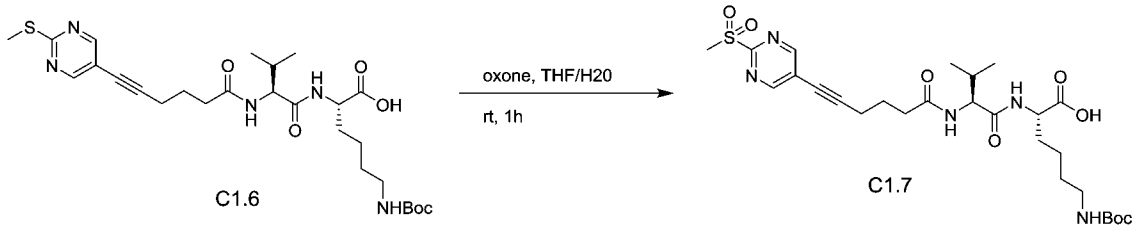


將 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 （920mg）和 N-羥基丁二醯亞胺（537 mg）溶於二氯甲烷（50mL）中，然後加入二環己基碳二亞胺（963 mg）。反應液室溫攪拌 1 小時，然後減壓除去二氯甲烷，殘留物溶於 N,N-二甲基甲醯胺（50mL），然後加入 N^2-L-纈胺酸-N^6-(Boc)-L-離胺酸 (1.5g)，反應液室溫下攪拌反應 16 小時，將反應液倒入 200mL 水中，用飽和碳酸氫鈉溶液調節 pH 至 11，上述水溶液用乙酸乙酯萃取兩次，棄掉有機相，將水相用檸檬酸調節 pH 到 4-5，用乙酸乙酯（100 mL x 3）萃取三次，有機相用飽和食鹽水（100 mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，旋蒸，得到粗產品 2.8g，粗產品用快速色譜法分離純化(DCM : MeOH = 30 : 1)得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 (1.0g) （化合物 C1.6）。

ESI-MS (m/z): 564.3 $[M+H]^+$。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.45 (s, 1H), 8.68 (s, 2H), 8.12 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.27 – 4.19 (m, 1H), 4.11 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 2.88 (d, J = 7.9 Hz, 3H), 2.73 (s, 1H), 2.59 (s, 1H), 2.52 (s, 4H), 2.40 – 2.24 (m, 3H), 2.03 – 1.88 (m, 2H), 1.77 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 1.68 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 1.60 – 1.49 (m, 1H), 1.36 (s, 15H), 0.85 (dd, J = 14.8, 6.7 Hz, 7H)。

【0718】實施例C1.7：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.7）

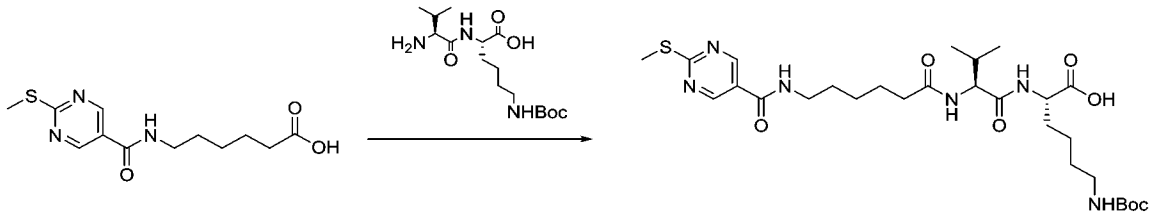


向化合物 C1.6（260 mg）的四氫呋喃（3 mL）和水（3 mL）混合溶液中加入過氧單磺酸鉀（1.414 g），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液過濾，濾液用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）純化得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物 C1.7）（120 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 596;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.48 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.14 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.24 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.12 (br s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.43 – 2.29 (m, 2H), 2.03 – 1.93 (m, 2H), 1.82 (br s, 2H), 1.63 – 1.60 (m, 4H), 1.37 (s, 12H), 0.88 – 0.83 (m, 6H)。

【0719】實施例C1.8：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲醯胺基)己醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.8）

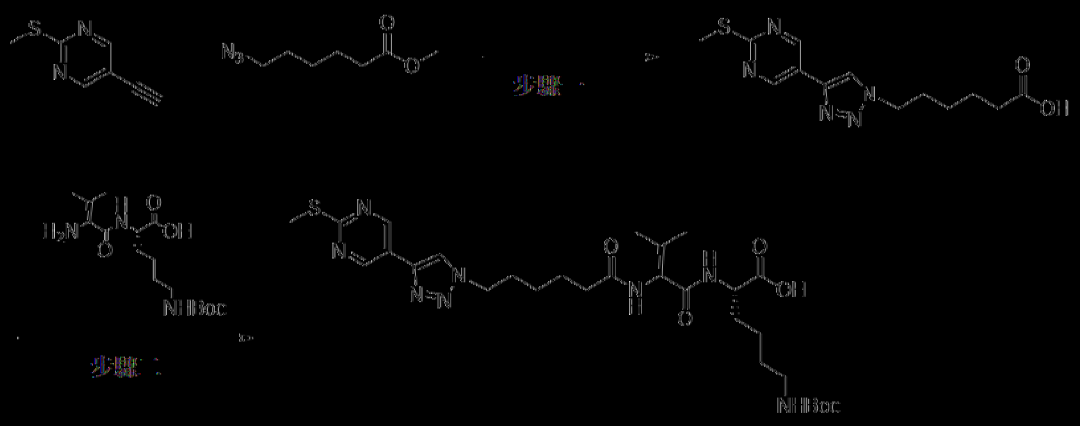


用實施例 C1.6 相同的方法和反應條件，用反應式所示的已知化合物作為原料，得到目標產物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲醯胺基)己醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物 C1.8）。

ESI-MS (m/z): 611 $[M+H]^+$。

【0720】實施例C1.9：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-

基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.9）



步驟一：6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)L-離酸

室溫下，將 2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶（1.5g）、6-疊氮基L-離酸甲酯（1.71g）溶於第三丁醇與水的混合溶劑（20 mL/25 mL）中，加入維生素 C 鈉 (5.7 g), 溴化亞銅（2.9g）攪拌反應 10 h。反應加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml x 5），乾燥後除去有機溶劑，矽膠柱析得到 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)L-離酸甲酯（2.8g），ESI-MS (m/z): 321.9[M+H]+。上述產物溶於四氫呋喃（100ml），加入氫氧化鋰（1M，20ml），混合物攪拌 3 小時，然後加入鹽酸至反應液 pH 2，然後加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml x 3），乾燥，除去有機溶劑得到目標產物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)L-離酸。ESI-MS (m/z): 308.4 [M+H]+。

步驟二：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)L-離醯)-L-纈胺酸)-L-離胺酸

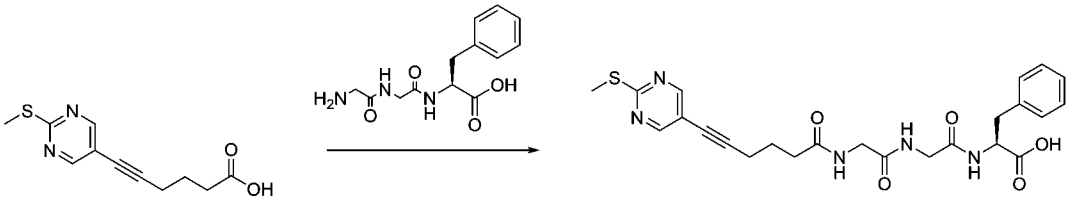
將化合物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)L-離酸 (370 mg,)和 N-羥基丁二醯亞胺 (152 mg) 溶在二氯甲烷（5 mL）中攪拌，再加入二環乙基碳二亞胺（273 mg），然後反應液在室溫下攪拌 1 小時。向反應液中加

入 10 mL 水，用乙酸乙酯萃取（20 mL x 2），有機相用飽和食鹽水洗，用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液減壓濃縮得到粗品。將此粗品溶解在 N,N-二甲基甲醯胺(10 mL)攪拌，加入化合物 N^2-L-纈胺酸-N^6-(Boc)-L-離胺酸，反應液在室溫下反應 16 小時，向反應液中緩慢加入檸檬酸將 PH 調至 5 左右，加入水，再用乙酸乙酯萃取(3 x 10 mL)，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到目標產物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物 C1.9，400 mg）。

ESI-MS (m/z): 635.3 $[M+H]^+$；

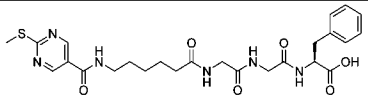
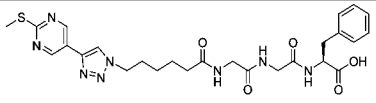
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.46 (s, 1H), 9.06 (s, 2H), 9.06 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.19 (dd, *J* = 8.9, 7.0 Hz, 1H), 4.14 – 4.05 (m, 1H), 2.92 – 2.85 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.24 – 2.10 (m, 2H), 1.97 – 1.81 (m, 3H), 1.71 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.50 (m, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.28 – 1.22 (m, 6H), 0.88 – 0.76 (m, 6H)。

【0721】實施例C1.10：(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-(5-炔)-醯基)甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物C1.10）

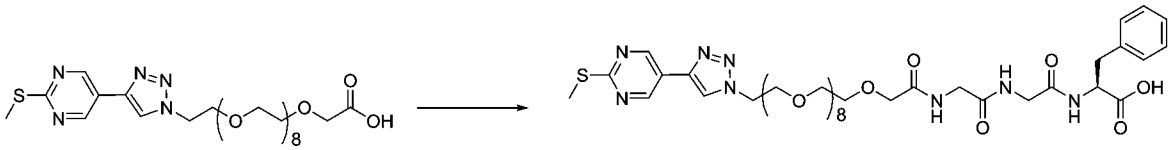


用實施例 C1.6 相同的方法和反應條件，上述反應式所示的已知原料，得到目標產物 (6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物 C1.10）。ESI-MS (m/z): 498 $[M+H]^+$。

用實施例 C1.6 相同的方法和反應條件，利用不同的反應原料，得到下表中目標產物。

化合物	化學結構	化學名稱	ESI-MS (*m/z*): $[M + H]^+$
C1.11		(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲醯胺基)己醯基) 甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸	545
C1.12		(6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基) 甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸	569

【0722】實施例C1.13：(29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜29烷醯基) 甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物C1.13）

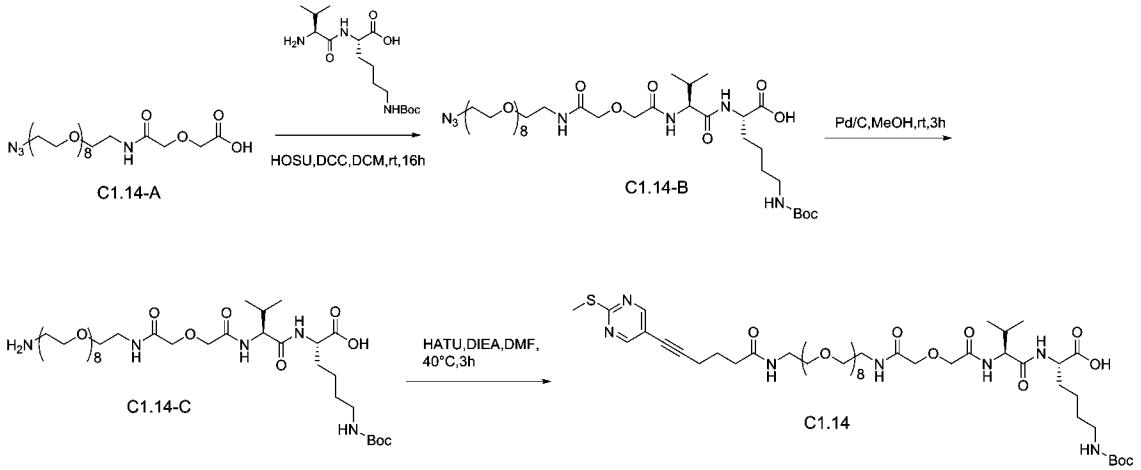


用實施例 C1.1 步驟四相同的方法和反應條件，利用已知原料，得到目標產物 (29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜 29 烷醯基)甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物 C1.13）。

ESI-MS (m/z): 909 $[M+H]^+$。

【0723】實施例C1.14：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧雜-6,33-二氮雜三十九烷-38-

炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.14）



步驟一：將化合物 C1.14-A（336mg）溶於二氯甲烷（5 mL）中，加入 N-羥基丁二醯亞胺（98 mg，0.85 mmol），二環己基碳二亞胺（175 mg，0.85 mmol）室溫攪拌反應 1 小時，然後將化合物 N^2-L-纈胺酸-N^6-(Boc)-L-離胺酸（230 mg）加入反應液，室溫攪拌反應過夜。濃縮除去溶劑得到粗產品，粗產品用 C18 柱反相分離純化（乙腈/0.01%FA 的水溶液：5%-50%）得到無色油狀目標化合物（C1.14B，290 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 882.3。

步驟二： 將化合物 C1.14-B（300 mg）溶於無水甲醇（5 mL）中，加入 Pd/C（10%, 60 mg），氫氣置換三次，室溫攪拌反應過夜，抽濾，濃縮得到目標化合物 C1.14-C（293 mg）為無色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：856.1。

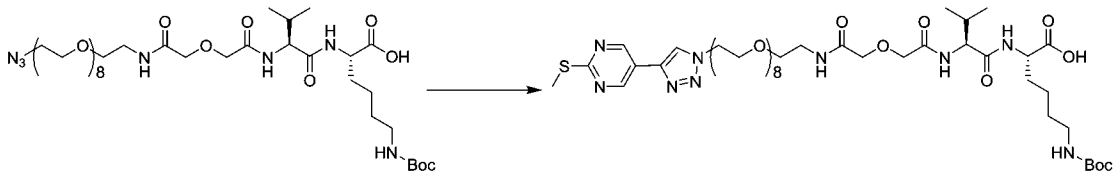
步驟三： 將 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸（84 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (3 mL)中，然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 （61 mg），HATU（108 mg）。反應液室溫攪拌 20 分鐘，然後加入化合物 C1.14-C（196 mg），40°C 攪拌反應 3 小時，粗產品用 C18 柱反相分離純化（乙腈/0.01%FA 的

水溶液：5%-65%）得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧雜-6,33-二氮雜三十九烷-38-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.14）（170 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1074.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.68 (s, 2H), 8.23 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.99 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.09 (dd, *J* = 8.8, 6.5 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.98 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 3.74 – 3.70 (m, 1H), 3.50 (s, 30H), 3.45 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.39 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.26 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.20 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.12 – 2.06 (m, 1H), 1.79 – 1.74 (m, 2H), 1.67 – 1.59 (m, 1H), 1.50 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.24 (s, 2H), 1.20 – 1.09 (m, 2H), 0.85 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H)。

【0724】實施例C1.15：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧雜-6-氮雜三十二烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.15）

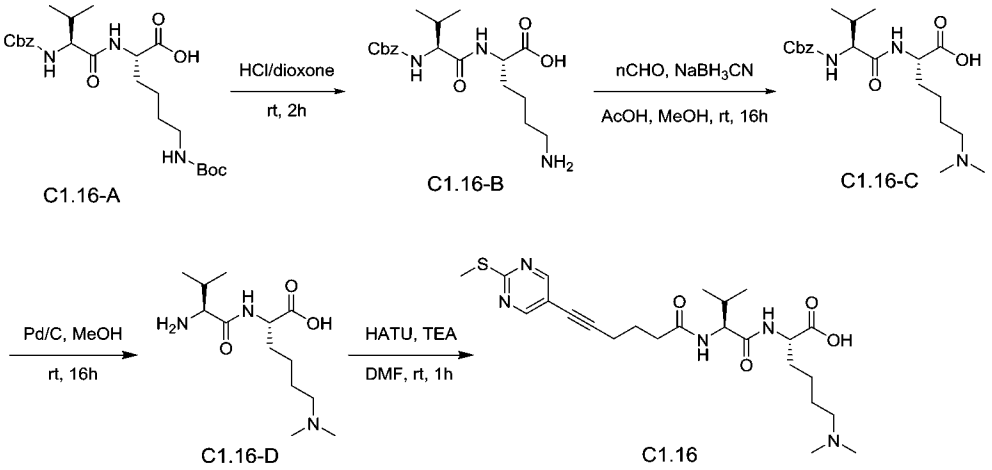


將化合物 C1.14-B（130 mg），5-乙炔基-2-甲硫基嘧啶（44 mg），維生素 C 鈉（3 mg）和硫酸銅（5 mg）加入到第三丁醇（2 mL）和水（2 mL）的混合溶液中，反應在室溫氮氣下反應 3 小時。向反應液中加入水（10 mL），用二氯甲烷（30 mL×3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濃縮得到粗品，粗產品 TLC 分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10 比

1)得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧雜-6-氮雜三十二烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.15）（90 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1032.3。

【0725】實施例C1.16：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：向化合物 C1.16-A（10.0 g）加入氯化氫-二氧六環（100 mL）溶液，在室溫下反應 2 小時。反應液減壓濃縮得到白色固體目標化合物 C1.16-B（8.0 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：380.1。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.40 – 7.30 (m, 5H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.23 – 4.11 (m, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 1H), 2.78 – 2.73 (m, 2H), 2.03 – 1.94 (m, 1H), 1.77 – 1.51 (m, 4H), 1.44 – 1.31 (m, 2H), 0.87 (dd, *J* = 17.3, 6.6 Hz, 6H)。

步驟二：將化合物 C1.16-B（3.0 g）和醋酸鈉（1.90 g）溶在甲醇（100 mL）溶液中，室溫下反應 10 分鐘，向反應液中加入多聚甲醛（2.8 g），室溫下攪拌反應 30 分鐘，再向反應液中加入氰基硼氫化鈉（1.0 g），反應在室溫

下攪拌反應 16 小時。反應液過濾後濾液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.16-C (1.70 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：408.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.86 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.26 (m, 6H), 5.03 (s, 2H), 4.08 – 4.06 (m, 1H), 3.90 – 3.85 (m, 1H), 2.50 – 2.45 (m, 2H), 2.35 (s, 6H), 2.05 – 1.93 (m, 1H), 1.73 – 1.55 (m, 2H), 1.51 – 1.40 (m, 2H), 1.33 – 1.22 (m, 2H), 0.85 (dd, *J* = 16.5, 6.8 Hz, 6H)。

步驟三：室溫下，將化合物 C1.16-C（1.6 g）溶於甲醇（80 mL）中，然後向反應液中加入 Pd/C（10%，0.16 g），氫氣下室溫下攪拌反應 12 小時。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.16-D（680 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：274.2。

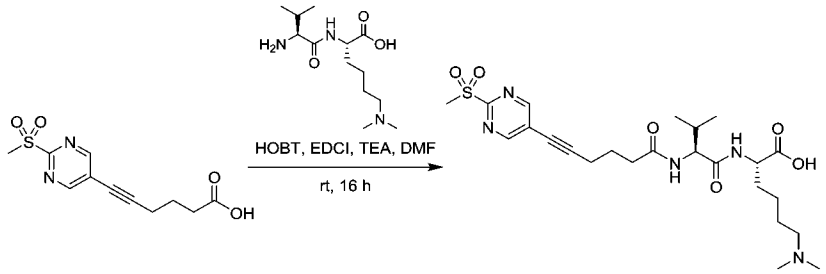
步驟四：將 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸（944 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (30 mL)中，然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 （1.3 g），2-(7-偶氮苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯（HBTU，1.8 g）。反應液室溫攪拌 20 分鐘，然後加入化合物 C1.16-D（1.1 g），40 °C 攪拌反應 3 小時，粗產品用 C18 柱反相分離純化（乙腈/0.01%甲酸的水溶液： 5%-65%）得到白色固體目標化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸 C1.16（1.2 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：492.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.68 (s, 2H), 8.00 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.20 (t, 1H), 4.08 (dd, *J* = 12.7, 7.7 Hz, 1H), 2.47 – 2.40 (m, 4H), 2.37 – 2.31 (m, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.01 – 1.92 (m, 1H), 1.82 – 1.73 (m, 2H),

1.71 – 1.56 (m, 2H), 1.49 – 1.37 (m, 2H), 1.33 – 1.23 (m, 2H), 0.88 – 0.82 (m, 6H).

【0726】實施例C1.17：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸C1.17

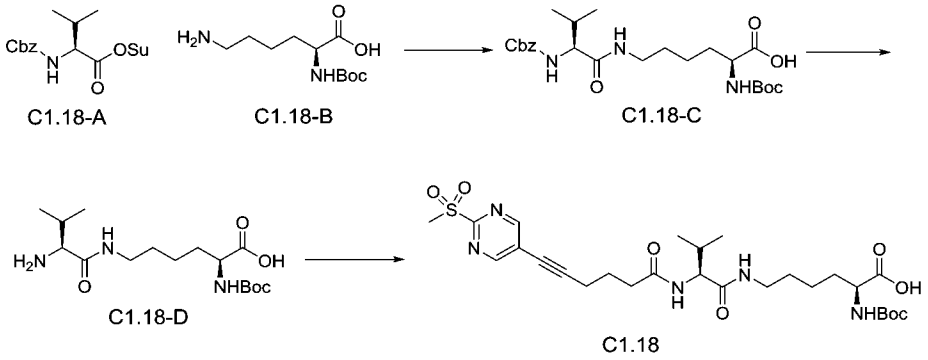


將 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg), 化合物 C1.16-D (328 mg)，三乙胺 (322 mg) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (5 mL)。然後再加入 1-羥基苯並三唑(HOBT，162 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(EDCI，229 mg) ，反應液室溫攪拌 16 小時，反應液直接經過 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 N6,N6-二甲基-N2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.17 ，白色固體，327 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：524.4。

^{1}H NMR (400 MHz,) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.21 (dd, *J* = 8.8, 6.9 Hz, 1H), 4.08 – 4.03 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.55 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.42 – 2.32 (m, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.98 (dd, *J* = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.74 – 1.55 (m, 2H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.31 – 1.23 (m, 2H), 0.85 (dd, *J* = 12.8, 6.8 Hz, 6H)。

【0727】實施例C1.18：N^2-(第三丁氧基羰基)-N^6-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：化合物 C1.18-B（3 g）溶於二氯甲烷（30 ml），加入 DIPEA（4 ml），然後加入化合物 C1.18-A（3.48 g），混合物室溫下攪拌反應 20 小時。向反應液中加入乙酸乙酯（200 ml），混合物依次用鹽酸（0.1M, 30 ml x 3）、水（30ml x 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，減壓濃縮後得到目標混合物 C1.18-C（4.7 g）。

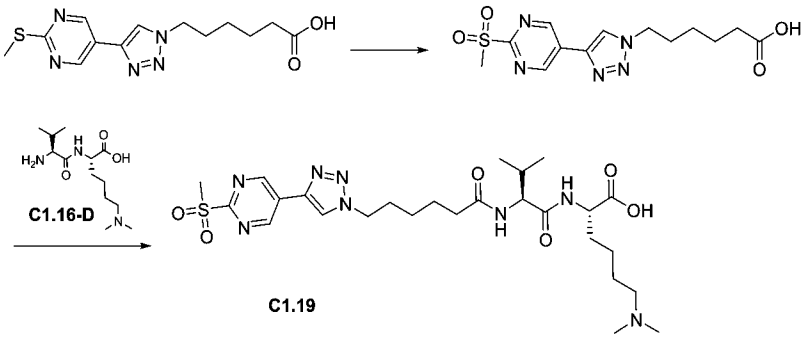
步驟二：室溫下，將化合物 C1.18-C（4.7 g）溶於甲醇（80 mL）中，然後向反應液中加入 Pd/C（10%，0.6 g），在氫氣下室溫下攪拌反應 12 小時。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.18-D（3.4 g)。LCMS (ESI) $[M+H]^+$：346.2。

步驟三：將 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (2.68 g), 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (50 mL), 然後再加入三乙胺 (3 ml), HBTU (3.8 g), 混合物室溫下攪拌 10 分鐘，然後加入乙酸乙酯（200 ml），混合物用飽和碳酸氫鈉（20 ml x 2），鹽酸（0.1M，50 ml x 2），水（50 ml x 2）洗，無水硫酸鈉乾燥，減壓濃縮得到粗產物中間體，上述粗產物溶於 DMF （30 ml），加入 DIPEA（1.6 ml），然後加入 C1.18-D (3.4 g)， 反應液室溫攪拌 3 小時，然後加入乙酸乙酯（200 ml），用鹽酸（0.1M，50 ml x 2），水（50 ml x 2）洗，無水硫酸鈉乾燥，減壓濃縮得到粗產物，經矽膠柱色譜分離提純得到目標化

合物 N^2-(第三丁氧基羰基)-N^6-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.18 ，白色固體，3.8 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：596.4。

【0728】實施例C1.19：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：將化合物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（1.0 g， 3.3mmol）溶在四氫呋喃和水（40mL，3:1）混合溶液中，加入過氧單磺酸鉀（10.0 g，16.3mmol)。室溫攪拌反應 3 小時，LCMS 檢測反應完成。反應液過濾，濾餅用 DMSO 洗滌，合併濾液。經反相純化（C18，乙腈：0.1%甲酸=5%-55%）純化，得到 6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（750mg，收率 67.9%）白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 340.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.48 (s, 2H), 8.95 (s, 1H), 4.49 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.22 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.61 – 1.50 (m, 2H), 1.36 – 1.26 (m, 2H)。

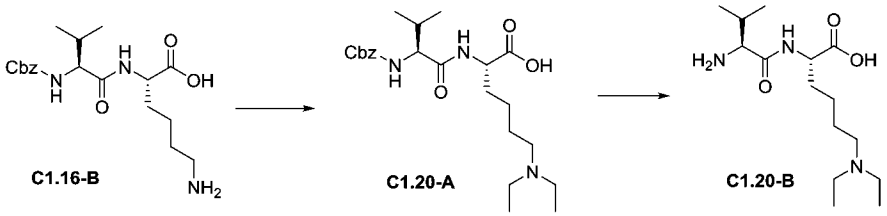
步驟二：將化合物 6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（300 mg，0.88mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（6mL），加入 HATU（337 mg，0.88mmol），DIPEA（286 mg，2.21mmol），室溫攪拌反應 30 分鐘，

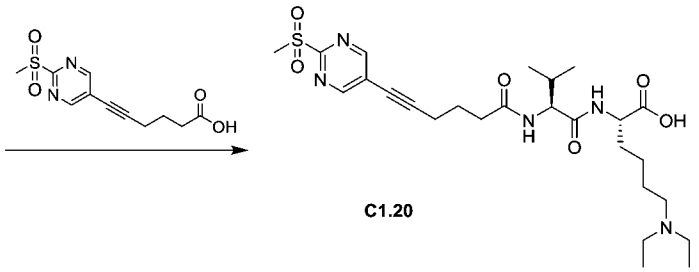
然後加入二肽 C1.16-D（243 mg，0.88 mmol），室溫攪拌反應 2 小時。LCMS 檢測反應完成，反應液通過 C18 柱分離純化（乙腈/0.01%FA 的水溶液：5%-50%）得到目標化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（300 mg，收率 57%）白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 595.5, t_R = 2.024 min。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.49 (s, 2H), 9.01 (s, 1H), 7.85 (br s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.48 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.17 – 4.15 (m, 1H), 4.02 (br s, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.42 (br s, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.18 – 2.14 (m, 2H), 1.99 – 1.96 (m, 1H), 1.88 (dd, *J* = 14.6, 7.1 Hz, 2H), 1.67 (br s, 1H), 1.59 – 1.53 (m, 2H), 1.43 (br s, 2H), 1.28 – 1.26 (m, 5H), 0.83 – 0.89 (m, 6H).

【0729】實施例C1.20：N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸





步驟一：將化合物 C1.16-B（5.0 g, 12.05 mmol）溶在二氯甲烷（100 mL）中，向反應液中加入乙醛（3.2 g, 72.3 mmol），室溫下攪拌反應 10 分鐘，再向反應液中加入三乙醯氧基硼氫化鈉（12.8 g, 60.25 mmol），反應在室溫

下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入氯化銨飽和水溶液攪拌一個小時，旋乾，過濾後濾液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.20-A (4.57 g, 收率82.0%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 436.4;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.70 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.38 – 7.26 (m, 5H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.00 (dd, *J* = 12.6, 6.5 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 14.0, 6.9 Hz, 4H), 2.64 – 2.54 (m, 2H), 2.05 – 1.94 (m, 1H), 1.72 – 1.52 (m, 2H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.18 (m, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.87 – 0.81 (m, 6H)。

步驟二：室溫下，將化合物 C1.20-A（1.6 g，3.68 mmol）溶於甲醇（80 mL）中，然後向反應液中加入 Pd/C（0.16 g），氫氣下室溫下攪拌反應 12 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.20-B（900 mg, 收率 82%)為米白色固體。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.04 (br s, 1H), 4.02 – 3.99 (m, 1H), 3.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 2.65 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.55 – 2.51 (m, 2H), 2.06 – 1.93 (m, 1H), 1.73 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.38 (m, 2H), 1.30 – 1.21 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

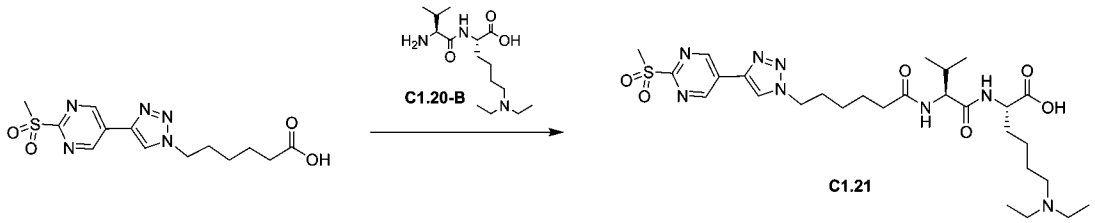
步驟三：將化合物 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg, 1 mmol)溶於 DMF（8 mL）中，依次加入 HATU（380 mg, 1 mmol）和三乙胺（322 mg, 2.5 mmol），室溫攪拌 20 分鐘後加入化合物 C1.20-B（301 mg, 1 mmol），室溫繼續攪拌 30 分鐘。LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經過 C18 柱

反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 (280 mg，收率 51%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 552.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 8.8, 6.8 Hz, 1H), 4.02 (dd, *J* = 12.8, 7.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.74 – 2.69 (m, 4H), 2.62 – 2.52 (m, 4H), 2.44 – 2.29 (m, 2H), 2.04 – 1.94 (m, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 2H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.33 – 1.23 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.87 – 0.82 (m, 6H)。

【0730】實施例C1.21：N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸

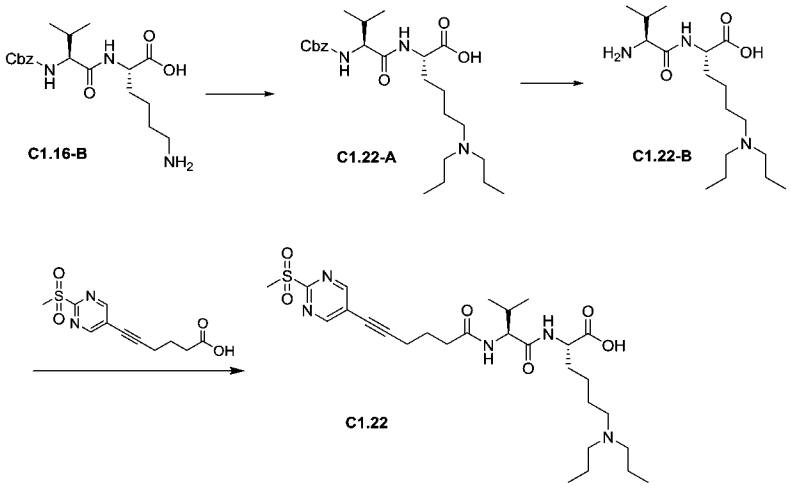


將化合物 6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (500 mg, 1.475 mmol)，溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (10 mL), 然後加入 HATU (560 mg, 1.475 mmol)，N,N-二異丙基乙胺 (476 mg, 3.688 mmol)，攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.20-B (444 mg，1.475 mmol)，反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經過 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 (330 mg，收率 34%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 623.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 9.04 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.14 (dd, *J* = 8.8, 6.6 Hz, 1H), 4.06 – 3.95 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.67 – 2.64 (m, 4H), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.21 – 2.10 (m, 2H), 2.02 – 1.94 (m, 1H), 1.92 – 1.84 (m, 2H), 1.72 – 1.63 (m, 1H), 1.72 – 1.63 (m, 3H), 1.59 – 1.54 (m, 2H), 1.32 – 1.21 (m, 4H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.81 (dd, *J* = 9.6, 6.8 Hz, 6H)。

【0731】實施例C1.22：N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：將化合物 C1.16-B（5.0 g，12 mmol）溶在二氯甲烷（100 mL）中，向反應液中加入正丙醛（4.2 g， 72.3 mmol），室溫下攪拌反應 10 分鐘，再向反應液中加入三乙醯氧基硼氫化鈉（12.8 g， 60.25 mmol），反應在室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入氯化銨飽和水溶液攪拌一個小時，旋乾，過濾後濾液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.22-A (4.57 g, 收率82.0%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 464.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.81 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 5H),

5.04 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 4.12 – 4.02 (m, 1H), 3.94 – 3.82 (m, 1H), 2.65 – 2.52 (m, 6H), 2.06 – 1.94 (m, 1H), 1.76 – 1.64 (m, 1H), 1.64 – 1.53 (m, 1H), 1.52 – 1.40 (m, 6H), 1.34 – 1.18 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 12H)。

步驟二：室溫下，將化合物 C1.22-A（2.0 g，4.32 mmol）溶於甲醇（80 mL）中，然後向反應液中加入 Pd/C（0.16 g），氫氣下室溫下攪拌反應 12 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.22-B（1.2 g, 收率 85.5%)為白色固體。

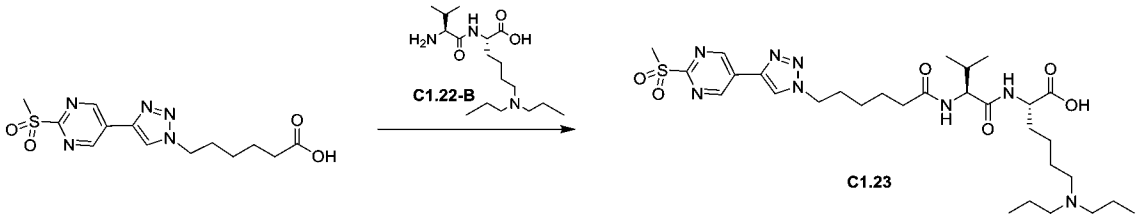
步驟三：將化合物 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (100 mg, 0.373 mmol)， 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (1 mL), 然後加入 HATU (142 mg, 0.373 mmol)，N,N-二異丙基乙胺 (120 mg, 0.93 mmol)，該體系攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.22-B (122 mg，0.371 mmol)，反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經過 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸(50 mg，收率 28%)為淡黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 580.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.24 (s, 2H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 4.24 – 4.16 (m, 1H), 4.10 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79 – 2.64 (m, 6H), 2.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.45 – 2.26 (m, 2H), 2.06 – 1.91 (m, 1H), 1.89 – 1.78 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 1H), 1.64 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.42 (m, 6H), 1.37 – 1.24 (m, 2H), 0.93 – 0.78 (m, 12H)。

【0732】實施例C1.23：N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-

1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸

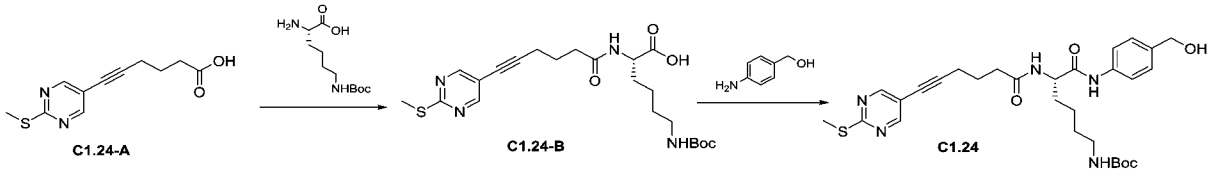


將化合物 6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (500 mg, 1.475 mmol)， 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (10 mL), 然後加入 HATU (560 mg, 1.475 mmol)， N,N-二異丙基乙胺 (476 mg, 3.688 mmol)，該體系攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.22-B (485 mg，1.475 mmol)，反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經過 C18 柱反相（乙腈和 0.05% 的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 (320 mg，收率 33%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 651.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 9.00 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.21 – 4.11 (m, 1H), 4.09 – 4.01 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.45 – 2.35 (m, 6H), 2.23 – 2.09 (m, 2H), 1.97 – 1.86 (m, 3H), 1.72 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.50 (m, 3H), 1.43 – 1.34 (m, 6H), 1.32 – 1.22 (m, 4H), 0.86 – 0.77 (m, 12H)。

【0733】實施例C1.24：(S)-(6-((4-(羥甲基)苯基)胺基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)-6-氧代己基)胺基甲酸第三丁酯



步驟一：將化合物 C1.24-A（3.70 g，15.7 mmol），二異丙基乙胺（11.0

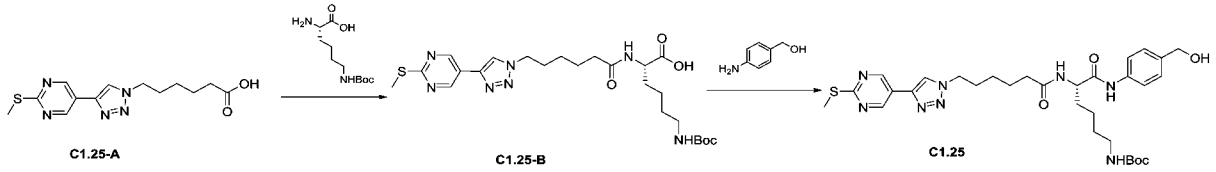
mL, 62.8 mmol）和 HBTU（8.90 g, 23.6 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（30 mL）中，反應在室溫下反應 30 分鐘。隨後加入化合物 Boc 保護的離胺酸（3.86 g，15.7 mmol），反應在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入檸檬酸水溶液（30 mL）調至 PH = 5，用二氯甲烷（50 mL X 3）萃取水溶液，合併有機相並用無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到目標化合物 C1.24-B（7.0 g, 粗品）為黃色油狀物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 465.1, t_R = 1.751 min.

步驟二：將化合物 C1.24-B（7.00 g，5.60 mmol），二異丙基乙胺（10.7 mL, 60.4 mmol）和 HBTU（8.60 g, 22.7 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（100 mL）中，隨後加入對胺基苄醇（3.71 g，30.2 mmol），反應在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入乙酸乙酯（300 mL），用飽和食鹽水（100 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物 (S)-(6-((4-(羥甲基)苯基)胺基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)-6-氧代己基)胺基甲酸第三丁酯（6.00 g, 收率：69.9%）為黃色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 570.1；

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.24 (s, 1H), 8.46 (s, 2H), 7.51 – 7.47 (m, 2H), 7.31 – 7.23 (m, 3H), 7.02 – 6.95 (m, 1H), 4.83 (br s, 1H), 4.63 – 4.60 (m, 2H), 3.19 – 2.96 (m, 4H), 2.57 (s, 3H), 2.52 – 2.48 (m, 2H), 2.47 – 2.41 (m, 2H), 1.99 – 1.92 (m, 2H), 1.87 – 1.77 (m, 2H), 1.76 – 1.63 (m, 2H), 1.43 (s, 9H)。

【0734】實施例C1.25： (S)-(6-((4-(羥甲基)苯基)胺基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)- 6-氧代己基)胺基甲酸第三丁酯



步驟一：將化合物 C1.25-A（1.60 g，5.21 mmol），二異丙基乙胺（2.68 mL, 20.8 mmol）和 HBTU（2.97 g, 7.82 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（30 mL），反應在室溫下反應 30 分鐘。隨後加入 Boc 保護的離胺酸（1.28 g，5.21 mmol），反應在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入檸檬酸水溶液（30 mL）調至 PH = 5，用二氯甲烷（50 mL X 3）萃取水溶液，合併有機相並用無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到目標化合物 C1.25-B（3.0 g, 粗品）為黃色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 536.0；

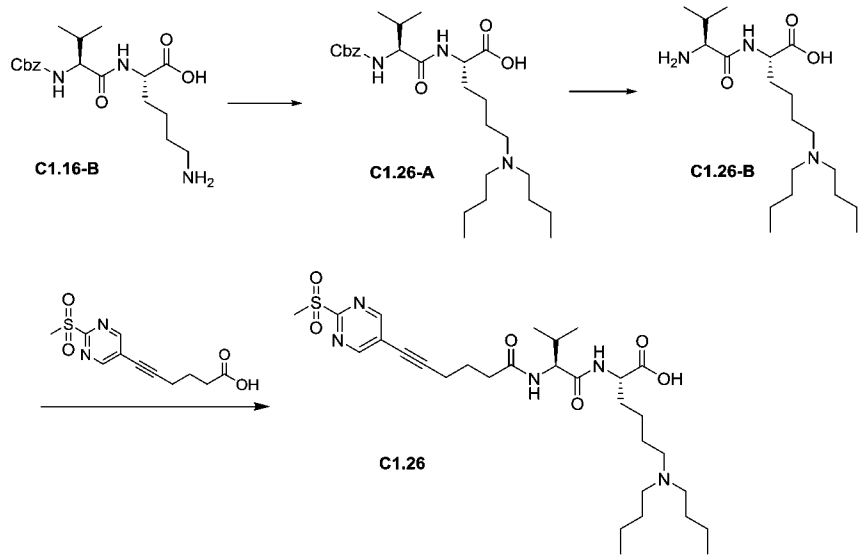
步驟二：將化合物 C1.25-B（3.00 g，5.60 mmol），二異丙基乙胺（2.89 g, 22.4 mmol）和 HBTU（3.19 g, 8.40 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（30 mL）。隨後加入對胺基苄醇（1.38 g，11.2 mmol），反應在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入乙酸乙酯（200 mL），用飽和食鹽水（80 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物(S)-(6-((4-(羥甲基)苯基)胺基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)- 6-氧代己基)胺基甲酸第三丁酯（2.90 g）為黃色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 641.1；

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.13 (s, 1H), 8.95 (s, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.83 – 6.77 (m, 1H), 4.93 – 4.80 (m, 1H), 4.64 – 4.58 (m, 2H), 4.40 – 4.29 (m, 2H), 3.12 – 2.97 (m, 4H), 2.60 (s, 3H),

2.31 – 2.23 (m, 2H), 1.96 – 1.83 (m, 4H), 1.76 – 1.61 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 1.37 – 1.29 (m, 4H)。

【0735】實施例C1.26：N^6,N^6-二丁基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：將化合物 C1.16-B（10.0 g）溶在二氯甲烷（200 mL）溶液中，向反應液中加入正丁醛（10.4 g），室溫下攪拌反應 10 分鐘，再向反應液中分批次加入三乙醯氧基硼氫化鈉（25.6 g），反應在室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入氯化銨飽和水溶液攪拌一個小時，旋乾，過濾後濾液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.26-A (4.9 g)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 492.7；

^{1}H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.35 – 7.30 (m, 5H), 5.14 – 5.08 (m, 2H), 4.33 – 4.30 (m, 1H), 4.14 – 4.12 (m, 1H), 2.94 – 2.80 (m, 6H), 2.13 – 2.11 (m, 1H), 1.85 – 1.82 (m, 2H), 1.58 – 1.55 (m, 4H), 1.40 – 1.22 (m, 8H), 0.98 – 0.87 (m, 12H)。

步驟二：室溫下，將化合物 C1.26-A（5.0 g）溶於甲醇（100 mL）溶液中，

然後向反應液中加入 Pd/C（10%，1 g），氫氣下攪拌反應 12 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.26-B（3.68 g)為白色固體。

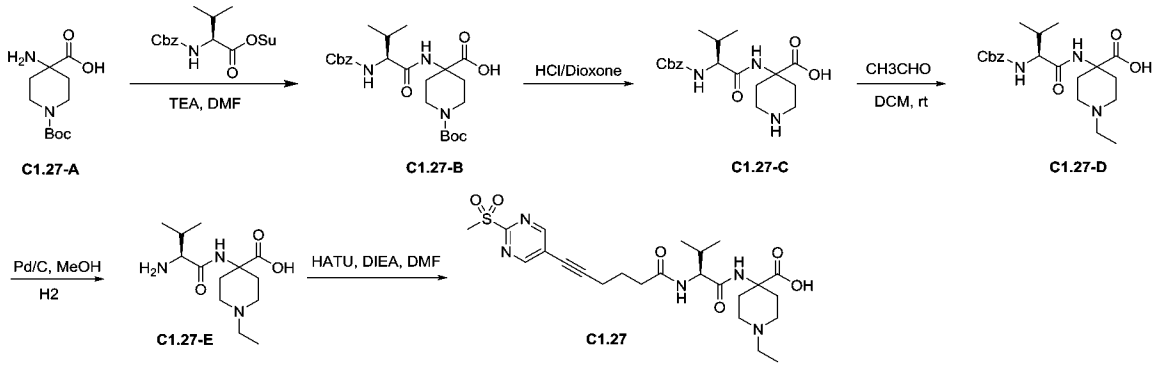
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 358.3。

步驟三：將化合物 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (1.0 g) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (15 mL), 然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 (1.2 g)，HATU (1.4 g)，反應攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.26-B (1.3 g)，反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，反應液，反應液直接經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N^6,N^6-二丁基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.26，500 mg）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 608.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.37 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.19 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.25 – 4.20 (m, 1H), 4.20 – 4.13 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.06 – 2.99 (m, 6H), 2.57 – 2.53 (m, 2H), 2.41 – 2.30 (m, 2H), 1.99 – 1.95 (m, 2H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.78 – 1.71 (m, 1H), 1.62 – 1.56 (m, 4H), 1.34 – 1.32 (m, 8H), 0.94 – 0.85 (m, 12H)。

【0736】實施例C1.27：(S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)哌啶-4-羧酸



步驟一：將化合物 C1.27-A（5.0 g，20.49 mmol）溶在 DMF（100 mL）中，向反應液中加入 N-（（苄氧基）羰基）-L-纈胺酸 2,5-二氧吡咯烷-N-羥基酯（7.13 g，20.49 mmol），100℃下攪拌反應 48 小時。LCMS 顯示反應完全。反應液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.27-B (1.3 g, 收率 13.3%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M\text{-boc}]^+ = 378.2$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.38 – 7.33 (m, 5H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.14 – 5.02 (m, 2H), 3.97 – 3.87 (m, 1H), 3.70 – 3.59 (m, 2H), 3.08 – 2.95 (m, 2H), 2.04 – 1.97 (m, 1H), 1.95 – 1.87 (m, 2H), 1.76 – 1.69 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 0.91 – 0.84 (m, 6H)。

步驟二：室溫下，將化合物 C1.27-B（1.3 g，2.71 mmol）溶於乙酸乙酯中（10 mL）溶液中，然後向反應液中加入二氧六環-HCl（3N，10 mL），室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液減壓濃縮得到目標化合物 C1.27-C（1.06 g, 收率 94.4%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 378.4$。

步驟三：將化合物 C1.27-C（1.06 g，2.81mmol）溶在二氯甲烷（10 mL）中，向反應液中加入乙醛（0.75 g，16.87 mmol），室溫下攪拌反應 10 分鐘，再向反應液中發批次加入三乙醯氧基硼氫化鈉（3g，14.05 mmol），反應在

室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入氯化銨飽和水溶液攪拌一個小時，減壓蒸餾除去二氯甲烷，剩餘水相經反相分離(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.27-D (1.13 g, 收率 99.23%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 406.1；

1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.42 – 7.25 (m, 5H), 5.22 – 5.06 (m, 2H), 3.91 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.52 – 3.36 (m, 2H), 3.25 – 2.93 (m, 4H), 2.66 – 2.54 (m, 1H), 2.47 – 2.36 (m, 1H), 2.27 – 2.14 (m, 2H), 2.13 – 2.06 (m, 1H), 1.35 – 1.29 (m, 4H), 0.98 – 0.90 (m, 6H)。

步驟四：室溫下，將化合物 C1.27-D（1.13 g，2.78 mmol）溶於甲醇（20 mL）溶液中，然後向反應液中加入 Pd/C（0.5 g），氫氣下攪拌反應 12 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.27-E （0.58 g, 收率 76.18%)為白色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 272.4。

步驟五：將化合物 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (1 g, 3.73mmol)，溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (5 mL), 然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 (1.2 g, 9.32 mmol)，HATU (1.42 g, 3.73 mmol)，反應液攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.27-E (1.01 g，3.73 mmol)，反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物(S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)哌啶-4-羧酸（C1.27，500 mg, 收率 28.7%）為黃色固體。

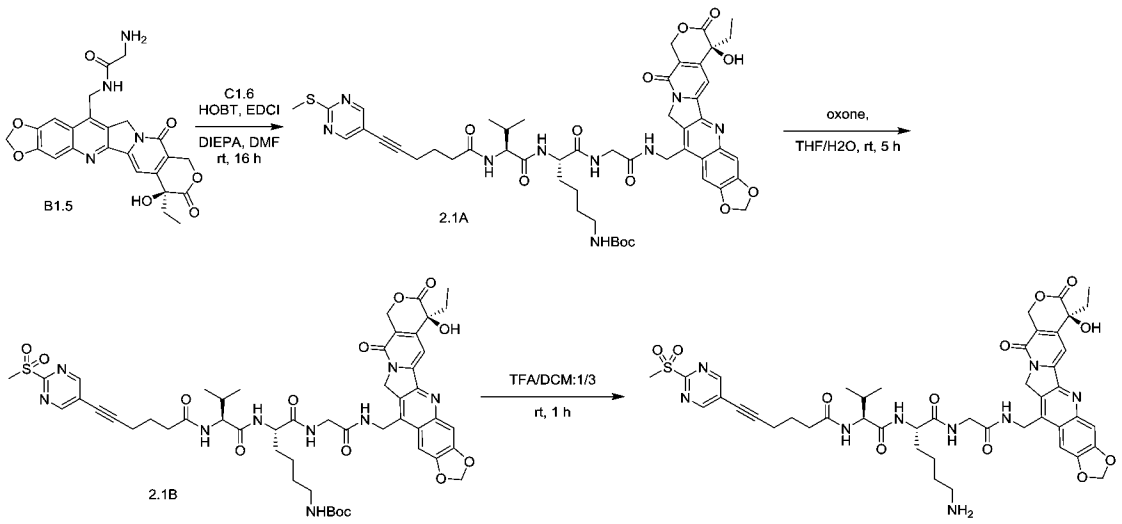
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 522.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.12 (s, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz,

1H), 4.28 – 4.25 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.89 – 2.78 (m, 2H), 2.57 – 2.52 (m, 4H), 2.45 – 2.30 (m, 4H), 2.07 – 2.01 (m, 2H), 1.99 – 1.96 (m, 1H), 1.95 – 1.88 (m, 2H), 1.85 – 1.79 (m, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.88 – 0.83 (m, 6H)。

【0737】二、藥物-連接體化合物合成

【0738】實施例2.1：N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啡並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 （DL-001）



步驟一：將化合物 C1.6 (50 mg, 0.10 mol), 化合物 B1.5 (71 mg， 0.12 mol)，N,N-二異丙基乙胺 (39 mg, 0.30 mol) 溶於 DMF (5 mL)。然後依次加入 1-羥基苯並三唑(16 mg, 0.12 mmol)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(23 mg, 0.12 mmol), 上述反應液室溫攪拌 16 小時，加入 50mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品，粗產品用快矽膠柱層析分離純化(DCM : MeOH = 100 : 0 到 90 : 10)得到目標化合物 2.1A， (62 mg，黃色固體，收率 58%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1024.8。

步驟二：將化合物 2.1A (40 mg, 0.04 mmol)溶於四氫呋喃和水的混合溶液（體積比為 1/1；4 mL）中，加入過氧單磺酸鉀(246 mg, 0.4 mmol)，反應液在室溫下攪拌 5 小時，加入 30mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到目標化合物 2.1B (30 mg，黃色固體,收率 74%)。

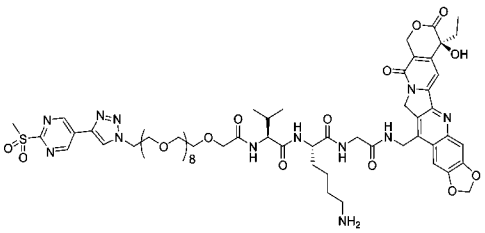
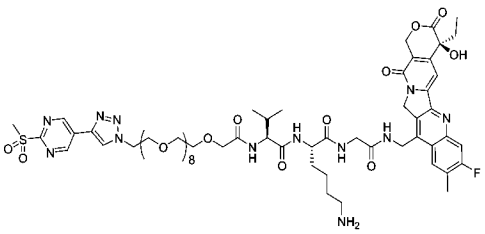
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1055.9。

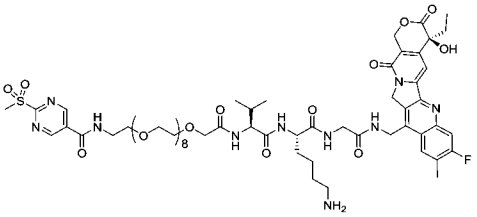
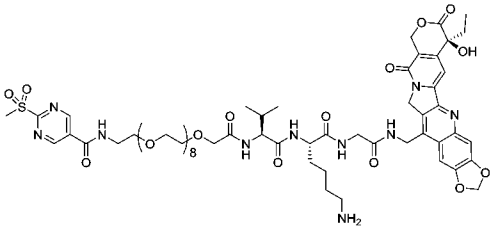
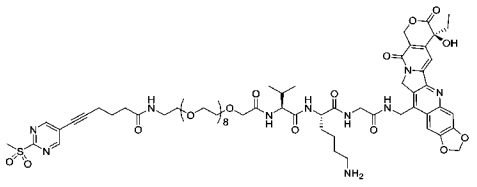
步驟三：將化合物 2.1B (30 mg, 0.03 mmol) 溶於三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(體積比為 1：3；4 mL)中, 反應液在室溫下攪拌 1 小時。然後減壓濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜(0.01% TFAin water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (9 mg, 白色固體，收率 33%)。

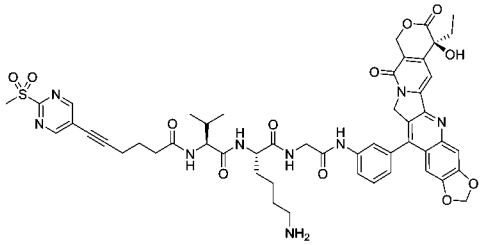
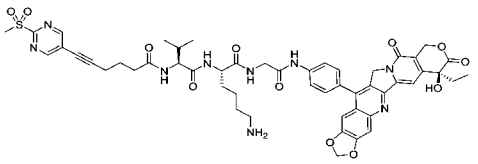
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：955.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.09 (s, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.15 (m, 2H), 7.84 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.64 (br s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.30 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 5.59 – 5.46 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.87 – 4.78 (m, 1H), 4.70 – 4.60 (m, 1H), 4.17 – 4.03 (m, 2H), 3.82 – 3.58 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.80 – 2.70 (m, 2H), 2.40 – 2.22 (m, 2H), 1.93 – 1.68 (m, 6H), 1.65 – 1.57 (m, 1H), 1.56 – 1.45 (m, 3H), 1.36 – 1.22 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H)。

用實施例 2.1 相同的方法和反應條件，用所示的不同起始原料，得到下表中實施例 2.2 到實施例 2.8 所示的目標產物。

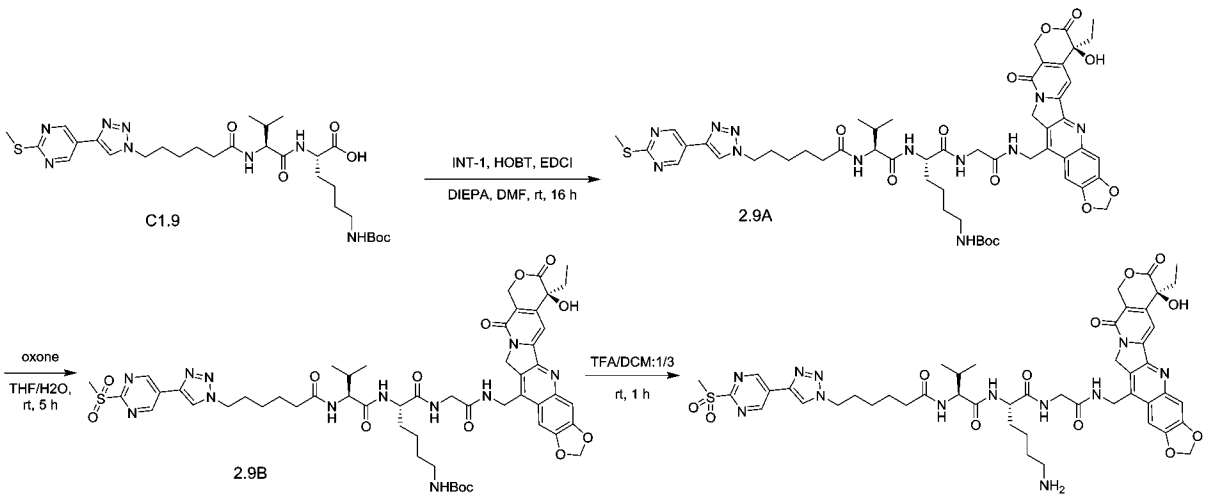
實施例	化合物	名稱	(m/z): $[M+H]^+$
實施例 2.2	 DL-002 原料：C1.2，B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代-己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代-丁-2-基)-29-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜二十九烷醯胺	1366.9
實施例 2.3	 DL-003 原料：C1.2，B1.4	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-己)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜二十九烷醯胺	1354.9

實施例2.4	 DL-004 原料：C1.1，B1.4	N-((7S,10S)-7-(4-胺基丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-10-異丙基-3,6,9,12-四氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧雜-2,5,8,11-四氮雜四十烷-40-基)-2-(甲磺醯基)嘧啶-5-甲醯胺	1330.9
實施例2.5	 DL-005 原料：C1.1，B1.5	N-((7S,10S)-7-(4-胺基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)- 10-異丙基-3,6,9,12-四氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧雜-2,5,8,11-四氮雜四十烷-40-基)-2-(甲磺醯基)嘧啶-5-甲醯胺	1342.8
實施例2.6	 DL-006 原料：C1.5，B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(6-(2-(甲	1408.5

		磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜二十九烷醯胺	
實施例2.7	 DL-007 原料：C1.7，B1.8	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-己)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔-醯胺	1017.9
實施例2.8	 DL-008 原料：C1.7，B1.9	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((4-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺	1017.8

【0739】實施例2.9：(S)-6-胺基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-

7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-009）



步驟一： 將化合物 B1.5 (30 mg), 化合物 C1.9 (48 mg)， N,N-二異丙基乙胺 (23 mg) 溶於 DMF (5 mL)。向上述溶液中加入 1-羥基苯並三唑(9 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(13 mg) ，反應室溫攪拌 16 小時，加入 50mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品，粗產品用快速色譜法分離純化(DCM：MeOH = 100 : 0 to 90 : 10)得到目標化合物 2.9A (35 mg，淡黃色固體，收率 43%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1095.8

步驟二：將化合物 2.9A (35 mg)溶於四氫呋喃和水的混合溶液（體積比為 1/1；4 mL）中，加入過氧單磺酸鉀(184 mg)，反應液室溫下攪拌 5 小時，加入 30mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到目標化合物 2.9B (25 mg，淡黃色固體，收率 71%)。

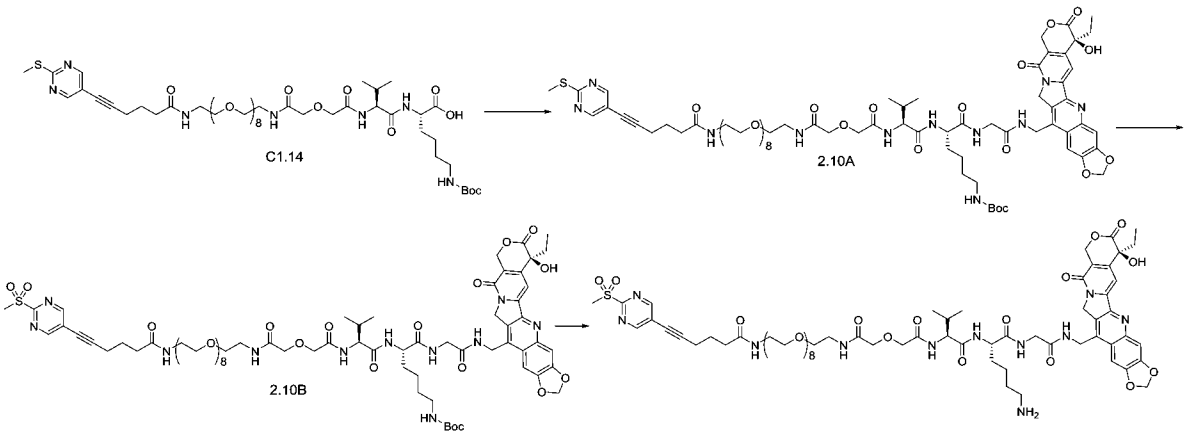
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1126.9。

步驟三：將化合物 2.9B (25 mg) 溶於三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(體積比為 1：3；4 mL)中, 反應液在室溫下攪拌 1 小時。液濃縮得粗產品，經 prep-HPLC (0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 (S)-6-胺基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺三氟乙酸鹽 (5.1 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1026.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.11 – 8.10 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73 – 7.72 (m, 1H), 7.63 (s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.29 (m, 2H), 5.61 – 5.46 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.85 – 4.83 (m, 1H), 4.63 – 4.60 (m 1H), 4.44 (s, 2H), 4.06 – 4.03 (m, 3H), 2.75 (s, 2H), 2.12 – 2.10 (m, 2H), 1.89 – 1.85 (m, 6H), 1.56 – 1.53 (m, 8H), 1.24 (br s, 4H), 0.87 – 0.84 (m, 3H), 0.77 (d, J = 6.1 Hz, 6H).

【0740】實施例2.10：N-((7S,10S)-7-(4-胺基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-10-異丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧雜-2,5,8,11,17-五氮雜四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-010）



步驟一：將化合物 C1.14（112 mg）溶在 N,N-二甲基甲醯胺（2 mL）中，依次加入三乙胺（32 mg，0.31 mmol），1-羥基苯並三唑(17 mg，0.13 mmol)，1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽 (24 mg，0.13 mmol)，攪拌 20 分鐘，然後將化合物 B1.5 (50 mg) 加入於反應液中，反應液在 40°C 下攪拌過夜。向反應液中加入 10 mL 水，二氯甲烷萃取，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，旋乾得到粗品。粗產品用 C18 柱反相分離純化（乙腈/0.01%FA 的水溶液： 0%-55%）得到白色固體目標化合物 2.10A（75 mg，收率 46%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1534.0。

步驟二：將化合物 2.10A（75 mg）溶在四氫呋喃和水（8mL，1:1）溶液中，加入過氧單磺酸鉀（211 mg）室溫攪拌反應 10 小時。向反應液中加入 10 mL 二氯甲烷，萃取，分液，無水硫酸鈉乾燥，抽濾旋乾得到目標產物 2.10B（50 mg，收率 65%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1566.2。

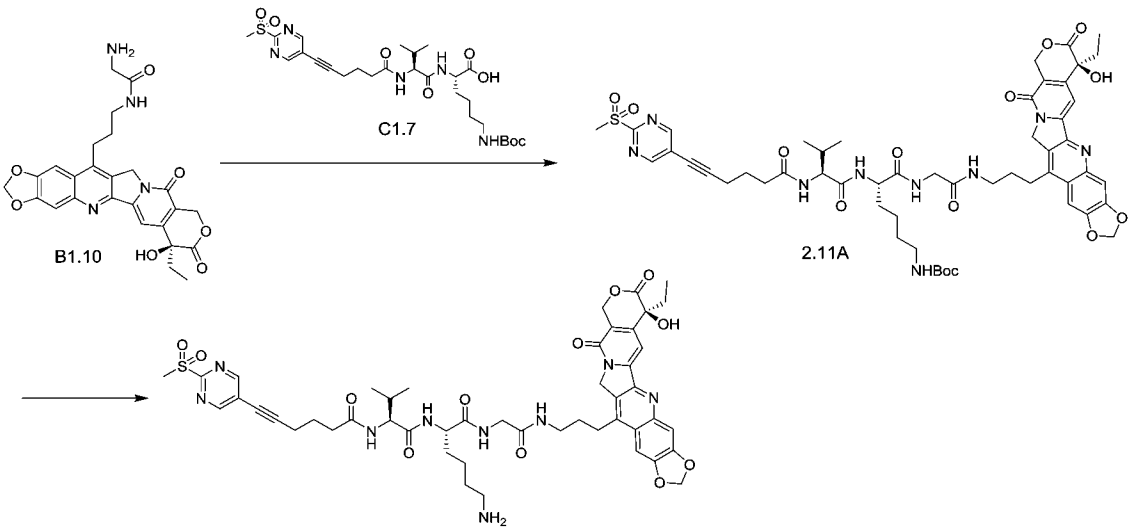
步驟三：將化合物 2.10B（50 mg）溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（體積比為 1：2：4 mL）中，然後反應液在室溫下攪拌 1 小時。將反應液濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜（0.01% TFAin water，MeCN）得到目標化

合物 N-((7S,10S)-7-(4-胺基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-10-異丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧雜-2,5,8,11,17-五氮雜四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)已-5-炔醯胺 (10.5 mg，收率 21%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1466.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12 (s, 2H), 8.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.26 – 8.11 (m, 2H), 8.03 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.93 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.61 (s, 3H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.31 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 5.46 (d, *J* = 17.2 Hz, 4H), 4.76 (dt, *J* = 14.8, 8.7 Hz, 2H), 4.20 – 4.15 (m, 4H), 4.00 (s, 3H), 3.95 (d, *J* = 5.5 Hz, 3H), 3.72 – 3.67 (m, 2H), 3.50 (d, *J* = 3.9 Hz, 30H), 3.41 (s, 3H), 3.25 – 3.19 (m, 4H), 2.76 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.90 (dd, *J* = 16.1, 7.4 Hz, 2H), 1.84 – 1.78 (m, 2H), 1.63 (s, 1H), 1.53 – 1.48 (m, 2H), 1.30 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 0.87 – 0.84 (m, 4H), 0.78 – 0.75 (m, 6H)。

【0741】實施例2.11：N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代已-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)已-5-炔醯胺（DL-011）



步驟一：向化合物 B1.10（75 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 C1.7（107 mg），三乙胺（45 mg），HOBT（25 mg）和 EDCI（35 mg），在 35 ℃下反應 4 小時。向反應液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物 2.11A（60 mg ，收率：37%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1084；

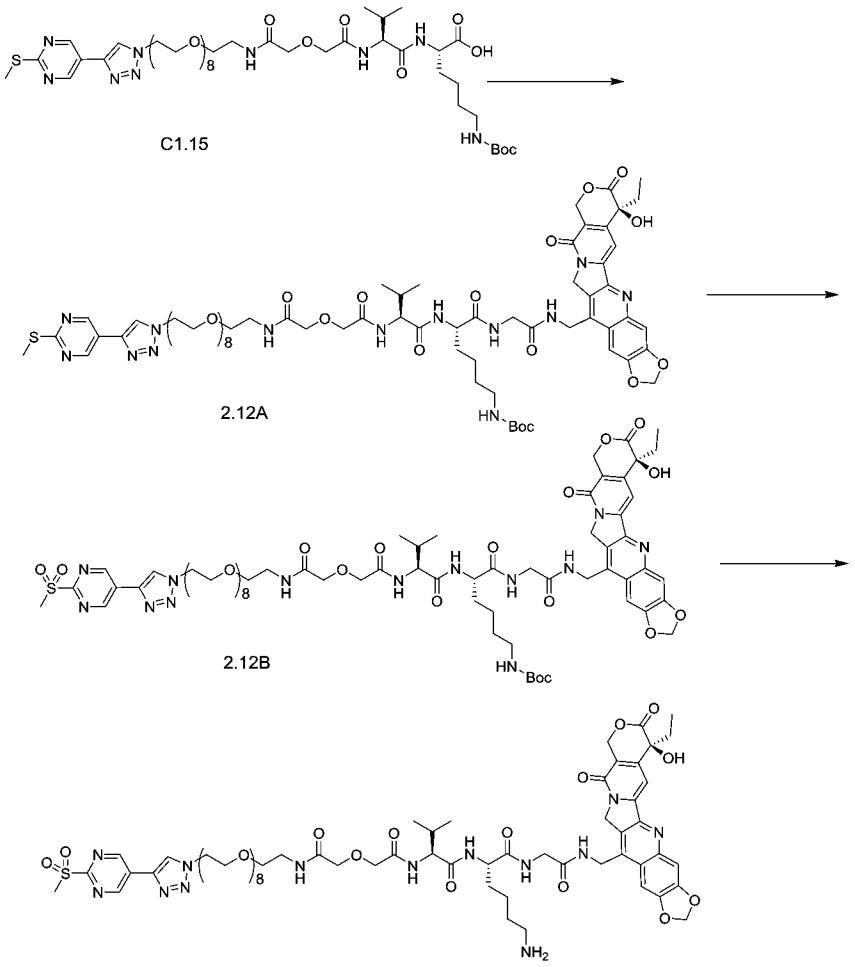
步驟二：向化合物 2.11A（60 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（體積比為 1：2：4 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液濃縮，粗品經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（9 mg，收率 18%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：983.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.08 (s, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.19

(d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.25 – 4.07 (m, 2H), 3.74 – 3.70 (m, 3H), 3.25 (d, *J* = 12.4 Hz, 3H), 3.08 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.73 (s, 2H), 2.40 – 2.19 (m, 3H), 2.01 – 1.64 (m, 10H), 1.52 (br s, 4H), 1.34 (br s, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.83 – 0.75 (m, 6H)。

【0742】實施例2.12：(S)-6-胺基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-異丙基-35-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧雜-3,9-二氮雜三十五醯胺)己醯胺（DL-012）



步驟一：將化合物 C1.15（80 mg），化合物 B1.5（37 mg），三乙胺 (23 mg，

0.231 mo,) 溶於 DMF (5 mL)。然後再加入 1-羥基苯並三唑(12 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(17 mg)，反應液室溫攪拌 16 小時，加入 50mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品，粗產品用快速色譜法分離純化(DCM :MeOH = 100：0 到 90：10)得到目標化合物 2.12A (75 mg，收率 65%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1492.0。

步驟二：將化合物 2.12A (50 mg)溶於四氫呋喃和水的混合溶液（體積比為 1/1；4 mL）中，加入過氧單磺酸鉀(202 mg)，反應液在室溫下攪拌 5 小時，加入 30mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到目標化合物 2.12B (40 mg，收率 80%)。

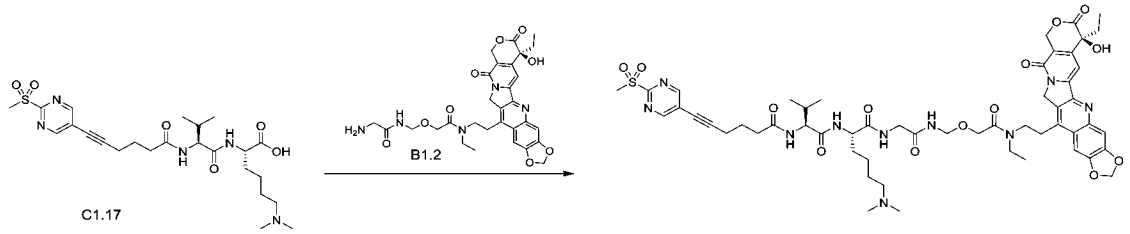
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1524.1。

步驟三：將化合物 2.12B (30 mg)溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(體積比為 1 比 3；4 mL)中,然後反應液在室溫下攪拌 1 小時。將反應液濃縮得粗產品，粗產品經 prep-HPLC(水含 0.01% 三氟乙酸, 乙腈)純化得到目標化合物(S)-6-胺基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-異丙基-35-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧雜-3,9-二氮雜三十五醯胺)己醯胺 (9 mg, 收率 30%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1423.9。

【0743】實施例2.13：N-((13S,16S)-13-(4-(二甲基胺基)丁基)-3-乙基-1-((S)-

7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-013）



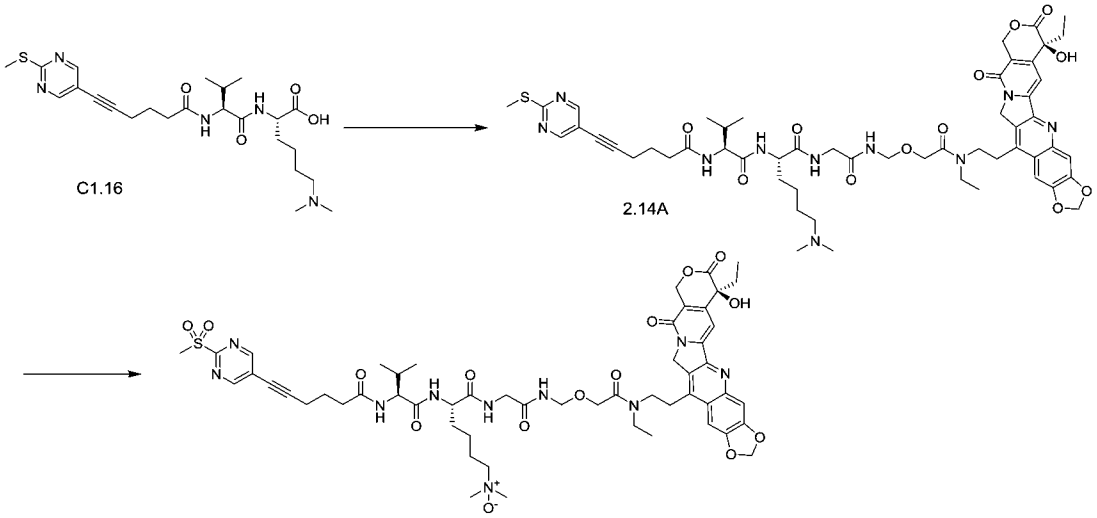
將化合物 C1.17 (50 mg), 化合物 B1.2 (58 mg)，三乙胺 (24 mg) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL)。然後依次加入 1-羥基苯並三唑(16 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(22 mg)，反應液室溫攪拌 16 小時。反應液直接經製備色譜(0.01% 甲酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物（21 mg, 收率 10%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1113.0；

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.93 (s, 2H), 8.40 – 8.33 (m, 1H), 8.30 – 8.25 (m, 1H), 8.25 – 8.21 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.22 (s, 2H), 5.47 (dd, *J* = 78.6, 16.4 Hz, 2H), 5.28 – 5.13 (m, 2H), 4.73 – 4.59 (m, 2H), 4.30 – 4.05 (m, 4H), 3.94 – 3.82 (m, 2H), 3.70 – 3.57 (m, 2H), 3.54 – 3.44 (m, 1H), 3.34 (s, 6H), 3.16 – 3.08 (m, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.58 – 2.40 (m, 4H), 2.04 – 1.83 (m, 6H), 1.80 – 1.68 (m, 3H), 1.54 – 1.36 (m, 2H), 1.24 – 1.15 (m, 3H), 1.03 – 0.86 (m, 9H)。

【0744】實施例2.14： N-((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基胺基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環

戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-014）



步驟一：將化合物 C1.16 (49 mg), 化合物 B1.2 (71 mg)， N,N-二異丙基乙胺 (39 mg) 溶於 DMF (5 mL)。然後依次加入 1-羥基苯並三唑(16 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(23 mg), 加完後反應液室溫攪拌 16 小時，加入 50mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品，粗產品用快矽膠柱層析分離純化(DCM：MeOH = 100：0 到 90：10)得到目標化合物 2.14A (61 mg，收率 60%)。

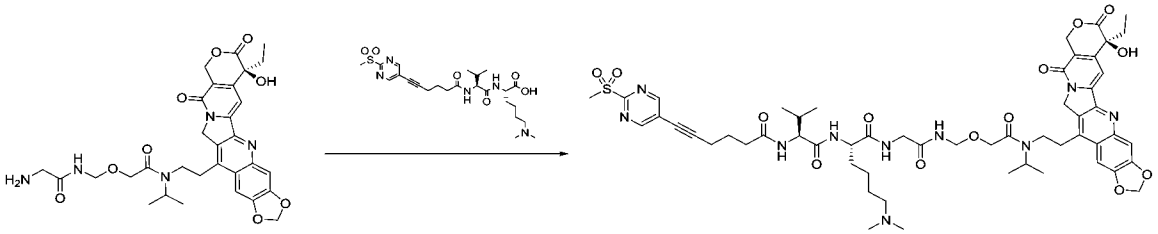
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1081.6；

步驟二：將化合物 2.14A (40 mg)溶於四氫呋喃和水的混合溶液（體積比為 1/1；4 mL）中，加入過氧單磺酸鉀(227 mg, 0.37 mmol)，反應液在室溫下攪拌 5 小時，LCMS 顯示反應完畢, 加入 30mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品化合物 ，粗產品經製備色譜(0.01% 甲酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-

((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基胺基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (9 mg, 收率 33%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1129.0。

【0745】實施例 2.15： N-((13S,16S)-13-(4-(N,N-二甲基胺基)丁基)-3-異丙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-015）



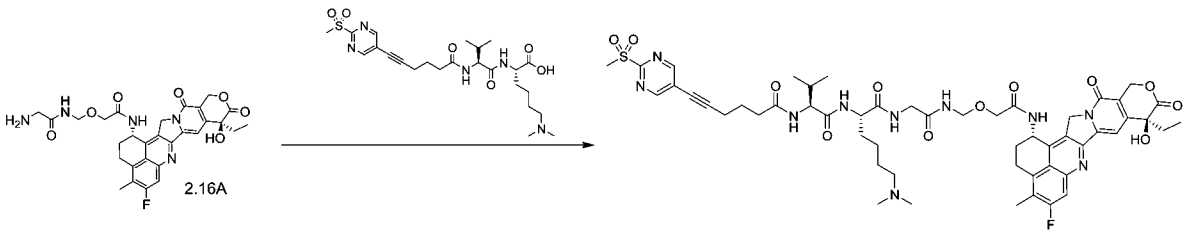
向化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（42 mg，C1.17）和化合物(S)-2-((2-胺基乙醯胺基)甲氧基)-N-異丙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙醯胺（50 mg，B1.11)，的 N,N-二甲基甲醯胺（10 mL）溶液中，依次加入 HBTU（31 mg）和二異丙基乙胺（21 mg）。反應在室溫下攪拌 2 小時。反應液過濾後經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%三氟乙酸）得到目標化合物 N-((13S,16S)-13-(4-(N,N-二甲基胺基)丁基)-3-異丙基-1-((S)-7-乙基-7-

羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（15.2 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1127.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.73 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.23 – 8.17 (m, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.97 – 7.93 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.33 – 4.21 (m, 4H), 4.20 – 4.13 (m, 2H), 3.76 – 3.74 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.40 – 3.38 (m, 1H), 3.30 – 3.21 (m, 2H), 3.04 – 2.95 (m, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.39 – 2.31 (m, 2H), 2.00 – 1.74 (m, 6H), 1.68 – 1.49 (m, 4H), 1.37 – 1.27 (m, 2H), 1.23 – 1.16 (m, 6H), 0.89 – 0.82 (m, 9H)。

【0746】實施例 2.16： N-((10S,13S)-10-(4-(N,N-二甲基胺基)丁基)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯並[de] 吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-1-基)胺基)-14-甲基-1,6,9,12-四氧代-3-氧雜-5,8,11-三氮雜十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-016）



將化合物 N6，N6-二甲基-N2-((6-（2-（甲磺醯基）嘧啶-5-基）十六烷基-5-炔醯基）-L-丙醯基）-L-離胺酸 (C1.17，52.3 mg) 溶於 N, N-二甲基甲醯

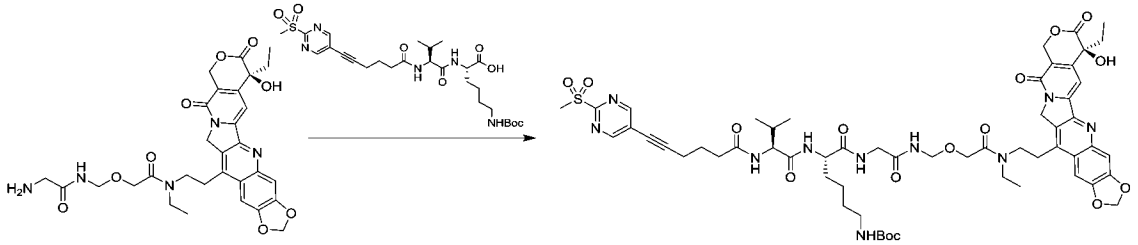
胺 (2 mL)，然後再依次加入 HBTU（38 mg, 0.10 mmol）和 N,N-二異丙基乙胺（26 mg, 0.20 mmol），加完後反應液室溫攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 2-胺基-N-((2-(((1S，9S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氫-1H，12H-苯並[de]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-1-基）胺基）-2-氧代乙氧基）甲基）乙醯胺 (2.16A，根據 CN104755494A 中第 147-148 頁報導的相同方法製備的，63 mg), LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜(0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((10S,13S)-10-(4-(N,N-二甲基胺基)丁基)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯並[de] 吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-1-基)胺基)-14-甲基-1,6,9,12-四氧代-3-氧雜-5,8,11-三氮雜十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（8.1 mg, 收率 7%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1085.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.31 (s, 1H), 9.11 (s, 2H), 8.72 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.63 – 5.54 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.68 – 4.58 (m, 2H), 4.26 – 4.12 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.73 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.20 – 3.10 (m, 2H), 3.05 – 2.95 (m, 2H), 2.76 (d, *J* = 4.7 Hz, 6H), 2.55 – 2.53 (m, 2H), 2.42 – 2.28 (m, 6H), 2.21 – 2.13 (m, 2H), 2.02 – 1.77 (m, 6H), 1.76 – 1.62 (m, 2H), 1.62 – 1.51 (m, 3H), 1.37 – 1.21 (m, 2H), 0.90 – 0.80 (m, 9H)。

【0747】實施例 2.17： 第三丁基 ((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二

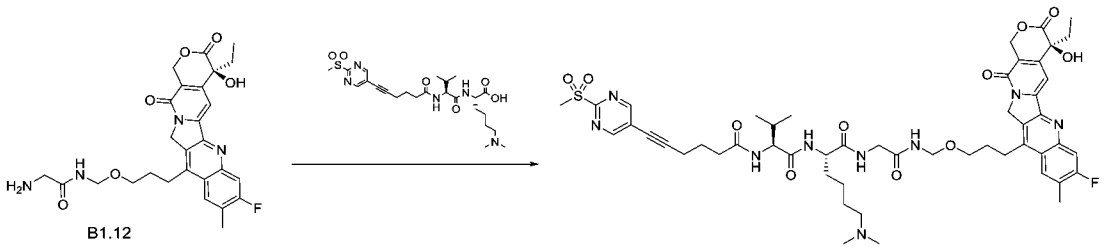
氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)-4,9,12-三氧代-6-氧雜-3,8,11-三氮雜十七烷-17-基)胺基甲酸酯（DL-017）



將化合物 C1.7（90.0 mg），二異丙基乙胺（68.0 mg）和 HATU（100 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（5 mL）中。隨後加入化合物 B1.2（80 mg），室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入乙酸乙酯（50 mL），用飽和食鹽水（30 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黃色固體化合物第三丁基 ((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)-4,9,12-三氧代-6-氧雜-3,8,11-三氮雜十七烷-17-基)胺基甲酸酯（2.06 mg，收率 10.6%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1184.9。

【0748】實施例2.18： N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-018）



B1.12

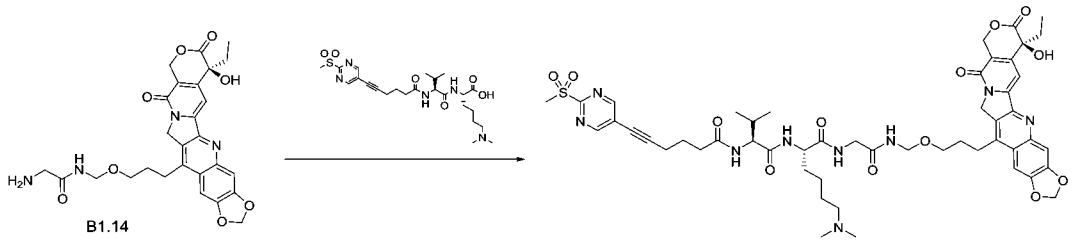
將化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（126 mg）（C1.17），B1.12（150 mg），1-羥基苯並三唑（49 mg）， 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽（69 mg）和二異丙基乙胺（156 mg, 1.21 mmol）溶在 N,N-二甲基甲醯胺（10 mL）溶液中，反應在 40 °C 下攪拌 12 小時。LCMS 顯示反應完成。反應液過濾經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黃色固體化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-018）（12 mg，收率 6.0%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1030.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.62 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.23 – 8.13 (m, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.95 – 7.83 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.64 – 4.53 (m, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.19 – 4.11 (m, 1H), 3.76 – 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.23 – 3.19 (m, 2H), 2.67 – 2.62 (m, 2H), 2.57 – 2.54 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.42 – 2.26 (m, 3H), 2.02 – 1.77 (m, 6H), 1.68 – 1.66 (m, 1H), 1.58 – 1.45 (m, 3H), 1.36 – 1.25 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H)。

【0749】實施例2.19： N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-

7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-019）



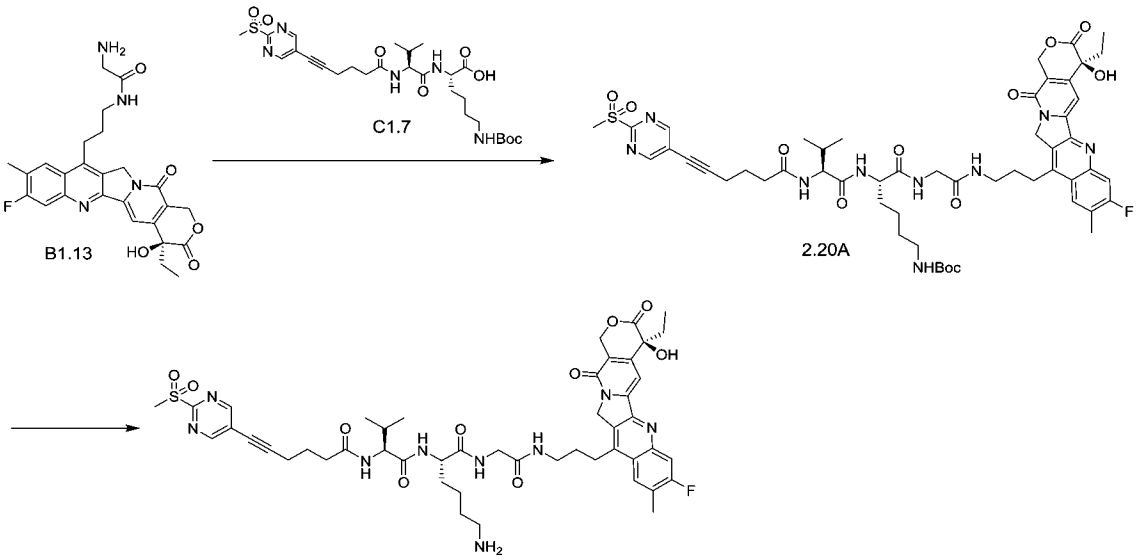
將化合物 B1.14 (100 mg, 0.186 mmol), 化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 (100 mg， 0.191 mmol) 溶於 DMF (2 mL)。然後再加入 1-羥基苯並三唑(38 mg, 0.280 mmol)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(53 mg, 0.280 mmol), 然後再加入三乙胺 (56 mg, 0.559mmol) 加完後反應液室溫攪拌 16 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (20 mg, 收率 10%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1042.5;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.28 (s, 1H, TFA), 9.10 (s, 2H), 8.64 (br s, 1H), 8.19 (br s, 1H), 8.09 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.67 – 4.52 (m, 2H), 4.30 – 4.10 (m, 2H), 3.74 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.17 – 3.07 (m, 2H), 3.04 – 2.91 (m, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.46 – 2.24

(m, 3H), 2.04 – 1.66 (m, 9H), 1.63 – 1.46 (m, 3H), 1.32 – 1.29 (m, 2H), 0.87 – 0.82 (m, 9H)。

【0750】實施例2.20：N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-020）



步驟一：向化合物 B1.13（75 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 C1.7（107 mg），三乙胺（45 mg），HOBT（25 mg）和 EDCI（35 mg），在 35 ℃下反應 4 小時。向反應液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物 2.20A（76 mg）。

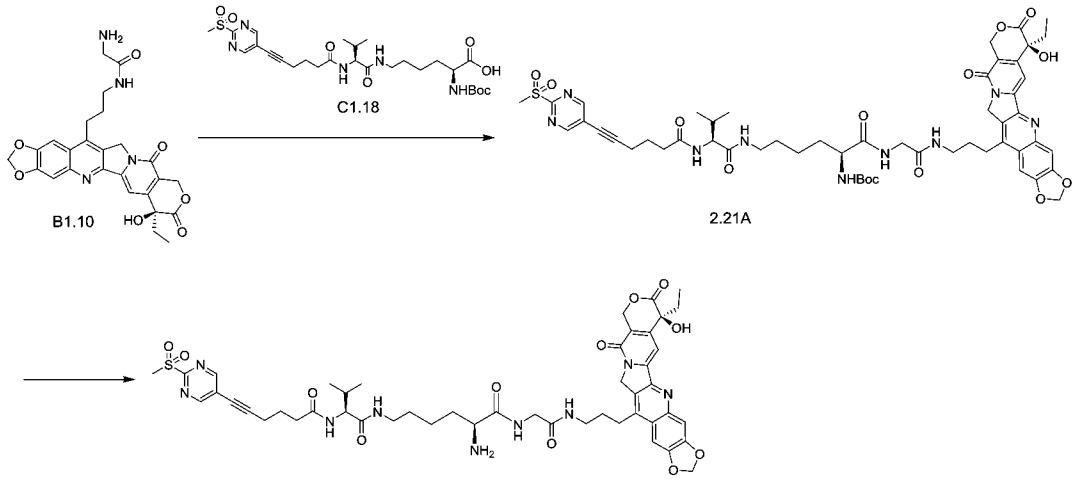
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1072.5；

步驟二：向化合物 2.20A（60 mg， 0.06 mmol）的二氯甲烷溶液（2 mL）中，加入三氟乙酸（1 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。將反應液濃縮，經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目

標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（43 mg，收率 80%）為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ ：972.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.09 (s, 2H), 8.24 – 8.17 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.99 – 7.93 (m, 1H), 7.88 – 7.84 (m, 2H), 7.64 (s, 3H, NH2-TFA), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.25 – 4.18 (m, 1H), 4.15 – 4.11 (m, 1H), 3.76 – 3.71 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.32 – 3.26 (m, 2H), 3.21 – 3.17 (m, 1H), 2.79 – 2.70 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.40 – 2.24 (m, 3H), 1.94 – 1.82 (m, 7H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.58 – 1.49 (m, 3H), 1.36 – 1.31 (m, 1H), 1.18 – 1.14 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.80 – 0.76 (m, 6H)。

【0751】實施例2.21：N-((S)-1-(((S)-5-胺基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-6-氧代己基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺



步驟一：將化合物 C1.18（430 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (5 mL)中，然

後加入 EDCI（160 mg），HOBT (115 mg)和三乙胺 （214 mg）。加完畢後反應液室溫攪拌 20 分鐘，然後加入化合物 B1.10（314 mg），室溫攪拌反應 3 小時，LCMS 檢測反應完全，加水稀釋，乙酸乙酯萃取，有機相濃縮的粗品 2.21A（350 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1084.3；

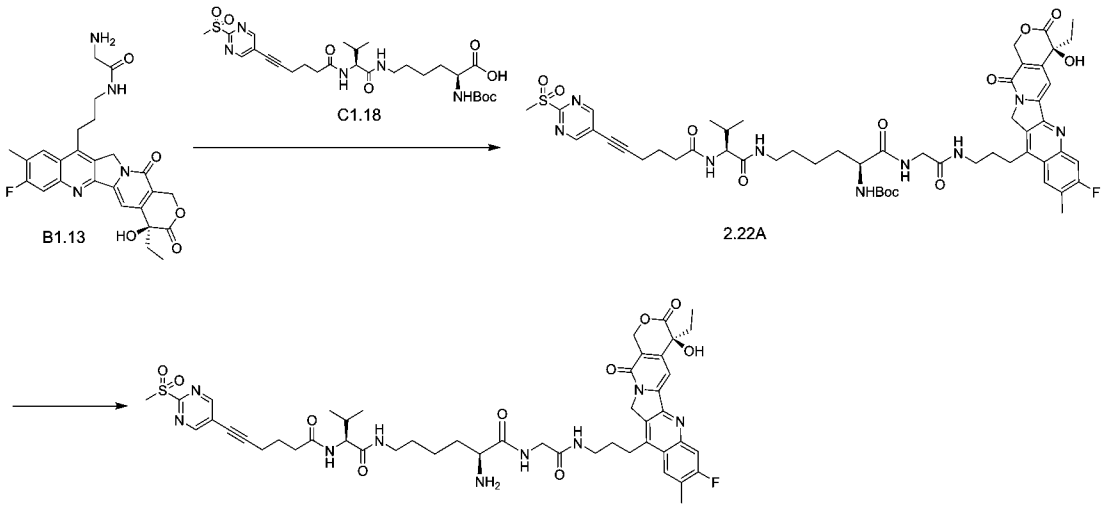
步驟二：向化合物 2.21A（350 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（體積比為 1：2：4 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液濃縮，粗品經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-5-胺基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-6-氧代己基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（100 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：984.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.69 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.14 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.08 (s, 3H, NH2-TFA), 7.95 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.09 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.83 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.33 – 3.27 (m, 2H), 3.15 – 3.06 (m, 3H), 2.97 – 2.94 (m, 1H), 2.57 – 2.53 (m, 2H), 2.43 – 2.28 (m, 3H), 1.95 – 1.68 (m, 9H), 1.46 – 1.28 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H)。

【0752】實施例2.22：N-((S)-1-(((S)-5-胺基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]

喹啉-11-基) 丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-6-氧代己基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 DL-022）



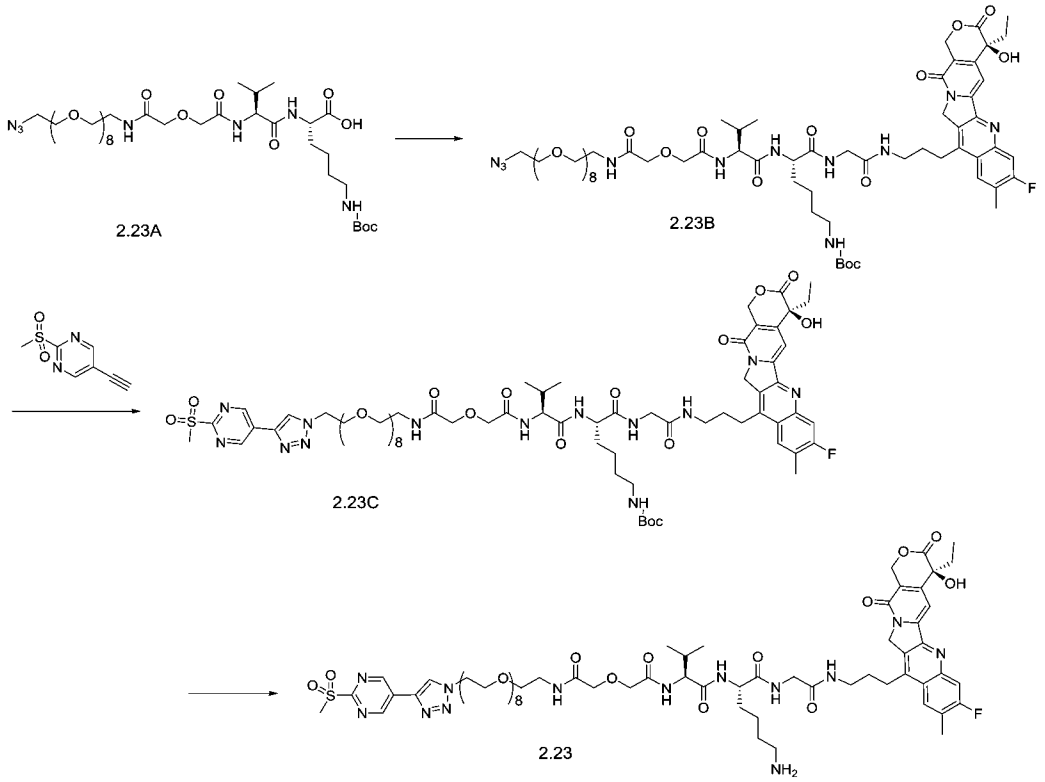
步驟一：將化合物 C1.18（136 mg，0.23 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (5 mL)中，然後加入 EDCI（48 mg，0.25 mmol），HOBT (34 mg, 0.25 mmol) 和三乙胺 （64 mg, 0.63 mmol）。加完畢後反應液室溫攪拌 20 分鐘，然後加入化合物 B1.13（3105 mg，0.19 mmol），室溫攪拌反應 3 小時，LCMS 檢測反應完全，加水稀釋，乙酸乙酯萃取，有機相濃縮的粗品。所得化合物溶於二氯甲烷（4 mL）中， 然後加入三氟乙酸 （2 mL），反應 1 小時後，濃縮，粗品經製備提純得目標化合物 N-((S)-1-(((S)-5-胺基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基) 丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-6-氧代己基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-022）（88 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 972.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.72 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.17 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.11 (s, 3H, NH2-TFA), 7.97 (t, *J* = 5.6

Hz, 1H), 7.93 – 7.86 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.14 – 4.02 (m, 2H), 3.85 – 3.83 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.32 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.24 – 3.16 (m, 2H), 3.11 – 2.94 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.35 – 2.30 (m, 3H), 1.92 – 1.69 (m, 10H), 1.43 – 1.29 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H)。

【0753】實施例2.23：(S)-6-胺基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-異丙基-35-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧雜-3,9-二氮雜三十五烷醯胺基)己醯胺（DL-023）



步驟一：向化合物 B1.13（46 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 2.23A（100 mg），三乙胺（50 ul），HOBT（16 mg）和 EDCI（23 mg），在 35 ℃下反應 4 小時。向反應液中加入水（30 mL），乙

酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物 2.23B（105 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1358.4；

步驟二：化合物 2.23B （105 mg），2-甲磺醯基-5-乙炔基嘧啶（45 mg）溶於 DMSO-水（2 ml，4:1）中，向混合物中加入溴化亞銅（50mg）。反應液室溫下攪拌 2 小時，然後加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），乾燥後減壓除去有機溶劑，粗產物用矽膠柱層析分離得到目標產物 2.23C（84m mg），MS (*m/z*): 1540.8 $[M + H]^+$；

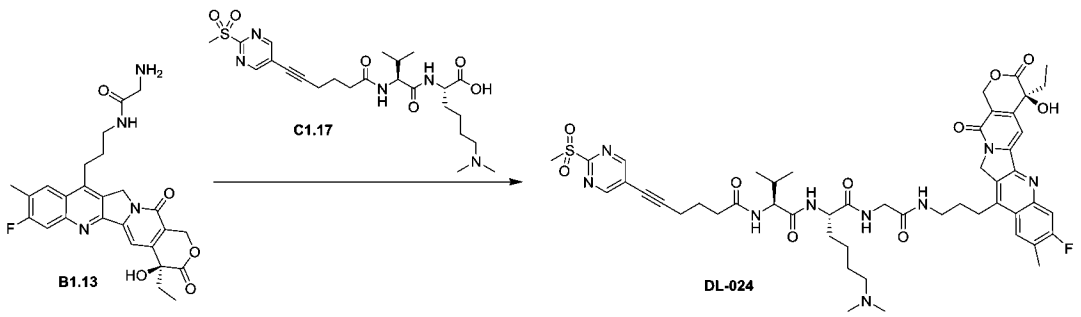
步驟三：將化合物 2.23C 溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（體積比為 1：2：4 mL）中，然後反應液在室溫下攪拌 30 分鐘。LCMS 顯示反應完成。將反應液濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜（0.01% TFA in water, MeCN）得到目標化合物(S)-6-胺基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基) 丙基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-異丙基-35-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧雜-3,9-二氮雜三十五烷醯胺基)己醯胺（DL-023, 8 mg，三氟乙酸鹽，收率 5%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1440.8;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.49 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.24 – 8.18 (m, 3H), 8.01 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 2H), 7.63 (s, 3H, TFA salt), 7.32 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.66 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 4.21 (dd, *J* = 15.2, 7.9 Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.75 – 3.72 (m, 2H), 3.56 – 3.54 (m, 2H), 3.54 – 3.38 (m, 30H), 3.33 – 3.13

(m, 5H), 2.75 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.02 – 1.94 (m, 1H), 1.91 – 1.81 (m, 3H), 1.71 – 1.65 (m, 1H), 1.58 – 1.46 (m, 3H), 1.38 – 1.29 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.81 – 0.75 (m, 6H)。

【0754】實施例 2.24：N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基) 胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己-2-基) 胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-024）



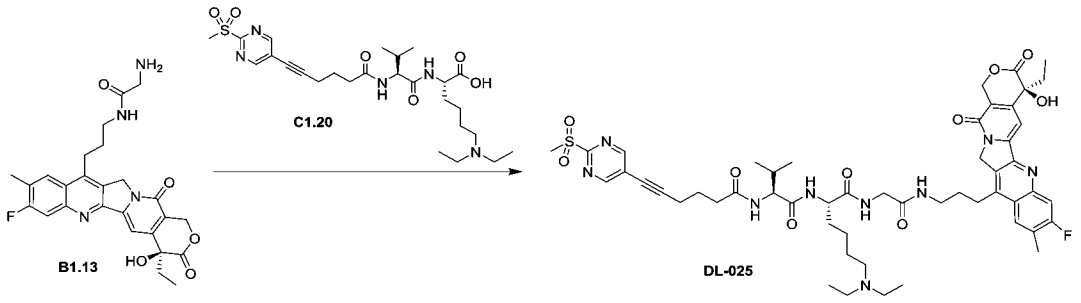
向化合物 B1.13（40 mg，0.081 mmol）和化合物 C1.17（42 mg，0.081mmol）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（2 mL）溶解中依次加入 PyBOP（41 mg，0.081），DIPEA（20 mg，0.16 mmol），反應液在室溫下攪拌 2 小時。LCMS 顯示反應完全。反應液經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%三氟乙酸的水溶液）得到化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基) 胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己-2-基) 胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（11.54 mg，收率 14%）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1000.6;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.42 (s, 1H), 9.08 (s, 2H), 8.27 – 8.18 (m,

2H), 8.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.91 – 7.77 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.15 – 4.12 (m, 1H), 3.81 – 3.65 (m, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.33 – 3.25 (m, 2H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 3.03 – 2.95 (m, 2H), 2.77 – 2.71 (m, 6H), 2.38 – 2.23 (m, 3H), 1.92 – 1.81 (m, 7H), 1.78 – 1.73 (m, 2H), 1.62 – 1.56 (m, 3H), 1.38 – 1.29 (m, 2H), 0.92 – 0.84 (m, 3H), 0.84 – 0.72 (m, 6H)。

【0755】實施例2.25：N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基) 胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己-2-基) 胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-025）

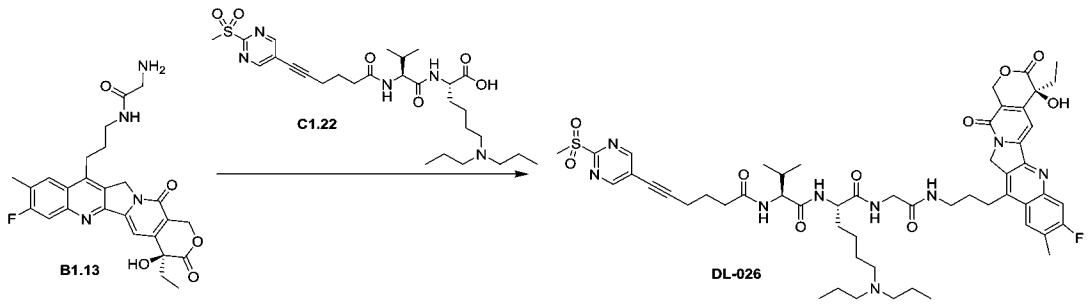


將化合物 C1.20 (30 mg, 0.054 mmol), 化合物 B1.13 (27 mg，0.054 mmol) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL)。然後再依次加入 HBTU（22 mg, 0.054 mmol）以及 N,N-二異丙基乙胺（17 mg, 0.135 mmol，加完畢後反應液室溫攪拌 30 分鐘。LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜(0.01%三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基) 胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己-2-基) 胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（23 mg, 收率 42%）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.08 (s, 2H), 9.02 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.13 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.97 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 10.6 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.28 – 4.18 (m, 1H), 4.14 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.80 – 3.65 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.31 – 3.24 (m, 2H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 3.12 – 3.06 (m, 4H), 3.02 – 2.91 (m, 2H), 2.36 – 2.23 (m, 2H), 1.95 – 1.68 (m, 9H), 1.68 – 1.49 (m, 4H), 1.38 – 1.28 (m, 2H), 1.13 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H),0.79 – 0.76 (m, 6H)。

【0756】實施例 2.26：N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-026）



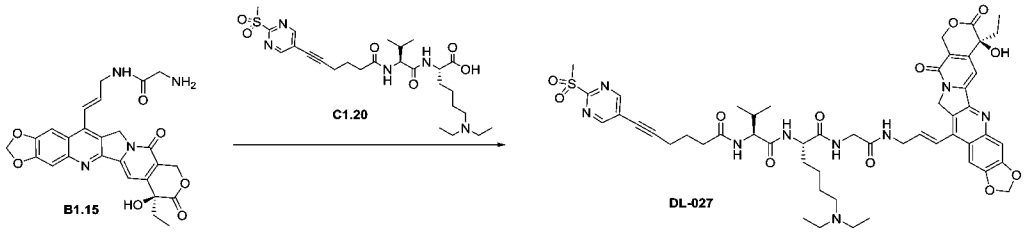
將化合物 C1.22（31 mg, 0.054 mmol, 化合物 B1.13 (27 mg，0.054 mmol) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL)。然後再依次加入 HBTU（22 mg, 0.054 mmol）以及 N,N-二異丙基乙胺（17 mg, 0.135 mmol，反應液室溫攪拌 30 分鐘。LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己

-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（25 mg, 收率 45%）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1056.6；

H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.09 (s, 2H), 8.27 – 8.19 (m, 2H), 8.13 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.97 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.13 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.73 (dd, *J* = 14.7, 5.9 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.28 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.99 (br, 6H), 2.33 – 2.27 (m, 2H), 1.95 – 1.70 (m, 9H), 1.62 – 1.57 (m, 8H), 1.33 – 1.30 (m, 2H), 0.96 – 0.82 (m, 9H), 0.82 – 0.73 (m, 6H)。

【0757】實施例 2.27：N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基胺基)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基) 胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺



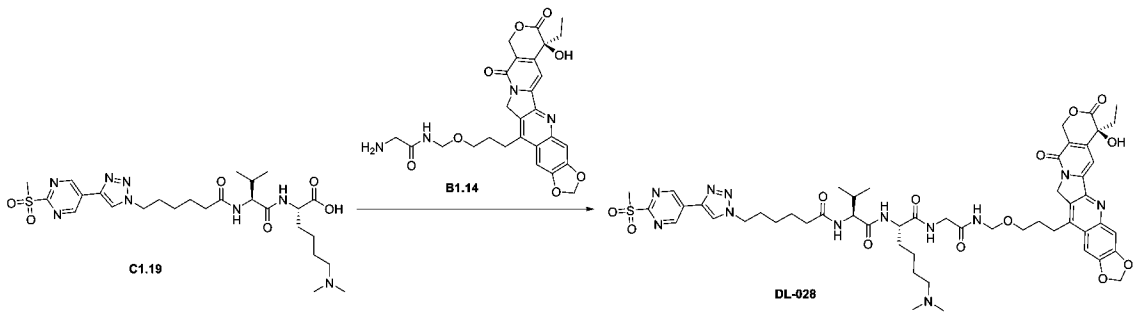
向化合物 B1.15（40 mg，0.074 mmol）和化合物 C1.20（40 mg，0.072 mmol）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（4 mL）溶解中依次加入 HBTU (30 mg，0.079 mmol)、DIPEA（26 mg，0.2 mmol）。反應液室溫下反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。反應液經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%三氟乙酸水溶液）得到化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基胺基)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-乙基

-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（11.1 mg，收率 14%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1038.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 9.02 (s, 1H, TFA), 8.33 – 8.25 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.52 – 6.50 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.28 – 5.24 (m, 2H), 4.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.12 (br s, 2H), 3.81 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.11 – 3.07 (m, 6H), 2.97 (br s, 2H), 2.53 – 2.50 (m, 1H), 2.39 – 2.24 (m, 4H), 1.85 – 1.79 (m, 8H), 1.16 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H)。

【0758】實施例 2.28：(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺



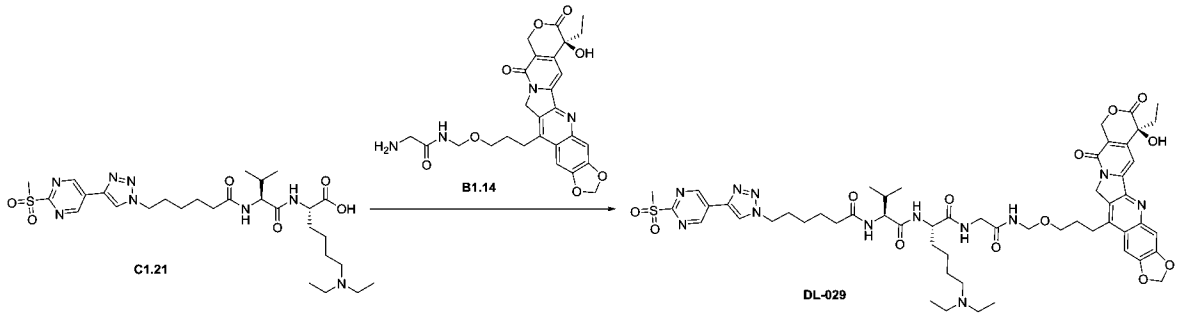
將化合物 C1.19 （40mg，0.06mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（1.5 mL），

依次加入 HBTU（26 mg，0.06 mmol）、B1.14（36 mg，0.06mmol）和 DIPEA（66 mg，0.17 mmol，室温攪拌反應 1 小時。LCMS 檢測反應完成，反應液通過製備（乙腈/ 0.05%三氟乙酸水溶液）分離純化得到目標化合物 (S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（13.88 mg，TFA salt 收率 16%）為米黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1113.7；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.46 (s, 2H), 9.29 (s, 1H, TFA salt), 8.92 (s, 1H), 8.63 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.18 (br s, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.15 – 4.09 (m, 1H), 3.76 – 3.71 (m, 4H), 3.53 – 3.48 (m, 4H), 3.44 (s, 3H), 3.10 – 3.08 (m, 2H), 2.97 – 2.95 (m, 2H), 2.75 (d, *J* = 4.9 Hz, 6H), 2.20 – 2.09 (m, 2H), 1.92 – 1.83 (m, 5H), 1.68 – 1.65 (m, 1H), 1.63 – 1.50 (m, 5H), 0.90 – 0.74 (m, 9H)。

【0759】實施例 2.29：(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

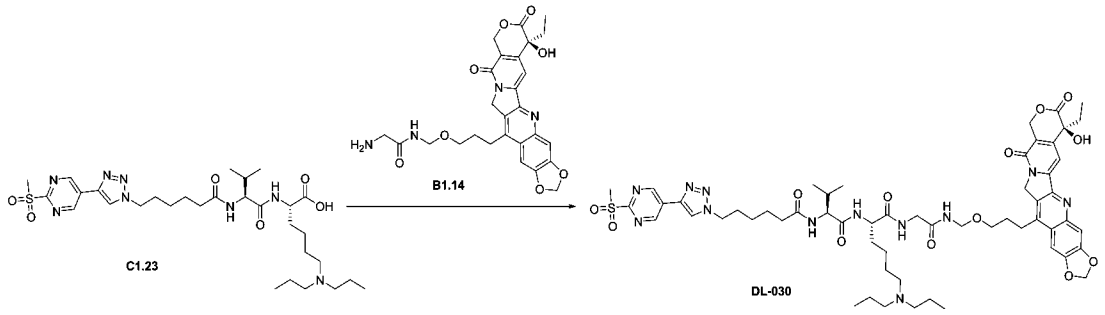


將化合物 C1.21 (58 mg, 0.09 mmol), 化合物 B1.14 (50 mg, 0.09 mmol)溶於 DMF (1 mL),然後再加入 HBTU (35 mg, 0.09 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺(30 mg, 0.23 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFAin water, MeCN)純化得到目標化合物(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (14 mg, 收率 13%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1141.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.98 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.62 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.27 – 4.23 (m, 1H), 4.11 – 4.09 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.13 – 3.06 (m, 6H), 3.01 – 2.93 (m, 2H), 2.22 – 2.07 (m, 2H), 1.91 – 1.83 (m, 6H), 1.70– 1.51 (m, 5H), 1.33 – 1.21 (m, 6H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 – 0.76 (m, 6H)。

【0760】實施例 2.30：(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺



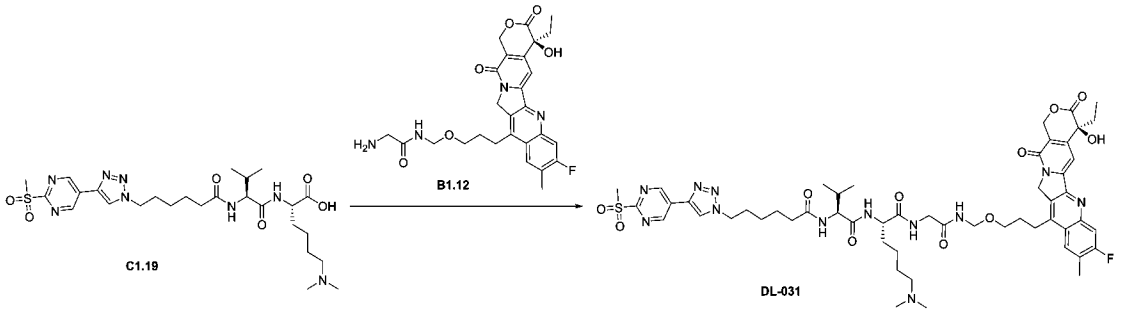
將化合物 C1.23 (61 mg, 0.09 mmol), 化合物 B1.14 (50 mg, 0.09 mmol)溶於 DMF (1 mL),然後再加入 HBTU (35 mg, 0.09 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺(30 mg, 0.23 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(21 mg, 收率 19%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1169.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 9.01 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (s,

2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.60 – 4.58 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.24 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.13 – 4.09 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.10 (br s, 2H), 3.02 – 2.95 (m, 6H), 2.19 – 2.15 (m, 2H), 1.88 – 1.86 (m, 6H), 1.71 – 1.69 (m, 1H), 1.61 – 1.56 (m, 8H), 1.28 – 1.26 (m, 6H), 0.88 – 0.83 (m, 9H), 0.81 – 0.78 (m, 6H)。

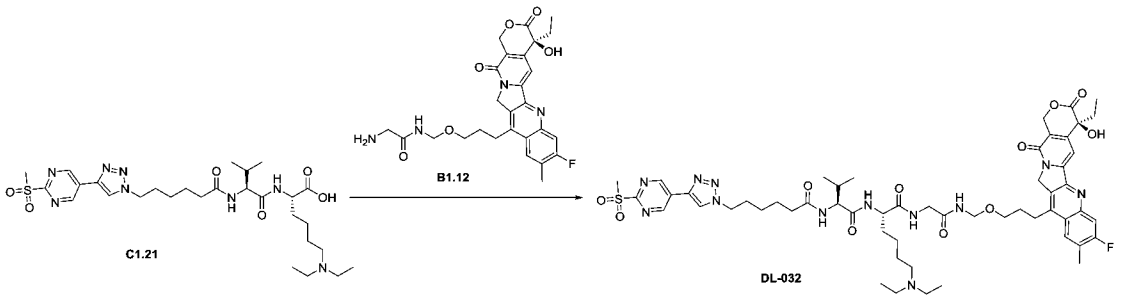
【0761】實施例 2.31：(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺



將化合物 C1.19 (113 mg, 0.19 mmol), 化合物 B1.12 (100 mg, 0.19 mmol)溶於 DMF (1 mL), 然後加入 HBTU (72 mg, 0.19 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺(61 mg, 0.48 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA 的水溶液，乙腈)純化得到目標化合物(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (16 mg, 收率 8%)為白色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1101.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.63 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.20 – 8.28 (m, 2H), 8.04 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 – 4.54 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.29 – 4.19 (m, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.24 – 3.14 (m, 2H), 3.01 – 2.91 (m, 2H), 2.72 (s, 6H), 2.53 (s, 3H), 2.23 – 2.07 (m, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 6H), 1.72 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.45 (m, 6H), 1.34 – 1.22 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 – 0.76 (m, 6H)。

【0762】實施例 2.32：(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

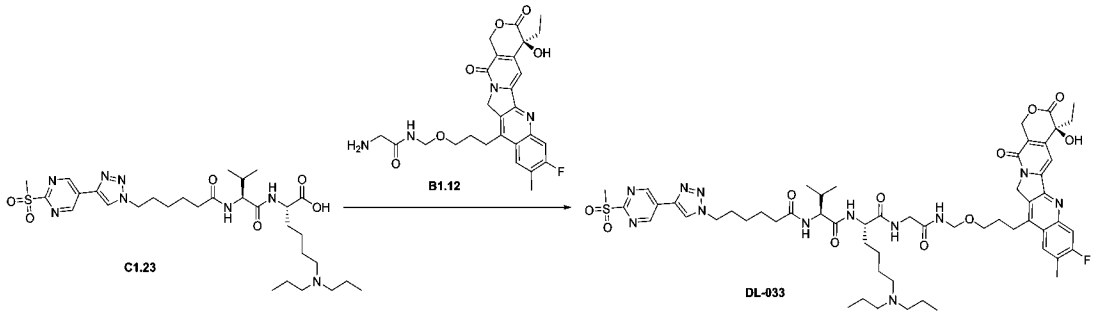


將化合物 C1.21 (59 mg, 0.10 mmol), 化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol)，溶於 DMF (1 mL), 然後再加入 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺 (31 mg, 0.24 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% 甲酸溶液, 乙腈)純化得到目標化合物(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-

1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (33.8 mg, 收率 32%)為白色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1129.7；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.24 – 8.15 (m, 2H), 8.00 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.63 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.23 – 4.18 (m, 1H), 4.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.77 – 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.17 – 3.15 (m, 3H), 2.61 (q, *J* = 6.7 Hz, 4H), 2.22 – 2.10 (m, 2H), 1.92 – 1.84 (m, 6H), 1.68 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.57 – 1.48 (m, 3H), 1.39 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.30 – 1.22 (m, 4H), 0.97 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 – 0.77 (m, 6H)。

【0763】實施例 2.33：(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

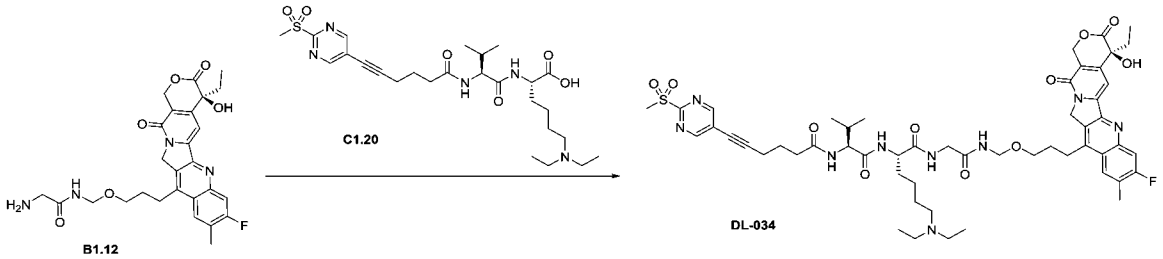


將化合物 C1.23 (62 mg, 0.10 mmol), 化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol)溶於 DMF (1 mL), 然後加入 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺(31 mg, 0.24 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜 (0.01% TFAin water, MeCN) 純化得到目標化合物(S)-

6-(二丙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (35.2 mg, 收率 32%)為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1157.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.62 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.24 (m, 1H), 4.13 – 4.07 (m, 1H), 3.74 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.23 – 3.16 (m, 2H), 3.01 – 2.95 (m, 6H), 2.50 (s, 3H), 2.22 – 2.09 (m, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 8H), 1.67 – 1.56 (m, 9H), 1.33 – 1.23 (m, 6H), 0.91 – 0.86 (m, 9H), 0.82 – 0.77 (m, 6H)。

【0764】實施例 2.34：N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-034）



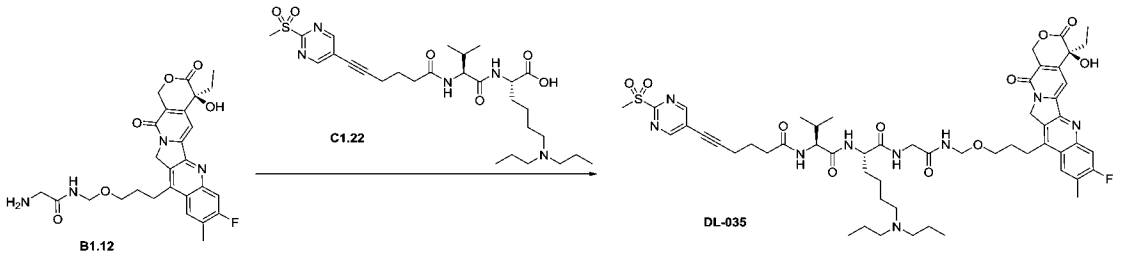
將化合物（S）-2-胺基-N-（（3-（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）丙氧基）

甲基）乙醯胺（B1.12，30 mg, 0.057 mmol), N6，N6-二乙基-N2-((6-（2-（甲磺醯基）嘧啶-5-基）十六烷基-5-炔醯基）-L-丙醯基）-L-離胺酸(C1.20，31 mg， 0.057 mmol)溶於 DMF（1 mL）中。然後依次加入 HBTU（22 mg, 0.057 mmol）以及 N,N-二異丙基乙胺（18 mg, 0.143 mmol），加完畢後反應液室溫攪拌一小時。 LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% 的三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物三氟乙酸鹽 N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (3.18 mg, 收率 5%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1058.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.65 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.21 - 8.19 (m, 2H), 8.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.64 – 4.56 (m, 2H), 4.29 – 4.22 (m, 1H), 4.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.74 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.51 – 3.49 (m, 2H), 3.24 – 3.18 (m, 2H), 3.13 – 3.07 (m, 4H), 3.01 – 2.95 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.40 – 2.31 (m, 3H), 1.99 – 1.74 (m, 8H), 1.65 – 1.49 (m, 4H), 1.38 – 1.25 (m, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.89 - 0.79 (m, 9H)。

【0765】實施例 2.35：N-((11S,14S)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-035）



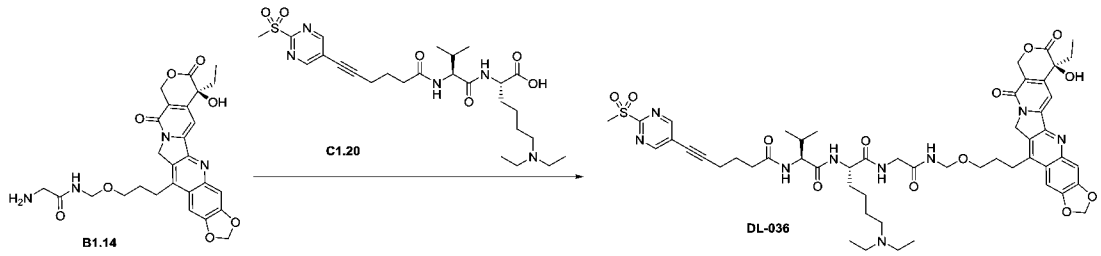
將化合物（S）-2-氨基-N-((3-（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）丙氧基）甲基）乙醯胺（B1.12，30 mg, 0.057 mmol), N2-((6-（2-（甲磺醯基）嘧啶-5-基）己-5-炔醯基）-L-丙醯基）-N6，N6-二丙基-L-離胺酸（C1.22，33 mg， 0.057 mmol)溶於 DMF（1 mL）中。然後再依次加入 HBTU（22 mg, 0.057 mmol）以及 N,N-二異丙基乙胺（18 mg, 0.143 mmol），加完畢後反應液室溫攪拌一小時。 LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% 的三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-035）(10. 65 mg, 收率 16%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1086.7；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.65 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.28 – 8.16 (m, 2H), 8.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 – 4.52 (m, 2H), 4.31 – 4.19 (m, 1H), 4.19 – 4.08 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.24 – 3.18 (m, 2H), 3.03 – 2.94 (m, 6H), 2.55 (s, 3H), 2.46 – 2.24 (m, 3H), 2.05 – 1.67 (m, 8H), 1.66 – 1.51 (m, 8H), 1.36 – 1.22

(m, 4H), 0.91 – 0.80 (m, 15H)。

【0766】實施例 2.36：N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-036）



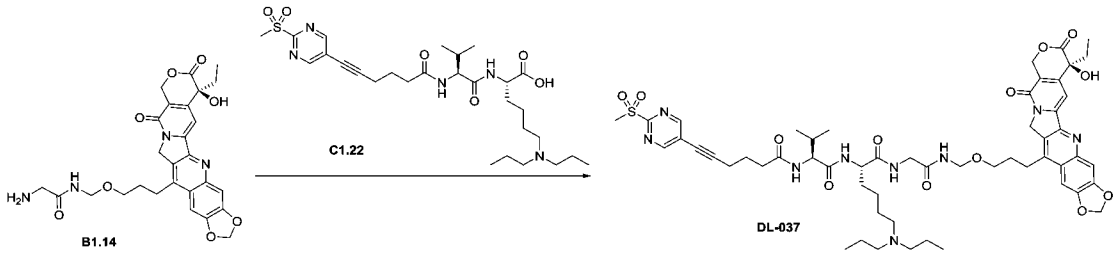
將化合物 C1.20 (40 mg, 0.075 mmol), 化合物 B1.14 (41 mg, 0.075 mmol) 溶於 DMF (1 mL)，然後再加入 HOBt (15.2 mg, 0.113 mmol)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽 (21.5 mg, 0.113 mmol)，然後再加入三乙胺 (23 mg, 0.225mmol) 加完後反應液室溫攪拌 16 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN) 純化得到目標化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (16 mg, 收率 20%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1070.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 – 9.08 (m, 2H), 9.01 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.20 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43

(s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.65 – 4.53 (m, 2H), 4.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.20 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.14 – 3.07 (m, 6H), 2.98 (s, 2H), 2.55 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.03 – 1.89 (m, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 7H), 1.61 – 1.56 (m, 2H), 1.32 (s, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.91 – 0.78 (m, 9H)。

【0767】實施例 2.37：N-((11S,14S)-11-(4-(二正丙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-037）



將化合物 C1.22 (43 mg, 0.074 mmol), 化合物 B1.14 (40 mg，0.075 mmol)，溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (1 mL)，然後依次加入 HBTU (28 mg, 0.075 mmol)，N,N-二異丙基乙胺 (24 mg, 0.187 mmol)， 反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜(0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物的三氟乙酸鹽（8.5 mg, 收率 10%）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H),

5.24 (s, 2H), 4.66 – 4.52 (m, 2H), 4.31 – 4.21 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.49 – 3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.15 – 3.06 (m, 2H), 3.02 – 2.95 (m, 6H), 2.59 – 2.52 (m, 3H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.05 – 1.90 (m, 2H), 1.91 – 1.77 (m, 6H), 1.63 – 1.57 (m, 6H), 1.31 – 1.29 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 15H).

採用本實施例中同樣的操作，反應液直接經製備色譜(0.1% 甲酸水溶液，乙腈)純化，凍乾，得到目標化合物的甲酸鹽（32.6 mg, 收率 39%），為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.09 (s, 2H), 8.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.14 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.48 – 5.35 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 – 4.54 (m, 2H), 4.23 – 4.07 (m, 2H), 3.79 – 3.66 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.14 – 3.08 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 2.59 – 2.52 (m, 2H), 2.36 – 2.27 (m, 8H), 2.00 – 1.76 (m, 7H), 1.72– 1.62 (m, 1H), 1.58– 1.48 (m, 1H), 1.40 – 1.20 (m, 8H), 0.88 – 0.77 (m, 15H).

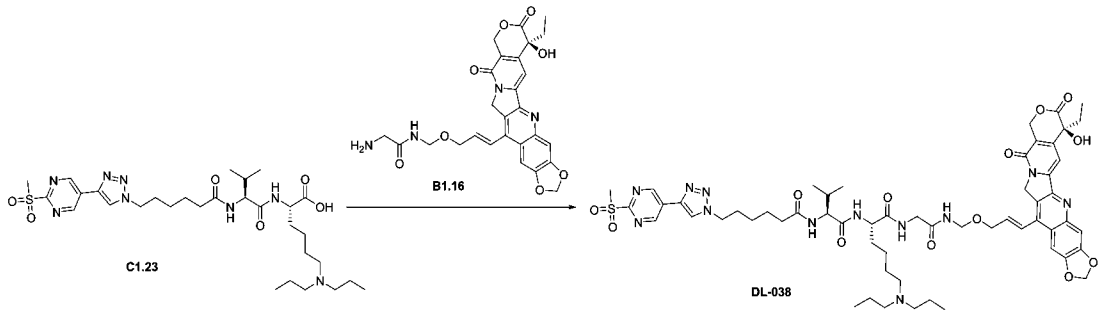
取 DL-037 甲酸鹽（16mg），通過製備 HPLC 純化（0.1% 碳酸氫銨水，乙腈），凍乾，得游離態的目標化合物（DL-037，10mg，收率 65%），為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.21 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.26 (s, 2H), 5.48 – 5.35 (m, 2H), 5.16 (s,

2H), 4.63 – 4.51 (m, 2H), 4.25 – 4.10 (m, 2H), 3.82 – 3.63 (m, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.56 – 2.51 (m, 2H), 2.41 – 2.23 (m, 8H), 1.96 – 1.76 (m, 7H), 1.71 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.48 (m, 1H), 1.37 – 1.21 (m, 8H), 0.88 – 0.78 (m, 15H).

【0768】實施例 2.38：(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代四氫二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基烯丙基氧基甲基胺基氧代乙基甲基甲磺醯基)嘧啶基三唑基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

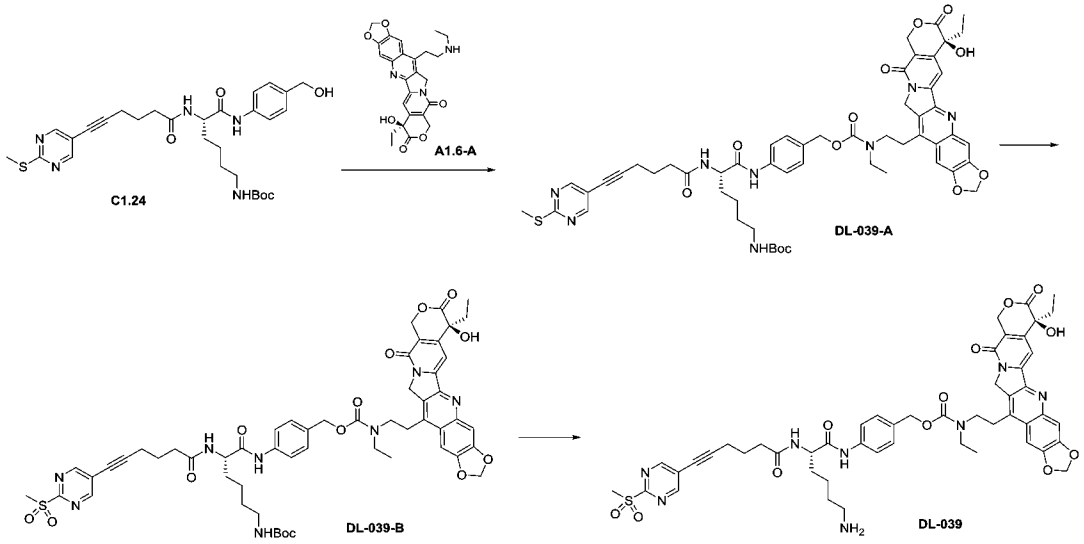


將化合物 B1.16 (30 mg, 0.06 mmol), 化合物 C1.23 (37 mg，0.06 mmol)溶於 DMF (1 mL)。然後再加入 HBTU (21 mg, 0.06 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺 (16 mg, 0.12 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 (S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (4 mg, 收率 6%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1167.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (s, 2H), 8.98 (s, 1H, TFA), 8.92 (s, 1H), 8.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.25 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.58 – 6.52 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.74 – 4.67 (m, 2H), 4.46 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.01 – 2.95 (m, 8H), 2.23 – 2.18 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.00 (m, 2H), 1.90 – 1.84 (m, 6H), 1.63 – 1.57 (m, 9H), 0.88 (m, 9H), 0.81 – 0.78 (m, 6H)。

【0769】實施例 2.39：4-((S)-6-胺基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺)己醯胺基)苄基 N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯



步驟一：在 0°C 冰浴條件下，向 C1.24（150 mg，0.264 mmol）和三乙胺（89 mg，0.88 mmol）的二氯甲烷（10 mL）溶液中加入 N，N-琥珀醯亞胺基碳酸酯（DSC，90 mg，0.352 mmol），反應在 0°C 氮氣下反應 30 分鐘，隨後滴加化合物 A1.6-A（82 mg，0.176 mmol），反應在室溫下反應 12 小

時。LCMS 監測反應完全。反應液減壓濃縮成粗產品，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黃色油狀化合物 DL-039-A（27 mg，收率：14.4%)為黃色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1059.2；

步驟二：向化合物 DL-039-A（60 mg，0.057 mmol）的四氫呋喃（5 mL）和水（1 mL）的混合溶液中加入過氧單磺酸鉀（Oxone，349 mg，0.567 mmol)，反應在室溫下攪拌 12 小時。TLC 檢測反應完全。向反應液中加入水（10 mL)，用二氯甲烷（10 mL X 3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到目標化合物 DL-039-B（60 mg，粗品）為黃色固體。

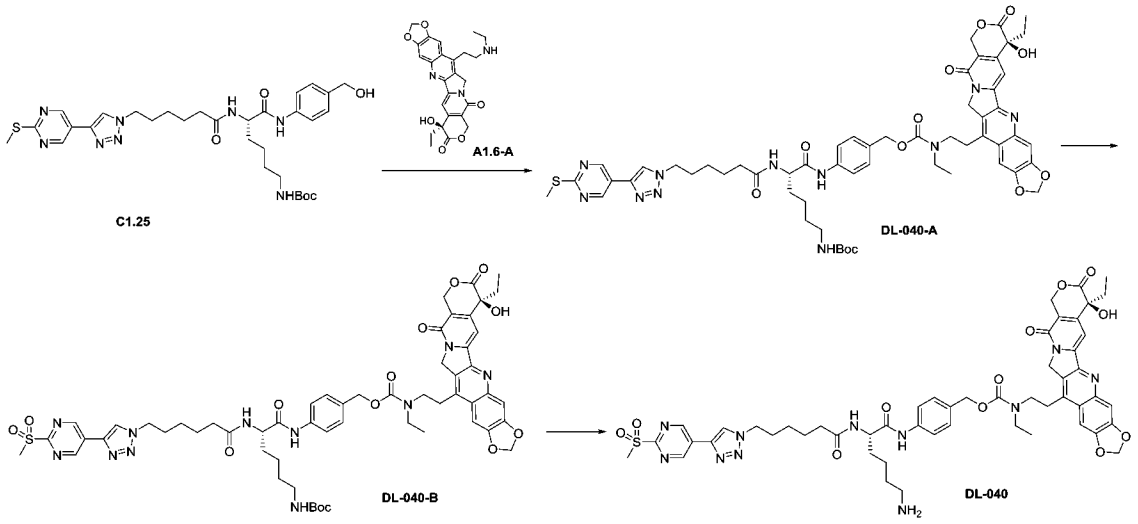
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1091.0；

步驟三：將化合物 DL-039-B（60 mg, 0.055 mmol）溶在二氯甲烷（1 mL）溶液中，0°C 下向反應液中加入二氯乙酸（1 mL)，反應在室溫下攪拌 3 小時。LCMS 顯示反應完成。濾液減壓濃縮成粗產品，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%三氟乙酸）得到黃色固體化合物 4-((S)-6-胺基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺)己醯胺基)苄基 N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯（2.44 mg，收率 3.69%)。

LCMS (ESI) $[1/2M+H]^+$ = 496.3, t_R = 2.252 min。

【0770】實施例 2.40：4-((S)-6-胺基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)己醯胺基)苄基 N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羥基-

8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯(DL-040)



步驟一：在 0°C 冰浴條件下，向 C1.25（300 mg，0.469 mmol）和 三乙胺（126 mg，1.25 mmol）的二氯甲烷（10 mL）中加入 N，N-琥珀醯亞胺基碳酸酯（DSC，160 mg，0.626 mmol），反應在 0°C 反應 30 分鐘，隨後滴加化合物 A1.6-A（145 mg，0.313 mmol），然後反應在室溫下反應 12 小時。LCMS 監測反應完全。反應液減壓濃縮成粗產品，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黃色油狀化合物 DL-040-A（70 mg，收率：19.8%)為黃色油狀物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1130.1。

步驟二：向化合物 DL-040-A（70 mg，0.062 mmol）的四氫呋喃（5 mL）和水（1 mL）的混合溶液中加入過氧單磺酸鉀（Oxone，381 mg，0.619 mmol），反應在室溫下攪拌 12 小時。TLC 檢測反應反應完全。向反應液中加入水（10 mL），用二氯甲烷（10 mL x 3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到目標化合物 DL-040-B（70 mg，粗品）為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1162.6, t_R = 1.710 min。

步驟三：將化合物 DL-040-B（70 mg, 0.060 mmol）溶在二氯甲烷（1 mL）

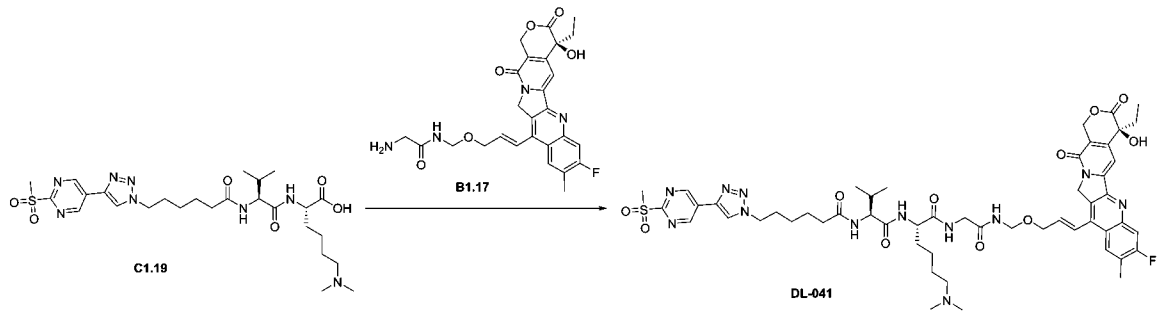
溶液中，0°C 下向反應液中加入二氯乙酸（1 mL），反應在室溫下攪拌 3 小時。LCMS 顯示反應完成。濾液減壓濃縮成粗產品，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%三氟乙酸）得到黃色固體化合物 4-((S)-6-胺基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)己醯胺基)苄基 N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯（5.54 mg，收率 8.66%）。

LCMS (ESI) $[1/2M+H]^+$ = 1062.5, t_R = 4.052 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.22 (br s, 1H), 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.22 – 8.03 (m, 1H), 7.85 (br s, 3H, NH2-TFA), 7.61 – 7.45 (m, 3H), 7.32 – 7.26 (m, 1H), 7.26 – 7.17 (m, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.35 (s, 2H), 5.91 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.37 – 5.30 (m, 1H), 5.27 – 5.20 (m, 1H), 5.10 – 5.00 (m, 1H), 4.97 – 4.78 (m, 1H), 4.52 – 4.26 (m, 3H), 3.56 – 3.46 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 2.83 – 2.71 (m, 2H), 2.21 – 2.11 (m, 2H), 1.98 – 1.78 (m, 4H), 1.67 – 1.48 (m, 6H), 1.37 – 1.22 (m, 4H), 1.09 – 0.96 (m, 3H), 0.93 – 0.78 (m, 3H)。

【0771】實施例 2.41：(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

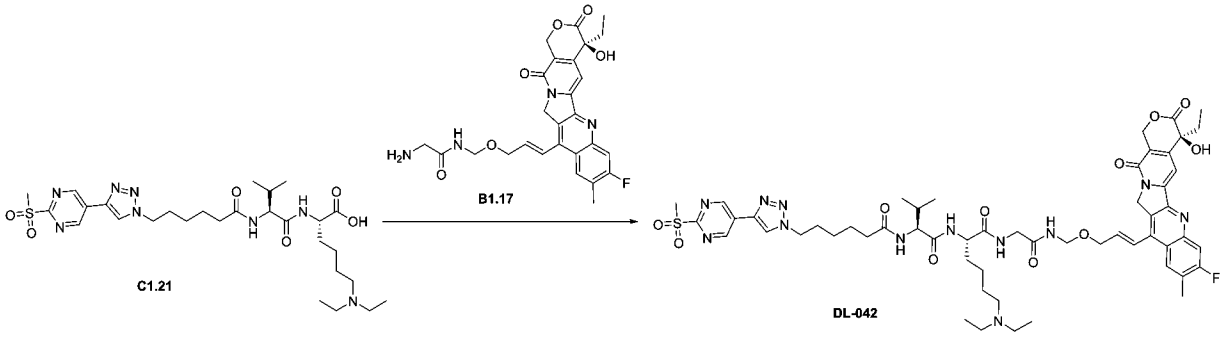
(DL-041)



將化合物 B1.17 (30 mg), 化合物 C1.19 (37 mg)溶於 DMF (1 mL)。然後再加入 HBTU (21 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(16 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(11 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1099.5。

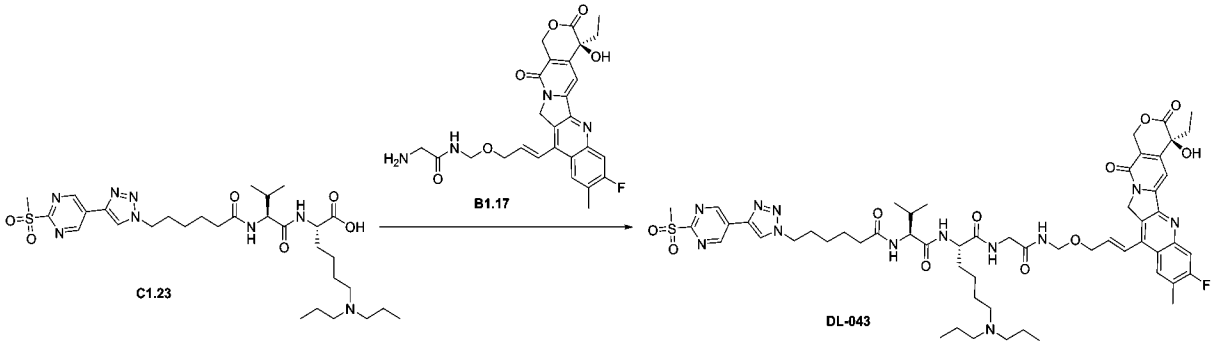
【0772】實施例 2.42：(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(DL-042)



將化合物 B1.17 (30 mg), 化合物 C1.21 (37 mg)溶於 DMF (1 mL)。然後再加入 HBTU (21 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(16 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(7 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1127.5。

【0773】實施例 2.43：(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(DL-043)

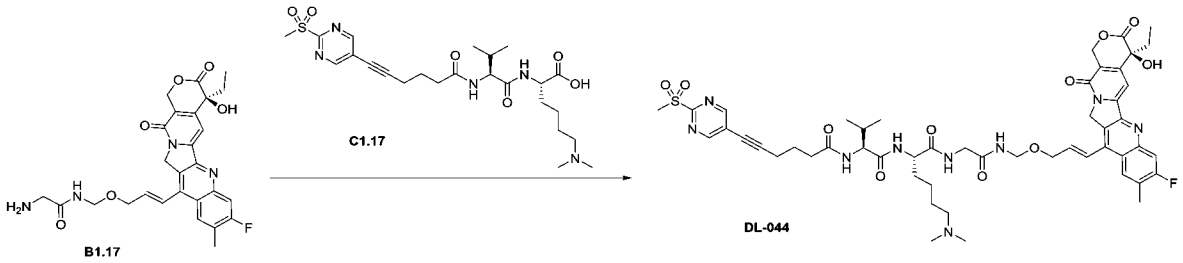


將化合物 B1.17 (17.5 mg, 0.033 mmol)和化合物 C1.23 (22 mg, 0.034 mmol)溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL)中，然後依次加入 HOBT (7 mg, 0.051mmol)，EDCI (10 mg, 0.051mmol)，DIPEA (9 mg, 0.068 mmol)，加畢，反應液室溫攪拌 1 小時，反應液直接經製備高效液相色譜 (0.01% 三氟乙酸

水溶液, 乙腈)純化，製備液冷凍乾燥得到目標化合物(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（7 mg, 收率 18%）為淡黃色固體產品。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1155.5.

【0774】實施例 2.44：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基胺基)丁基乙基氟羥基甲基二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基甲磺醯基嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺(DL-044)

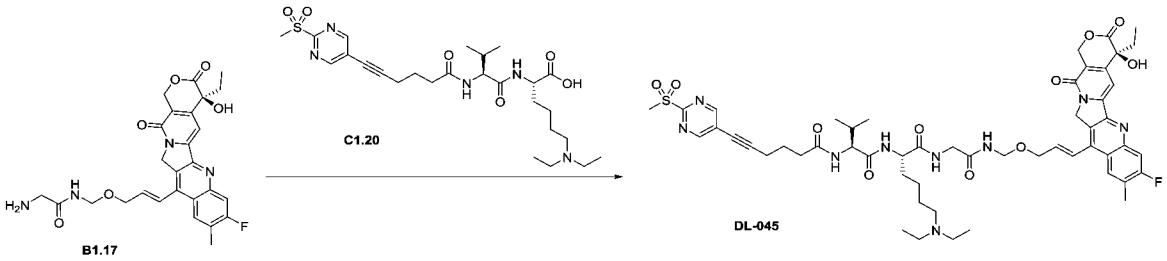


將化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.17 (80 mg)溶於 DMF (2 mL)。然後再加入 HBTU (45 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(35 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (21 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.5。

【0775】實施例 2.45：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙

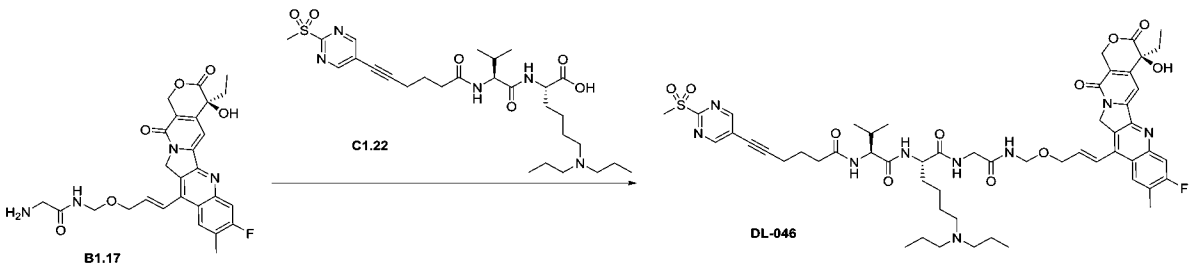
基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啡並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺(DL-045)



將化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.20 (80 mg)溶於 DMF (2 mL)。然後再加入 HBTU (45 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(35 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啡並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (29 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1056.5。

【0776】實施例 2.46：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啡並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺(DL-046)



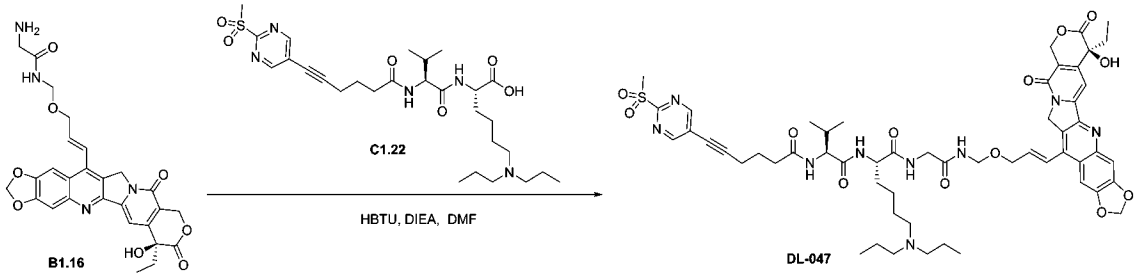
將化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.22 (80 mg)溶於 DMF (2 mL)。然後再加

入 HBTU (45 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(35 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (30 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1084.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.09 (s, 2H), 8.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.30 – 8.24 (m, 2H), 8.05 (m, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 2H), 7.38 - 7.33 (m, 2H), 6.67 – 6.60 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.37 (s, 2H), 4.73 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.34 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.26 – 4.20 (m, 1H), 4.17 – 4.13 (m, 1H), 3.86 – 3.69 (m, 4H), 3.40 (s, 3H), 2.41 – 2.30 (m, 8H), 2.02 – 1.94 (m, 2H), 1.89 – 1.85 (m, 2H), 1.82 – 1.77 (m, 2H), 1.74 – 1.63 (m, 2H), 1.60 – 1.50 (m, 2H), 1.47 – 1.39 (m, 8H), 0.90 – 0.86 (m, 6H), 0.85 – 0.80 (m, 9H)。

【0777】實施例 2.47： N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-047）



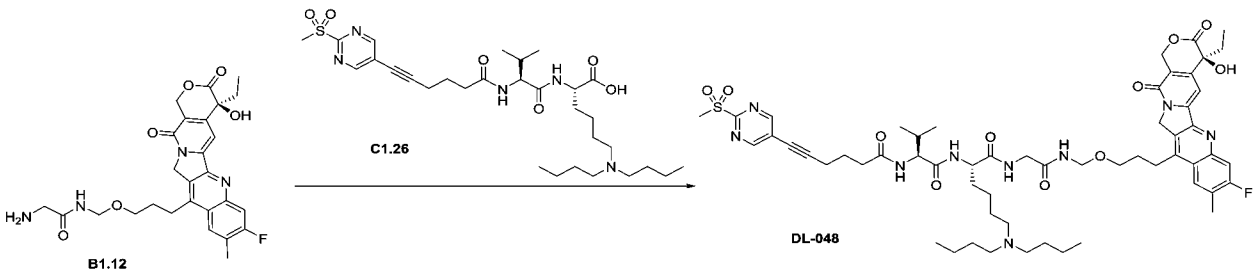
將化合物 B1.16 (45 mg, 0.08 mmol), 化合物 C1.22 (49 mg， 0.08 mmol), 溶

於 DMF (1 mL)。然後再加入 HBTU (32 mg, 0.08 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺 (27 mg, 0.2 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% 三氟乙酸的水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啡並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (DL-047，10 mg)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1096.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.10 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.75 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.26 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 – 2.24 (m, 2H), 6.65 – 6.43 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.74 – 4.69 (m, 1H), 4.31 – 4.29 (m, 2H), 4.26 - 424 (m, 1H), 4.19 – 4.12 (m, 1H), 3.79 – 2.76 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.02 – 2.95 (m, 8H), 2.55 (m, 2H), 2.39 – 2.32 (m, 2H), 2.01 – 1.93 (m, 2H), 1.92 – 1.77 (m, 5H), 1.62 – 1.58 (m, 6H), 1.36 – 1.30 (m, 2H), 0.91 – 0.83 (m, 15H)。

【0778】實施例 2.48：N-((11S,14S)-11-(4-(二丁基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啡並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-048）

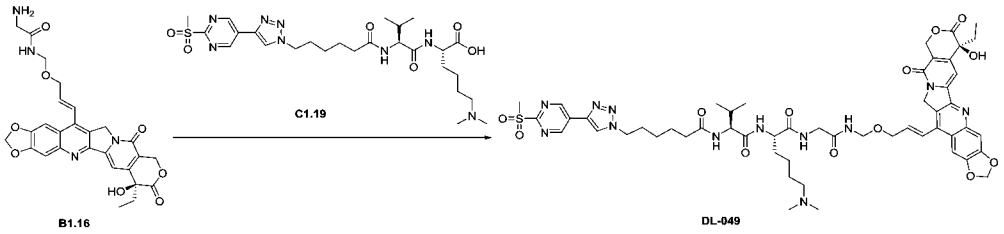


將化合物 C1.26 （50mg，0.08mmol），化合物 B1.12（43mg，0.08mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（1.5mL），然後依次加入 DIPEA（26mg，0.21mmol），HBTU（31mg，0.08mmol），室溫攪拌反應 1 小時。LCMS 檢測反應完成，反應液直接通過高效製備 (0.01% 三氟乙酸的水溶液, 乙腈)分離純化得到目標化合物（13.57mg）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1114.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.09 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.64 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.23 – 8.16 (m, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.61 - 4.59 (m, 2H), 4.24 – 4.22 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.73 – 3.70 (m, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.21 – 3.18 (m, 6H), 3.00 – 2.98 (m, 8H), 2.54 (s, 3H), 1.97 – 1.78 (m, 7H), 1.56 – 1.52 (m, 8H), 1.36 – 1.25 (m, 6H), 0.93 – 0.78 (m, 15H)。

【0779】實施例 2.49：(S)-6-(二甲基基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-049）



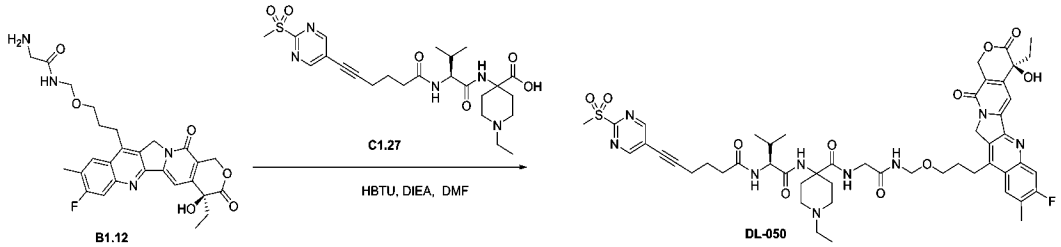
將化合物 B1.16 (45 mg, 0.08 mmol), 化合物溶於 DMF (1 mL)。然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 (27 mg, 0.2 mmol)，HBTU (32 mg, 0.08 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，將反應液直接經製備色譜 (0.01% 的甲酸水溶液，乙腈純化得到目標化合物(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-049，3 mg)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1111.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (s, 2H), 8.92 (s, 1H), 8.69 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.25 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H, FA), 7.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27 (m, 2H), 6.59 – 6.48 (m, 2H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.74 – 4.67 (m, 2H), 4.44 (m, 2H), 4.30 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.83 – 3.70 (m, 4H), 3.43 (s, 3H), 2.25 (m, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.04 – 1.97 (m, 2H), 1.90 – 1.85 (m, 4H), 1.55 – 1.51 (m, 3H), 1.39 – 1.34 (m, 6H), 0.90 – 0.83 (m, 3H), 0.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H)。

【0780】實施例 2.50： 1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)

己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)哌啶-4-甲醯胺（DL-050）



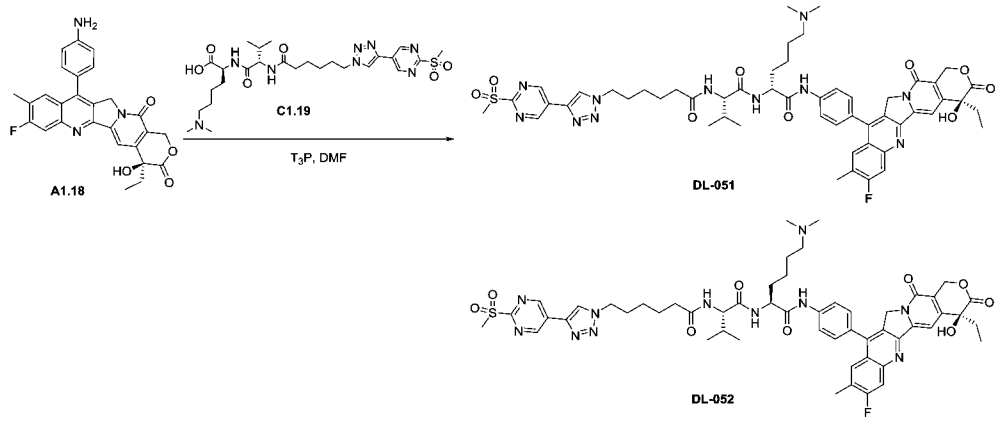
將化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol), 化合物 C1.27 (50 mg，0.10 mmol), 溶於 DMF (1 mL)。然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺(30 mg, 0.24 mmol)和 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)，加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜 (0.01% FA in water, MeCN)純化得到目標化合物 1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)哌啶-4-甲醯胺（DL-050，10 mg)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.08 (s, 2H), 8.42 (s, 1H, FA), 8.18 – 8.15 (m, 4H), 7.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.72 – 4.63 (m, 1H), 4.53 – 4.45 (m, 1H), 4.07 – 4.06 (m, 1H), 3.79 – 3.69 (m, 1H), 3.58 – 3.55 (m, 2H), 3.55 – 3.48 (m, 5H), 3.21 – 3.16 (m, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.66 – 2.64 (m, 2H), 2.40 – 2.26 (m, 5H), 1.99 – 1.71 (m, 12H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.93 – 0.85 (m, 9H)。

【0781】實施例 2.51： (R)-6-(二甲基胺基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-

基)已醯胺基)丁醯胺基)已醯胺（DL-051）和 (S)-6-(二甲基胺基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)已醯胺基)丁醯胺基)已醯胺（DL-052）



將化合物 A1.18 (40 mg，0.08 mmol)和 C1.19 (71 mg，0.12 mmol) 溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (3 mL)。再加入 T_3P (254 mg, 0.40 mmol, 50%w/w 乙酸乙酯的混合物)，將反應液於室溫下攪拌 1 小時。LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 純化得到目標化合物 (R)-6-(二甲基胺基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)已醯胺基)丁醯胺基)已醯胺（DL-051，8.1 mg）和 (S)-6-(二甲基胺基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)已醯胺基)丁醯胺基)已醯胺（DL-052，8.8 mg）均為白色固體。

DL-051：

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1048.2, t_R = 1.258 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.12 (s, 1H), 9.40 (s, 2H), 8.84 (s, 1H), 8.55 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.99 – 7.89 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.36 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.40 (m, 3H), 4.22 – 4.10 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.30 – 2.25 (m, 2H), 2.24 – 2.20 (m, 2H), 2.19 – 2.15 (m, 6H), 2.03 – 1.93 (m, 2H), 1.92 – 1.78 (m, 6H), 1.72 – 1.66 (m, 1H), 1.61 – 1.54 (m, 2H), 1.48 – 1.42 (m, 2H), 1.30 – 1.26 (m, 2H), 0.91 – 0.86 (m, 9H)。

DL-052：

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1048.2, t_R = 1.283 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.34 (s, 1H), 9.45 (s, 2H), 8.94 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.99 – 7.85 (m, 4H), 7.75 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.52 – 4.42 (m, 3H), 4.25 – 4.17 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.30 – 2.13 (m, 8H), 2.05 – 1.97 (m, 2H), 1.95 – 1.81 (m, 7H), 1.60 – 1.55 (m, 2H), 1.50 – 1.44 (m, 2H), 1.33 – 1.28 (m, 4H), 0.95 – 0.83 (m, 9H)。

【0782】三、抗體製備與鑒定

【0783】實施例 3.1 B7H3 抗原和抗 B7H3 抗體 B7H3-C1 和 B7H3-C2 製備

選取人 2Ig B7H3 的 29-245 位胺基酸（NCBI 蛋白編號 NP_001316557.1）的核酸序列，其中 C 端添加檢測 6×His 標籤，命名為人 B7H3-2IgG-his；

選取人 4Ig B7H3 的 27-461 位胺基酸（Uniprot 蛋白編號 Q5ZPR3-1）的核酸序列，其中 C 端添加純化 6× His 標籤，命名為人 B7H3-4IgG-his；

選取猴 B7H3 4Ig 的 27-465 位胺基酸（Uniprot 蛋白編號 F7G5V3）的核酸序列，其中 C 端添加純化 6x His 標籤，命名為猴 B7H3-4IgG-his；B7H3-C1 參考 CN 103687945B 中編號 M30-H1-L4 的抗體；B7H3-C2 參考 CN109069633A 中編號 mAb-C-DUBA 的抗體。

分別合成上述三種 B7H3 抗原的基因，以及密碼子優化合成 B7H3-C1 和 B7H3-C2 抗體的基因（上海生工生物技術有限公司），構建到 PTT5 表達載體上，並大量抽提質粒。將抽提製備好的表達載體分別於 HEK293F 中瞬轉表達 7 天，表達上清經 ProteinA 化製備獲得抗原蛋白和 B7H3-C1 抗體和 B7H3-C2 抗體。

【0784】實施例 3.2 全人源噬菌體庫製備

徵集 20-30 歲左右 10 名健康男性以及 10 名健康女性志願者，抽取約 50mL 新鮮血液體，通過 Ficol 抽提新鮮 PBMC 細胞，然後通過 Trizol 抽提 mRNA 進行反轉錄獲得 cDNA。通過 VH 和 VK 引物對從 cDNA 中擴增抗體重鏈及輕鏈，再通過 Overlap PCR 獲得 ScFv 片段，通過 SfiI 酶切連接到 pTT-1 載體上，通過電轉獲得全人源 ScFv 噬菌體庫，庫容量約 $5.2*10^9$。

【0785】在 1.0L 新鮮培養基 2YT+100μg/ml Amp+2%葡萄糖中加入 1mL 文庫，菌液起始 OD600＜0 .1，在 37℃、220rpm 的條件下培養。當 OD600 為 0 .6 左右時，按細胞:噬菌體 = 1:20 的比例加入 M13K07 噬菌體，輔助噬菌粒侵染，在 37℃條件靜止培養 30min, 然後在 37℃、200rpm 條件下培養 30min，最後採用 4000rpm 條件下離心 10min，用 1.0L 等體積的 2YT+100μg/mlAmp+50μg/ml Kana 重懸，30℃培養 16h，用於表達。待表達培養完成後，取菌液於 4℃條件下，8000rpm 離心 30 分鐘，去上清。高

速離心，去掉菌體，上清中加入 1/5 體積的 PEG/NACL，沉澱上清中的 Phage，離心後將 Phage 溶解於 PBS 中，測 phage 滴度約為 2 *10^{11}。

【0786】實施例 3.3 噬菌體庫篩選抗 B7H3 抗體

3.3.1 hB7H3-his/cynoB7H3-his/MCF-7 親和淘選

第一輪親和淘洗：將 hB7H3-his 抗原（義翹神州）用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 5μg /mL，按 100μL/孔加入酶標孔中，包被 8 孔，4℃包被過夜；第二輪親和淘洗：將 cynoB7H3-his 抗原（義翹神州）用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 2μg /mL ，按 100μL/孔加入酶標孔中，包被 4 孔，4℃包被過夜。第三輪親和淘洗: 胰酶消化 MCF -7 細胞，採用 DMEM+10%FBS 重選，50000 細胞/孔鋪於 96 孔細胞板，37℃5% CO2 培養箱中培養過夜。棄包被液或細胞培養液，PBS 洗滌 3 次，每孔加入 300μL 3% OVA-PBS 封閉液，37℃封閉 1 小時； PBS 洗滌 3 次，加入 100μL 噬菌體文庫，37℃孵育 0.5-1 小時；吸出未結合的噬菌體，用 PBST 洗滌 6-8 次，PBS 洗滌 2 次；加入 100μL Gly-HCl 洗脫液，37℃孵育 8 分鐘，洗脫特異性結合的噬菌體；將該洗脫液轉移至 1.5mL 無菌離心管中，迅速用 10μLTris-HCl 中和緩衝液中和；取 10μL 進行梯度稀釋，測定滴度，計算淘選回收率，其餘洗脫物混合後進行擴增和純化，用於下一輪親和淘選，改變淘選條件，每一輪淘選條件如下表 1。

表 1：親和淘選條件

輪次	抗原包被濃度(μg/mL)	封閉液	文庫投入量(cfu)	結合時間(h)	PBST 濃度	PBST 洗滌次數
1	5	OVA-	2×10^{11}	1	0.1%	6

		PBS				
2	2	OVA-PBS	1×10^{11}	0.75	0.25%	8
3	MCF-7 50000細胞/孔	OVA-PBS	1×10^{11}	0.5	0.5%	8

3.3.2 噬菌體的救援

從淘選洗脫物滴度的平板上，用滅菌牙籤從第三輪滴度測定平板上各隨機挑選 96 個克隆，接種於 1mL 2×YT-A 中，37℃，230 r/min 振盪培養 8 h。取 100 μL 上述培養物，按 cell：phage = 1：20 的比例加入 M13K07 噬菌體，37℃，靜置 15 min，220 r/min 振盪培養 45 min。補加 800 μL 體積的 2×YT-AK，30℃，劇烈振盪培養過夜。第二天 12000 rpm 離心 2min，取上清，用於單克隆 ELISA 鑒定。

3.3.3 陽性噬菌體克隆的鑒定

將人 B7H3-4IgG-his 用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 1μg/mL，和 2%OVA-PBS 按 100 μL/孔分別加入酶標孔中，4℃包被過夜；棄包被液，PBST 洗滌 3 次，每孔加入 300 μL 5%脫脂牛奶，37℃封閉 1 h；PBST 洗滌 1 次， 每孔加入 50 μL 噬菌體培養菌液上清和 50μL 5%脫脂牛奶，37℃，孵育 1 h；PBST 洗滌 5 次，加入辣根過氧化物酶標記的抗 M13 抗體（用 PBS 按 1:10000 稀釋），100 μL/孔，37℃作用 1 h；PBST 洗板 6 次。加入 TMB 顯色液顯色，100 μL/孔，37℃，7min，加入終止液終止反應，50 μL/孔，於 450 nm 下測定吸光度，共篩選到 9 個抗 B7H3 的 scFv 抗體具有獨特序列，其中與腫瘤細胞結合最強的 scFv 抗體 1D1 序列如 SEQ ID NO:1 所示、2E3 序列如 SEQ ID NO:2 所示。

【0787】實施例 3.4 抗 B7H3 抗體表達

將 1D1 和 2E3 的 ScFv 的 VH 胺基酸序列 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:23 分別加上 IgG1 的恆定區胺基酸序列（SEQ ID NO:43）通過密碼子優化及基因合成（上海生工生物技術有限公司），然後構建到 PTT5 載體上，分別命名為 PTT5-01-CH 和 PPT5-02-CH；將 1D1 和 2E3 的 ScFv 的 VL 胺基酸序列 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:33 加上 Kappa 恆定區序列（SEQ ID NO:44）通過密碼子優化及基因合成（上海生工生物技術有限公司），然後構建到 PTT5 載體上，分別命名為 PTT5-01-CL 和 PTT5-01-CL；通過 PEI max 試劑將抗體 B7H3 抗體表達質粒 PTT5-01-CH/PTT5-01-CL、PTT5-02-CH/PTT5-02-CL 共轉染 HEK293F 細胞進行表達，37℃ 5%CO2 搖床表達 7 天，收集上清液，通過 ProA 磁珠進行純化，獲得抗 B7H3 抗體分別命名為 1D1-01、2E3-02。

【0788】實施例 3.5 抗 B7H3 抗體蛋白親和力檢測

通過 ELISA 實驗方法檢測 B7H3 全人源抗體與人 B7H3-4IgG-his 和猴 B7H3-4IgG-his 蛋白的親和力。具體實驗操作：將人 B7H3-4IgG-his 或猴 B7H3-4IgG-his 蛋白用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 1μg/mL 按 100 μL/孔分別加入 96 孔酶標孔中，4℃包被過夜；棄包被液，PBST 洗滌 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA），37℃封閉 1 小時；然後每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀釋好的 B7H3 全人源抗體（10μg 起始，3 倍稀釋，2 複孔)， 37℃，孵育 2h；PBST 洗滌 3 次，加入辣根過氧化物酶標記的抗人 Fc 抗體（用 PBS 按 1:10000 稀釋），100 μL/孔，37℃作用 1 小時；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 顯色液顯色，100 μL/孔，

37℃，7min，加入終止液終止反應，50 μL/孔，於 450 nm 下測吸光度。根據原始資料計算 EC50 值。

結果見圖 1A，1B，2A 和 2B，詳細結果如表 1-1 和 1-2 所示，1D1-01、2E3-02 與人 B7H3-4IgG 均具有較高親和力，分別是 43.56pM 和 17.54pM，其中 2E3-02 強於 B7H3-C1 的親和力 51.85pM；1D1-01、2E3-02 與猴 B7H3-4IgG 較高結合能力，分別是 35.82 pM 和 27.72pM。

表 1-1：1D1-01 抗體蛋白親和力檢測結果

抗體	人 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)	猴 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)
1D1-01	43.56	35.82
B7H3-C1	48.03	166.52

表 1-2：2E3-02 抗體蛋白親和力檢測結果

抗體	人 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)	猴 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)
2E3-02	17.54	27.72
B7H3-C1	51.85	3921

【0789】實施例 3.6 抗 B7H3 抗體細胞親和力檢測

B7H3 蛋白在多種實體瘤細胞上高表達，通過 FACS 實驗方法檢測 B7H3 全人源抗體與腫瘤細胞親和力。具體實驗操作：將生長至對數期的 MCF-7 乳腺癌細胞、A549 人非小細胞肺癌以及 PC3 人前列腺癌細胞通過胰酶消化，用含 2%BSA 的 PBS 緩衝液重懸到 5*10^5 細胞每毫升，加入 100uL 細胞懸液至 96 孔板中; 用含有 2%BSA 的 PBS 緩衝液稀釋 B7H3-C1、B7H3-C2，1D1-01 以及 2E3-02，起始濃度 40μg/mL, 3 倍稀釋，然後加入 100μL 抗體懸液至 96 孔板中混勻；4℃孵育 1 小時，採用預冷的 PBS 清洗 2 次，每次 300μL/孔，500g 離心 5 分鐘；加入 1：50 螢光二抗 APC anti-Human IgG 或者 PE anti-human IgG (購買自 Biolegend) 100μL/每孔，混勻；4℃孵育 0.5

小時，採用預冷的 PBS 清洗 2 次，每次 300μL/孔，500g 離心 5 分鐘，用 500μl PBS 重選，採用貝克曼流式細胞儀進行檢測平均螢光訊號值。將平均螢光訊號值計算 EC50 值，結果見圖 3A、3B、4A、4B 及圖 5，具體資料見表 2-1 和 2-2。

表 2-1：1D1-01 抗體細胞親和力檢測結果

抗體	MCF-7 腫瘤細胞		A549 腫瘤細胞	
	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI
1D1-01	0.524	94465	0.322	11288
B7H3-C1	1.709	83992	1.865	8273

表 2-2：2E3-02 抗體細胞親和力檢測結果

抗體	MCF-7 腫瘤細胞		A549 腫瘤細胞		PC-3 腫瘤細胞	
	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI
2E3-02	0.398	77732	0.150	84806	0.063	9729
B7H3-C1	1.360	63194	1.054	47956	0.618	6436
B7H3-C2	0.278	27925	未檢測	未檢測	0.167	2170

如表 2-1 和 2-2 所示，在 B7H3 高表達腫瘤細胞 MCF-7 上，1D1-01 和 2E3-02 親和力分別是 0.524nM 和 0.398nM，均遠高於 B7H3-C1，同時最大螢光訊號值比 B7H3-C1 分別高 12%和 23%，其中 2E3-02 最大螢光訊號值比對照抗體 2 高 2.78 倍。在 B7H3 中表達腫瘤細胞 A549 上，1D1-01 和 2E3-02 親和力分別是 0.322nM 和 0.150nM，均遠高於 B7H3-C1，同時最大螢光訊號值比 B7H3-C1 分別高 36%和 77%。在 B7H3 低表達腫瘤細胞 PC-3 上，2E3-02 親和力 0.06nM 遠高於 B7H3-C1 親和力 0.618nM，也高於 B7H3-C1 親和力 0.167 nM，同時最大螢光訊號值分別是 B7H3-C1 和 B7H3-C2 的 1.51 和 4.48 倍。綜合來看，抗 B7H3 抗體 1D1-01 和 2E3-02 比 B7H3-C1、

B7H3-C1 均有更好的腫瘤細胞親和力。

【0790】實施例 3.7 抗 B7H3 抗體動態親和力檢測

Fortibio 是常用的動態親和力檢測設備，通過其檢測抗 B7H3 抗體與 B7H3 蛋白的動態親和力。簡述方法如下：對人 B7H3-4IgG-His 、人 B7H3-2IgG-His 或猴 B7H3-4IgG-His 採用 PBST 進行系列稀釋，得到 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5μM、6.25nM、3.125 nM、1.5625 nM 和 0 nM。ProA 生物感測器(Pall 生命科學)在使用前用 PBST 緩衝液預濕。將抗 B7H3 抗體用 PBST 稀釋到 5μg/mL 並固化在 ProA 感測器上。然後將固化了抗體的感測器在 PBST 緩衝液中平衡 60s 以獲得基線，然後轉移到抗原稀釋液結合 60s，再在 PBST 中解離 180s。在一個分析迴圈後，感測器用 10 mM Gly (pH 1.5) 再生。使用 Date analysis 用 1：1 模型分析，確定結合(Ka)和解離(Kd)速率常數並使用其來計算解離平衡常數(KD)。

如表 3 所示，1D1-01、2E3-02 與人 B7H3-4Ig-his 動態親和力在 4.3E-11M 和 2.4E-10M，均遠高於抗體 B7H3-C1 和抗體 B7H3-C2；同時 1D1-01、2E3-02 與猴 B7H3-4Ig-his 動態親和力在 E-10M，具有良好猴交叉；1D1-01、2E3-02 與人 B7H3-4Ig-his/人 B7H3-2Ig-his 動態親和力倍數分別是 9.5 和 32.5。

表 3：抗 B7H3 抗體分子的動態親和力分析

抗體	人 B7H3-4Ig-his 親和力 KD（M）	人 B7H3-2Ig-his 親和力 KD（M）	猴 B7H4-4Ig-his 親和力 KD（M）
1D1-01	4.3E-11	4.1E-10	2.5E-10
2E3-02	2.4E-10	7.8E-09	4.7E-10
B7H3-C1	5.4E-10	4.8 E-08	2.0 E-10
B7H3-C2	1.8E-09	7.1E-08	2.5 E-09

【0791】實施例 3.8 抗 B7H3 抗體特異性檢測

通過 ELISA 實驗方法檢測 B7H3 抗體與 B7H3 結合特異性。具體實驗操作：將人 B7-1、人 B7-2、人 B7H1-his、人 B7H2-his、人 B7H3-his、人 B7H4-his 蛋白（購買自義翹神州生物技術有限公司）用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 1μg /mL 按 100 μL/孔分別加入 96 孔酶標孔中，4℃包被過夜；棄包被液，PBST 洗滌 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA），37℃封閉 1 h；然後每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀釋好的 B7H3 全人源抗體 10ug/mL， 37℃，孵育 2h；PBST 洗滌 3 次，加入辣根過氧化物酶標記的抗人 Fc 抗體（用 PBS 按 1:10000 稀釋），100 μL/孔，37℃作用 1h；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 顯色液顯色，100 μL/孔，37℃，7min，加入終止液終止反應，50 μL/孔，於 450 nm 下測光密度。1D1-01 和 2E3-02 結果分別如圖 6A,6B 所示。如結果所示 1D1-01、2E3-02 與人 B7H3 特異性結合，而不結合人 B7-1、人 B7-2、人 B7H1、人 B7H2、人 B7H4 蛋白。

【0792】實施例 3.9 抗 B7H3 抗體內吞活性檢測

採用 FACS 方式檢測 A549 人非小細胞肺癌細胞對抗 B7H3 抗體被細胞內吞的強弱。將生長至對數生長期的 A549 細胞採用胰酶進行消化，離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次；用 PBS（含 1%BSA）重懸細胞，分別加入待檢測抗 B7H3 抗體，濃度為 10 μg/mL，4℃孵育 1 小時；離心收集細胞，PBS 洗三次，用 DMEM+10% FBS 重懸細胞，將重懸後細胞分成 4 份，分別在 37℃孵育 0、1、2、4 小時；孵育相完成後，離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次，用 50 μL 1%BSA（in PBS）重懸細胞，每孔加入 1μL 螢光二抗 APC anti-Human IgG（Biolegend），混勻，4℃孵育 0.5 小時；離心收集細胞，預

冷 PBS 洗三次，用 200 μL PBS 重懸細胞，上機檢測。按照公式：內吞率（%）=[1-（該時間點檢測樣品平均螢光值-該時間點陰性對照樣品平均螢光值）/（0 小時檢測樣品平均螢光值-0 小時陰性對照樣品平均螢光值）]*100。1D1-01 和 2E3-02 結果分別如圖 7A 和 7B 所示，抗 B7H3 抗體 1D1-01 和 2E3-02 在 A549 腫瘤細胞上具有較強的內吞活性，4 小時能達到 40%左右，與抗體 B7H3-C1 相當。

【0793】實施例 3.10 抗 B7H3 抗體表位競爭檢測

採用競爭 ELISA 方式檢測抗 B7H3 抗體 1D1-01、2E3-02 與抗體 B7H3-C1 是否表位競爭。具體步驟如下：採用 CBS 包被液包被人 B7H3-4Ig-his 抗原，100ng/孔，4 度過夜孵育；去除包被液，用 300 μL PBS 洗孔一次，用 PBS（含 2% BSA）溶液封閉每個孔，100 μL 每孔，37 度孵育 2 小時；棄去除封閉液，將 1D1-01、2E3-02 抗體用 PBS（含 2% BSA）進行稀釋，40 μg/mL 起始，2 倍稀釋，總共 11 個稀釋點，第 12 個點用稀釋液代替，2 複孔，50 μL 每孔加入孔中；將生物素標記的 B7H3-C1 稀釋至 50 ng/mL，50 μL 每孔加入孔中，25 度孵育 2 小時；用 300 μL PBST 洗孔，重複 3 次，加入用 PBS（含 2% BSA）進行 1：5000 倍數稀釋 HRP 抗生物素二抗 100 μL/孔，25 度孵育 1 小時；用 300 μL PBST 洗孔，重複 5 次；每孔加入 100 μL TMB 顯色液（安徽湖州英創），室溫顯色 5 分鐘後每孔加入 50 μL H_2SO_4 終止反應，立即用酶標儀讀取 OD450 nm。將原始資料導入 Graph-prism 計算 EC50 值，結果見圖 8A 與 8B。結果表明，抗 B7H3 抗體 1D1-01 與抗體 B7H3-C1 存在結合表位競爭；抗 B7H3 抗體 2E3-02 與抗體 B7H3-C1 不存在結合表位競爭。

【0794】實施例 3.11 Her3 抗原製備

選取人 Her3 的 1-643 位胺基酸 (NCBI：NP_001973.2)的核酸序列，其中 C 端添加檢測 6xHis 標籤，命名為人 Her3-his。選取猴 Her3 的胺基酸序列，其中 C 端添加檢測 6xHis 標籤，命名為猴 Her3-his。選取鼠 Her3 的胺基酸序列，其中 C 端添加檢測 6×His 標籤，命名為猴 Her3-his。

【0795】實施例 3.12 抗 Her3 抗體表達

將抗體 202-2-1 重鏈可變區（SEQ ID NO:49）加上重鏈 IgG1 恆定區（SEQ NO:43），抗體 202-2-1 輕鏈可變區（SEQ NO:50）與 Kappa 恆定區序列（SEQ ID NO:44），抗體 Her3-C3（patritumab ）來自於第一三共公司，其序列來自 IMGT 資料庫 IMGT/mAb-DB ID：964 ，INN 編號：11093，以及來自於 MediaPharma 公司專利 CN 103189392 B（重鏈 SEQ ID NO:10，輕鏈 SEQ ID NO:14）的抗體 Her3-C4，通過密碼子優化及基因合成，然後分別構建到 PTT5 載體上。通過 PEI max 試劑將抗 Her3 抗體重鏈和輕鏈表達質粒分別共轉染 HEK293F 細胞進行表達，37℃ 5%CO_2搖床表達 7 天，收集上清液，通過 ProteinA 磁珠進行純化，獲得抗 Her3 抗體分別命名為：202-2-1（其重鏈序列為 SEQ ID NO 51，輕鏈序列為 SEQ ID NO 52），抗體 Her3-C3。

【0796】實施例 3.13 抗 Her3 抗體蛋白親和力檢測

通過 ELISA 實驗方法檢測抗 Her3 抗體與 Her3 蛋白的親和力。具體實驗操作：將人 Her3-his、猴 Her3-his 蛋白以及大鼠 Her3-his 用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 1μg /mL 按 100 μL/孔分別加入 96 孔酶標孔中，4℃包被過夜；棄包被液，PBST 洗滌 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含

2%BSA），37℃封閉 1 小時；然後每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀釋好的抗 Her3 抗體（1ug 起始，3 倍稀釋，2 複孔)， 37℃，孵育 2h；PBST 洗滌 3 次，加入辣根過氧化物酶標記的抗人 Fc 抗體（用 PBS 按 1:10000 稀釋），100 μL/孔，37℃作用 1 小時；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 顯色液顯色，100 μL/孔，37℃，7min，加入終止液終止反應，50 μL/孔，於 450 nm 下測吸光度。將原始資料導入 Graph-prism 計算 EC50 值，詳細結果如表 4 所示，202-2-1 與人 Her3 蛋白以及猴 Her3 蛋白有強的結合與抗體 Her3-C4 相當，均不與大鼠 Her3 蛋白結合。

表 4 ：抗 Her3 抗體蛋白親和力檢測結果

抗體名稱	人 Her3-his EC50 (pM)	猴 Her3-his EC50 (pM)	大鼠 Her3-his EC50 (pM)
202-2-1	20.97	15.91	不結合
Her3-C4	27.72	9.275	不結合

【0797】實施例 3.14 抗 Her3 抗體內吞活性檢測

採用 FACS 方式檢測 A549-人 Her3（人非小細胞肺癌細胞）對抗 Her3 抗體被細胞內吞的強弱。將生長至對數生長期的 A549-人 Her3 細胞採用胰酶進行消化，離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次；用 PBS（含 1%BSA）重懸細胞，分別加入待檢測抗 Her3 抗體，濃度為 10 ug/mL，4℃孵育 1 小時；離心收集細胞，PBS 洗三次，用 DMEM+10% FBS 重懸細胞，將重懸後細胞分成 4 份，分別在 37℃孵育 0、1、2、4 小時；孵育相完成後，離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次，用 50 uL 1%BSA（in PBS）重懸細胞，每孔加入 1 uL 螢光二抗 APC anti-Human IgG（Biolegend），混勻，4℃孵育 0.5 小時；離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次，用 200 uL PBS 重懸細胞，流式細胞儀（貝克曼，型號 CytoFlex）上機檢測。按照公式：內吞率（%）=[1-（該

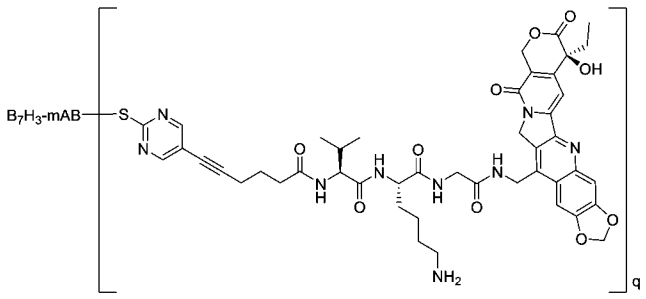
時間點檢測樣品平均螢光值-該時間點陰性對照樣品平均螢光值）/（0 小時檢測樣品平均螢光值-0 小時陰性對照樣品平均螢光值）]*100。結果如圖 7C 顯示，抗 Her3 抗體 202-2-1 在 A549-人 Her3 腫瘤細胞上具有較強的內吞活性 4 小時能達到 26.9%左右，強於抗體 Her3-C4 的 16.6%,與抗體 Her3-C3 相當。但抗 Her3 抗體 202-2-1 內吞先於 Her3-C4/ Her3-C3 達到最大內吞率，具有快於 Her3-C4/ Her3-C3 的內吞速率。

【0798】四、包含細胞生物活性分子和連接體的化合物與抗體的偶聯

【0799】實施例 4.1：B7H3-ADC 的製備

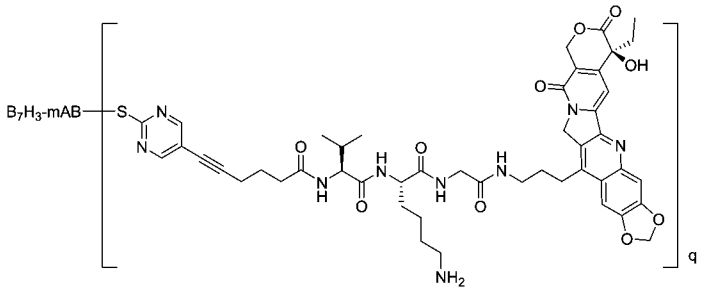
【0800】實施例 4.1.1：B7H3-ADC-01 的製備

取 0.3mL B7H3 抗體(2E3-02 抗體)33.5 mg/mL，用 0.25mL 20mM PB+150mM NaCl+20mM 依地酸鈉溶液（pH 7.6）稀釋，後加入 0.45mL 20mM PB+150mM NaCl 溶液（pH 7.6）混勻，以 1M K_2HPO_4 溶液調 pH 至 7.4，加入 10 mM TCEP（三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol）溶液混勻，室溫放置 30 min。向上述溶液體系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗體物質摩爾數量）的二甲基亞碸（0.1mL）溶液，混勻，室溫靜置 2h，完畢後加入 100mM 半胱胺酸 6.1μl 終止反應。最後採用 G-25 凝膠柱將緩衝液置換為 pH6.44 的 20 mM PB 緩衝溶液。得到 DL-001 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-01。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



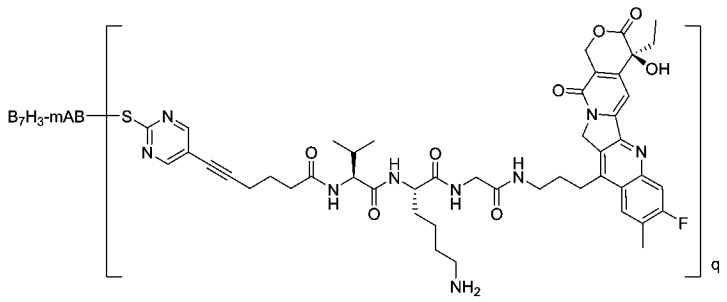
【0801】實施例 4.1.2：B7H3-ADC-02 的製備

用化合物 DL-011 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-02。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



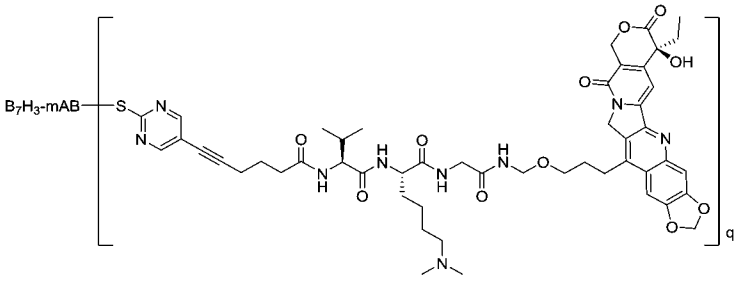
【0802】實施例 4.1.3：B7H3-ADC-03 的製備

用化合物 DL-020 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-020 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-03。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



【0803】實施例 4.1.4：B7H3-ADC-04 的製備

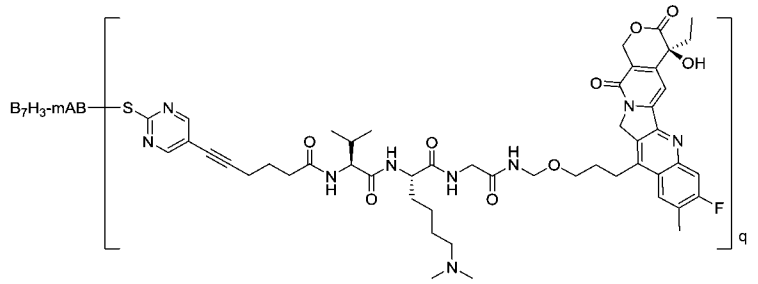
用化合物 DL-019 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-019 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-04。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



【0804】實施例 4.1.5.1：B7H3-ADC-05(DAR8)的製備

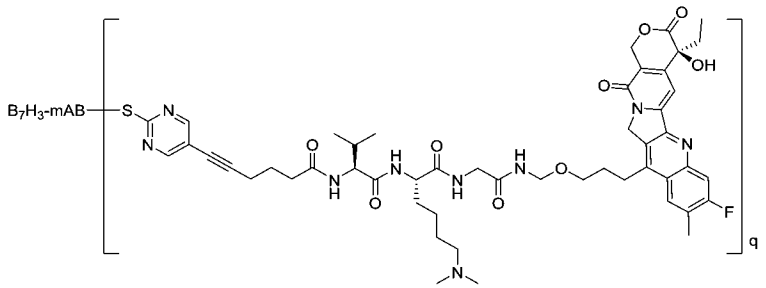
用化合物 DL-018 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 與

B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-05。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



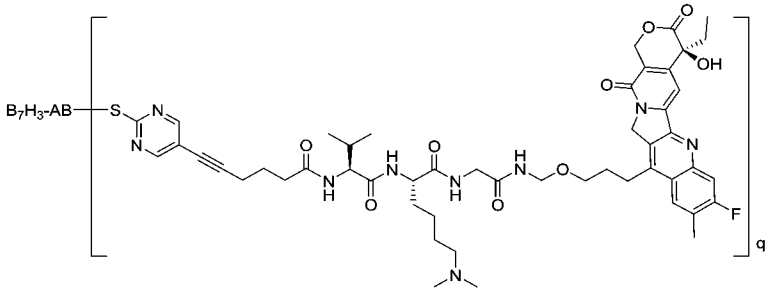
【0805】實施例 4.1.5.2：B7H3-ADC-05(DAR4)的製備

用化合物 DL-018 代替實施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，得到 DL-018 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-05（DAR4）。質譜法測定 DAR 值。



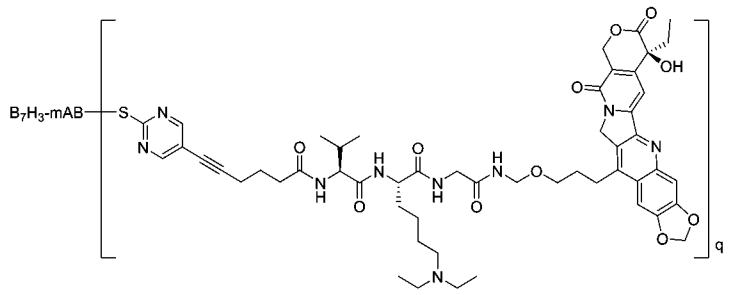
【0806】實施例 4.1.5.3：B7H3-C1-ADC-05(DAR4)的製備

用化合物 DL-018 代替實施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，將 2E3-02 抗體替換為抗體 B7H3-C1，得到 DL-018 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-C1-ADC-05（DAR4）。質譜法測定 DAR 值。

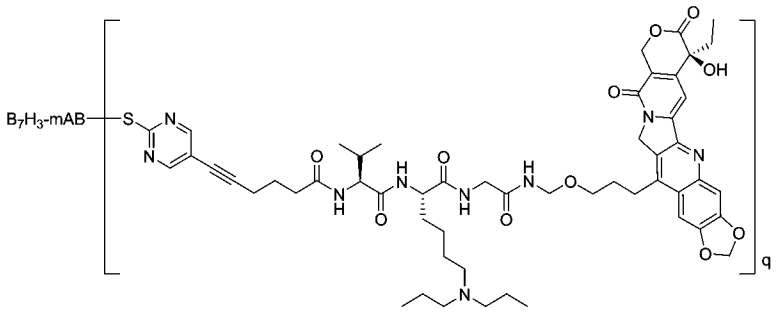


【0807】實施例 4.1.6：B7H3-ADC-06 的製備

用化合物 DL-036 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-06。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



【0808】實施例 4.1.7：B7H3-ADC-07 的製備



【0809】4.1.7.1 B7H3-ADC-07(DAR8)樣品製備

製備方法 A：用化合物 DL-037 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-07(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.7。

製備方法 B：取 25ml 2E3-02 抗體（抗 B7H3，濃度 28.5mg/ml，20mM 醋酸緩衝液），向其中加入 25ml 20mM 醋酸緩衝液稀釋，隨後添加 1ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液並混勻，用 0.5M 磷酸氫二鈉水溶液調樣品 pH 至 7.6 後加入抗體 4.5 倍當量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦鹽酸鹽）溶液並混勻，室溫下反應 90min。最後加入抗體 10 倍當量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混勻後繼續室溫反應 2h。反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有抗 B7H3 抗體 ADC 組合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR8)，質譜法測定 DAR 值為 7.98。

【0810】4.1.7.2 B7H3-ADC-07(DAR2)樣品製備

取 5ml 2E3-02 抗體（抗 B7H3，濃度 28.5mg/ml，20mM 醋酸緩衝液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸緩衝液稀釋，隨後添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液並混勻，用 0.5M 磷酸氫二鈉水溶液調樣品 pH 至 7.6 後加入抗體 4.5 倍當量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦鹽酸鹽）溶液並混勻，室溫下反應 90min。最後加入抗體 2.4 倍當量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混勻後繼續室溫反應 2h。反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有抗 B7H3 抗體 ADC 組合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR2) ，質譜法測定 DAR 值為 2.3。

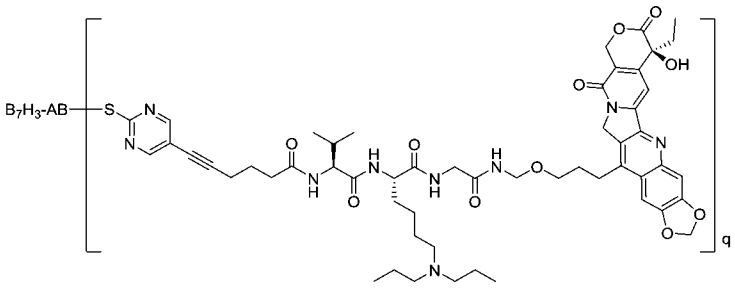
【0811】4.1.7.3

(1)B7H3-ADC-07(DAR4) 樣品製備

取 5ml 2E3-02 抗體（抗 B7H3，濃度 28.5mg/ml，20mM 醋酸緩衝液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸緩衝液稀釋，隨後添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液並混勻，用 0.5M 磷酸氫二鈉水溶液調樣品 pH 至 7.6 後加入抗體 4.5 倍當量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦鹽酸鹽）溶液並混勻，室溫下反應 90min。最後加入抗體 4.8 倍當量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混勻後繼續室溫反應 2h。反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有抗 B7H3 抗體 ADC 組合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR4) ，質譜法測定 DAR 值為 4.1。

(2)B7H3-C1-ADC-07(DAR4) 樣品製備

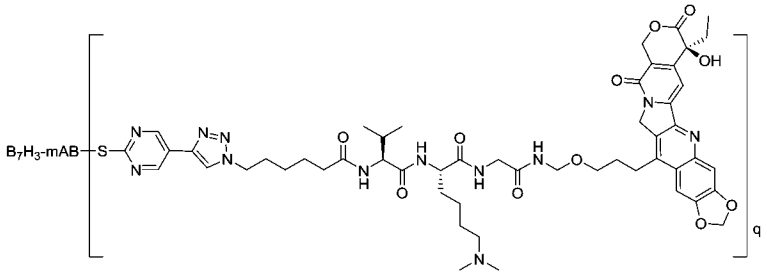
利用 B7H3-ADC-07(DAR4)製備的方法，將 2E3-02 抗體替換為抗體 B7H3-C1，獲得抗體 B7H3-C1 的 ADC 組合物的溶液 B7H3-C1-ADC-07(DAR4) ，質譜法測定 DAR 值為 4.9。



【0812】4.1.7.4 B7H3-ADC-07(DAR6)樣品製備

取 5ml 2E3-02 抗體（抗 B7H3，濃度 28.5mg/ml，20mM 醋酸緩衝液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸緩衝液稀釋，隨後添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液並混勻，用 0.5M 磷酸氫二鈉水溶液調樣品 pH 至 7.6 後加入抗體 4.5 倍當量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦鹽酸鹽）溶液並混勻，室溫下反應 90min。最後加入抗體 7.2 倍當量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混勻後繼續室溫反應 2h。反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有抗 B7H3 抗體 ADC 組合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR6)，質譜法測定 DAR 值為 5.4。

【0813】實施例 4.1.8：B7H3-ADC-08 的製備



【0814】4.1.8.1 B7H3-ADC-08(DAR8)樣品製備

用化合物 DL-028 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-08(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.3。同時，用化合物 DL-028 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-08(DAR8)，質譜法測定 DAR 值，結果如下：

肽鏈	理論值	實測值	面積	比例	DAR
LC	23335	未檢出	0	0	7.321946
LC+DAR1	24368.4	23247.05	70520268	1	
HC	50735	50371.9	409745	0.068972	
HC+DAR1	51768.4	51405.98	151226	0.025456	
HC+DAR2	52801.8	52438.75	482382	0.081199	
HC+DAR3	53835.2	53471.3	4897381	0.824373	

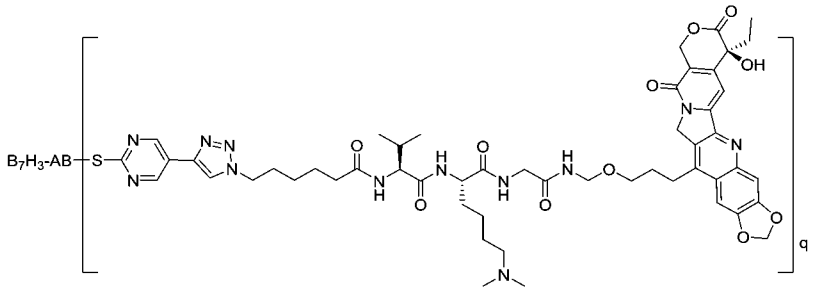
【0815】4.1.8.2

（1）B7H3-ADC-08(DAR4)樣品製備

用化合物 DL-028 代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的製備的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-08(DAR4)，質譜法測定 DAR 值為 4.7。

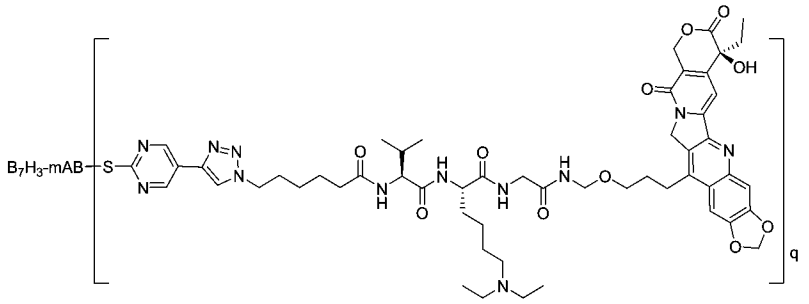
（2）B7H3-C1-ADC-08(DAR4)

用化合物 DL-028 代替實施例 4.1.7.3 B7H3-C1-ADC-07(DAR4) 的製備的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-C1-ADC-08，質譜法測定 DAR 值為 4.7。



【0816】實施例 4.1.9：B7H3-ADC-09 的製備

用化合物 DL-029 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-09。質譜法測定 DAR 值為 7.6。

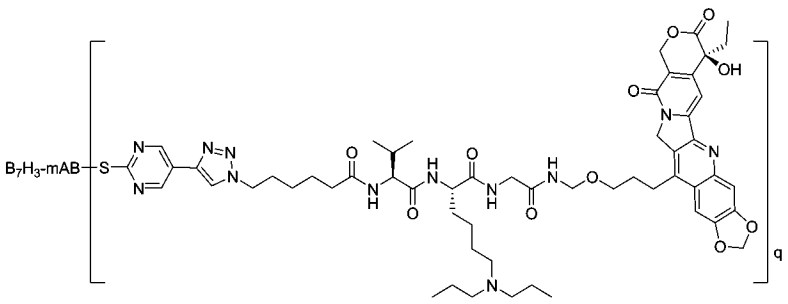


同時，用化合物 DL-029 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-029 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-09，質譜法測定 DAR 值，結果如下：

肽鏈	理論值	實測值	面積	比例	DAR
LC	23245	23247.03	6274384	0.094179	7.811641
LC+DAR1	24306	24308.41	60347328	0.905821	
HC	50367	未檢出	0	0	
HC+DAR1	51428	未檢出	0	0	
HC+DAR2	52489	未檢出	0	0	
HC+DAR3	53550	53555.46	10285189	1	

【0817】實施例 4.1.10：B7H3-ADC-10 的製備

用化合物 DL-030 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-10。質譜法測定 DAR 值為 7.6。

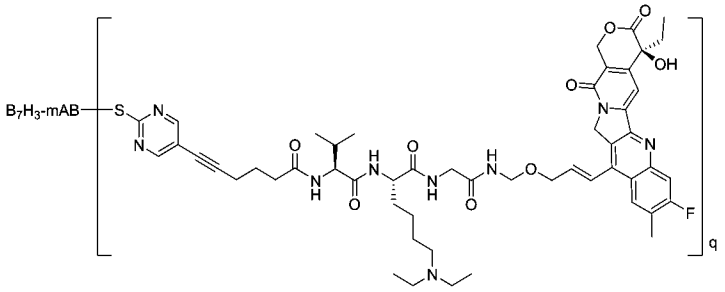


同時，用化合物 DL-030 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-030 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-10，質譜法測定 DAR 值，結果如下：

肽鏈	理論值	實測值	面積	比例	DAR
LC	23245	未檢出	0	0	8
LC+DAR1	24194.4	24336.45	66512554	1	
HC	50367	未檢出	0	0	
HC+DAR1	51316.4	未檢出	0	0	
HC+DAR2	52165.8	未檢出	0	0	
HC+DAR3	53215.2	未檢出	11529758	1	

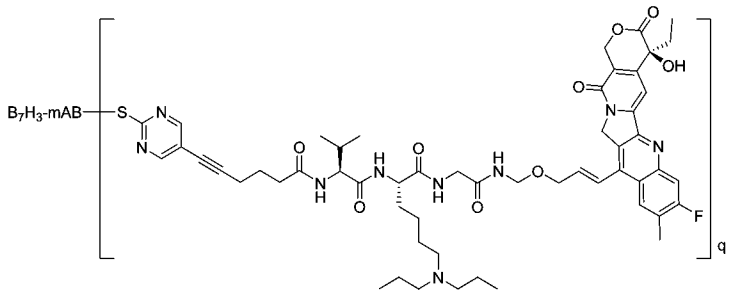
【0818】實施例 4.1.11：B7H3-ADC-11 的製備

用化合物 DL-045 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-045 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-11。質譜法測定 DAR 值為 7.5。



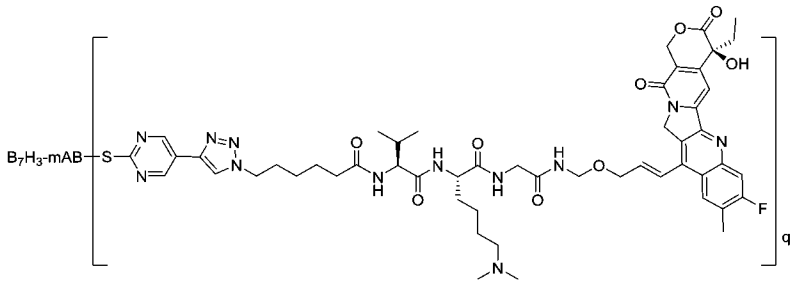
【0819】實施例 4.1.12：B7H3-ADC-12 的製備

用化合物 DL-046 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-046 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-12。質譜法測定 DAR 值為 7.6。



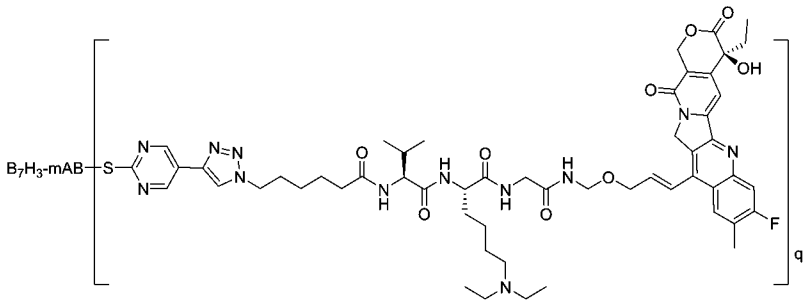
【0820】實施例 4.1.13：B7H3-ADC-13 的製備

用化合物 DL-041 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-041 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-13。質譜法測定 DAR 值為 7.8。

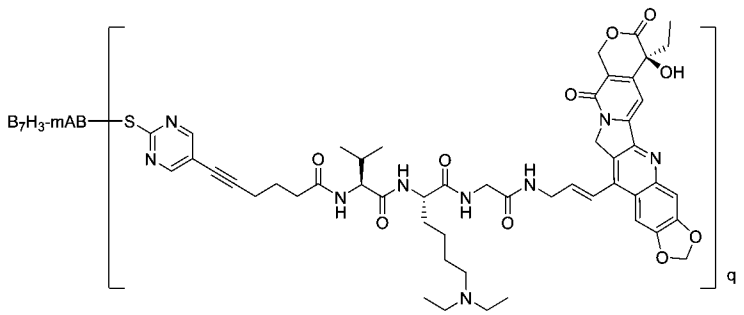


【0821】實施例 4.1.14：B7H3-ADC-14 的製備

用化合物 DL-042 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-042 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-14。質譜法測定 DAR 值為 7.9。



【0822】實施例 4.1.15：B7H3-ADC-15 的製備



【0823】4.1.15.1 B7H3-ADC-15(DAR8)樣品製備

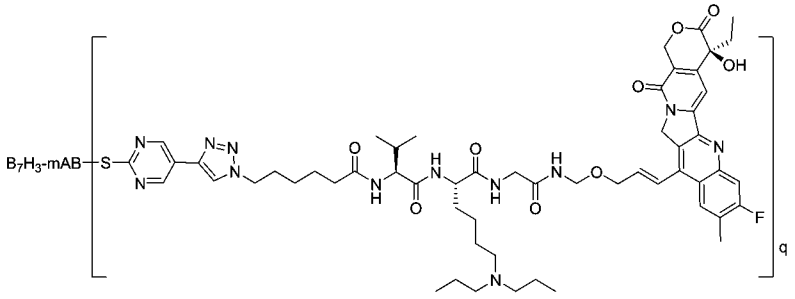
用化合物 DL-027 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-027 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-15(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.8。

【0824】4.1.15.2 B7H3-ADC-15(DAR4)樣品製備

用化合物 DL-027 代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的製備的化合物 DL-037，得到 DL-027 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-15(DAR4)，質譜法測定 DAR 值為 3.4。

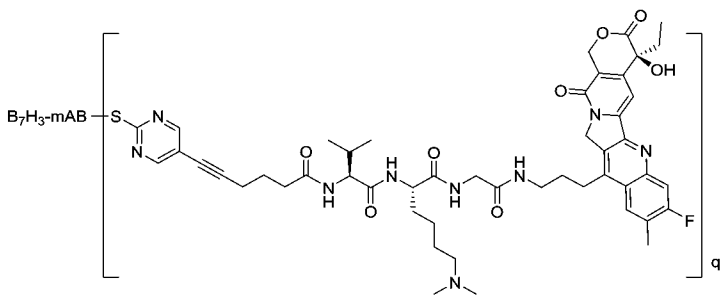
【0825】實施例 4.1.16：B7H3-ADC-16 的製備

用化合物 DL-043 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-043 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-16。質譜法測定 DAR 值為 7.4。



【0826】實施例 4.1.17：B7H3-ADC-17 的製備

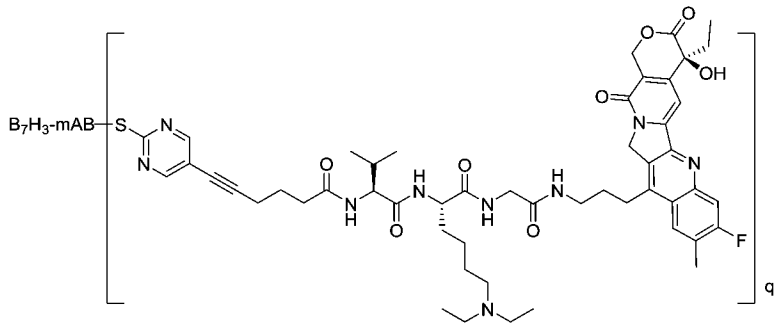
用化合物 DL-024 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-024 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-17，質譜法測定 DAR 值。



【0827】實施例 4.1.18：B7H3-ADC-18 的製備

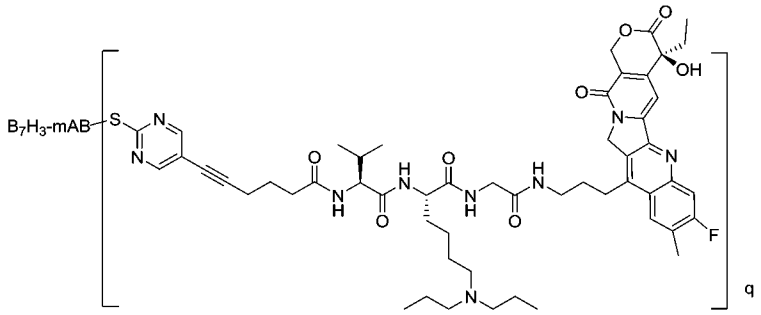
用化合物 DL-025 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到

DL-025 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-18，質譜法測定 DAR 值 8.0。



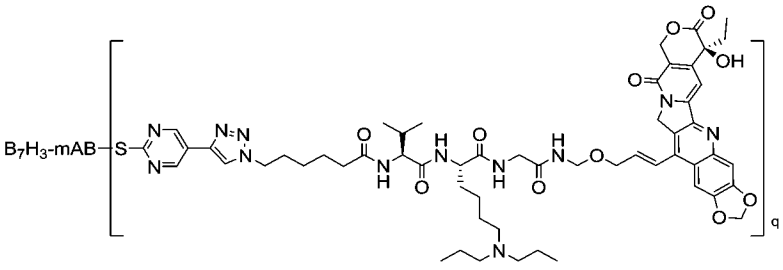
【0828】實施例 4.1.19：B7H3-ADC-19 的製備

用化合物 DL-026 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-026 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-19，質譜法測定 DAR 值 8.0。



【0829】實施例 4.1.20：B7H3-ADC-20 的製備

用化合物 DL-038 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-038 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-20，質譜法測定 DAR 值為 7.3。

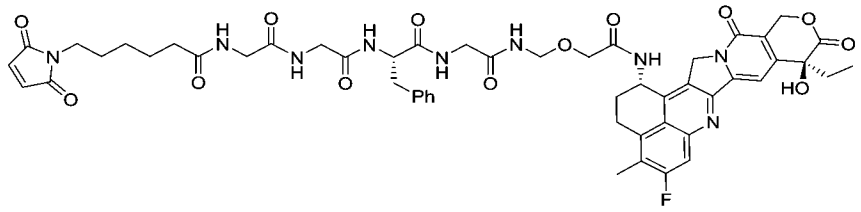


肽鏈	理論值	實測值	面積	比例	DAR
LC	23245	23247.17	29131808	0.323854	7.306055
LC+DAR1	24331.5	24334.63	60821684	0.676146	
HC	50375	未檢出	0	0	
HC+DAR1	51461	未檢出	0	0	

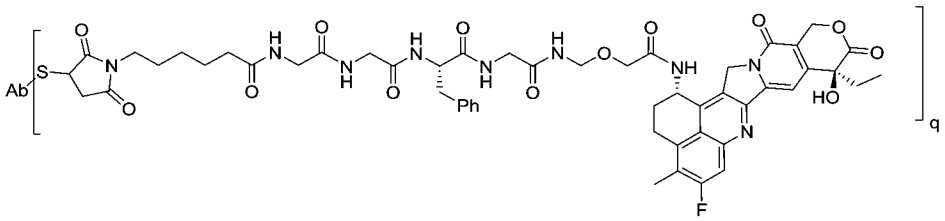
HC+DAR2	52547.83	52547.83	159238	0.023119	
HC+DAR3	53633.84	53633.84	6728635	0.976881	

【0830】實施例 4.1.21：B7H3-ADC-21 的製備

參照 CN104755494B 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



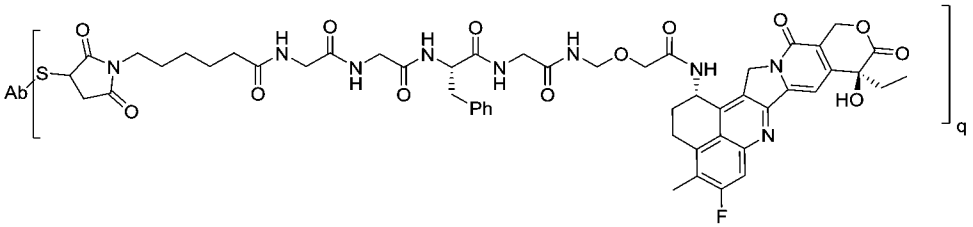
用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7.1 製備方法 B 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-21（DAR8），其結構如下，並質譜法測定 DAR 值為 7.8。



用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7.2 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-21（DAR2），其結構如下，並質譜法測定 DAR 值為 2.0。

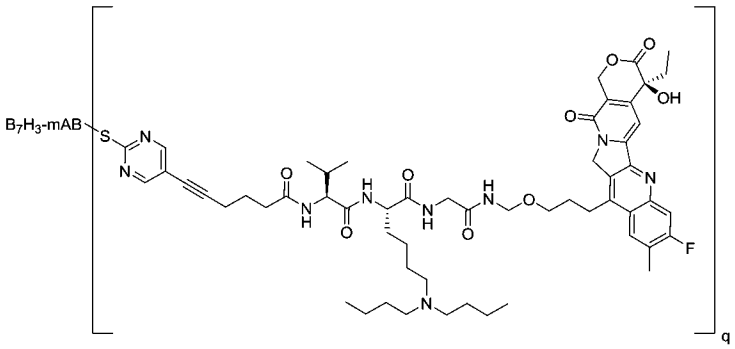
用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，對照卡尼 1 替換 2E3-02 抗體，獲得 B7H3-C1-ADC-21（DAR4），其結構如下，並質譜法測定 DAR 值為 4.5。

用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7.4 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-21（DAR6），其結構如下，並質譜法測定 DAR 值為 5.4。



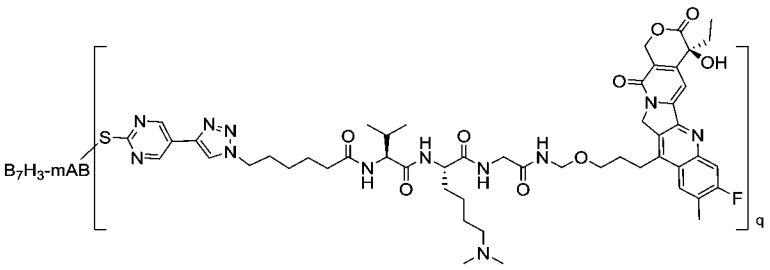
【0831】實施例 4.1.22：B7H3-ADC-22 的製備

用化合物 DL-048 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-048 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-22，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



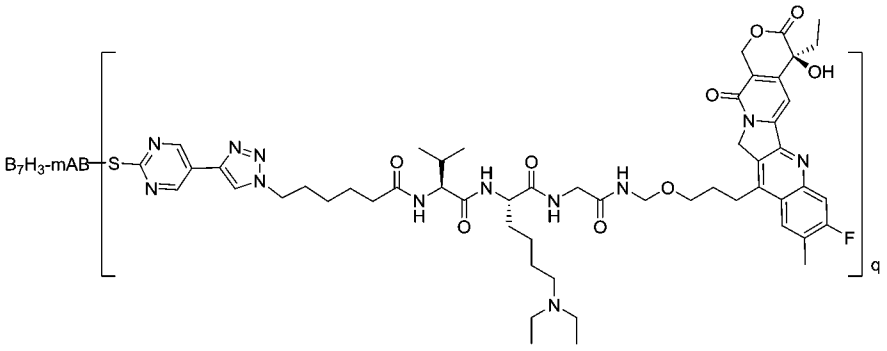
【0832】實施例 4.1.23：B7H3-ADC-23 的製備

【0833】用化合物 DL-031 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-031 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-23，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



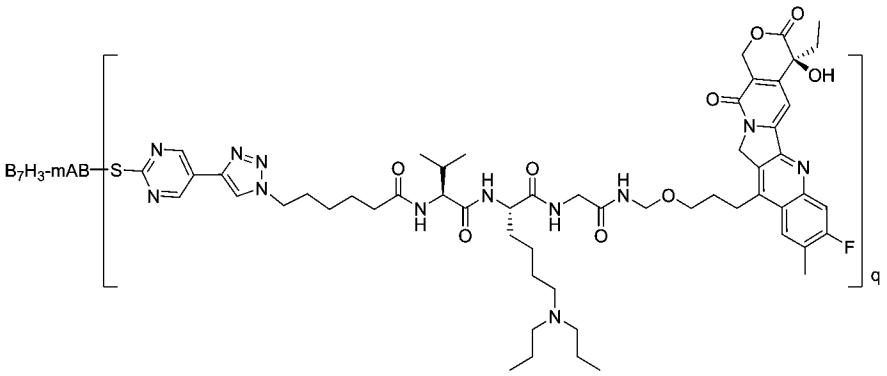
【0834】實施例 4.1.24：B7H3-ADC-24 的製備

用化合物 DL-032 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-032 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-24，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



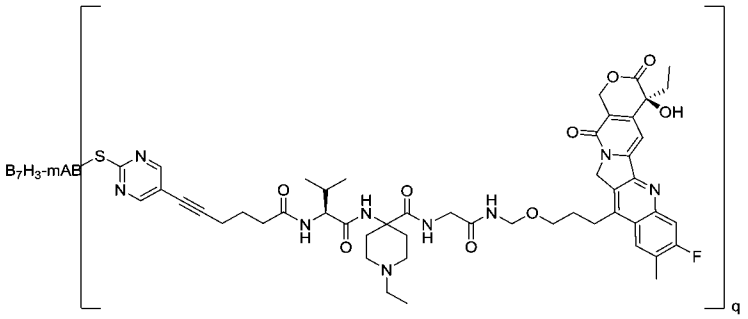
【0835】實施例 4.1.25：B7H3-ADC-25 的製備

【0836】用化合物 DL-033 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-033 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-25，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



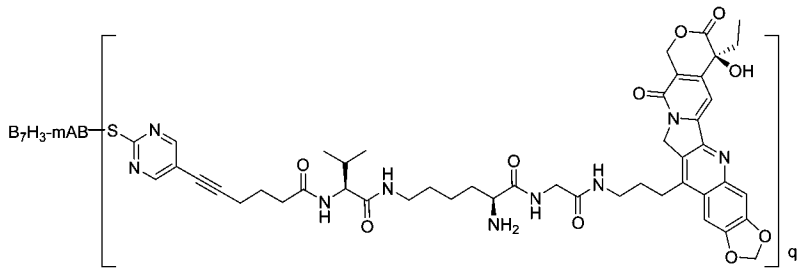
【0837】實施例 4.1.27：B7H3-ADC-27 的製備

用化合物 DL-050 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-050 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-27，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



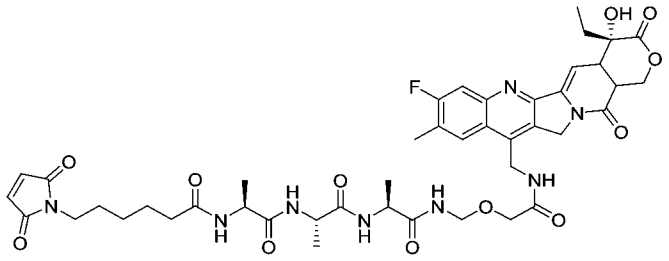
【0838】實施例 4.1.28：B7H3-ADC-28 的製備

用化合物 DL-021 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-021 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-28，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



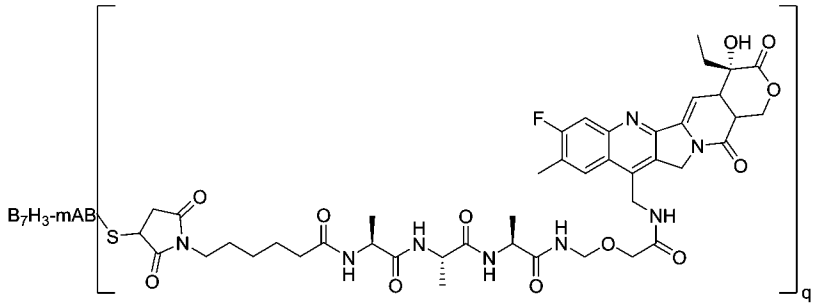
【0839】實施例 4.1.29：B7H3-ADC-32 的製備

參照 WO2020219287 實施例 16 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



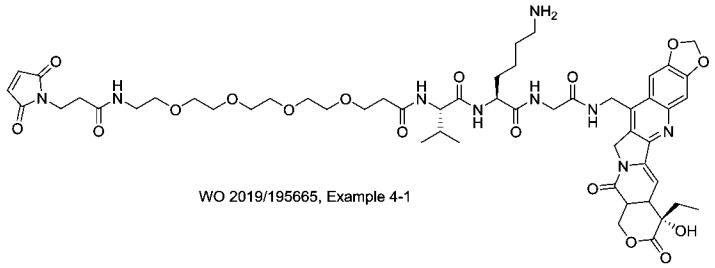
WO 2020/219287, Example 22a

用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4. 1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-32。質譜法測定 DAR 值為 7.3。

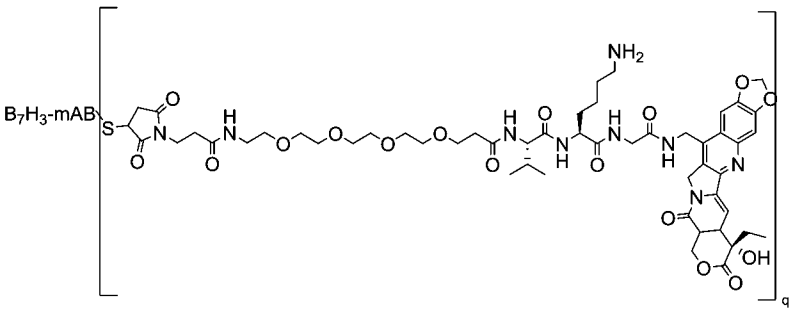


【0840】實施例 4.1.30：B7H3-ADC-33 的製備

參照 WO2019195665 實施例 4-1 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



WO 2019/195665, Example 4-1



【0841】4.1.30.1 B7H3-ADC-33(DAR8)樣品製備

用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4. 1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-33(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.4。

【0842】4.1.30.2 B7H3-ADC-33(DAR4)樣品製備

用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4. 1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的製備的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-33（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 4.9。

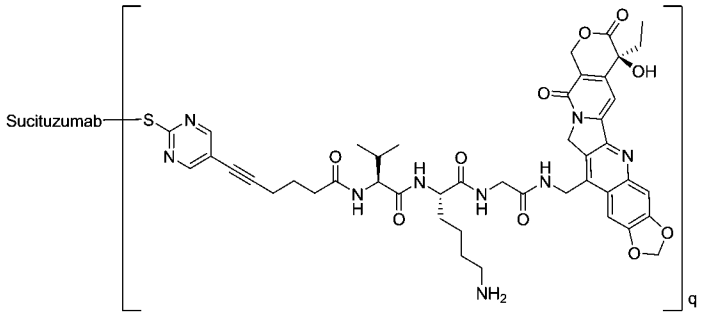
注：B7H3-mAB 為 2E3-02 抗體，B7H3-AB 為 B7H3-C1。

【0843】4.2：Trop2-ADC 的製備

【0844】實施例 4.2.1 Trop2-ADC-01（DAR8）的製備

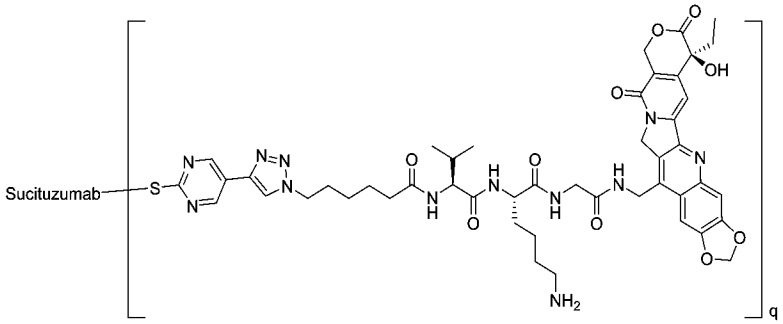
取 0.3mL Sacituzumab 抗體（抗 Trop-2，33.5mg/mL），用 0.25mL 20mM PB+150mM NaCl+20mM 依地酸鈉溶液（pH 7.6）稀釋，後加入 0.45mL 20mM PB+150mM NaCl 溶液（pH 7.6）混勻，以 1M K_2HPO_4 溶液調 pH 至 7.4，加入 10 mM TCEP（三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol）溶液混勻，室溫放置 30 min。向上述溶液體系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗體物質摩爾數量）的二甲基亞碸（0.1mL）溶液，混勻，室溫靜置 2h，完畢後加入 100mM 半胱胺酸 6.1μl 終止反應。最後採用 G-25 凝膠柱將緩衝液置換為 pH6.44 的 20 mM PB 緩衝溶液。得到 DL-001 與 Sacituzumab 抗體的偶

聯產物 Trop2-ADC-01（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



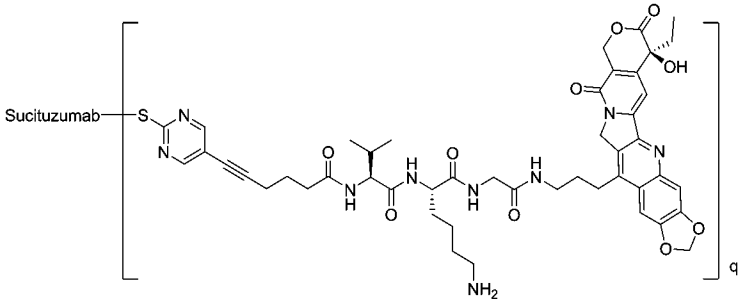
【0845】實施例 4.2.2：Trop2-ADC-02（DAR8）的製備

用化合物 DL-009 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-009 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-02（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。



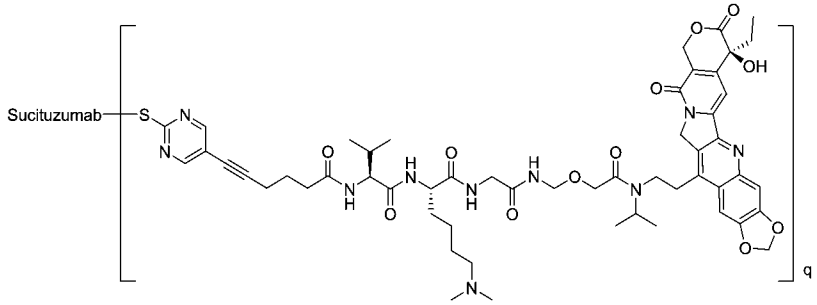
【0846】實施例 4.2.3：Trop2-ADC-03（DAR8）的製備

用化合物 DL-011 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-03（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



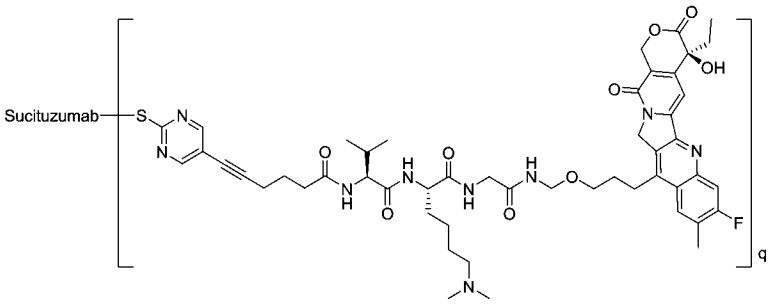
【0847】實施例 4.2.4：Trop2-ADC-04（DAR8）的製備

用化合物 DL-015 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-015 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-04（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。



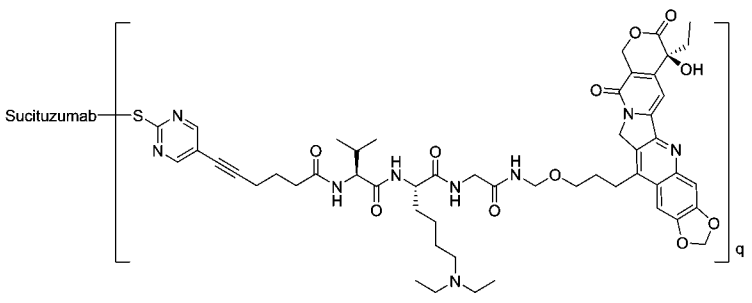
【0848】實施例 4.2.5：Trop2-ADC-05（DAR8）的製備

用化合物 DL-018 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-05（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



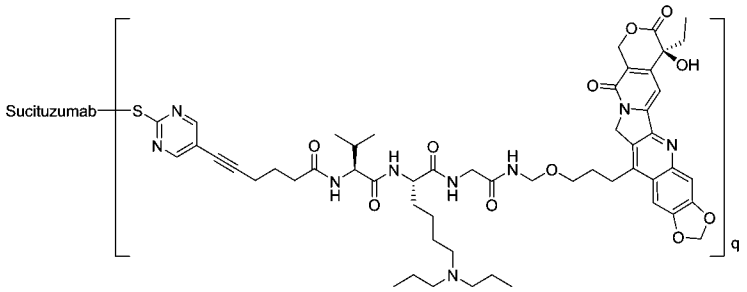
【0849】實施例 4.2.6：Trop2-ADC-06（DAR8）的製備

用化合物 DL-036 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-06（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



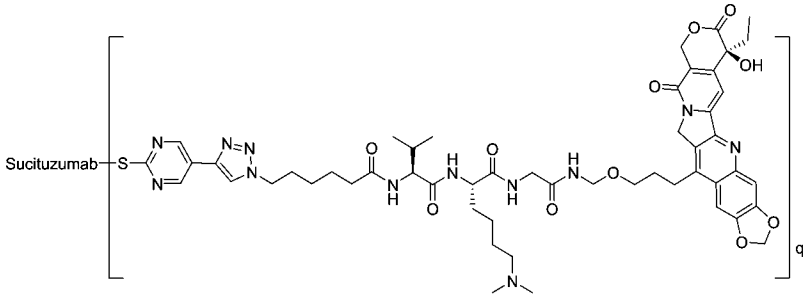
【0850】實施例 4.2.7：Trop2-ADC-07（DAR8）的製備

用化合物 DL-037 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-07（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



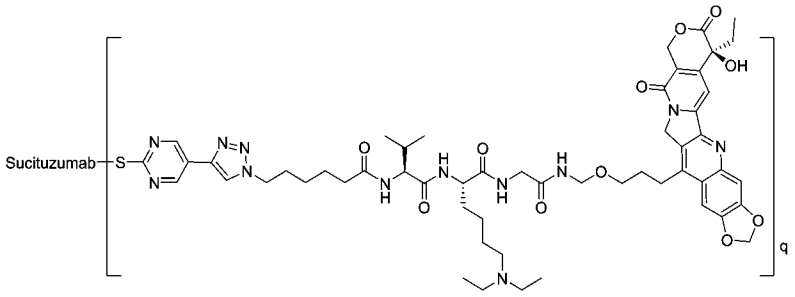
【0851】實施例 4.2.8：Trop2-ADC-08（DAR8）的製備

用化合物 DL-028 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-08（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.3。



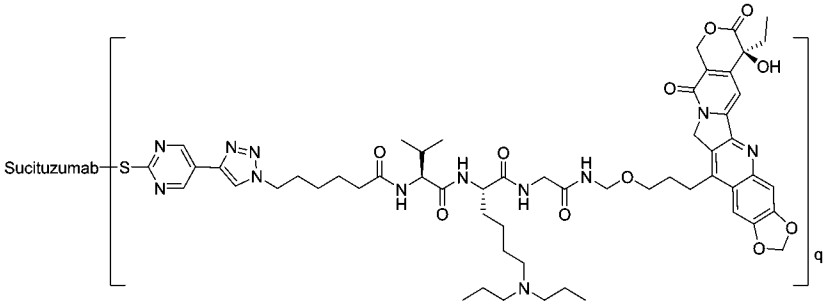
【0852】實施例 4.2.9：Trop2-ADC-09（DAR8）的製備

用化合物 DL-029 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-09（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.6。



【0853】實施例 4.2.10：Trop2-ADC-10（DAR8）的製備

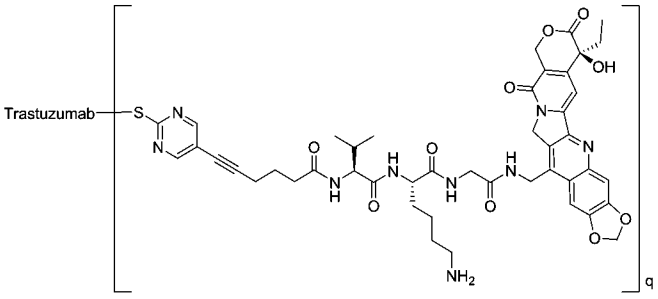
用化合物 DL-030 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-10（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.6。



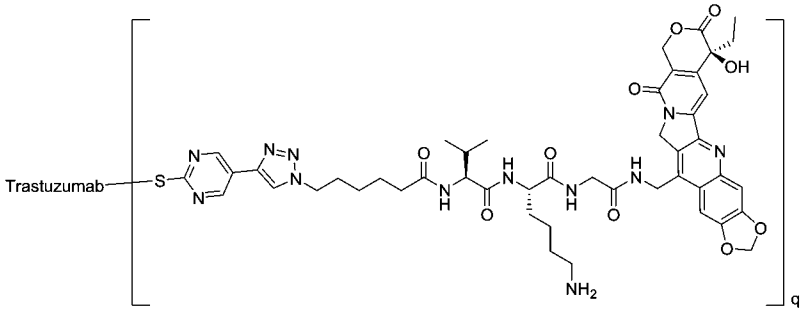
【0854】4.3：Her2-ADC 的製備

【0855】實施例 4.3.1：Her2-ADC-01（DAR8）的製備

在 37°C 條件下，向 Trastuzumab 的 PBS 緩衝溶液（pH=6.5，1ml，10.05mg/ml，0.0677μmol）加入 TCEP（10 mM，三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol），溶液混勻，37°C 條件下放置 3 小時。向上述溶液體系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗體物質摩爾數量）的二甲基亞碸（0.1mL）溶液，混勻，室溫靜置 3h，完畢後加入 100mM 半胱胺酸 6.1μl 終止反應。最後採用 G-25 凝膠柱將緩衝液置換為 pH6.44 的 20 mM PB 緩衝溶液。得到 DL-001 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-01（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

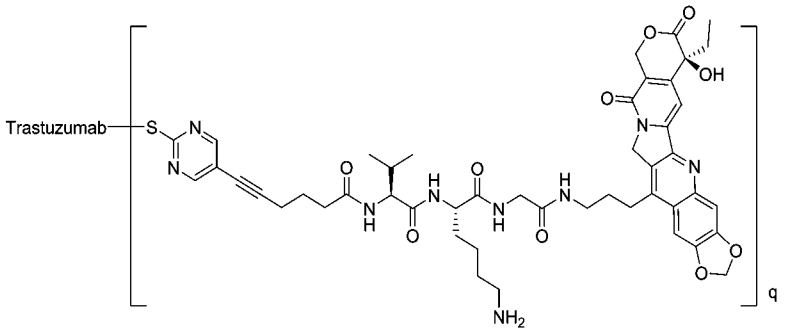


【0856】實施例 4.3.2：Her2-ADC-02（DAR8）的製備



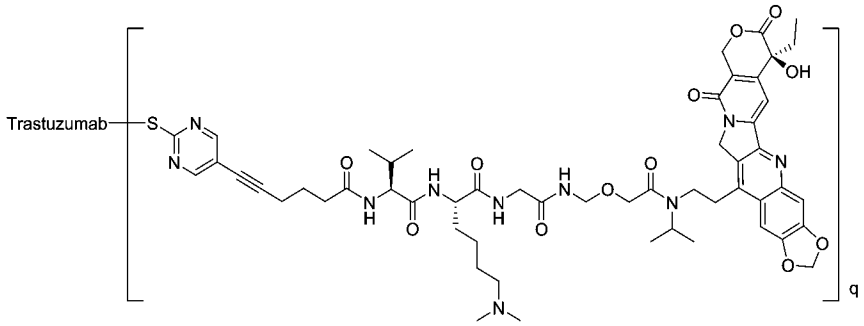
用化合物 DL-009 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-009 與 Trastuzumab 抗體偶聯的產物 Her2-ADC-02（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

【0857】實施例 4.3.3：Her2-ADC-03（DAR8）的製備



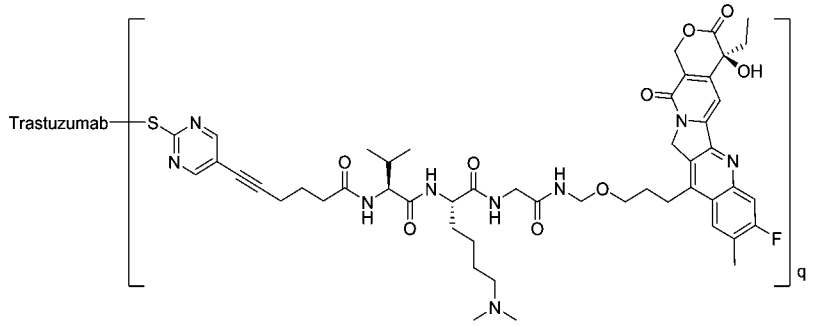
用化合物 DL-011 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 與 Trastuzumab 抗體偶聯的產物 Her2-ADC-03（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。

【0858】實施例 4.3.4：Her2-ADC-04（DAR8）的製備



用化合物 DL-015 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-015 與 Trastuzumab 抗體偶聯的產物 Her2-ADC-04（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

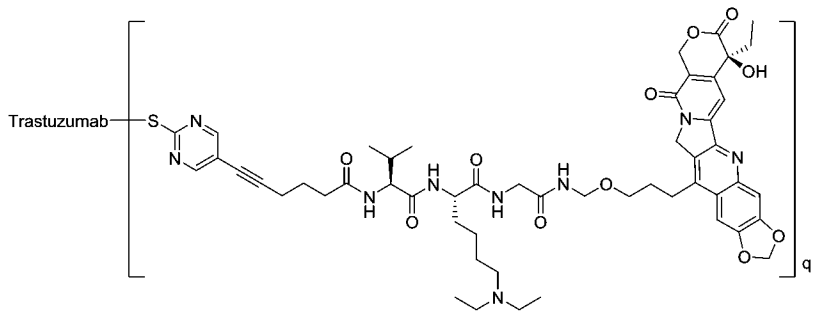
【0859】實施例 4.3.5：Her2-ADC-05（DAR8）的製備



用化合物 DL-018 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 與 Trastuzumab 抗體偶聯的產物 Her2-ADC-05（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

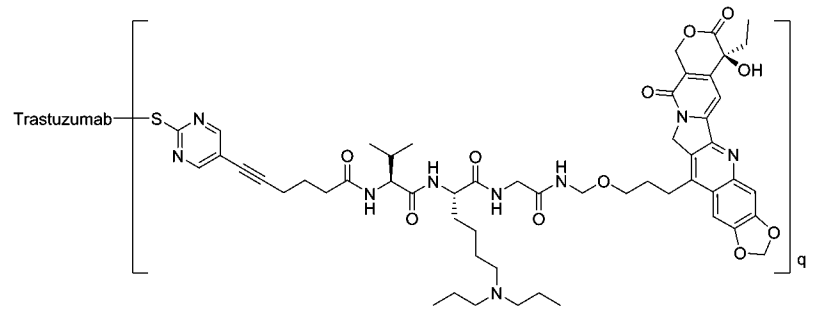
【0860】實施例 4.3.6：Her2-ADC-06（DAR8）的製備

用化合物 DL-036 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-06（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



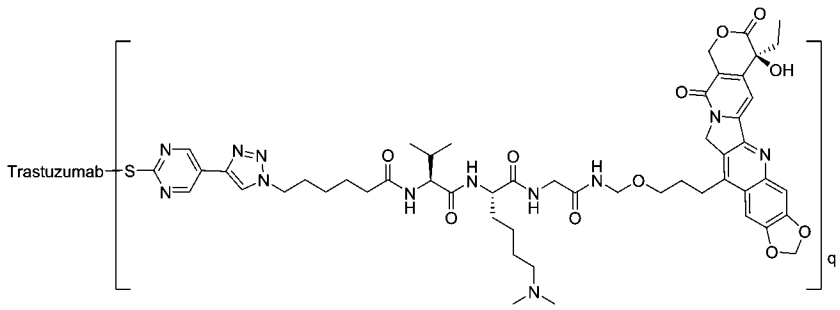
【0861】實施例 4.3.7：Her2-ADC-07（DAR8）的製備

用化合物 DL-037 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-07（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



【0862】實施例 4.3.8：Her2-ADC-08（DAR8）的製備

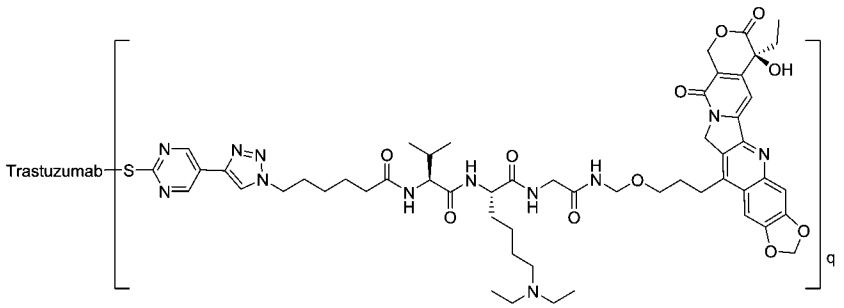
【0863】用化合物 DL-028 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-08（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.3。



【0864】實施例 4.3.9：Her2-ADC-09（DAR8）的製備

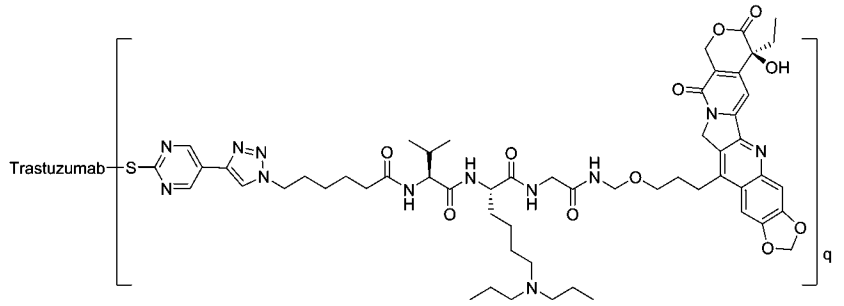
用化合物 DL-029 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-09（DAR8）。質譜法測定 DAR 值

為 7.6。



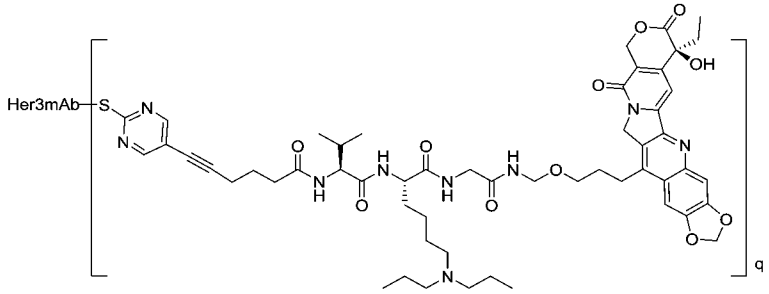
【0865】實施例 4.3.10：Her2-ADC-10（DAR8）的製備

用化合物 DL-030 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-10（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.6。



【0866】4.4：Her3-ADC 的製備

【0867】實施例 4.4.1：Her3-ADC-07 的製備



【0868】4.4.1.1 Her3-ADC-07（DAR8）樣品製備

將抗 Her3 抗體 202-2-1 30 mg，用稀釋液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀釋，加入終濃度為 5mM 的依地酸鈉溶液，混勻；加入抗體 4.5 倍當量的 TCEP 溶液，混勻，室溫放置 30 分鐘；向上述溶液體系加入抗體

10 倍當量的溶解於二甲基亞碸中的 DL-037，混勻，室溫靜置 2 小時，得到偶聯後樣品，反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有 202-2-1 抗體 ADC 組合物的溶液 Her3-ADC-07（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.98。

【0869】4.4.1.2 Her3-ADC-07(DAR4)樣品製備

將抗 Her3 抗體 202-2-1 30 mg，用稀釋液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀釋，加入終濃度為 5mM 的依地酸鈉溶液，混勻；加入抗體 4.5 倍當量的 TCEP 溶液，混勻，室溫放置 30 分鐘；向上述溶液體系加入抗體 4.8 倍當量的溶解於二甲基亞碸中的 DL-037，混勻，室溫靜置 2 小時，得到偶聯後樣品，反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有 202-2-1 抗體 ADC 組合物的溶液 Her3-ADC-07(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.5。

【0870】4.4.1.3 Her3-ADC-07(DAR6)樣品製備

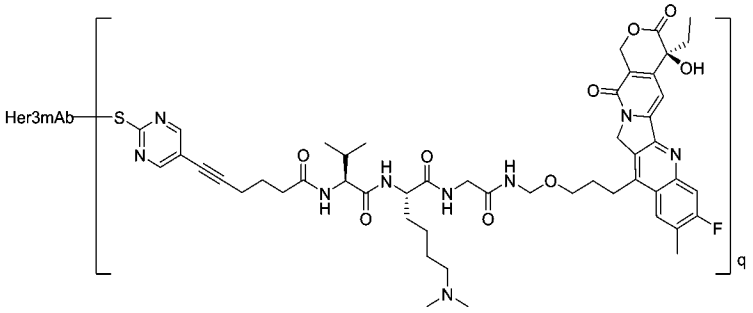
將抗 Her3 抗體 202-2-1 30 mg，用稀釋液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀釋，加入終濃度為 5mM 的依地酸鈉溶液，混勻；加入抗體 4.5 倍當量的 TCEP 溶液，混勻，室溫放置 30 分鐘；向上述溶液體系加入抗體 7.2 倍當量的溶解於二甲基亞碸中的 DL-037，混勻，室溫靜置 2 小時，得到偶聯後樣品，反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有 202-2-1 抗體 ADC 組合物的溶液 Her3-ADC-07(DAR6)。質譜法測定 DAR

值為 5.8。

【0871】實施例 4.4.2：Her3-ADC-05 的製備

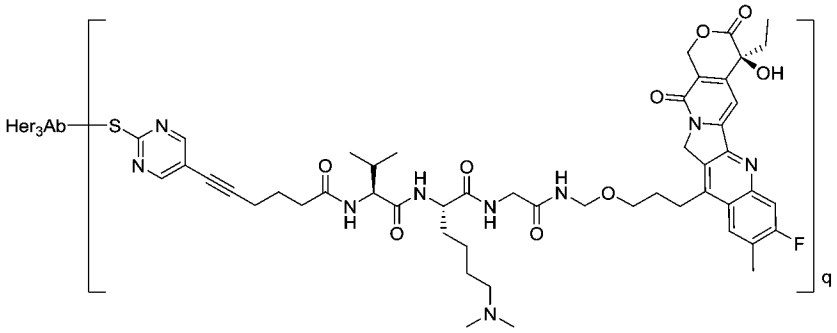
【0872】4.4.2.1 Her3-ADC-05(DAR4)樣品製備

利用 DL-018 代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到 DL-018 與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-05(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.0。

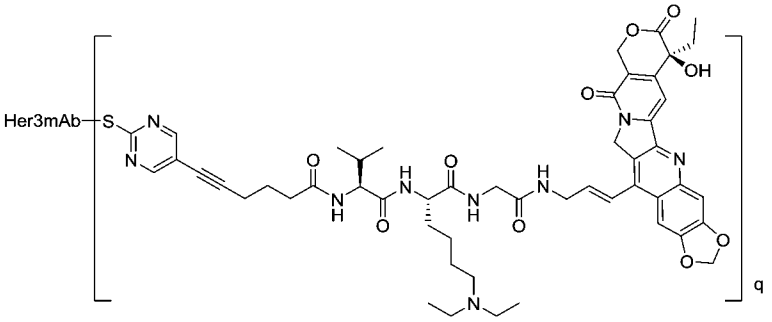


【0873】4.4.2.2 Her3-C3-ADC-05(DAR4) (DAR4)樣品製備

利用 DL-018 代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，抗體 Her3-C3 代替實施例 4.4.1.2 的抗 Her3 抗體 202-2-1，得到 DL-018 與 Her3-C3 的偶聯產物 Her3-C3-ADC-05(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.7。



【0874】實施例 4.4.3：Her3-ADC-15 的製備



【0875】4.4.3.1 Her3-ADC-15(DAR8)樣品製備

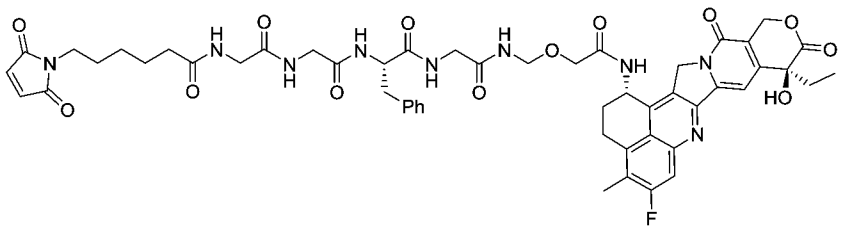
利用 DL-027 代替實施例 4.4.1.1 的化合物 DL-037，得到 DL-027 與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-15(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

【0876】4.4.3.2 Her3-ADC-15(DAR2)樣品製備

利用 DL-027 代替實施例 4.1.7.2 的化合物 DL-037，抗 Her3 抗體 202-2-1 代替實施例 4.1.7.2 的 2E3-02 抗體，得到 DL-027 與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-15(DAR2)。質譜法測定 DAR 值為 2。

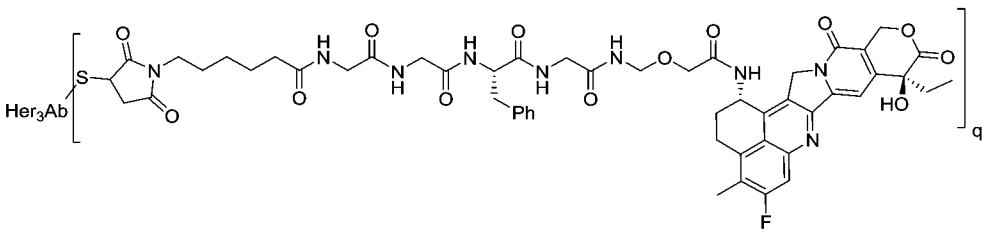
【0877】實施例 4.4.4：Her3-ADC-21 的製備

參照 CN104755494B 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



【0878】4.4.4.1 Her3-C3-ADC-21(DAR4)樣品製備

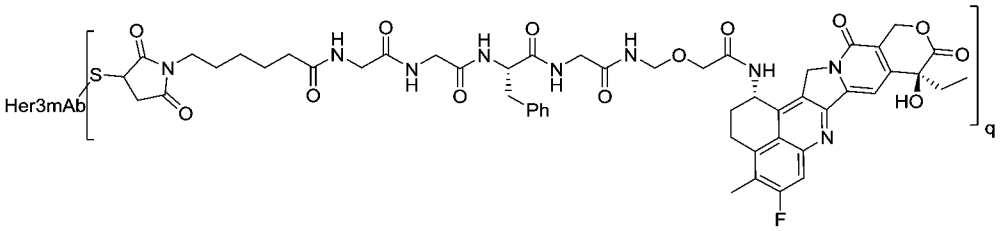
利用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，抗體 Her3-C3 代替實施例 4.4.1.2 的抗 Her3 抗體 202-2-1，得到 Her3-C3-ADC-21(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.4。



【0879】4.4.4.2 Her3-ADC-21(DAR4)樣品製備

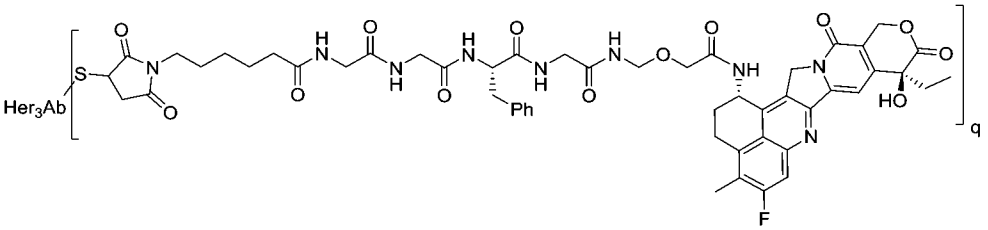
利用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到上述藥物-連接體化合物與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-21(DAR4)。質

譜法測定 DAR 值為 4.1。



【0880】4.4.4.3 Her3-C3-ADC-21(DAR8)樣品製備

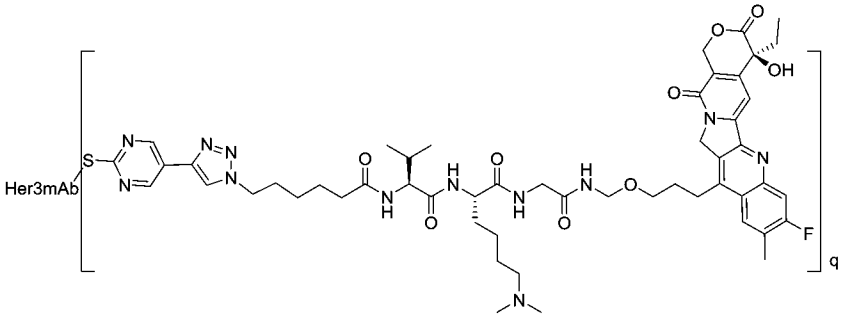
利用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.4.1.1 的化合物 DL-037，抗體 Her3-C3 代替實施例 4.4.1.1 的抗 Her3 抗體 202-2-1，得到 Her3-C3-ADC-21(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 9.5。



【0881】實施例 4.4.5：Her3-ADC-23 的製備

【0882】4.4.5.1 Her3-ADC-23(DAR4)樣品製備

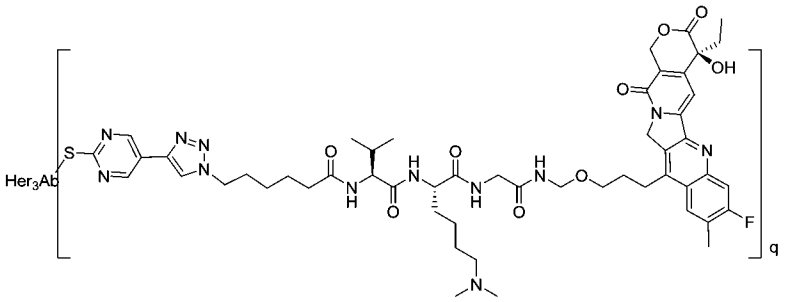
利用 DL-031 代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到 DL-031 與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-23(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.2.



【0883】4.4.5.2 Her3-C3-ADC-23(DAR4)樣品製備

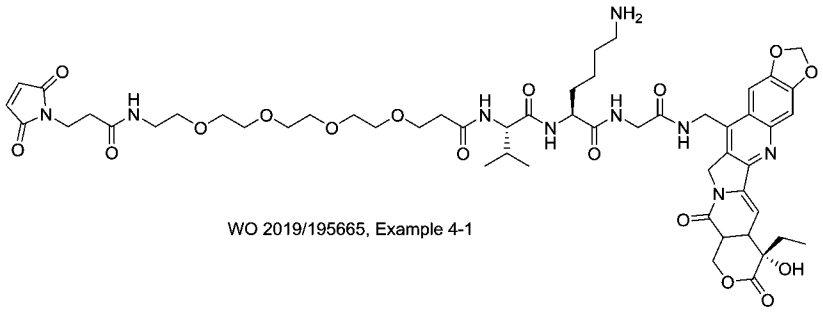
利用 DL-031 代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，用抗體 Her3-C3 代替 4.4.1.2 的 Her3 抗體 202-2-1，得到 DL-031 與抗體 Her3-C3 的偶聯產物

Her3-C3-ADC-23(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.9。

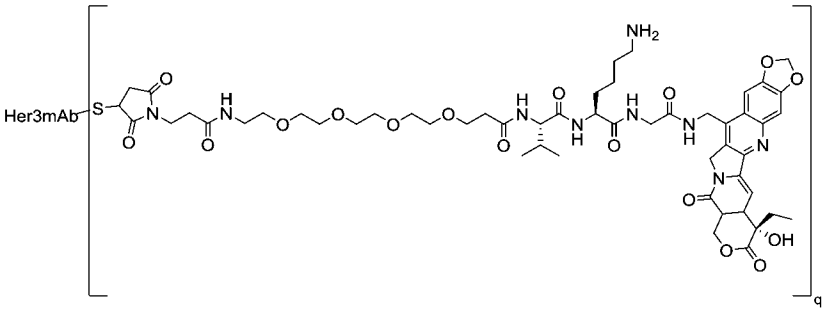


【0884】實施例 4.4.6：Her3-ADC-33 的製備

參照 WO2019195665 實施例 4-1 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



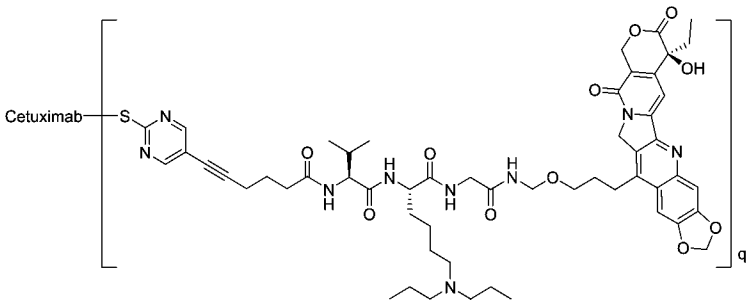
用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到上述藥物-連接體化合物與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-33（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 5.6。



注：Her3mAb 為 202-2-1 抗體，Her3Ab 為抗體 Her3-C3。

【0885】4.5：EGFR-ADC 的製備

【0886】4.5.1 EGFR-ADC-07 的製備



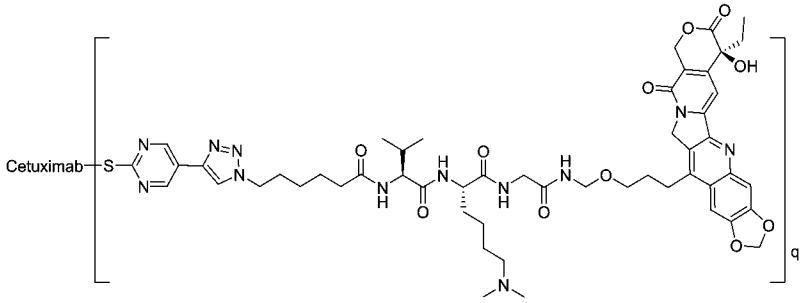
【0887】4.5.1.1 EGFR-ADC-07（DAR8）樣品製備

用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的 2E3-02 抗體，得到 DL-037 與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-07（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。

【0888】4.5.1.2 EGFR-ADC-07（DAR4）樣品製備

用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)製備方法的 2E3-02 抗體，得到 DL-037 與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-07（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 5.0。

【0889】4.5.2 EGFR-ADC-08 的製備



【0890】4.5.2.1 EGFR-ADC-08（DAR8）樣品製備

用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的 2E3-02 抗體，用 DL-028 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-08（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.3。

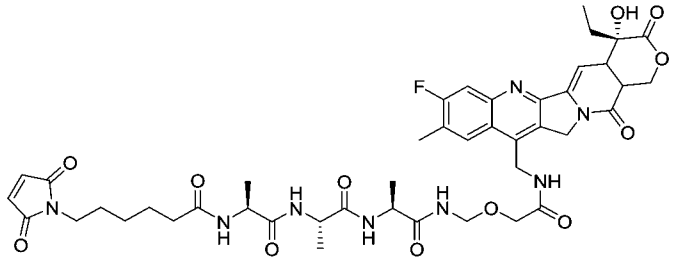
【0891】4.5.2.2 EGFR-ADC-08（DAR4）樣品製備

用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)製備方法的

2E3-02 抗體，用 DL-028 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-08（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 4.3。

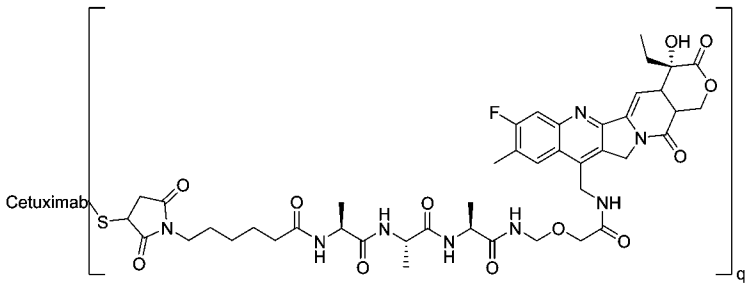
【0892】4.5.3 EGFR-ADC-32（DAR4）樣品製備

參照 WO2020219287 實施例 16 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



WO 2020/219287, Example 22a

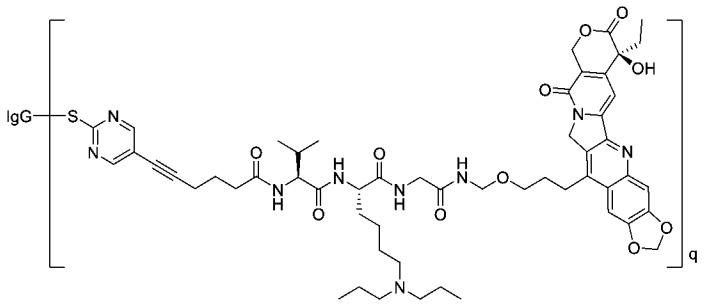
用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)製備方法的 2E3-02 抗體，用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到上述藥物-連接體化合物與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-32（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 4.9。



【0893】4.6： IgG-ADC 的製備

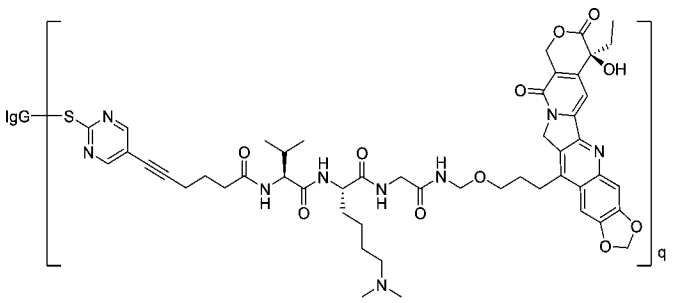
【0894】實施例 4.6.1：IgG1-ADC-07 的製備

用 IgG1 同型抗體（抗雞融菌酶抗體，蘇州宜聯生物醫藥有限公司製備）代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的 2E3-02 抗體，得到 DL-037 與 IgG1 抗體的偶聯產物 IgG1-ADC-07。質譜法測定 DAR 值為 8.0。



【0895】實施例 4.6.2：IgG1-ADC-04 的製備

用 IgG1 同型抗體（抗雞融菌酶抗體，蘇州宜聯生物醫藥有限公司製備）代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的 2E3-02 抗體，用化合物 DL-019 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-019 與 IgG1 抗體的偶聯產物 IgG1-ADC-04。質譜法測定 DAR 值為 7.9。



【0896】五、ADC 的鑒定

【0897】實施例 5.1． SEC-HPLC 測定

通過 SEC-HPLC 監測偶聯反應，對抗體偶聯物的 SEC 檢測。

儀器型號：Agilent 1200

色譜條件：

色譜柱：TSKgel G3000SWXL，7.8×300mm，5μm

流動相：60mmol/L Na_2HPO_4，40mmol/L NaH_2PO_4，200mmol/L NaCl。

柱溫：室溫 樣品室溫度：8℃ 流速：0.8 ml/min

進樣量：200μg 檢測波長：280nm。

樣品處理：用超純水將樣品 B7H3-ADC-07（DAR8）稀釋至 10mg/ml，進

樣體積 20μl。

抗體偶聯前後的 SEC 色譜圖如圖 8 所示，抗體偶聯前後，主峰分子量約為 150kD，可知偶聯產物仍保持抗體的完整結構。

【0898】實施例 5.2．採用質譜法進行偶聯後樣品的 DAR 值測定之一

色譜條件：

色譜柱：PLRP-S，2.1*50mm,5μm；

流動相 A：0.1%FA /H2O; 流動相 B：0.1%FA/ACN

柱溫：30℃ 樣品室溫度：8℃ 流速：0.6 ml/min 進樣量：2μl

時間（min）	1	5	5.1	7	10
流動相 A	90	40	10	90	90
流動相 B	10	60	90	10	10

樣品處理：取 B7H3-ADC-07 樣品 50 μg，加入 1M DTT2μl，加超純水至 50μl 稀釋至約 1.0 mg/ml 濃度，混勻，室溫還原 30min。

LC/MS 型號：Agilent 1290-6545XT Q-TOF

質譜條件：Gas temp：320℃，Drying Gas： Nebulizer ：35 psi；Sheath Gas Temp ：350℃；sheath Gas Flow ：11 l/min；m/z 500~3000。

結果如下所示：

肽鏈		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理論值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
	實測值	23247.41	24265.49	未檢出	未檢出
HC	理論值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
	實測值	未檢出	未檢出	未檢出	53426.64

表中，mAb 表示未偶聯的抗體；LC 代表抗體輕鏈；HC 代表抗體重鏈；DAR1 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 1 個毒素分子的偶聯物；DAR2 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 2 個毒素分子的偶聯物；DAR3 代表包含輕鏈或重鏈偶聯

3 個毒素分子的偶聯物；其中，單抗理論分子量以 G0F 糖型計算。下文中 mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3 如上說明。

測定 2E3-02 抗體輕鏈偶聯 0~1 個毒素分子（LC，DAR1 比例分別為 1.0%，99.0%）、重鏈偶聯 0~3 個毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分別為 0%，0%，0%，100%），由此計算 B7H3-ADC-07（DAR8）的抗體-藥物偶聯比（DAR 值）為 7.98。

【0899】實施例 5.3 採用質譜法進行偶聯後樣品的 DAR 值測定之二

利用 5.2 相同的實驗條件，對樣品 B7H3-ADC-07(DAR2)，B7H3-ADC-07(DAR4)，B7H3- ADC-07(DAR6)進行分子量測定，結果如下：

樣品名稱	肽鏈		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
B7H3-ADC-07(DAR2)	LC	理論值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		實測值	23247	未檢出	未檢出	未檢出
	HC	理論值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		實測值	50372	51389	52408	53426
B7H3-ADC-07(DAR4)	LC	理論值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		實測值	23247	24265	未檢出	未檢出
	HC	理論值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		實測值	50372	51389	52408	53426
B7H3-ADC-07(DAR6)	LC	理論值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		實測值	23247	24265	未檢出	未檢出
	HC	理論值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		實測值	50372	未檢出	52408	53426

並計算 DAR 值結果為：B7H3-ADC-07(DAR2)的 DAR 值為 2.3；B7H3-ADC-07(DAR4)的 DAR 值為 4.1；B7H3-ADC-07(DAR6)的 DAR 值為 5.4。

【0900】實施例 5.4 LC-MS 測定 Trop2-ADC-01 分子量和藥物-抗體比（DAR）

對 Trop2-ADC-01 進行 LCMS 分子量分析。

色譜測定條件：

液相色譜柱：ACQUITU UPLC® Protein BEH C4 1.7μm，2.1mm x 100mm；

流動相A：0.1%FA/98%H_2O/2%ACN；流動相B：0.1%FA/2%H_2O/98%ACN；

流速：0.25 mL/min；樣品室溫度：8 °C；柱溫：60 °C；進樣量：1μg；

時間(分鐘)	1	7	8	9	13
流動相 A (體積%)	90	20	20	90	90
流動相 B (體積%)	10	80	80	10	10

質譜測定條件：

質譜型號：Triple TOF 5600+；

GS1 60；GS2 60；CUR30；TEM600；ISVF5000；DP300；CE10 m/z600-5000。

Trop2-ADC-01 理論分子量及實測分子量

糖型		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	理論值	23334.0	24209.7	25085.4		
	實測值	未檢出	24209.9	未檢出	未檢出	未檢出
HC-G0F	理論值	50734.0	51609.7	52485.4	53361.1	56024.7
	實測值	未檢出	未檢出	52485.3	53361.2	未檢出

表中，mAb 表示單克隆抗體；LC 代表抗體輕鏈；HC 表示抗體重鏈；

DAR1 表示包含一條抗體輕鏈/重鏈和一個細胞生物活性分子的偶聯物；

DAR2 表示包含一條抗體輕鏈/重鏈和兩個細胞生物活性分子的偶聯物；

DAR3 表示包含一條抗體輕鏈/重鏈和三個細胞生物活性分子的偶聯物；

DAR4 表示包含一條抗體輕鏈/重鏈和四個細胞生物活性分子的偶聯物；糖型表示兩條重鏈上的糖鏈結構：G0F 表示岩藻糖化無半乳糖。

抗體與化合物 DL-001 偶聯後，輕重鏈分子量均發生變化，其中輕鏈偶聯 1 個細胞生物活性分子、重鏈偶聯 2.9 個細胞生物活性分子，由此推知整個抗體與細胞生物活性分子的偶聯比（DAR）為 7.8。

【0901】實施例 5.5 LC-MS 測定 Her3-ADC 分子量和藥物-抗體比（DAR）

檢測：對 Her3-ADC-07（DAR8）進行 LC-MS 分子量和 DAR 值分析，條件如下：

色譜條件：

色譜柱：PLRP-S，2.1*50mm,5μm；

流動相 A：0.1%FA /H2O; 流動相 B：0.1%FA/ACN

柱溫：30℃ 樣品室溫度：8℃ 流速：0.6 ml/min 進樣量：2μl

時間（min）	1	5	5.1	7	10
流動相 A	90	40	10	90	90
流動相 B	10	60	90	10	10

樣品處理：分別取樣品 50 μg，加入 1M DTT2μl，加超純水至 50μl 稀釋至約 1.0 mg/ml 濃度，混勻，室溫還原 30min。

LC/MS 型號：Agilent 1290-6545XT Q-TOF

質譜條件：Gas temp：320℃，Drying Gas： Nebulizer ：35 psi；Sheath Gas Temp ：350℃；sheath Gas Flow ：11 l/min；m/z 500~3000。

結果如下所示：

肽鏈		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理論值	23243.8	24261.2	25278.6	26296
	實測值	未檢出	24258	未檢出	未檢出

HC	理論值	50598.6	51616	52633.4	53650.8
	實測值	未檢出	未檢出	未檢出	53646

上表中，mAb 表示未偶聯的單克隆抗體；LC 代表抗體輕鏈；HC 代表抗體重鏈；DAR1 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 1 個毒素分子的偶聯物；DAR2 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 2 個毒素分子的偶聯物；DAR3 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 3 個毒素分子的偶聯物；其中，單抗理論分子量以 G0F 糖型計算。下文中 mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3 如上說明。

檢測結果顯示，Her3-ADC-07（DAR8）上抗體輕鏈偶聯 0~1 個毒素分子（LC，DAR1 比例分別為 0%，100%）、重鏈偶聯 0~3 個毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分別為 0%，0%，0%，100%），由此計算 Her3-ADC-07（DAR8）的藥物抗體偶聯比（DAR 值）為 8.0。

可以理解，本公開的 ADC 都可以通過相同或類似的方法測定分子量和藥物-抗體比（DAR）。

【0902】六、生物活性分子以及抗體藥物偶聯的生物活性測定

【0903】實施例 6.1：生物活性分子對體外細胞活性的抑制活性檢測一

首先培養腫瘤細胞；將本公開的生物活性分子與腫瘤細胞進行共培養，然後添加 CCK8 試劑（東仁化學科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶標儀（廠家：Molecular Devices, 型號：SpectraMax M2）讀數（檢測波長為 450nm），檢測線粒體內的脫氫酶的活性，以評價生物活性分子對細胞增殖的抑制作用。

腫瘤細胞來源見表 5。

表 5.

細胞名稱	腫瘤類型	來源

NCl-H358	人非小細胞肺癌	ATCC，CRL-5807
HT29	人結腸癌細胞	ATCC，HTB-38
LS174T	人結腸腺癌細胞	ATCC，CL-187
NCl-H322M	人非小細胞肺癌	ATCC
PANC-1	人胰腺癌腫瘤細胞	ATCC，CRL-1469
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物

體外細胞活性檢測方法：用對應檢測培養基（含 2% FBS）稀釋生物活性分子（12 個濃度梯度）。使用胰酶通過常規方法對腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸。將稀釋的生物活性分子加入 96 孔板中，再加入細胞。然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 4 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗結果如表 6.1,6.2,6.3,6.4,6.5 所示。

參照 CN104755494B 製備獲得 DXD，具體結構如下，

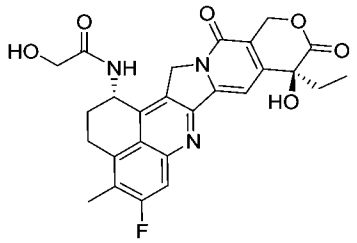


表 6.1：生物活性分子對 NCl-H358 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.10	NCl-H358	8.11
DXD		39.02

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.8D	NCl-H358	7.919
A1.15a		3.882
DXD		21.43

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.4	NCl-H358	29.91
A1.8		296.4
A1.9		60.79
A1.11		202.9

A1.12		167.1
A1.13		49.19
A1.14		122.6
DXD		148.45±10.87 (n=4)

表 6.2：生物活性分子對 HT29 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.10	HT29	5.965
DXD		49.47

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.15a	HT29	3.574
A1.15b		47.52
DXD		64.84

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.4	HT29	29.45
A1.8		367.1
A1.9		57.5
A1.11		284.5
A1.12		211.8
A1.13		96.85
A1.14		155.9
DXD		301.875±69.00 (n=4)

表 6.3：生物活性分子對 LS174T 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.15a	LS174T	19.49
A1.15b		44.62
DXD		82.05

表 6.4：生物活性分子對 NCl-H322M 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.9	NCl-H322M	30.45
DXD		76.89

表 6.5：生物活性分子對 PANC-1 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.9	PANC-1	94.54
DXD		966

表 6.6 生物活性分子對 HCC1806 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.9	HCC1806	1.9
Dxd	(7500 細胞/孔，3 天)	37

測試結果表明，本公開的生物活性分子具有腫瘤細胞殺傷作用。

【0904】實施例 6.2：生物活性分子對體外細胞活性的抑制活性檢測二

首先培養腫瘤細胞 NUCG-4，PC-9，HT29，NCI-H358，KYSE520，A431 和 A549；將本公開的生物活性分子或片段與腫瘤細胞進行共培養，然後添加 CCK8 試劑（東仁化學科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶標儀（廠家：Molecular Devices, 型號：SpectraMax M2）讀數（檢測波長為 450nm），檢測線粒體內的脫氫酶的活性，以評價生物活性分子對細胞增殖的抑制作用。腫瘤細胞來源見表 7。

表 7：腫瘤細胞來源

細胞名稱	腫瘤類型	來源
NUCG-4	胃癌	南京科佰
PC-9	肺腺癌	ATCC
HT29	結腸癌	ATCC，HTB-38
NCI-H358	非小細胞肺癌	ATCC，CRL-5807
KYSE520	食管癌	ATCC
A431	人皮膚鱗狀癌（人表皮癌）細胞	ATCC
A549	非小細胞肺癌	ATCC

體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 5000-10000 細胞/孔加至 96 孔板。用 DMSO 稀釋的生物活性分子，加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 10μM 開始，3 倍稀釋（12 個濃度梯度），37℃ 5%CO_2 培養 3-4 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測

波長為 450nm）。生物活性分子及其檢測結果如表 8 所示。

表 8：A1.9 和 B1.14 的活性測定

細胞	A1.9 EC_{50} nM	B1.14EC_{50} nM	DXD EC_{50} nM
NUCG-4	8.73	184.8	43.32
PC-9	2.06	34.32	16.69
HT29	20.32	367.9	210.5
NCI-H358	46.2	581.2	261.6
A431	5.71	67.97	25.08
A549	65.86	252.3	262.2

測試結果表明，生物活性分子 A1.9 和 B1.14 具有腫瘤細胞殺傷作用，其中 A1.9 在多個腫瘤細胞中均具有強於 Dxd 的腫瘤殺傷作用。A1.9 在 KYSE520 的體外細胞活性的抑制活性檢測中，EC50 為 49.62 nM，具有殺傷 KYSE520 的作用。

【0905】實施例 6.3：生物活性分子對體外細胞活性的抑制活性檢測三

首先培養腫瘤細胞 HT29（來源同上），將本公開的生物活性分子或片段與腫瘤細胞進行共培養，然後添加 CCK8 試劑（東仁化學科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶標儀（廠家：Molecular Devices, 型號：SpectraMax M2）讀數（檢測波長為 450nm），檢測線粒體內的脫氫酶的活性，以評價生物活性分子對細胞增殖的抑制作用。

體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 5000-10000 細胞/孔加至 96 孔板。用 DMSO 稀釋的生物活性分子，加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 10μM 開始，3 倍稀釋（12 個濃度梯度），37℃ 5%CO_2 培養 3-4 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。生物活性分子及其檢測結果如表 9 所示。

表 9：生物活性分子對 HT29 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
B1.9	HT29	262.2
B1.12		85.87
B1.17		204.8
DXD		22.89

測試結果表明，生物活性分子 B1.9、B1.12 和 B1.17 具有腫瘤細胞殺傷作用。

【0906】實施例 6.4：ADC 對體外細胞活性的抑制活性檢測

使用胰酶通過常規方法對 HT29 和 NCI-H358 腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 150μg/ml 起始，3 倍稀釋（12 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 7 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。ADC 及其檢測結果如表 10,表 11 所示。

表 10：部分 ADC 的活性測定

ADC	HT29 (EC_{50}, ng/mL)	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
B7H3-ADC-07(DAR8)	23555	21131
B7H3-ADC-05(DAR8)	33135	33490
B7H3-ADC-04(DAR8)	28793	28493
B7H3-ADC-22(DAR8)	24418	20825
B7H3-ADC-12(DAR8)	5032	4068
B7H3-ADC-27(DAR8)	28510	29155
B7H3-ADC-08(DAR8)	31669	34149
B7H3-ADC-23(DAR8)	21074	19578
B7H3-ADC-20(DAR8)	1348	1325
B7H3-ADC-09(DAR8)	22479	20751
2E3-02 抗體	弱	弱
B7H3-ADC-32(DAR8)	32472	30903

測試結果表明，本公開的 ADC 分子具有腫瘤細胞殺傷作用，其中大部分

ADC 具有強於 B7H3-ADC-32(DAR8)的腫瘤細胞殺傷作用。

表 11：部分 ADC 的活性測定

ADC	HT29 (EC_{50}, ng/mL)	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
B7H3-ADC-33(DAR8)	18380	20354
B7H3-ADC-15(DAR8)	1181	1015

測試結果表明，本公開的 ADC 分子具有腫瘤細胞殺傷作用，其中 B7H3-ADC-15(DAR8)具有強於 B7H3-ADC-33(DAR8)的腫瘤細胞殺傷作用。

同時對本公開的 ADC 分子 B7H3-ADC-07(DAR8)在 B7H3 陰性細胞 Calu-3 上測試，結果顯示殺傷效果弱（IC50>10^7ng/ml）,說明體外在 B7H3 陽性與陰性腫瘤細胞間，本公開的 ADC 分子具有很好的選擇靶向性殺傷。

【0907】實施例 6.5：檢測多種靶點抗體藥物偶聯物對多種腫瘤細胞的體外抑制活性

【0908】A．B7H3 ADC 的多種腫瘤抑制活性測定

ADC 樣品：根據實施例製備獲得 ADC 樣品

體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對多種腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC(見表 12)加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 150μg/ml 起始，3 倍稀釋（11 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 7 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗細胞和檢測結果如表 12 所示。

表：12

細胞	B7H3-ADC-07(DAR8)	B7H3-ADC-21(DAR8)
PC-9(EC50, ng/mL)	3618	2377
HT29(EC50, ng/mL)	10433	7442
KYSE520(EC50,ng/mL)	5845	2842

NCI-H358(EC50,ng/mL)	15800	8060
NUCG-4(EC50,ng/mL)	4855	4158
A431(EC50, ng/mL)	7624	2478

測試結果表明，表 12.ADC 具有多種腫瘤細胞殺傷作用。

【0909】B．Her3 ADC 的多種腫瘤抑制活性測定

ADC 樣品：根據實施例製備獲得 ADC 樣品 Her3-ADC-07（DAR8）

體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對 PC-9 和 NCI-H358 腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 150μg/ml 起始，3 倍稀釋（11 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 7 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗細胞和檢測結果如表 13 所示。

表 13.

細胞	Her3-ADC-07（DAR8）
PC-9(EC_{50}, nM/L)	49.26
NCI-H358(EC_{50}, nM/L)	183.3

測試結果表明，Her3-ADC-07（DAR8）具有腫瘤細胞殺傷作用。

【0910】C.EGFR ADC 的腫瘤抑制活性測定

使用胰酶通過常規方法對 KYSE520 腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC（如表 14）加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 50μg/ml 起始，3 倍稀釋（11 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 5 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 1-4 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗細胞和檢測結果如表 14 所示。

表 14.

檢測組編號	ADC 樣品	KYSE520 (EC_{50}, ng/mL)
1	EGFR-ADC-07(DAR8)	11.56
	EGFR-ADC-07(DAR4)	18.17
	EGFR-ADC-32(DAR4)	29.21
2	Her3-ADC-05(DAR4)	19.01
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	32.94

測試結果表明，EGFR- ADC-07、Her3- ADC-05 和 Her3- C3-ADC-05 都具有很強的腫瘤細胞殺傷作用。

【0911】綜合以上測試結果表明，本申請公開多種靶點（如 B7H3,Her3,EGFR）的 ADC 對多種腫瘤細胞均具有殺傷作用。

【0912】D．Trop-2 抗體藥物偶聯物對體外細胞活性的抑制作用

首先培養腫瘤細胞 HCC1806（Trop-2 陽性細胞系）和 NCI-H23（Trop-2 陰性細胞系）；將本公開的生物活性分子及 ADC 分子與腫瘤細胞進行共培養，然後添加 CCK8 試劑（東仁化學科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶標儀（廠家：Molecular Devices, 型號：SpectraMax M2）讀數（檢測波長為 450nm），檢測線粒體內的脫氫酶的活性，以評價 ADC 對細胞增殖的抑制作用。腫瘤細胞來源見表 15。

表 15.

細胞名稱	腫瘤類型	來源
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物
NCI-H23	非小細胞肺癌	康諾泰

體外細胞活性檢測：用對應檢測培養基（含 2% FBS）稀釋生物活性分子或 ADC（12 個濃度梯度）。使用胰酶通過常規方法對腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸。將稀釋的生物活性分子或 ADC 加入 96 孔板中，再加入細胞。然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 4 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗條件和檢

測結果如表 16 所示。

表 16：偶聯物對 Trop-2 陽性、陰性細胞系殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
Trop2-ADC-01（DAR8）	HCC1806 (7500 細胞/孔，3 天)	2.1
	NCI-H23 (10000 細胞/孔，3 天)	10000
Trop2-ADC-05（DAR8）	HCC1806 (7500 細胞/孔，3 天)	3.4
	NCI-H23 (10000 細胞/孔，3 天)	10000

測試結果表明，本公開的 ADC 分子具有腫瘤細胞殺傷作用。同時在 Trop-2 陽性與陰性細胞間，具有很好的靶向性。

【0913】實施例 6.6：不同 DAR 值得抗體藥物偶聯物對體外細胞活性的抑制作用

ADC 樣品：根據實施例製備獲得 ADC 樣品，體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對 NCI-H358 腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 150μg/ml 起始，3 倍稀釋（11 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 7 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。各組樣品和檢測結果如表 17 所示。

表 17.

檢測組編號	ADC 樣品	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
1	B7H3-ADC-07(DAR4)	30428
	B7H3-C1-ADC-07(DAR4)	22174
	B7H3-C1-ADC-21(DAR4)	31057
2	Her3-ADC-05(DAR4)	47742
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	65109

	Her3-C3-ADC-21(DAR4)	76365
3	B7H3-ADC-07(DAR6)	27858
	B7H3-ADC-21(DAR6)	20629
4	B7H3-ADC-08(DAR4)	83363
	B7H3-C1-ADC-08(DAR4)	101649
5	Her3-ADC-23(DAR4)	49330
	Her3-C3-ADC-23(DAR4)	弱
6	Her3-ADC-15(DAR2)	5572
	Her3-ADC-15(DAR8)	2562
	Her3-ADC-33(DAR4)	50774
7	B7H3-ADC-15(DAR4)	2931
	B7H3-ADC-33(DAR4)	42071
	2E3-02 抗體	弱

本實例以及實例 6.5 C 測試結果表明，本申請公開的多種 DAR 值（如 4,6,8）的 ADC 對腫瘤細胞均具有殺傷作用。

【0914】實施例 6.7：B7H3 抗體藥物偶聯物體內活性測試

【0915】6.7.1 B7H3 抗體藥物偶聯物對 NCI-HT29 移植瘤藥效測試之一

【0916】1. 實驗材料

受試化合物：B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)、B7H3-ADC-08(DAR8)、B7H3-ADC-05(DAR8)、B7H3-ADC-06(DAR8)、B7H3-ADC-17(DAR8)、B7H3-ADC-18(DAR8)、B7H3-ADC-19(DAR8)、IgG1-ADC-04(DAR8)。

實驗細胞：NCI-HT29 細胞，購自 ATCC；

實驗動物：Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周齡，購自維通利華實驗動物有限公司。

【0917】2. 實驗方案

2.1. 細胞處理

NCI-HT29 細胞用含 10 %FBS 的 1640 培養基培養於 15 cm 直徑培養皿，達 80-90 %左右融合度時用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗兩次，然後離心重懸於預冷 PBS 中，細胞計數儀計數，PBS 稀釋使細胞濃度為 5×10^7/ml。

2.2. 腫瘤細胞移植

Balb/c nu 小鼠實驗室環境適應 2-5 天，於右肋部皮下接種 NCI-HT29 細胞，接種細胞量為 5×10^6/只，接種體積為 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待腫瘤生長至 250 mm^3 左右時，進行實驗。

2.3. 動物給藥與檢測

入組的荷瘤裸鼠，按以下方案給藥：

表 18

No.	組別	動物數量	給藥劑量	給藥途徑和週期
1	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
2	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
3	B7H3-ADC-08(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
4	B7H3-ADC-05(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
5	B7H3-ADC-06(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
6	B7H3-ADC-17(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
7	B7H3-ADC-18(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
8	B7H3-ADC-19(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
9	IgG1-ADC-04(DAR8) (對照組)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3

給藥週期結束後，繼續觀察 1-2 周。最後一次瘤體積測量後，分離腫瘤，準確稱取腫瘤重量並拍照記錄。

2.4. 腫瘤體積及體重測定：

每週測量 2 次瘤體積及體重，計算 TGI%和抑瘤率（TGI）（%），計算公式為：相對腫瘤增殖率 T/C(%)= TRTV / CRTV × 100%（TRTV：治療組平均 RTV ；CRTV：對照組平均 RTV；RTV=Vt/V0，V0 為分組時該動物的瘤體

積，Vt 為治療後該動物的瘤體積）；相對腫瘤抑制率 TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）。

腫瘤體積（V）計算公式為：V＝1/2×L 長×L 短 ^{2}, 其中 L 長、L 短分別表示腫瘤長徑、短徑。

【0918】3. 實驗結果

具體結果見表 19 和附圖 9，本申請 ADC 均顯示了對腫瘤生長的抑制作用，特別是 B7H3-ADC-05, B7H3-ADC-06、B7H3-ADC-07, B7H3-ADC-08 和 B7H3-ADC-17 具有很強的抑制腫瘤的效果，B7H3-ADC-18, B7H3-ADC-19 和 B7H3-ADC-21 的抑制腫瘤的效果接近。給藥期間，各組動物無明顯體重下降和明顯的藥物毒性。

表 19：NCI-HT29 移植瘤模型資料

	腫瘤體積 mm3						T/C（%）	TGI（%）
樣品	給藥 Day1	給藥 Day4	給藥 Day8	給藥 Day11	給藥 Day15	給藥 Day18		
IgG1-ADC-04(DAR8)	244.4	381.0	543.6	1061.2	1285.6	1821.8	-	-
B7H3-ADC-21(DAR8)	244.4	335.4	414.4	781.4	862.2	1233.4	62.70	37.30

B7H3-ADC-08(DAR8)	244.4	268.6	243	418.4	456.6	555.4	19.72	80.28
B7H3-ADC-05(DAR8)	244.4	286.2	221.8	479.6	574	745.2	31.75	68.25
B7H3-ADC-06(DAR8)	245.8	293.6	302.8	482.6	592.2	669	26.83	73.17
B7H3-ADC-07(DAR8)	243.6	276	253.2	414.8	461.8	576.4	21.10	78.90
B7H3-ADC-17(DAR8)	245.4	250.2	304.2	559.2	741	970	45.94	54.06
B7H3-ADC-18(DAR8)	245.2	302.2	413.4	741.4	958.8	1218.6	61.71	38.29
B7H3-ADC-19(DAR8)	245.2	318.6	441.4	784.6	1003.6	1244.6	63.36	36.64

【0919】6.7.2 B7H3 抗體藥物偶聯物對 NCI-HT29 移植瘤藥效測試之二

利用 5.3.1 相同的方法測定 B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-08(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)的移植瘤藥效，具體的分組和給藥方案如表 20 所示，

表 20：給藥方案

組號	組別	動物	給藥劑	給藥方	給藥頻次	給藥體

		數量	量	式		積
1	生理鹽水	5	-	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
2	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	10 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
3	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
4	B7H3-ADC-08(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
5	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	10 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
6	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg

獲得結果如表 21 所示，和附圖 10。

表 21：NCI-HT29 移植瘤模型資料

分組	平均腫瘤體積（mm^3）D1	平均腫瘤體積（mm^3）D18	T/C（%）D18	抑瘤率 TGI（%）D18
生理鹽水	232.2±35.1	1281.8±170.0	-	-
B7H3-ADC-21(DAR8) 10 mg/kg	231.8±49.6	679.2±141.7***	53.1	46.92
B7H3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg	232.2±41.4	1081.6±209.7	84.4	15.62
B7H3-ADC-08(DAR8) 3 mg/kg	232.6±37.5	675.8±190.0***	52.6	47.37
B7H3-ADC-07 (DAR8)10 mg/kg	231.6±45.9	363.8±162.4***	28.5	71.54
B7H3-ADC-07 (DAR8)3 mg/kg	231.8±65.0	579.2±281.8***	45.3	54.74

D1：首次給藥的第一天； *P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001。

腫瘤體積結果顯示，至試驗結束時（D18），B7H3-ADC-21 10 mg/kg 組，B7H3-ADC-08 3 mg/kg 組，B7H3-ADC-07 10 mg/kg、3 mg/kg 組動物腫瘤

體積顯著低於 Vehicle 對照組（P<0.001），抑瘤率分別為 46.92%，47.37%，71.54%，54.74%；B7H3-ADC-21 3 mg/kg 組腫瘤體積與 Vehicle 組相比未見統計學差異。體重結果顯示，至給藥結束時（D18），所有受試劑量組給藥期間體重均增加，顯示各劑量組均耐受良好。

【0920】6.7.3 B7H3 抗體藥物偶聯物對 NCI-H358 移植瘤藥效測試

【0921】1. 研究目的

評價受試藥物在人非小細胞肺癌 NCI-H358 皮下異種移植雌性 Balb/c Nude 小鼠模型中的抗腫瘤作用。

【0922】2. 受試物信息

B7H3-ADC-21(DAR8) 、 B7H3-ADC-05(DAR8) 、 B7H3-ADC-07(DAR8) 、 B7H3-ADC-09(DAR8)、B7H3-ADC-10(DAR8)，B7H3-ADC-20(DAR8)。

【0923】3. 試驗內容

參照本實施例 6.7.1 進行細胞處理 NCl-H358（ATCC，CRL-5807）和腫瘤細胞移植。

3.1 給藥及分組

每組的動物數及詳細的給藥途徑、劑量和方案見下表 22：

表 22：給藥方案

No.	給藥組	動物數量	給藥劑量(mg/kg)	給藥途徑和週期
1	生理鹽水	5	3	i.v., QW×3
2	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
3	B7H3-ADC-05(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
4	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
5	B7H3-ADC-09(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
6	B7H3-ADC-10(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
7	B7H3-ADC-20(DAR8)	5	3	i.v., QW×3

8	B7H3-ADC-20(DAR8)	5	1	i.v., QW×3

3.2 檢測指標

腫瘤體積及體重測定，每週測量 2 次瘤體積（mm^3）及體重，計算相對腫瘤增殖率 T/C(%)和相對腫瘤抑制率 TGI(%)。

腫瘤體積（V）計算公式為：V＝1/2×L 長×L 短 ^{2}；

相對腫瘤增殖率 T/C(%)= TRTV / CRTV × 100%（TRTV：治療組平均 RTV ；CRTV：對照組平均 RTV；RTV=Vt/V0，V0 為分組時該動物的瘤體積，Vt 為治療後該動物的瘤體積）；

相對腫瘤抑制率 TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）。

3.3 試驗終點

確定給藥期結束後，繼續觀察 1-2 周，隨後解剖取瘤，稱重並拍照。

【0924】4. 實驗結果

具體結果見表 23 和附圖 11,本申請 ADC 均顯示了對腫瘤生長的抑制作用，並且 ADC-20 的 3mg/kg 劑量優於 1mg/kg 劑量的抑制腫瘤效果。給藥期間，各組動物無明顯體重下降和明顯的藥物毒性。

表 23：NCI-H358 移植瘤模型資料（腫瘤體積 mm^3）

給藥後天數 / 組別	1	3	7	10	14	17	21
生理鹽水	234	256	262	294	378	434	604
B7H3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg	234	224	182	176	164	128	126
B7H3-ADC-05 (DAR8)3 mg/kg	233	249	180	130	110	94	87
B7H3-ADC-07 (DAR8)3 mg/kg	234	225	173	120	118	95	95
B7H3-ADC-09(DAR8) 3 mg/kg	233	180	177	139	114	103	97
B7H3-ADC-10(DAR8) 3 mg/kg	233	211	232	197	154	144	125
B7H3-ADC-20(DAR8) 3 mg/kg	233	191	184	172	170	162	202
B7H3-ADC-20(DAR8) 1 mg/kg	234	230	231	238	256	308	411

【0925】6.7.4 B7H3 抗體藥物偶聯物在前列腺癌皮下異種移植 PDX 模型中的藥效測試

【0926】1. 研究目的

測試 B7H3 抗體藥物偶聯物在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 皮下異種移植 NPG 雄鼠模型中的藥效

【0927】2. 受試物

B7H3-ADC-07(DAR8)、IgG1-ADC-07（DAR8）

【0928】3. 試驗內容

3.1 實驗小鼠資訊

NPG PR9586 模型的小鼠，周齡 6-9 周（腫瘤細胞接種時的小鼠預計周齡），雄性，共 100 只小鼠，購自北京維通達生物技術有限公司。

3.2 構建荷瘤小鼠模型

從 HuPrime®前列腺癌 PR9586(種族為 Western)荷瘤小鼠收取腫瘤組織，切成直徑為 2-3mm 的瘤塊接種於 NPG 右前肩胛處皮下。

當荷瘤鼠平均腫瘤體積到達約 100-200 （~150）mm^3 時，將小鼠按照“3.3 分組及給藥”表格進行隨機分組。各組內的腫瘤體積的變異係數(CV) 用公式 CV= SD/MTV×100%計算，應小於 40%。分組當天定義為第 1 天。

3.3. 分組及給藥

每組的動物數及詳細的給藥途徑、劑量和方案見下表 24。

表 24：實驗動物分組

組別	動物數	給藥組	劑量(mg/kg)	給藥方式	給藥週期

1	8	Vehicle（生理鹽水）	/	*i.v.*	QW×3weeks
2	8	IgG1-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks
3	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	1	*i.v.*	QW×3weeks
4	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	3	*i.v.*	QW×3weeks
5	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks

注：1. 給藥體積為 10 μL/g；2. 分組當天定義為第一天(day 1)，給藥在 day 1，day8 和 day15；3. 給藥時注意避光； 4. 分組當天取一隻分剩小鼠腫瘤進行 FACS 檢測分析腫瘤細胞表面抗原表達情況，流式結果表明 B7H3 在 PR9586 模型中有明顯表達。

3.4 實驗觀察和資料收集

腫瘤細胞接種後，常規監測包括了腫瘤生長及治療對動物正常行為的影響，具體內容有實驗動物的活動性，攝食和飲水情況，體重增加或降低情況，眼睛、被毛及其它異常情況。試驗過程中觀察到的臨床症狀均記錄在原始資料中。開始給藥後，每週測量兩次小鼠的體重和腫瘤的大小。腫瘤體積計算公式：腫瘤體積（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示長徑，b 表示短徑）。實驗中使用 StudyDirector™（版本號 3.1.399.19，供應商 Studylog System, Inc.）軟體收集資料，包括腫瘤的長短徑的測量和動物體重的稱量，原始資料由天平和遊標卡尺測量後直接導入軟體，資料的任何變動都將被記錄在此軟體中。

給藥、腫瘤測量及體重稱量等全部過程都在生物安全櫃或超淨工作臺中進行。

3.5 資料分析

本實驗的主要觀察指標為：

相對腫瘤增殖率，T/C(%)，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。計算公式為：

T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%（T_{RTV}：治療組平均 RTV ；C_{RTV}：對照組平均 RTV；RTV=V_t/V_0，V_0 為分組時該動物的瘤體積，V_t 為治療後該動物的瘤體積）；

或 T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%（T_{TW}：治療組實驗終結時平均瘤重；C_{TW}：對照組實驗終結時平均瘤重）。

【0929】相對腫瘤抑制率，TGI(%)，計算公式為：

TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））

【0930】4. 實驗結果

B7H3-ADC-07（DAR8）和IgG1-ADC-07（DAR8）在PR9586模型上的藥效結果如圖12，表25和表26所示：

表 25：在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 模型中各組腫瘤體積分析表

實驗組	分組後第 22 天			
	腫瘤體積（$\bar{x}$ ±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值
第 1 組 Vehicle	874.80 ± 135.11(8)	--	--	--

第 2 組 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	129.30 ± 49.16(8)	85.73	14.27	< 0.001
第 3 組 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	135.42 ± 39.36(8)	84.00	16.00	0.009
第 4 組 B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	92.61 ± 36.73(8)	88.96	11.04	< 0.001
第 5 組 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	104.38 ± 33.65(8)	87.7	12.30	< 0.001

注：1. 資料以“平均值 ± 標準誤差”表示；2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%；TGI% =（1-T/C）× 100%；

表 26：在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 模型中各組瘤重分析表

實驗組	瘤重 (mg)（$\bar{x}$ ±s） 分組後第 22 天	TGI（%）	T/C (%)	P 值
第 1 組 Vehicle	473.29 ± 91.75(8)			
第 2 組 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	52.96 ± 22.85(8)	88.81	11.19	0.002
第 3 組 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	52.64 ± 19.72(8)	88.88	11.12	0.006
第 4 組 B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	27.90 ± 14.59(8)	94.11	5.89	<0.001

第 5 組 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	46.40 ± 24.35(8)	90.20	9.80	0.001

注：1. 資料以“平均值 ± 標準誤差”表示；2. T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%; TGI% =（1-T/C）× 100%；

【0931】5. 結論

在PR9586模型中，腫瘤體積測量結果顯示，試驗結束時（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg和10 mg/kg組動物腫瘤體積均顯著（p<0.001）低於Vehicle（生理鹽水）組，B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg劑量組腫瘤體積抑瘤率（TGI）分別為84.00%，88.96%，88.7%。動物體重測量結果顯示，試驗結束時（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8）各劑量組給藥期間動物體重均增加與對照組無明顯差異，顯示動物對B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg劑量均耐受良好。腫瘤重量測量結果顯示，試驗結束時（Day22）B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg組與Vehicle組相比，動物平均腫瘤重量顯著降低，具有統計學意義（P < 0.001），B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、 3 mg/kg、10 mg/kg組的腫瘤重量TGI為88.88%、94.11%（P<0.001）和90.20%。無論按照腫瘤體積或者腫瘤重量，IgG1-ADC-07（DAR8）組都具有很好的腫瘤抑制效果，TGI分別為85.7% 和88.8%。結果表明本公開提供的抗體藥物偶聯物及其藥物連接物（毒素-linker）即不需要抗體的細胞內吞、也不需要腫瘤細胞表明抗原陽性表達既可以實現抗腫瘤效果。同時實驗各組體重與對照組體重無明顯區別，本公開的抗體藥物偶聯物具有良好的安全性。

【0932】6.7.5 B7H3抗體藥物偶聯物在食管鱗癌皮下異種移植PDX模型中

的藥效學評價

【0933】1. 研究目的

測試 B7H3-ADC-07（DAR8）和 IgG1-ADC-07（DAR8）在食管鱗癌 ES0204 皮下異種移植 BALB/c 雌性裸鼠模型中的藥效。

【0934】2. 受試物

B7H3-ADC-07（DAR8）、IgG1-ADC-07（DAR8）

【0935】3. 試驗內容

3.1 實驗小鼠資訊

BALB/c nude for ES0204 模型小鼠，6-9 周（腫瘤細胞接種時的小鼠預計周齡），雌性，共 100 只小鼠（40 只加上 150%富餘），購自江蘇集萃藥康生物科技有限公司。

3.2 構建荷瘤小鼠模型

從食管鱗癌 ES0204（亞型為 ECC，種族為 Asian）荷瘤小鼠收取腫瘤組織，切成直徑為 2-3mm 的瘤塊接種於 Balb/c 裸小鼠右前肩胛處皮下。

當荷瘤鼠平均腫瘤體積到達約 100-200 （~150）mm^3 時，將小鼠按照“3.3 分組及給藥”表格進行隨機分組。各組內的腫瘤體積的變異係數(CV) 用公式 CV= SD/MTV×100%計算，應小於 40%。分組當天定義為第 1 天。

3.3. 分組及給藥

每組的動物數及詳細的給藥途徑、劑量和方案見下表 27。

表 27：實驗動物分組

組別	動物數	給藥組	劑量(mg/kg)	給藥方式	給藥週期

1	8	Vehicle（生理鹽水）	/	*i.v.*	QW×3weeks
2	8	IgG1-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks
3	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	1	*i.v.*	QW×3weeks
4	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	3	*i.v.*	QW×3weeks
5	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks

注： 1. 給藥體積為 10 μL/g； 2. 分組當天定義為第一天(day 1)，給藥在 day 1，day8 和 day15； 3. 給藥時注意避光； 4. 分組當天取一隻分剩小鼠腫瘤進行 FACS 檢測分析腫瘤細胞表面抗原表達情況, 流式結果表明 B7H3 在 ES0204 模型中有明顯表達

3.4 實驗觀察和資料收集

腫瘤細胞接種後，常規監測包括了腫瘤生長及治療對動物正常行為的影響，具體內容有實驗動物的活動性，攝食和飲水情況，體重增加或降低情況，眼睛、被毛及其它異常情況。試驗過程中觀察到的臨床症狀均記錄在原始資料中。開始給藥後，每週測量兩次小鼠的體重和腫瘤的大小。腫瘤體積計算公式：腫瘤體積（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示長徑，b 表示短徑）。實驗中使用 StudyDirector™（版本號 3.1.399.19，供應商 Studylog System, Inc.）軟體收集資料，包括腫瘤的長短徑的測量和動物體重的稱量，原始資料由天平和遊標卡尺測量後直接導入軟體，資料的任何變動都將被記錄在此軟體中。

給藥、腫瘤測量及體重稱量等全部過程都在生物安全櫃或超淨工作臺中進行。

3.5 資料分析

本實驗的主要觀察指標為：

相對腫瘤增殖率，T/C(%)，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。計算公式為：

T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%（T_{RTV}：治療組平均 RTV ；C_{RTV}：對照組平均 RTV；RTV=V_t/V_0，V_0 為分組時該動物的瘤體積，V_t 為治療後該動物的瘤體積）；

或 T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%（T_{TW}：治療組實驗終結時平均瘤重；C_{TW}：對照組實驗終結時平均瘤重）。

相對腫瘤抑制率，TGI(%)，計算公式為：

TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））

【0936】4. 實驗結果

B7H3-ADC-07（DAR8）和 IgG1-ADC-07（DAR8）在 ES0204 模型上的藥效結果如圖 13，表 28 和表 29 所示：

表 28：在 HuPrime®食管鱗癌 ES0204 模型中各組腫瘤體積分析表

實驗組	分組後第 22 天			
	腫瘤體積（$\bar{x}$±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值
第 1 組 Vehicle	959.89 ± 146.45(8)	-	-	-

第 2 組 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	182.05 ± 66.12(8)	81.28	18.72	< 0.001
第 3 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg	277.49 ± 115.05(8)	75.71	24.29	< 0.001
第 4 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	< 0.001
第 5 組 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	< 0.001

注：1. 資料以“平均值 ± 標準誤差”表示；2.T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%；

TGI% =（1-T/C）× 100%；

表 29：在 HuPrime®食管鱗癌 ES0204 模型中各組瘤重分析表

實驗組	瘤重 (mg)（$\bar{x}$ ±s） 分組後第 22 天	TGI	T/C (%)	P 值 （相較於對照組）
第 1 組 Vehicle	794.41 ± 143.85(8)	--	--	--
第 2 組 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	38.14 ± 13.37(8)	95.20	4.80	<0.001
第 3 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg	193.65 ± 90.66(8)	75.62	24.38	<0.001
第 4 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 3	0.00 ± 0.00(8)	100.0	0.00	<0.00

mg/kg		0		1
第 5 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 10 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001

注：1. 資料以“平均值 ± 標準誤差”表示；2. T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%; TGI% =（1-T/C）× 100%；

【0937】5. 結論

在 ES0204 模型中，腫瘤體積測量結果顯示，試驗結束時（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg、3 mg/kg 和 10 mg/kg 組動物腫瘤體積均顯著低於 Vehicle（生理鹽水）組（P < 0.001），B7H3-ADC-07（DAR8）1mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 劑量組腫瘤體積抑瘤率（TGI）分別為 75.71%，100.00%，100.00%，與劑量呈正相關。動物體重測量結果顯示，試驗結束時（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8）各劑量組給藥期間動物體重均增加與對照組無明顯差異，顯示動物對 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 劑量均耐受良好。腫瘤重量測量結果顯示，試驗結束時（Day22） B7H3-ADC-07（DAR8）1mg/kg、3mg/kg、10 mg/kg 組與 Vehicle 組相比，動物平均腫瘤重量均顯著降低，具有統計學意義（P < 0.001），腫瘤重量 TGI 為 75.62%，100.00%和 100.00%； IgG1-ADC-07（DAR8）組同樣具有很好的腫瘤抑制效果，TGI 分別為 81.3%（腫瘤體積）和 95.2%（腫瘤重量）。結果表明本公開提供的抗體藥物偶聯物及其的藥物連接物（毒素-linker）即不需要抗體的細胞內吞、也不需要腫瘤細胞表明抗原陽性表達既可以實現抗腫瘤效果。同時實驗各組體重與對照組體重無明顯區別，本公開的抗體藥物偶聯物具有良好的安全性。

【0938】實施例 6.8：Her3 抗體藥物偶聯物和 IgG1-ADC 體內活性測試

【0939】6.8.1 Her3 抗體藥物偶聯物對 NCI-H358 移植瘤藥效測試

本公開通過評價抗 Her3 抗體 ADC 藥物對 Balb/c Nude 小鼠皮下人非小細胞肺癌細胞株 NCI-H358 細胞（ATCC 來源，Her3 表達陽性率在 10%左右）移植瘤模型的抗腫瘤作用來展示體內藥效。

具體步驟如下： Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周齡，購自維通利華實驗動物有限公司。NCI-H358 細胞用含 10 %FBS 的 1640 培養基培養於 15 cm 直徑培養皿，達 80-90 %左右融合度時用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗兩次，然後離心重懸於預冷 PBS 中，細胞計數儀計數，PBS 稀釋使細胞濃度為 5×10^7/ml。Balb/c nu 小鼠實驗室環境適應 7 天，於右肋部皮下接種 NCI-H358 細胞，接種細胞量為 5×10^6/只，接種體積為 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待腫瘤生長至 300mm^3 左右時，根據腫瘤大小隨機分組，每組 5 只，分別為：抗雞溶菌酶人 IgG1 同型抗體（陰性對照，蘇州宜聯生物製備）組、IgG1-ADC-07（DAR8）、Her3-C3-ADC-21（DAR4），Her3-ADC-21（DAR4）以及 Her3-ADC-07（DAR8）劑量組。所有樣品均為尾靜脈注射，每週 1 次，共給藥 3 周。給藥後觀察並定期測量小鼠腫瘤體積及體重。相對腫瘤增殖率，T/C(%)，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。相對腫瘤抑制率，TGI(%)，計算公式為：TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））。

結果見表 30 及圖 14。

表 30：Her3-ADC-07 對人非小細胞肺癌 NCI-H358 裸小鼠皮下移植瘤的療

效

分組	平均腫瘤體積（mm^3）	平均腫瘤體積（mm^3）	T/C（%）	抑瘤率 TGI（%）	*P* 值（D29）
	D1	D29	D29	D29	
IgG1 5mg/kg	309.0±72.0	1425.0±241.2	-	-	-
IgG1-ADC-07（DAR8）5mg/kg	309.4±53.4	725.2±415.1	50.83	49.17	0.203
Her3-C3-ADC-21（DAR4）1 mg/kg	308.8±67.7	1080.8±741.8	75.89	24.11	0.996
Her3-ADC-21（DAR4）5 mg/kg	309.6±60.6	346.4±123.8**	24.26	75.74	0.002
Her3-ADC-21（DAR4）1 mg/kg	309.6±58.6	1000.6±184.1	70.08	29.92	0.214
Her3-ADC-07（DAR8）5mg/kg	309.4±43.4	205.4±56.7**	14.40	85.60	0.003
Her3-ADC-07（DAR8）1mg/kg	309.6±47.1	339.0±95.8**	23.74	76.26	0.003

由實驗結果可知，和 IgG1 組相比，5mg/kg 和 1mg/kg 劑量 Her3-ADC-07（DAR8）對 NCI-H358 人非小細胞肺癌移植瘤模型的腫瘤生長有顯著抑制作用，並且呈現劑量梯度趨勢。Her3-ADC-07 1mg/kg 組 TGI 為 76.26%，略強於 Her3-ADC-21 5mg/kg 劑量組的 TGI 75.74%。Her3-ADC-21 1mg/kg 組 TGI 為 29.92%，略強於 Her3-C3-ADC-21 1mg/kg 劑量組的 TGI 24.11%。

令人驚奇的是，和 IgG1 組相比，IgG1-ADC-07 也具有明顯的抑制腫瘤作用，說明得到的本公開偶聯物（ADC）通過在連接體實現提高了整個

ADC（無論是否具有抗原結合活性或內吞活性）在腫瘤環境中的暴露量，具有更好的腫瘤組織靶向性，從而具有更好的抑制腫瘤（無論是否表達相應抗原）效果。

另外，動物體重結果顯示，整個給藥期以及恢復期間，各給藥組動物耐受良好。

【0940】6.8.2. Her3 抗體藥物偶聯物對 SW480 移植瘤藥效測試之一

本公開通過評價抗 Her3 抗體 ADC 藥物對 Balb/c Nude 小鼠皮下人結腸癌細胞株 SW480 細胞（ATCC 來源，Her3 表達陽性率在 30%左右）移植瘤模型的抗腫瘤作用來展示體內藥效。具體步驟如下： 36 只 Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周齡，購自維通利華實驗動物有限公司。SW480 細胞用含 10 %FBS 的 1640 培養基培養於 15 cm 直徑培養皿，達 80-90 %左右融合度時用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗兩次，然後離心重懸於預冷 PBS 中，細胞計數儀計數，PBS 稀釋使細胞濃度為 5×10^7/ml。Balb/c nu 小鼠實驗室環境適應 7 天，於右肋部皮下接種 SW480 細胞，接種細胞量為 5×10^6/只，接種體積為 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待腫瘤生長至 250mm3 左右時，根據腫瘤大小隨機分組，每組 5 只，分別為抗雞溶菌酶人 IgG1 同型抗體（陰性對照，蘇州宜聯生物）組、IgG1-ADC-07、以及 Her3-ADC-07 劑量組。所有樣品均為尾靜脈注射，每週 1 次，共給藥 3 周。給藥後觀察並定期測量小鼠腫瘤體積及體重。

1) 相對腫瘤增殖率，T/C(%)，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。

2) 相對腫瘤抑制率，TGI(%)，計算公式為：TGI% =（1-T/C）× 100%（T

和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））。

具體結果見表 32 及圖 15。由實驗結果可知，10mg/kg 和 3mg/kg 劑量 Her3-ADC-07 對 SW480 人結直腸癌移植瘤模型的腫瘤生長有顯著一定抑制作用，並且呈現劑量梯度趨勢。

表 31：SW480+ Balb/c Nude 小鼠模型藥效結果

分組	平均腫瘤體積（mm^3）	平均腫瘤體積（mm^3）	T/C（%）	抑瘤率 TGI（%）	*P* 值 (D18)
	D1	D18	D18	D18	
Ig-G1 10 mg/kg	269.80±32.42	2437.80±378.82	-	-	-
IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	270.60±33.13	1129.40±856.17**	46.2	53.8	0.007
Her3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	269.20±31.17	164.80±39.81***	6.8	93.2	0.000
Her3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	270.20±31.40	939.00±744.80**	38.5	61.5	0.002
Her3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	271.60±38.35	2708.80±535.14	110.4	-10.4	0.876

【0941】6.8.3. Her3 抗體藥物偶聯物對 SW480 移植瘤藥效測試之二

參考實施例 6.8.2. 相同的模型和方法測定 IgG1，IgG1-ADC-07(DAR8),Her3-ADC-07(DAR8), Her3-C3-ADC-21(DAR8)在人結腸癌細胞株 SW480 細胞（ATCC 來源，Her3 表達陽性率在 30%左右）移植瘤模型的抗腫瘤作用。

具體測試結果見下表 32 及圖 16。

表 32.

給藥後天數 / 各組腫瘤體積（mm^3）	D1	D4	D8	D11	D15	D18	D22	D25	D29	P 值(vs IgG1)D15	T/C(%)D15	TGI(%)D15
IgG1 10mg/kg	291	483	1084	1874	2407	/	/	/	/	/	/	/
IgG1-ADC-07(DAR8) 10mg/kg	290	315	459	931	1497	1691	1939	/	/	0.035	62.36	37.64
Her3-ADC-07(DAR8) 10mg/kg	291	242	200	169	133	196	168	120	237	0.000	5.53	94.47
Her3-ADC-07(DAR8) 3mg/kg	291	254	361	589	716	967	1190	1315	/	0.000	29.71	70.29
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10mg/kg	292	258	129	125	178	228	360	390	890	0.000	7.36	92.64
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3mg/kg	292	246	525	968	1352	1894	2360	/	/	0.012	55.97	44.03

由測試結果可知，10mg/kg 和 3mg/kg 劑量 Her3-ADC-07 對 SW480 人結直腸癌移植瘤模型的腫瘤生長有顯著一定抑制作用，並且呈現劑量梯度趨勢。難以預料的是，Her3-ADC-07(DAR8)3mg/kg 組的抑瘤效果明顯強於 Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3mg/kg 組，Her3-ADC-07(DAR8)10mg/kg 組的抑瘤效果明顯強於 Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10mg/kg 組。

令人驚奇的是，和 IgG1 組相比，IgG1-ADC-07 在 SW480 人結直腸癌移植瘤模型中也具有明顯的抑制腫瘤作用，並且強於 Her3-C3-ADC-21(DAR8)3mg/kg 組的抑瘤作用，說明得到的本公開偶聯物（ADC）通過在連接體實現提高了整個 ADC（無論是否具有抗原結合活性或內吞活性）在腫瘤環境中的暴露量，具有更好的腫瘤組織靶向性，從而具有更好的抑制腫瘤（無論是否表達相應抗原）效果。

另外，動物體重結果顯示，整個給藥期以及恢復期間，各給藥組動物耐受良好。

【0942】實施例 6.9 ADC 血漿穩定性測試

通過在孵育 B7H3-ADC-07（DAR8）的人血漿中測定生物活性分子 A1.9 的釋放，在孵育 B7H3-C1-ADC-21(DAR4)的人血漿中測定 Dxd 的釋放，評價 B7H3-ADC-07（DAR8）在血漿中的穩定性。

樣品和組別

表 33

組別	受試物	孵育濃度	體系	檢測物	檢測時間點
1	B7H3-ADC-07（DAR8）	200 μg/mL	人血漿	A1.9	0 h、4h、24h、2d、3d、7d、10d、14d、17d、21d、28d
5	B7H3-C1-ADC-21(DAR4)	200 μg/mL	人血漿	Dxd	

溶液配製：用 PBS 將 B7H3-ADC-07（DAR8）及 B7H3-C1-ADC-21(DAR4) 原液稀釋至濃度 2 mg/mL 的工作溶液。用 DMSO 配製合適濃度的內標儲備液，然後用乙腈或其他試劑配製合適濃度的含內標的沉澱劑。

樣品孵育：各種屬（人、食蟹猴、ICR 小鼠）血漿和含 1%BSA 的 PBS 中均加入抑菌劑 ProClin，ProClin 終濃度為 0.1%，無菌操作。分別取 40 μL 受試物工作溶液與 360 μL 人血漿混合，制得濃度為 200 μg/mL 的孵育樣品。封板封膜，37℃ 5% CO2 培養箱中孵育， 震盪速度 80 次/分鐘。於 0 h、4h、24h、2d、3d、7d、10d、14d、17d、21d、28d 分別轉移 20 μL 血漿樣品，加入沉澱劑（含內標）200 μL，充分混勻沉澱蛋白。

所有樣品經蛋白沉澱後，離心取上清液，加水稀釋後使用 LC-MS/MS 進行

分析。分析條件為：

表 34：血漿穩定性測試的分析條件

分析物	A1.9				Dxd			
檢測方法	LC-MS/MS-6500-001				LC-MS/MS-6500-001			
內標	甲苯磺丁脲（Tolbutamide）				甲苯磺丁脲（Tolbutamide）			
質譜條件	正離子, ESI				正離子, ESI			
流動相	A: 0.1%FA in H2O				A: 0.1%FA in H2O			
	B: 0.1%FA in ACN				B: 0.1%FA in ACN			
色譜柱	Waters ,BEH C18，1.7μm，2.1*50mm				Aglient ,ZORBAX XDB-C18，3.5μm，2.1*50mm			
流速	0.5 mL/min				0.5 mL/min			
液相色譜條件	時間 (min)		泵 B (%)		時間 (min)		泵 B (%)	
	0.4		5		0.4		10	
	1.8		95		1.8		95	
	2.2		95		2.2		95	
	2.21		5		2.21		10	
	2.5		終止		2.5		終止	
檢測	化合物	m/z	去簇電壓 (v)	碰撞能量 (v)	化合物	m/z	去簇電壓 (v)	碰撞能量 (v)
	甲苯磺丁脲（Tolbutamide）	271.0-172.0	50	30	DXD	494.2-375.1	100	45
	A1.9	451.1-407.2	50	25				

獲得結果如下表 35 所示：

表 35

時間（天）	釋放比例(%)	
	A1.9	DXD
0	0.14	0.348
0.17	0.10	1.786
1	0.11	2.765
2	0.16	3.603

3	0.14	3.763
7	0.19	4.116
10	0.24	5.126
14	0.35	5.786
17	0.40	6.446
21	0.46	7.494
28	0.82	12.659

B7H3-ADC-07（DAR8）在人血漿中穩定性好，孵育 28 天後，釋放生物活性分子（A1.9）占總生物活性分子含量的 2%以下。而 B7H3-C1-ADC-21(DAR4)在人血漿中相中釋放 Dxd 明顯更多。

【0943】實施例 6.10 抗體藥物偶聯物在 HT 29 移植瘤中的中腫瘤組織分佈的測試實驗

【0944】6.10.1 實驗內容

步驟一.細胞處理

人結腸癌 HT29 細胞購自 ATCC。HT29 細胞用 15 cm^2 培養皿貼壁培養，培養條件為 1640 培養基中加 10 %胎牛血清，於 37 ℃、含 5 % CO2 空氣的培養箱中培養。當細胞呈指數生長期時，胰酶消化、收集細胞，計數，接種。

步驟二. 腫瘤細胞移植

BALB/c Nude 小鼠實驗室環境適應 2-5 天，於右肋部皮下接種 HT29 細胞，接種細胞量為 5×10^6/只，接種體積為 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待腫瘤生長至 200-300 mm3 左右時，進行實驗。

步驟三. 給藥及採樣

每組的動物數及詳細的給藥途徑、劑量和方案見下表。

表 36

組別	動物數	給藥組	劑量(mg/kg)	給藥體積（μL/g）	給藥方式	給藥週期	採集樣本	採樣時間點
1	3	生理鹽水	/	10	i.v.	單次	腫瘤與血漿	給藥後 72 h
2	3	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	10	i.v.	單次	腫瘤與血漿	給藥後 24 h
3	3	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	10	i.v.	單次	腫瘤與血漿	給藥後 72 h

步驟四. 腫瘤組織勻漿

取腫瘤組織塊於冰上剪碎，稱重轉移至研磨管中，按 1:5（w/v）加入生理鹽水研磨，製備組織勻漿液；2~8 ℃，1800 ×g，離心 10 min，製備組織勻漿上清液，於-15~-25 ℃條件下保存備用。使用前取出於 15~25 ℃放置，平衡至室溫後使用。

步驟五. 生物樣品分析

A1.9 的分析方法參照實施例 6.9。

B7H3-ADC-07(DAR8)的分析方法

（1）包被：將抗毒素抗體用包被液（0.05M CBS）稀釋至 1 μg/mL，以 100 μL/孔加入酶標板，覆膜，2~8 °C 靜置過夜（大於 12 h）。

（2）洗板：棄去孔內溶液，用 0.05% PBST 洗滌 3 次，300 μL/孔，拍乾。

（3）封閉：加入封閉液（2%BSA-1×PBST），300 μL/孔，覆膜，37 °C 孵育 2 h±20 min。

（4）洗板：棄去孔內溶液，用 0.05% PBST 洗滌 3 次，300 μL/孔，拍乾。

（5）加樣：向酶標板中加入基質溶液、標準曲線樣本、質控樣本及待測樣本，100 μL/孔，覆膜，37°C 孵育 2 h±5 min。每個樣品均做兩個重複。

（6）洗板：棄去孔內溶液，用 0.05%PBST 洗滌 3 次，300 μL/孔，拍乾。

（7）加二抗：將 Goat Anti-Human IgG Fc-HRP 用稀釋液（2%BSA-1×PBST）稀釋 40000 倍(16 ng/ml)，100 μL/孔，覆膜，37 °C 孵育 1 h±5 min。

（8）洗板：棄去孔內溶液，用 0.05%PBST 洗滌 3 次，300 μL/孔，拍乾。

（9）顯色：加入 TMB 基質顯色液，100 μL/孔，覆膜，15~25 °C 避光顯色 2~15 min。

（10）終止：加入終止液（0.5 M H2SO4），100 μL/孔，終止反應。

（11）檢測：用酶標儀於檢測波長 450 nm（參比波長 620 nm）處讀取各孔 OD 值。

【0945】實驗結果

A1.9 的分佈結果如圖 17 所示，A1.9 分佈於腫瘤相對於血漿具有高達 18 倍的分配比差異，腫瘤組織中 A1.9 占絕大多數。

ADC 的分配結果如圖 18 所示，在腫瘤/血清中，ADC 分子具有明顯的分配比差異，並具有時間依賴性，證明本公開 ADC 分子或者含有本公開 linker 的 ADC 更傾向於分佈在腫瘤組織中。從而導致整個 ADC 分子在相對酸性腫瘤環境中的暴露量，因而具有更好的腫瘤組織靶向性，增加了生物活性分子在瘤內和血液濃度比，降低了 ADC 分子的機理相關的毒性（或者又叫“on-target 安全性“），不同 ADC 之間 on-target 相對安全性的計算公式為：

（第一種 ADC 腫瘤細胞體外 EC50 抑制濃度/第一種 ADC 相同腫瘤細胞模型體內給藥劑量）/（第二種 ADC 腫瘤細胞體外 EC50 抑制濃度/在和

第一種 ADC 體內效果接近情況下第二種 ADC 相同腫瘤細胞模型體內給藥劑量）

具體的，結合上述實施例中的資料，圖 10 中 B7H3-ADC-07 3mg/kg 組和 B7H3-ADC-21 10mg/kg 組的效果接近，B7H3-ADC-07 相對於 B7H3-ADC-21 在 HT29 的相對 on-target 安全性為：

(10433 ng/mL /150KDa/3mg/kg)/(7442 ng/mL /150 KDa /10mg/kg)= 4.66

因此 B7H3-ADC-07 相對於 B7H3-ADC-21 在 HT29 的具有 4.66 倍的相對 on-target 安全性。換句話說，由於本公開 ADC 有更好的腫瘤組織靶向性，到達相同體內抑制腫瘤效果的給藥劑量更低（例如實施例 6.7.2 B7H3-ADC-08 3 mg/kg 組和 B7H3-ADC-07 3 mg/kg 組均與 B7H3-ADC-21 10 mg/kg 的 TGI 接近）。

【0946】實施例 6.11 抗體藥物偶聯物在腫瘤組織勻漿液、肌肉組織勻漿液中的穩定性測試

【0947】研究目的:

本實驗研究的目的是類比 B7H3-ADC-07(DAR8)在腫瘤組織/腫瘤微環境裂解，對 B7H3-ADC-07 在 22RV1 Balb/c nu 裸鼠腫瘤組織勻漿液、Balb/c 小鼠肌肉組織勻漿液、勻漿液基質生理鹽水中的穩定性進行體外考察，在 B7H3-ADC-07(DAR8)的孵育體系中測定 A1.9。將腫瘤組織勻漿液結果與血漿穩定性結果進行對比，評估腫瘤組織/腫瘤微環境中毒素分子的釋放效率。

組別:

表 37

	受試物	孵育濃度	體系	檢測物	檢測時間點
1	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	22RV1 Balb/c nu 裸鼠腫瘤組織勻漿液	A1.9	0 h、4 h、24 h、48h
2	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	Balb/c 小鼠肌肉組織勻漿液	A1.9	
3	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	勻漿液基質（生理鹽水）	A1.9	

【0948】實驗步驟:

1、配製生理鹽水（0.85%）

0.85 克氯化鈉加上蒸餾水 100 毫升，即 85mg 氯化鈉加入 10ml 水

2、配製 B7H3-ADC-07

取 100μL 的 B7H3-ADC-07(DAR8)原液 4 倍稀釋，得到濃度 5 mg/ml 的工作液，即 5 μg/μl。

3、組織勻漿液稀釋

①原始勻漿為 1:4，以生理鹽水 1:2 稀釋備用（200μL 勻漿+400μL 生理鹽水）。

②再 1:9 稀釋後測蛋白濃度，肌肉勻漿為 0.8mg/ml，腫瘤勻漿為 1.2mg/ml，這一步僅為檢測用，不用於後續實驗。

③調整腫瘤勻漿的蛋白濃度至與肌肉勻漿相同：將①所得的腫瘤勻漿繼續 2:1 稀釋（600μL 勻漿+300 μL 生理鹽水），則最終孵育體系中勻漿液的蛋白濃度都為 8mg/ml 左右，肌肉稀釋了 15 倍，腫瘤稀釋了 22.5 倍。

4、孵育體系 200μL，

表 38

	受試物	孵育濃度	體系	計算
1	B7H3-ADC-07(DAR8) 5 μg/μl	100 μg/mL	B7H3-ADC-07(DAR8) 工作液 4μL 加入 196μL 勻漿液或生理鹽水	5 μg/μl×4μL÷0.2ml

5、37℃孵育，到點取 30μL 加入 300μL 沉澱劑，0 h、4 h、24 h、48h。

【0949】結果與討論：

結果如圖 19A 和圖 19B 所示。從毒素分子 A1.9 釋放來看，B7H3-ADC-07(DAR8)在腫瘤組織勻漿液中可以釋放大量的 A1.9，而在正常組織勻漿液中 A1.9 無明顯釋放。提示 B7H3-ADC-07(DAR8)的毒素 linker 具有腫瘤組織特異性釋放毒素分子的特點。

【0950】從而本公開 ADC 有更寬的治療指數和治療效果。儘管本公開的具體實施方式已經得到詳細的描述，但本發明所屬技術領域具有通常知識者將理解：根據已經公佈的所有教導，可以對細節進行各種修改和變動，並且這些改變均在本公開的保護範圍之內。本公開的保護範圍由所附申請專利範圍及其任何等同物給出。

SEQUENCE LISTING

<110> 大陸商蘇州宜聯生物醫藥有限公司(MediLink Therapeutics (Suzhou) Co., Ltd.)

<120> 生物活性物偶聯物及其製備方法和用途

<130> P22430419T

<150> 2021101781361
<151> 2021-02-09

<150> 2021103408065
<151> 2021-03-30

<150> 202110825932X
<151> 2021-07-21

<150> 2021108259226
<151> 2021-07-21

<150> 2021108259067
<151> 2021-07-21

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> scFv 1D1

<400> 1

Glu Gly Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Met Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Trp Gly Ala Phe Asp Met
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
145 150 155 160

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ile Tyr Leu Ala Trp Asn Gln
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Phe Lys
180 185 190

Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Ser Ser Ile Thr Phe Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Arg Leu Glu Ile Lys
245

<210> 2
<211> 243
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> scFv 2E3

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
130 135 140

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
145 150 155 160

Ser Gln Arg Ile Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
180 185 190

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Tyr Ser Asn Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 3
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 VH

<400> 3

Glu Gly Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Met Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Trp Gly Ala Phe Asp Met
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 chothia HCDR1

<400> 4

Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 chothia HCDR2

<400> 5

Lys Gln Asp Gly Ser Glu
1 5

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 chothia HCDR3

<400> 6

Arg Met Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Trp Gly Ala Phe Asp Met
1 5 10

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 kabat HCDR1

<400> 7

Ser Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 kabat HCDR2

<400> 8

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 kabat HCDR3

<400> 9

Arg Met Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Trp Gly Ala Phe Asp Met
1 5 10

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 IMGT HCDR1

<400> 10

Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr Trp
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 IMGT HCDR2

<400> 11

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 IMGT HCDR3

<400> 12

Ala Arg Arg Met Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Trp Gly Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 13
<211> 108

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 VL

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ile
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Phe Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Ser Ser
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 chothia LCDR1

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ile Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 chothia LCDR2

<400> 15

Gly Thr Phe Lys Arg Ala Thr
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 chothia LCDR3

<400> 16

Gln Gln Tyr Asp Thr Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 kabat LCDR1

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ile Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 kabat LCDR2

<400> 18

Gly Thr Phe Lys Arg Ala Thr
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 kabat LCDR3

<400> 19

Gln Gln Tyr Asp Thr Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 IMGT LCDR1

<400> 20

Gln Ser Val Ser Ser Ile Tyr
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 Kabat/IMGT LCDR3

<400> 21

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 22
<211> 9

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 IMGT LCDR3

<400> 22

Gln Gln Tyr Asp Thr Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 VH

<400> 23

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 chothia HCDR1

<400> 24

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 chothia HCDR2

<400> 25

Ser Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 chothia HCDR3

<400> 26

Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 kabat HCDR1

<400> 27

Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 kabat HCDR2

<400> 28

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 kabat HCDR3

<400> 29

Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 IMGT HCDR1

<400> 30

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 IMGT HCDR2

<400> 31

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 IMGT HCDR3

<400> 32

Ala Lys Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 VL

<400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 chothia LCDR1

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 chothia LCDR2

<400> 35

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 chothia LCDR3

<400> 36

Gln Gln Tyr Ser Asn Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 kabat LCDR1

<400> 37

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 kabat LCDR2

<400> 38

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 kabat LCDR3

<400> 39

Gln Gln Tyr Ser Asn Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 IMGT LCDR1

<400> 40

Gln Arg Ile Ser Ser Ser Phe
1 5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 IMGT LCDR1

<400> 41

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 IMGT LCDR3

<400> 42

Gln Gln Tyr Ser Asn Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 43
<211> 330

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IgG1 CH

<400> 43

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
```

```
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Kappa CL

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 45
<211> 453
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 HC

<400> 45

Glu Gly Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Met Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Trp Gly Ala Phe Asp Met
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 46
<211> 215
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1D1-01 LC

<400> 46

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ile
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Phe Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Ser Ser
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 47
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 HC

<400> 47

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 48
<211> 215

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2E3-02 LC

<400> 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 49
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 VH

<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Val Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Trp Gly Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 VL

<400> 50

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 51
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 202-2-1 HC

<400> 51

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Val Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Trp Gly Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190
```

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 52
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 LC

<400> 52

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 Kabat HCDR1

<400> 53

Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 Kabat HCDR2

<400> 54

Val Ile Trp Tyr Asp Val Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 Kabat HCDR3

<400> 55

Asp Trp Gly Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 IMGT HCDR1

<400> 56

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 IMGT HCDR2

<400> 57

Ile Trp Tyr Asp Val Ser His Lys
1 5

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 IMGT HCDR3

<400> 58

Ala Arg Asp Trp Gly Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 Kabat LCDR1

<400> 59

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 202-2-1 Kabat LCDR2

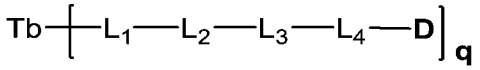
<400> 60

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

202241521

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種式XV所示的配體藥物偶聯物，



式XV

或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，

其中：

Tb為和靶點結合的配體或靶向部分；

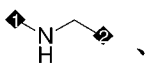
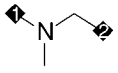
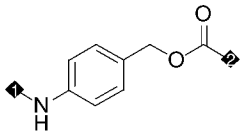
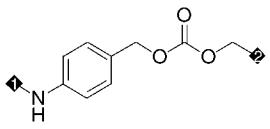
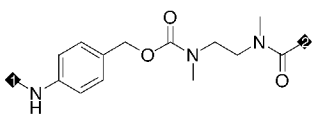
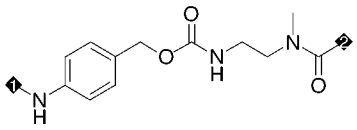
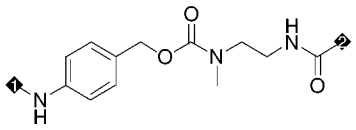
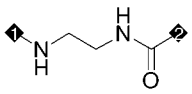
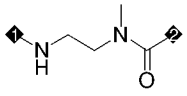
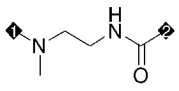
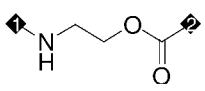
q為藥物配體偶聯比；

D為生物活性分子片段；

L_1為延伸單元；

L_2不存在或為連接單元；

L_3選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽；

L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

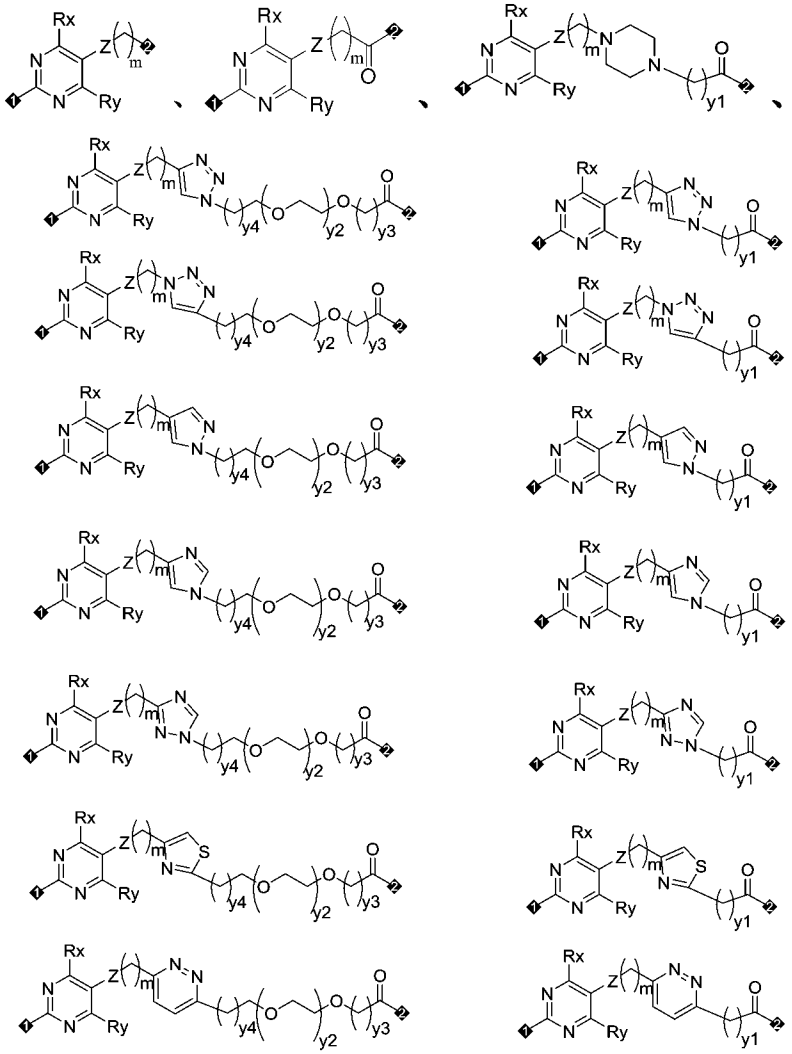
【請求項2】如請求項1所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

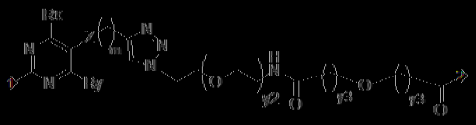
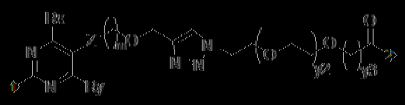
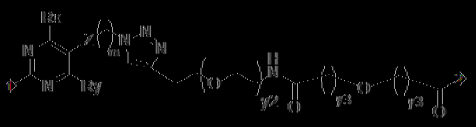
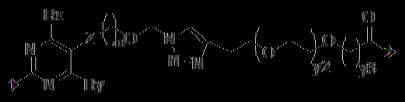
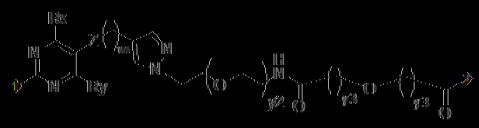
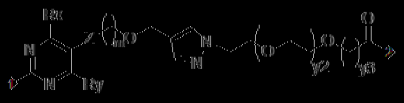
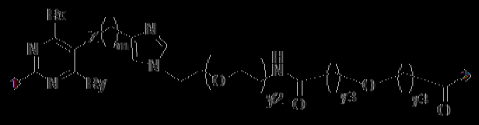
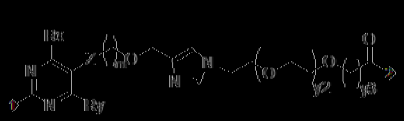
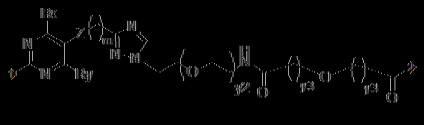
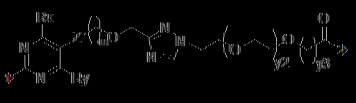
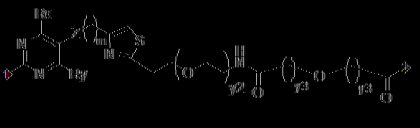
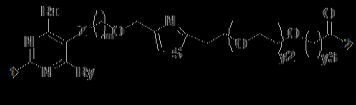
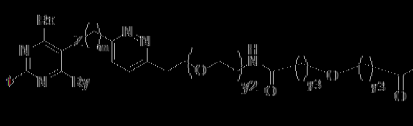
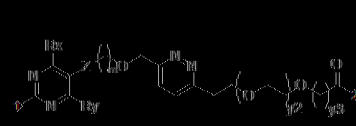
（1）Tb為抗體或其抗原結合片段；

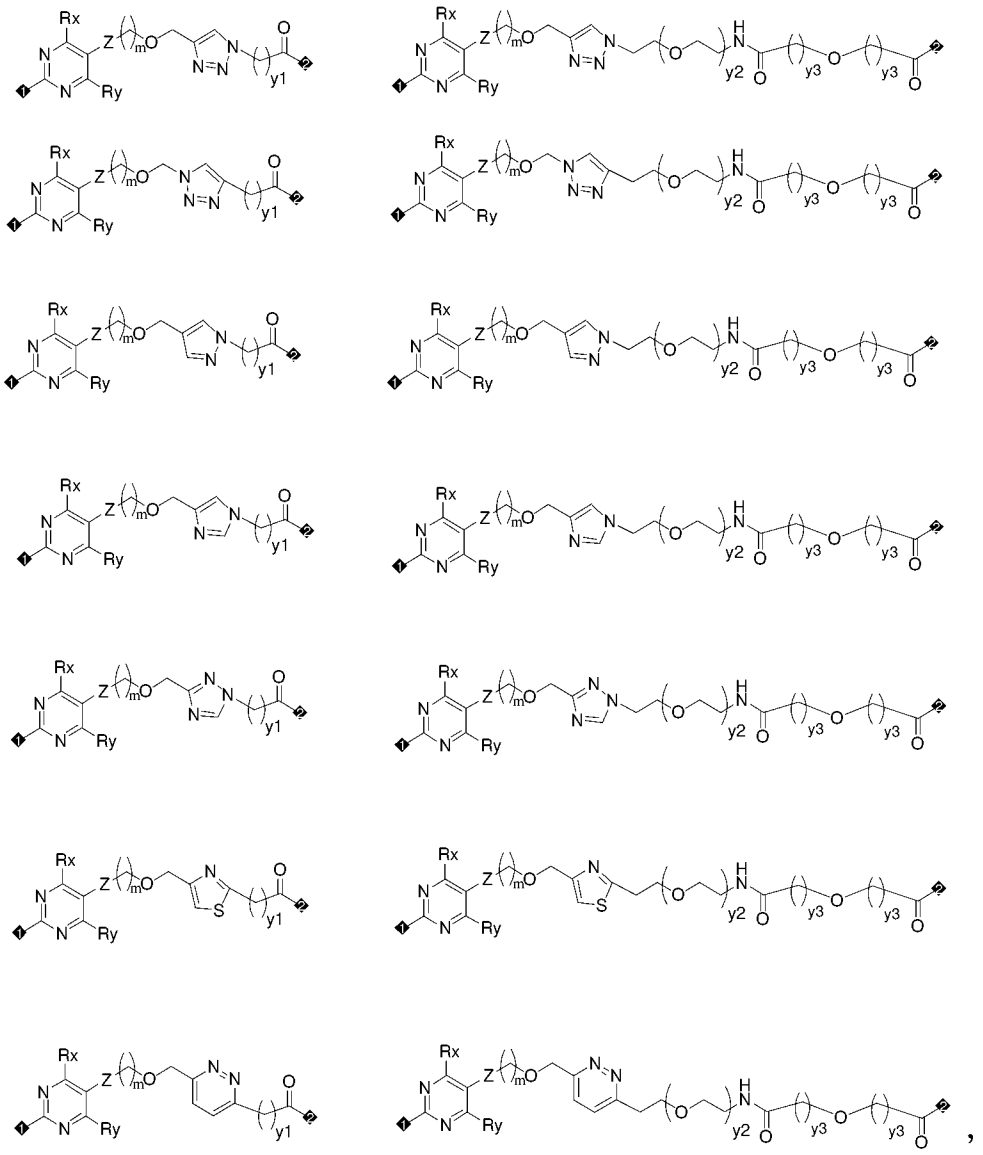
（2）q選自0.1-16.0之間的任意數值；

（3）D為具有抗腫瘤生物活性分子片段；

（4）L_1選自：





各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10芳基、5-10元雜芳基、醯胺基、磺醯胺基、亞胺基和CF_2；

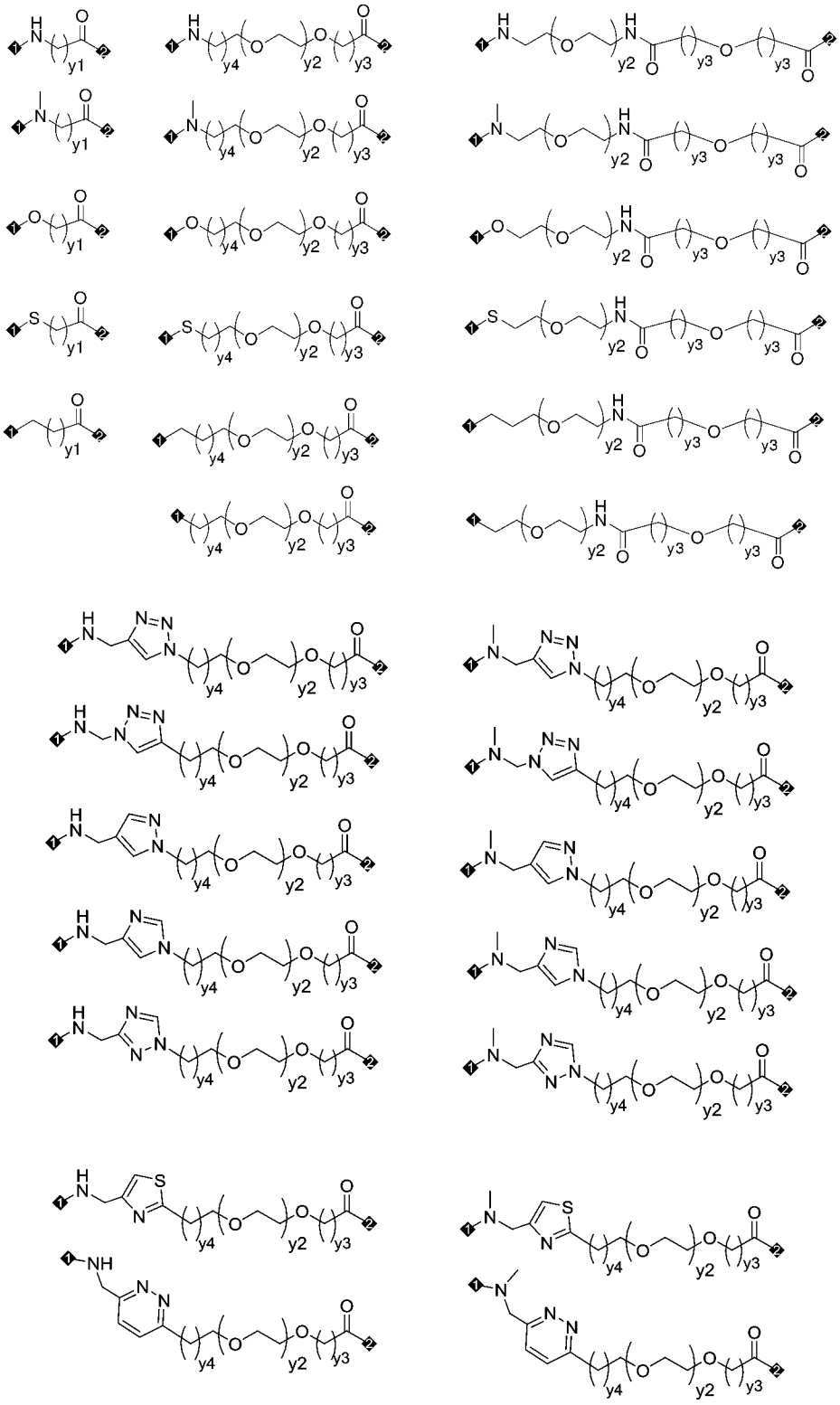
Rx和Ry各自獨立地選自H和C1-4烷基；

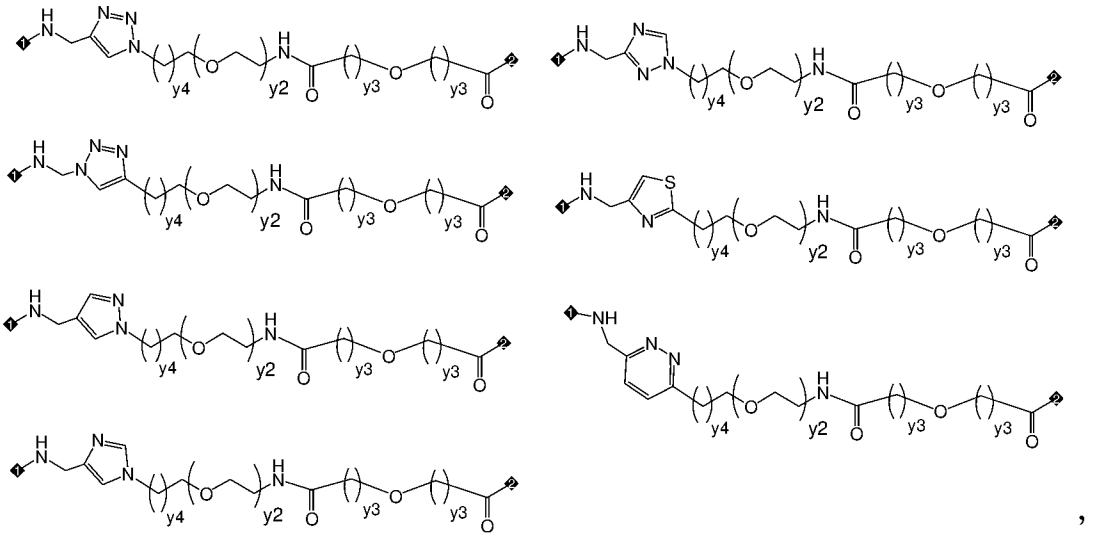
各m獨立地選自0、1、2、3、4、5和6；

y1、y2、y3和y4各自獨立地選自0-20之間的任意整數；

1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連；

（5）L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自：

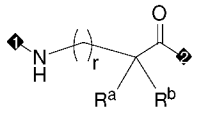




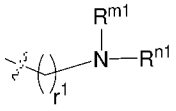
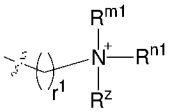
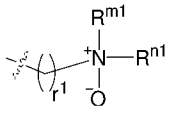
y1、y2、y3和y4各自獨立地選自0-20之間的任意整數，1位與L_1相連，2位與L_3相連；

（6）L_3選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽；所述的胺基酸殘基選自天然胺基酸殘基、非天然胺基酸殘基、或選自AA^1所示胺基酸殘基或其立體異構體；

AA^1所示胺基酸殘基的結構如下所示，



AA^1

其中：R^a、R^b各自獨立地選自H、  、  和  ，且R^a、R^b不同時為H；

或者，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成4-10元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代；

r、r^1各自獨立地選自0到20的任意整數；

R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基和-

$COOR^{x1}$；

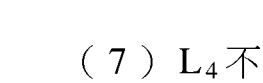
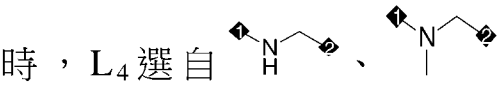
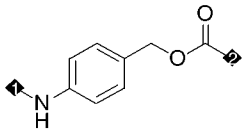
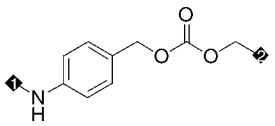
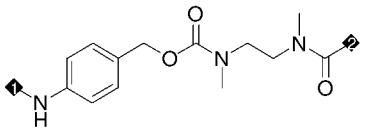
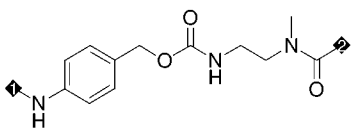
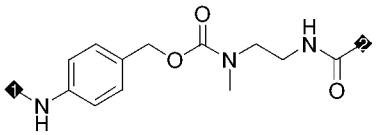
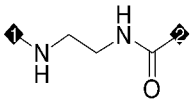
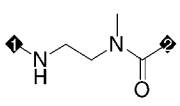
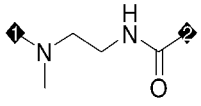
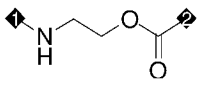
R^{x1}選自C1-6烷基；

或者，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成4-10元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個$R^{0'}$所取代；

R^{z}選自C1-6烷基；

R^{0}、$R^{0'}$各自獨立地選自C1-6烷基、C3-6環烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$和任選被C1-6烷基取代的4-10元雜環基；

R^{m2}、R^{n2}各自獨立地選自H和C1-6烷基；

（7）L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

【請求項3】如請求項2所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

（1）Tb為抗體或其抗原結合片段，其滿足如下條件中的一個或多個：

（i）所述抗體或其抗原結合片段包括Fab、Fab'、F(ab')2、

Fd、Fv、dAb、互補決定區片段、非人抗體、人源化抗體、嵌合抗體、全人抗體、前抗、單克隆抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體；

（ii）Tb為單克隆抗體或其抗原結合片段；

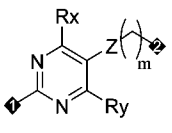
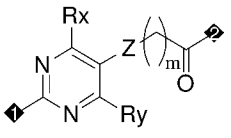
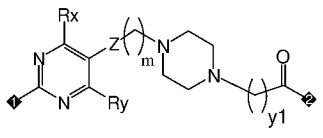
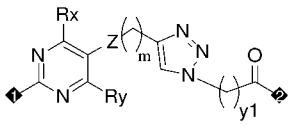
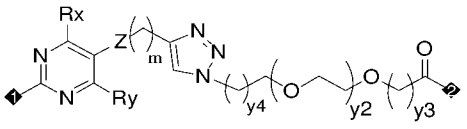
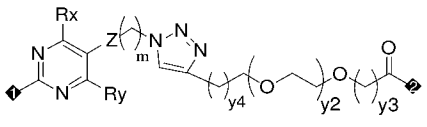
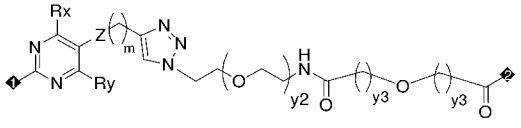
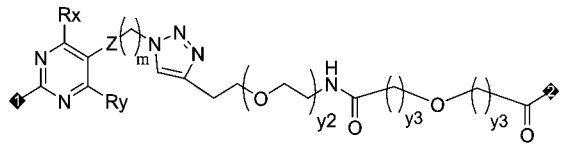
（iii）Tb為具有內吞、不內吞或內吞較弱的抗體或其抗原結合片段；

（iv）Tb為具有結合腫瘤組織中游離抗原和/或腫瘤細胞表面抗原活性的抗體或其抗原結合片段；

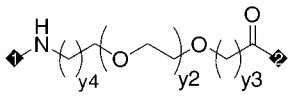
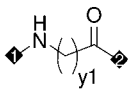
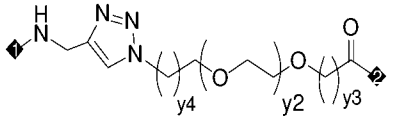
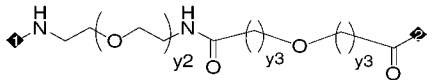
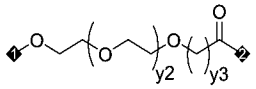
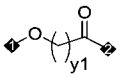
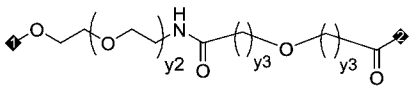
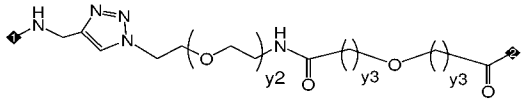
（v）Tb為不具有結合腫瘤組織中游離抗原和/或腫瘤細胞表面抗原活性的抗體或其抗原結合片段；

（2）q選自0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12和之間的任意數值；

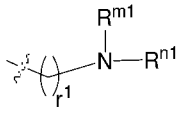
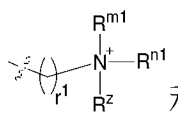
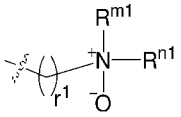
（3）所述的生物活性分子片段中，所述的生物活性分子為DNA拓撲異構酶抑制劑或微管蛋白抑制劑；

（4）L_1選自  、  、  、  、  、  、  和  ，各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10芳基、5-10元雜芳基和醯胺基；Rx、Ry各

自獨立地選自H和C1-4烷基；各m獨立地選自0、1、2、3、4、5和6；y1選自1-6之間任意整數；各y2獨立地選自0-15之間任意整數；各y3獨立地選自1、2和3；各y4獨立地選自0和1；1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連；

（5）L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  、  、  、  和  ，y1選自1-6之間任意整數，各y2獨立地選自0-10之間任意整數，各y3獨立地選自1和2，各y4獨立地選自0和1，1位與L_1相連，2位與L_3相連；

（6）L_3選自胺基酸殘基Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg和AA^1或由2-10個選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp和AA^1的胺基酸殘基組成的短肽；

（7）AA^1的胺基酸殘基中，R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自  、  和  ；

或者，AA^1的胺基酸殘基中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環；

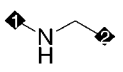
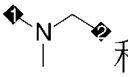
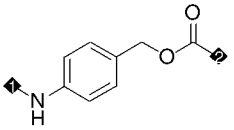
（8）AA^1的胺基酸殘基中，r、r^1各自獨立地選自0、1、2、

3、4和5；

（9）AA^1的胺基酸殘基中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3和-COOCH2CH2CH2CH3；或者，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成被$R^{0'}$取代的5-6元雜環；

（10）AA^1的胺基酸殘基中，R^z為甲基；

（11）AA^1的胺基酸殘基中，R^0、$R^{0'}$各自獨立地選自C1-6烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$和任選被C1-6烷基取代的5-6元雜環基；

（12）L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自  、  和  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

【請求項4】如請求項3所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

（1）Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段、抗Trop-2抗體或其抗原結合片段、抗Her2抗體或其抗原結合片段、抗Her3抗體或其抗原結合片段、抗EGFR抗體或其抗原結合片段、或IgG1同型抗體抗雞融菌酶抗體；

（2）q選自0.1、1、2、3、4、5、6、7、8和之間的任意數值；

（3）當所述的生物活性分子片段中的生物活性分子為DNA拓

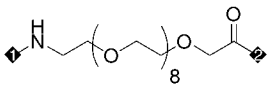
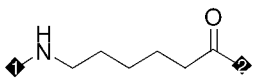
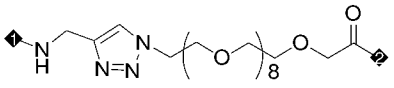
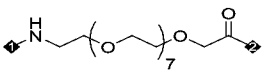
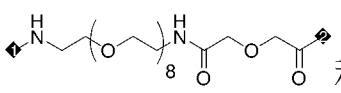
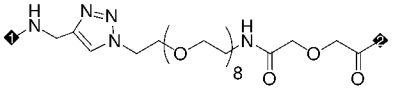
撲異構酶抑制劑時，所述的DNA拓撲異構酶抑制劑為喜樹鹼類生物活性分子；

（4）當所述的生物活性分子片段中的生物活性分子為微管蛋白抑制劑時，所述的微管蛋白抑制劑為MMAF類微管蛋白抑制劑，MMAE類微管蛋白抑制劑；

（5）L_1中，各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵和碳碳雙鍵；

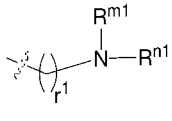
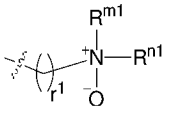
（6）L_1中，y1為4、5或6；

（7）L_1中，各y2獨立地選自6-10之間任意整數；

（8）L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連；

（9）L_3選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys和Lys-Ala-

Asn；

（10）AA^1所示胺基酸殘基中，R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自  和  ；或，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環為被R^0取代的哌啶環或哌咔環；

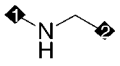
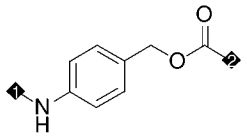
（11）AA^1的胺基酸殘基中，r、r^1各自獨立地選自0和4；

（12）AA^1的胺基酸殘基中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基和第三丁氧羰基；或者，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成被$R^{0'}$取代的哌啶環或哌咔環；

（13）AA^1的胺基酸殘基中，R^0選自C1-6烷基和被C1-6烷基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基選自哌啶基和哌咔基；

（14）AA^1的胺基酸殘基中，$R^{0'}$選自C1-6烷基和$-NR^{m2}R^{n2}$；

（15）AA^1的胺基酸殘基中，R^{m2}、R^{n2}為甲基；

（16）L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4為  或  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

【請求項5】如請求項1-4中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

（1）q選自2、3、4、5、6、7、8和之間的任意數值；

（2）Tb為如下任一方案：

（i）Tb為抗Her2的抗體或其抗原結合片段，所述的抗Her2的抗體為anbenitamab，coprelotamab，disitamab，gancotamab，margetuximab，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab，Pertuzumab或其抗原結合片段；

（ii）Tb為抗Trop-2的抗體或其抗原結合片段，所述的抗Trop-2的抗體為datopotamab，Sacituzumab或其抗原結合片段；或

（iii）Tb為抗EGFR的抗體或其抗原結合片段，所述的抗EGFR的抗體為demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab或其抗原結合片段；或

（iv）Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，其中所述抗B7H3抗體為enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab，1D1-01，2E3-02抗體或其抗原結合片段；或

（v）Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，其中所述抗B7H3抗體其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR），其中CDR按kabat編號系統定義：

(a)序列為SEQ ID NO:7的HCDR1，序列為SEQ ID NO:8的HCDR2，序列為SEQ ID NO:9的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:17的LCDR1，序列為SEQ ID NO:18的

LCDR2，序列為SEQ ID NO:19的LCDR3；

(b)序列為SEQ ID NO:27的HCDR1，序列為SEQ ID NO:28的HCDR2，序列為SEQ ID NO:29的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:37的LCDR1，序列為SEQ ID NO:38的LCDR2，序列為SEQ ID NO:39的LCDR3；

(c)序列為SEQ ID NO:7的HCDR1，序列為SEQ ID NO:8的HCDR2，序列為SEQ ID NO:9的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:37的LCDR1，序列為SEQ ID NO:38的LCDR2，序列為SEQ ID NO:39的LCDR3；

或 (d)序列為SEQ ID NO:27的HCDR1，序列為SEQ ID NO:28的HCDR2，序列為SEQ ID NO:29的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:17的LCDR1，序列為SEQ ID NO:18的LCDR2，序列為SEQ ID NO:19的LCDR3；或

（vi）Tb為抗Her3抗體或其抗原結合片段，其中所述抗Her3抗體為barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，202-2-1或其抗原結合片段;或

（vii）Tb為抗Her3抗體或其抗原結合片段，其中所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR），其中CDR按kabat編號系統定義：

序列為SEQ ID NO:53的HCDR1，序列為SEQ ID NO:54的HCDR2，序列為SEQ ID NO:55的HCDR3；和/或，

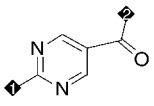
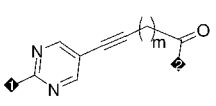
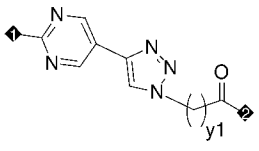
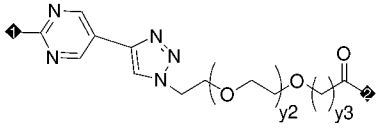
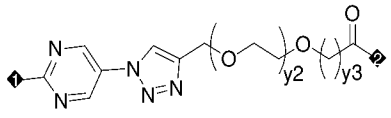
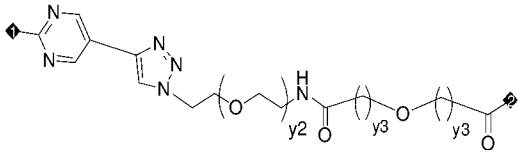
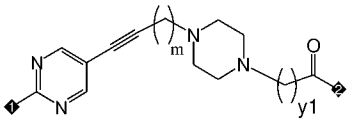
序列為SEQ ID NO:59的LCDR1，序列為SEQ ID NO:60的LCDR2，序列為SEQ ID NO:21的LCDR3；

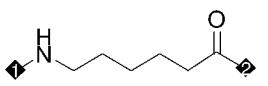
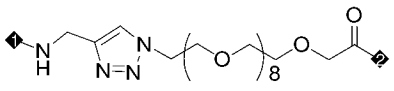
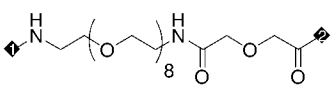
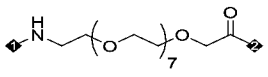
（viii）有腫瘤細胞內吞活性，且有腫瘤組織中游離抗原和/或腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段；

（ix）腫瘤細胞內吞活性較弱或無內吞活性，且有腫瘤組織中游離抗原和/或腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段；

（x）腫瘤細胞內吞活性較弱或無內吞活性，且無腫瘤組織中游離抗原或腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段；例如，Tb為抗雞溶菌酶人IgG1同型抗體；

（xi）結合非內吞抗原的抗體或其抗原結合片段；例如ALCAM/CD166；

（3）L_1選自  、  、  、  、  、  和  ，m選自2、3和4，y1選自1-6之間任意整數，各y2獨立地選自0-10之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連；

（4）L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自 、  、  、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連；

（5）L_3選自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn和Gly-Gly-Phe-Gly；

（6）AA^1所示胺基酸殘基中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環為被R^0取代的哌啶環；

（7）AA^1的胺基酸殘基中，r、r^1中，任一個為0，另一個為4；

（8）AA^1的胺基酸殘基中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H和C1-6烷基；或，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成被$R^{0'}$取代的哌啶環；

（9）AA^1的胺基酸殘基中，R^0選自甲基、乙基和被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基；

（10）AA^1的胺基酸殘基中，$R^{0'}$選自甲基和-$NR^{m2}R^{n2}$；

（11）當所述的生物活性分子片段中的生物活性分子為DNA拓撲異構酶抑制劑、所述的DNA拓撲異構酶抑制劑為喜樹鹼類生物活性分子時，所述的喜樹鹼類生物活性分子為喜樹鹼、DXD、取代基被修飾的喜樹鹼或取代基被修飾的DXD。

【請求項6】如請求項1-4中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或

其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

（1）q選自3、4、5、6、7、8和之間的任意數值；

（2）Tb為如下任一方案：

（vi）Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，其中所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR），其中CDR按kabat編號系統定義：

(a)序列為SEQ ID NO:7的HCDR1，序列為SEQ ID NO:8的HCDR2，序列為SEQ ID NO:9的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:17的LCDR1，序列為SEQ ID NO:18的LCDR2，序列為SEQ ID NO:19的LCDR3；

(b)序列為SEQ ID NO:27的HCDR1，序列為SEQ ID NO:28的HCDR2，序列為SEQ ID NO:29的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:37的LCDR1，序列為SEQ ID NO:38的LCDR2，序列為SEQ ID NO:39的LCDR3；

(c)序列為SEQ ID NO:7的HCDR1，序列為SEQ ID NO:8的HCDR2，序列為SEQ ID NO:9的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:37的LCDR1，序列為SEQ ID NO:38的LCDR2，序列為SEQ ID NO:39的LCDR3；

或 (d)序列為SEQ ID NO:27的HCDR1，序列為SEQ ID NO:28的HCDR2，序列為SEQ ID NO:29的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:17的LCDR1，序列為SEQ ID NO:18的

LCDR2，序列為SEQ ID NO:19的LCDR3；

且所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含含有以上含有（a）-(d)中一組重鏈CDR的VH和含有（a）-(d)中一組輕鏈CDR的VL；

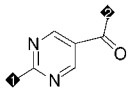
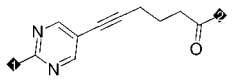
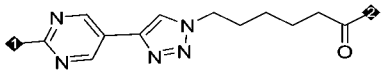
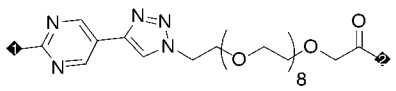
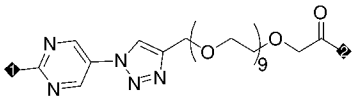
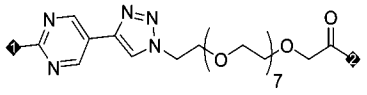
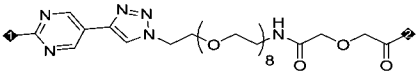
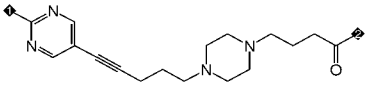
（ii）Tb為抗Her3抗體或其抗原結合片段，

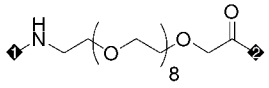
其中所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR），其中CDR按kabat編號系統定義：

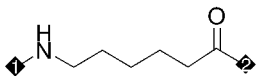
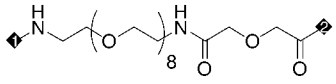
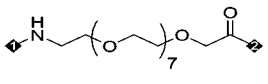
序列為SEQ ID NO:53的HCDR1，序列為SEQ ID NO:54的HCDR2，序列為SEQ ID NO:55的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:59的LCDR1，序列為SEQ ID NO:60的LCDR2，序列為SEQ ID NO:21的LCDR3；

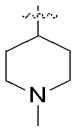
所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含以上組重鏈CDR的VH和含有以上組輕鏈CDR的VL；

（3）L_1選自  、  、  、  、  、  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連；

（4）L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、

 、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連；

（5）L_3選自AA^1、Val-AA^1-Gly；

（6）AA^1的胺基酸殘基中，R^0選自甲基、乙基和  。

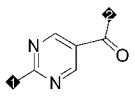
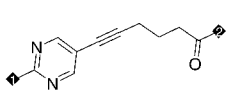
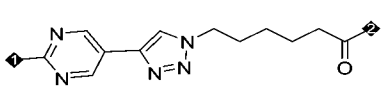
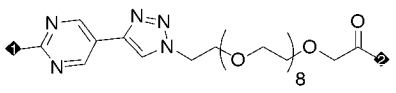
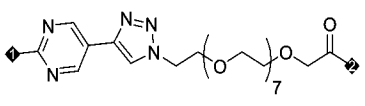
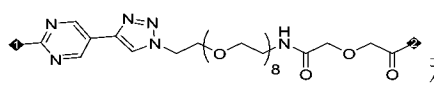
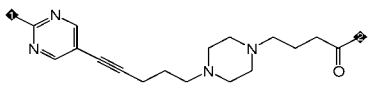
【請求項7】如請求項1-4中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

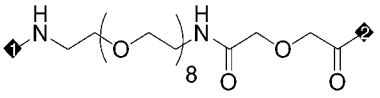
（1）q選自4、5、6、7、8和之間的任意數值；

（2）Tb為如下任一方案：

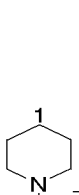
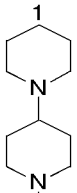
（i）Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO:3或 23所示的VH，和/或，SEQ ID NO:13或33所示的VL；

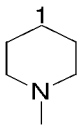
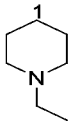
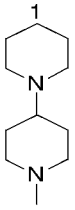
（ii）Tb為抗Her3抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO:49所示的VH，和/或，SEQ ID NO:50所示的VL；

（3）L_1選自  、  、  、  、  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連；

（4）L_2不存在或  ；

（5）L_3選自Val-AA^1-Gly；

（6）AA^1所示胺基酸殘基中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成  或  ，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子；

（7）r、r^1中，r為4，r^1為0時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H和C1-6烷基；r為0，r^1為4時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自C1-6烷基，或，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成  、  或  ，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【請求項8】如請求項7所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，

（1）q選自6、7、8和之間的任意數值；

（2）Tb為如下任一方案：

（i）Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO:3或 23所示的VH，和/或，SEQ ID NO:13或33所示的VL；

進一步包含：

(a) 人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體；和/或

(b) 人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體，

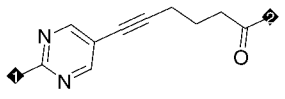
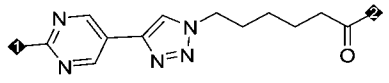
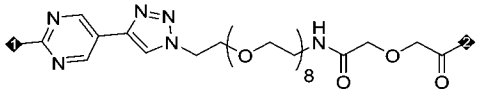
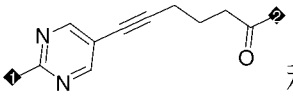
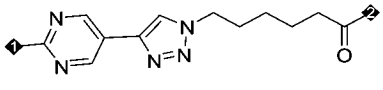
（ii）Tb為抗Her3抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO:49所示的VH，和/或，SEQ ID NO:50所示的VL；

進一步包含：

(a) 人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體；和/或

(b) 人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體；

（3）r、r^1中，r為4，r^1為0時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H和C1-6烷基；r為0，r^1為4時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自C2-6烷基；

（4）L_1選自  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連；例如L_1選自  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

【請求項9】如請求項8所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，

（1）Tb為如下任一方案：

（i）Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗

B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

SEQ ID NO:3所示的VH，SEQ ID NO:43所示的CH或其變體，和/或，SEQ ID NO:13所示的VL，SEQ ID NO:44所示的CL或其變體；

SEQ ID NO:23所示的VH，SEQ ID NO:43所示的CH或其變體,和/或，SEQ ID NO:33所示的VL，SEQ ID NO:44所示的CL或其變體；

優選地，所述B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

SEQ ID NO:45所示的重鏈，和/或，SEQ ID NO:46所示的輕鏈；

SEQ ID NO:47所示的重鏈，和/或，SEQ ID NO:48所示的輕鏈；

（ii）Tb為抗Her3抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含：

SEQ ID NO:49所示的VH，SEQ ID NO:43所示的CH或其變體,和/或，SEQ ID NO:50所示的VL，SEQ ID NO:44所示的CL或其變體；

優選地，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含：

SEQ ID NO:51所示的重鏈，和/或，SEQ ID NO:52所示的輕鏈；

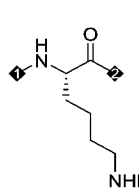
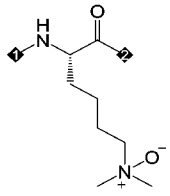
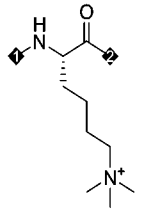
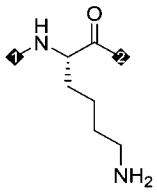
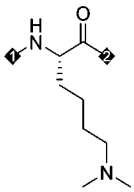
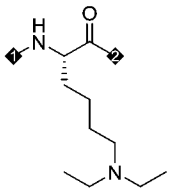
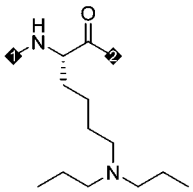
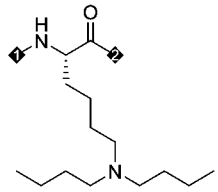
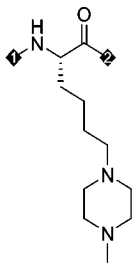
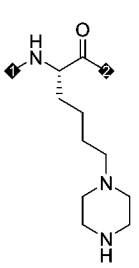
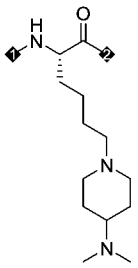
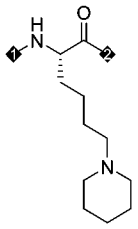
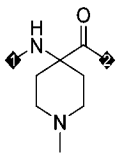
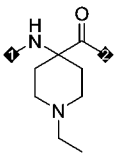
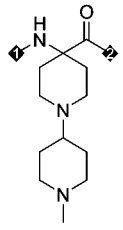
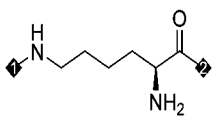
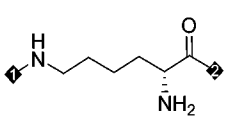
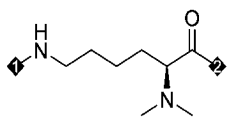
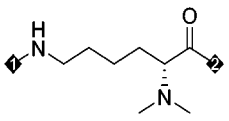
（2）R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自C1-6烷基中，所述的C1-6烷基選自甲基、乙基和正丙基；或R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自C2-6烷基

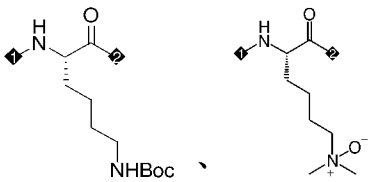
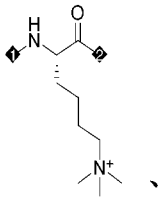
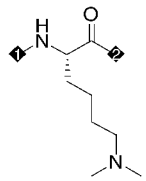
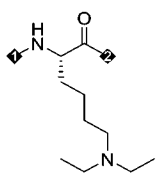
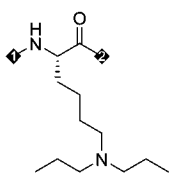
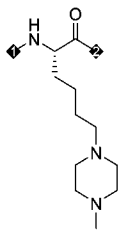
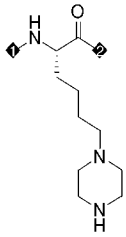
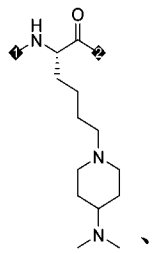
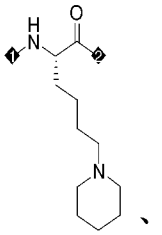
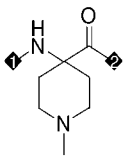
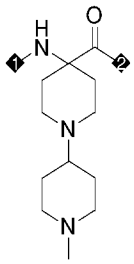
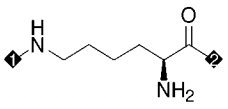
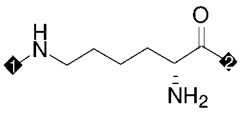
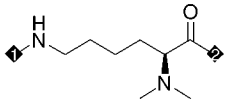
中，所述的C2-6烷基選自乙基和正丙基。

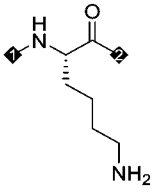
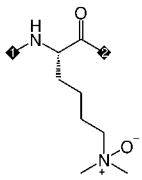
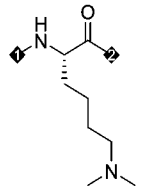
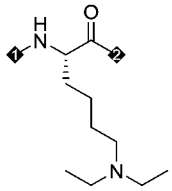
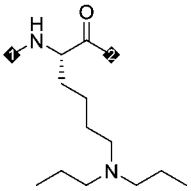
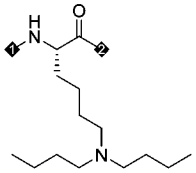
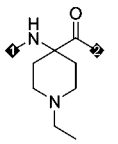
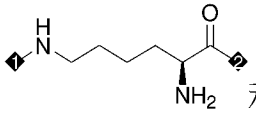
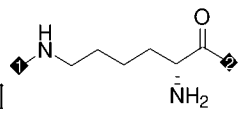
【請求項10】如請求項1-9中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

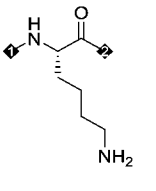
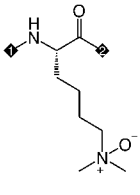
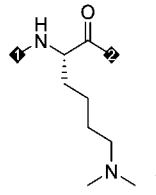
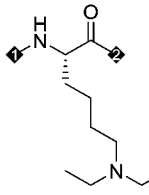
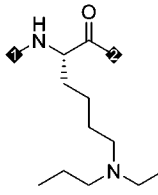
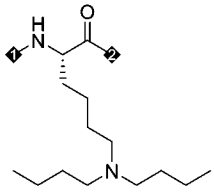
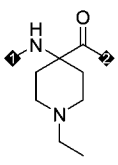
（1）Tb為抗體或其抗原結合片段、所述抗體或其抗原結合片段包括單鏈抗體時，所述的單鏈抗體為scFv；

（2）Tb為具有內吞活性的抗體或其抗原結合片段；

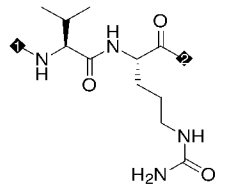
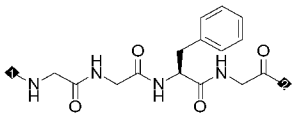
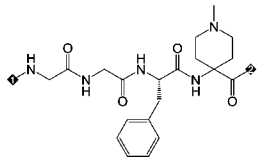
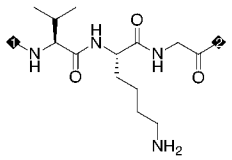
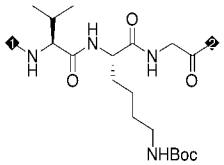
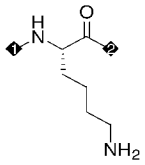
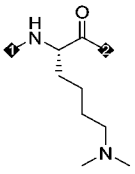
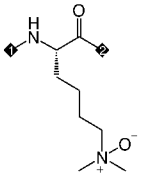
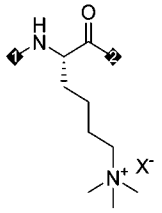
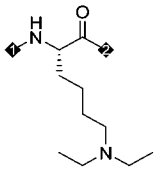
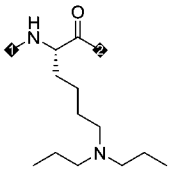
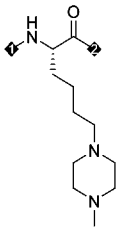
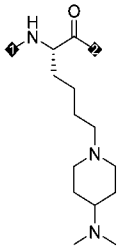
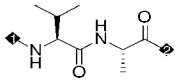
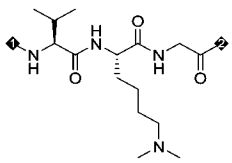
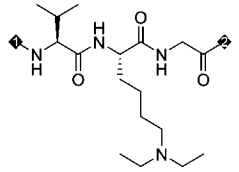
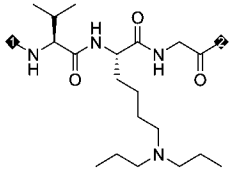
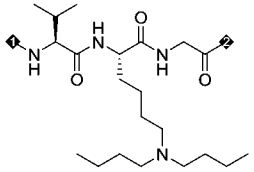
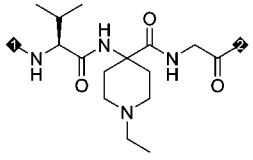
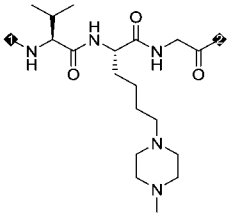
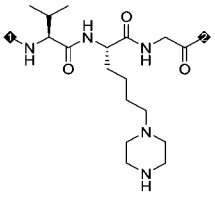
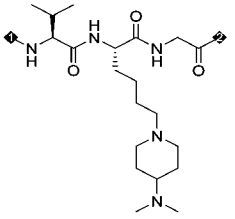
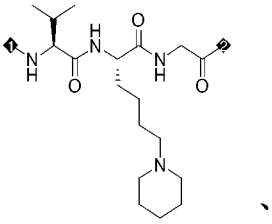
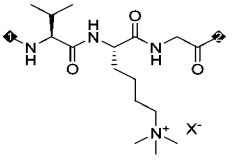
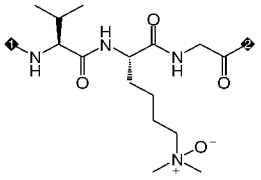
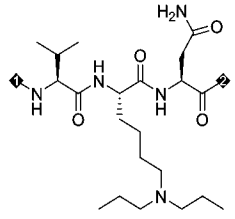
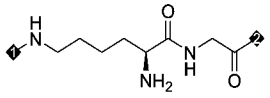
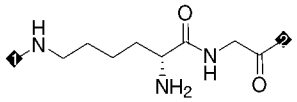
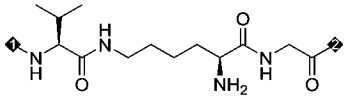
（3）AA^1所示胺基酸殘基選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ；

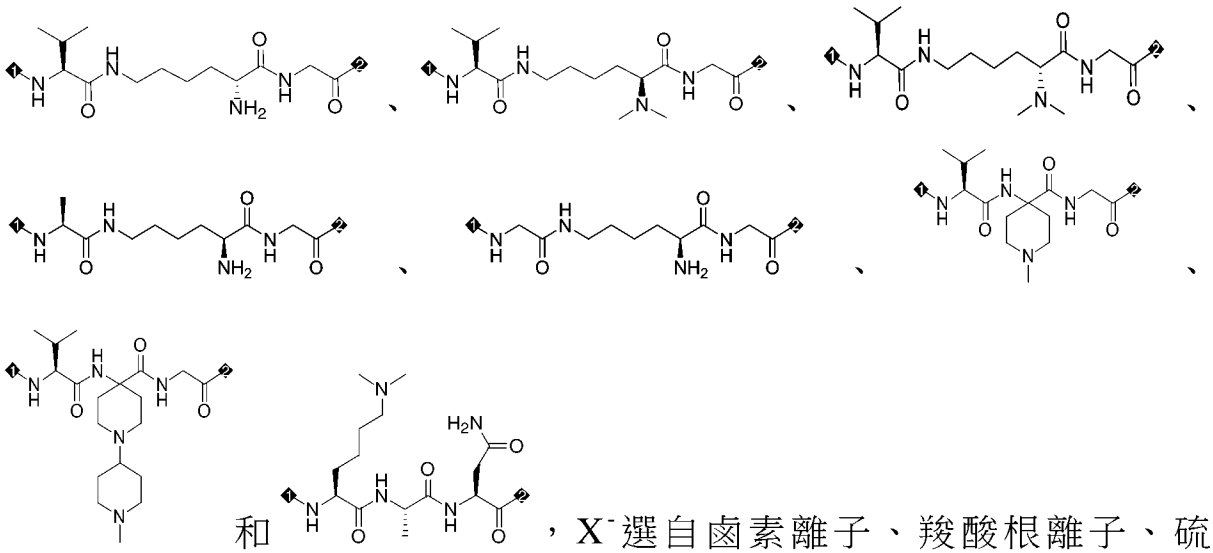
優選地，AA^1所示胺基酸殘基選自  、、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ；

進一步優選地，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  、  、  、  、  、  、  和  ；

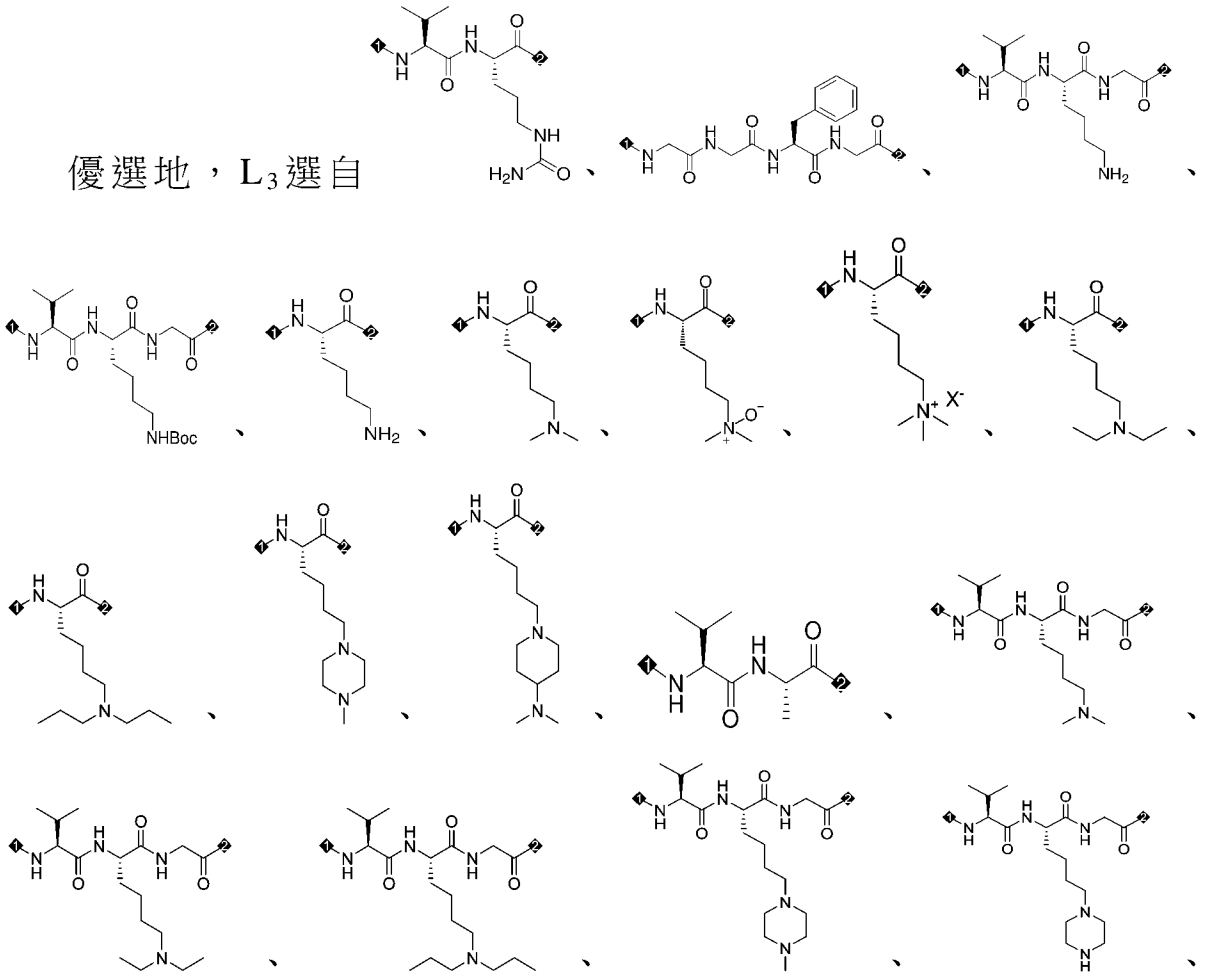
最優選地，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  、  、  、  、  和  。

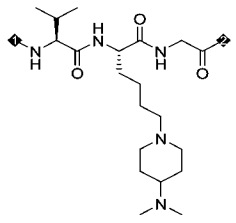
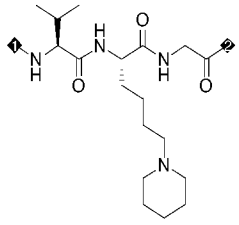
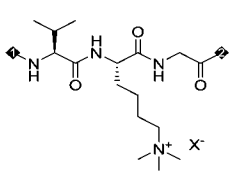
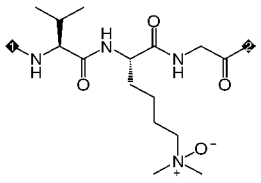
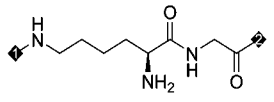
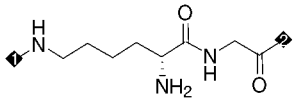
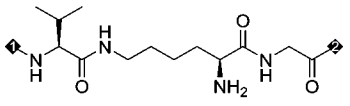
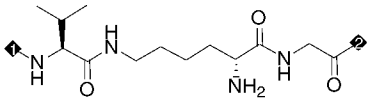
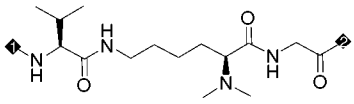
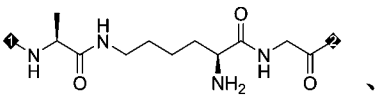
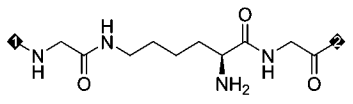
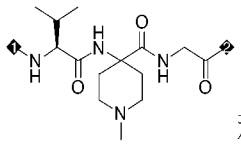
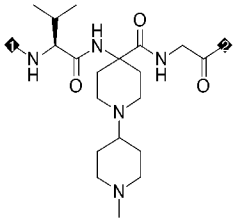
【請求項11】如請求項1-10中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，

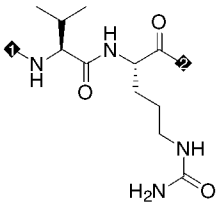
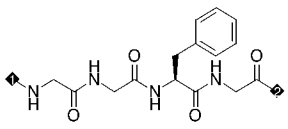
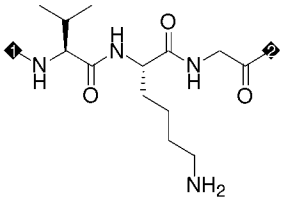
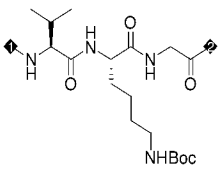
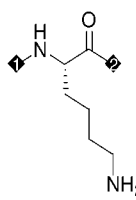
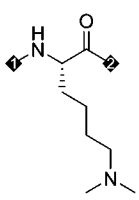
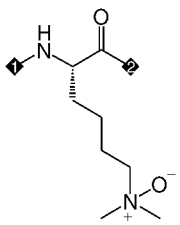
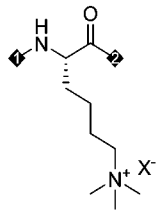
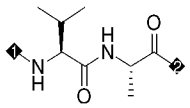
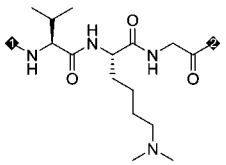
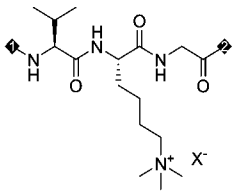
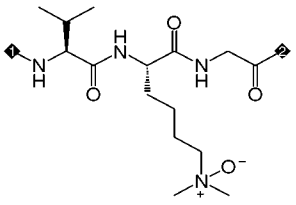
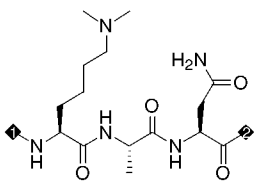
L_3 選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、



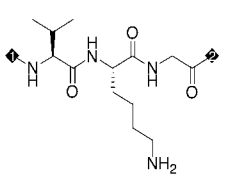
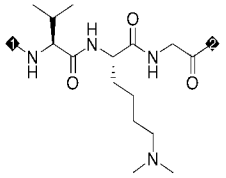
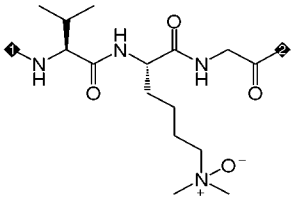
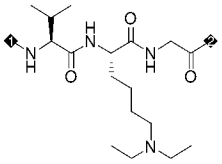
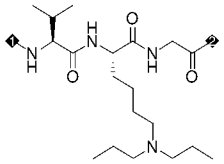
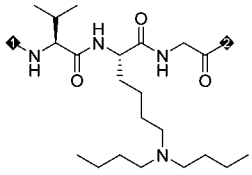
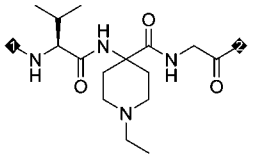
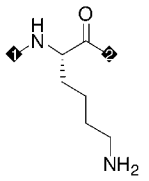
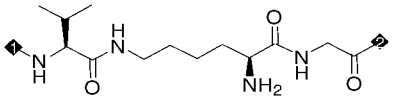
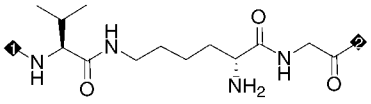
和 ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連；

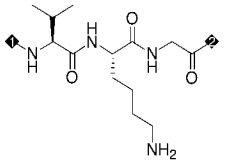
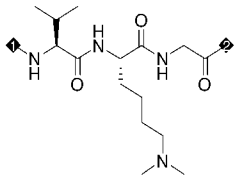
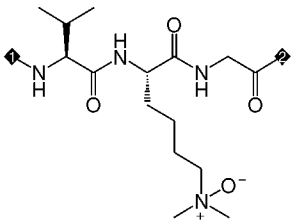
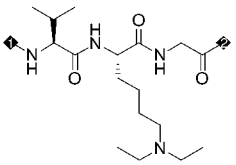
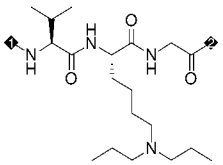
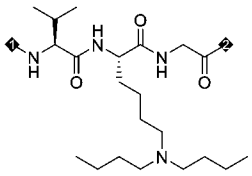
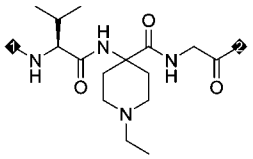
優選地，L_3選自 

 、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X⁻選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH⁻，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連；

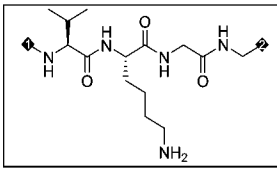
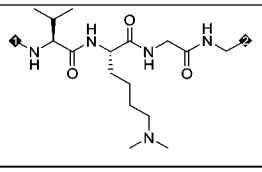
進一步優選地，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X⁻選自鹵素離子、羧酸根離

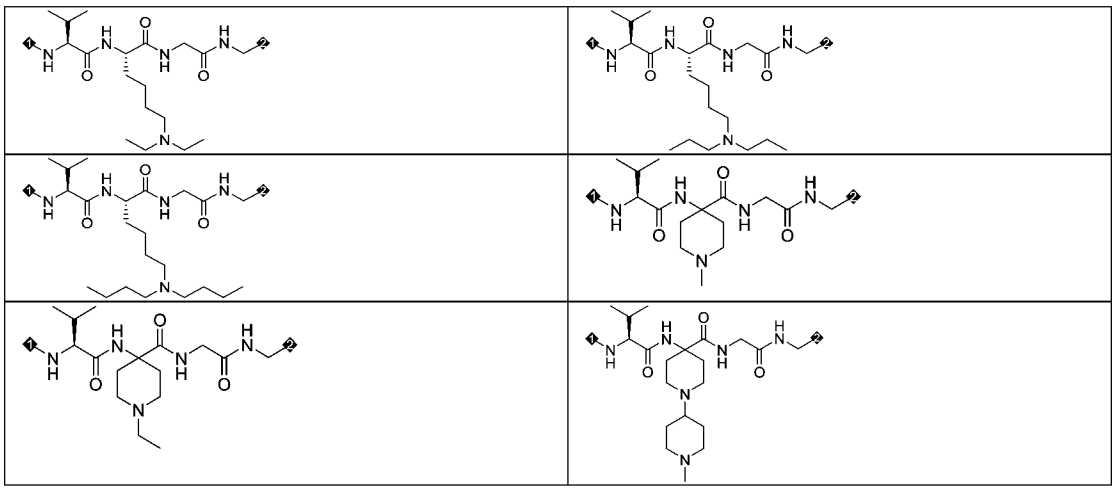
子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連；

還優選地，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連；

最優選地，L_3選自  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連；

例如❶——L_3——L_4——❷的結構選自以下結構片段：

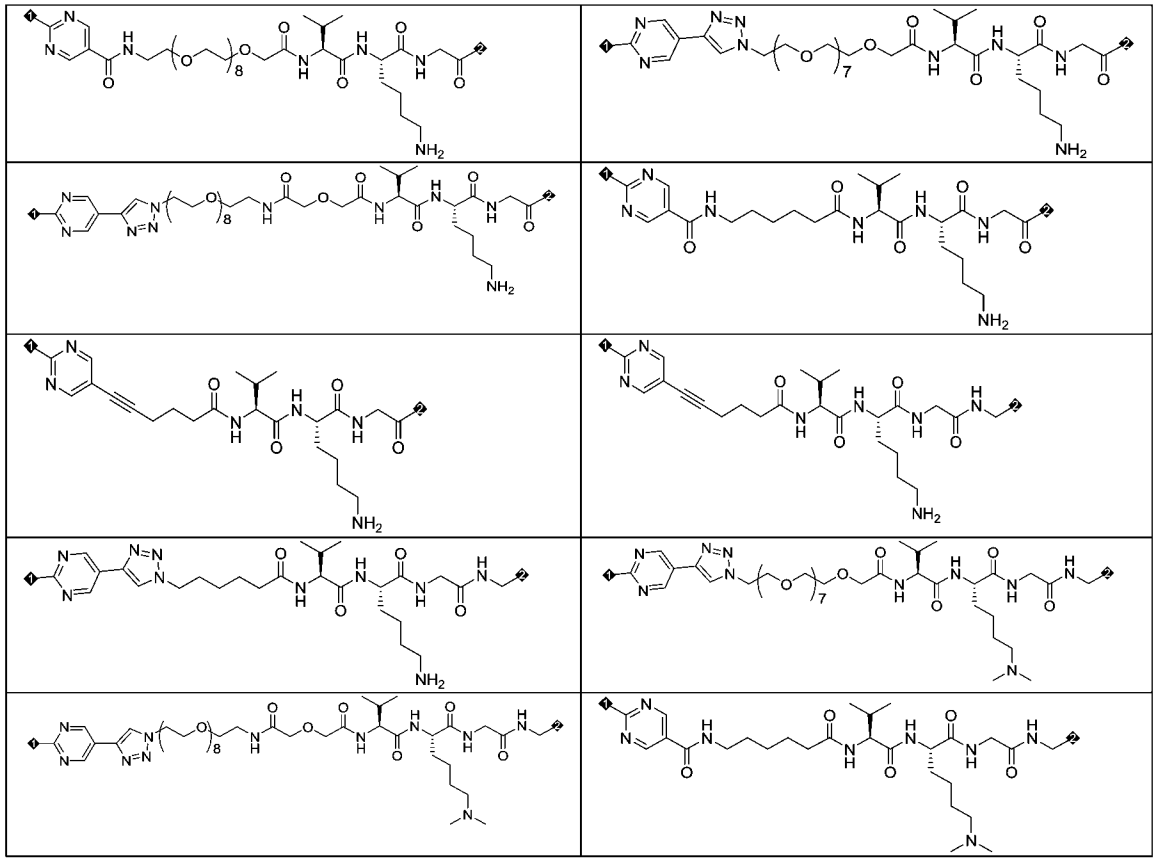
	

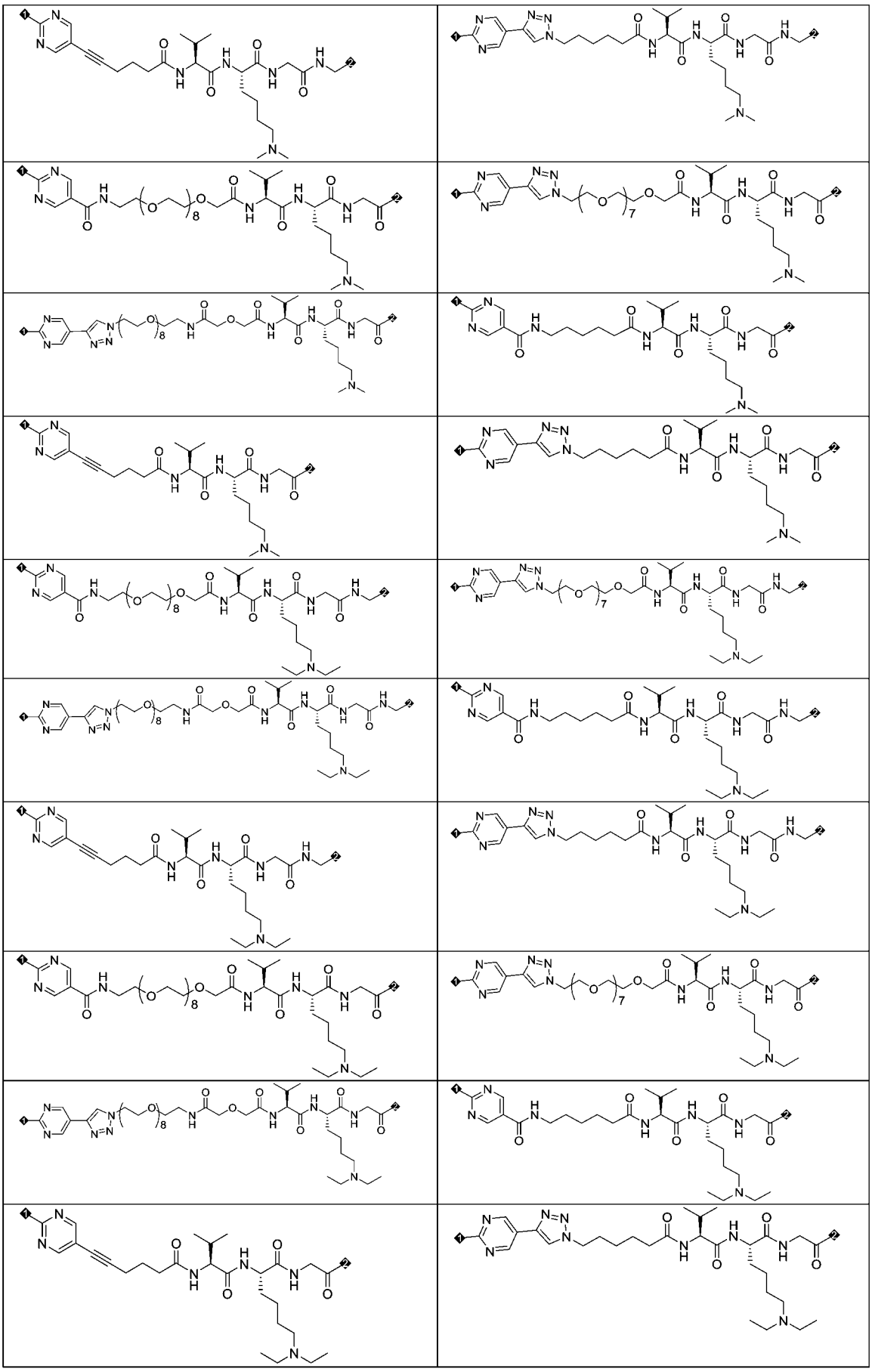


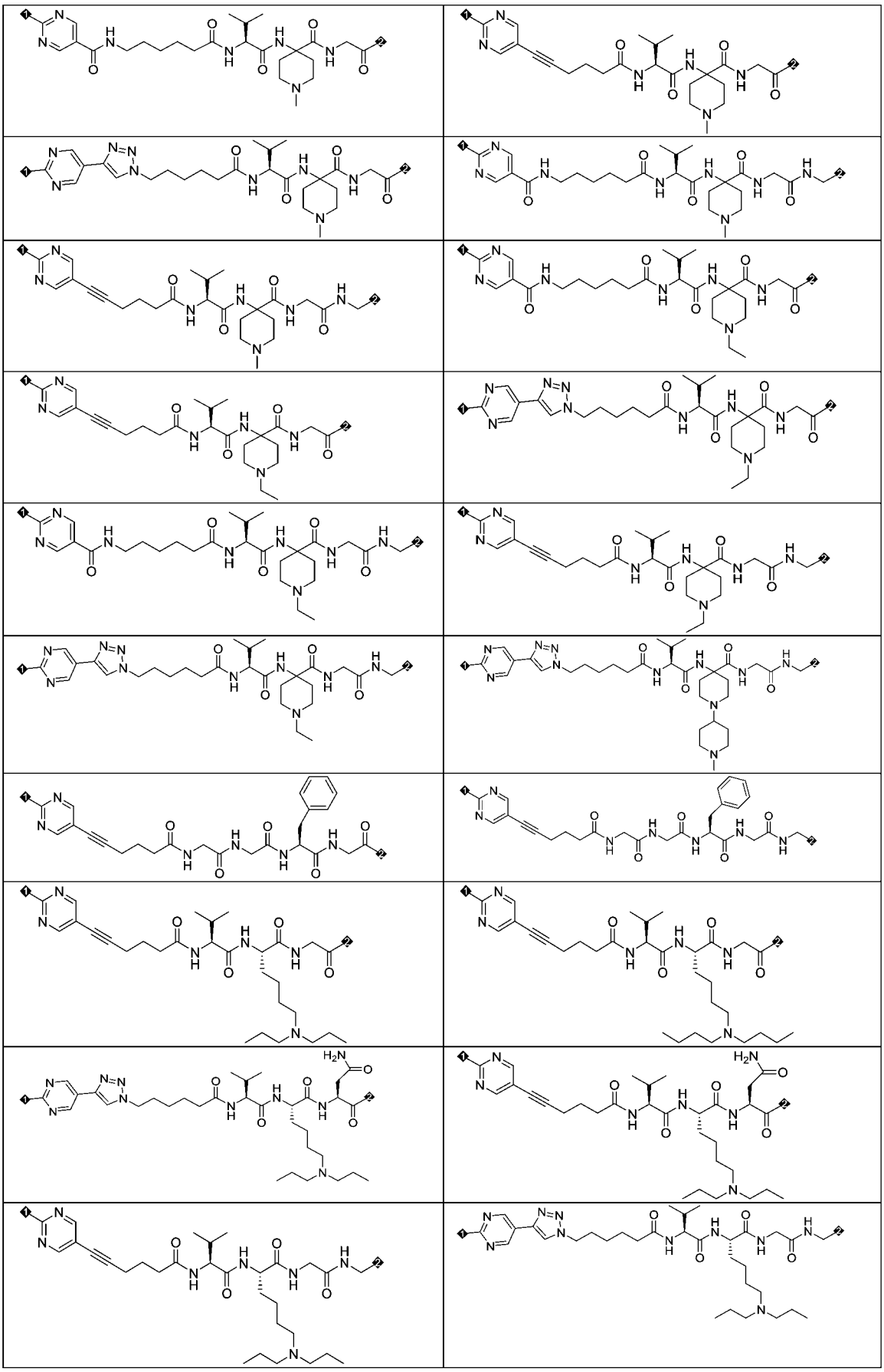
。

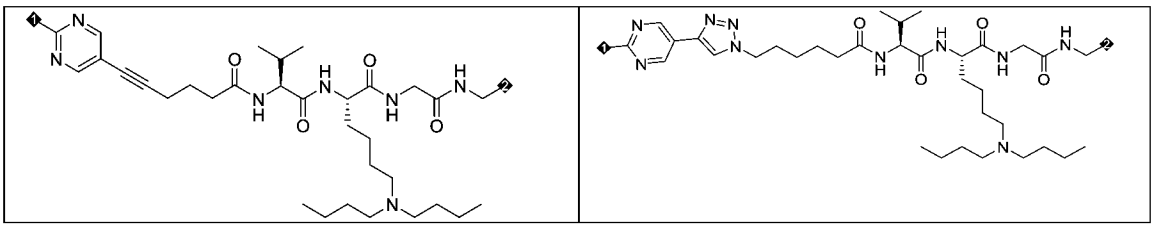
【請求項12】如請求項1-11中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，

其中 ❶—L_1—L_2—L_3—L_4—❷ 的結構選自以下：





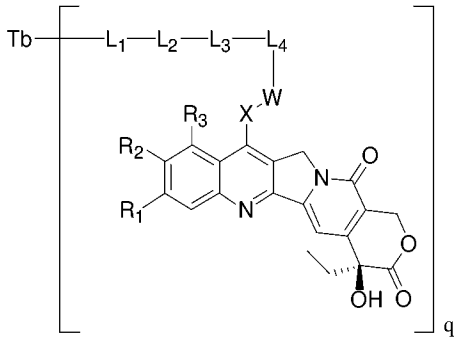




其中，1位與Tb相連，2位與D相連。

【請求項13】如請求項1-12中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，

其中，所述配體藥物偶聯物具有式I所式結構：



式I

其中：Tb、L1、L2、L3、L4和q的定義如請求項1-12中任一項所述；

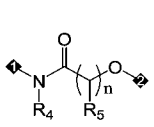
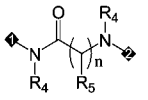
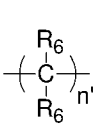
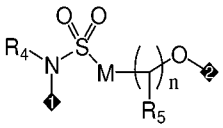
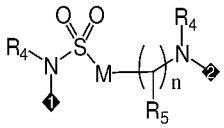
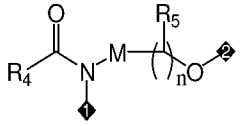
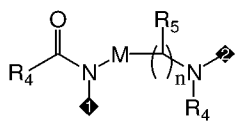
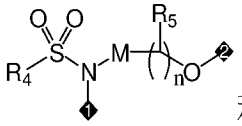
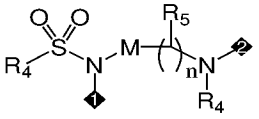
R_1、R_2各自獨立地選自H、鹵素、-OH、任選取代的C1-6烷基和任選取代的C1-6烷氧基，或者，

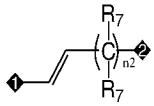
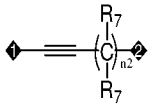
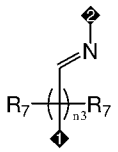
R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-7元碳環或5-7元雜環，所述雜環含有1個或多個O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

R_3選自H、鹵素、-OH、$-NH_2$、任選取代的C1-6烷基和任選取代的C1-6烷氧基，或者，

R_3和X和與其相連的碳原子一起形成5-7元碳環或5-7元雜環，所述雜環含有1個或多個O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合，或者，

R_3和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-7元碳環或5-7元雜環，所述雜環含有1個或多個O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連；

X選自直接鍵，任選取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-NR_4-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$-、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C3-6環烷基、C6-10芳基、5-10元雜芳基和4-10元雜環基，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自一個或多個C1-4烷基、C3-6環烷基，或者多個C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基；

各M獨立地選自直接鍵和-$CR^{5a}R^{5b}$-；

R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R_7各自獨立地選自H、任選取代的C1-4烷基、任選取代的C1-4烷氧基和任選取代的C3-6環烷基；

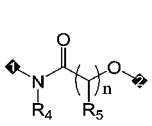
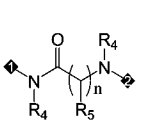
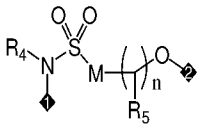
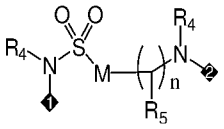
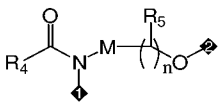
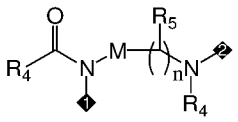
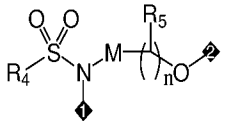
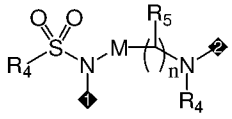
n、n’、n1、n2、n3各自獨立地選自0到6之間的任意整數；

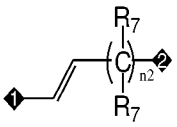
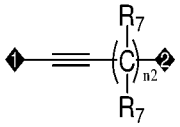
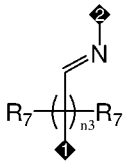
1位與喜樹鹼母核相連，2位與W或L_4相連。

【請求項14】如請求項13所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

（1）R_1、R_2各自獨立地選自H、鹵素、C1-4烷基；或者，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-6元雜環，所述雜環含有1個、2個或3個O，S或N或其任意組合；

（2）R_3選自H、C1-4烷基；或，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成5-6元碳環；

（3）W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連；

（4）X選自任選取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C6-10芳基、5-10元雜芳基和4-10元雜環基，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基，或者2個C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基；

（5）R_4、R_5各自獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基；

（6）R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H和C1-4烷基；

（7）各R_7獨立地選自H和C1-4烷基；

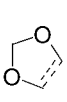
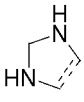
（8）n選自1、2和3；

（9）n1選自1、2、3和4；

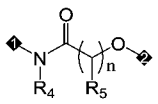
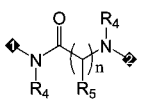
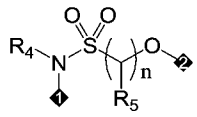
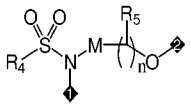
（10）n2為1；

（11）n3為0。

【請求項15】如請求項13或14所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

（1）R_1選自H和鹵素，R_2選自H和C1-4烷基；或，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成  、  、 或 ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的位置；

（2）R_3為H；或，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位置；

（3）W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  和  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連；

（4）各R_4獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基，R_5為H；

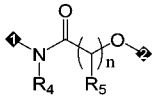
（5）R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H和甲基；

（6）R_7為H；

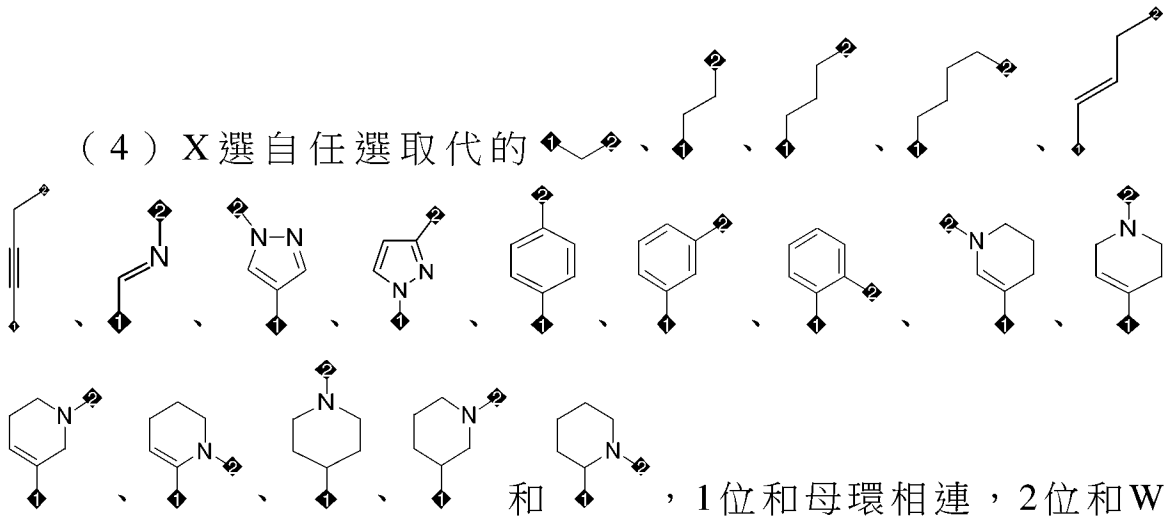
（7）n為1。

【請求項16】 如請求項13-15中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其滿足如下條件中的一個或多個：

（1）R_1為H或F，R_2為H或甲基；或，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的位置；

（2）W選自-O-、-NR_4-和  ，1位X相連，2位與L_4或L_3相連；

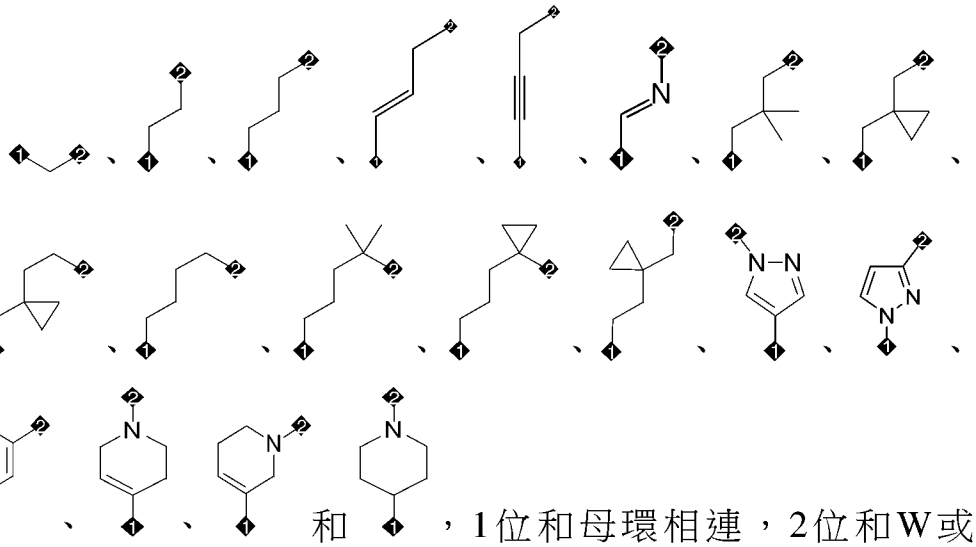
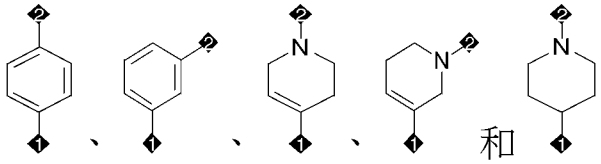
（3）各R_4獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、異丙基、第三丁基和環丙基，R_5為H；

（4）X選自任選取代的  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基，或者2個C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基；所述的C1-4烷基如甲基；所述的C3-6環烷基如環丙基。

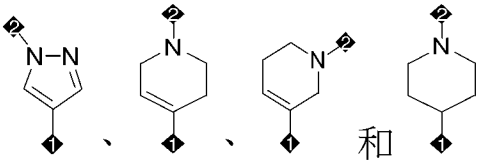
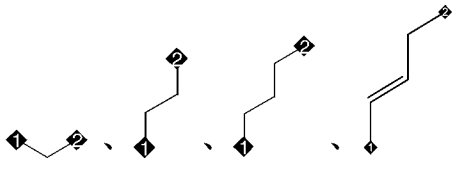
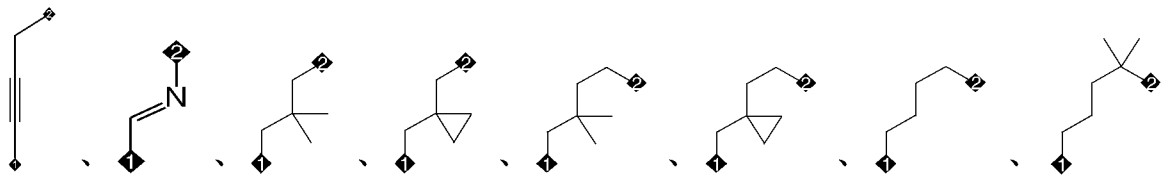
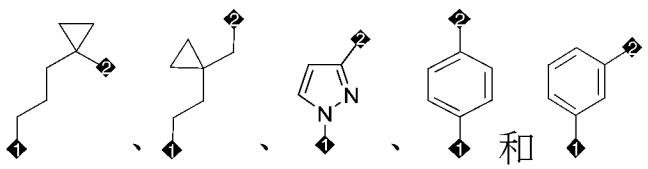
【請求項17】如請求項13-16中任一項所述的配體藥物偶聯物

或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，

（1）W選自-O-和-NR_4-；

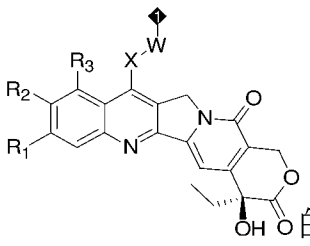
（2）X選自  和  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連。

【請求項18】如請求項13-17中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，

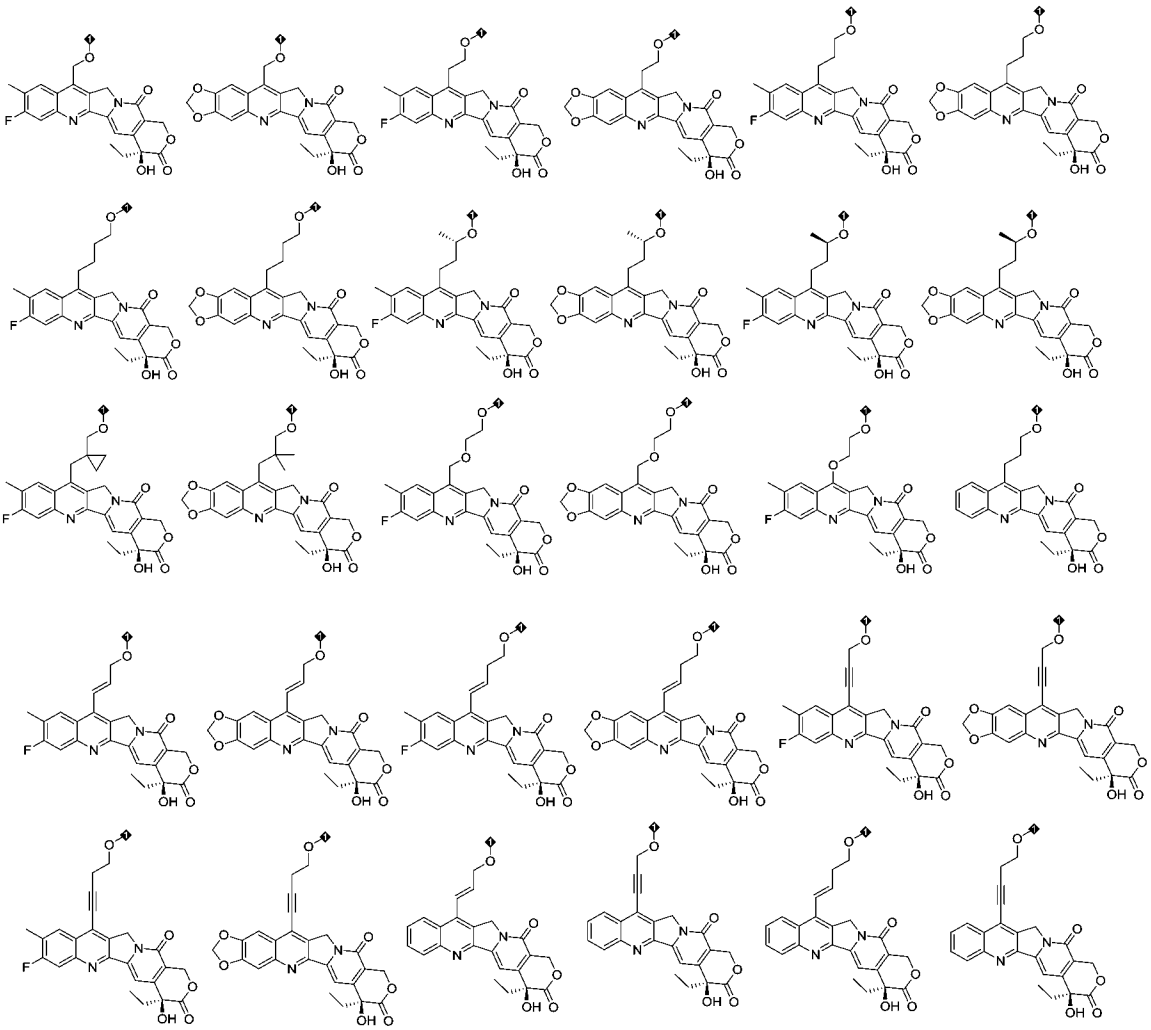
W不存在時，X選自  和，1位和母環相連，2位和L_4相連；W存在時，X選自  、  和  ，1位和母環相連，2位和W相

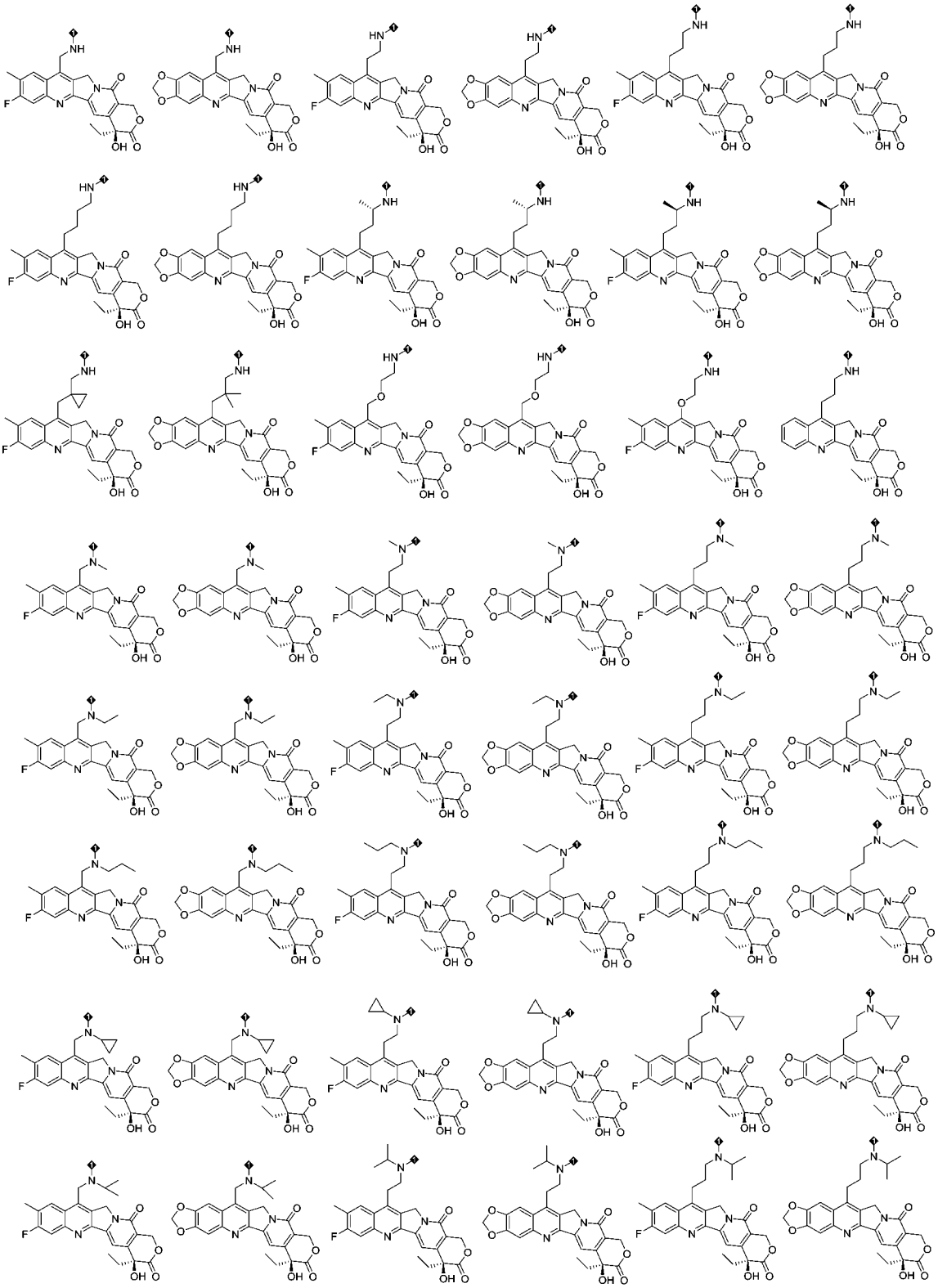
連。

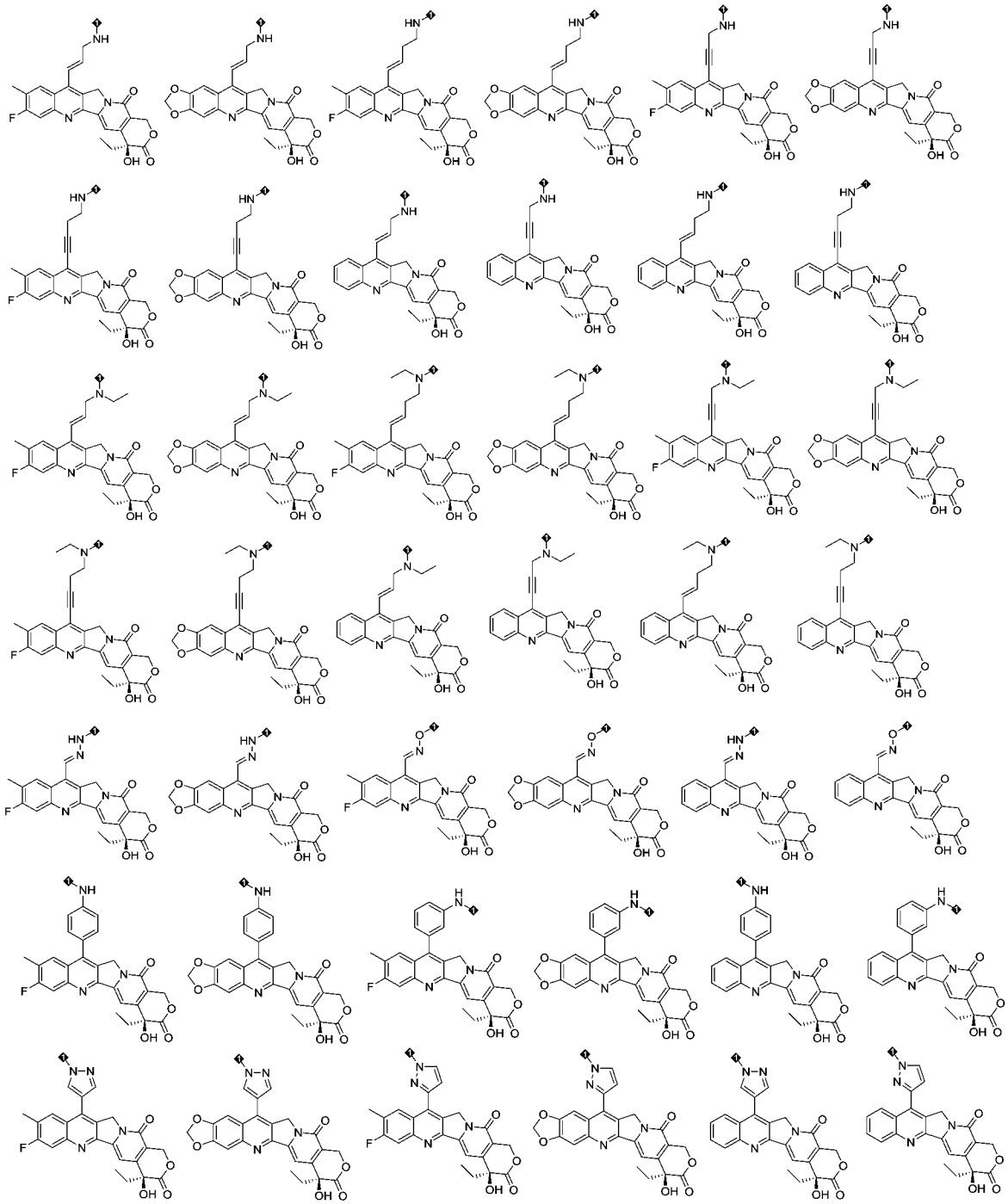
【請求項19】如請求項13-18中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，

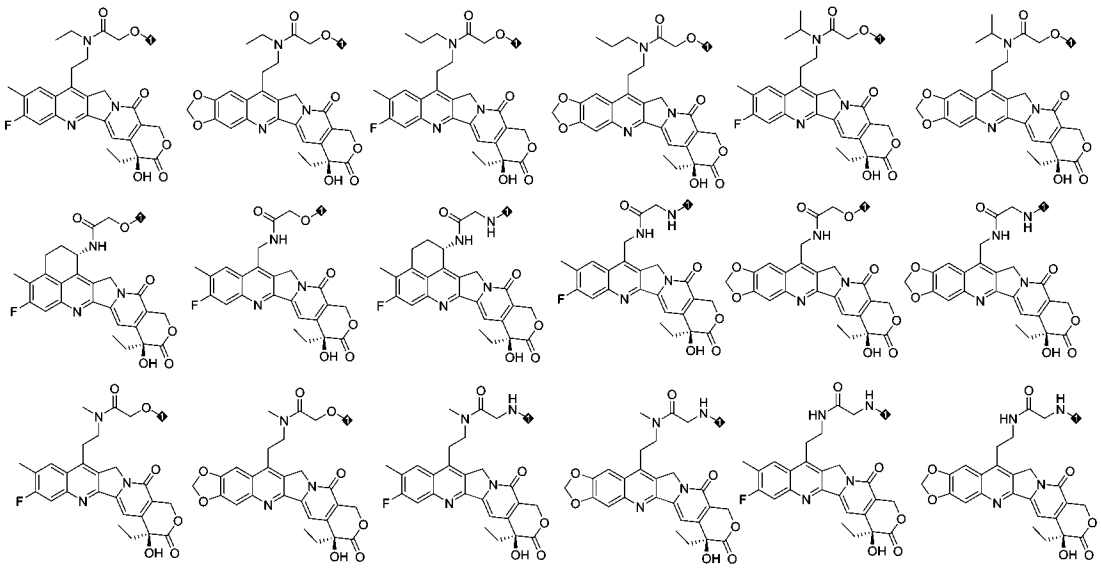


的結構選自以下：



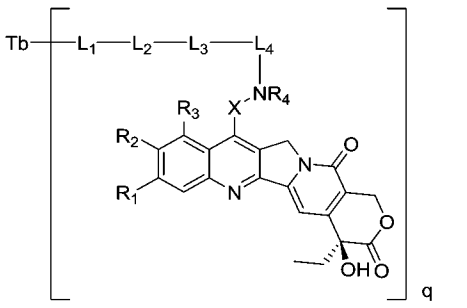






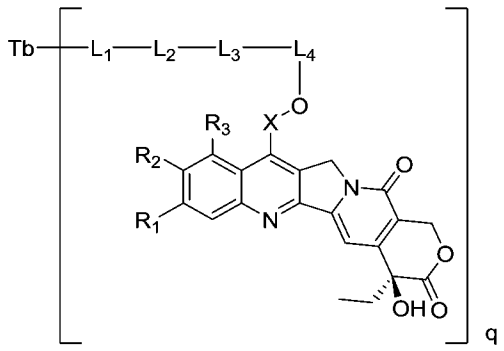
其中，1位與L_4相連；當L_4不存在時，1位與L_3相連。

【請求項20】如請求項13-19中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，所述的配體藥物偶聯物具有式I-1、式I-2或式I-3所式結構：



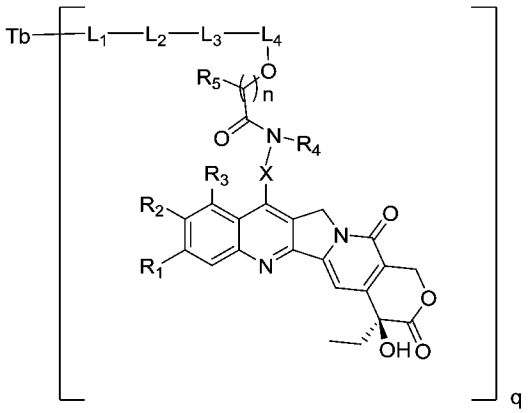
I-1 、

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q如請求項13-19中任一項所定義；



I-2

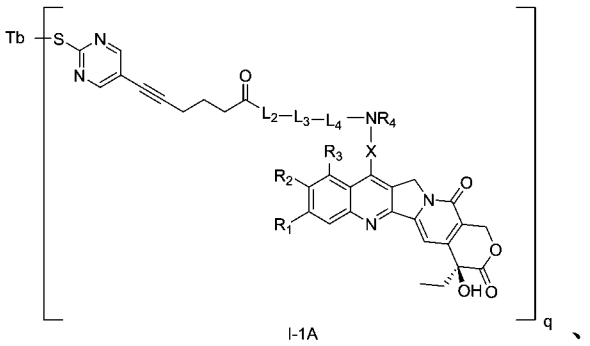
其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q如請求項13-19中任一項所定義；



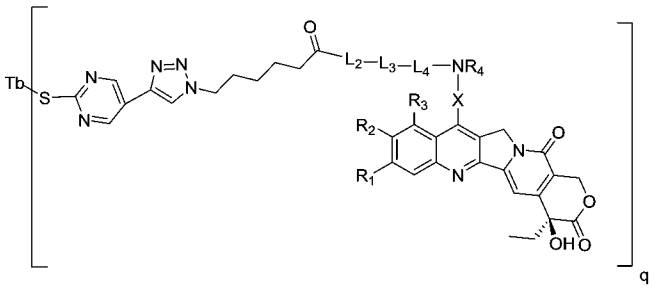
I-3

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和q如請求項13-19中任一項所定義。

【請求項21】如請求項13-20中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，所述配體藥物偶聯物具有式I-1A、式I-1B、式I-2A、式I-2B、式I-3A或式I-3B所式結構：

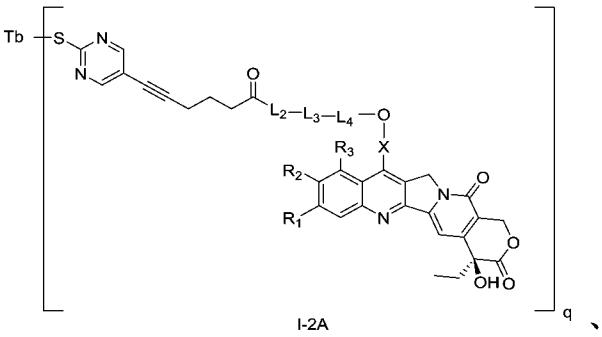


I-1A、

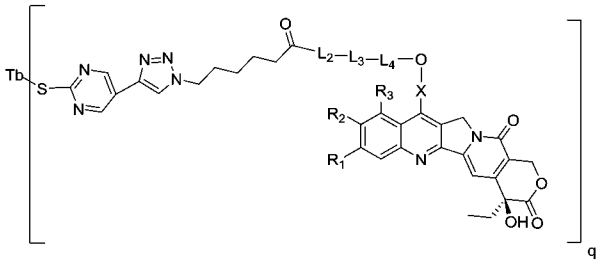


I-1B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q如請求項13-19中任一項所定義；

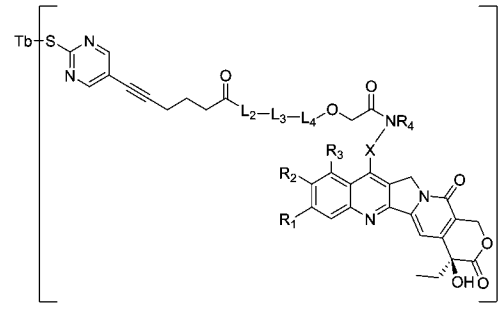


I-2A、

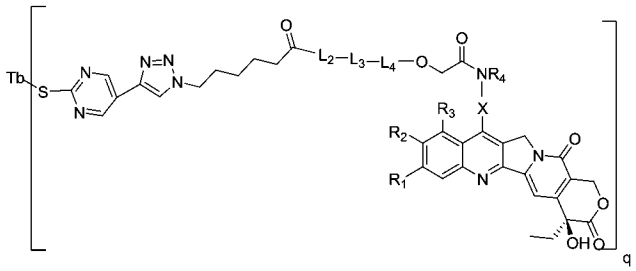


I-2B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q如請求項13-19中任一項所定義；



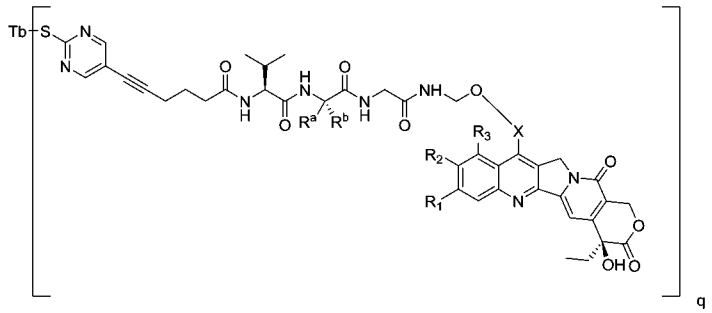
I-3A 、



I-3B

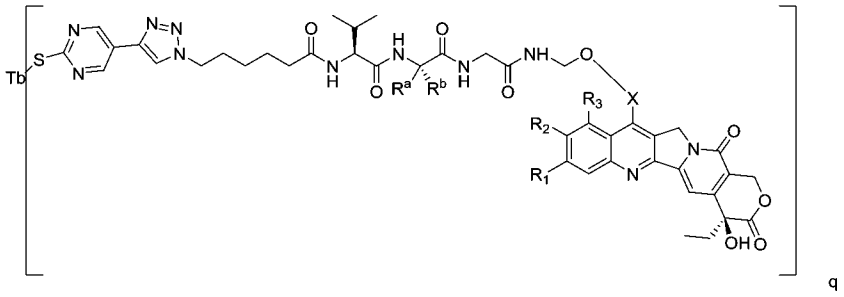
其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q如請求項13-19中任一項所定義。

【請求項22】如請求項13-21中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其中，所述的配體藥物偶聯物具有式I-A或式I-B所式結構：



I-A

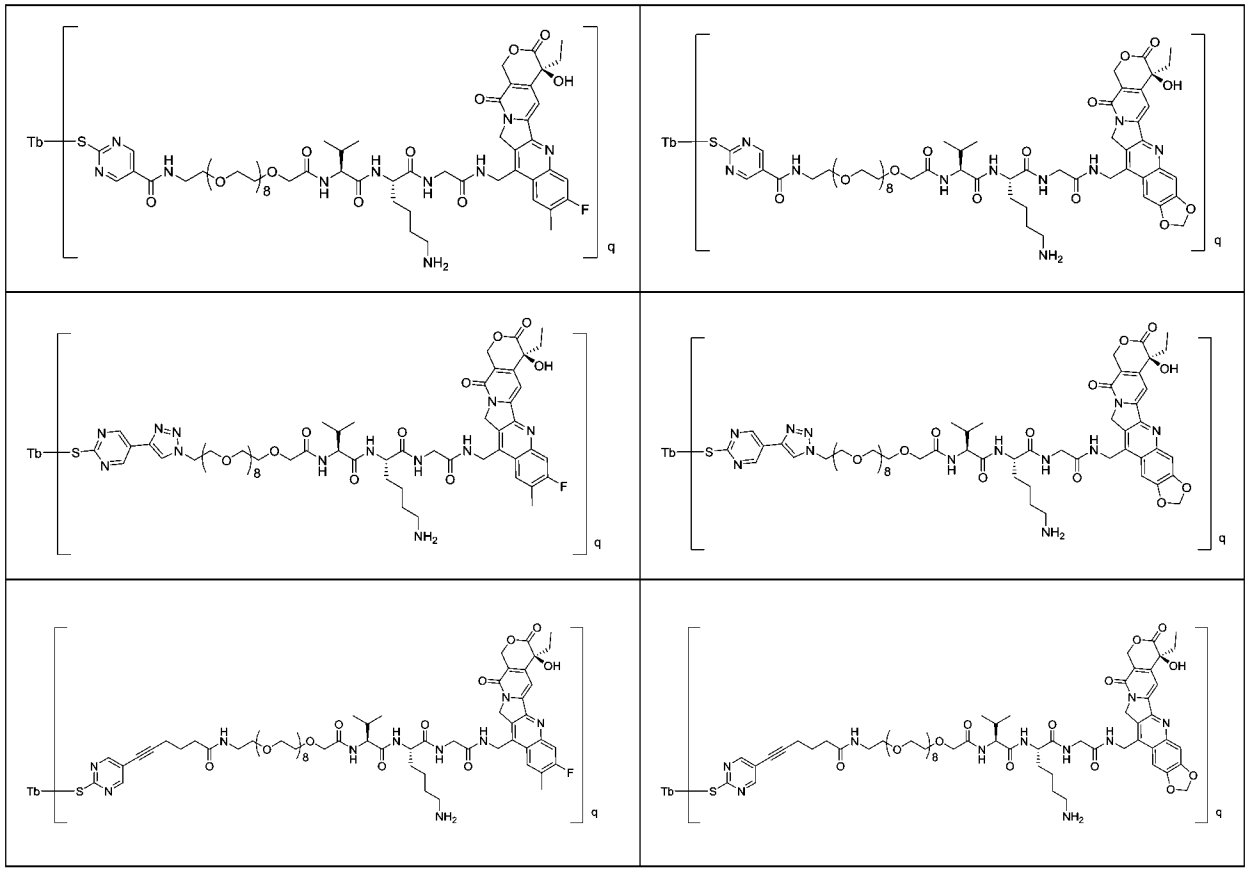
其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q如請求項13-19中任一項所定義；

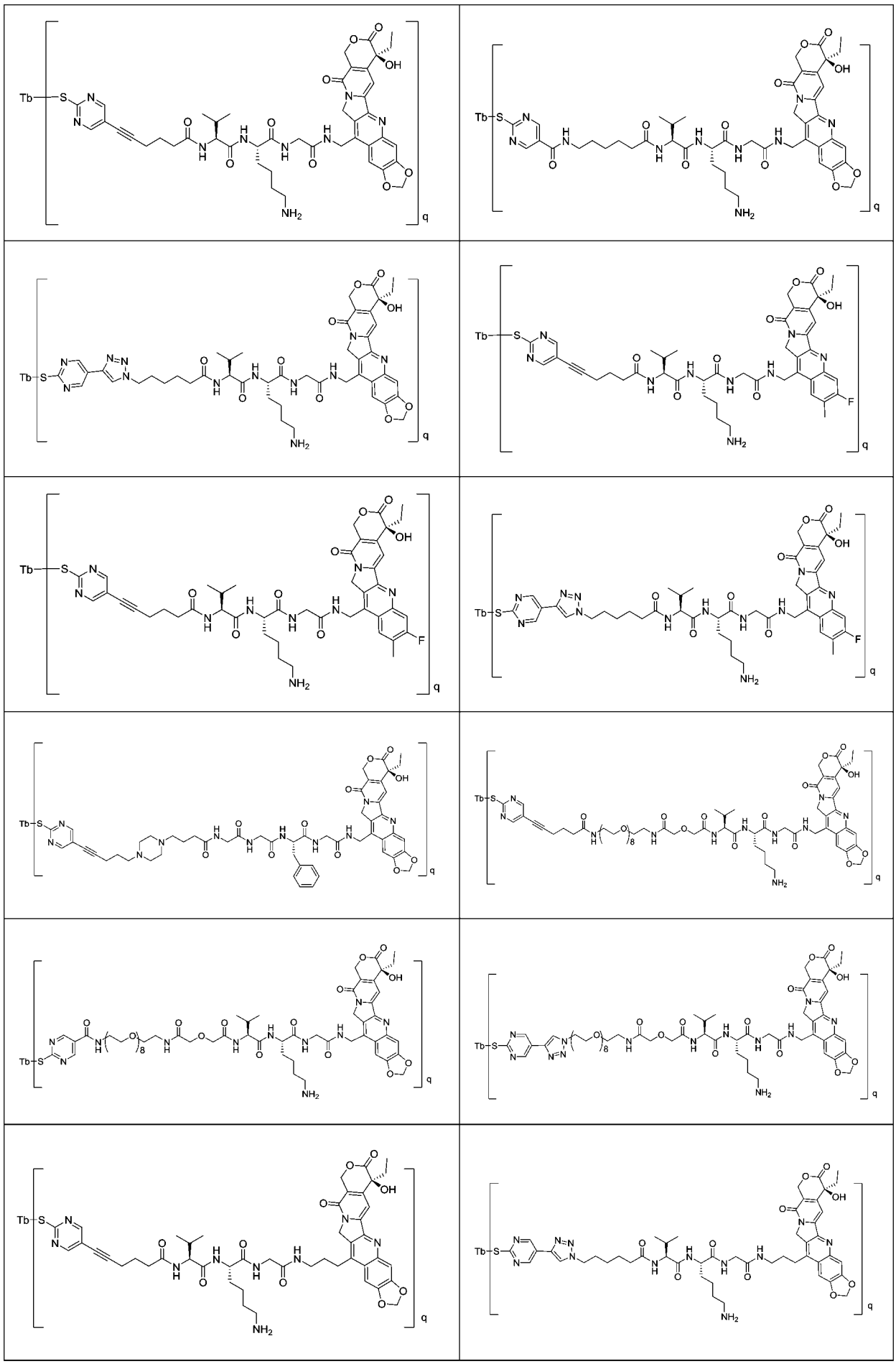


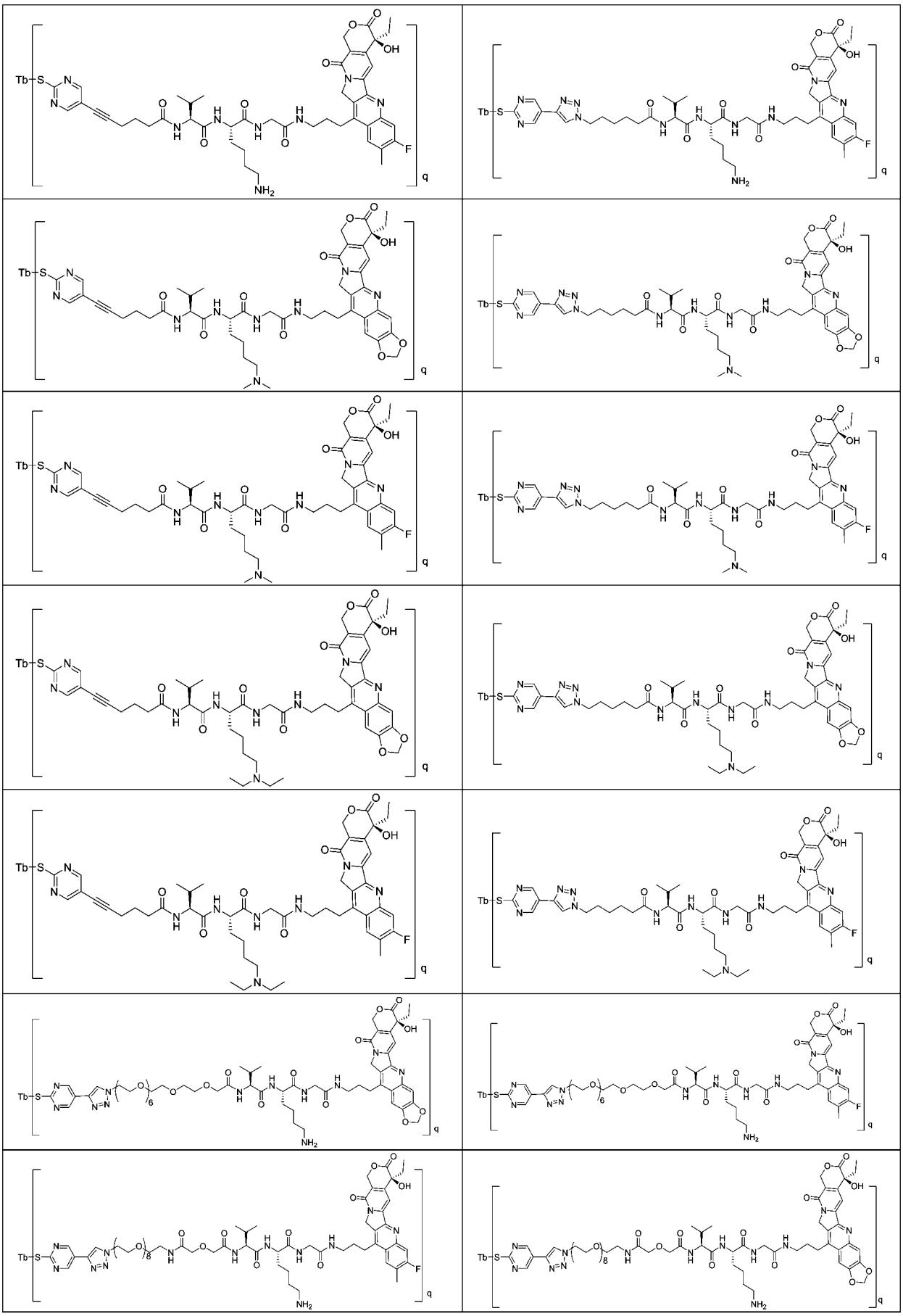
I-B

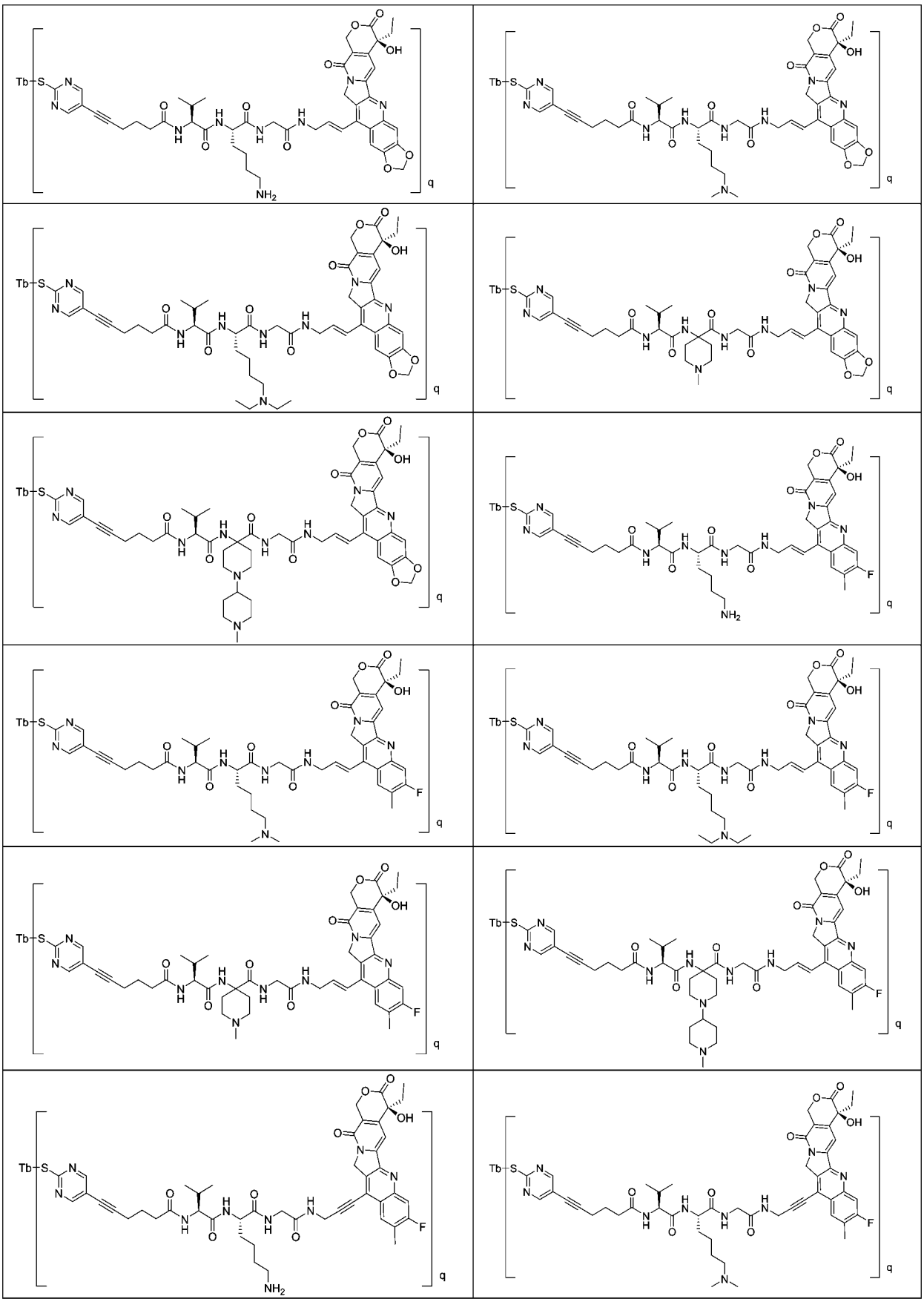
其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q如請求項13-19中任一項所定義。

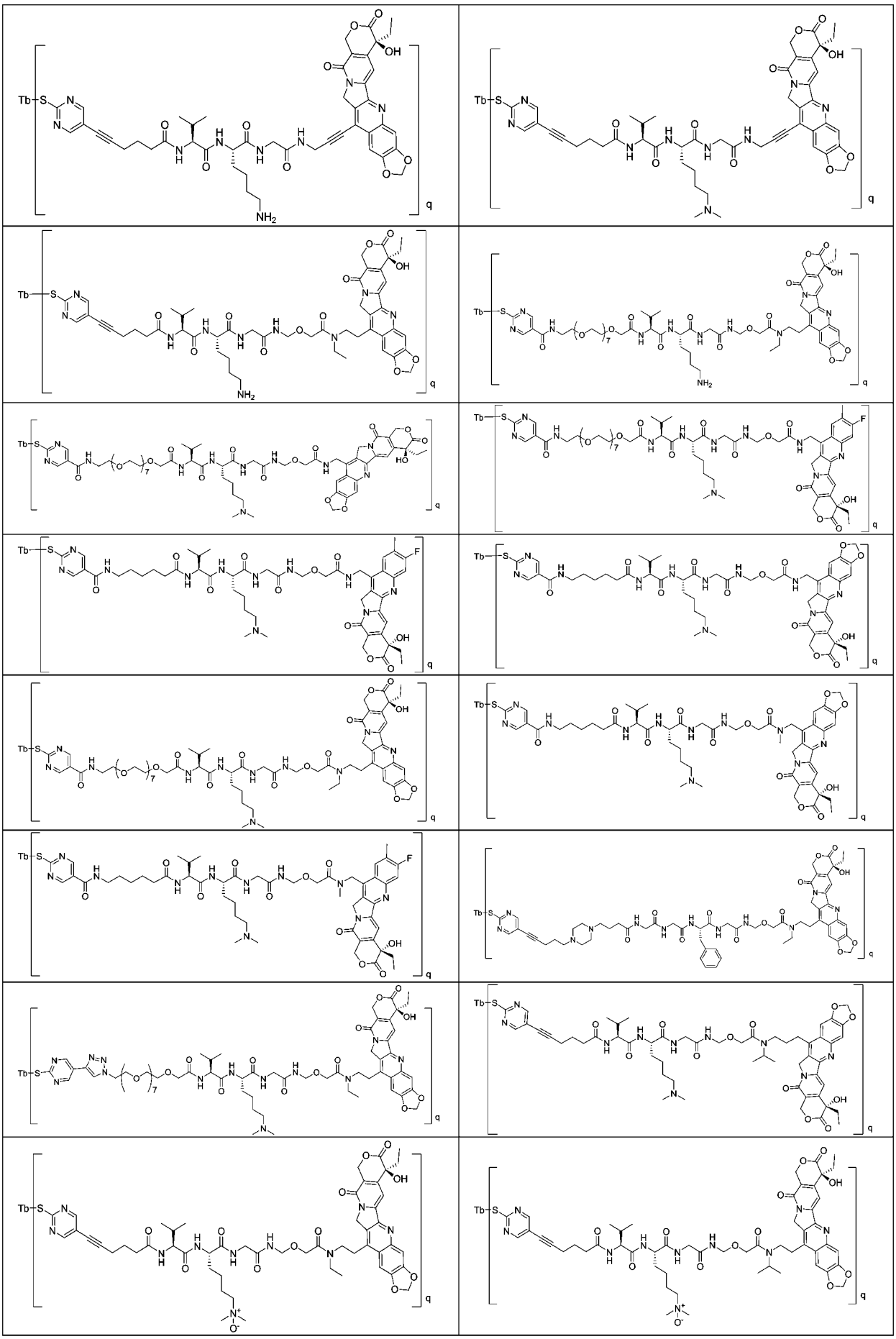
【請求項23】如請求項1-22中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其中，所述的配體藥物偶聯物選自以下：

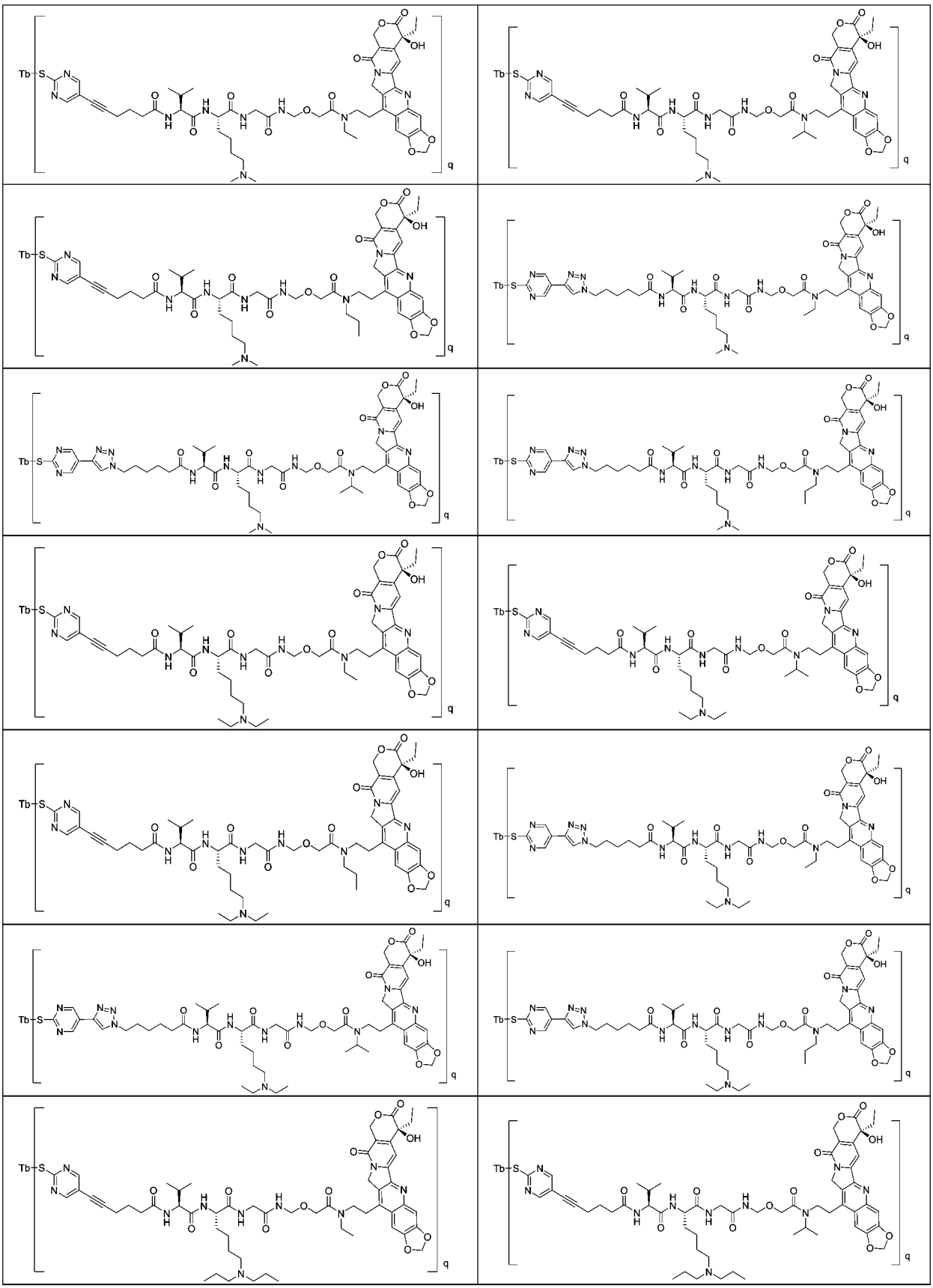


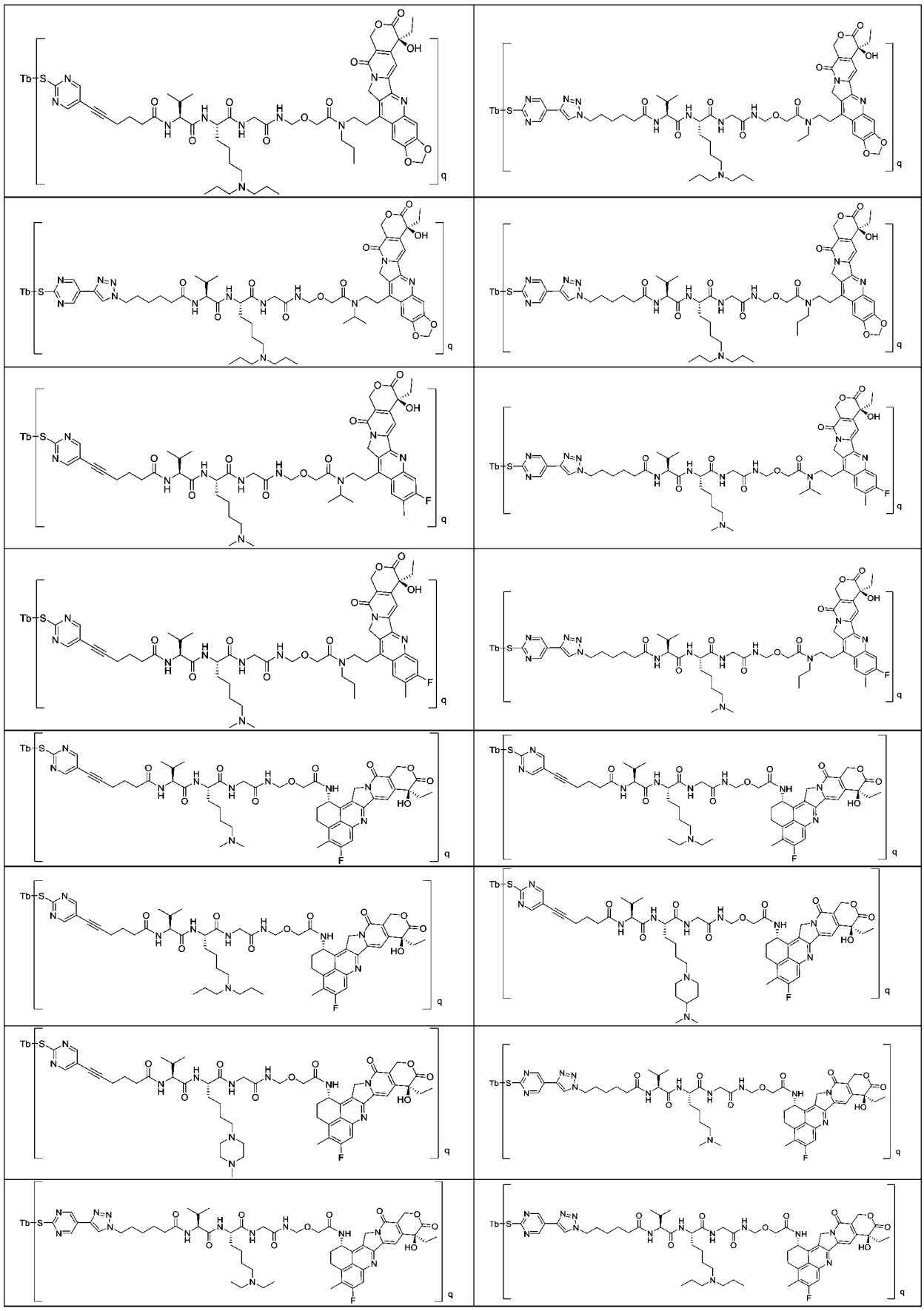


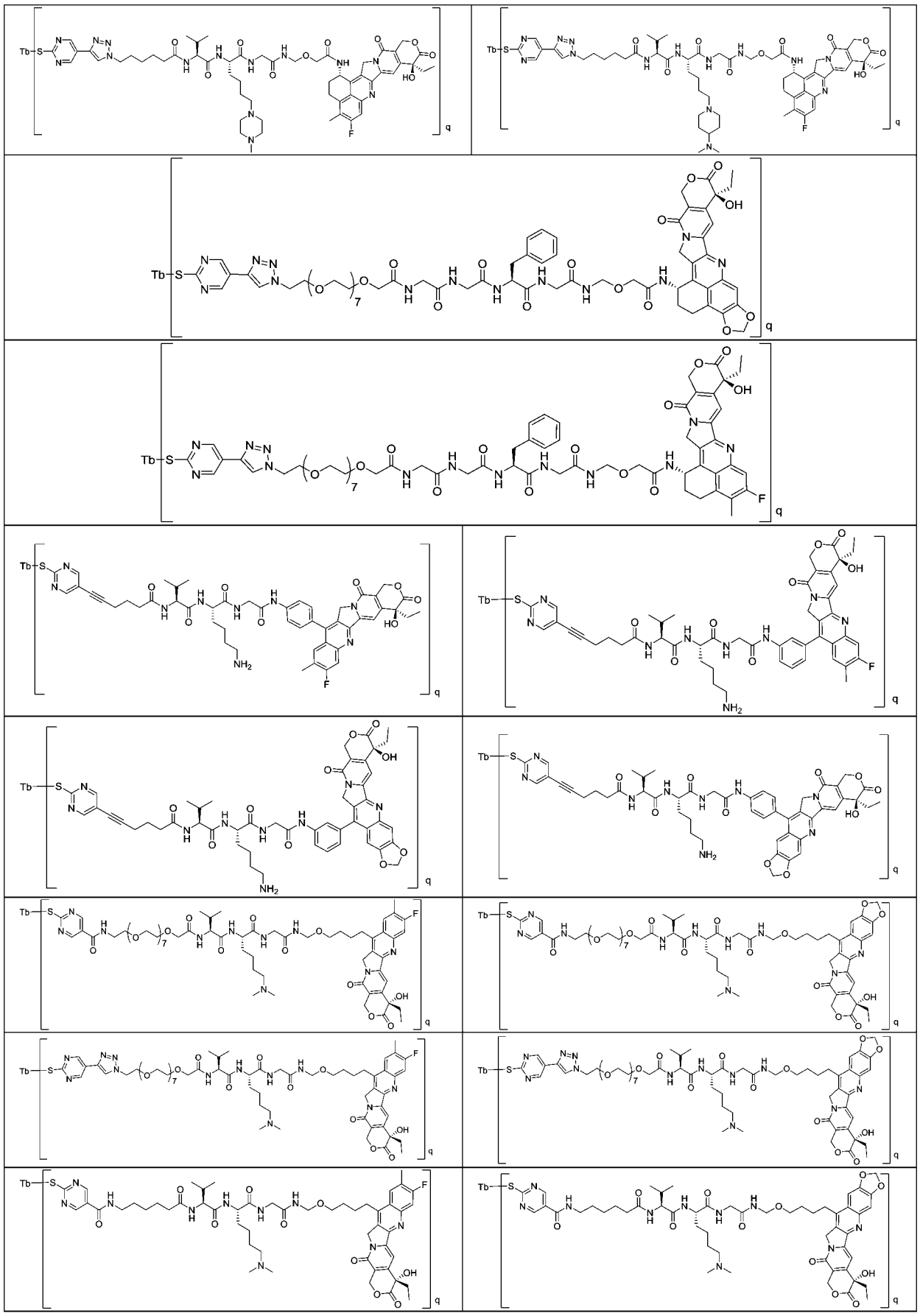


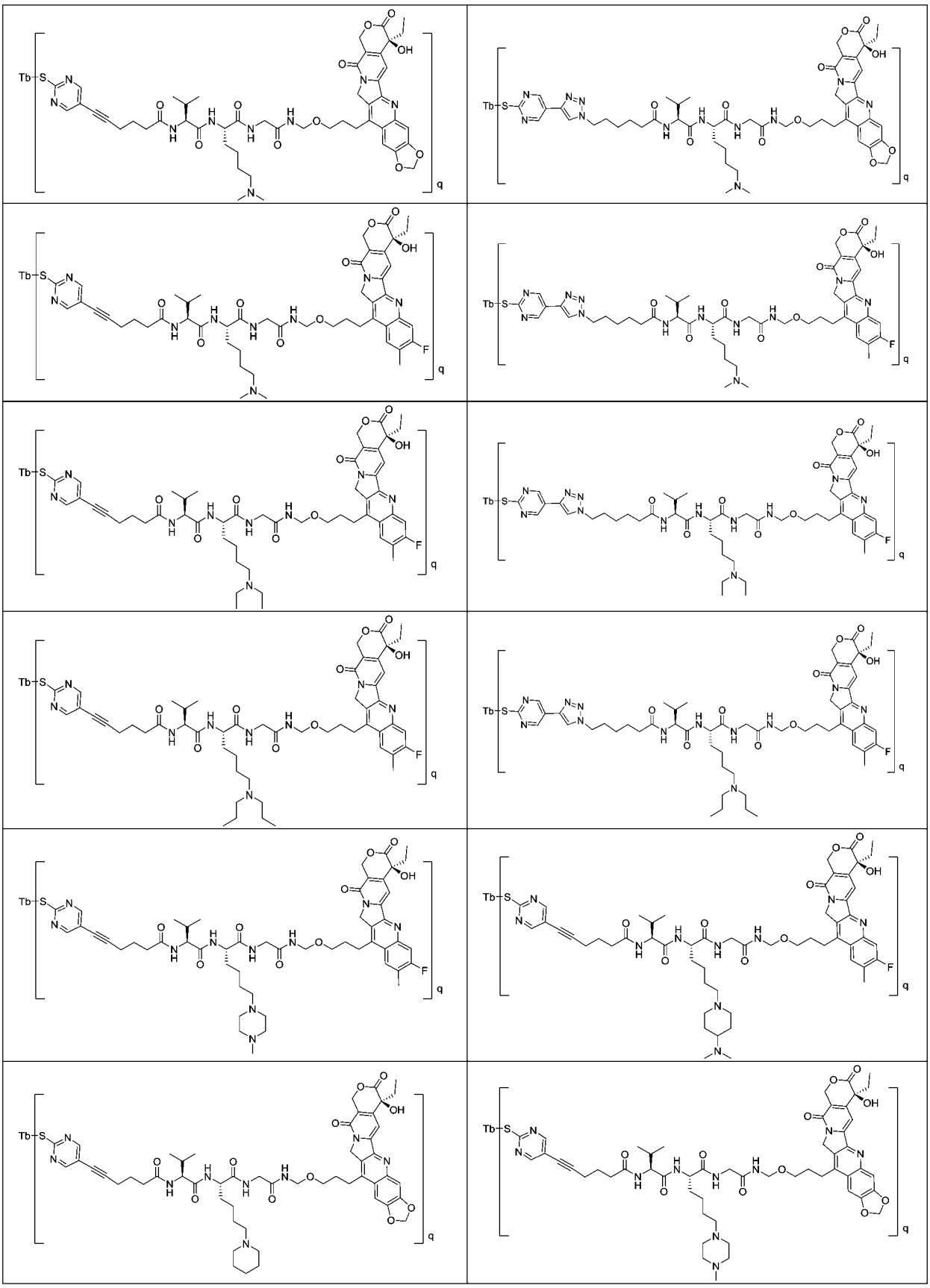


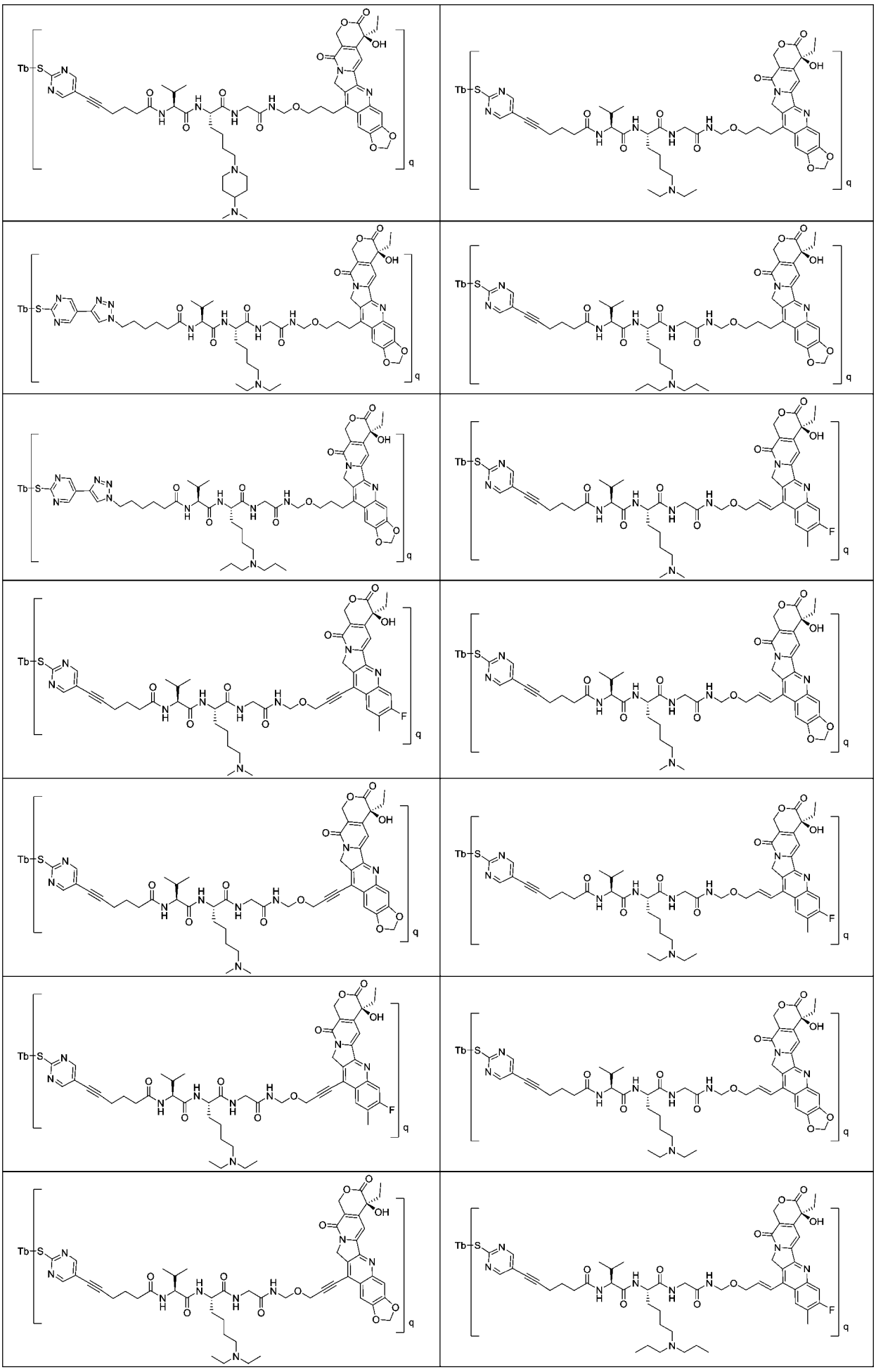


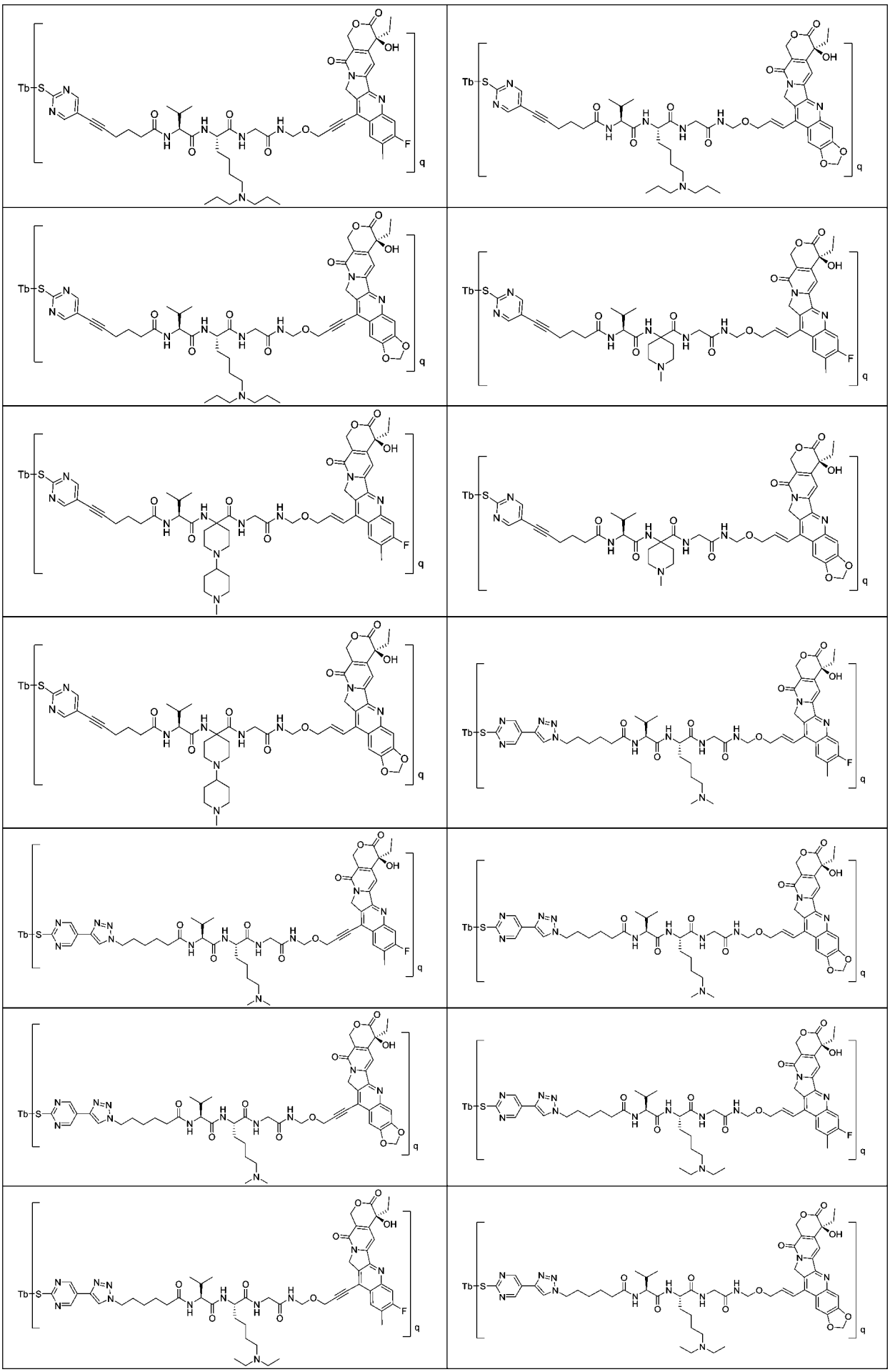


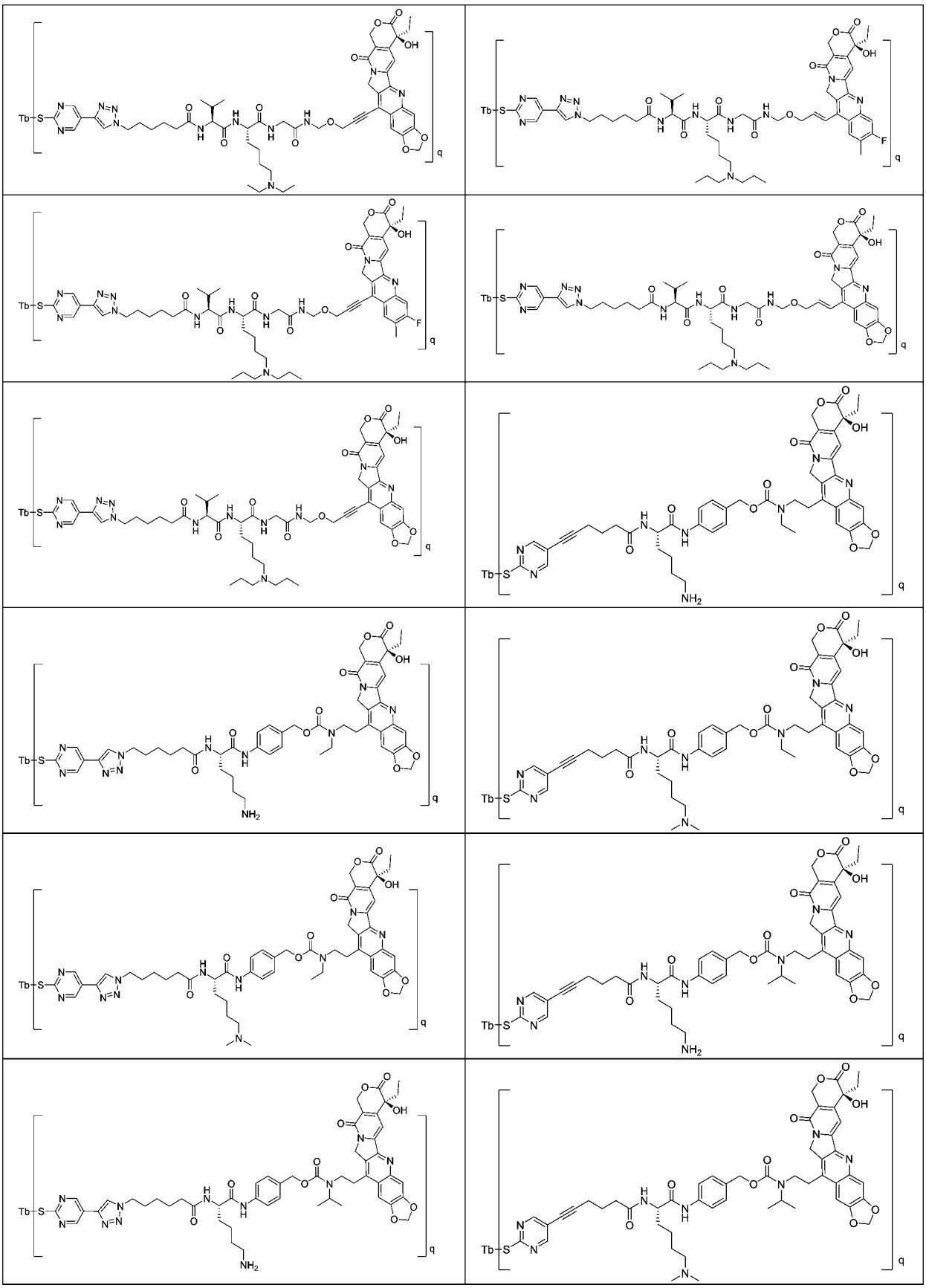


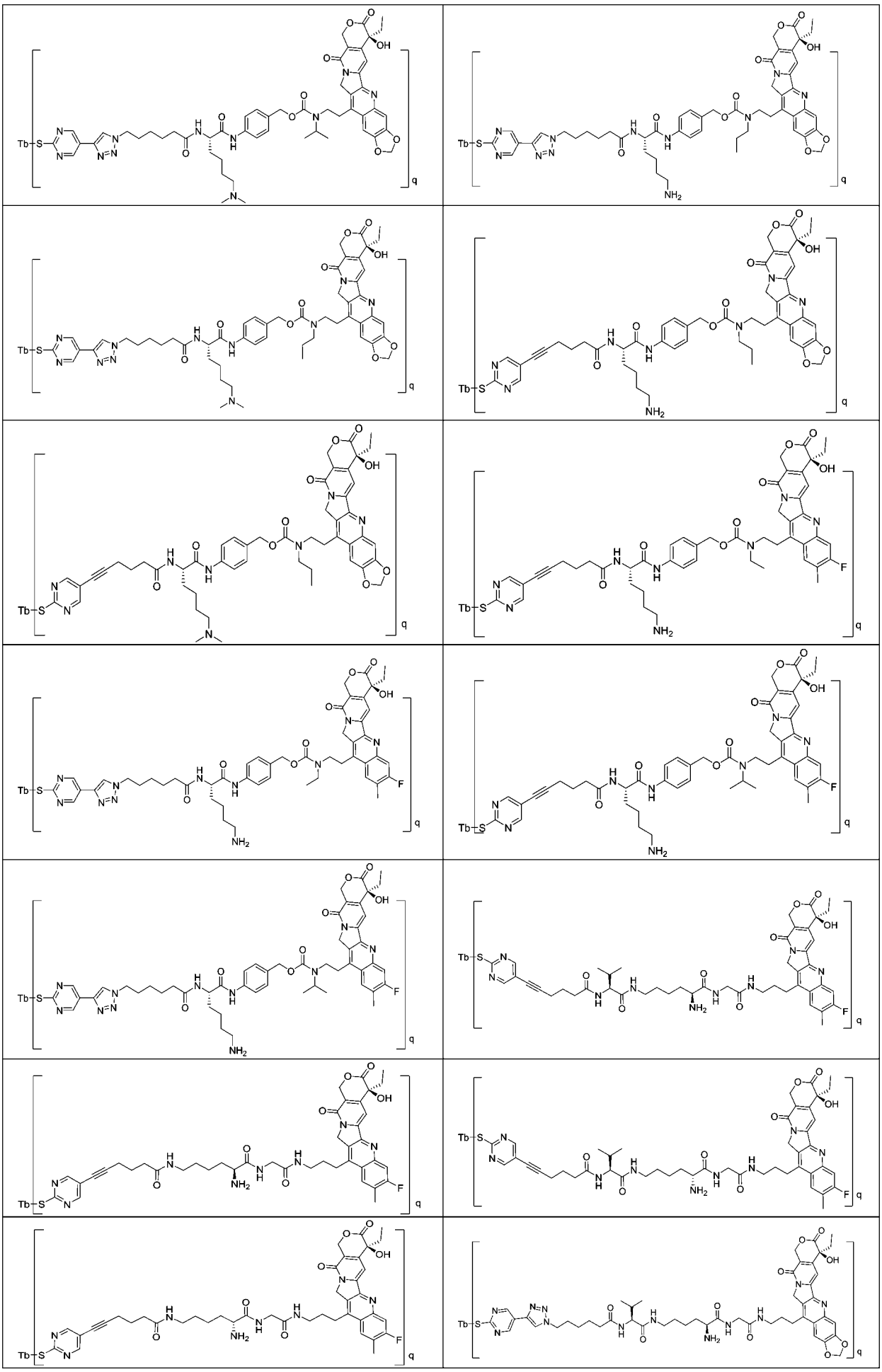


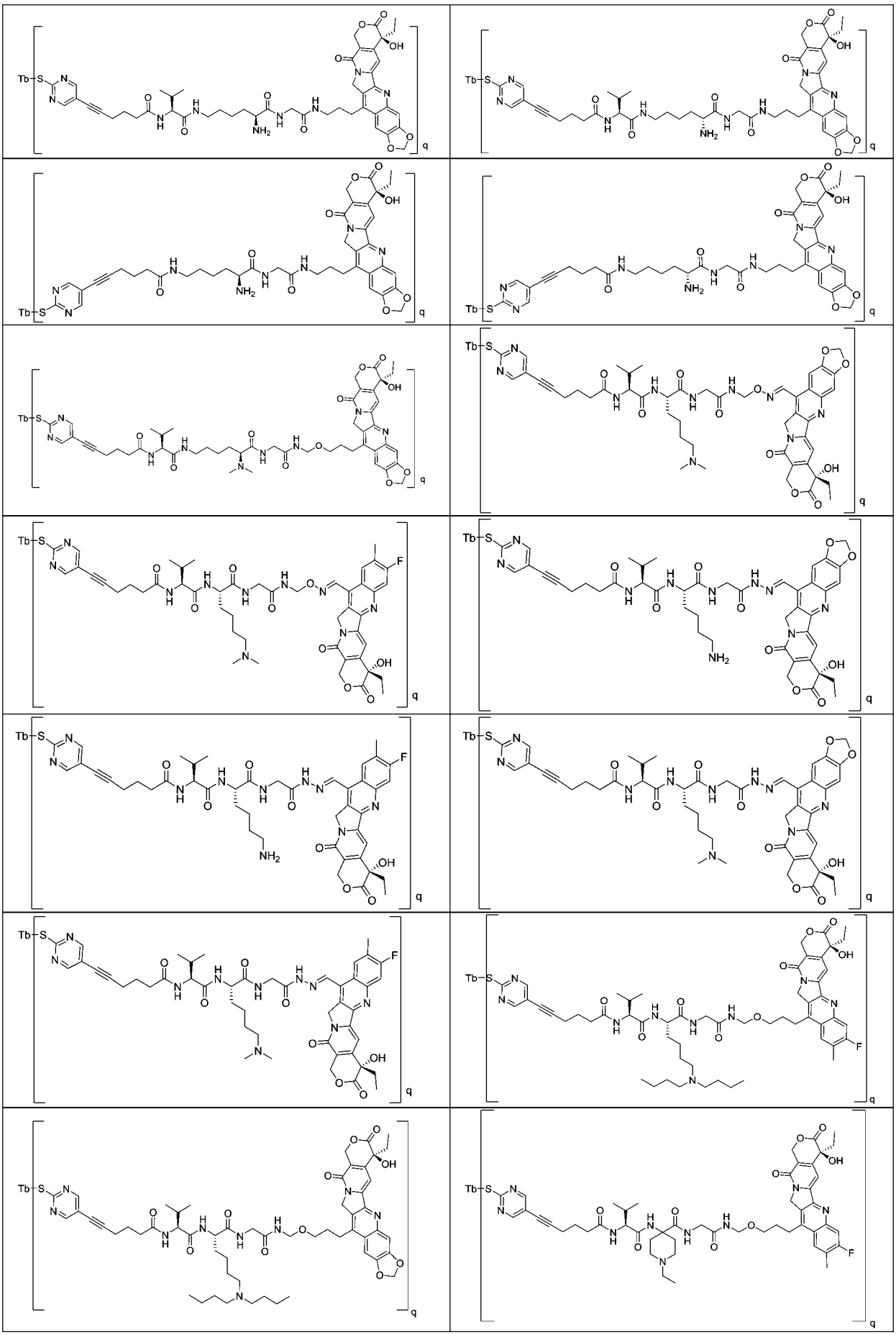


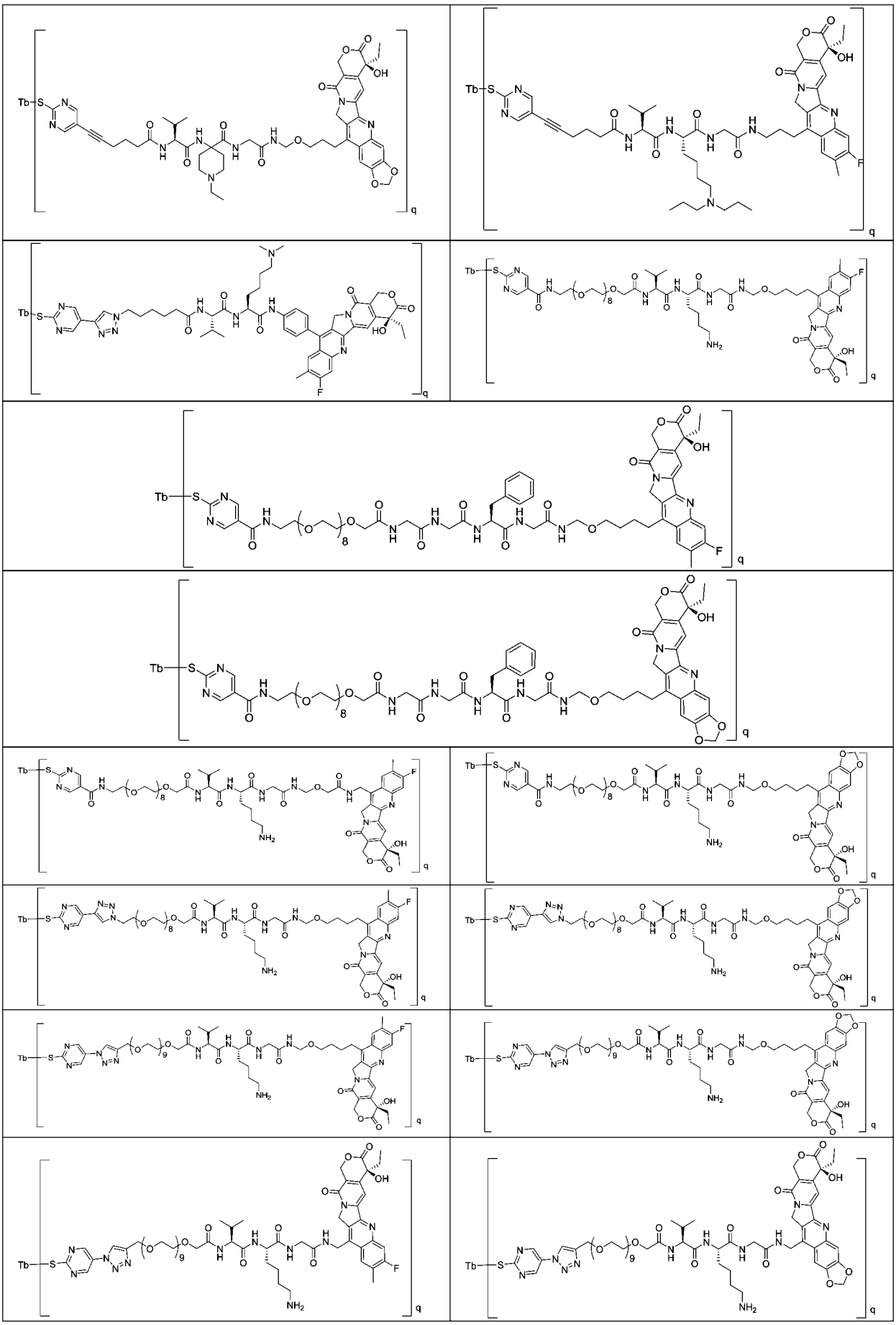


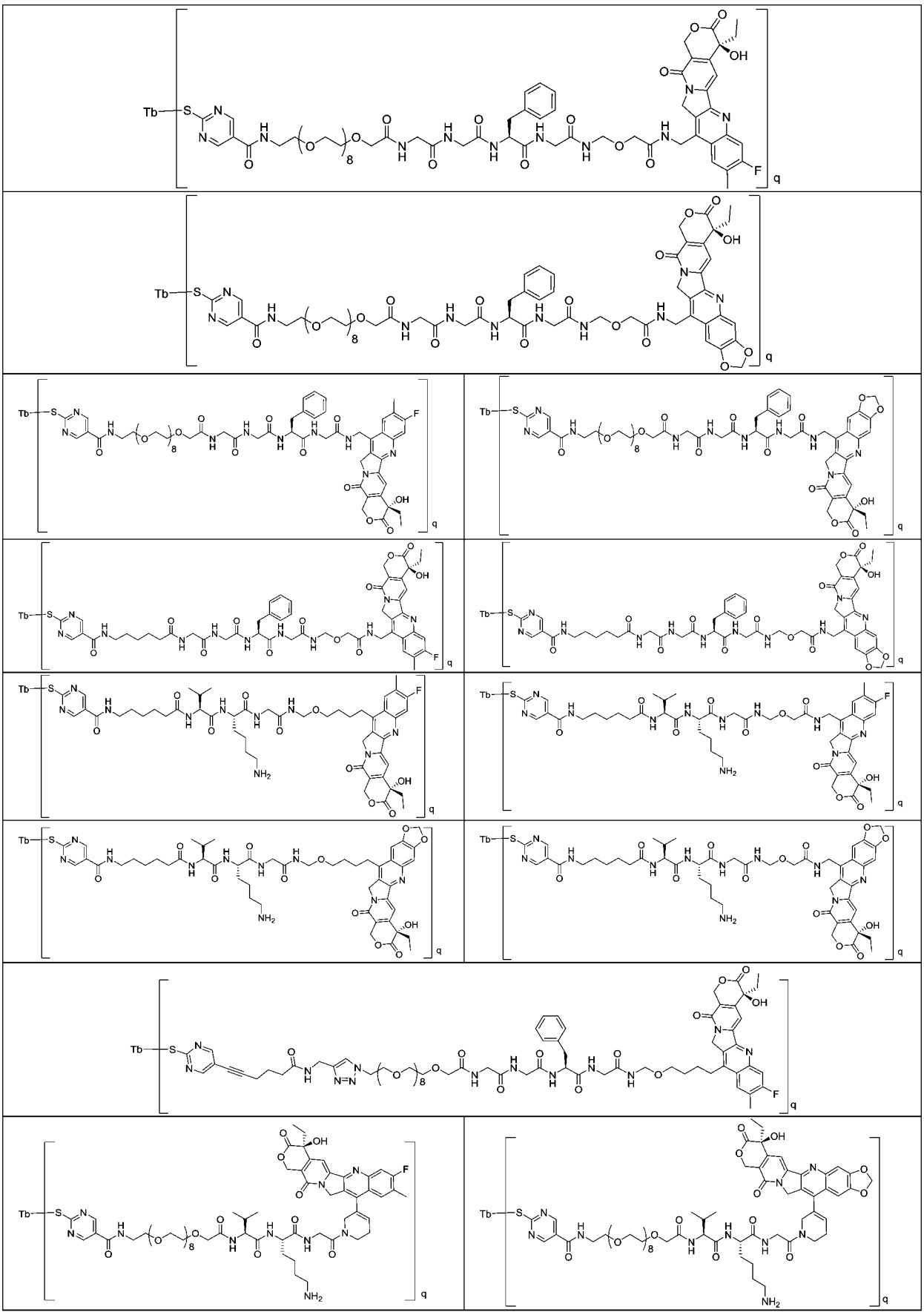


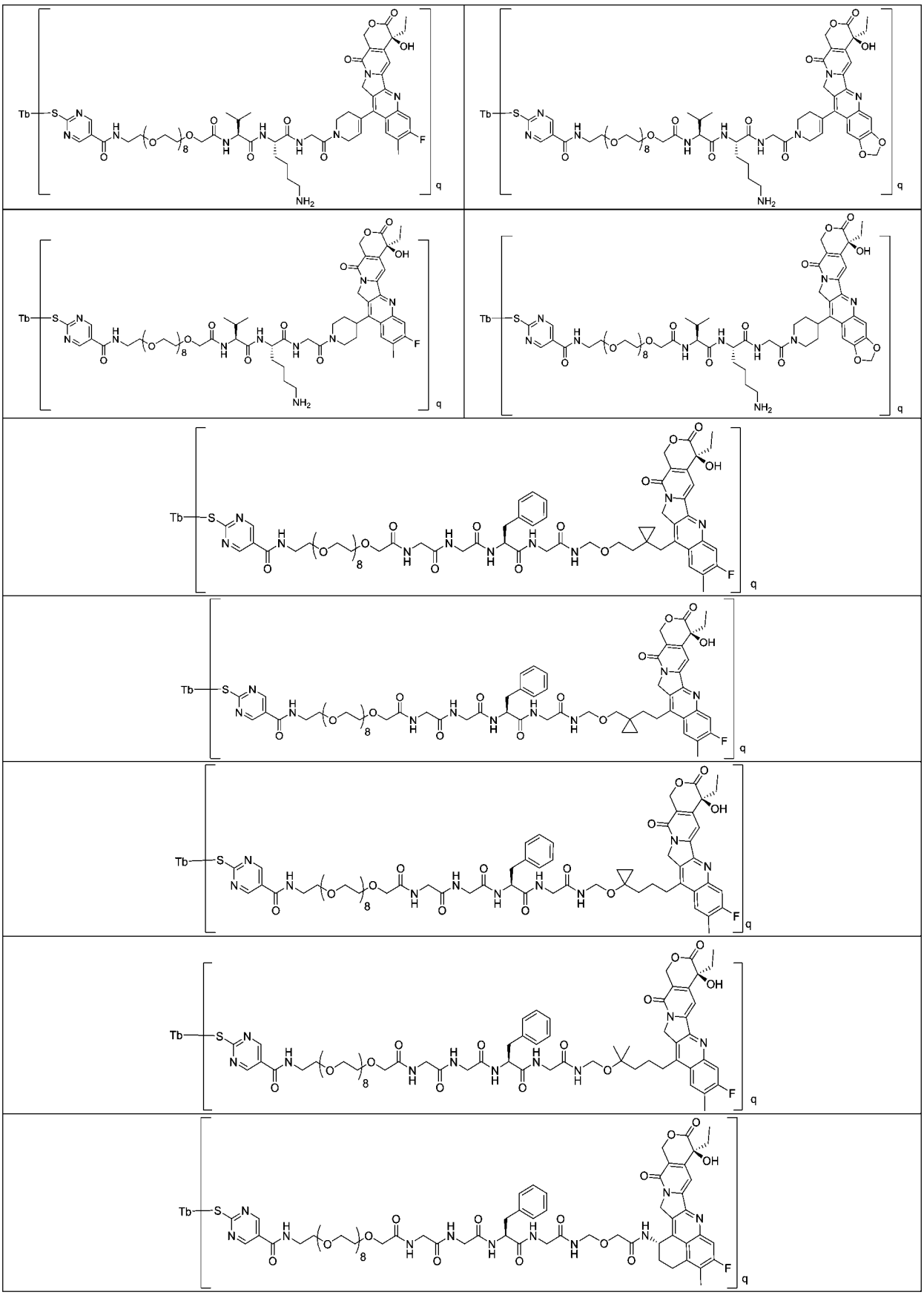


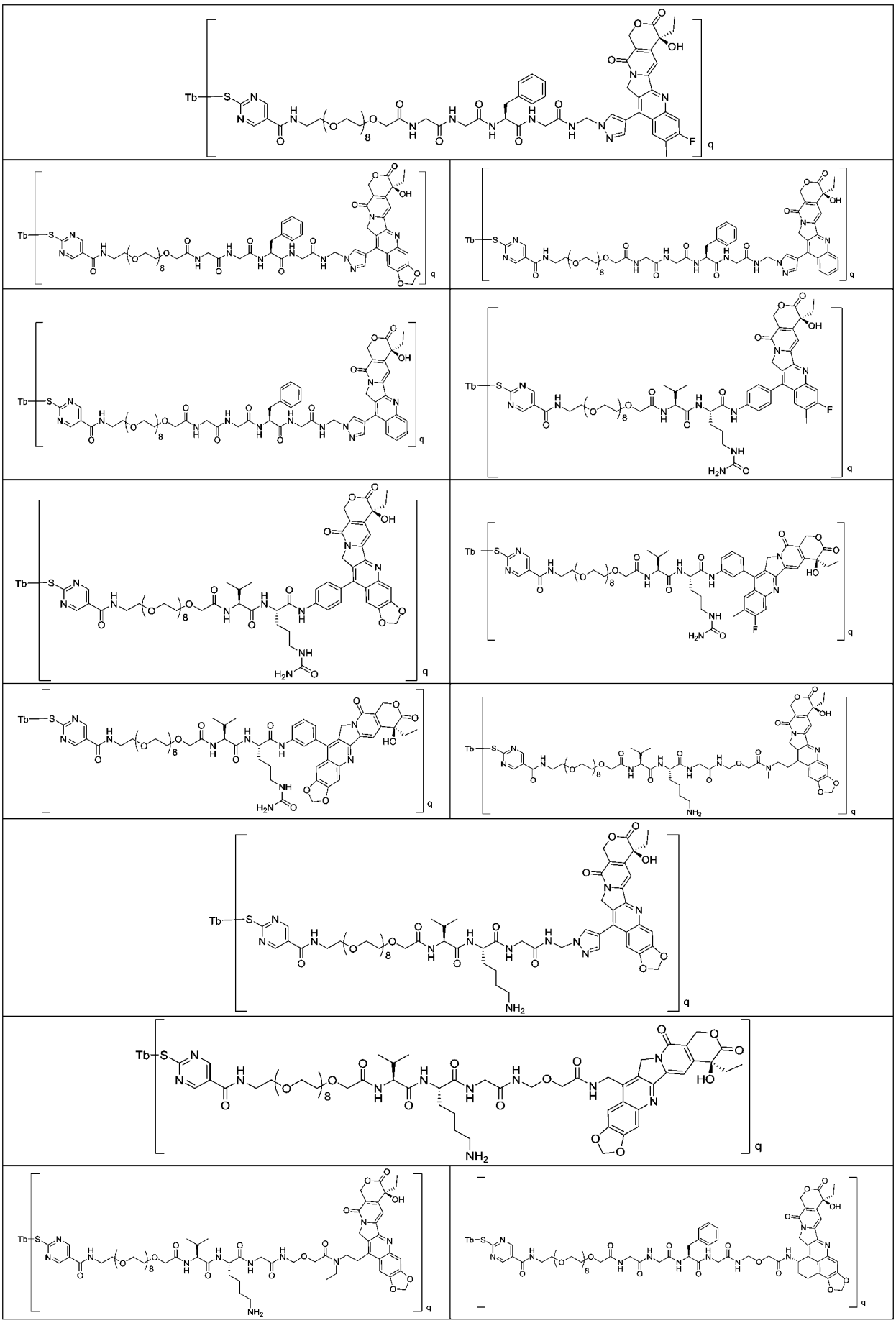


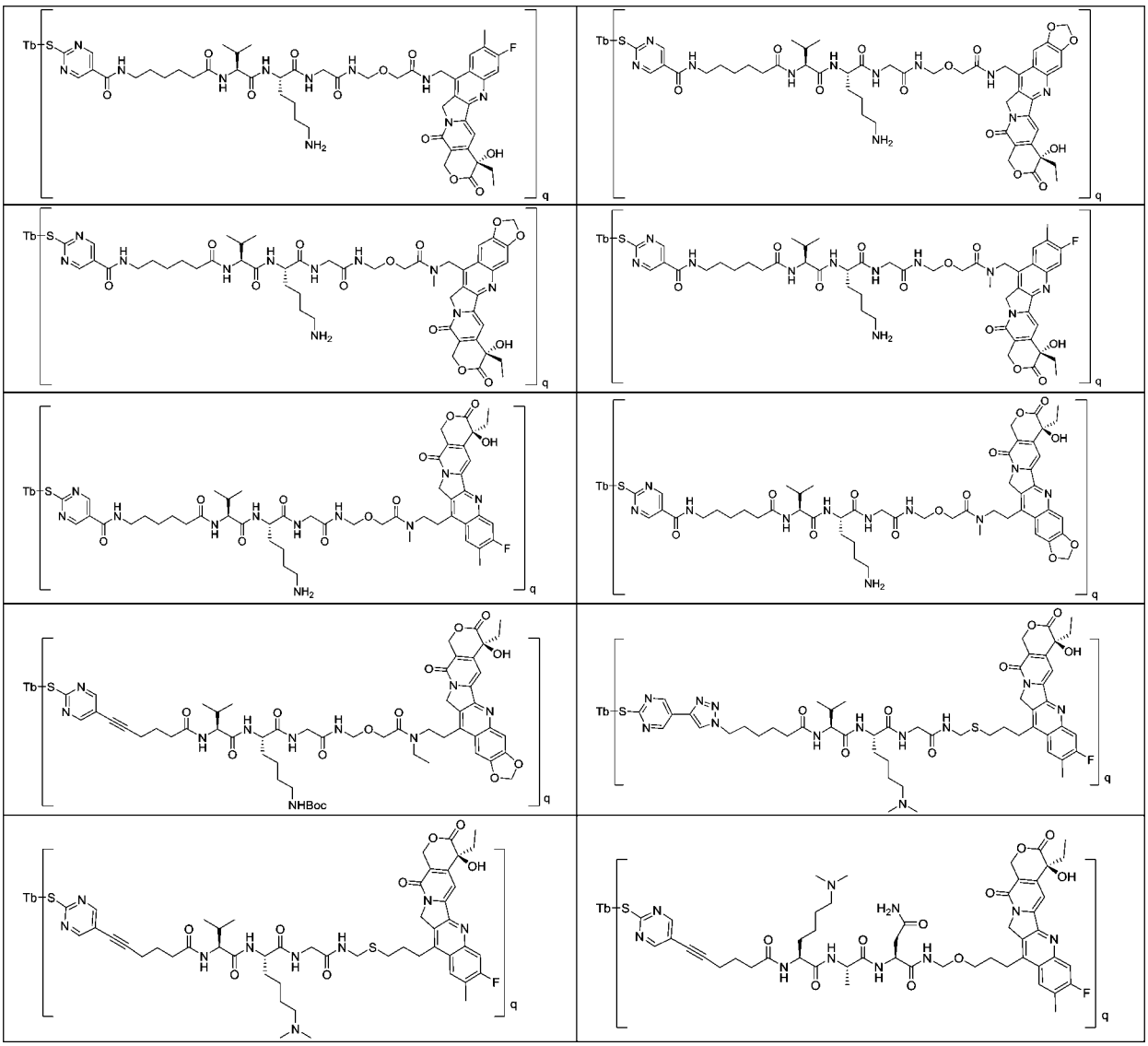






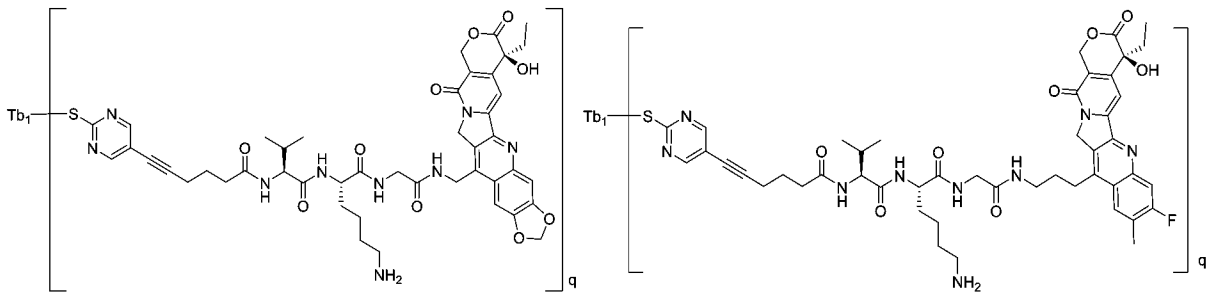


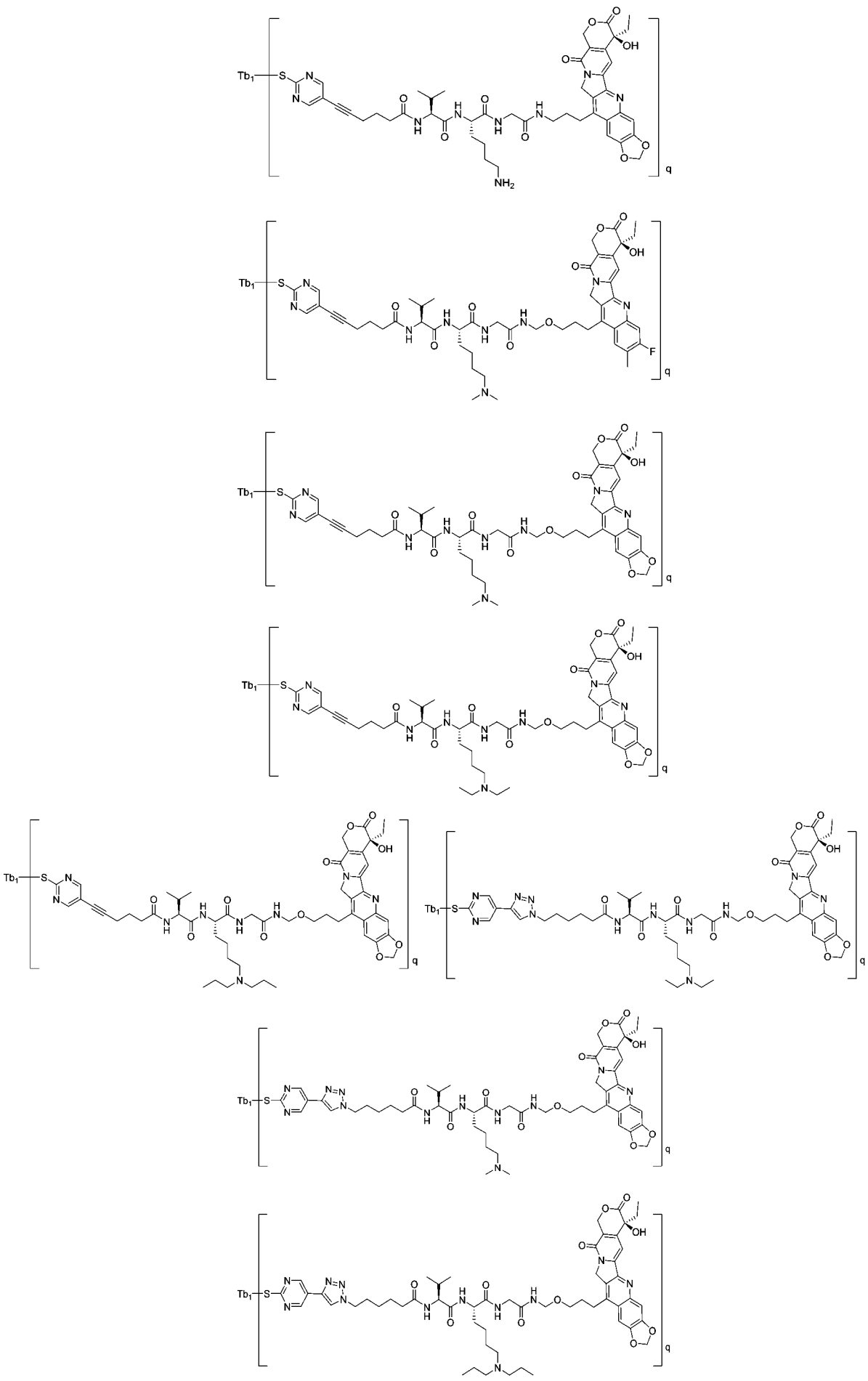


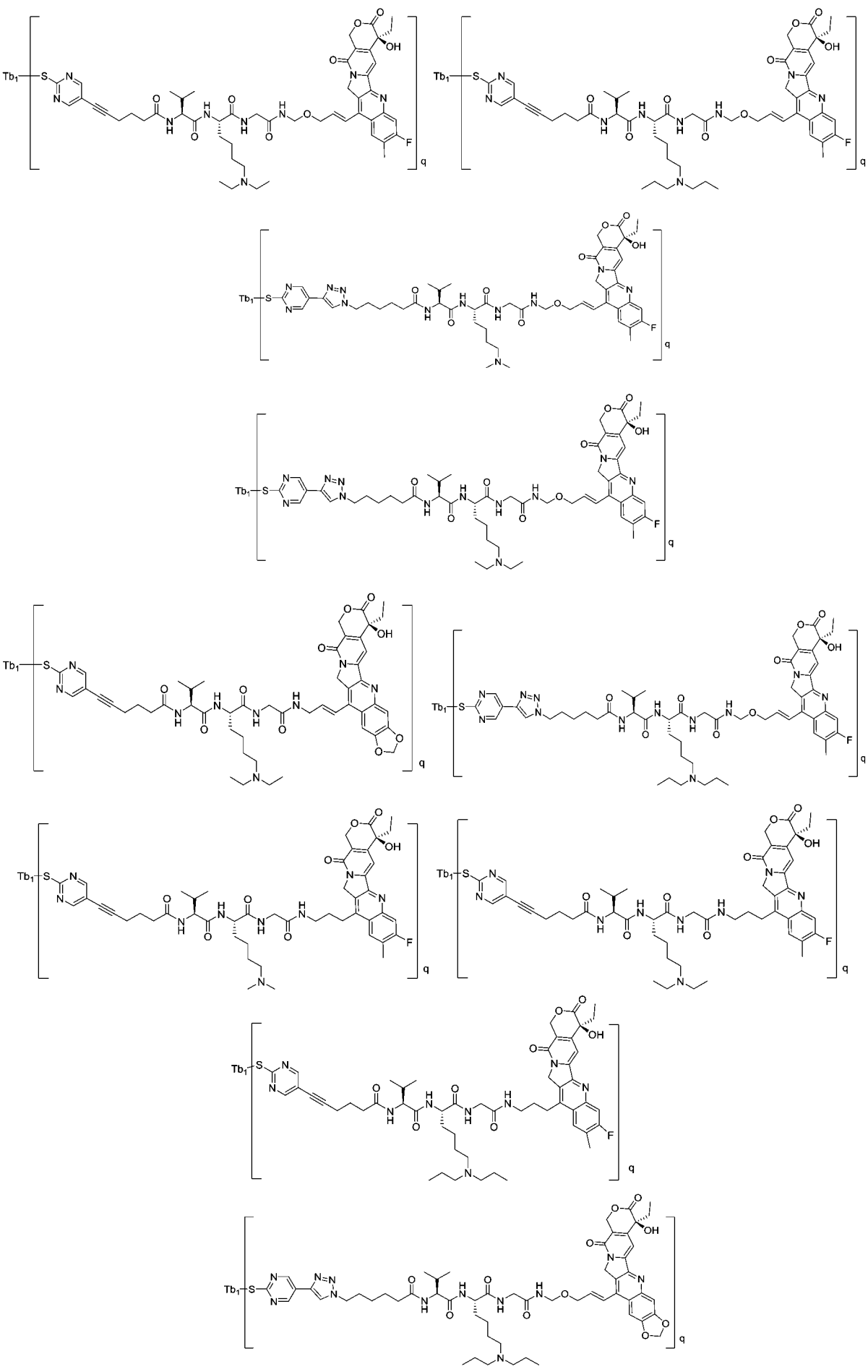


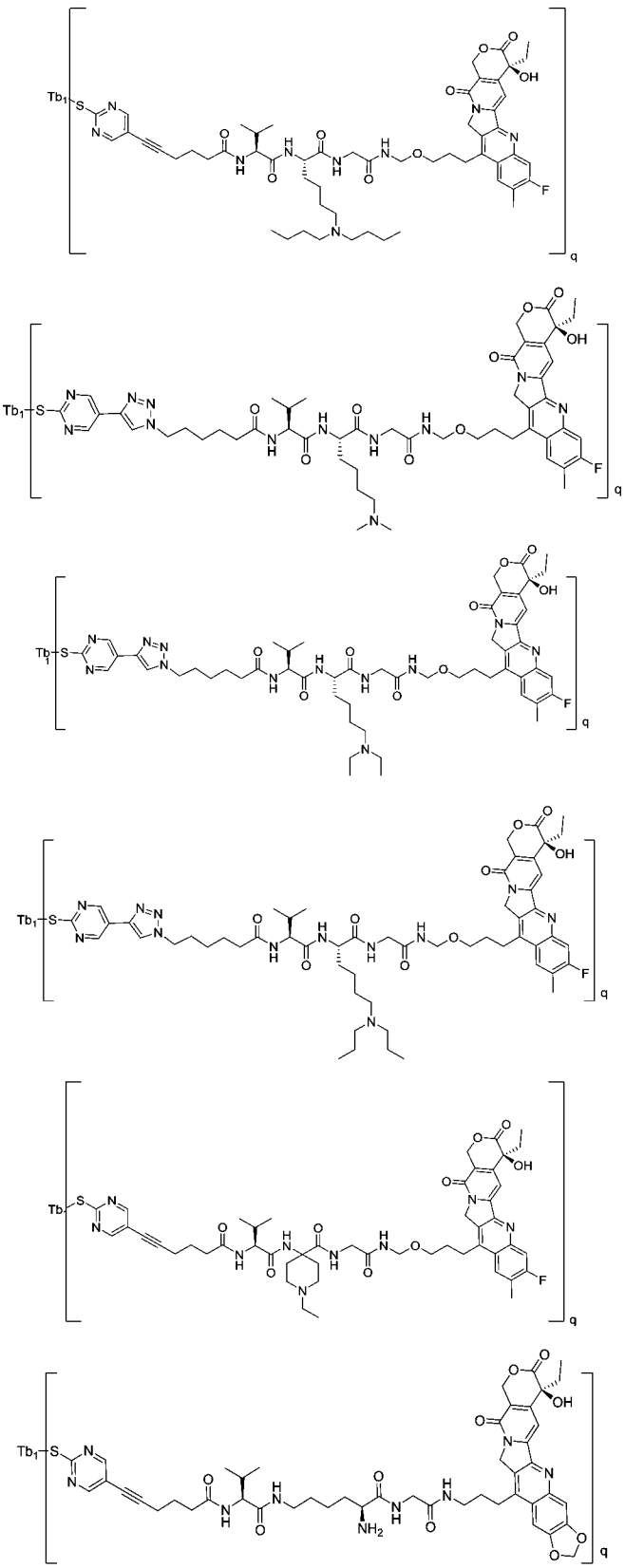
。

【請求項24】如請求項1-23中任一項所述的配體藥物偶聯物或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其中，所述配體藥物偶聯物選自：



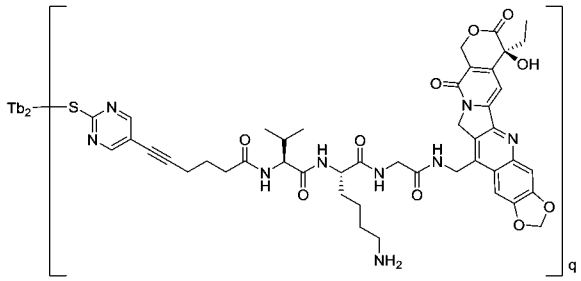


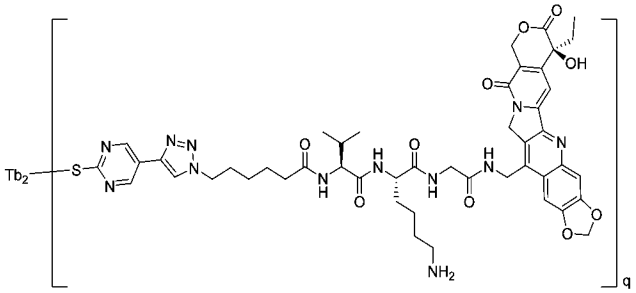


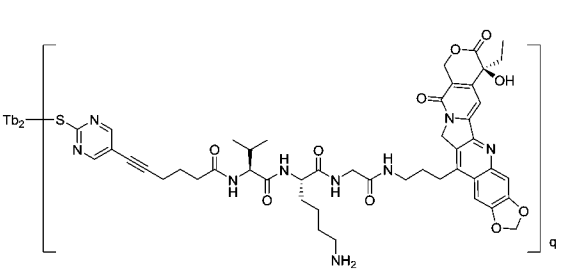


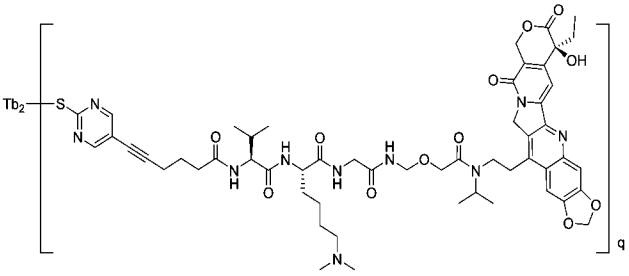
其中，Tb_1為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，例如enoblituzumab，mirzotamab， omburtamab，1D1-01，2E3-02抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值，

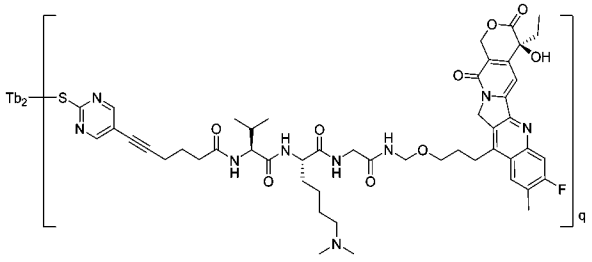
更優選地，q為2、4、6或8；

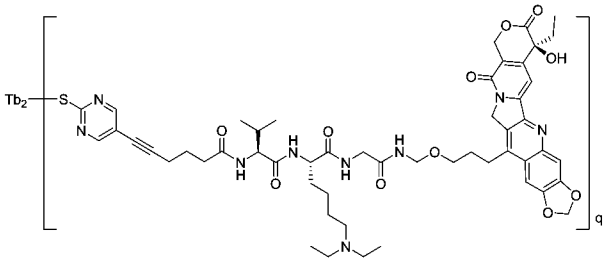


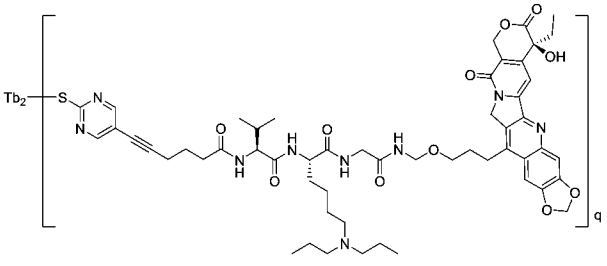


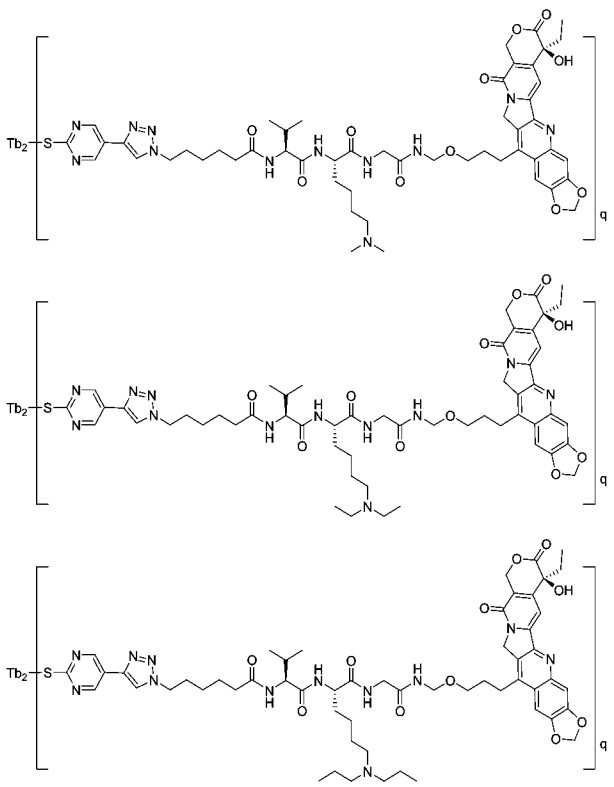




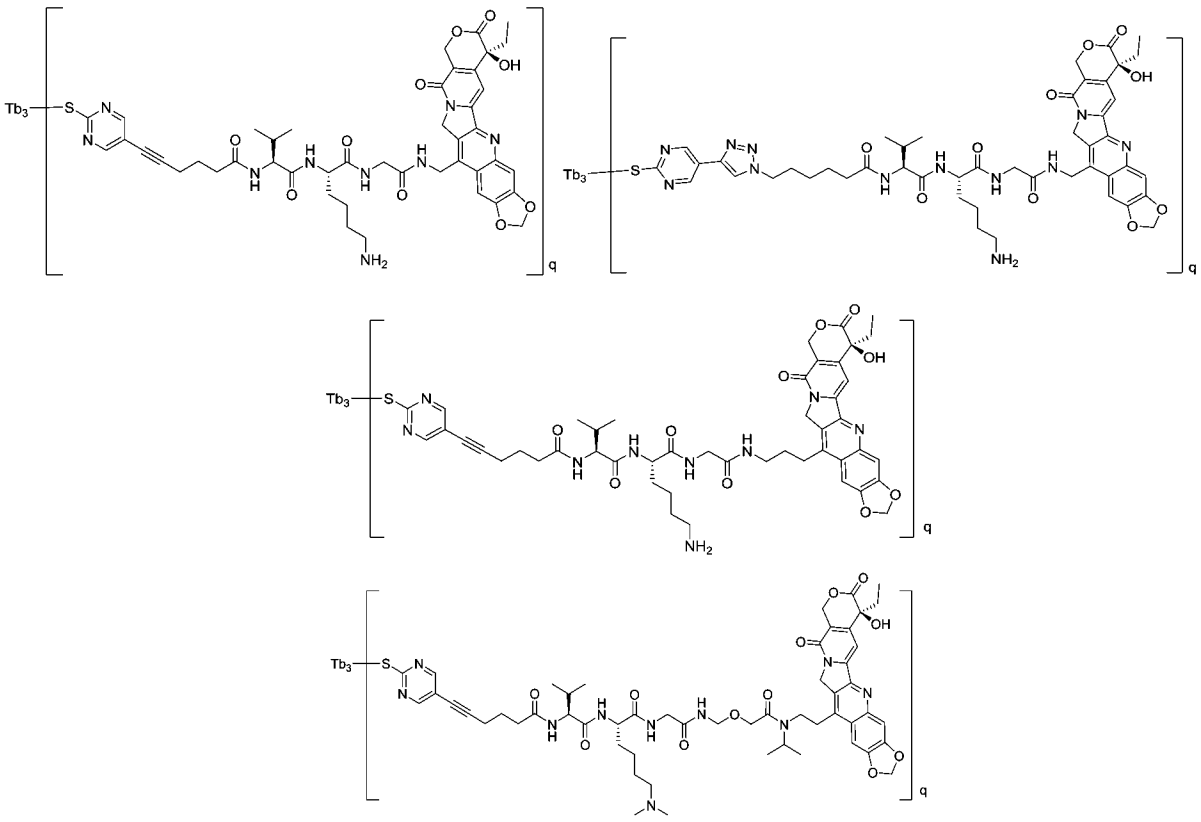


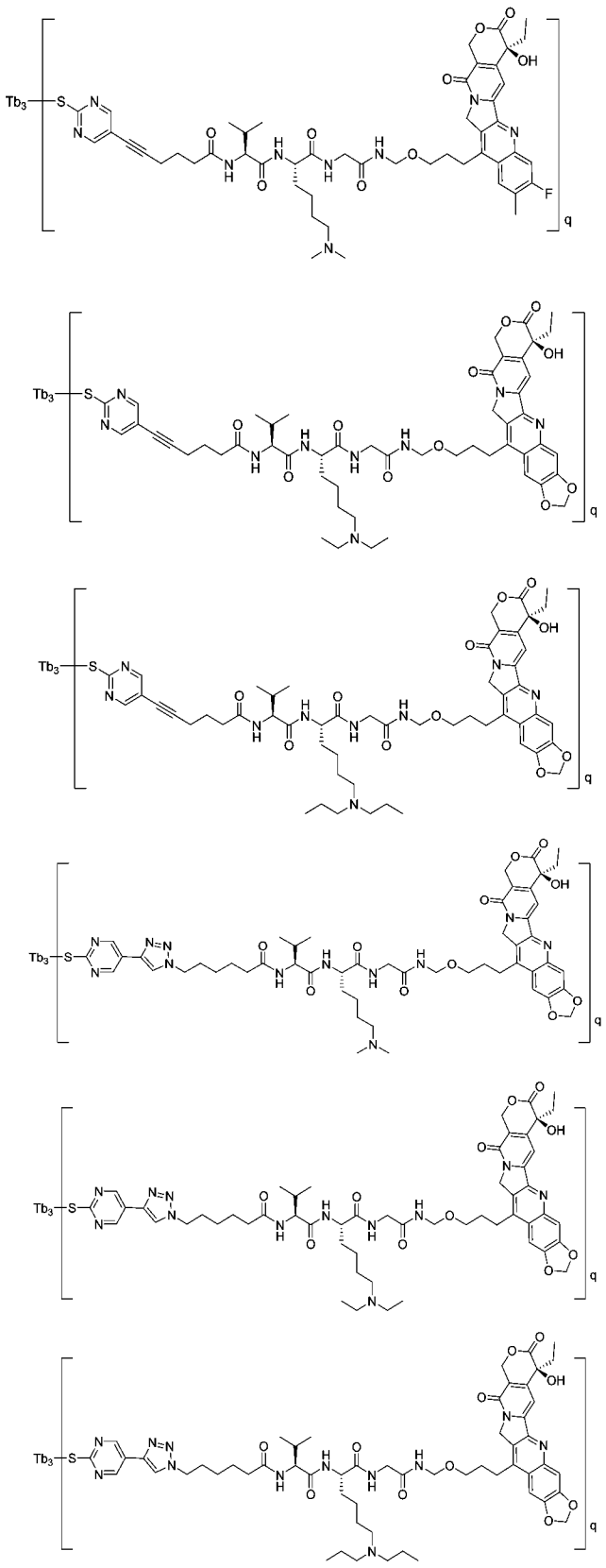






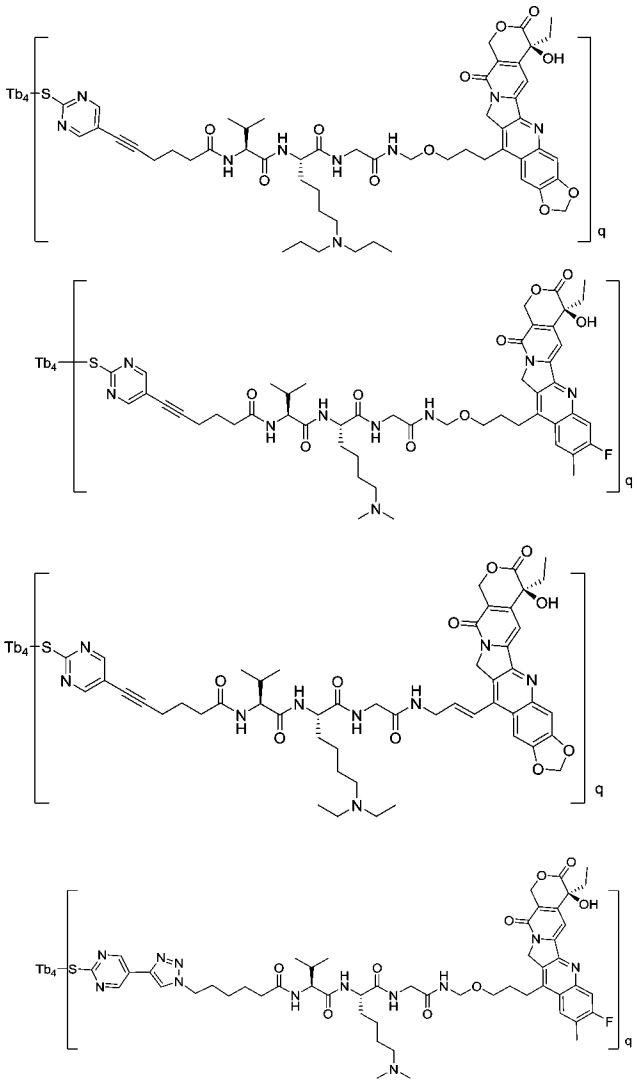
其中，Tb_2為抗Trop-2抗體或其抗原結合片段，例如datopotamab, sacituzumab；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值，更優選地，q為2、4、6或8；



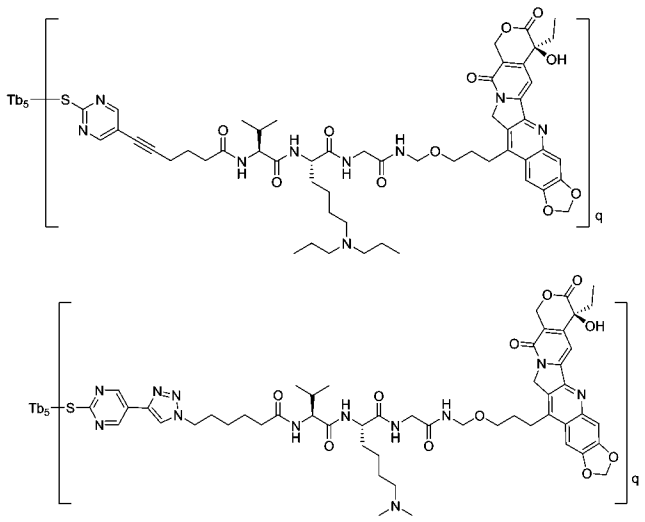


其中，Tb_3為抗Her2抗體或其抗原結合片段，例如anbenitamab，coprelotamab，disitamab，gancotamab，margetuximab，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，

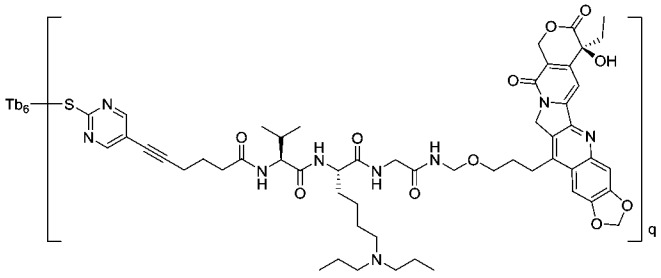
Trastuzumab；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值，更優選地，q為2、4、6或8；



其中，Tb_4為抗Her3抗體或其抗原結合片段，例如barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，IMGT/mAb-DB ID：546所示的抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值，更優選地，q為2、4、6或8；

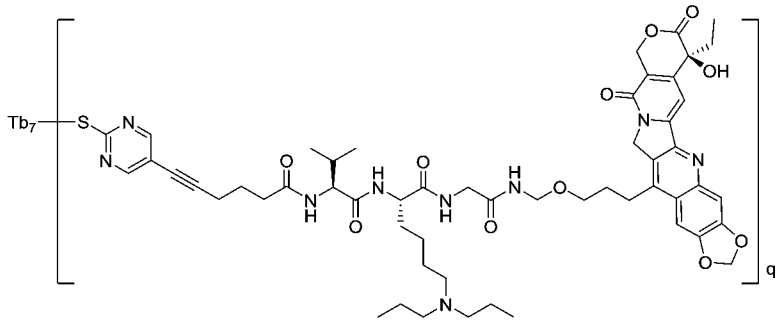


其中，Tb_5為抗EGFR抗體或其抗原結合片段，例如demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值，更優選地，q為2、4、6或8；

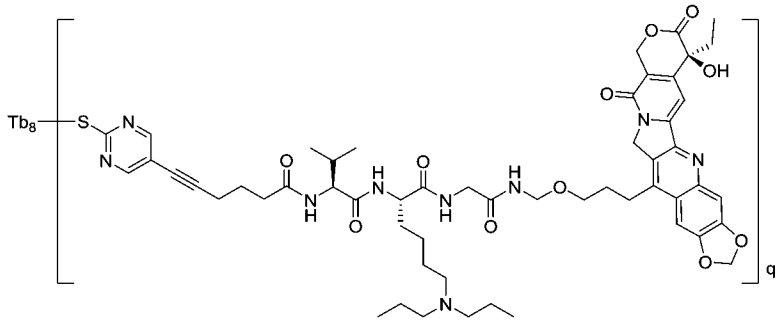


其中，Tb_6為無腫瘤細胞內吞活性的且沒有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體，或者具有結合非內吞（例如ALCAM/CD166）抗原活性的抗體，例如：人體內沒有相應細胞表面抗原的IgG同型抗體，抗CD166的抗體；更具體的，抗雞溶菌酶人IgG1同型抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值，更

優選地，q為2、4、6或8；

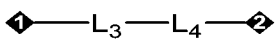


其中，Tb_7為腫瘤細胞內吞活性較弱或無，但有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體；例如所述抗體具有結合B7H3、Her3、GD-2、Trop-2、EGFR、CD19、CD30、GPNMB、CD20、CD79b和BCMA抗原但不具有內吞活性的抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值，更優選地，q為2、4、6或8；



其中，Tb_8為具有腫瘤細胞內吞活性的且有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體，例如1D1-01，2E3-02抗體，sacituzumab，pertuzumab，Trastuzumab或Cetuximab抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值，更優選地，q為2、4、6或8。

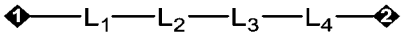
【請求項25】一種配體藥物偶聯物中的連接體，含如下所示片段：



其中，2位與生物活性分子片段相連；

L_3、L_4的定義如請求項1-24中任一項所述；

優選地，其結構如下所示：

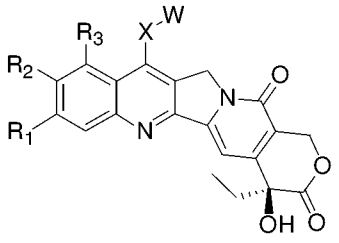


其中，1位與和靶點結合的配體或靶向部分相連，2位與生物活性分子片段相連；

L_3、L_4的定義如請求項1-24中任一項所述；

較佳地，所述的靶點結合的配體或靶向部分和所述的生物活性分子片段的定義分別如請求項1-24中任一項中的Tb和D所述。

【請求項26】一種式II所示的化合物：

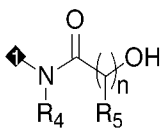
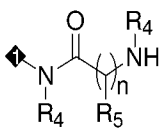
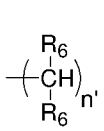
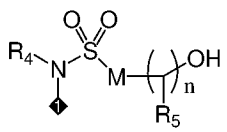
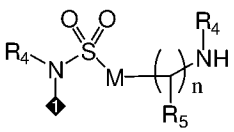


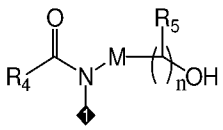
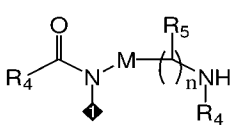
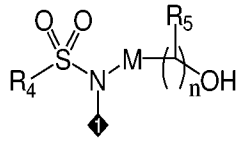
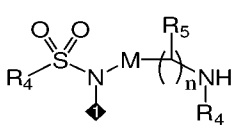
式II

或所述化合物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽、其藥學上可接受的溶劑合物或其配體藥物偶聯物，

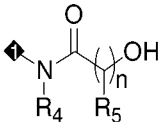
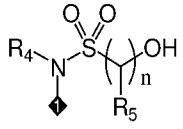
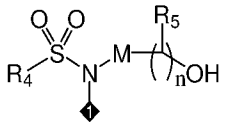
其中，R_1、R_2、R_3和X的定義如請求項13-24中任一項所述；

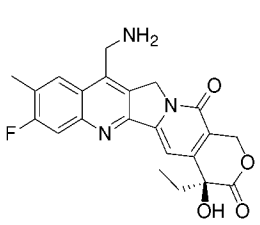
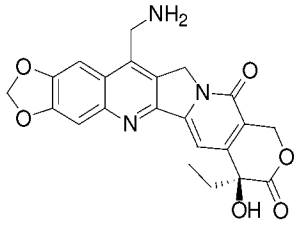
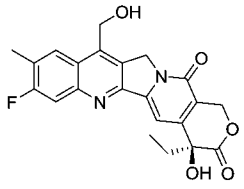
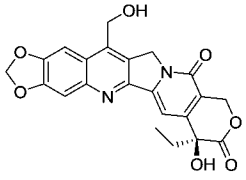
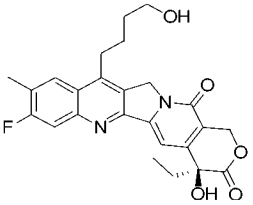
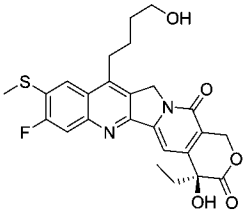
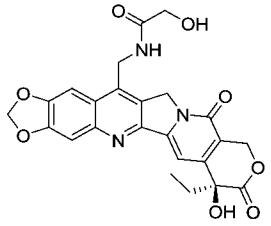
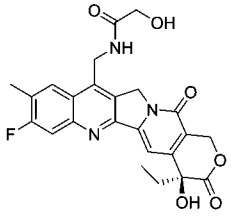
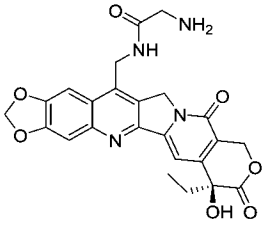
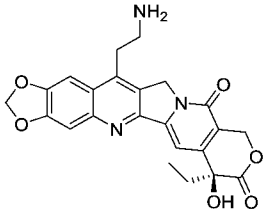
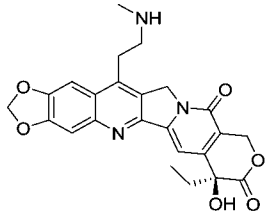
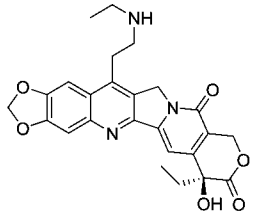
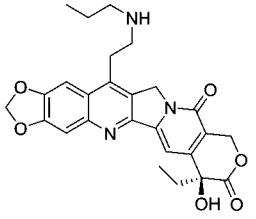
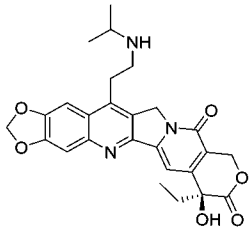
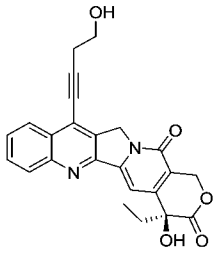
W不存在或存在，W存在時，W選自-OH、-SH、-NHR_4、


、

、

、

、

、


、

、

、

，1位與

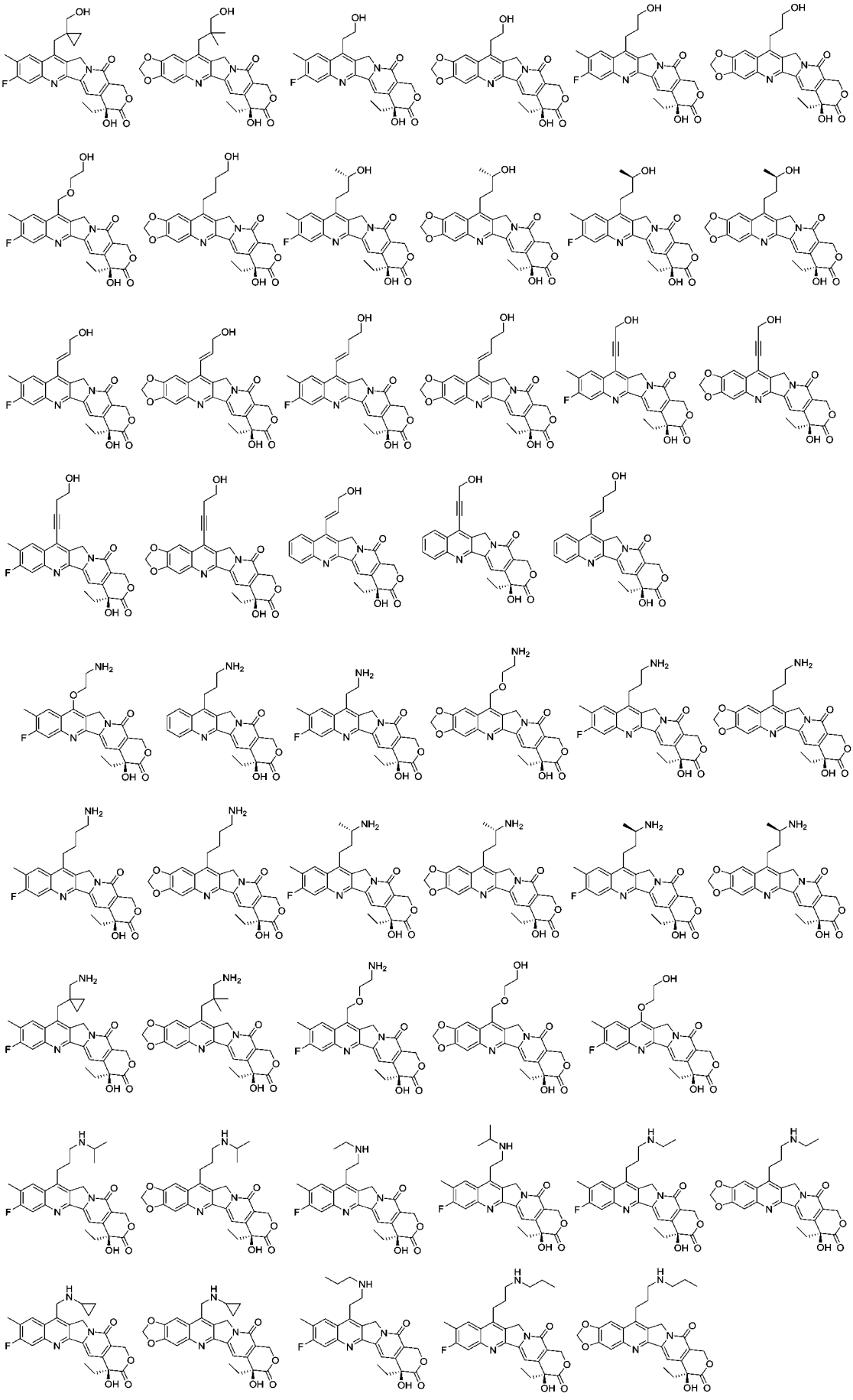
X相連；

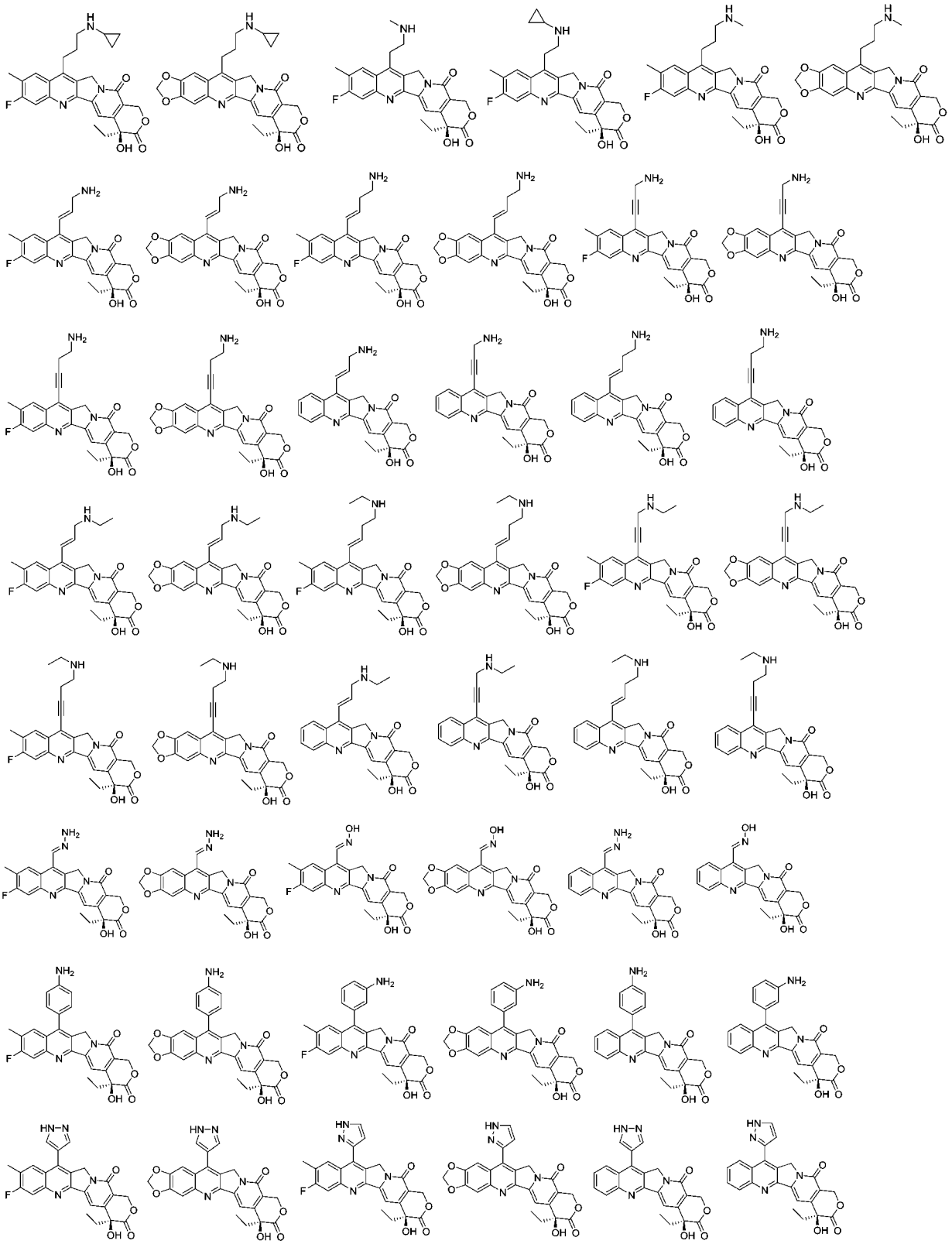
優選地，W不存在或存在，W存在時，W選自-OH、-SH、-NHR$_4$、  、  、  ，1位與X相連；

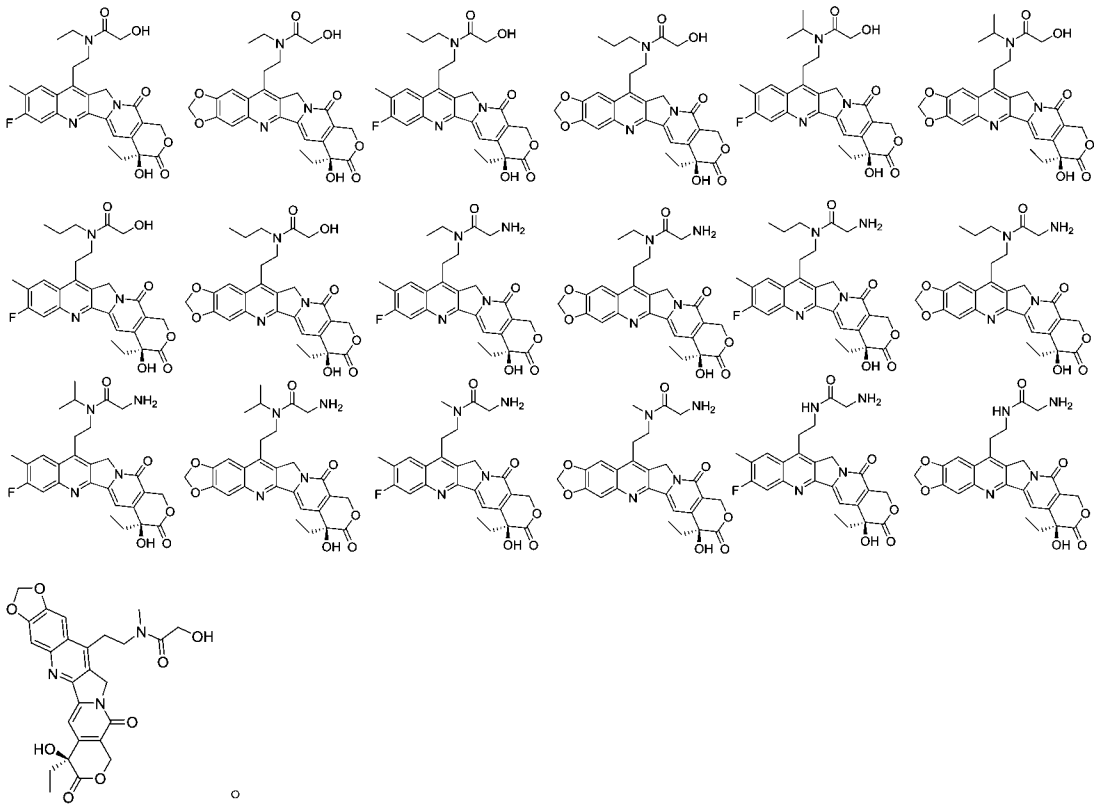
且當W不存在時，X與H相連接；其中，當R$_1$、R$_2$同時為H，且X為-(CH$_2$)$_{n1}$-，n1為1、2、3、4時，W不為-OH或-NHR$_4$；且式II所示化合物不包含  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  。

【請求項27】如請求項26化合物，其中，式II所示化合物選自

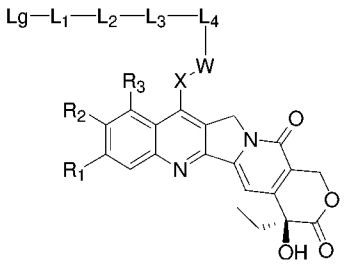
以下：







【請求項28】一種式III所示的藥物連接體偶聯物，



式III

或所述藥物連接體偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，

其中：

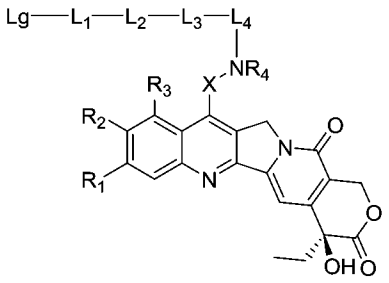
R_1、R_2、R_3、X、L1、L2、L3和L4的定義如請求項1-24中任一項所述；W的定義如請求項13-24中任一項所述；L1的1位與Lg相連；

Lg為離去基團，Lg選自鹵素、碸基、三級胺鹽基（Me_3N^+、Et_3N^+）、重氮鹽基、-OMs、$MeSO_2$-和CF_3SO_3-；

優選地，Lg選自F、Cl和$MeSO_2$-；三級胺鹽基選自Me_3N^+和Et_3N^+；

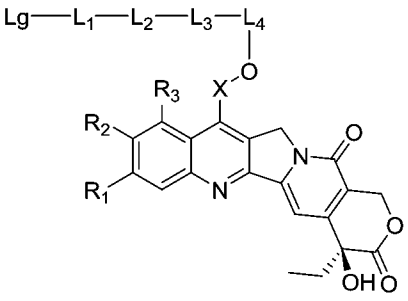
更優選地，Lg選自F和$MeSO_2$-。

【請求項29】如請求項28所述的藥物連接體偶聯物或所述藥物連接體偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其具有式III-(1)、式III-(2)或式III-(3)所式結構：



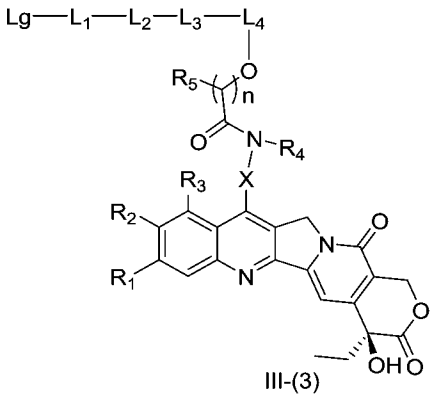
III-(1)　　，

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg如請求項28所定義；



III-(2)

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg如請求項28所定義，

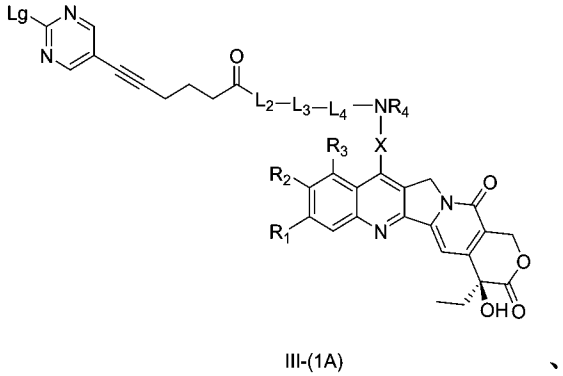


III-(3)

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和Lg如請求項28所定義。

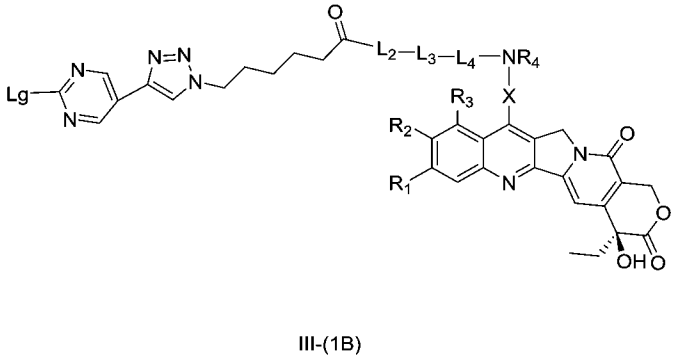
【請求項30】如請求項28或29所述的藥物連接體偶聯物或所述藥物連接體偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其具有式III-(1A)、III-(1B)、III-(2A)、III-(2B)、III-(3A)或III-(3B)所式結構；

式III-(1A)或III-(1B)所式結構：



III-(1A)

、

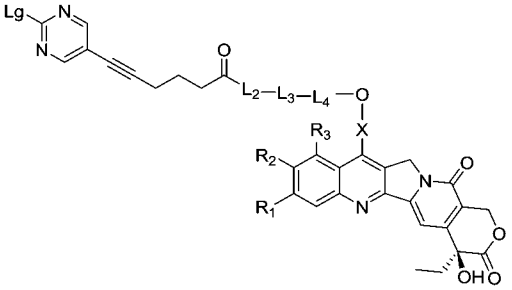


III-(1B)

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg如請求項28或

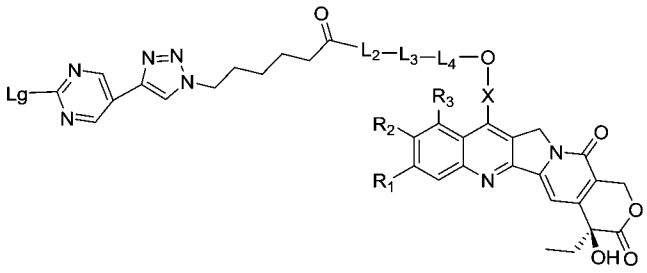
29所定義；

式III-(2A)或III-(2B)所式結構：



III-(2A)

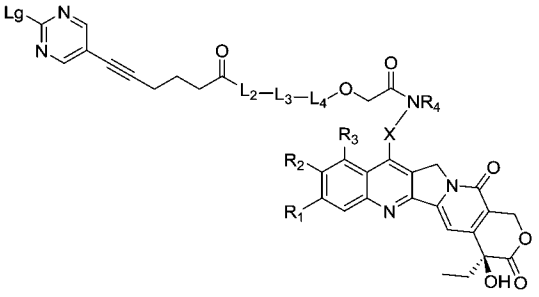
、



III-(2B)

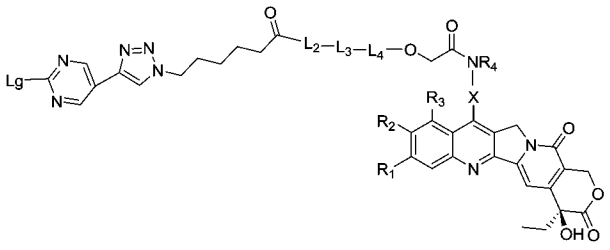
其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg如請求項28或29所定義；

式III-(3A)或III-(3B)所式結構：



III-(3A)

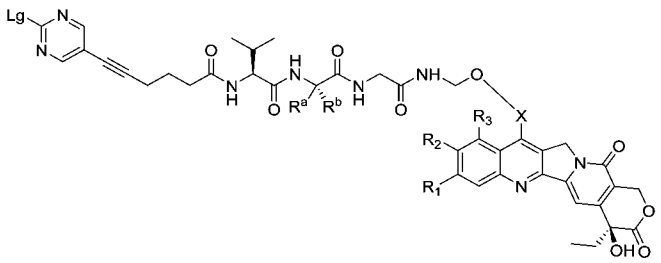
、



III-(3B)

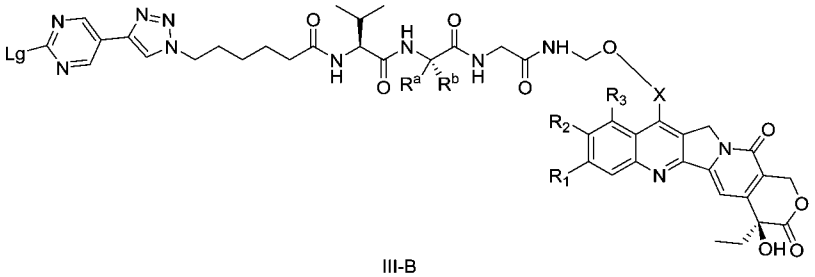
其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg如請求項28或29所定義。

【請求項31】如請求項28-30中任一項所述的藥物連接體偶聯物或所述藥物連接體偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其中，所述藥物連接體偶聯物具有式III-A或式III-B所式結構：



III-A

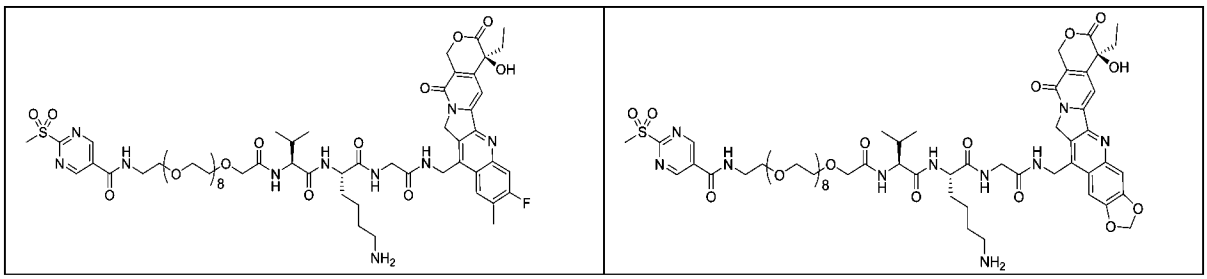
其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q如請求項28-30中任一項所定義；

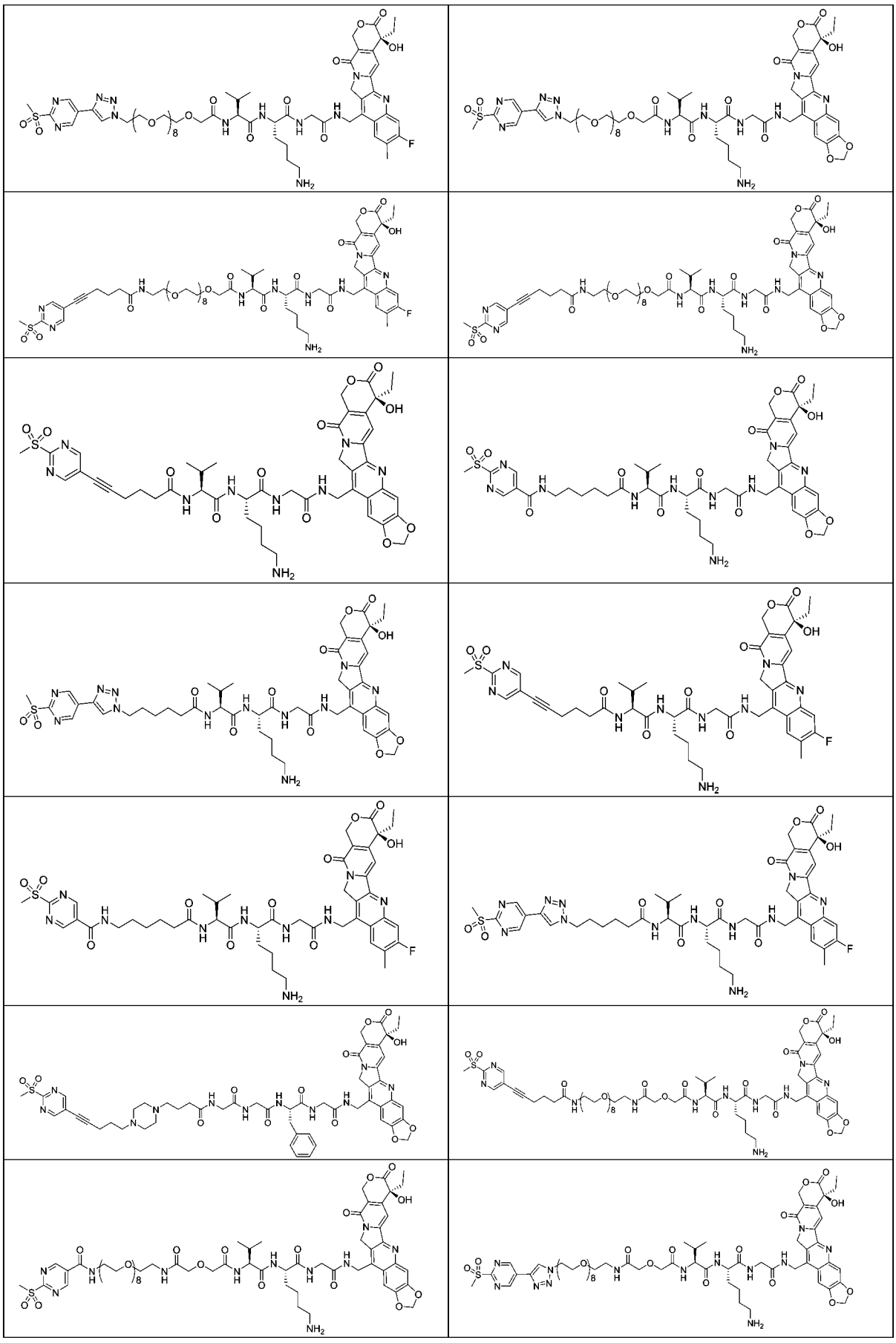


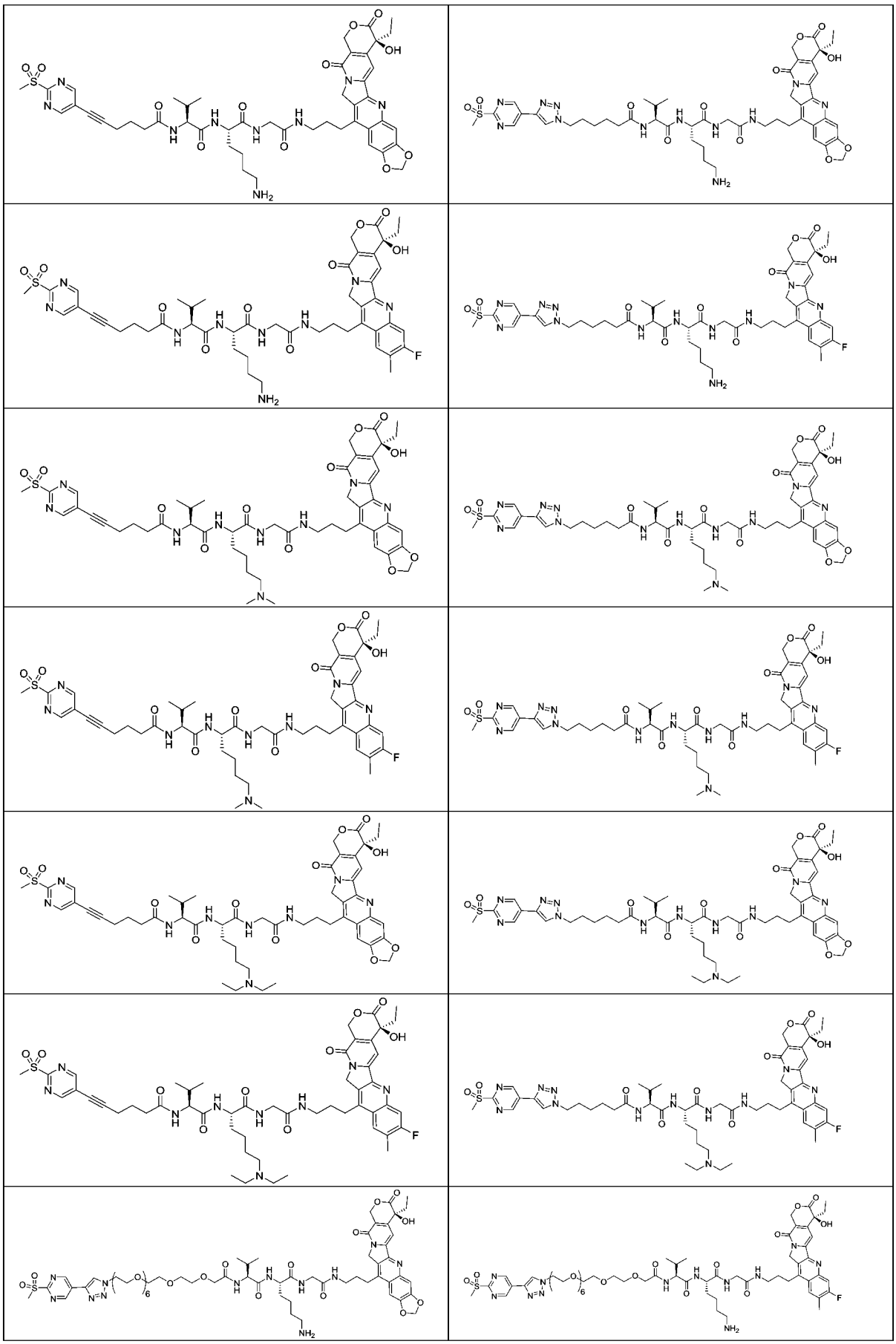
III-B

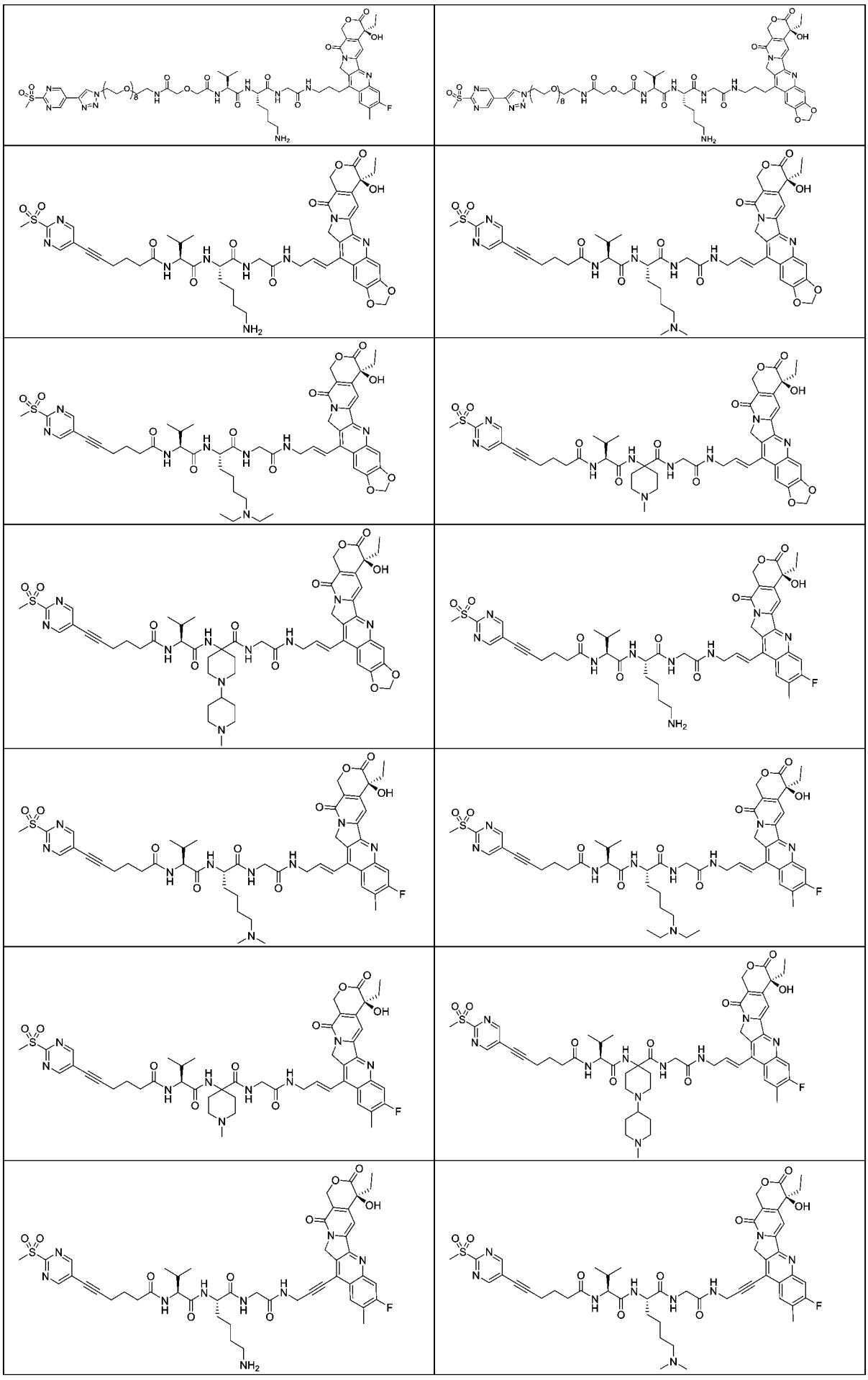
其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q如請求項28-30中任一項所定義。

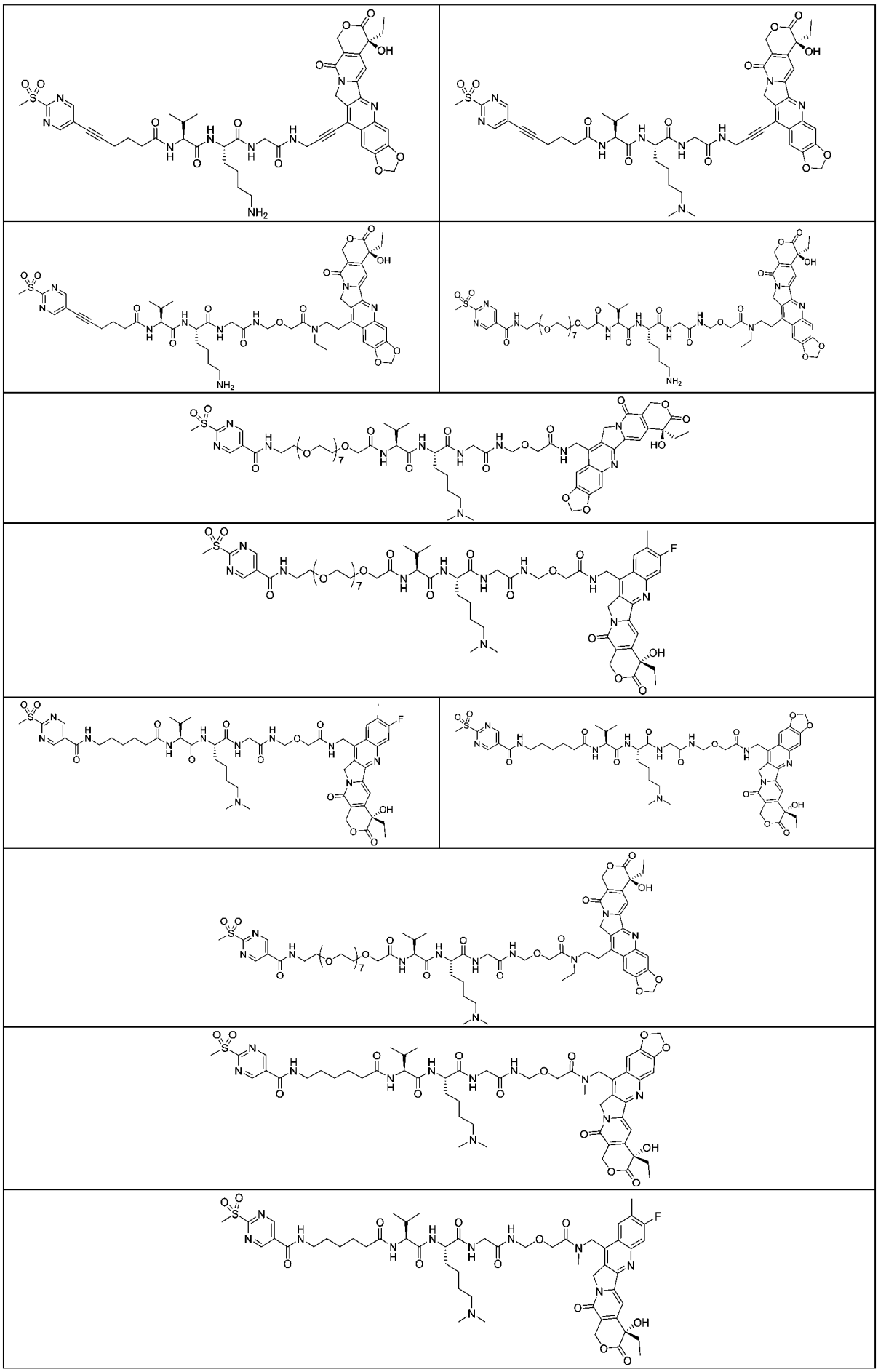
【請求項32】如請求項28-31中任一項所述的藥物連接體偶聯物或所述藥物連接體偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，其特徵在於，其中，所述藥物連接體偶聯物選自以下：

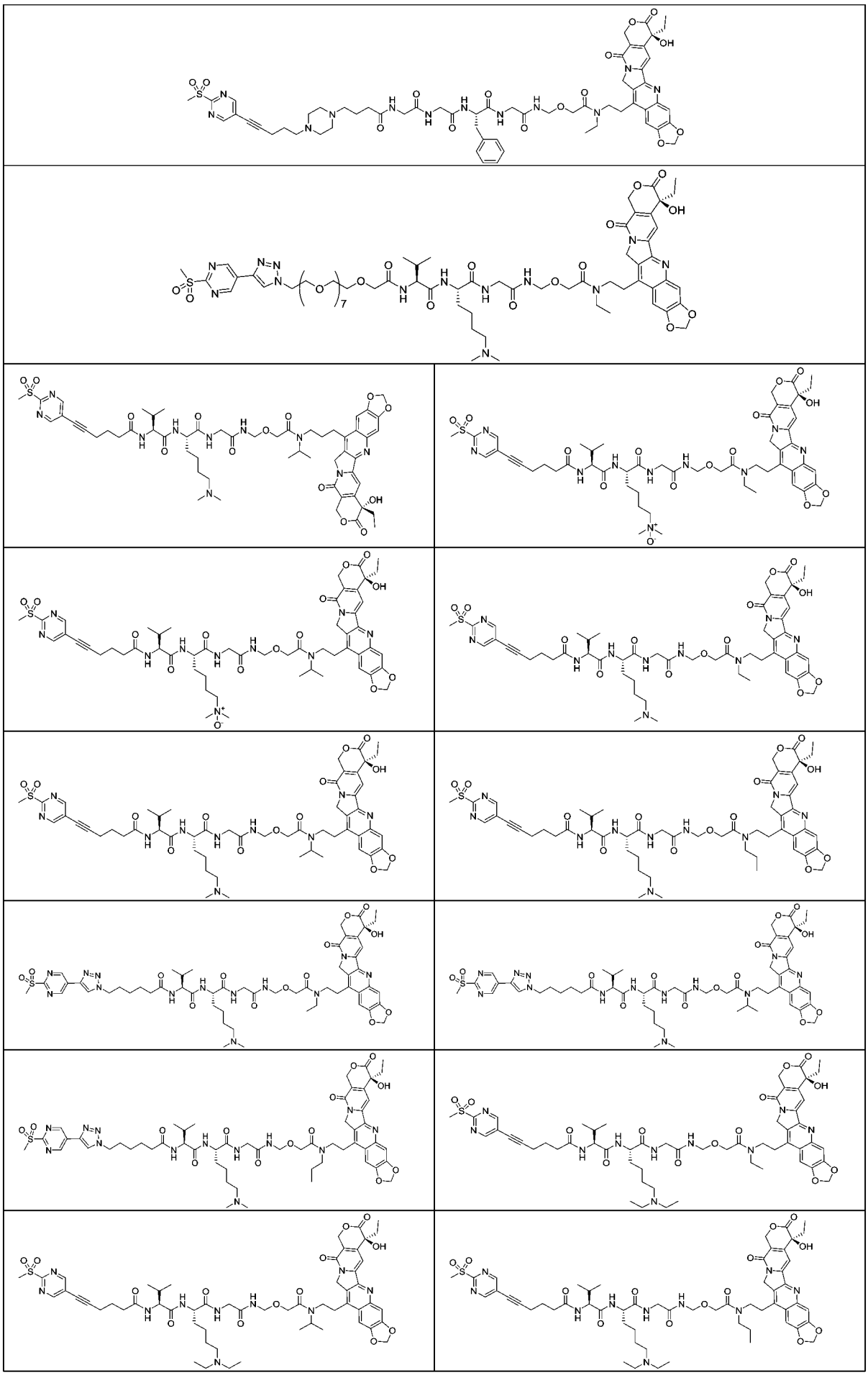


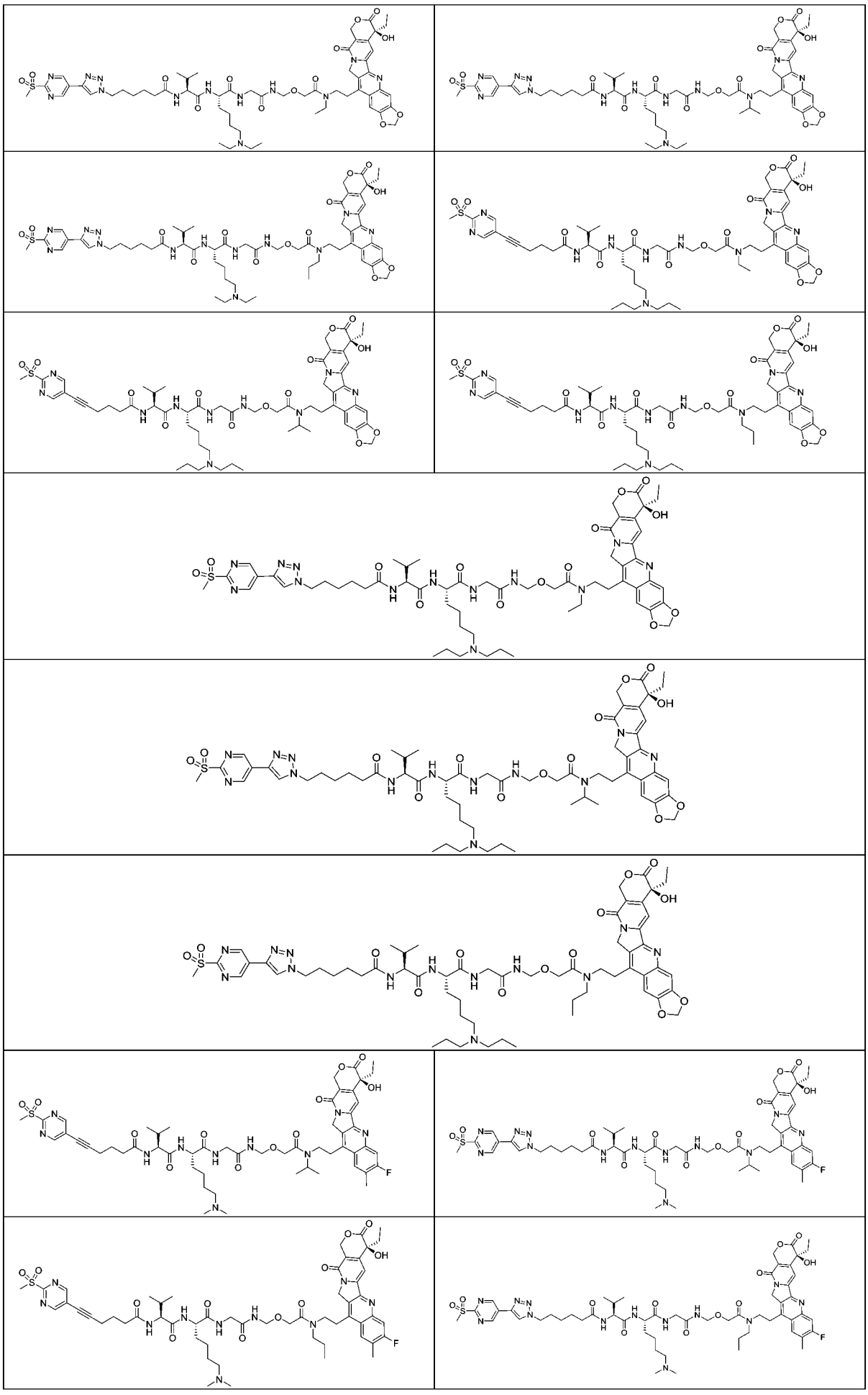


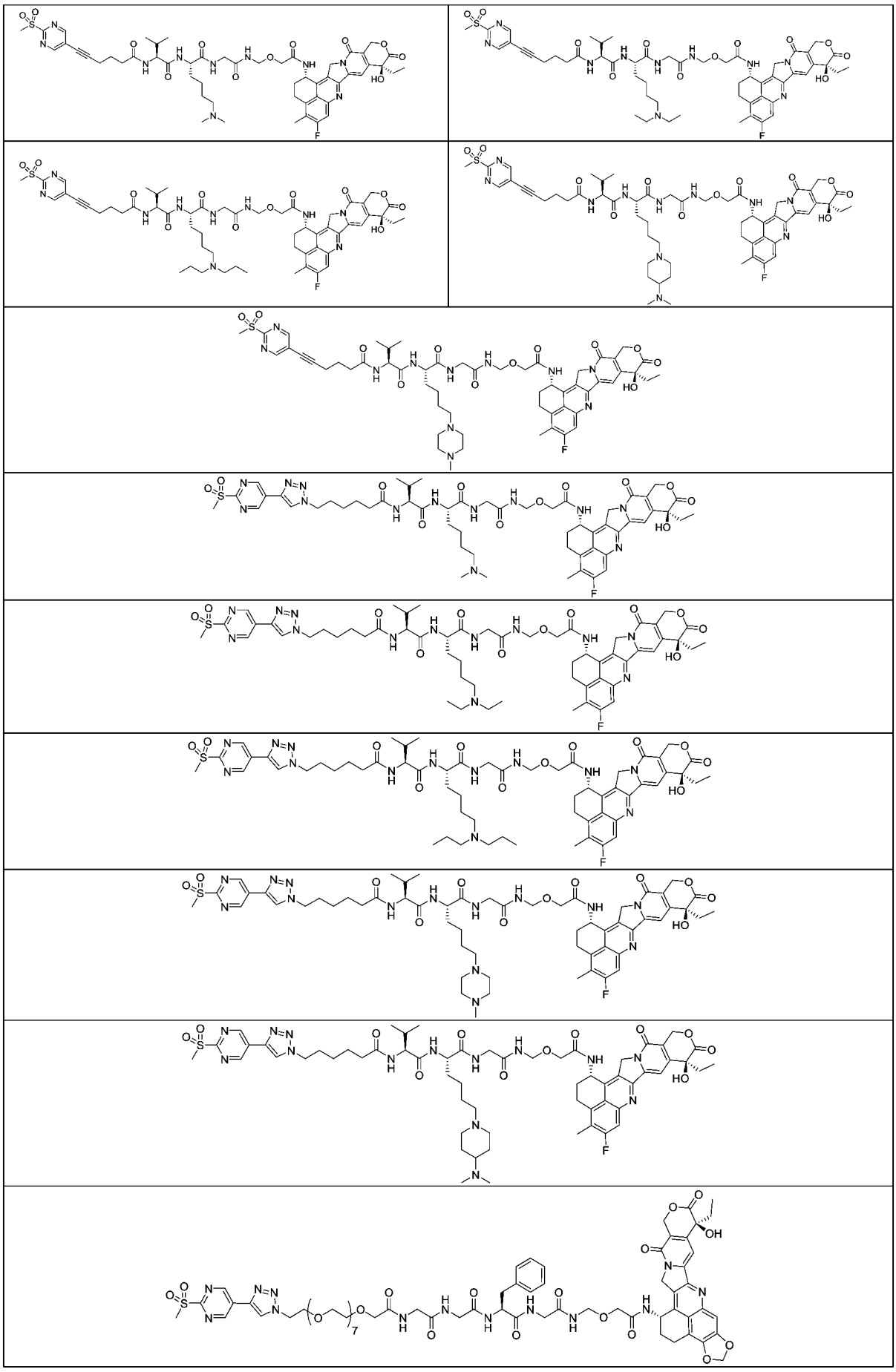


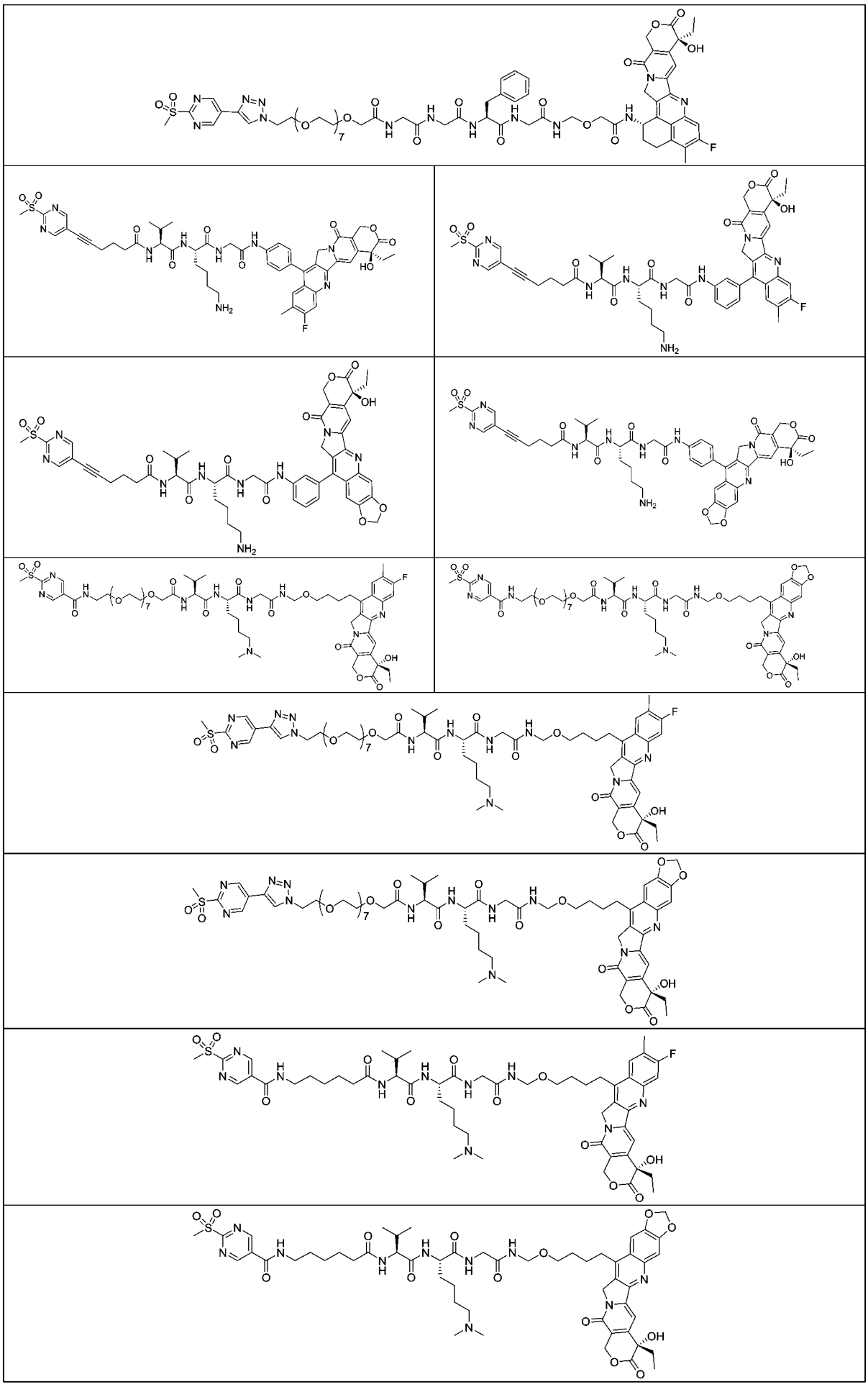


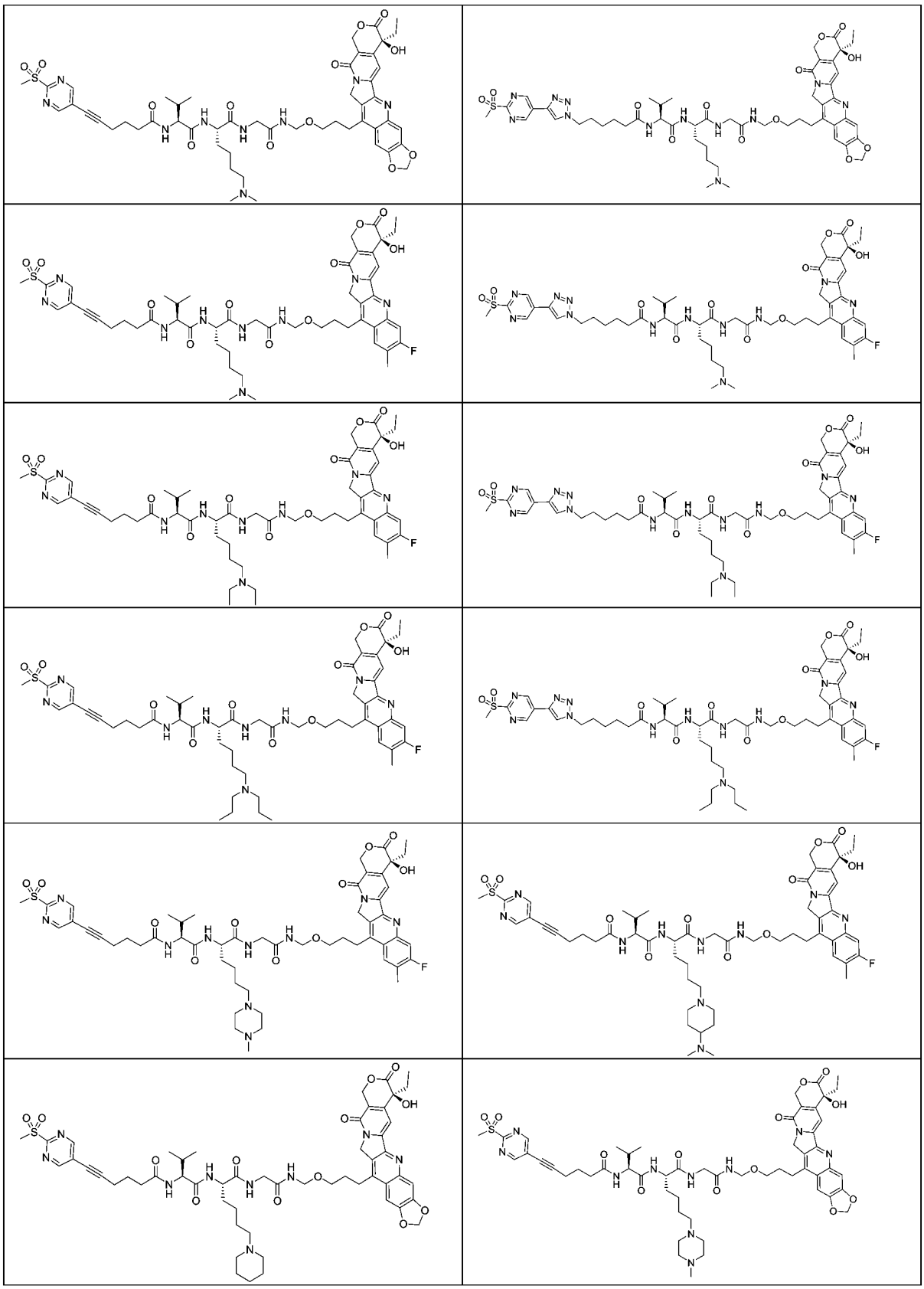


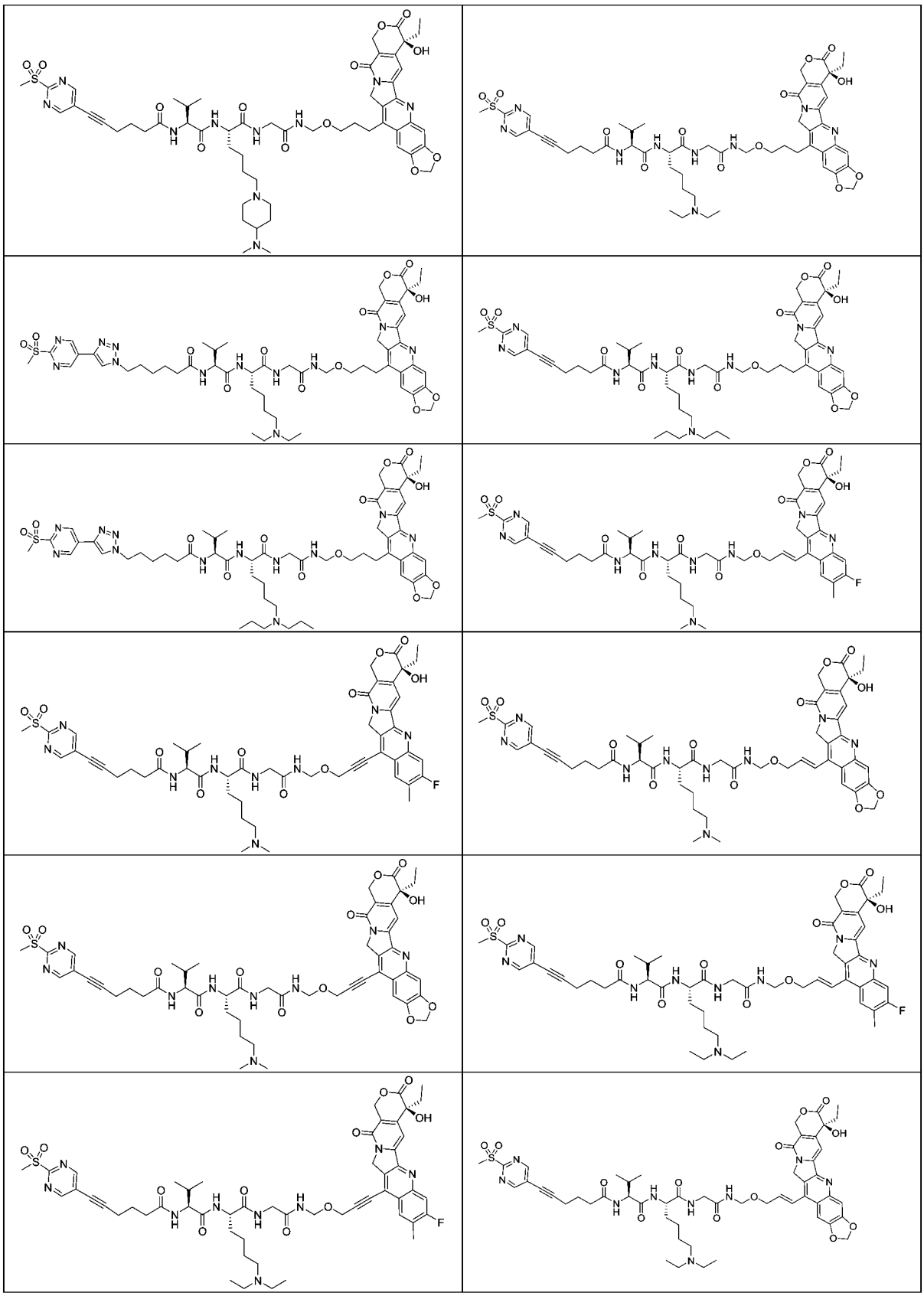


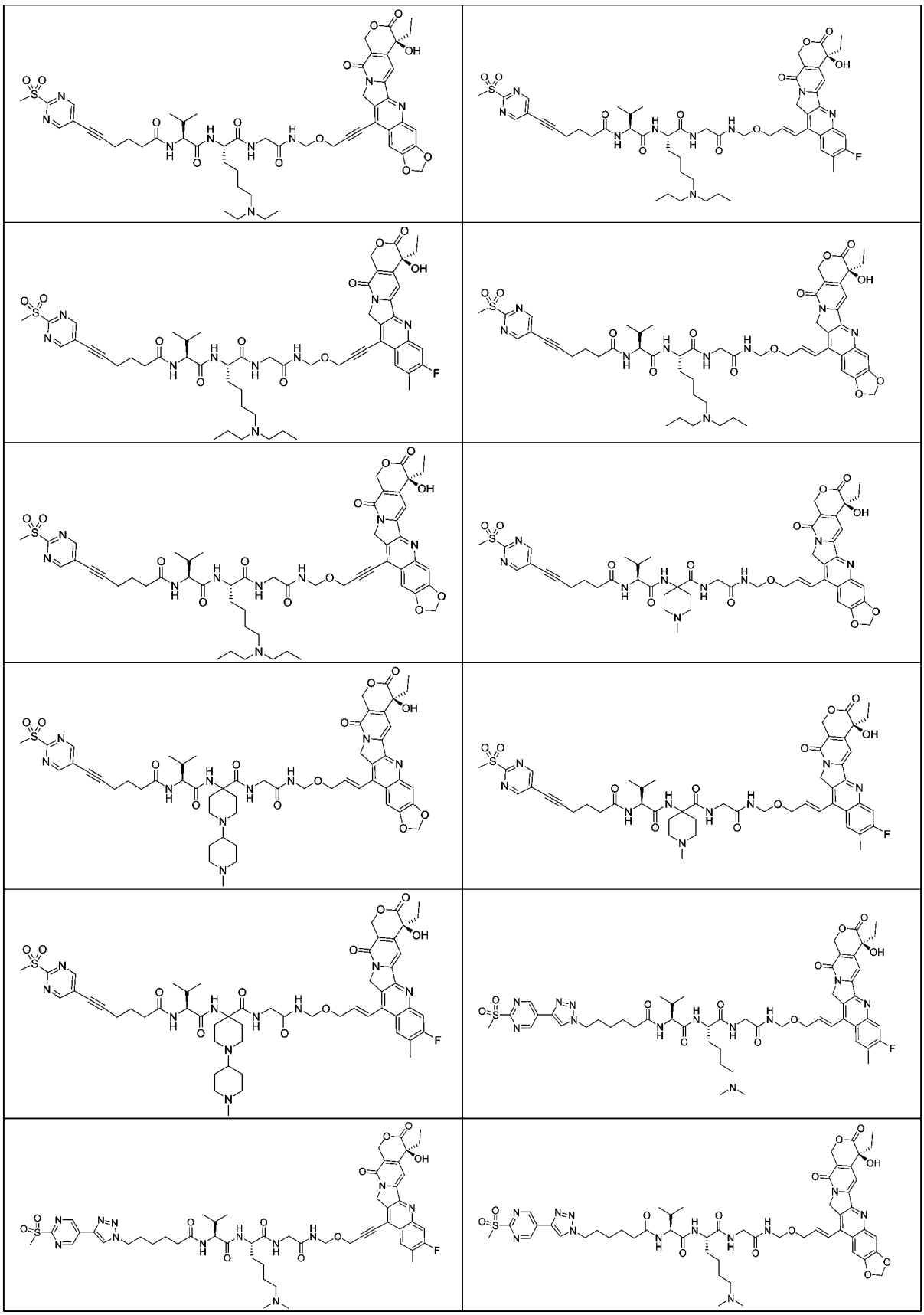


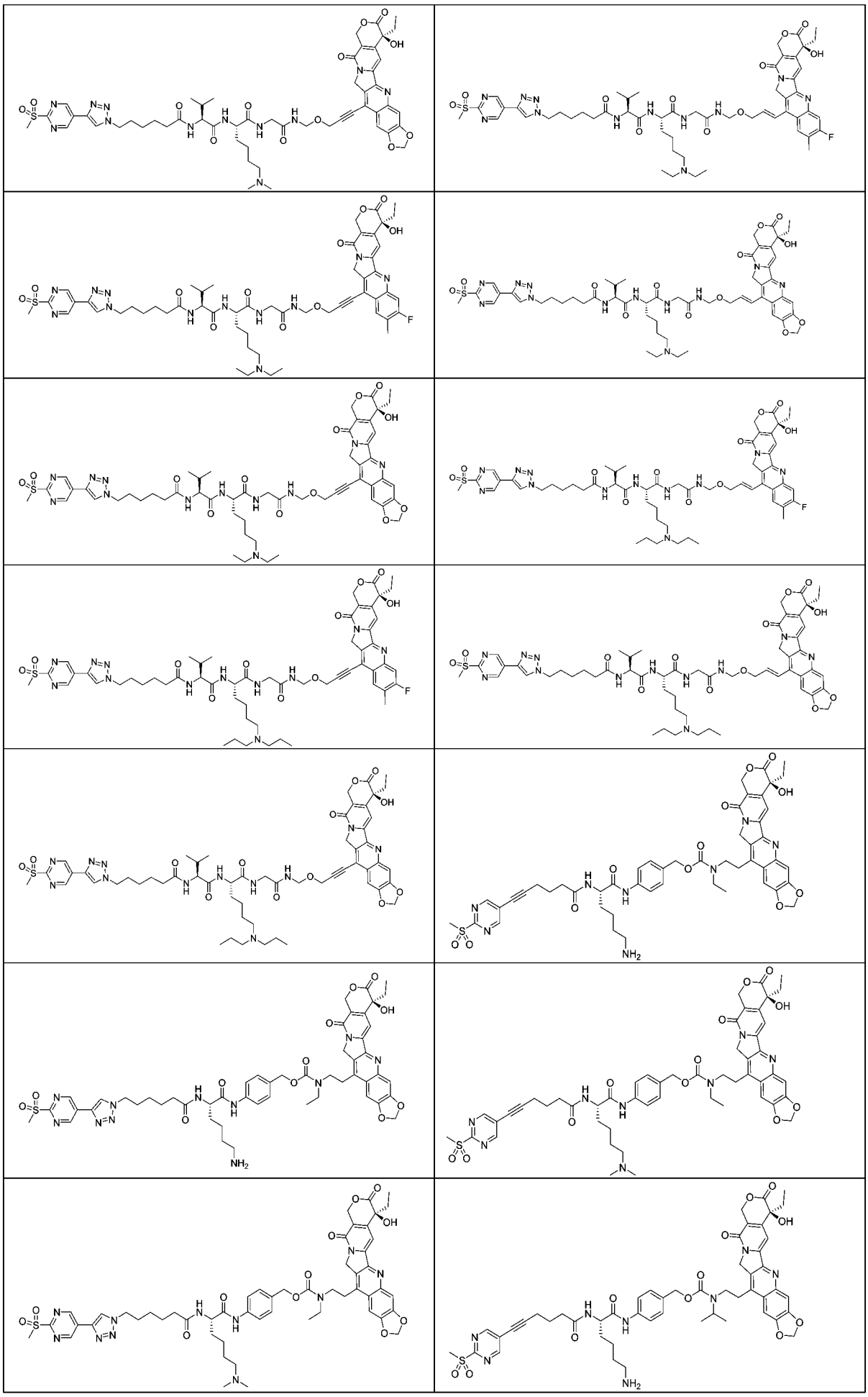


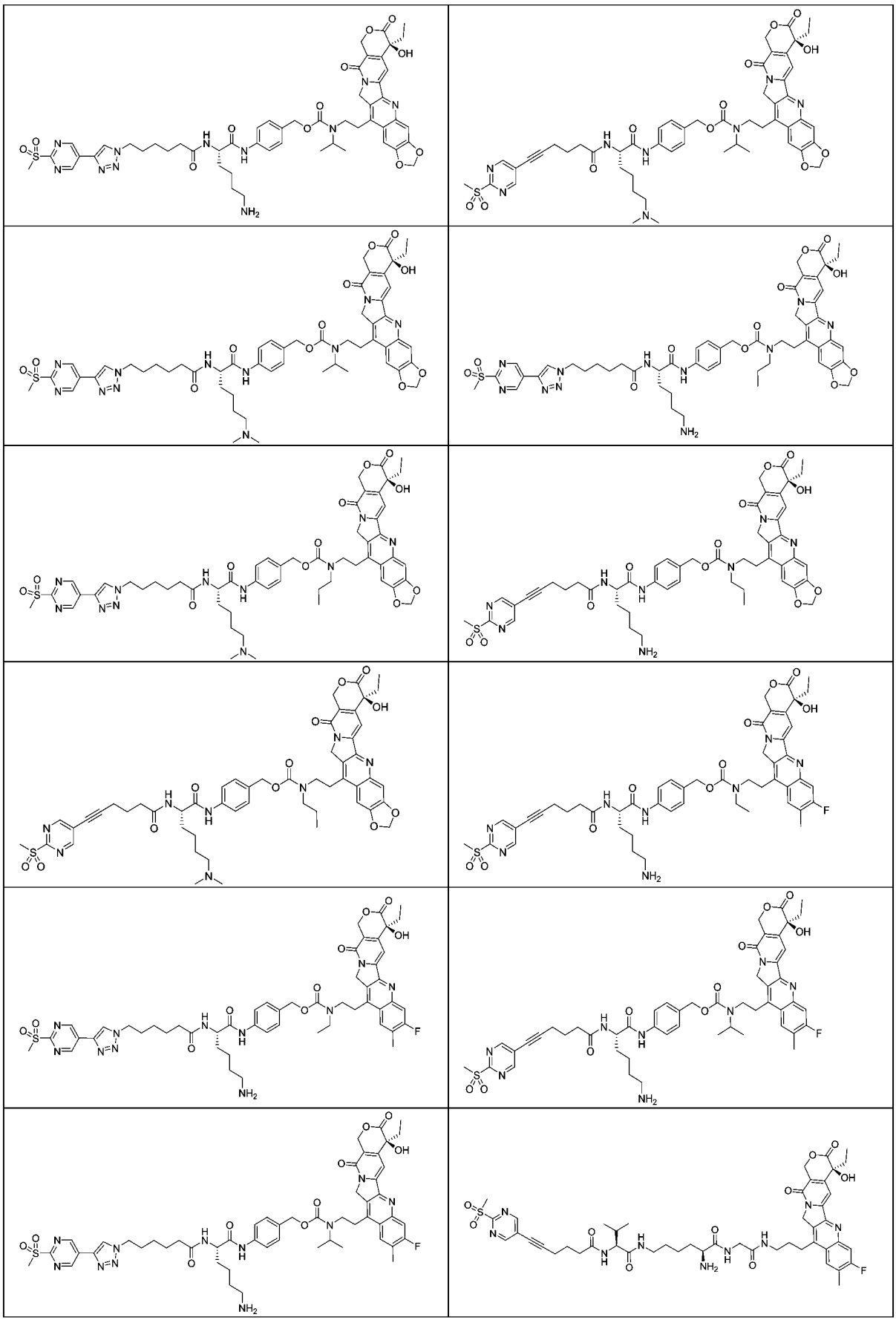


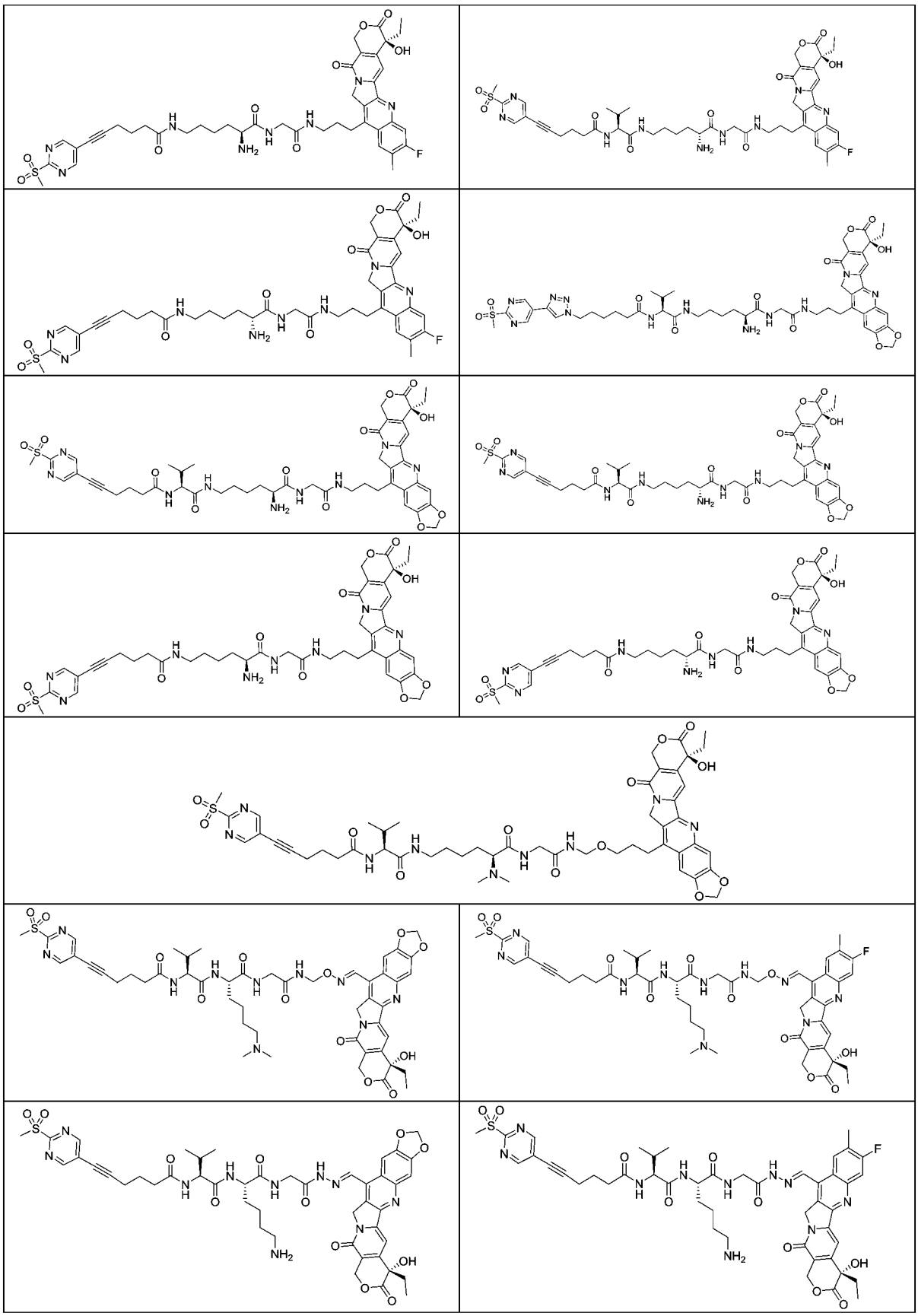


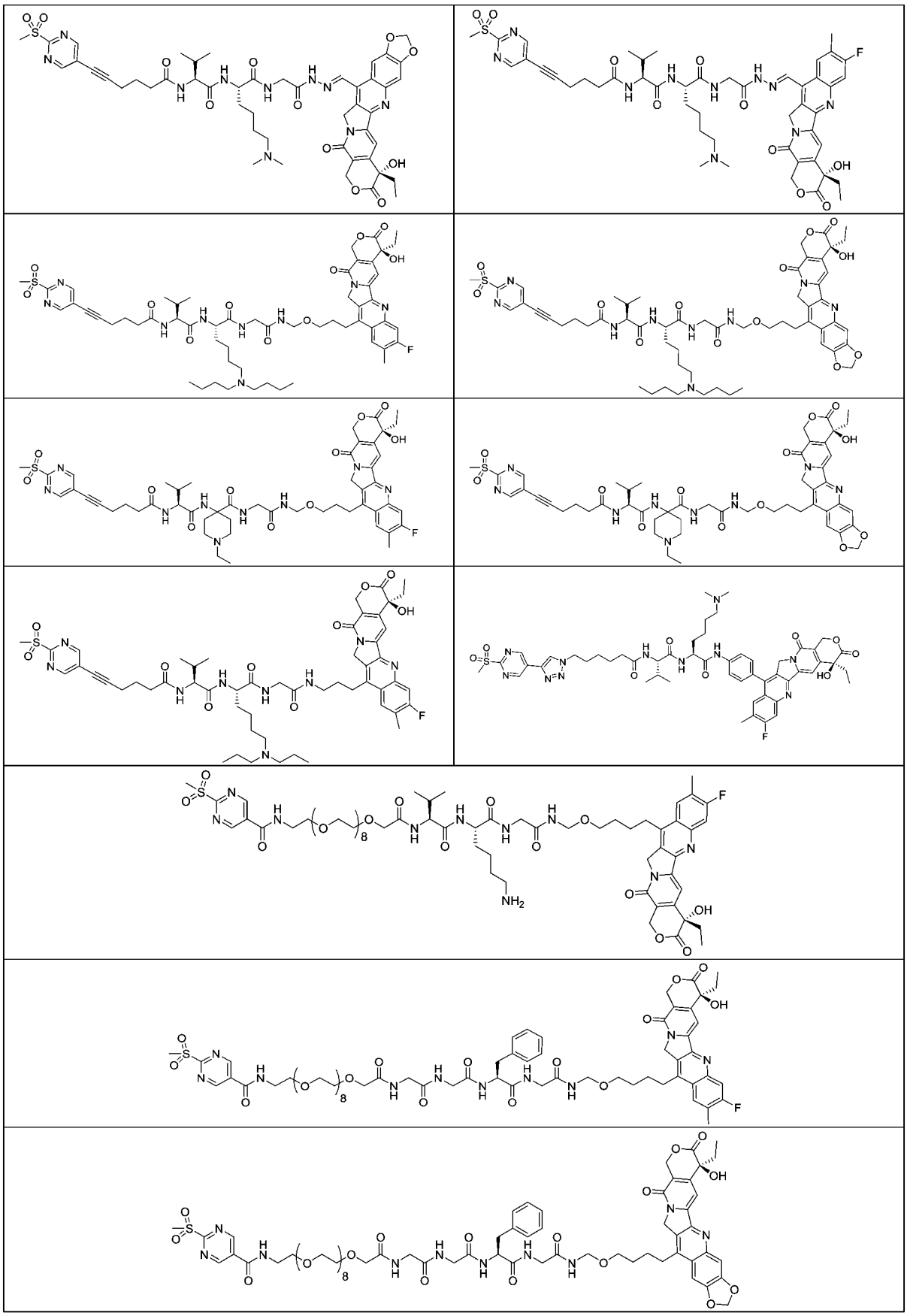


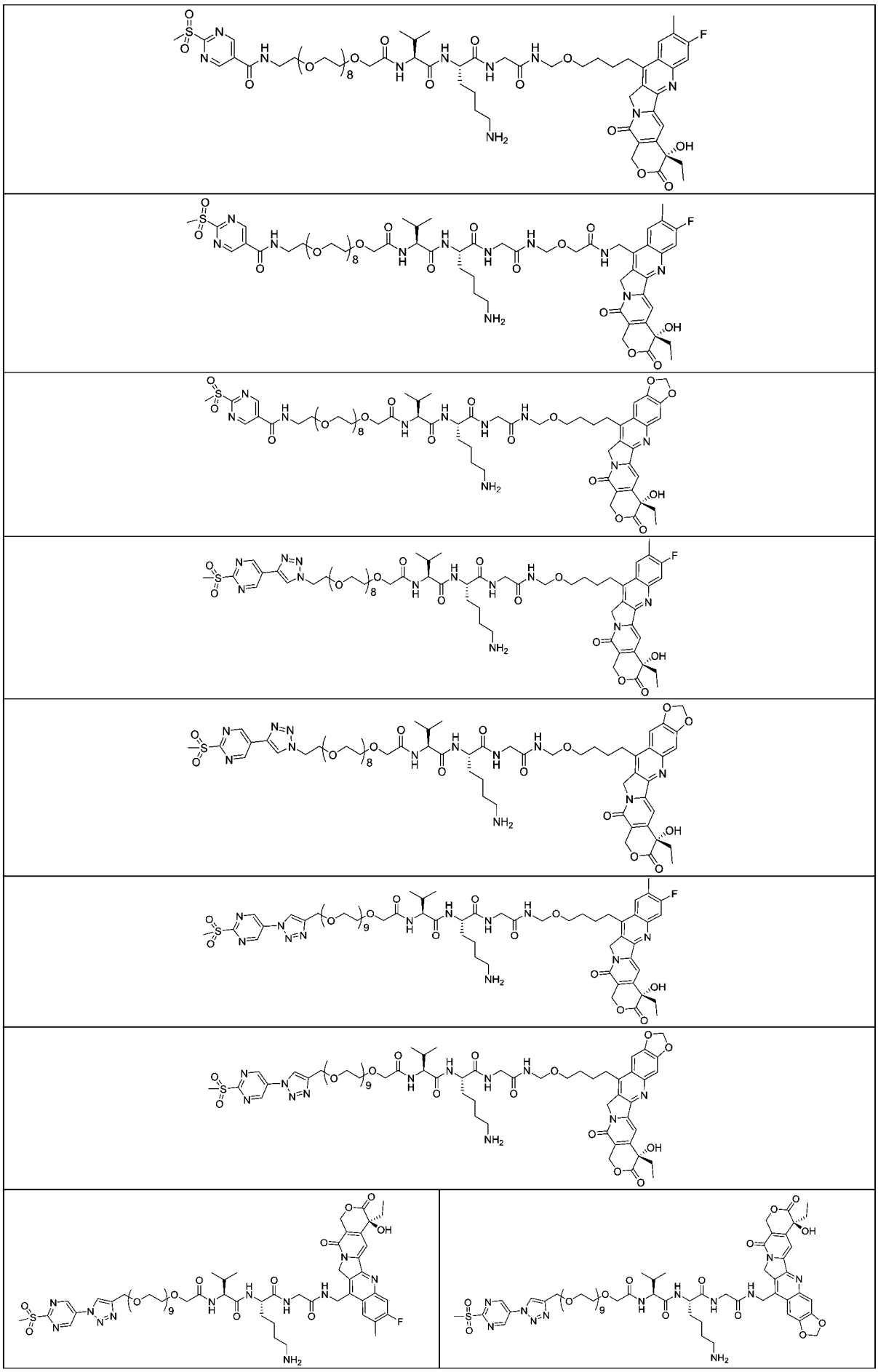


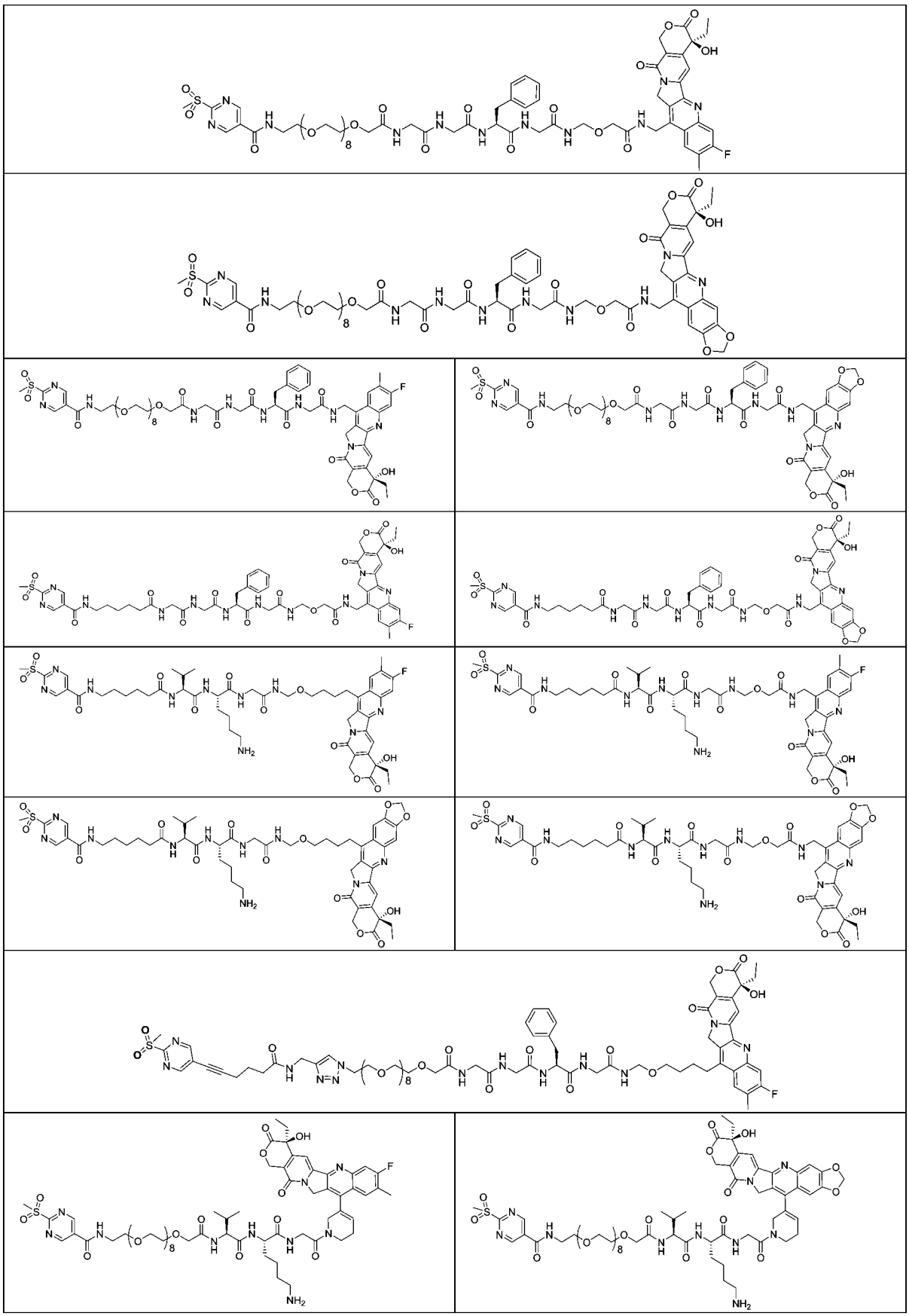


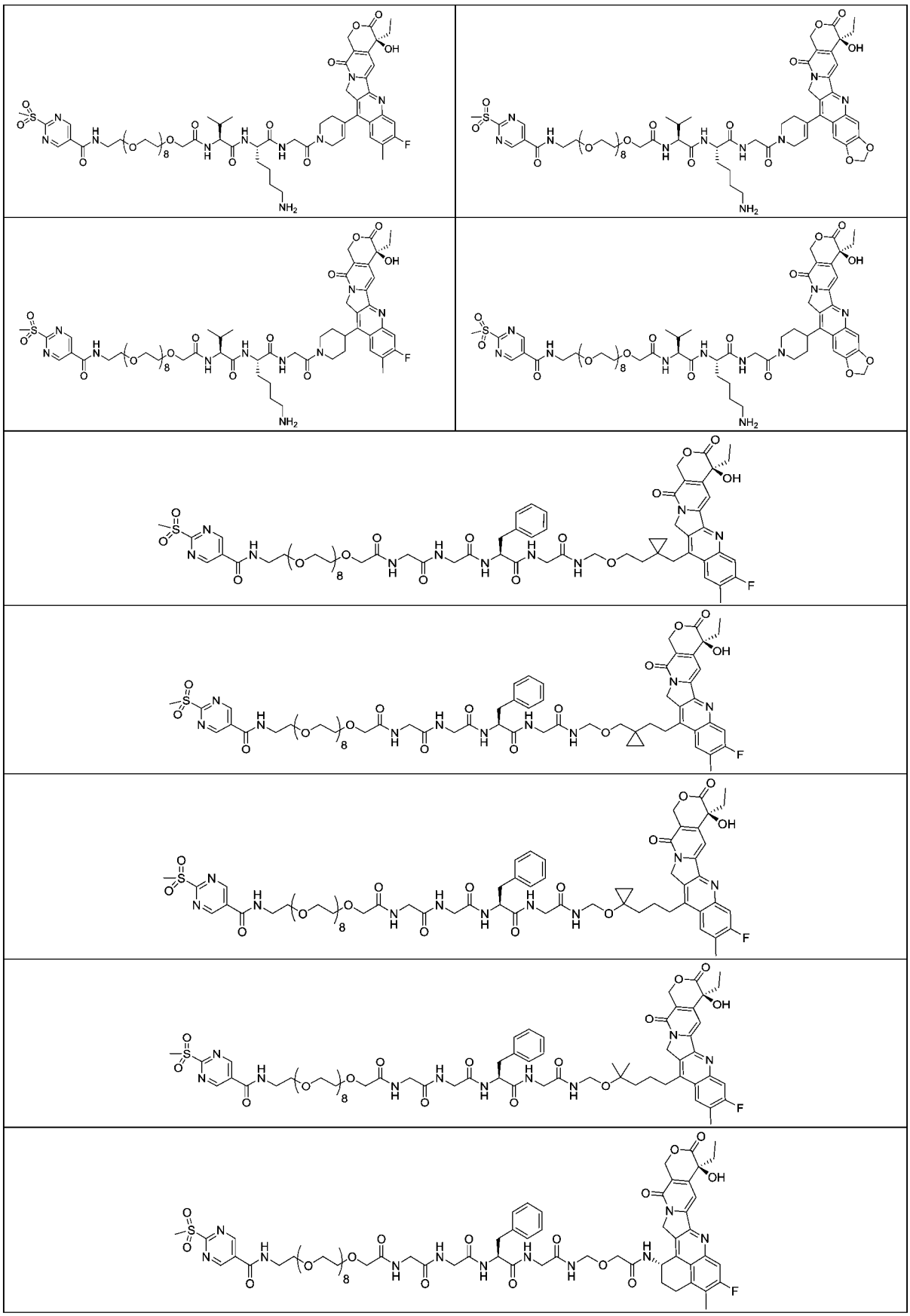


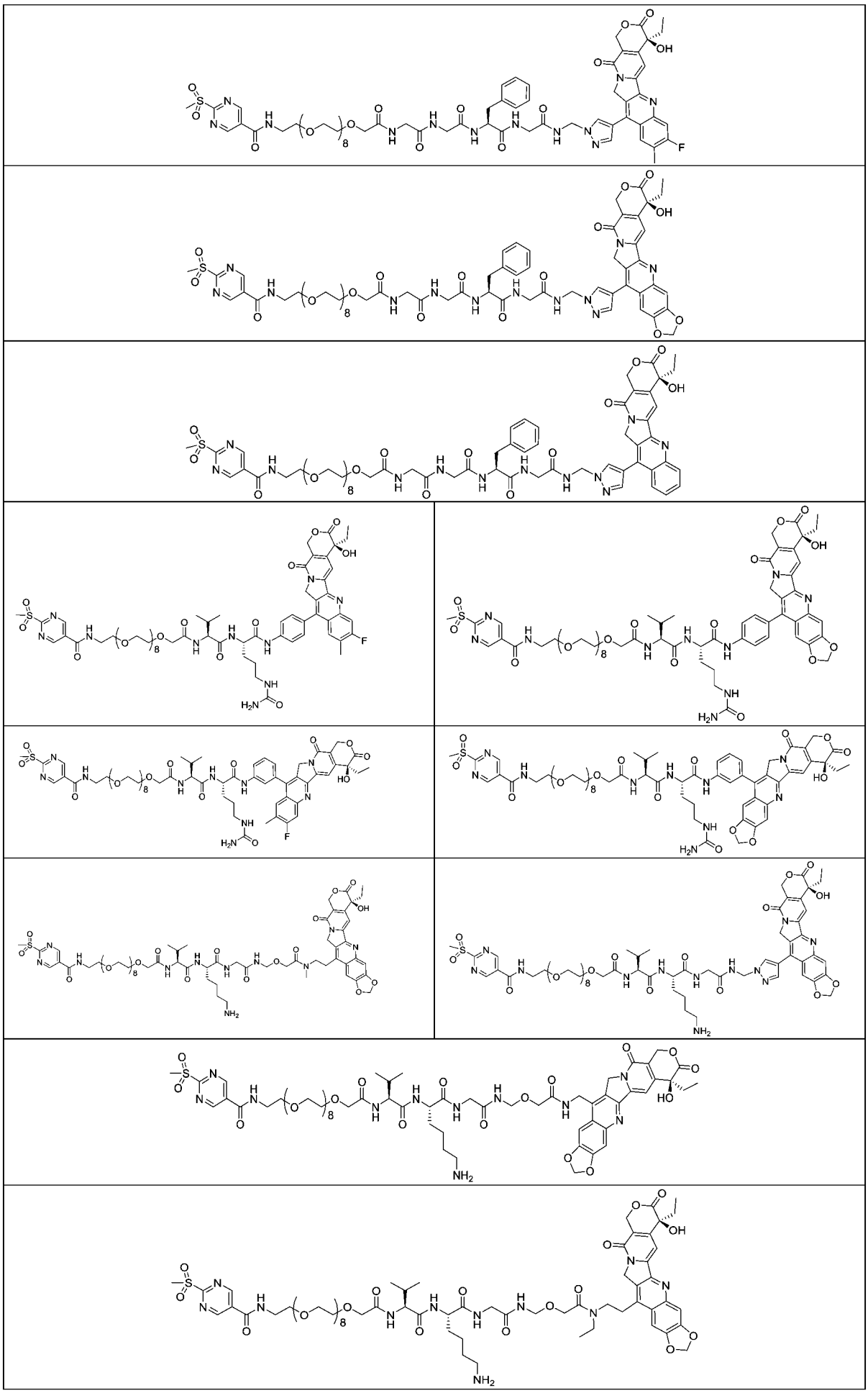


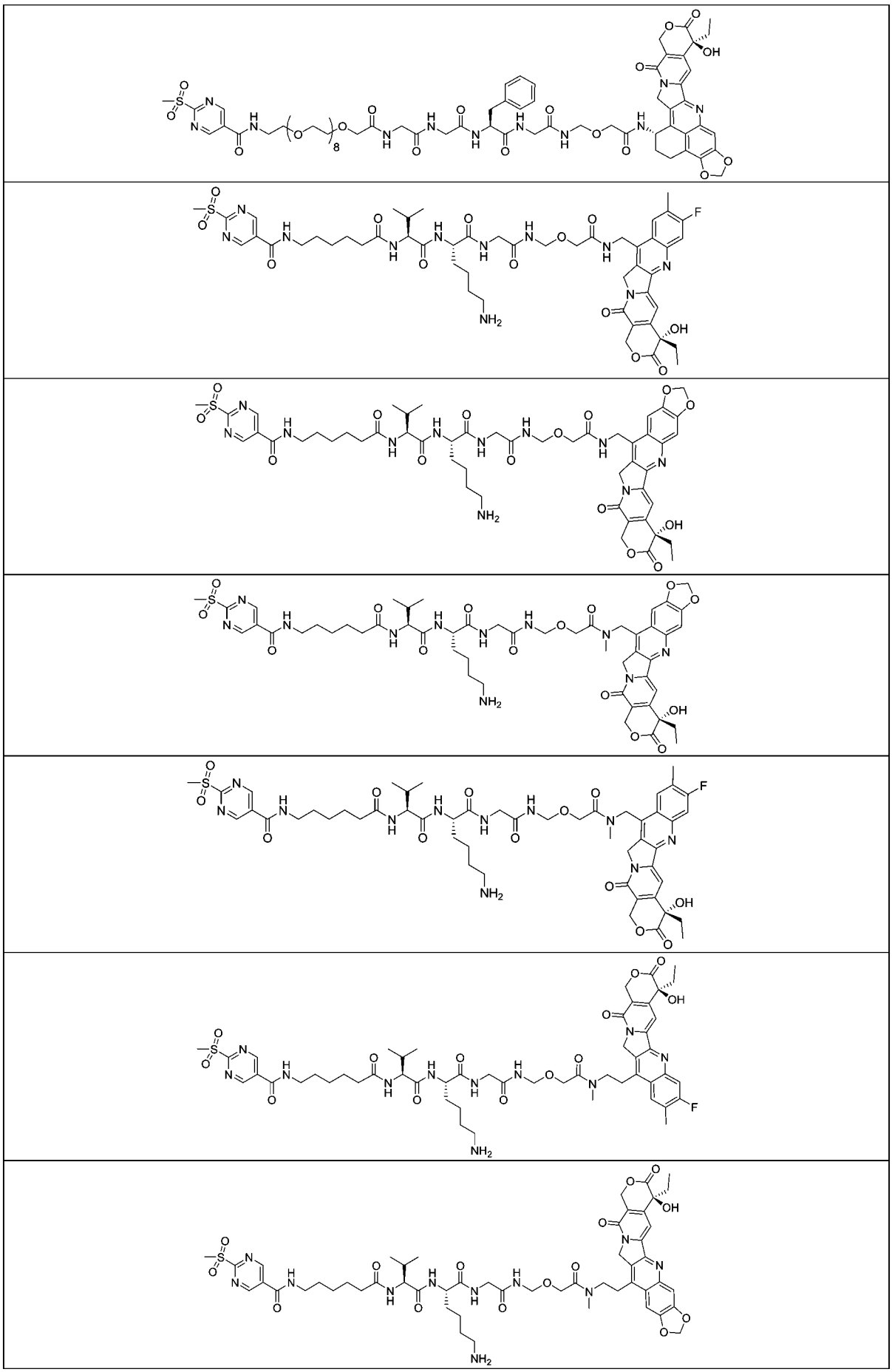


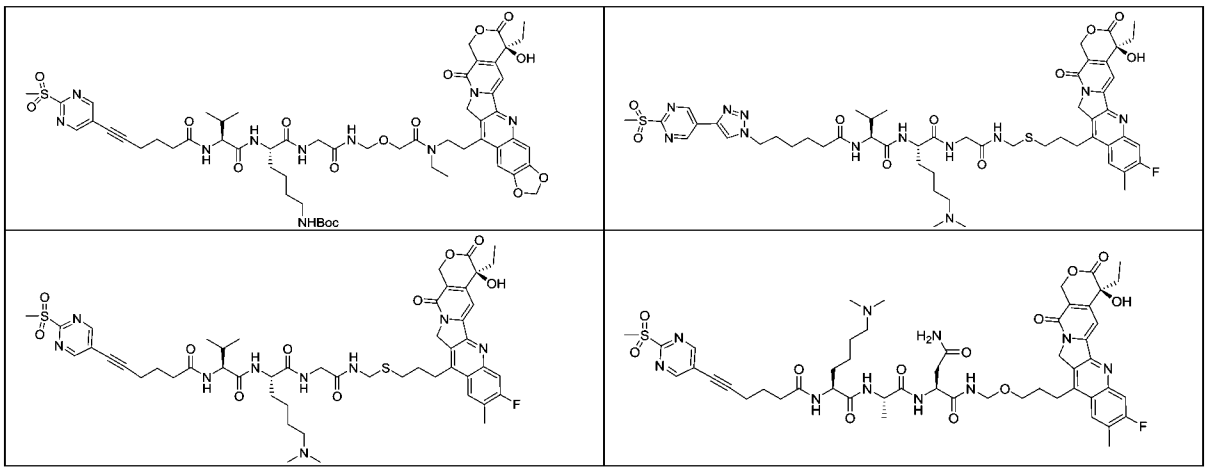






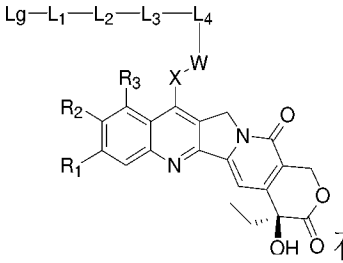






。

【請求項33】一種製備請求項28-32中任一項所述的配體藥物偶聯物的方法，其包括：

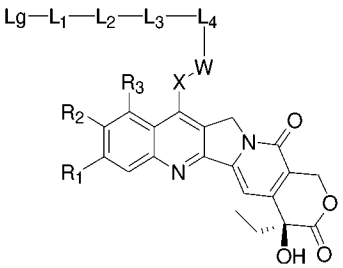
將Tb與式III所示的藥物連接體偶聯物  在合適的溶劑和條件下進行偶聯反應；

其中：

L_1、L_2、L_3、L_4、Tb如請求項1-24中任一項所定義；

R_1、R_2、R_3、X、W如請求項13-24所定義；

Lg如請求項28-32中任一項所定義。

【請求項34】如請求項33的方法，其中，所述方法包括將Tb與式III所示的藥物連接體偶聯物  在合適的溶劑和條件下進行偶聯反應形成C-S鍵的步驟；

優選地，所述Tb與所述藥物連接體偶聯物的物質的量的比為1:（1-20）；

優選地，所述偶聯反應在水和/或有機溶劑中進行；優選地，所述有機溶劑選自N,N-二甲基甲醯胺、二甲基亞碸、N-甲基吡咯烷酮、腈類(例如乙腈)、醇類(例如甲醇、乙醇)或其任意組合；所述的腈類可為乙腈，所述的醇類可為甲醇、乙醇；

優選地，所述方法進一步包括將偶聯產物進行純化的步驟；優選地，通過層析方法對所述偶聯產物進行純化；優選地，所述層析方法包括離子交換層析、疏水層析、反相層析或親和層析中的一種或多種。

【請求項35】一種結合B7H3的抗體或其抗原結合片段，所述抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區CDR：

(a) SEQ ID NO: 3或23所示的重鏈可變區VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體、以及HCDR3或其序列的變體;和/或

(b) SEQ ID NO:13或33所示的輕鏈可變區VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體、以及LCDR3或其序列的變體;

優選地，所述序列的變體為與其來源CDR相比為具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加，例如1個、2個或3個胺基酸的置換、缺失或添加的CDR；優選地，所述的置換為保守置換。

【請求項36】如請求項35所述的抗體或其抗原結合片段，其

中，所述抗體或其抗原結合片段包含：

(1) VH和/或VL，其中按IMGT編號系統定義：

(a) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:10的HCDR1，序列為SEQ ID NO:11的HCDR2，序列為SEQ ID NO:12的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:20的LCDR1，序列為GTF的LCDR2，序列為SEQ ID NO:22的LCDR3；

(b) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:10的HCDR1，序列為SEQ ID NO:11的HCDR2，序列為SEQ ID NO:12的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:40的LCDR1，序列為GAS的LCDR2，序列為SEQ ID NO:42的LCDR3；

(c) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:30的HCDR1，序列為SEQ ID NO:31的HCDR2，序列為SEQ ID NO:32的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:40的LCDR1，序列為GAS的LCDR2，序列為SEQ ID NO:42的LCDR3；

或

(d) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:30的HCDR1，序列為SEQ ID NO:31的HCDR2，序列為SEQ ID NO:32的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:20的LCDR1，序列為GTF的

LCDR2，序列為SEQ ID NO:22的LCDR3；

(2) VH和/或VL，其中按chothia編號系統定義：

(a) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:4的HCDR1，序列為SEQ ID NO:5的HCDR2，序列為SEQ ID NO:6的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:14的LCDR1，序列為SEQ ID NO:15的LCDR2，序列為SEQ ID NO:16的LCDR3；

(b) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:24的HCDR1，序列為SEQ ID NO:25的HCDR2，序列為SEQ ID NO:26的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:34的LCDR1，序列為SEQ ID NO:35的LCDR2，序列為SEQ ID NO:36的LCDR3；

(c) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:4的HCDR1，序列為SEQ ID NO:5的HCDR2，序列為SEQ ID NO:6的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:34的LCDR1，序列為SEQ ID NO:35的LCDR2，序列為SEQ ID NO:36的LCDR3；

或

(d) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:24的HCDR1，序列為SEQ ID NO:25的HCDR2，序列為SEQ ID NO:26的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:14的LCDR1，序列為SEQ

ID NO:15的LCDR2，序列為SEQ ID NO:16的LCDR3；

(3) VH和/或VL，其中按 kabat編號系統定義：

(a) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:7的HCDR1，序列為SEQ ID NO:8的HCDR2，序列為SEQ ID NO:9的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:17的LCDR1，序列為SEQ ID NO:18的LCDR2，序列為SEQ ID NO:19的LCDR3；

(b) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:27的HCDR1，序列為SEQ ID NO:28的HCDR2，序列為SEQ ID NO:29的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:37的LCDR1，序列為SEQ ID NO:38的LCDR2，序列為SEQ ID NO:39的LCDR3；

(c) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:7的HCDR1，序列為SEQ ID NO:8的HCDR2，序列為SEQ ID NO:9的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:37的LCDR1，序列為SEQ ID NO:38的LCDR2，序列為SEQ ID NO:39的LCDR3；

或

(d) 所述VH包含：序列為SEQ ID NO:27的HCDR1，序列為SEQ ID NO:28的HCDR2，序列為SEQ ID NO:29的HCDR3；和/或，

所述VL包含：序列為SEQ ID NO:17的LCDR1，序列為SEQ

ID NO:18的LCDR2，序列為SEQ ID NO:19的LCDR3；

可選地，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區VH和/或輕鏈可變區VL，其中，與前述IMGT、chothia或kabat定義的CDR相比，所述重鏈可變區VH和/或輕鏈可變區VL中至少一個CDR含有突變，所述突變為一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合，例如1個，2個或3個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；優選地，所述的置換為保守置換；

更優選地，所述抗體或其抗原結合片段結合人B7-H3和/或猴B7-H3。

【請求項37】如請求項35或36所述的抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗體或其抗原結合片段包含：

(a) SEQ ID NO:3或23所示的VH，和/或，SEQ ID NO:13或33任一項所示的VL；

(b) 與(a)中的任一VH相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VH；和/或，與(a)中的任一VL相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VL；或者

(c) 與(a)中的任一VH相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、

8個、9個或10個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合的VH；和/或，與(a)中的任一VL具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合的VL；優選地，所述的置換是保守置換。

【請求項38】如請求項35-37任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗體或其抗原結合片段包含：

(a) SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL；

(b) SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL；

(c) SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL；

(d) SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL；

(e) VH和VL，與(a)至(d)任一組中的VH和VL相比，其VH具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性；和/或，其VL具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性；或者

(f) VH和VL，與(a)至(d)任一組中的VH和VL相比，其VH具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；和/或，其VL具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；優選地，所述的置換是保守置換。

【請求項39】如請求項35-38任一項所述抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗體或其抗原結合片段是嵌合抗體、人源化抗體或全人源抗體；

可選地，所述抗體或其抗原結合片段選自scFv、Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv片段、二硫鍵連接的Fv(dsFv)、雙抗體 (diabody)和多特異性抗體；

可選地，所述scFv包含：

(i) SEQ ID NO:1或2所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多50個、至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至

少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)中所述的置換是保守置換。

【請求項40】如請求項35-39任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗體或其抗原結合片段進一步包含：

(a) 人免疫球蛋白的重鏈恆定區CH或其變體；和/或

(b) 人免疫球蛋白的輕鏈恆定區CL或其變體，

其中，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性；或者，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有一個或多個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合例如至多50個、至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；優選地，所述的置換是保守置換；

優選地，所述重鏈恆定區是IgG重鏈恆定區，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重鏈恆定區；和/或，所述輕鏈恆定區是κ或λ輕鏈恆定區；

更優選地，所述抗體或其抗原結合片段包含人IgG1重鏈恆定區；和/或所述抗體或其抗原結合片段包含人κ輕鏈恆定區。

【請求項41】如請求項40所述的抗體或其抗原結合片段，其中，

所述重鏈恆定區包括SEQ ID NO:43所示的CH或其變體，所述變體與SEQ ID NO:43相比具有至多20個胺基酸的保守置換例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換，例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸的保守置換；或者與SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性；和/或

所述輕鏈恆定區包括SEQ ID NO:44所示的CL或其變體，所述變體與SEQ ID NO:44相比具有至多20個胺基酸的保守置換例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換，例如1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸的保守置換，或者與SEQ ID NO:44相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性；

優選地，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:43所示的重鏈恆定區CH和SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區CL。

【請求項42】如請求項35-41任一項所述的抗體或其抗原結合

片段，其中，所述抗體包括：

(a) 包括SEQ ID NO:3所示的VH和SEQ ID NO:43所示的CH的重鏈，和，包括SEQ ID NO:13所示的VL和 SEQ ID NO:44所示的CL的輕鏈；優選包括SEQ ID NO:45所示的重鏈和SEQ ID NO:46所示的輕鏈；

(b) 包括SEQ ID NO:23所示的VH和SEQ ID NO:43所示的CH的重鏈，和，包括SEQ ID NO:33所示的VL和 SEQ ID NO:44所示的CL的輕鏈；優選包括SEQ ID NO:47所示的重鏈和SEQ ID NO:48所示的輕鏈。

【請求項43】一種多特異性抗體，其包含請求項35-42任一項所述的抗體或其抗原結合片段，和另外的抗體或其片段或抗體類似物；

優選地，所述多特異性抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體或四特異性抗體。

【請求項44】一種分離的核酸分子，其編碼請求項35-42任一項所述的抗體或其抗原結合片段，或請求項43所述的多特異性抗體。

【請求項45】一種載體，其包含請求項44所述的分離的核酸分子；優選地，所述載體為克隆載體或表達載體。

【請求項46】一種宿主細胞，其包含請求項44所述的分離的核酸分子或請求項45所述的載體。

【請求項47】一種製備請求項35-42任一項所述的抗體或其抗

原結合片段，或請求項43所述的多特異性抗體的方法，其包括，在允許所述抗體或其抗原結合片段表達的條件下，培養請求項46所述的宿主細胞，和從培養的宿主細胞培養物中回收所述抗體或其抗原結合片段，或所述多特異性抗體。

【請求項48】一種抗體-藥物偶聯物，其中抗體為請求項35-42任一項的抗體或其抗原結合片段，或請求項43所述的多特異性抗體，其通過連接體與偶聯部分連接，所述偶聯部分選自：可檢測的標記、放射性同位素、螢光物質、發光物質、有色物質、酶、聚乙二醇、核素、核酸、小分子毒素、具有結合活性多肽、蛋白、受體、配體，以及其它抑制腫瘤細胞生長、促進腫瘤細胞凋亡或壞死的活性物質。

【請求項49】一種配體藥物偶聯物，其包含請求項1-28中任一項所述的配體藥物偶聯物，所述的配體藥物偶聯物具有兩種或多種q值；

可選地，所述配體藥物偶聯物中的藥物與抗體的比例（DAR）選自1-10中的整數或小數；

優選地，所述配體藥物偶聯物中的藥物與抗體的比例（DAR）選自1.5-2.5、3.5-4.5、5.5-6.5和7.5-8.5；

優選地，所述配體藥物偶聯物中的藥物與抗體的比例（DAR）選自約2.0、4.0、6.0和8.0；

優選地，所述配體藥物偶聯物中的藥物與抗體的比例（DAR）選自2、2.5、3、3.5、4、4.5,5、5.5、6、6.5、7、7.2、7.4、

7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.7、8.9和9。

【請求項50】一種藥物組合物，其包含物質A，及任選的一種或多種藥用輔料，所述的物質A為如請求項1-24中任一項所述的配體藥物偶聯物、或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物、或如請求項26或27所述的化合物、或如請求項28-32任一項藥物連接體偶聯物、或如請求項35-42任一項所述的抗體或其抗原結合片段、或如請求項43所述的多特異性抗體、或如請求項44所述的核酸分子、或如請求項45所述的載體、或如請求項46所述的宿主細胞、或如請求項49所述的配體藥物偶聯物；優選還包括藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【請求項51】一種物質A或者請求項50所述的藥物組合物在製備治療和/或預防與細胞活動異常相關的疾病的藥物中的用途；所述的物質A為如請求項1-24中任一項所述的配體藥物偶聯物、或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物、或如請求項26或27所述的化合物、或如請求項28-32任一項所述的藥物連接體偶聯物、或如請求項35-42任一項所述的抗體或其抗原結合片段、或如請求項43所述的多特異性抗體、或如請求項44所述的核酸分子、或如請求項45所述的載體、或如請求項46所述的宿主細胞或如請求項49所述的配體藥物偶聯物；所述的與細胞活動異常相關的疾病可為癌症疾病；

優選地，所述癌症疾病選自食管癌、腦瘤、肺癌、鱗狀上皮細胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、頭頸癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸癌、直腸癌、結直腸癌、肝癌、腎癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中樞神經系統腫瘤、前列腺癌或甲狀腺癌；所述的食管癌例如食管腺癌或食管鱗狀細胞癌；所述的肺癌例如小細胞性肺癌、非小細胞性肺癌或肺腺癌；所述的中樞神經系統腫瘤例如神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、膠質瘤或肉瘤；所述結腸癌例如人結腸腺癌；

優選地，所述癌症疾病選自結腸癌，結直腸癌，結腸腺癌，肺癌，乳腺癌，前列腺癌，食管鱗癌；

更優選地，所述癌症疾病為與B7H3相關的癌症疾病；

更優選地，所述癌症疾病為與Her3相關的癌症疾病；

更優選地，所述癌症疾病為與EGFR相關的癌症疾病；

更優選地，所述癌症疾病為與Trop-2或Her2相關的癌症疾病；

最優選地，所述癌症疾病為乳腺癌或肺癌為非小細胞肺癌。

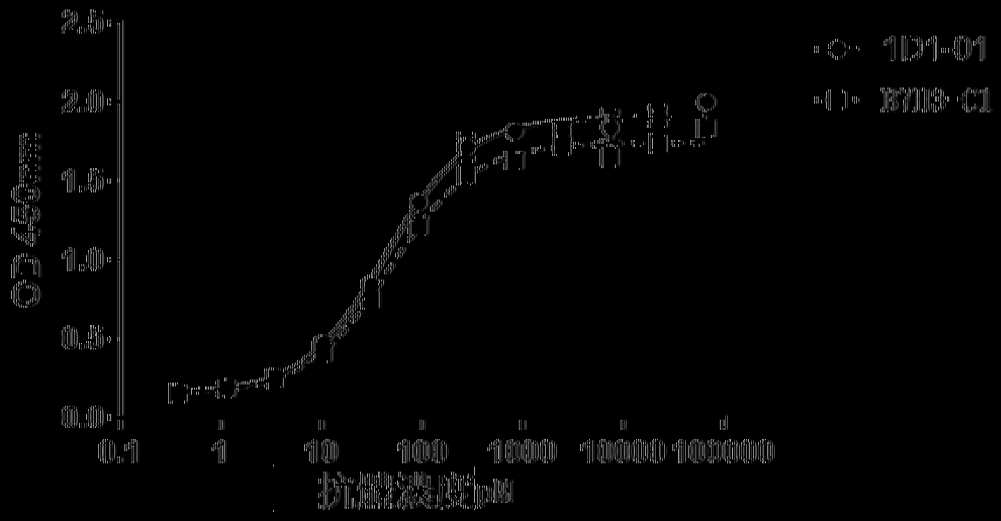

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗體濃度[pM]
101-01
B18-G1

圖 1A

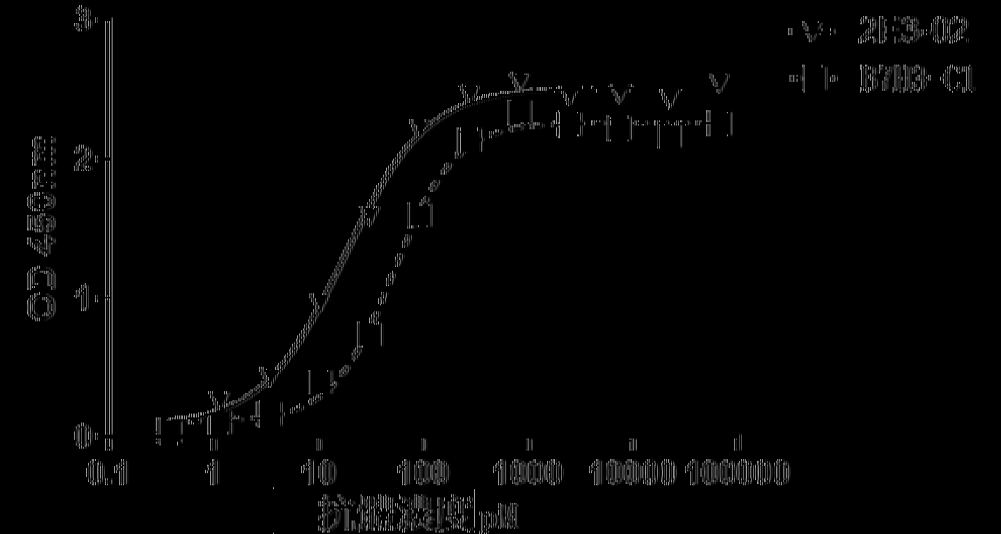

2
1
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗體濃度[pM]
213-02
B18-G1

圖 1B

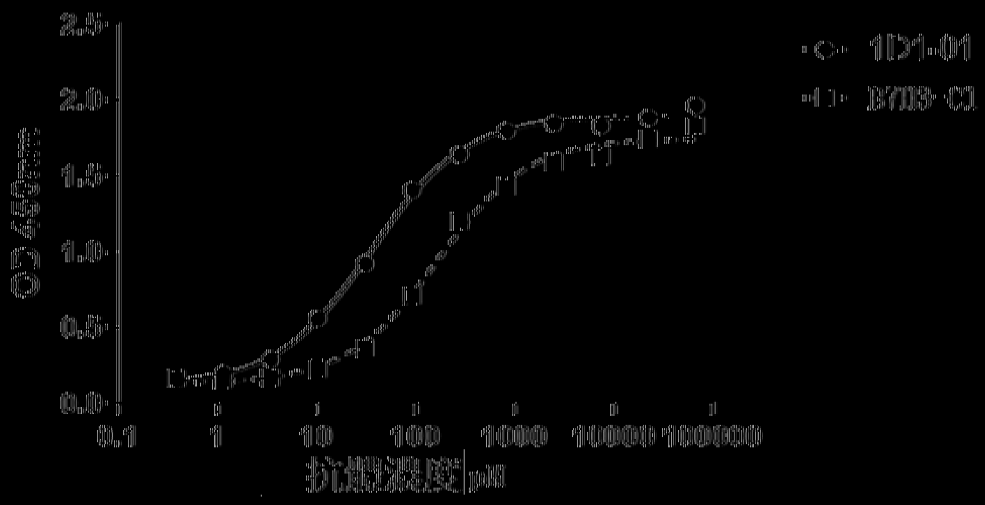

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
10000
抗體濃度(nM)
1D1-01
B7H3-01

圖 2A

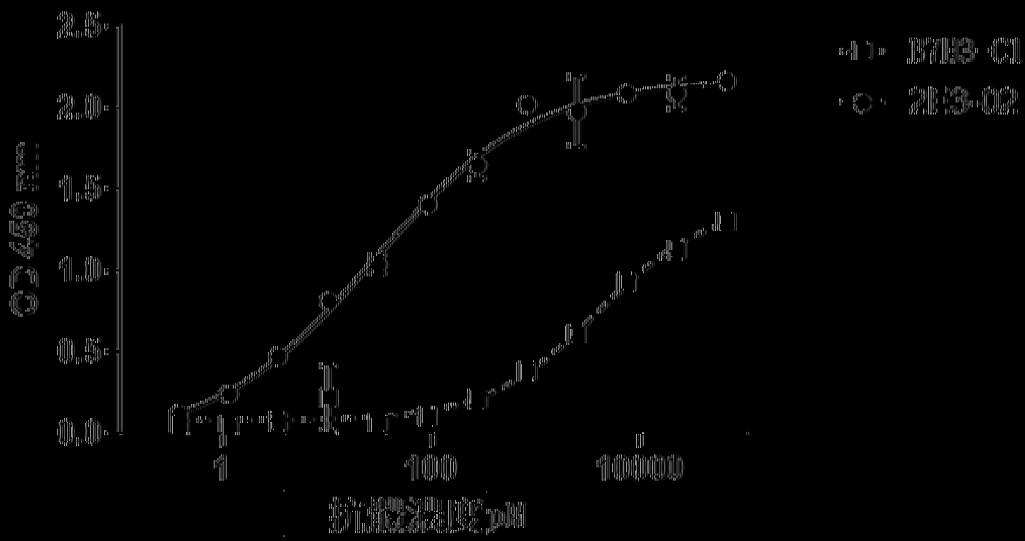

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
100
1000
抗體濃度(nM)
B7H3-01
2E3-02

圖 2B

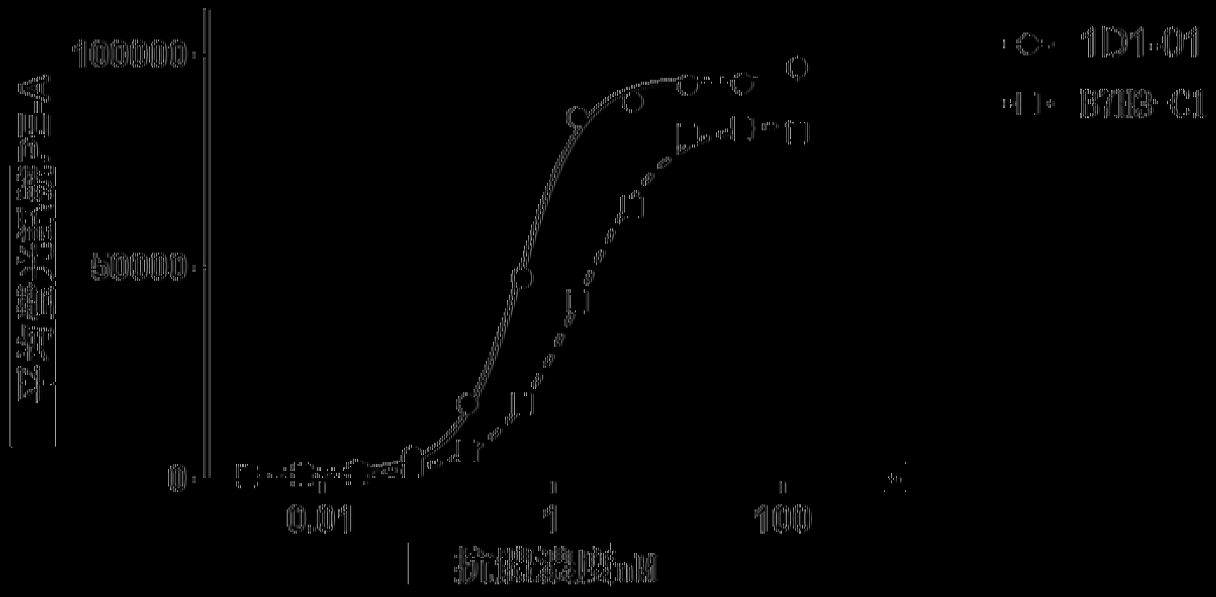

100000
50000
0
0.01
1
100
1D1-01
B7H3-C1

圖 3A

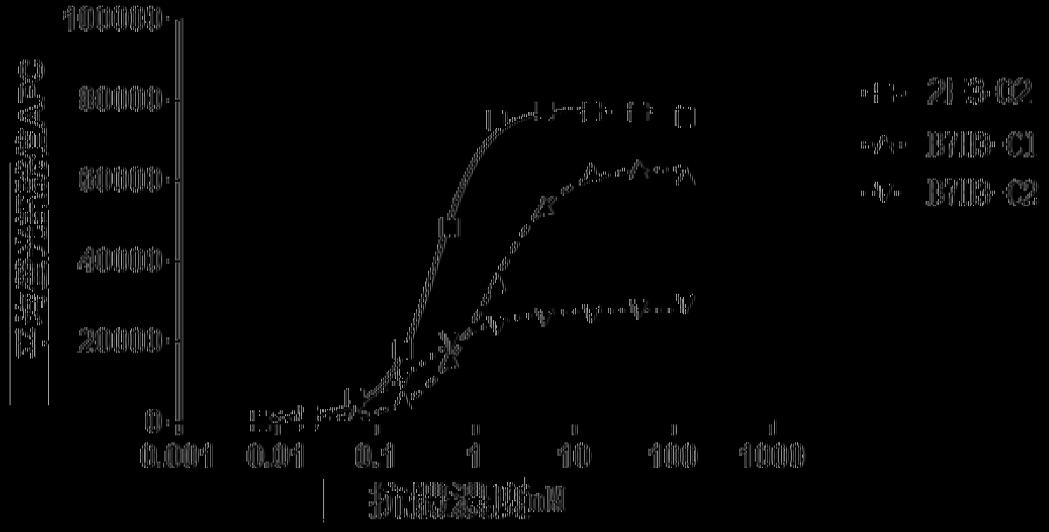

100000
80000
60000
40000
20000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
2H3-02
B7H3-C1
B7H3-02

圖 3B

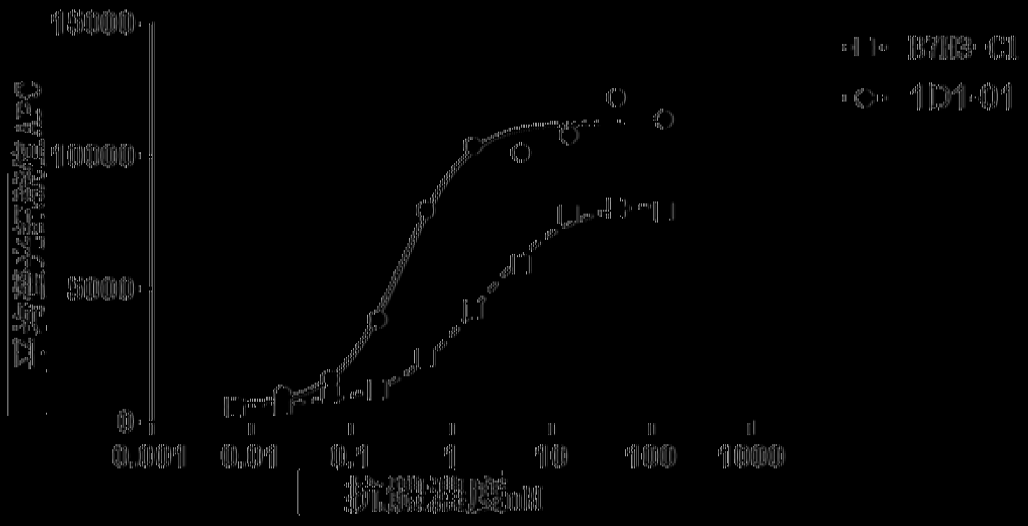

15000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度nM
BMB-01
1D1-01

圖 4A

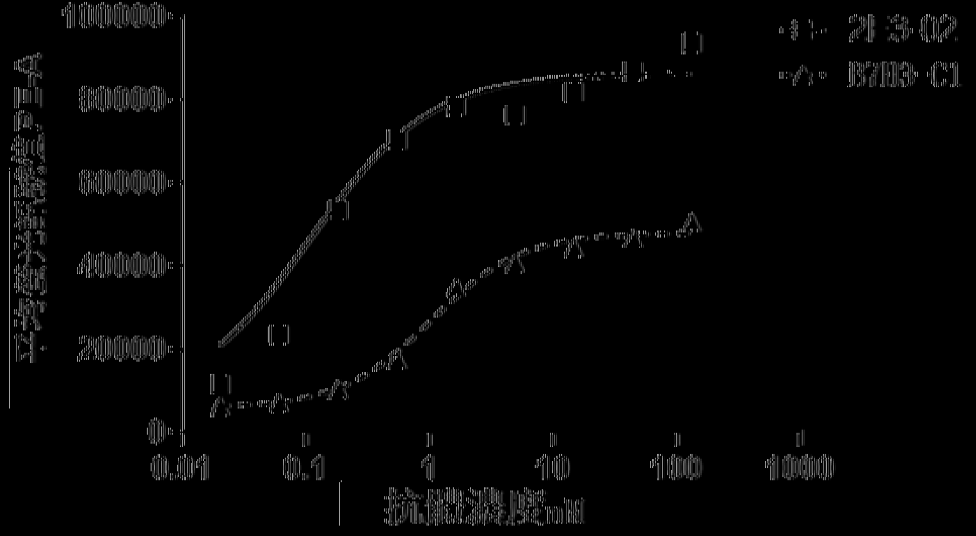

100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度nM
2H3-02
BMB-01

圖 4B

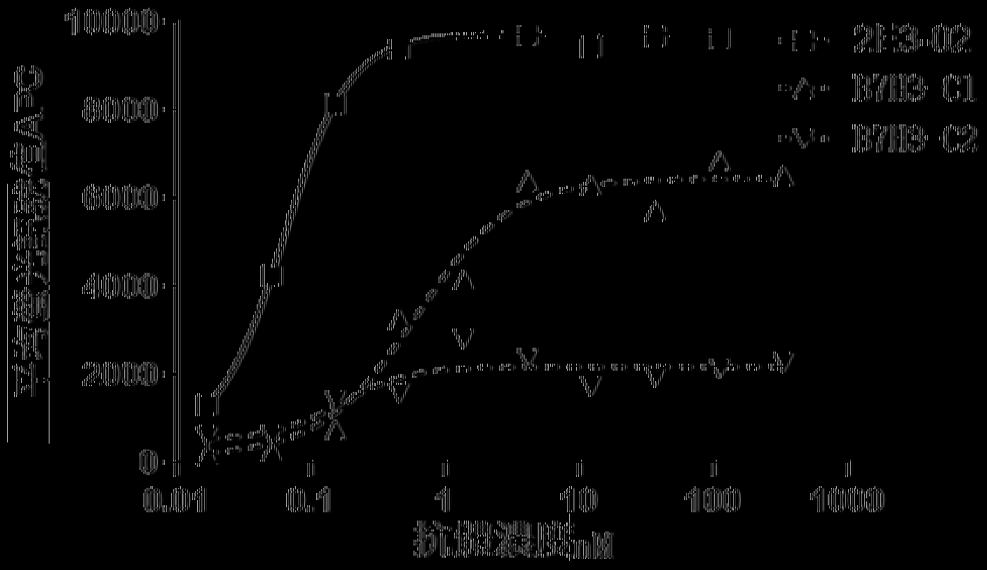

10000
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度nM
2E3-02
BMB-C1
BMB-C2

圖5

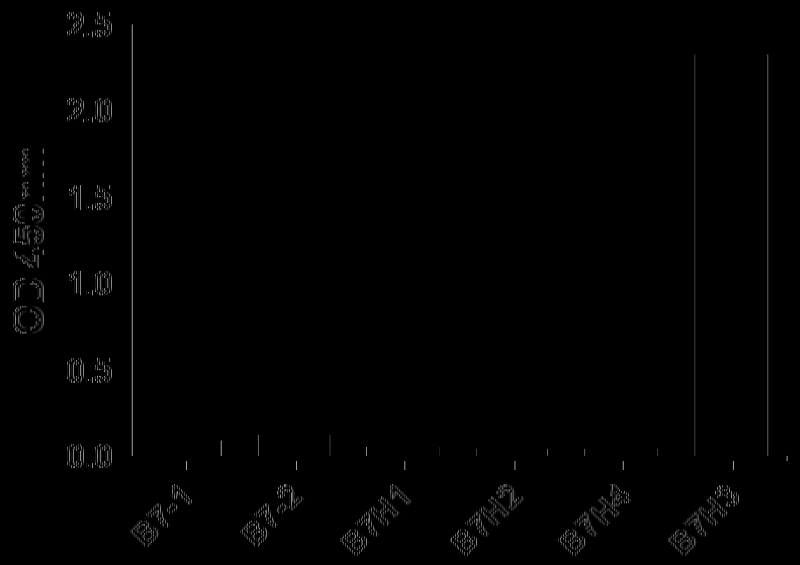

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
6T-1
6T-2
6TH1
6TH2
6TH4
6TH5

圖 6A

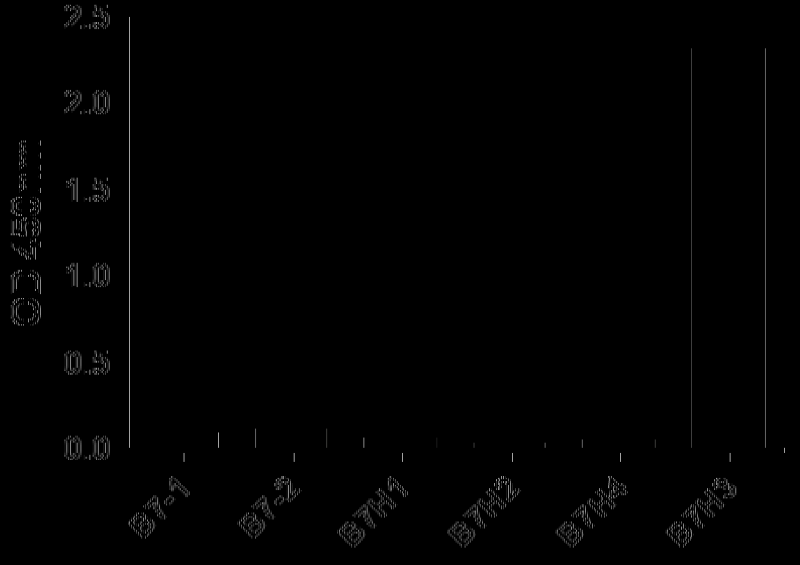

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
6T-1
6T-2
6TH1
6TH2
6TH4
6TH5

圖 6B

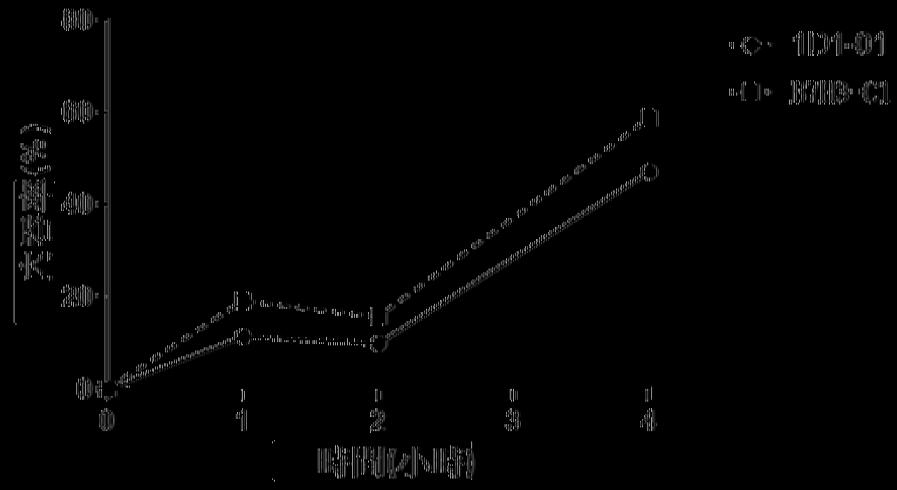

80
60
40
20
0
腫瘤體積
0
1
2
3
4
時間(小時)
IDN-01
IDN-01

圖 7A

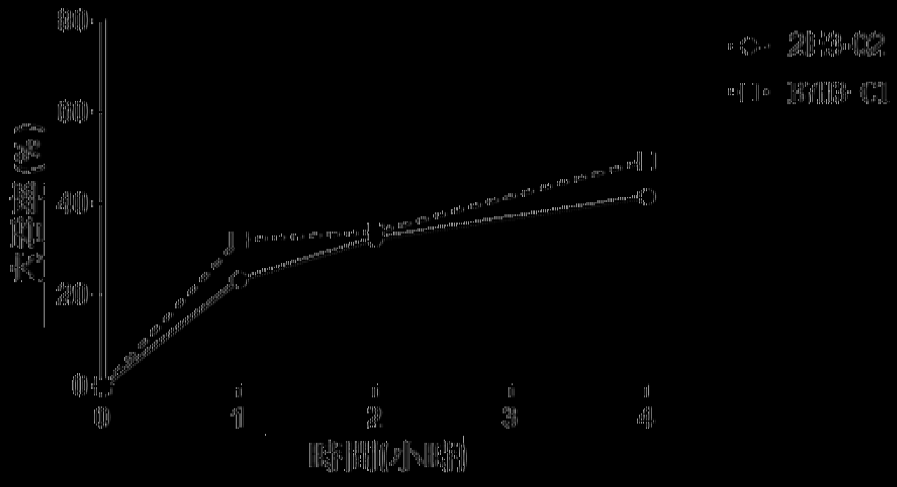

80
60
40
20
0
腫瘤體積
0
1
2
3
4
時間(小時)
IDN-02
IDN-02

圖 7B

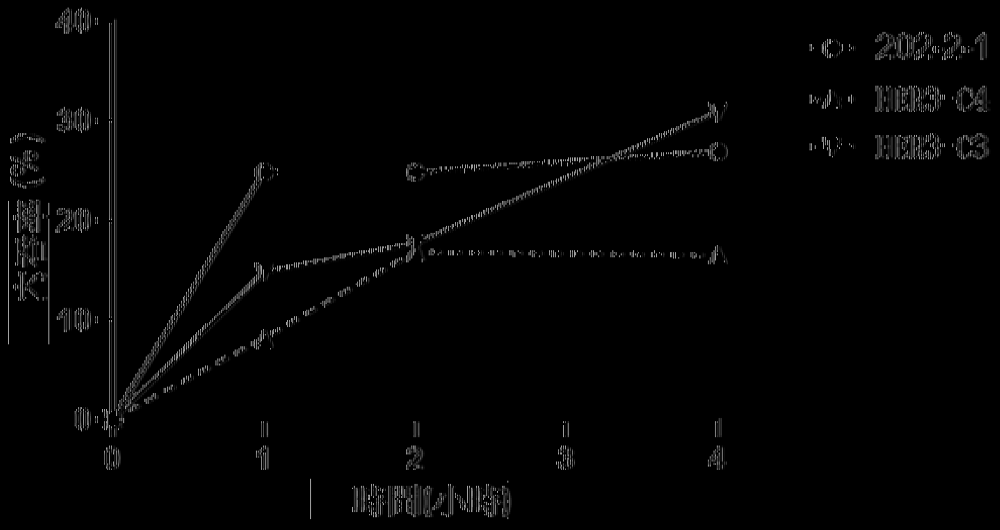


圖 7C

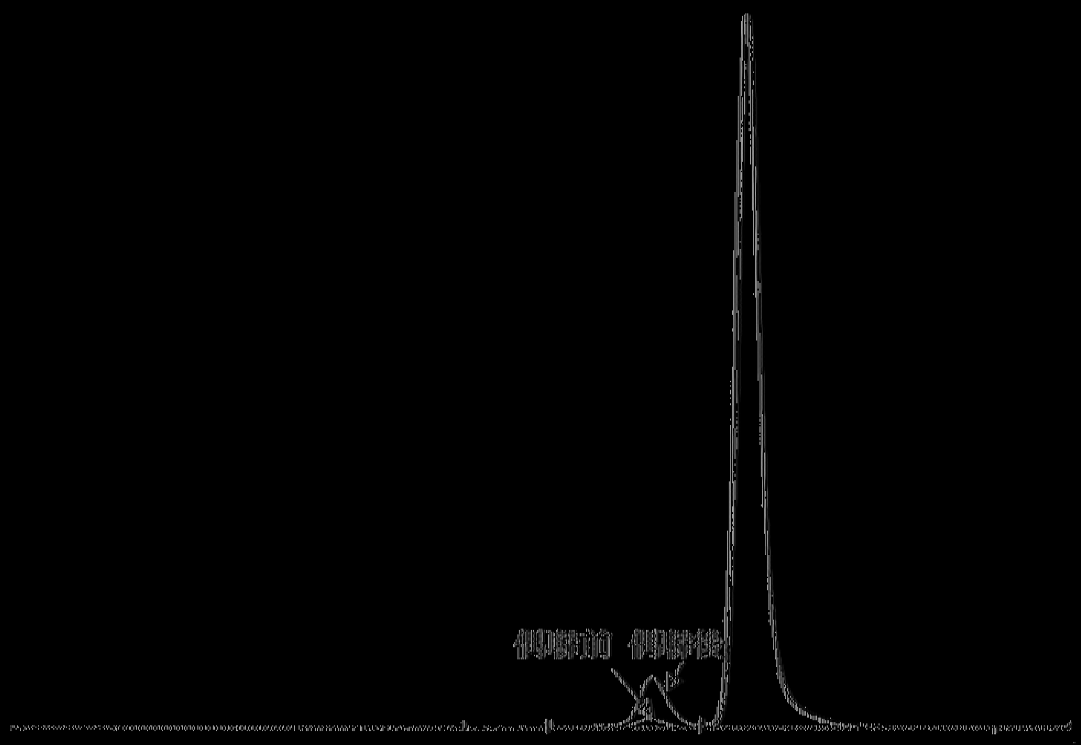


圖 8

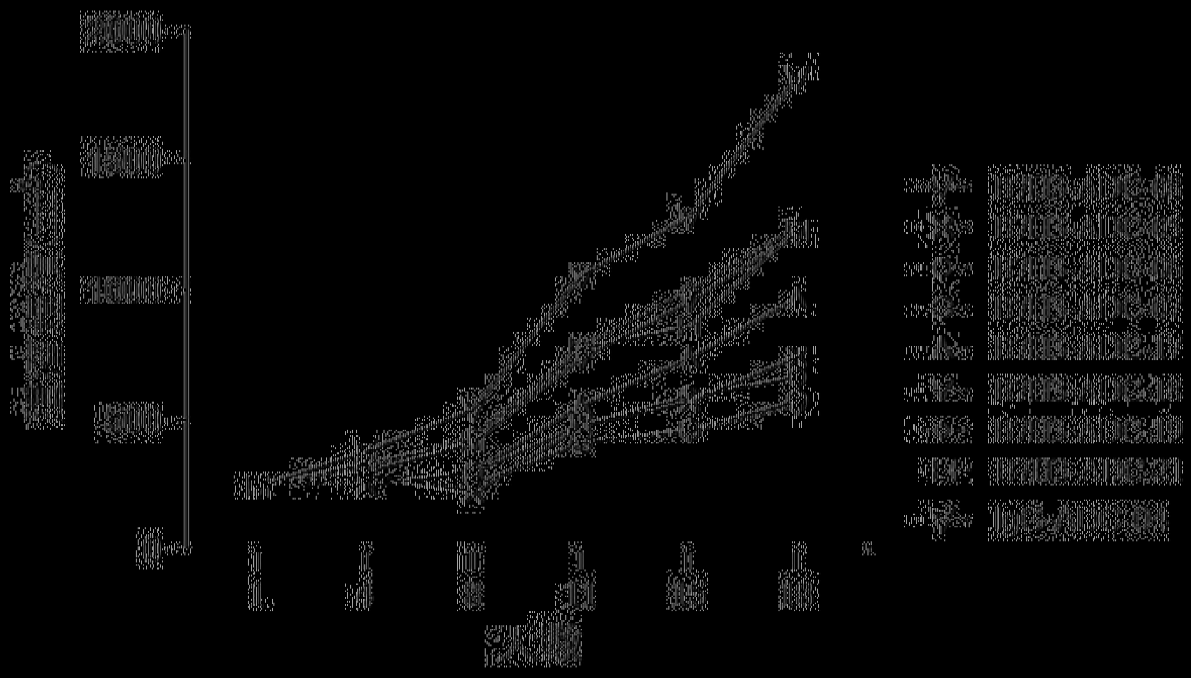


圖 9

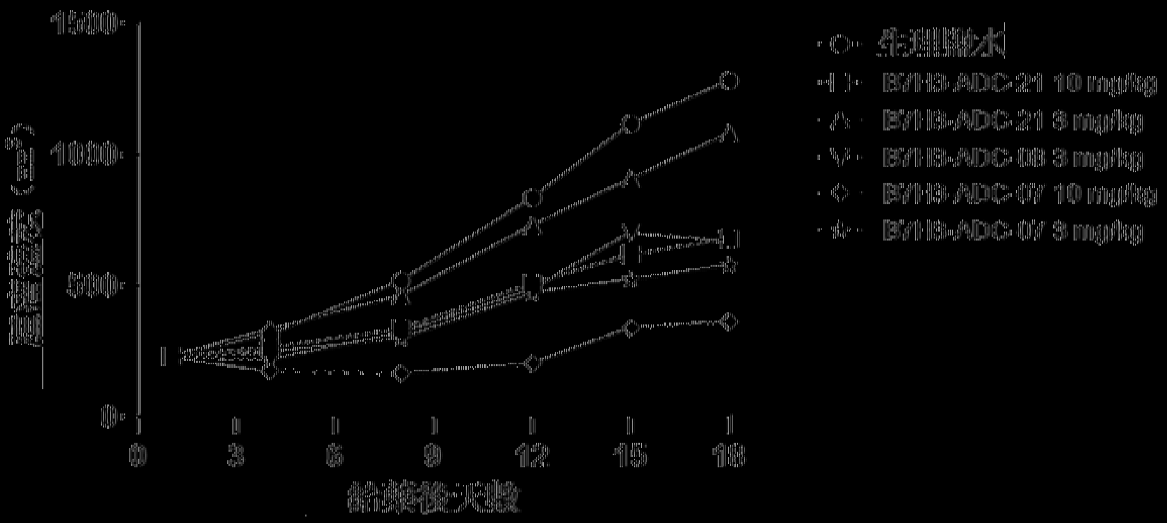

15000
10000
5000
0
0
3
6
9
12
15
18
結腸腫瘤體積
給藥後天數
生理鹽水
B7H3-ADC-21 10 mg/kg
B7H3-ADC-21 3 mg/kg
B7H3-ADC-08 3 mg/kg
B7H3-ADC-07 10 mg/kg
B7H3-ADC-07 3 mg/kg

圖 10

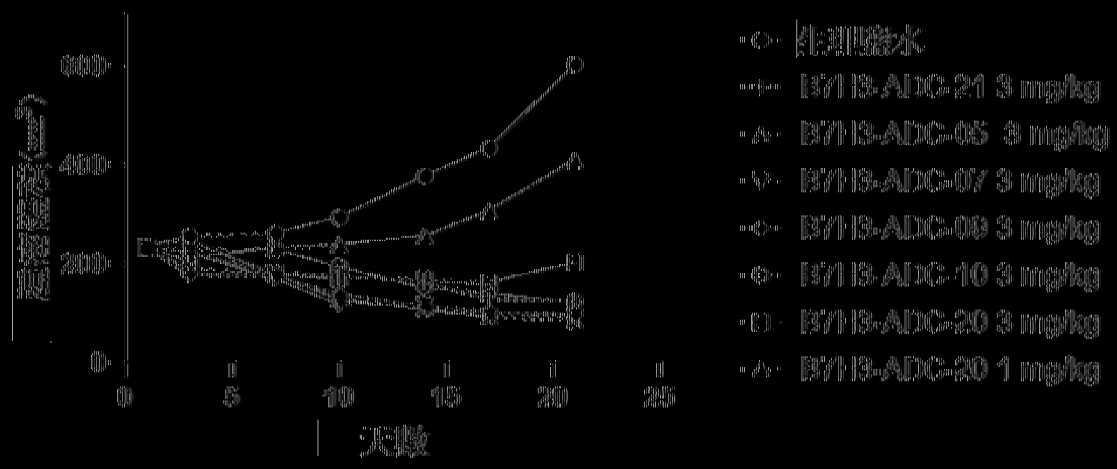

腫瘤體積
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
天數
Vehicle(注射用水)
B7H3-ADC-21 3 mg/kg
B7H3-ADC-05 3 mg/kg
B7H3-ADC-07 3 mg/kg
B7H3-ADC-09 3 mg/kg
B7H3-ADC-10 3 mg/kg
B7H3-ADC-20 3 mg/kg
B7H3-ADC-20 1 mg/kg

圖11

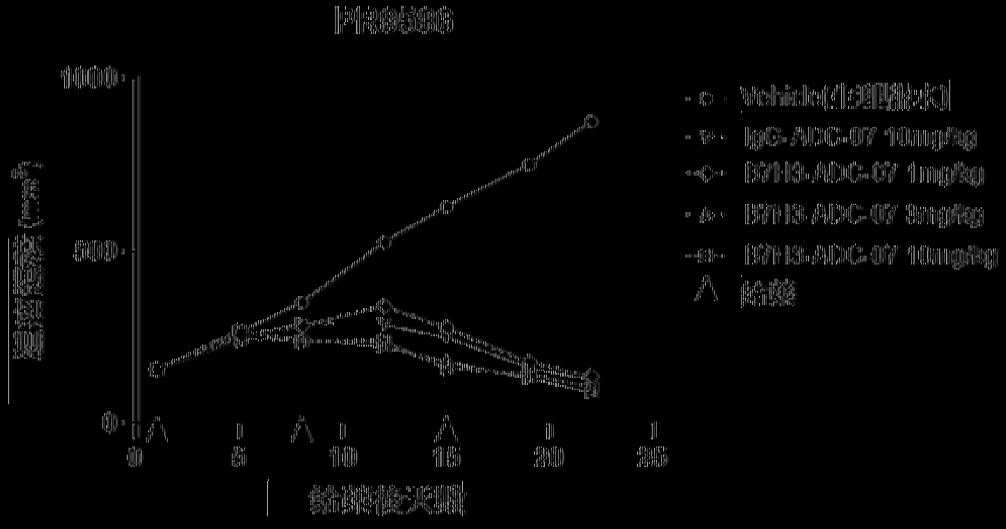

PR0606
腫瘤體積
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
給藥後天數
Vehicle(注射用水)
IgG-ADC-07 10mg/kg
B7H3-ADC-07 1mg/kg
B7H3-ADC-07 3mg/kg
B7H3-ADC-07 10mg/kg
給藥

圖12

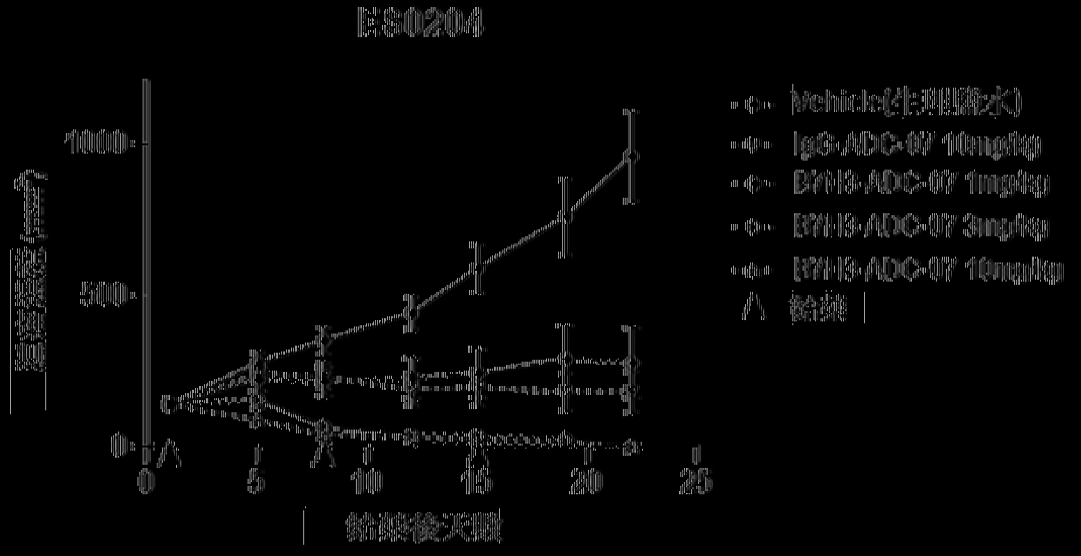

BT0204
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
給藥後天數
Vehicle(生理鹽水)
IgG-ADC-07 10mg/kg
B7H3-ADC-07 1mg/kg
B7H3-ADC-07 3mg/kg
B7H3-ADC-07 10mg/kg

圖 13

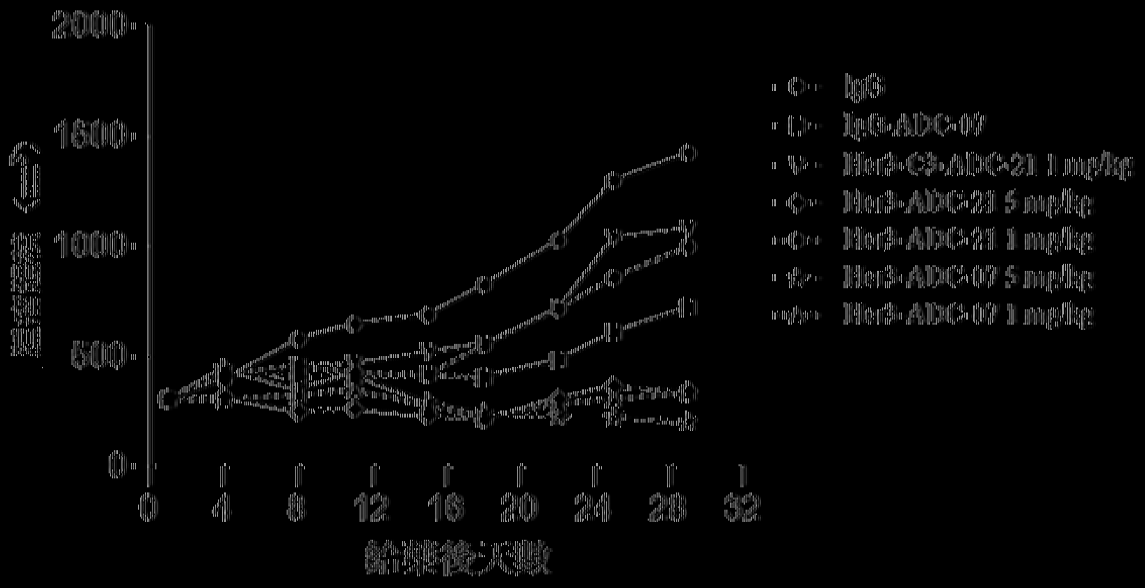

2000
1600
1000
500
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
給藥後天數
IgG
IgG-ADC-07
Her3-C3-ADC-21 1 mg/kg
Her3-ADC-21 5 mg/kg
Her3-ADC-21 1 mg/kg
Her3-ADC-07 5 mg/kg
Her3-ADC-07 1 mg/kg

圖 14

圖 15

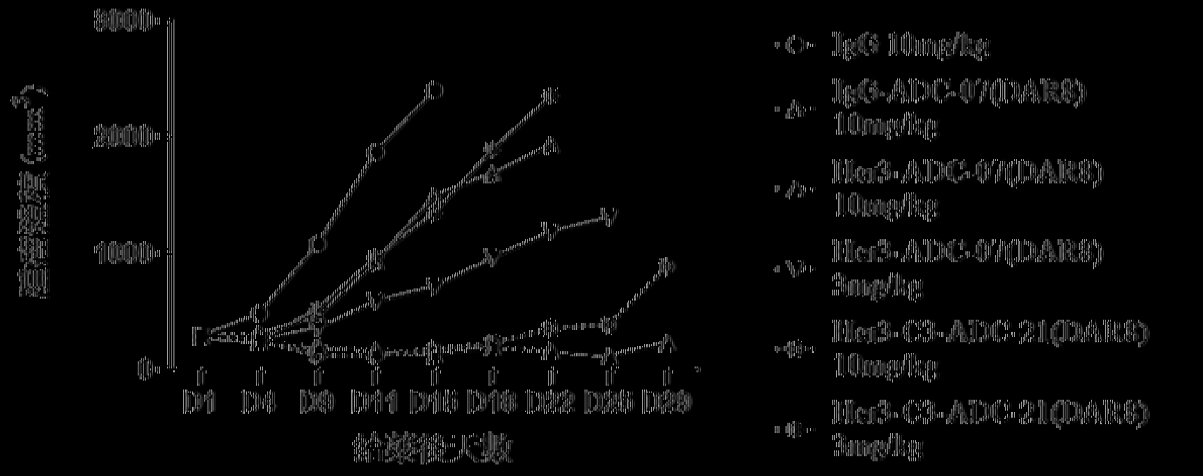


圖 16

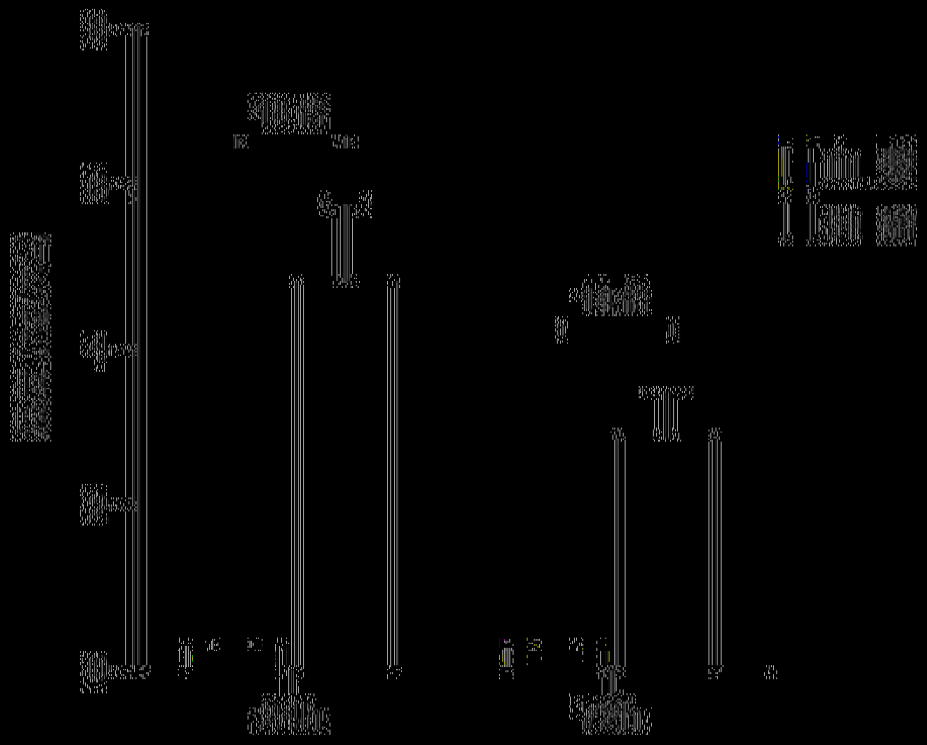


圖 17

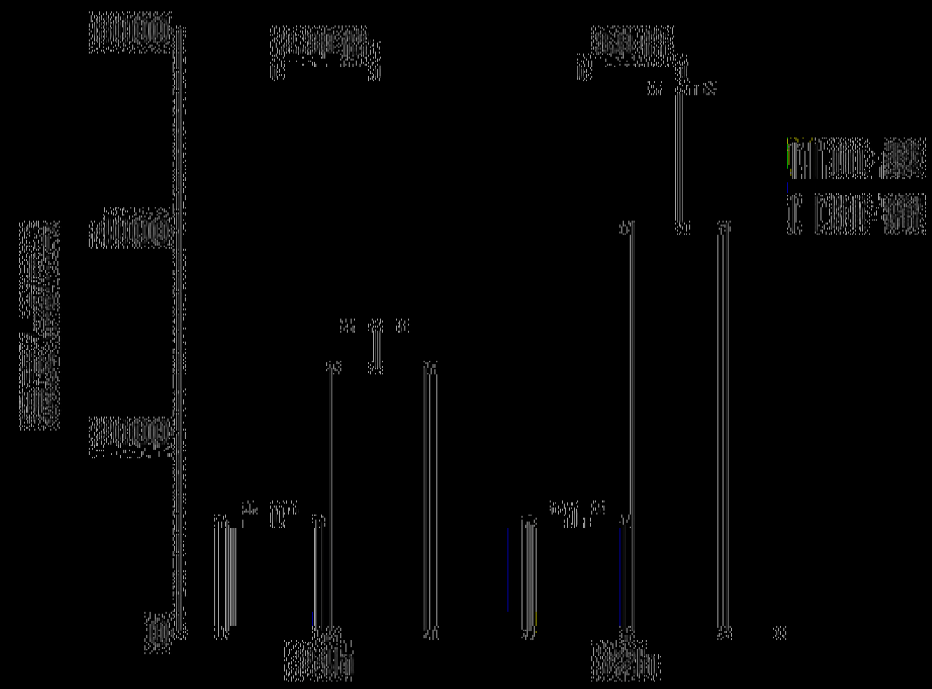


圖 18

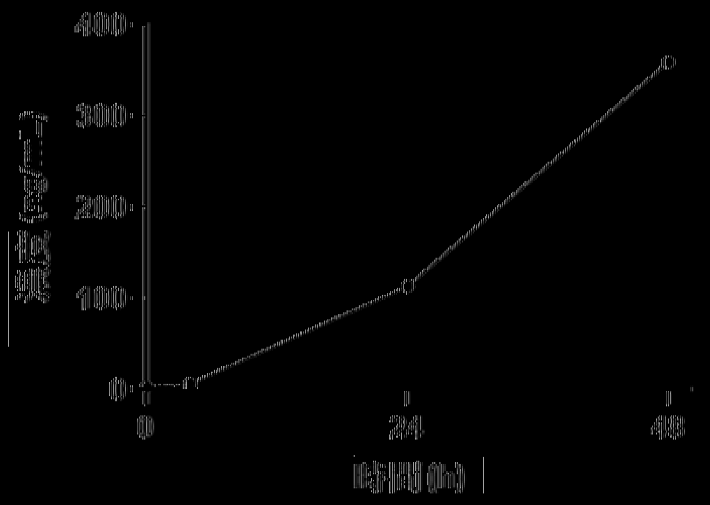


圖 19A

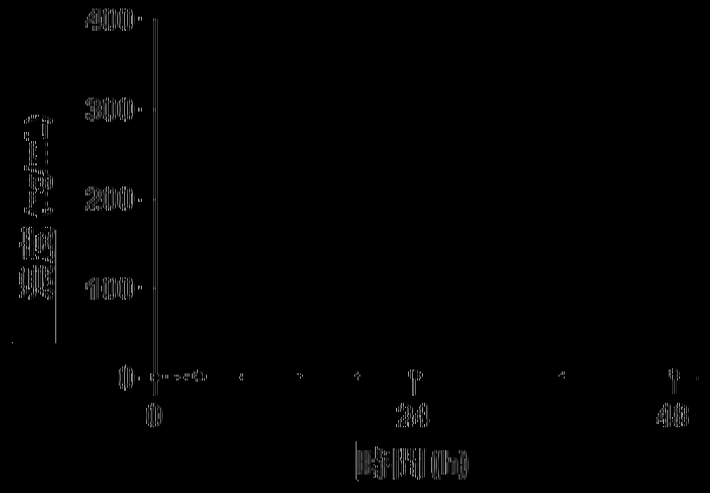


圖 19B

111 年 04 月 15 日修正替換

【發明說明書】

【中文發明名稱】生物活性物偶聯物及其製備方法和用途

【英文發明名稱】BIOLOGICALLY ACTIVE CONJUGATE AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】本公開屬於醫藥技術領域，涉及生物活性物偶聯物（配體藥物偶聯物）、化合物、藥物連接體偶聯物及其製備方法，以及其在預防和/或治療與細胞活動異常相關的疾病，包括但不限於在預防和/或治療腫瘤疾病中的用途。

【0002】本申請要求申請日為2021/2/9的中國專利申請2021101781361的優先權；要求申請日為2021/3/30的中國專利申請2021103408065的優先權；要求申請日為2021/7/21的中國專利申請202110825932X的優先權；要求申請日為2021/7/21的中國專利申請2021108259226的優先權，序列表txt的檔也於2021/7/21與中國專利申請2021108259226同時提交；要求申請日為2021/7/21的中國專利申請2021108259067的優先權，序列表txt的檔也於2021/7/21與中國專利申請2021108259067同時提交。本申請引用上述中國專利申請的全文。本申請包含的序列列表是說明書的一部分，並且本文通過引用整體併入本文。

【先前技術】

【0003】利用細胞毒的化療一度是癌症的標準療法，但高殺傷力的細胞毒

素分子會殺傷正常細胞，引起嚴重的毒副作用。靶向抗腫瘤藥物由於同時具有靶向性和抗腫瘤活性，已成為當今腫瘤研究領域的熱點，但經常由於靶向藥物的靶點選擇性問題產生比較大的毒副作用，從而限制了靶向藥物的治療效果。生物大分子藥物，如抗體或抗體片段，雖然靶向性強，但對實體瘤的治療效果有限，或者根本不具有治療效果。ADC是抗體和小分子藥物的偶聯體，融合了抗體的靶向作用和生物活性分子的活性，成為一種生物導彈，具有非常可期待的療效和安全性優勢。抗體引導ADC結合到靶細胞，隨後被細胞內化，小分子藥物在細胞內通過特定酶作用下發生的酶解釋放，治療疾病。

【0004】ADC藥物近幾年發展非常迅速，已經上市的ADC有14種：（1）Mylotarg（Gemtuzumab Ozogamicin，吉妥珠單抗（CD33）-卡齊黴素），CD33陽性急性髓性白血病（AML），2000年FDA批准上市，2010年下市，2017年重新上市；（2）Adcetris（Brentuximab Vedotin，CD30單抗-MMAE），經典霍奇金淋巴瘤和間變性大細胞淋巴瘤，2011年FDA批准上市；（3）Kadcyla（Trastuzumab Emtansine，曲妥珠單抗（Her2）-美登素生物鹼TM1），HER2陽性乳腺癌，2013年FDA批准上市；（4）Besponsa（Inotuzumab ozogamicin，CD22單抗-卡奇黴素），成人復發或難治性B細胞淋巴細胞白血病，2017年批准上市；（5）Lumoxiti（Moxetumomab pasudotox-tdfk, CD22-假單胞菌外毒素），復發性或難治性毛細胞白血病（HCL），2018年上市；（6）Polivy（Polatuzumab vedotin-piiq, CD79b-MMAE），復發性或難治性彌漫性大B細胞淋巴瘤（R/R DLBCL），2019年上市；（7）Padcev（Enfortumab vedotin-ejfv, Nectin 4-MMAE），局部晚期

或轉移性尿路上皮癌（UC），2019年上市；（8）Enhertu（Famtrastuzumab deruxtecan-nxki, Her2-拓撲異構酶I抑制劑），乳腺癌，2019年上市；（9）Trodelvy（Trop2-拓撲異構酶I抑制劑 ADC），三陰乳腺癌，2020年4月FDA批准上市；（10）BCMA ADC Belantamab mafodotin（GSK2857916）；(11) CD19 ADC Zynlonta (loncastuximab tesirine); (12) EGFR ADC Akalux; (13) Her2 ADC 維迪西妥單抗RC48；（14）Tissue Factor ADC Tivadak（tisotumab vedotin）。

【0005】ADC藥物由抗體、生物活性分子（藥物分子）及連接體（Linker）三部分組成。生物活性分子通過連接體共價偶聯到抗體上。除了靶向性和生物活性，生物活性分子與抗體的偶聯方式也是ADC藥物的核心之一，其決定了藥品的均一性和穩定性，極大地影響ADC的藥代動力學性質和毒性等。生物活性分子與抗體連接部分的穩定性的提高，會增加ADC體循環穩定性，減少藥物在非靶向組織的脫落，從而相對增加了帶入靶細胞內和靶細胞附近周圍的藥物，增加生物活性分子在靶細胞內及附近的釋放量，可以進一步的增效減毒。因此，增加生物活性分子與抗體連接穩定性是ADC藥物研究中極為重要的技術領域之一。

【0006】目前上市的10種ADC抗體和連接體的偶聯方式主要有兩種：（1）離胺酸是抗體中最常見的連接位點，其ε-胺基可以與連接體的活化羧基反應，形成醯胺鍵。目前已有可以實現定點偶聯的技術，即以活化基團活化連結子的羧基，再與抗體中特定的離胺酸ε-胺基形成醯胺鍵，完成偶聯。一方面，通過此類醯胺鍵實現定點定量偶聯還不具有廣譜實用性，只能在某些特定情況下使用；另一方面，在體內酶的作用下，易發生水解，導致

生物活性分子與抗體在未達到靶細胞時即發生脫落，增加了毒性。(2) 抗體半胱胺酸的巯基（SH），都是以二硫鍵的形式存在。打開抗體中的二硫鍵，可以提供多個自由的巯基作為偶聯位點。與抗體巯基進行偶聯，一種方法是抗體上自由的巯基與馬來醯亞胺發生Michael加成反應，也可以是特定的基質與抗體上自由的巯基通過兩次Michael加成反應，形成一個結構獨特的硫橋鍵。但有較多文獻報導，通過巯基Michael加成方法得到的ADC，會有30%或更多的ADC在體循環中發生逆Michael加成，產生毒素提前脫落而發生毒性反應。

【0007】抗體偶聯藥物根據發展歷程可以分為四代：

【0008】第一代抗體偶聯藥物是基於鼠源抗體，這類抗體由於可以產生複雜的免疫原性，從而具有很強的毒副作用；

【0009】第二代抗體偶聯藥物是在第一代的基礎上使用人源化或全人源抗體，第二代抗體偶聯藥物的成藥性質得到了巨大改善。第一代和第二代抗體偶聯藥物在抗體和藥物的連接上是相對隨意的，因而最終抗體偶聯藥物產品為一個多組份混合物，這類藥物不但毒性大，其品質也難以控制；

【0010】第三代抗體偶聯藥物在使用人源化或全人源抗體的基礎上，同時實現毒素-連接體（linker）和抗體的定點-定量偶聯，從而生成均一性的單分子抗體偶聯藥物，這類抗體偶聯藥物的毒性和品質控制比第二代抗體偶聯藥物有很大改進；

【0011】第四代抗體偶聯藥物是在第三代的基礎上，對毒素-連接體（linker）進行了革新。第四代抗體偶聯藥物一改過去以高毒性毒素為基礎的抗體偶聯藥物策略，選用相對低毒性的喜樹鹼類分子作為生物活性成

分，同時採用高毒素-抗體比（DAR），如DAR值8，這類ADC對腫瘤表面抗原低表達的腫瘤也能產生很好的治療效果。第四代抗體偶聯藥物儘管起步晚，但由於其顯著的療效，異軍突起，很快獲得了臨床認可，其代表性藥物Enhertu和Trodelvy已被FDA批准上市。但目前第四代ADC依然存在穩定性差或溶解度低的問題，已有技術缺乏普適性，仍然需要進一步開發新的毒素-linker來解決這些問題。

【0012】已有的抗體偶聯藥物一般是通過ADC中的抗體和腫瘤細胞表面抗原結合，然後發生細胞內吞進入核內體（endosome），再從核內體向溶酶體轉化，然後在溶酶體中水解酶的作用下將生物活性分子（毒素或payload）從ADC解離下來，解離下來的生物活性分子從溶酶體進入胞漿後殺傷腫瘤細胞，從殺傷腫瘤細胞後逃逸的生物活性分子可以進一步殺傷其周圍抗原不表達或低表達的腫瘤細胞（即所謂的旁觀者效應，by-stander effect）。在這整個過程中，任何一個環節的變化都可以使ADC產生耐藥性而失去治療效果，如治療過程中抗原表達發生變化，內吞減弱甚至失去內吞，核內體或溶酶體功能發生變化等等。因此尋找一種能在體內血液循環體系中穩定的ADC、同時這種ADC又能在腫瘤微環境中不需要細胞內吞而產生胞外裂解將毒素解離脫落來殺傷腫瘤，這種ADC將能克服傳統ADC存在的多種耐藥機制，因而在臨床治療上將具有非常重大的意義。

【0013】儘管有證據表明Immunomedics和Gilead的Trodelvy可以不需要內吞而在腫瘤細胞外裂解，但由於Trodelvy在血漿和水溶液中非常不穩定，其血漿半衰期小於24小時，因而這類ADC只能用於生物活性低的毒素組成的ADC去避免ADC毒素提前脫落產生的非靶向毒副作用。

【0014】此外傳統ADC的連接體的功能是完成細胞內的酶切或利用其調節水溶性等，如何能讓連接體在滿足酶切要求的同時，利用連接體實現ADC在腫瘤組織中的富集，對降低ADC在正常組織中的毒副作用也具有重要意義。

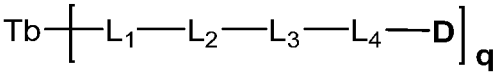
【0015】另外，B7H3為B7家族的I型跨膜蛋白，在人體中具有兩種同種型2Ig-B7H3和4Ig-B7H3。B7H3在正常組織中廣泛的表達，僅組成型表達於非免疫靜息期纖維細胞、內皮細胞、成骨細胞和羊水幹細胞，誘導性表達於活化的T、NK、DC和巨噬細胞上，未在淋巴器官檢測到陽性表達（Chapoval, A.I., et al., B7H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN production. Nature Immunology, 2001. 2(3): p. 269-274）。研究表明，約76.5%的早期肝癌患者血清中的B7H3較正常人高3倍左右（60.79 ± 19.45 Vs 20.52 ± 8.46ng/mL），但與疾病進程的相關性尚不清（Zhao, L., et al., Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatocirrhosis by Soluble B7H3. Journal of Gastrointestinal Surgery. 21(5): p. 807-812）。

【0016】目前，臨床前研究中有針對B7H3靶點的治療策略。例如，針對小鼠B7H3的抗體將增強腫瘤中浸潤的CD8陽性T細胞並抑制腫瘤生長（Mod Pathol . 2010 Aug;23(8):1104-12.）。此外，WO2008/066691顯示識別B7H3變體B7H3a的抗體在體內對腺癌具有抗腫瘤作用。在臨床研究中，小鼠B7H3抗體和放射性碘131的結合藥物可以顯著抑制患者神經母細胞瘤的生長[Jneufoocol 97（3）：409-18（2010）]。

【發明內容】

【0017】為了改進抗體藥物偶聯物（ADC）或其它配體藥物偶聯物（PDC）的治療效果，降低藥物毒副作用，提高治療範圍(therapeutic window)，本公開提供一種式（XV）所示的配體藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其含有生物活性分子（藥物分子）、連接體和靶向部分，所述靶向部分通過活性基團（例如巯基）與所述連接體連接形成配體藥物偶聯物。本公開還開發了包含結合B7H3分子的可變輕鏈結構域和/或可變重鏈(VH)結構域，所述可變輕鏈結構域和/或可變重鏈(VH)結構域抗體來自人源抗體。

【0018】為此，在本公開的第一方面，本公開提供了式XV所示的配體藥物偶聯物，



式XV

或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，

其中：

Tb為和靶點結合的配體或靶向部分；

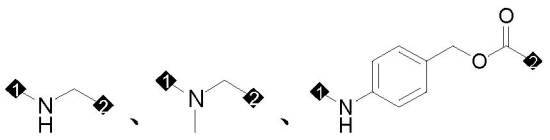
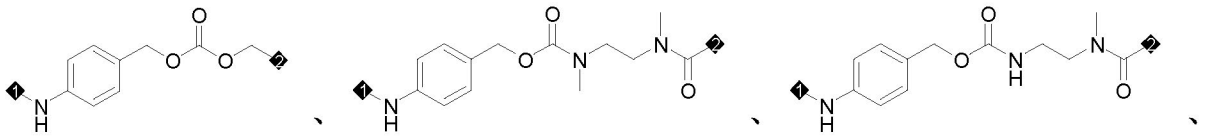
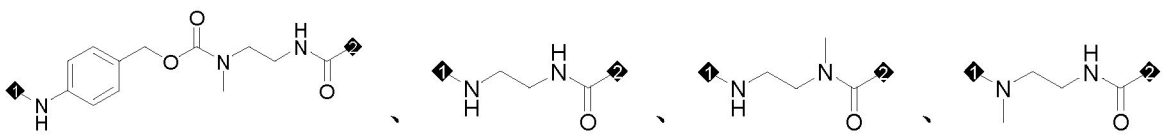
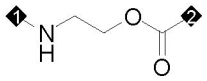
q為藥物配體偶聯比；

D為生物活性分子片段；

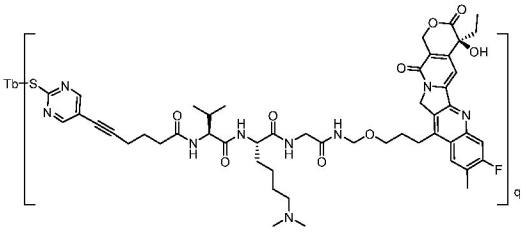
L_1為延伸單元；

L_2不存在或為連接單元；

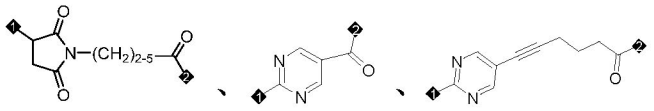
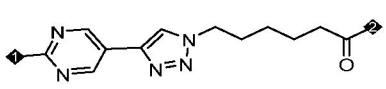
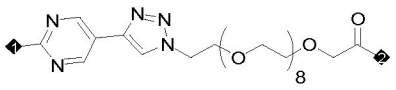
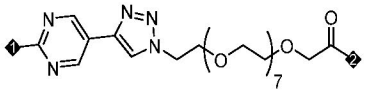
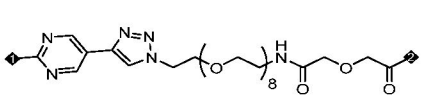
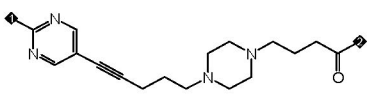
L_3選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽；

L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自  、  、  、和  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

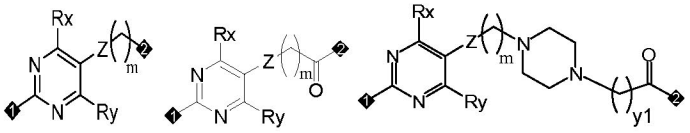
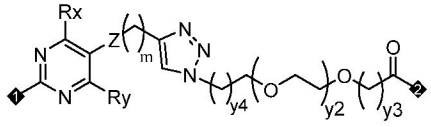
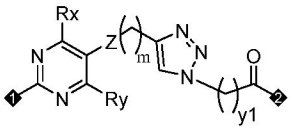
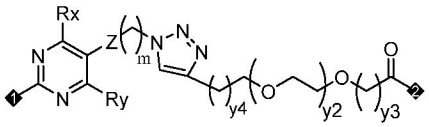
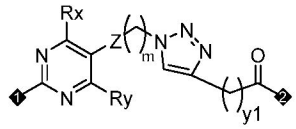
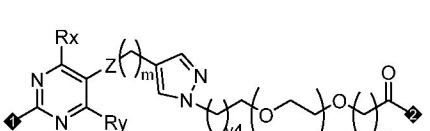
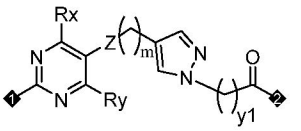
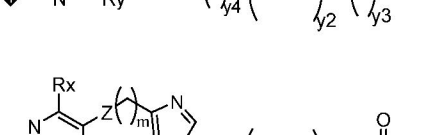
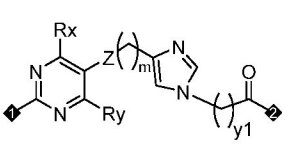
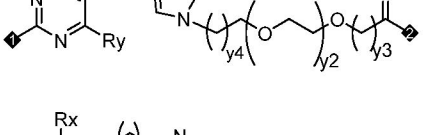
【0019】另外，還需要說明的是，對於“L_1的1位通過S原子與Tb相連”，本發明所屬技術領域具有通常知識者可以理解的是，L_1的1位是與打開二硫鍵（例如，通過還原劑TCEP還原二硫鍵可以打開二硫鍵，生成巰基-SH）後的Tb（如抗體）自身所含有巰基進行連接，也就是說，L_1與Tb之間的-S-並非另外再外接的硫原子。

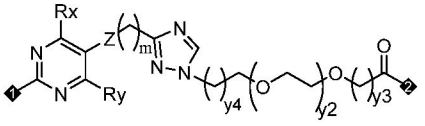
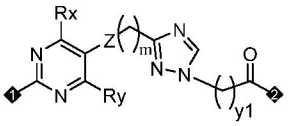
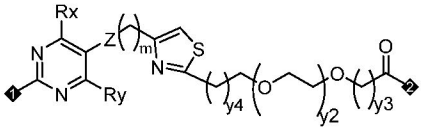
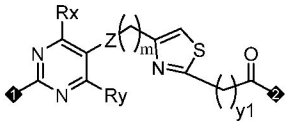
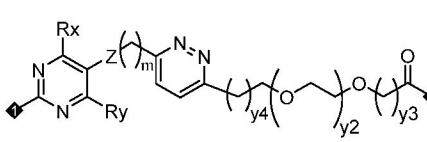
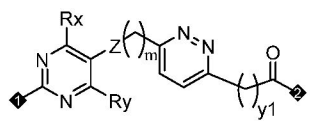
例如，  中，-S-並非另外外接的硫原子，而是打開雙硫鍵後的Tb自身所含有巰基與L_1例如 的1位進行連接後形成的-S-。

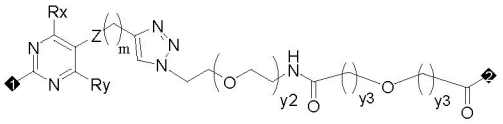
【0020】延伸單元為配體藥物偶聯物或藥物連接體偶聯物或連接體的組分，其作用是將和靶點結合的配體或靶向部分與配體藥物偶聯物的其餘部分或連接體的其餘部分相連。延伸單元能夠將Tb單元連接於L_2（如果存在）或L_3，具體實例包括但不限於(其中1位與靶點結合的配體或靶向部分

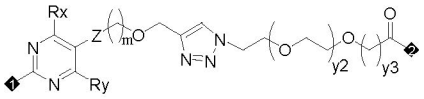
相連、2位與L_2或L_3相連)：  、  、  、  、  、  。

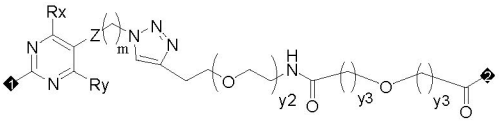
【0021】在一些實施方案中，L_1選自：

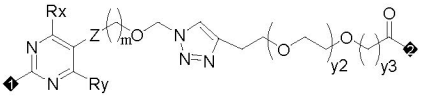











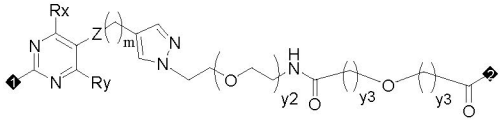







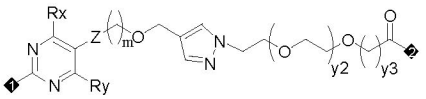


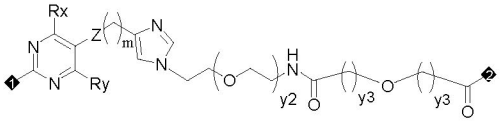


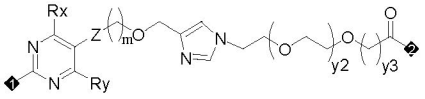


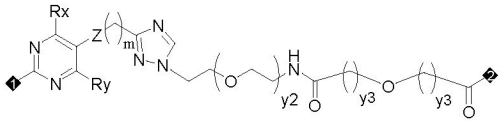


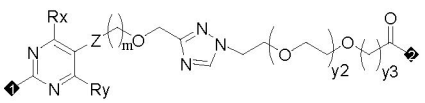


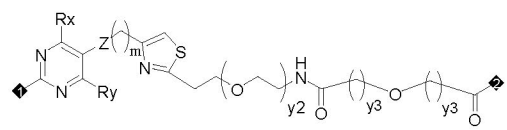


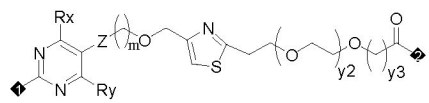


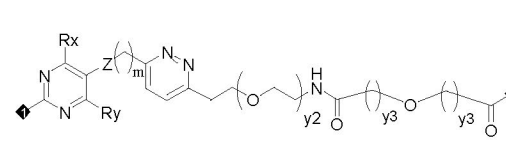


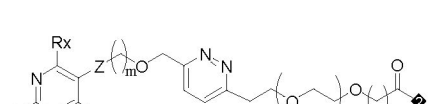


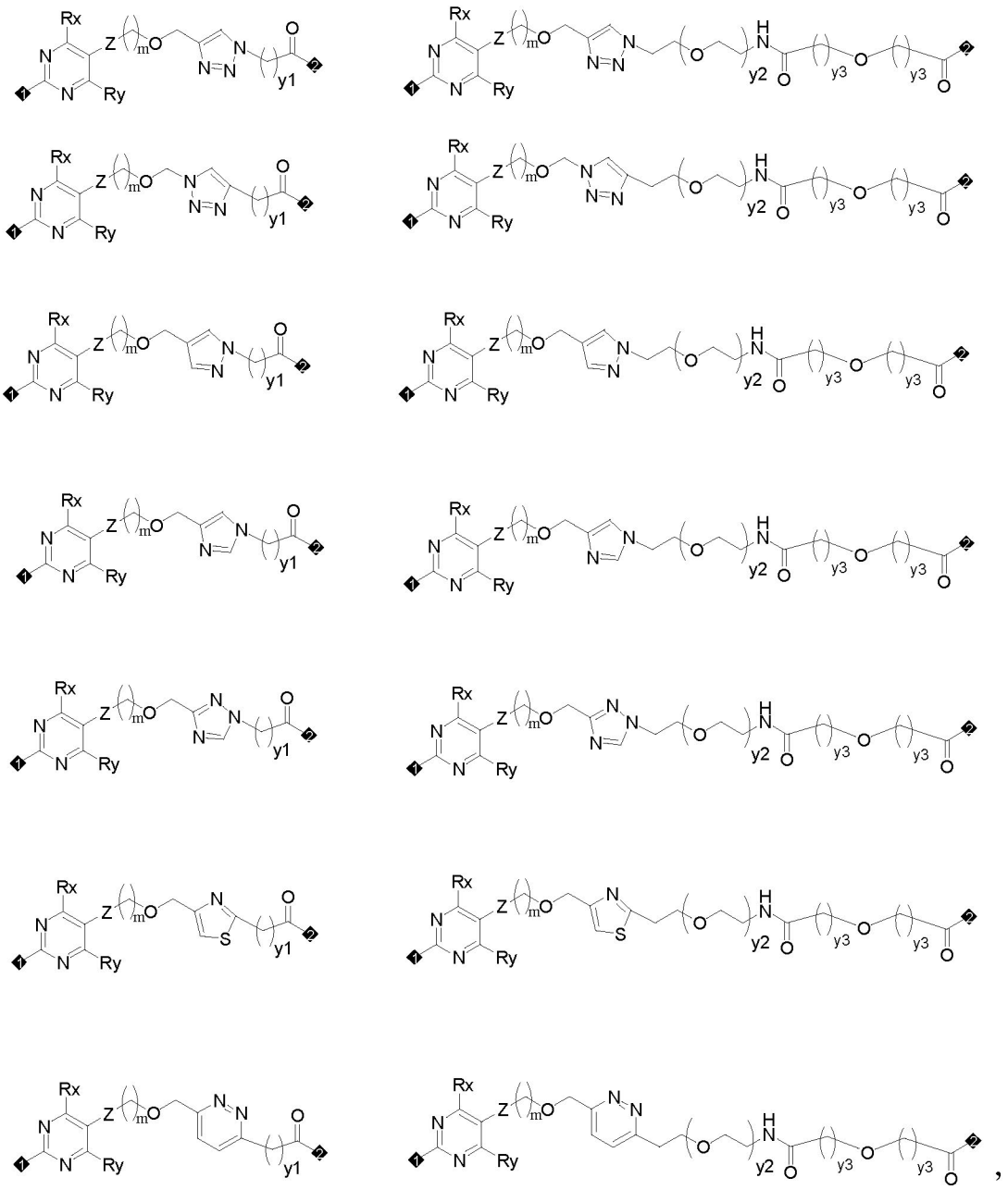












各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10芳基、5-10元雜芳基、醯胺基、磺醯胺基、亞胺基和CF_2；

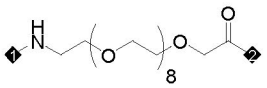
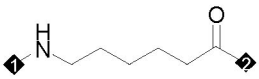
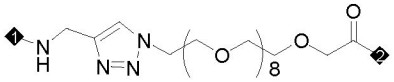
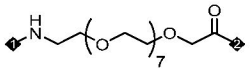
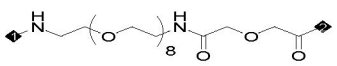
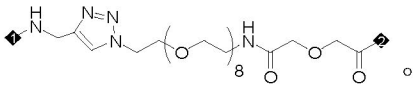
Rx和Ry獨立地選自H和C1-4烷基；

各m獨立地選自0、1、2、3、4、5和6；

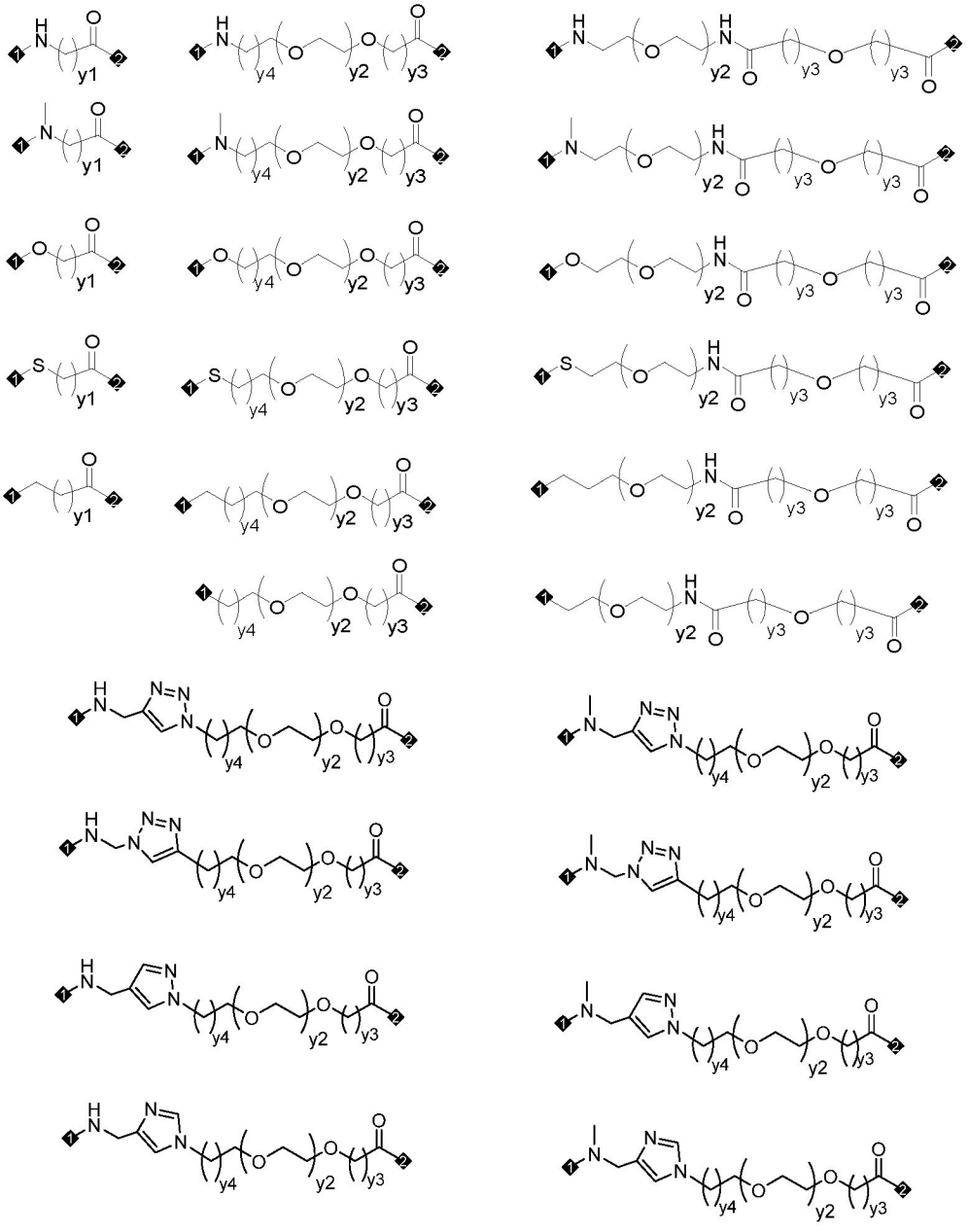
y1、y2、y3和y4獨立地選自0-20之間的任意整數；

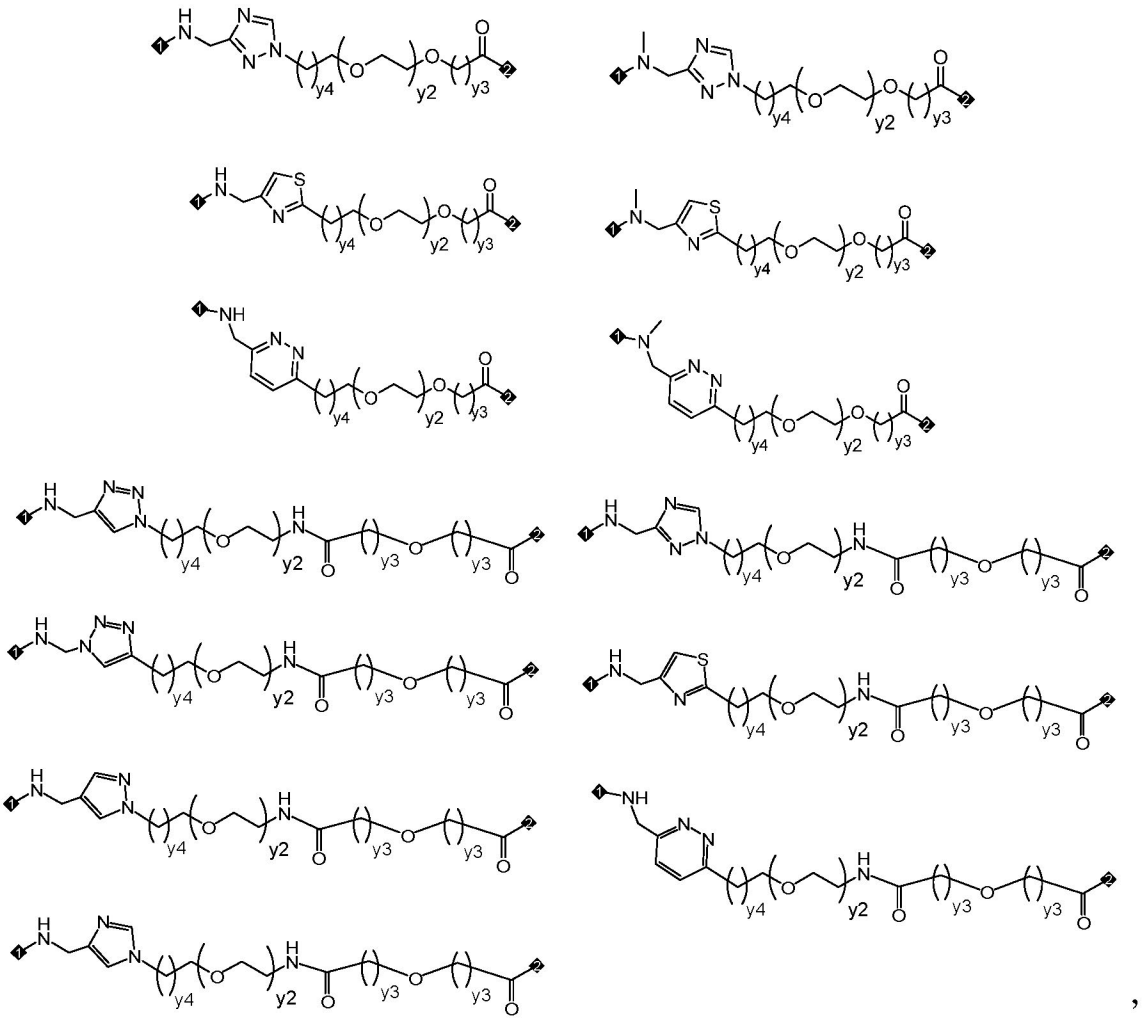
1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

【0022】連接單元為配體藥物偶聯物或藥物連接體偶聯物或連接體的組

分，其作用是用來結合延伸單元與胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽。連接單元存在時能夠將L_1連接於L_3。具體實例包括但不限於(其中1位與延伸單元相連、2位與L_3相連)：  、  、  、  、  和  。

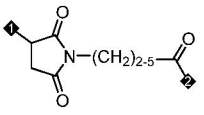
【0023】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自：

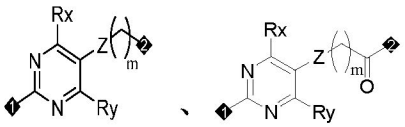
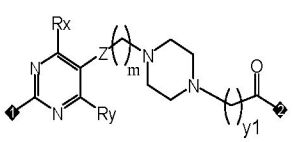
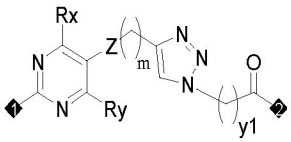
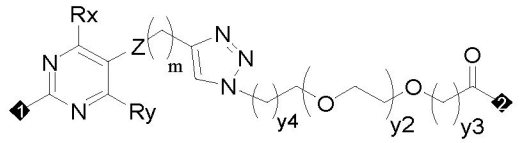
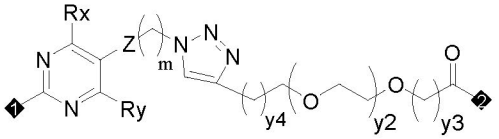
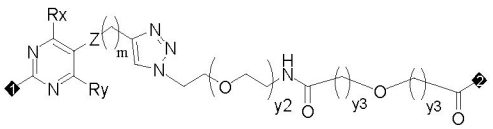


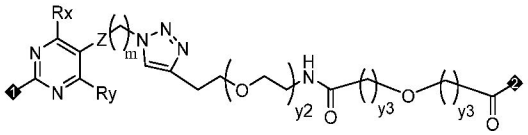


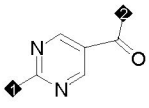
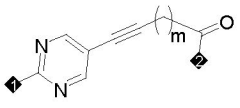
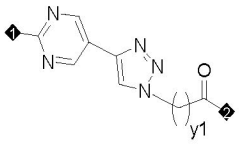
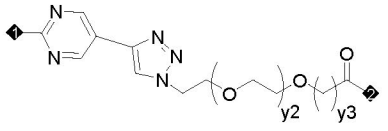
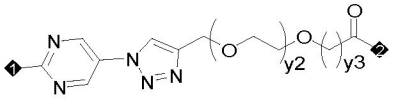
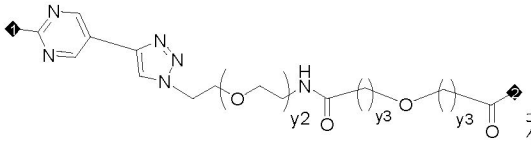
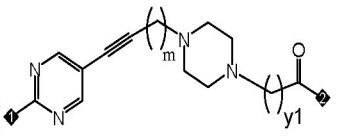
，

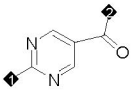
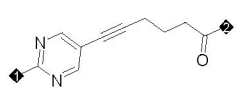
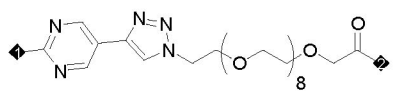
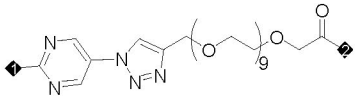
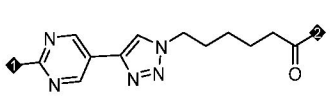
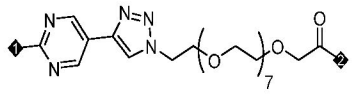
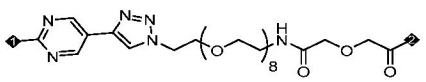
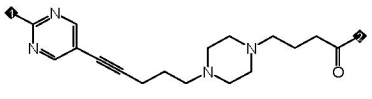
y1、y2、y3和y4獨立地選自0-20之間的任意整數，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

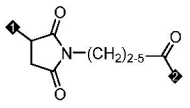
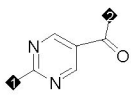
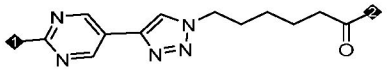
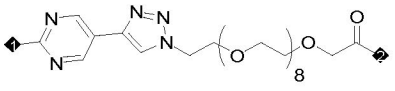
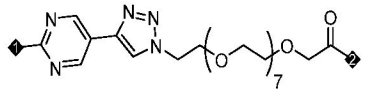
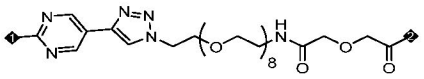
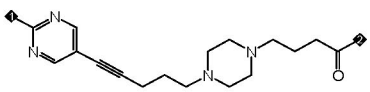
【0024】在一些實施方案中，L_1為  。

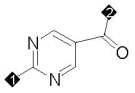
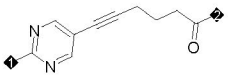
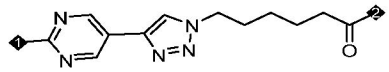
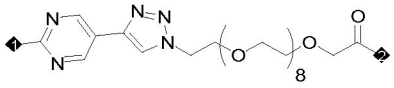
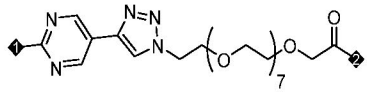
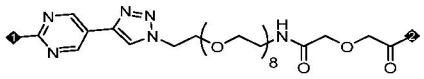
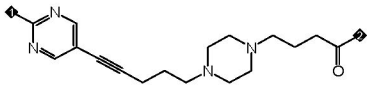
【0025】在一些實施方案中，L_1選自  、 、  、  、  、  、  和

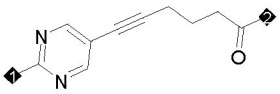
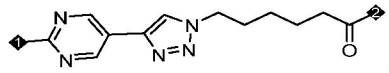
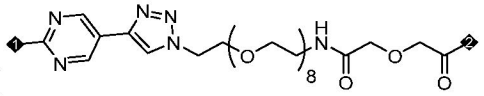
 ，各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10芳基、5-10元雜芳基和醯胺基（優選選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵）；Rx、Ry獨立地選自H和C1-4烷基；各m獨立地選自0、1、2、3、4、5和6；y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6）；各y2獨立地選自0-15（如6-15）之間任意整數；各y3獨立地選自1、2和3；各y4獨立地選自0和1；1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

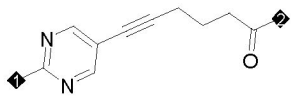
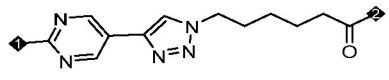
【0026】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  和  ，m選自2、3、4，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-10（如6-10）之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

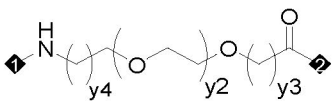
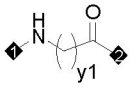
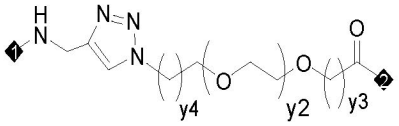
【0027】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

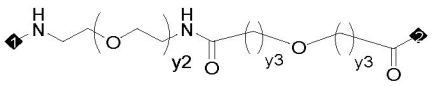
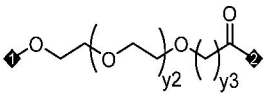
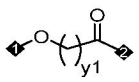
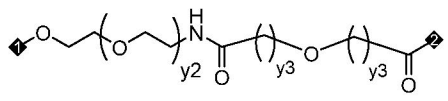
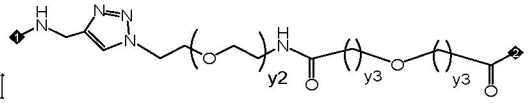
【0028】在一些實施方案中，L_1選自  、  、 、  、  、  、  、  。

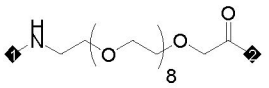
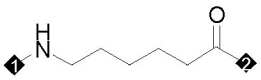
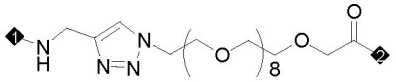
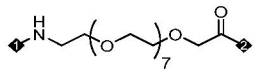
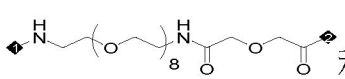
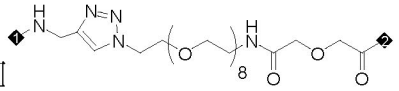
【0029】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

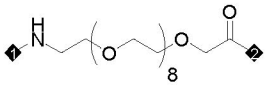
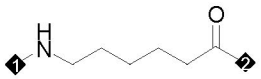
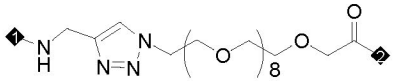
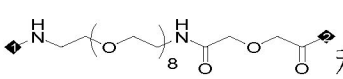
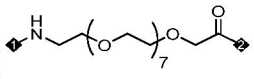
【0030】在一些實施方案中，L_1選自  、  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

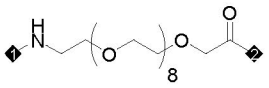
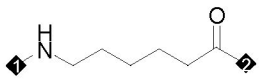
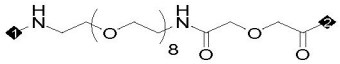
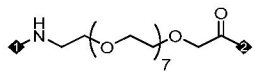
【0031】在一些實施方案中，L_1選自  和  ，1位通過S原子與Tb相連，2位與L_2或L_3相連。

【0032】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、

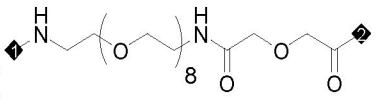
 、  、  、  和  ，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-10（如6-10）之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，各y4獨立地選自0或1，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0033】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0034】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0035】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  和  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0036】在一些實施方案中，L_2不存在。

【0037】在一些實施方案中，L_2選自  。

【0038】在一些實施方案中，L_3選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組

成的短肽；所述的胺基酸殘基選自天然胺基酸殘基、非天然胺基酸殘基、或選自AA_1所示胺基酸殘基或其立體異構體。

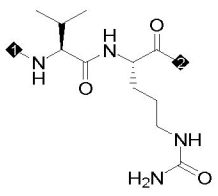
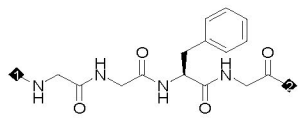
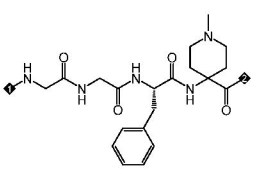
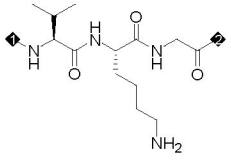
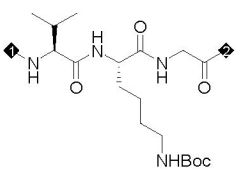
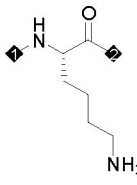
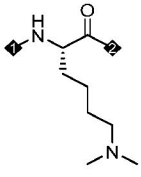
【0039】在一些實施方案中，L_3選自胺基酸殘基Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1或由2-10個選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1的胺基酸殘基組成的短肽。

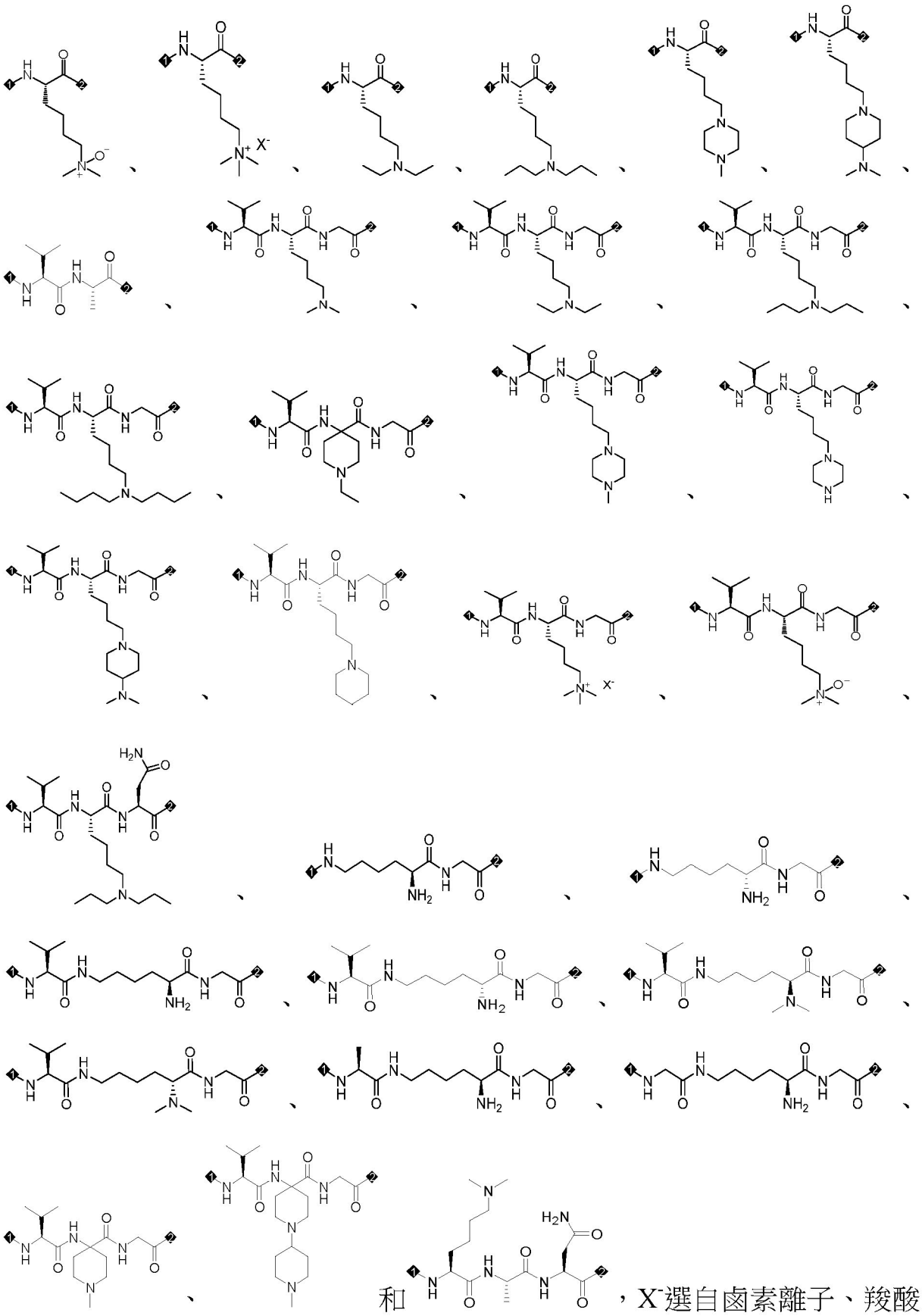
【0040】在一些實施方案中，L_3選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys和Lys-Ala-Asn。

【0041】在一些實施方案中，L_3選自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn和Gly-Gly-Phe-Gly。

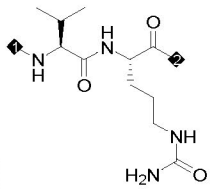
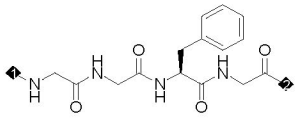
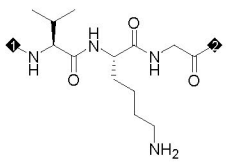
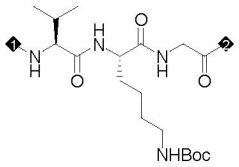
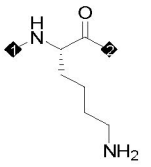
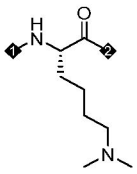
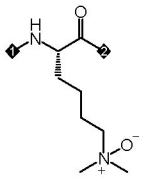
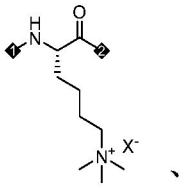
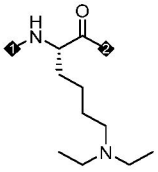
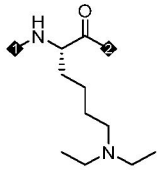
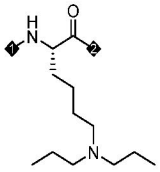
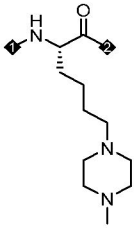
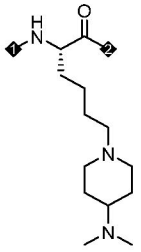
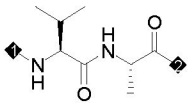
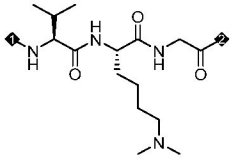
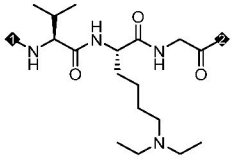
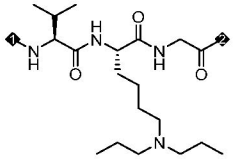
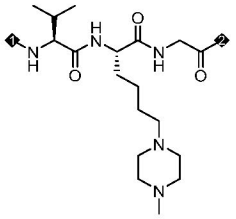
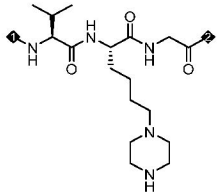
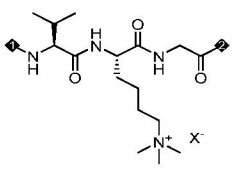
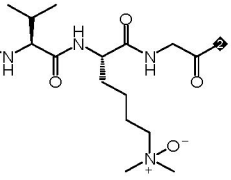
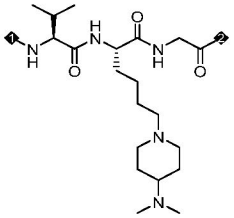
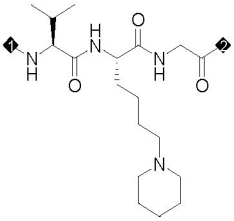
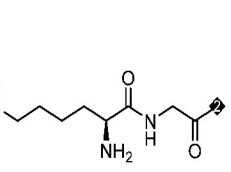
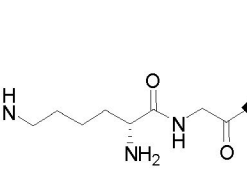
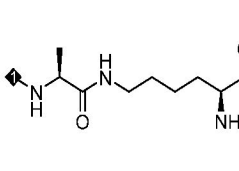
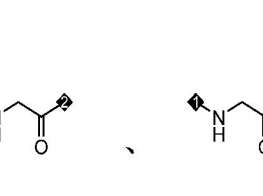
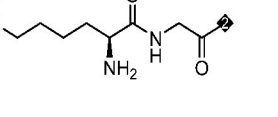
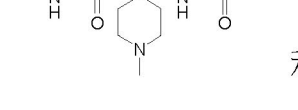
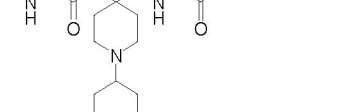
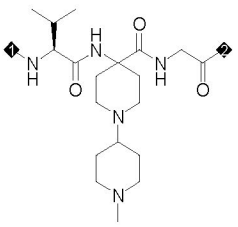
【0042】在一些實施方案中，L_3選自AA^1和Val-AA^1-Gly。

【0043】在一些實施方案中，L_3選自Val-AA^1-Gly。

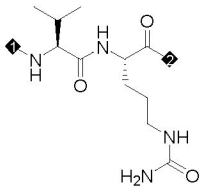
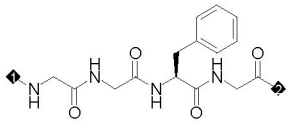
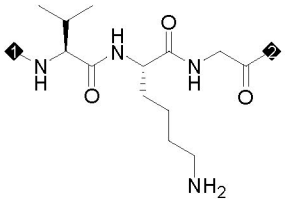
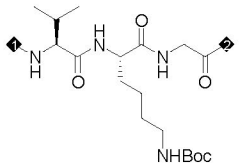
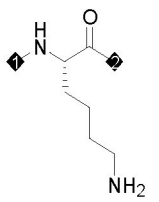
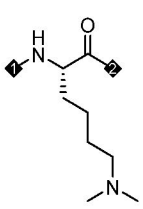
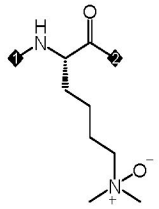
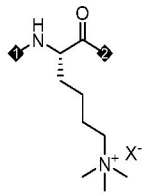
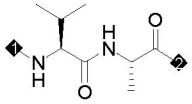
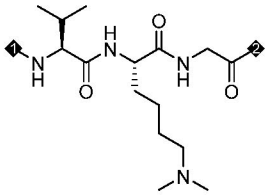
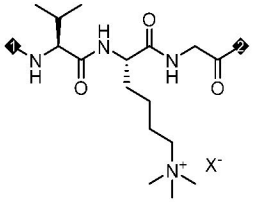
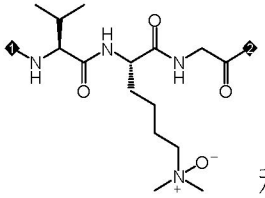
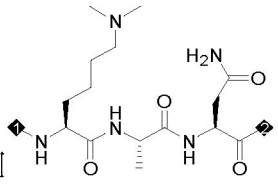
【0044】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、

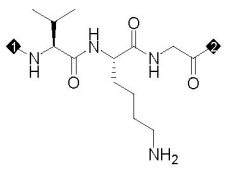
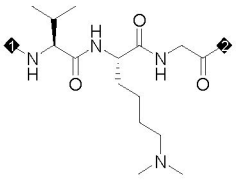
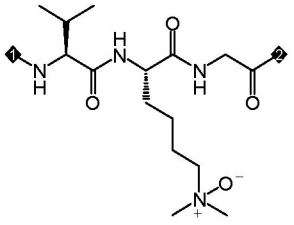
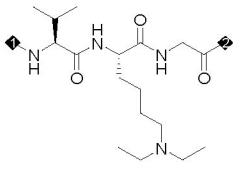
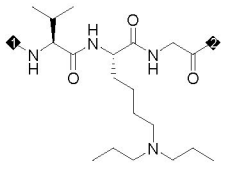
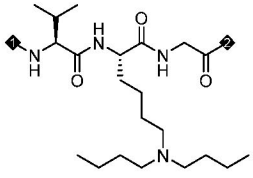
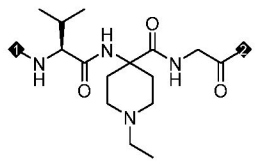
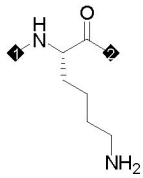
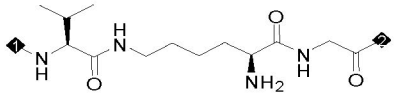
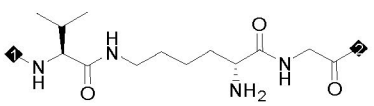


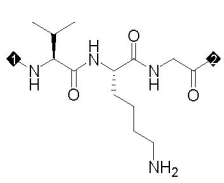
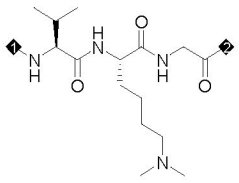
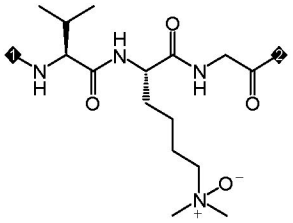
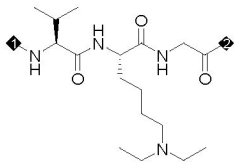
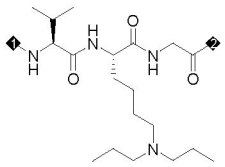
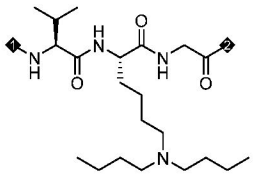
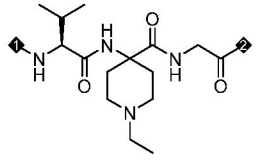
，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

【0045】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、、  、  、  、  、  、  、  、、、 、 、 和  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離

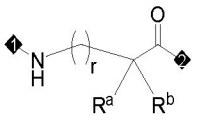
子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

【0046】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

【0047】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

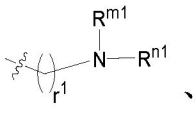
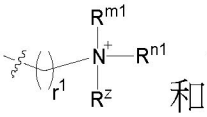
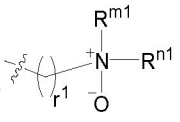
【0048】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或D相連。

【0049】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基的結構如下所示，



AA^1

其中：

R^a、R^b各自獨立地選自H、  、  和  ，且R^a、R^b不同時為H；

或者，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成4-10元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代；

r、r^1各自獨立地選自0到20的任意整數；

R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基和-$COOR^{x1}$；

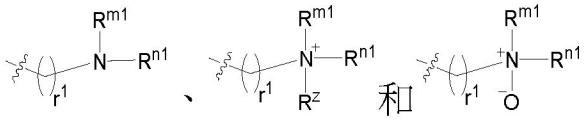
R^{x1}選自C1-6烷基；

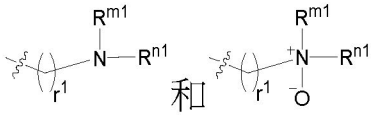
或者，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成4-10元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個$R^{0'}$所取代；

R^z選自C1-6烷基；

R^0、$R^{0'}$各自獨立地選自C1-6烷基、C3-6環烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$和任選被C1-6烷基取代的4-10元雜環基；

R^{m2}、R^{n2}各自獨立地選自H和C1-6烷基。

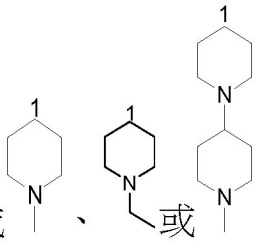
【0050】在一些實施方案中，R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自  和。

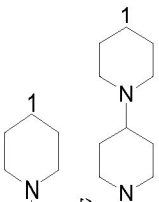
【0051】在一些實施方案中，R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自  和。

【0052】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環。

【0053】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶環或哌啡環。

【0054】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶環。

【0055】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成  ，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【0056】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成  ，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【0057】在一些實施方案中，r、r^1各自獨立地選自0、1、2、3、4和5。

【0058】在一些實施方案中，r、r^1各自獨立地選自0和4。

【0059】在一些實施方案中，r、r^1中，任一個為0，另一個為4。

【0060】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3和-COOCH2CH2CH2CH3。

【0061】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基和第三丁氧羰基。

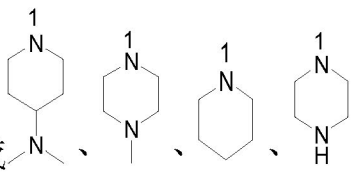
【0062】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H和C1-6烷基。

【0063】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基和正丙基。

【0064】在一些實施方案中，r、r^1中，r為4，r^1為0時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基（如H、甲基）；r為0，r^1為4時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自C1-6烷基（如甲基、乙基、正丙基），優選選自C2-6烷基（如乙基、正丙基）。

【0065】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成任選被$R^{0'}$取代的5-6元雜環。

【0066】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成任選被$R^{0'}$取代的哌啶環或哌啡環。

【0067】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成  ，1號氮原子為與R^{m1}和R^{n1}共同相連的氮原子。

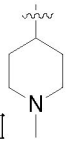
【0068】在一些實施方案中，R^z為甲基。

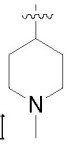
【0069】在一些實施方案中，R^0、$R^{0'}$各自獨立地選自C1-6烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$和任選被C1-6烷基取代的5-6元雜環基。

【0070】在一些實施方案中，R^0選自C1-6烷基和被C1-6烷基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基選自哌啶基和哌啡基。

【0071】在一些實施方案中，R^0選自甲基、乙基和被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基。

【0072】在一些實施方案中，R^0選自甲基和被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基。

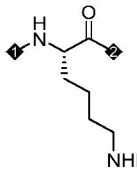
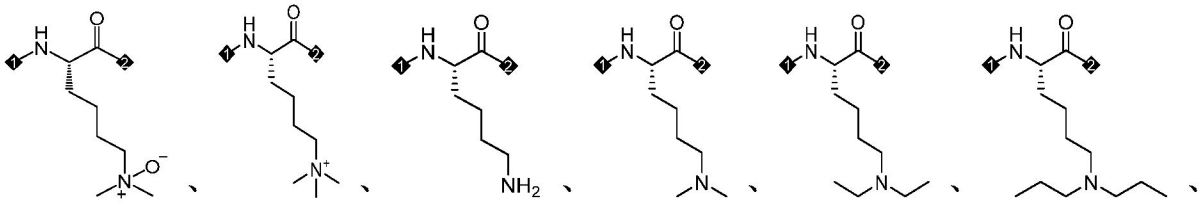
【0073】在一些實施方案中，R^0選自甲基、乙基和  。

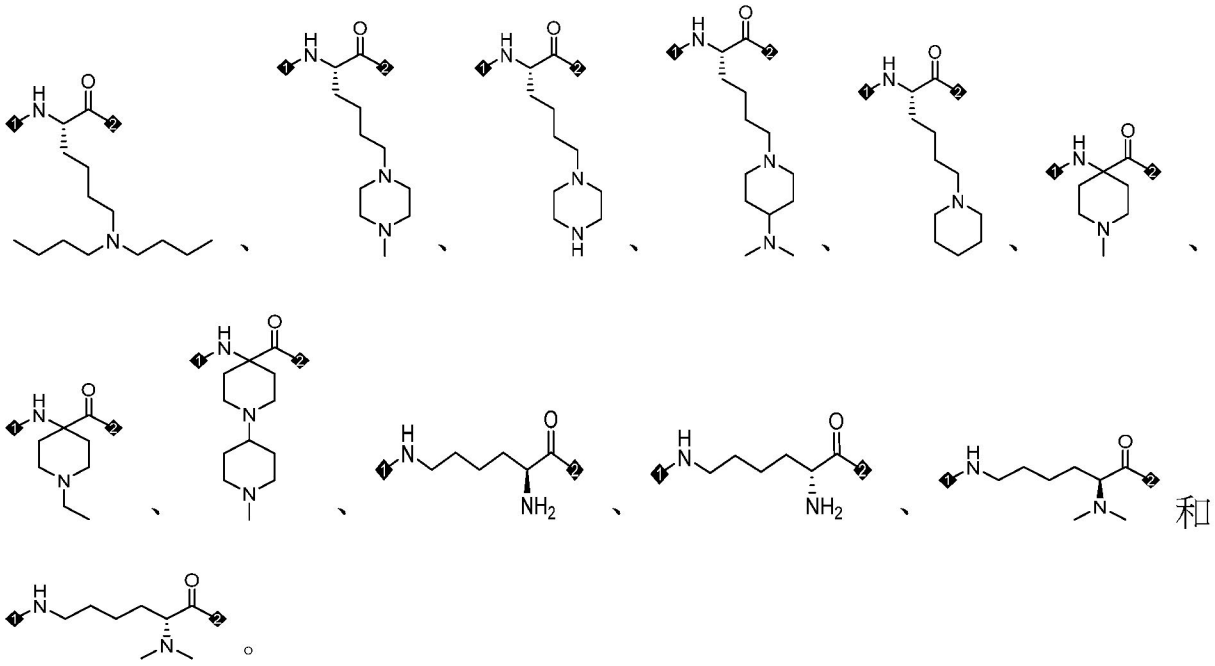
【0074】在一些實施方案中，R^0選自甲基和  。

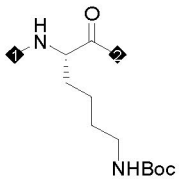
【0075】在一些實施方案中，$R^{0'}$選自C1-6烷基和$-NR^{m2}R^{n2}$。

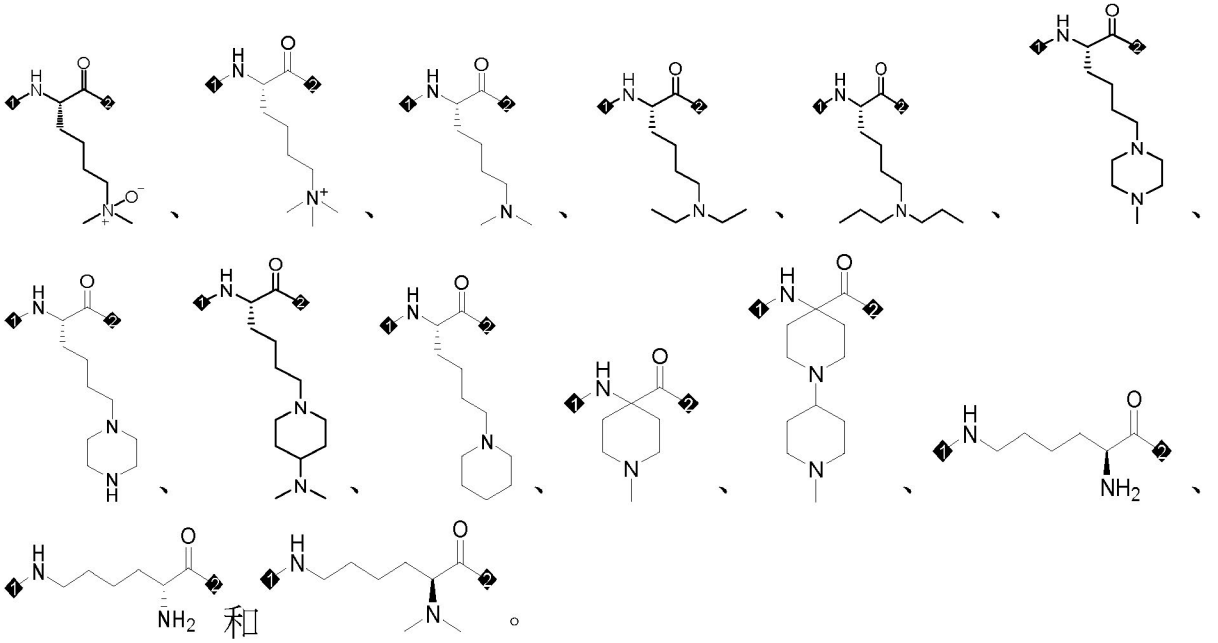
【0076】在一些實施方案中，$R^{0'}$選自甲基和$-NR^{m2}R^{n2}$。

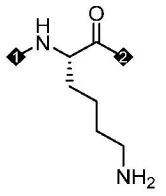
【0077】在一些實施方案中，R^{m2}、R^{n2}為甲基。

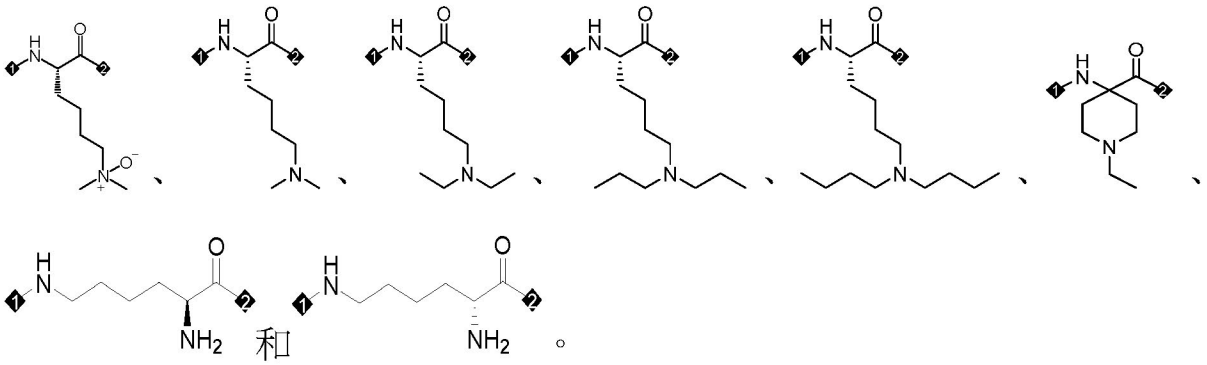
【0078】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  。

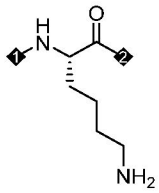
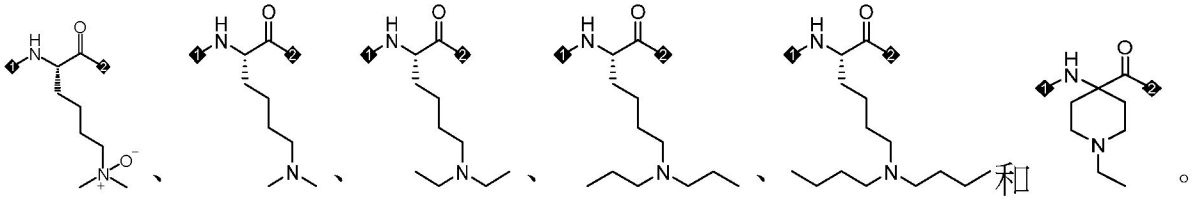


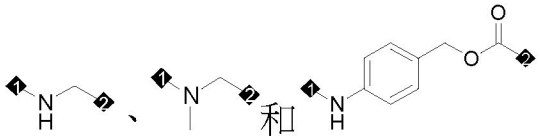
【0079】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、

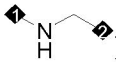
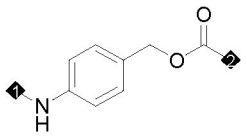


【0080】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、

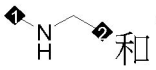
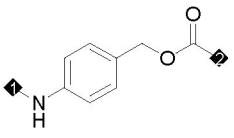


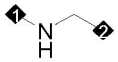
【0081】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  。

【0082】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

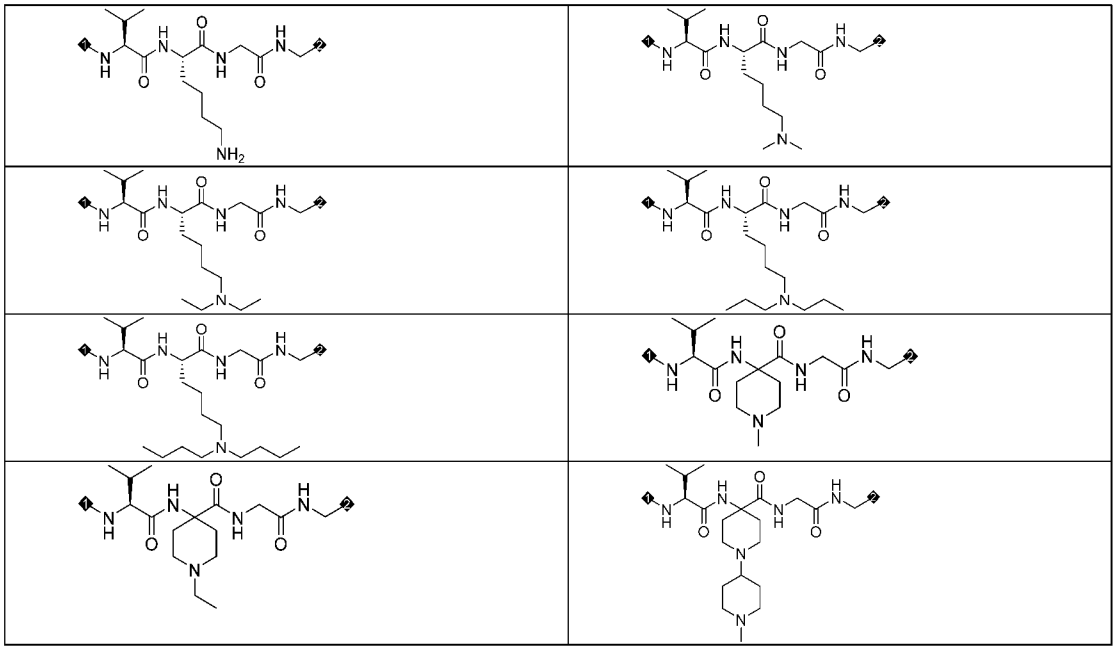
【0083】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4為  或  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

【0084】在一些實施方案中，L_4不存在。

【0085】在一些實施方案中，L_4選自  和  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

【0086】在一些實施方案中，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與D相連。

【0087】在一些實施方案中，❶—L_3—L_4—❷的結構選自以下結構片段：



。

【0088】在一些實施方案中，Tb為抗體或其抗原結合片段。

【0089】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段以及單克隆抗體或其抗原結合片段包括：Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv（例如，scFv)、dAb、互補決定區片段、非人抗體、人源化抗體、嵌合抗體、全人抗體、前抗（Probody）、單克隆抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0090】在一些實施方案中，Tb為具有內吞或不內吞活性的抗體或其抗原結合片段。

【0091】在一些實施方案中，Tb為具有內吞活性的抗體或其抗原結合片段。

【0092】在一些實施方案中，Tb為具有結合腫瘤組織中游離抗原和/或腫瘤細胞表面抗原腫瘤細胞表面抗原活性的抗體或其抗原結合片段。

【0093】在一些實施方案中，Tb為具有被腫瘤細胞內吞的活性，且有腫瘤組織中游離抗原或者腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0094】在一些實施方案中，Tb為具有被腫瘤細胞內吞的活性，且有腫瘤組織中游離抗原以及腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0095】在一些實施方案中，Tb為具有被腫瘤細胞內吞的活性，且沒有腫瘤組織中游離抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0096】在一些實施方案中，Tb為具有被腫瘤細胞內吞的活性，且沒有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0097】在一些實施方案中，Tb為沒有內吞活性的、或內吞活性弱的抗體或其抗原結合片段。

【0098】在一些實施方案中，Tb為不具有結合腫瘤組織中游離抗原和/或腫瘤細胞表面抗原腫瘤細胞表面抗原活性的抗體或其抗原結合片段。

【0099】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的、或內吞活性弱的，且有腫瘤組織中游離抗原或者腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0100】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的、或內吞活性弱的，且有腫瘤組織中游離抗原以及腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0101】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的、或內吞活性弱的，且沒有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體其抗原結合片段。

【0102】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的、或內吞活性弱的，且沒有腫瘤組織中游離抗原結合活性的抗體其抗原結合片段。

【0103】在一些實施方案中，Tb為沒有被腫瘤細胞內吞活性的，且人體內沒有對應抗原的抗體或其抗原結合片段。

【0104】在一些實施方案中，Tb為沒有腫瘤細胞相關抗原結合的抗體。

【0105】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段，選自IgG同型抗體。

【0106】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段，選自同型IgG1，同型IgG2，同型IgG3或同型IgG4。

【0107】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段，為抗雞溶菌酶人IgG1同型抗體。

【0108】在一些實施方案中，Tb為具有結合腫瘤細胞表面非內吞（例如ALCAM/CD166）抗原活性的抗體其抗原結合片段。

【0109】在一些實施方案中，Tb為具有腫瘤細胞相關抗原結合的抗體。

【0110】在一些實施方案中，Tb為具有腫瘤組織中游離抗原或者腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0111】在一些實施方案中，Tb為具有腫瘤組織中游離抗原以及腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體或其抗原結合片段。

【0112】在一些實施方案中，Tb為具有B7H3-2Ig和/或B7H-4Ig的抗體或其抗原結合片段。

【0113】在一些實施方案中，Tb為具有B7H3-4Ig結合活性高於B7H3-2Ig結合活性抗體或其抗原結合片段。

【0114】在本公開的部分實施方案中，Tb為和靶點結合的配體或靶向部分。

【0115】在一些實施方案中，所述Tb的靶點選自腫瘤細胞表達高於正常細胞的靶點。

【0116】在一些實施方案中，所述Tb的靶點選自腫瘤細胞高表達，而正常細胞低表達的靶點。

【0117】在一些實施方案中，所述Tb的靶點選自：B7H3、CD20、CD19、CD30、GPNMB、Her2、Trop-2、EGFR、Her3、GD-2，CD79b和BCMA等。

【0118】在一些實施方案中，所述Tb為抗體或其抗原結合的片段。

【0119】在一些實施方案中，Tb為非人抗體、人源化抗體、嵌合抗體、全人抗體。

【0120】在一些實施方案中，Tb為單克隆抗體，雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0121】在一些實施方案中，Tb為單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0122】在一些實施方案中，Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段、抗Trop-2抗體或其抗原結合片段、抗Her2抗體或其抗原結合片段、抗Her3抗體或其抗原結合片段或抗EGFR抗體或其抗原結合片段。

【0123】在一些實施方案中，Tb為抗B7H3抗體或其抗原結合片段，例如1D1、1D1-01、2E3，2E3-02抗體、enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab或其抗原結合片段。

【0124】所述1D1的序列如SEQ ID NO:1所示。所述1D1-01的VH序列如

SEQ ID NO:3所示，VL序列如SEQ ID NO:13所示。所述1D1-01的重鏈序列如SEQ ID NO:45所示，輕鏈序列如SEQ ID NO:46所示。所述2E3的序列如SEQ ID NO:2所示。所述2E3-02的VH序列如SEQ ID NO:23所示，VL序列如SEQ ID NO:33所示。所述2E3-02的重鏈序列如SEQ ID NO:47所示，輕鏈序列如SEQ ID NO:48所示。

【0125】在一些實施方案中，Tb為抗B7H3單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0126】在一些實施方案中，Tb為抗Trop-2抗體或其抗原結合片段，例如datopotamab , sacituzumab或其抗原結合片段。

【0127】在一些實施方案中，Tb為抗Trop-2單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0128】在一些實施方案中，Tb為抗Her2抗體或其抗原結合片段，例如anbenitamab ， coprelotamab ， disitamab ， gancotamab ， margetuximab ，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab，Pertuzumab或其抗原結合片段。

【0129】在一些實施方案中，Tb為抗Her2單克隆抗體或其抗原結合片段，例如曲妥珠單抗、帕妥珠單抗或其抗原結合片段。

【0130】在一些實施方案中，Tb為抗Her3抗體或其抗原結合片段，例如barecetamab ， duligotuzumab ， elgemtumab ， istiratumab ， lumretuzumab ，patritumab ， seribantumab ， zenocutuzumab ， 202-2-1抗體或其抗原結合片段。

【0131】在一些實施方案中，Tb為抗Her3單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0132】在一些實施方案中，Tb為抗EGFR抗體或其抗原結合片段，例如demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab或其抗原結合片段。

【0133】在一些實施方案中，Tb為抗EGFR單克隆抗體或其抗原結合片段。

【0134】在一些實施方案中，所述抗體具有結合抗原但不具有內吞活性的抗體。

【0135】在一些實施方案中，所述抗體具有結合B7H3、CD20、CD19、CD30、GPNMB、Her2、Trop-2、EGFR、Her3、GD-2、CD79b和BCMA等抗原但不具有內吞活性的抗體。

【0136】在一些實施方案中，所述抗體具有結合B7H3抗原但不具有內吞活性的抗體。比如WO2021168379A1的INV721和I7-01。更具體的，Anti-B7H3的抗體具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:2的VH和SEQ ID NO:1的VL。

【0137】在一些實施方案中，所述抗體具有結合GD2抗原但不具有內吞活性的抗體。比如WO2021168379A1的INV721和GD2-5。更具體的，Anti-GD2的抗體具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:3的VL。

【0138】在一些實施方案中，所述抗體具有結合HER3抗原但不具有內吞活性的抗體，比如US10808032B2的SEQ ID NO: 22所示的ANTI-HER3的

21F06 抗體。

【0139】在一些實施方案中，所述抗體具有結合CD20抗原但不具有內吞活性的抗體。儘管已顯示所謂的“II 型”CD20 特異性抗體很難被 CD20 陽性靶細胞內化，但已發現其他所謂的“I 型”CD20 特異性抗體某種程度上被內化並降解,這取決於與其相互作用的靶細胞上啟動和抑制 Fc γR 的表達水準。在一些實施方案中，所述抗體具有結合CD20抗原但不具有內吞活性的抗體為II 型”CD20 特異性抗體，例如obinutuzumab。

【0140】在一些實施方案中，所述抗體具有結合非內吞（例如ALCAM/CD166）抗原活性的抗體。在一些實施方案中，所述抗體為包含EP3911682A1中SEQ ID No:73的VH和SEQ ID No:74的VL, SEQ ID No:75的VH和SEQ ID No:76的VL, SEQ ID No:77的VH和SEQ ID No:78的VL, 或，SEQ ID No:79的VH和SEQ ID No:88的VL所示的抗體。

【0141】在一些實施方案中，所述Tb為靶向部分，例如配體、蛋白質、多肽、非蛋白質試劑(例如糖、RNA或DNA)，抗體類似物等。

【0142】在一些實施方案中，q選自0.1-16.0之間的任意數值；在優選地實施方案中，q選自0.1-16.0之間的任意整數。

【0143】在一些實施方案中，q選自0.1-8.0之間的任意數值，在優選地實施方案中，q選自0.1-8.0之間的任意整數。

【0144】在一些實施方案中，q選自2-8之間的任意數值。

【0145】在一些實施方案中，q選自3-8之間的任意數值。

【0146】在一些實施方案中，q選自4-8之間的任意數值。

【0147】在一些實施方案中，q選自6-8之間的任意數值。

【0148】在一些實施方案中，q選自2-8之間的任意整數。

【0149】在一些實施方案中，q選自3-8之間的任意整數。

【0150】在一些實施方案中，q選自4-8之間的任意整數。

【0151】在一些實施方案中，q選自6-8之間的任意整數。

【0152】在一些實施方案中，q選自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12。

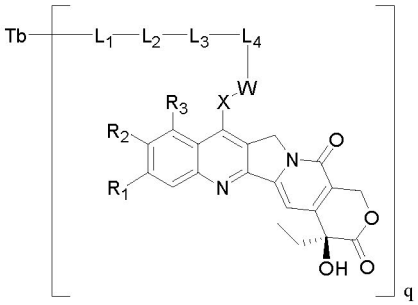
【0153】在一些實施方案中，q選自2、4、6和8。

【0154】本公開中，所述的生物活性分子片段是指本領域中均知的，抗體-藥物偶聯物（或稱抗體偶聯藥物（antibody-drug conjugate, ADC））中，在腫瘤組織間或腫瘤細胞內連接體裂解/降解/酶切後，能夠形成具有生物活性的藥物（例如小分子細胞毒藥物，所述藥物包括其失去一個原子或原子團後的基團）或其衍生物（例如其前體）的部分（片段或基團）。為了避免歧義，“藥物”並非僅指已獲得醫藥監管部門審批的“藥品”，還包括臨床中，或者研發和學術研究中任何有潛在治療生物活性的分子。

【0155】在一些實施方案中，D為具有抗腫瘤生物活性分子片段。

【0156】在一些實施方案中，D為具有抗腫瘤生物活性分子片段，其中所述的生物活性分子選自細胞毒性劑或其衍生物，例如DNA拓撲異構酶抑制劑（例如喜樹鹼類生物活性分子，例如喜樹鹼、DXD、取代基被修飾的喜樹鹼或取代基被修飾的DXD）或微管蛋白抑制劑(例如MMAF類微管蛋白抑制劑，MMAE類微管蛋白抑制劑)。

【0157】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I所式結構：



其中，

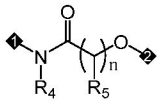
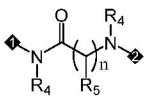
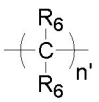
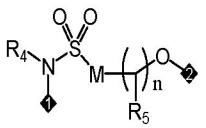
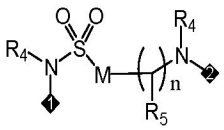
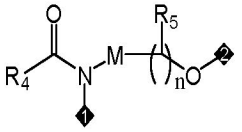
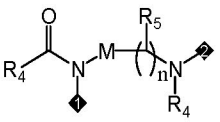
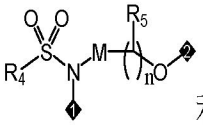
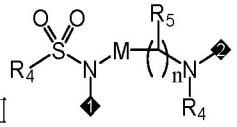
R_1、R_2各自獨立地選自 H、鹵素、-OH、任選取代的 C1-6 烷基和任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_1和 R_2和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

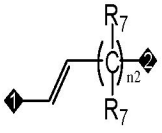
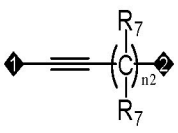
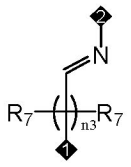
R_3選自 H、鹵素、-OH、$-NH_2$、任選取代的 C1-6 烷基和任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3和 X 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合，或者，

R_3和 R_2和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

W 不存在或存在，W 存在時，W 選自-O-、-S-、$-NR_4$-、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位與 X 相連，2 位與 L_4或 L_3相連；

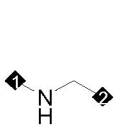
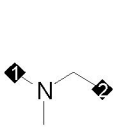
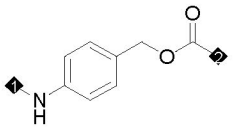
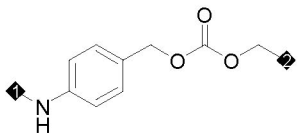
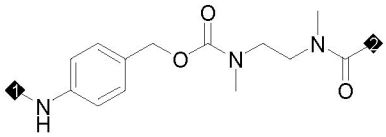
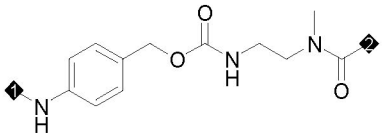
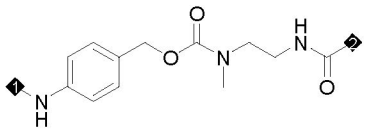
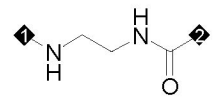
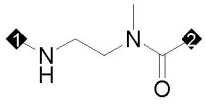
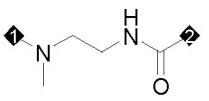
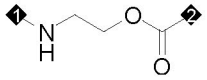
X 選自直接鍵，任選取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-N(R_4)-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰

基-$(CH_2)_{n3}$、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、  、  、  、-$(CH_2)_{n1}$-、C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 元雜芳基和 4-10 元雜環基，1 位和母環相連，2 位和 W 或 L_4 相連；所述取代基選自一個或多個 C1-4 烷基、C3-6 環烷基，或者多個 C1-4 烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成 C3-6 環烷基；

各 M 獨立地選自直接鍵和-$CR^{5a}R^{5b}$-；

R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R_7各自獨立地選自 H、任選取代的 C1-4 烷基、任選取代的 C1-4 烷氧基和任選取代的 C3-6 環烷基；

n、n’、n1、n2、n3 各自獨立地選自 0 到 6 之間的任意整數；

L_4 不存在或存在，L_4 存在時，L_4 選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  ，1 位與 L_3 相連，2 位與 W 或 X 相連。

【0158】Tb、L_1、L_2、L_3和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0159】在一些實施方案中，R_1、R_2各自獨立地選自H、鹵素和C1-4烷基。

【0160】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-6元雜

環，所述雜環含有1個、2個或3個O，S或N或其任意組合。

【0161】在一些實施方案中，R_1選自H和鹵素，R_2選自H和C1-4烷基。

【0162】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成 、 、 或 ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的位置。

【0163】在一些實施方案中，R_1為H或F，R_2為H或甲基。

【0164】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基或R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

【0165】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基。

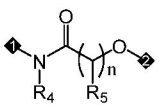
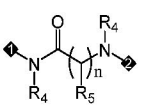
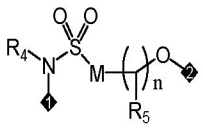
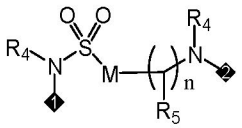
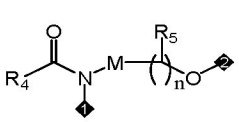
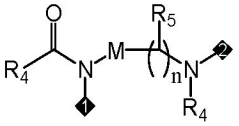
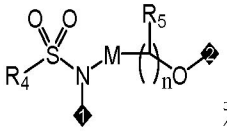
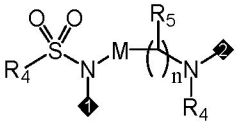
【0166】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

【0167】在一些實施方案中，R_3選自H和C1-4烷基。

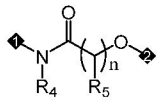
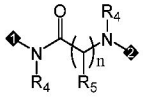
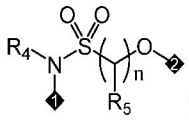
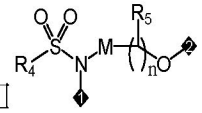
【0168】在一些實施方案中，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成5-6元碳環。

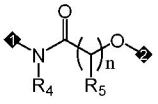
【0169】在一些實施方案中，R_3為H或R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位置。

【0170】在一些實施方案中，R_3為H。

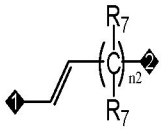
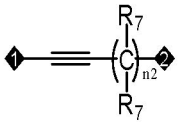
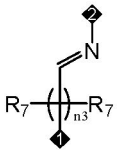
【0171】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連。

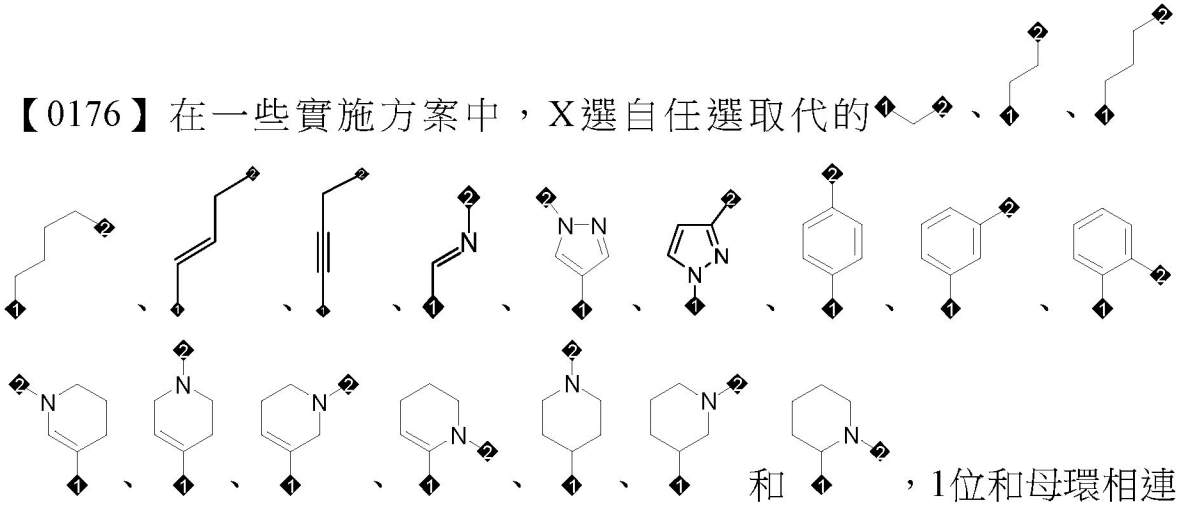
【0172】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-

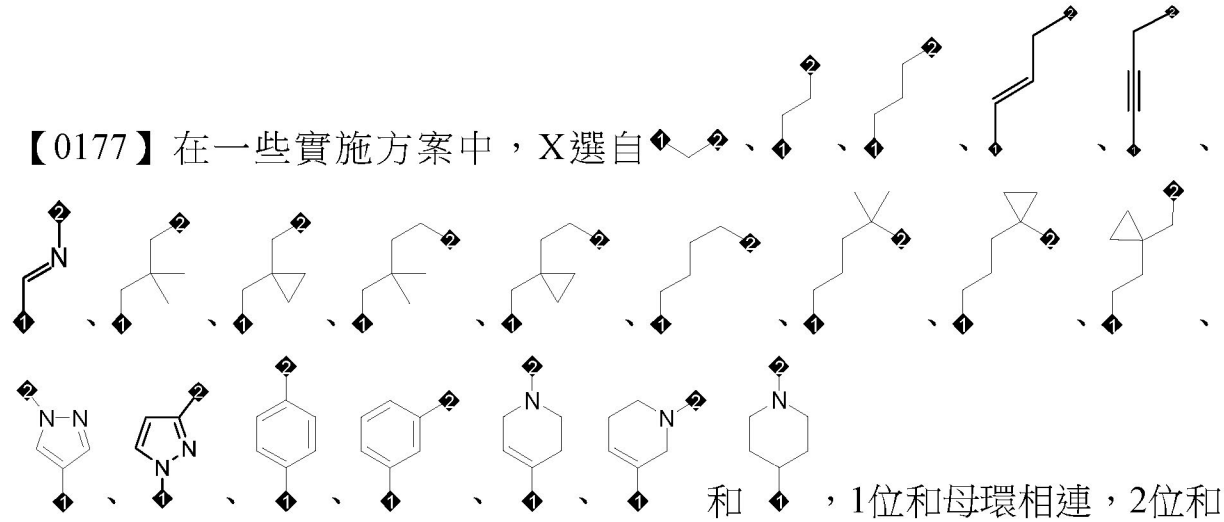
S-、-NR_4-、  、  、  和  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連。

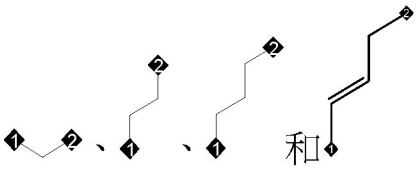
【0173】在一些實施方案中，W選自-O-、-NR_4-和  ，1位X相連，2位與L_4或L_3相連。

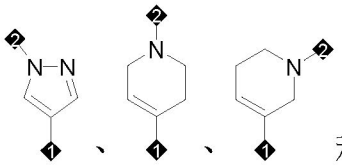
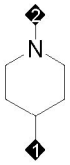
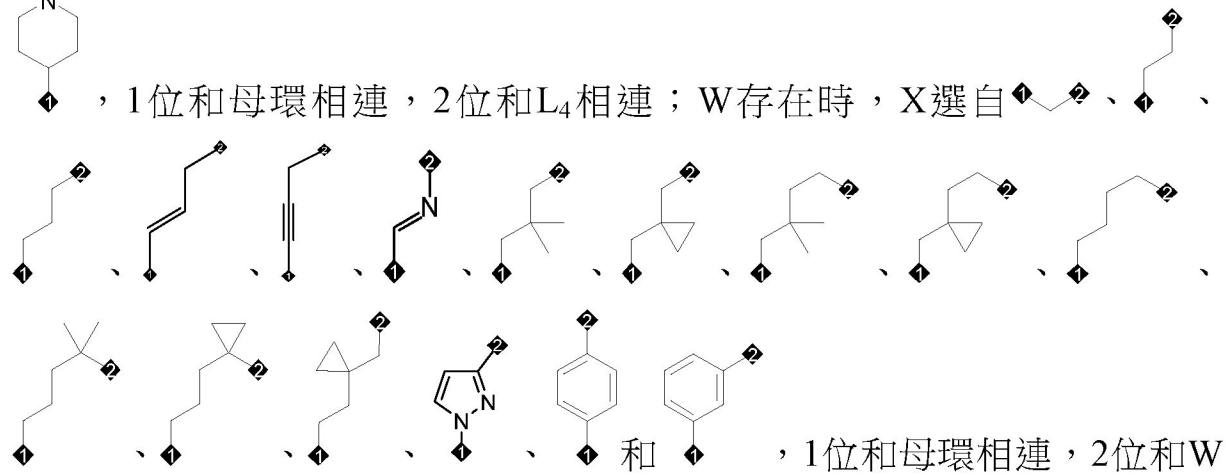
【0174】在一些實施方案中，W選自-O-和-NR_4-，1位X相連，2位與L_4或L_3相連。

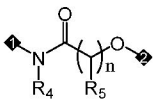
【0175】在一些實施方案中，X選自任選取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C6-10芳基、5-10元雜芳基和4-10元雜環基，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基，或者2個C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基。

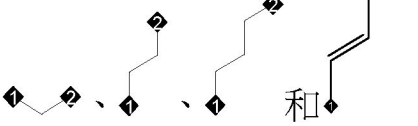
【0176】在一些實施方案中，X選自任選取代的  和，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基（如甲基），或者2個C1-4烷基（如甲基）和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基（如環丙基）。

【0177】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連。

【0178】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0179】在一些實施方案中，W不存在時，X選自  和  ，1位和母環相連，2位和L_4相連；W存在時，X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0180】在一些實施方案中，W選自-O-、-NR_4-和  ，1位X相連，

2位與L_4或L_3相連；X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0181】在一些實施方案中，R_4、R_5各自獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基。

【0182】在一些實施方案中，各R_4獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基，R_5為H。

【0183】在一些實施方案中，各R_4獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、異丙基、第三丁基和環丙基，R_5為H。

【0184】在一些實施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H和C1-4烷基。

【0185】在一些實施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H和甲基。

【0186】在一些實施方案中，各R_7獨立地選自H和C1-4烷基。

【0187】在一些實施方案中，R_7為H。

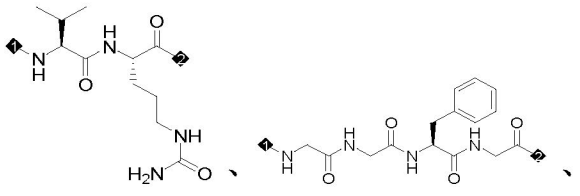
【0188】在一些實施方案中，n選自1、2和3。

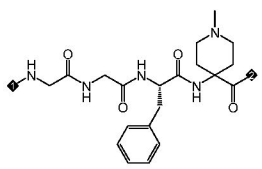
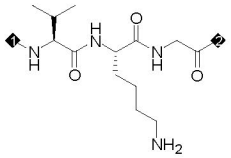
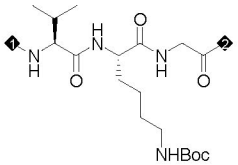
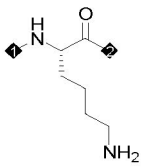
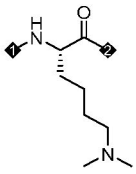
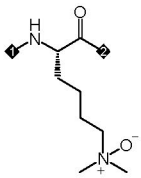
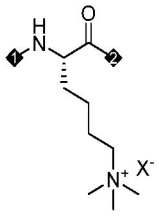
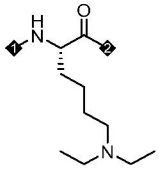
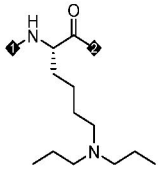
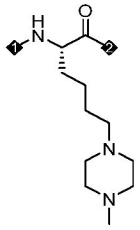
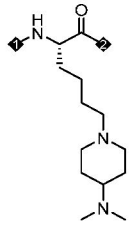
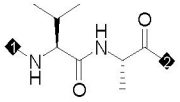
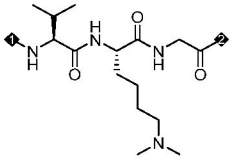
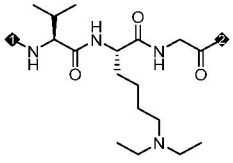
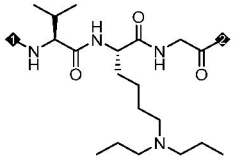
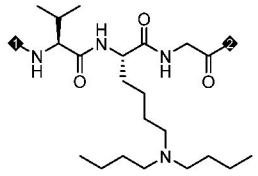
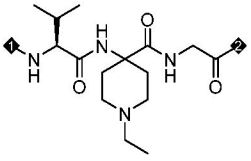
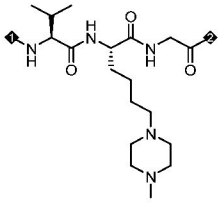
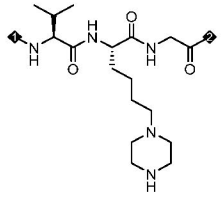
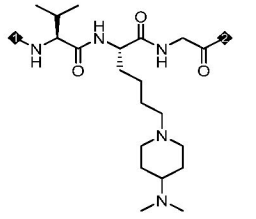
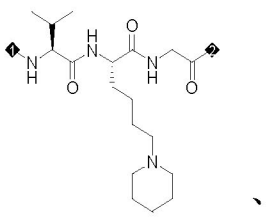
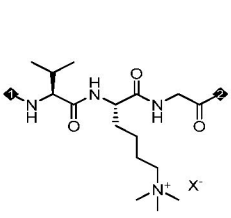
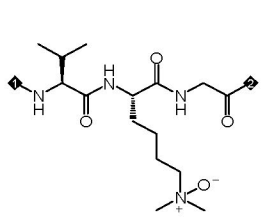
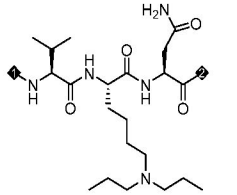
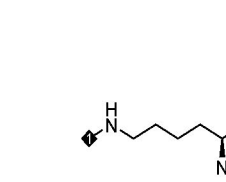
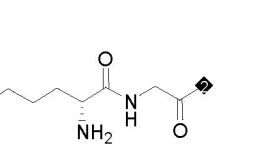
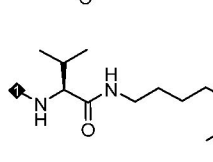
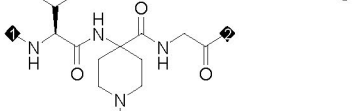
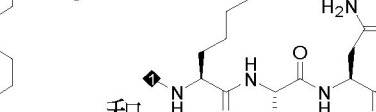
【0189】在一些實施方案中，n為1。

【0190】在一些實施方案中，n1選自1、2、3和4。

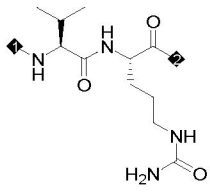
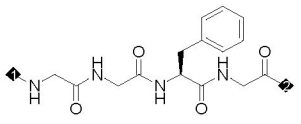
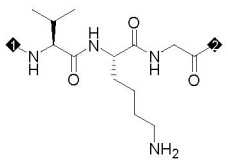
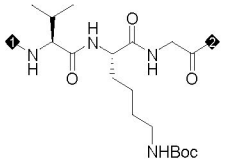
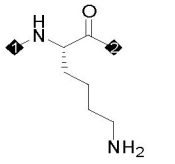
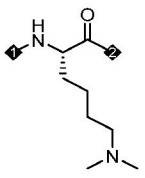
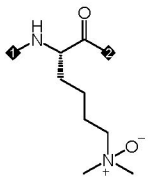
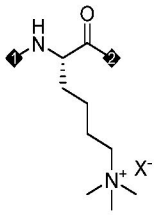
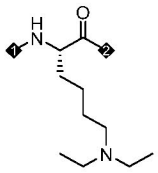
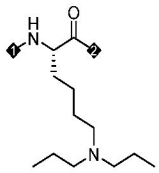
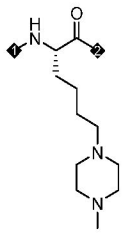
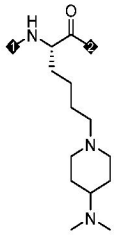
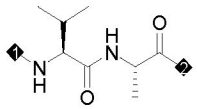
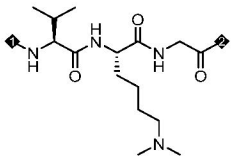
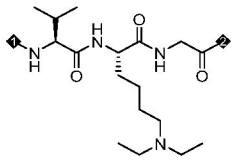
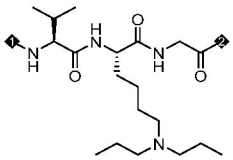
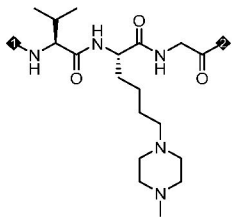
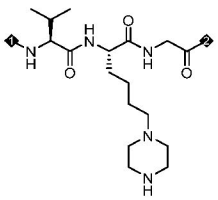
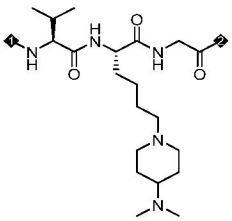
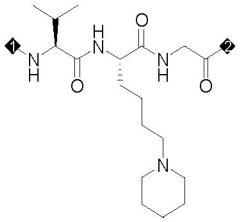
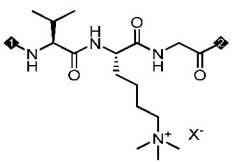
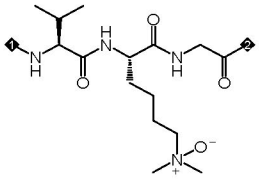
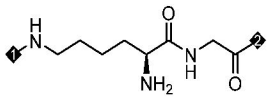
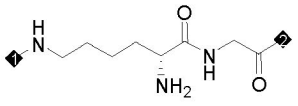
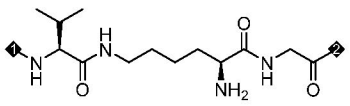
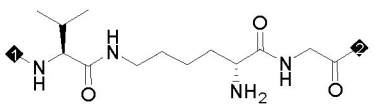
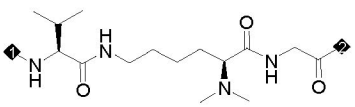
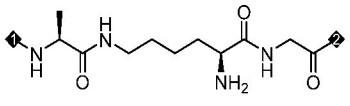
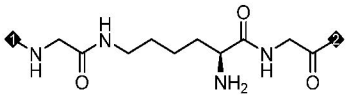
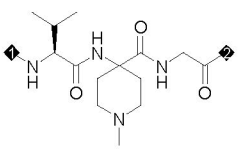
【0191】在一些實施方案中，n2為1。

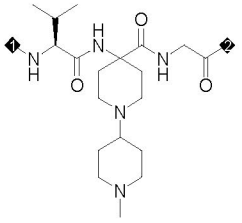
【0192】在一些實施方案中，n3為0。

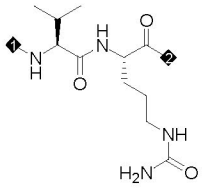
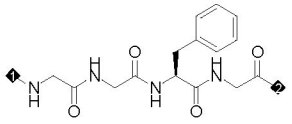
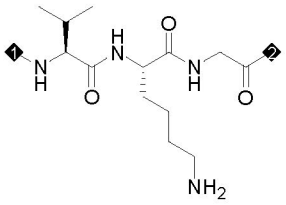
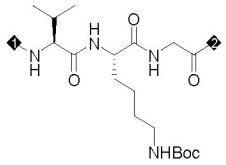
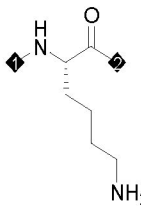
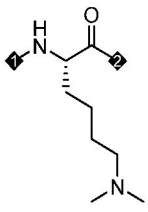
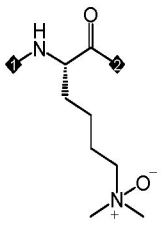
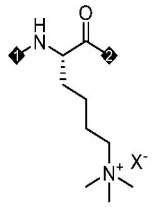
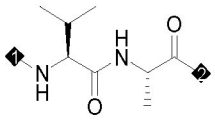
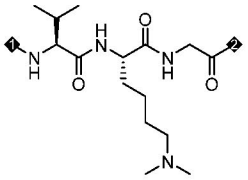
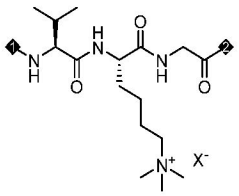
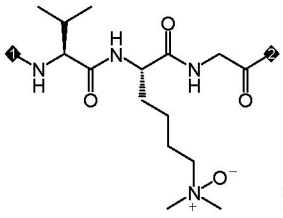
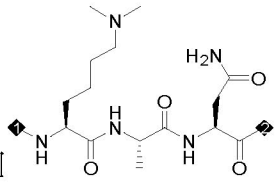
【0193】在一些實施方案中，L_3選自  、

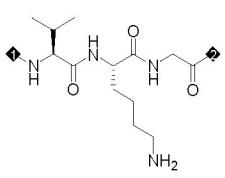
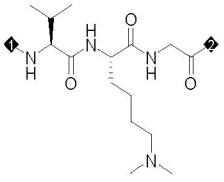
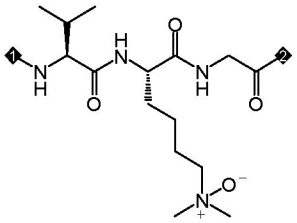
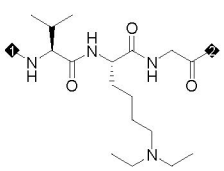
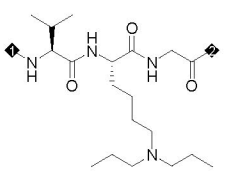
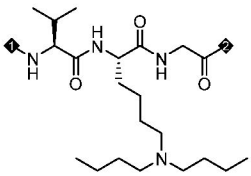
 、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、 、  、  、、 、  、  、、、 、、、、和，X^-選自鹵素離子、羧酸

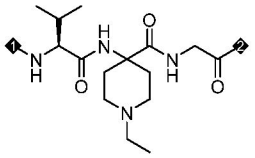
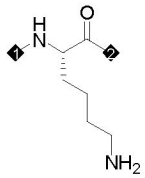
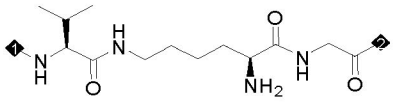
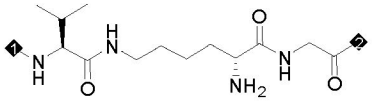
根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

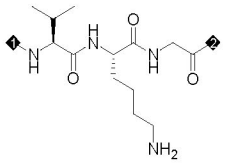
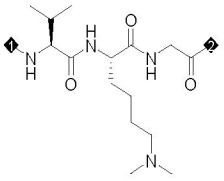
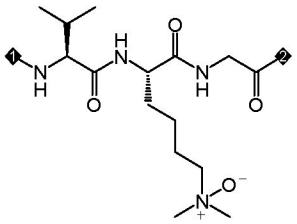
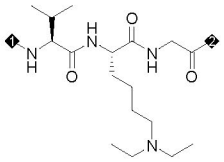
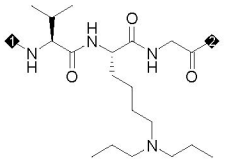
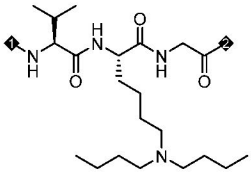
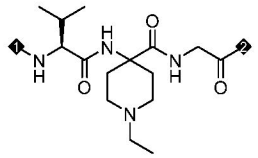
【0194】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和

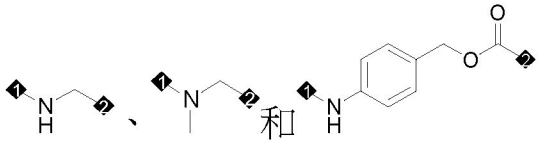
 ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子和OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

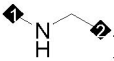
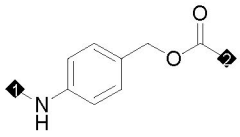
【0195】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子和硫酸氫根離子、OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

【0196】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、

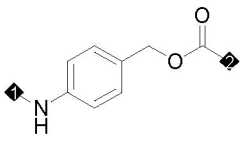
 、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

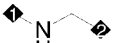
【0197】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  和  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

【0198】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

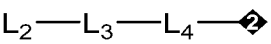
【0199】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4為  或  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

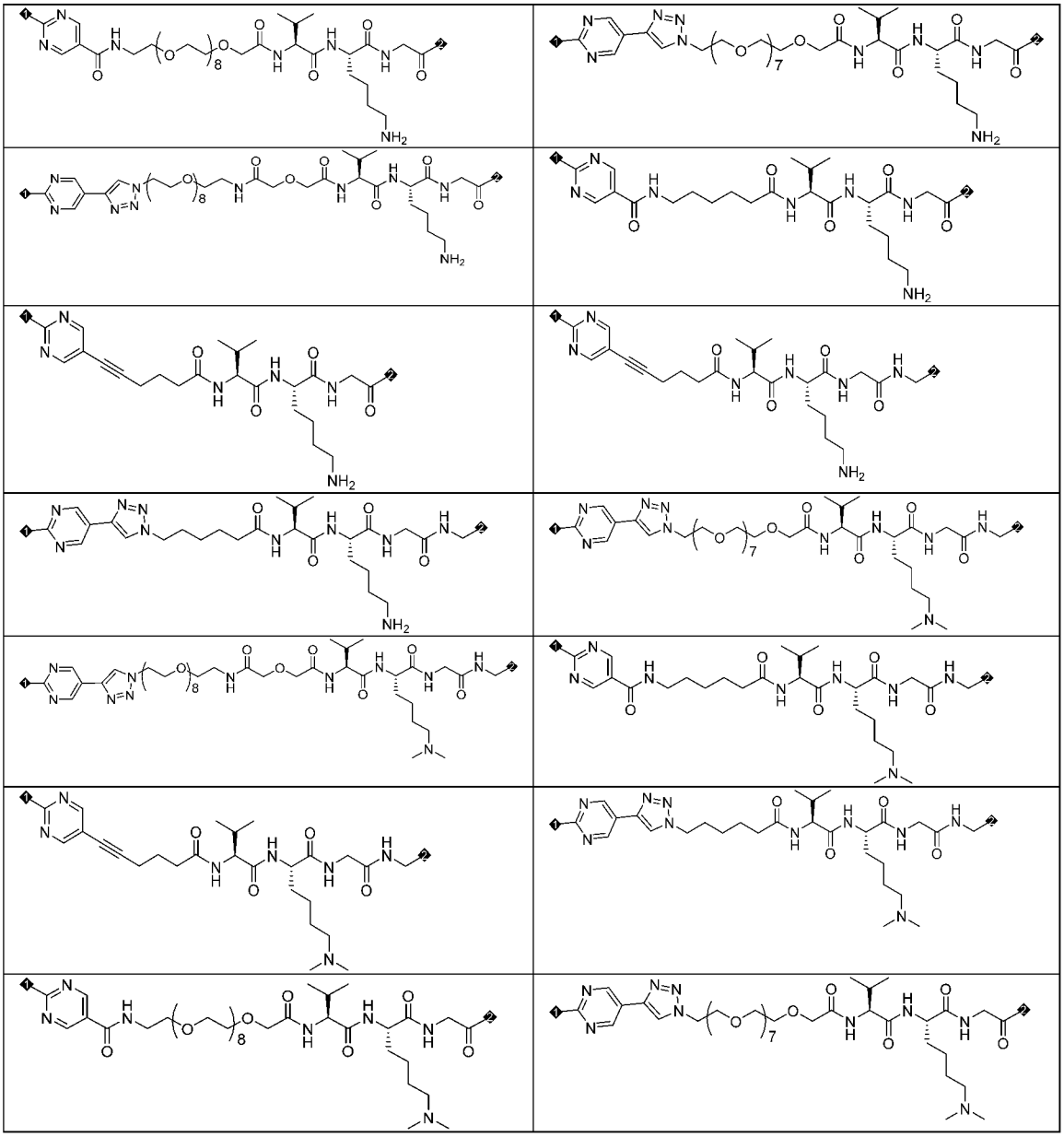
【0200】在一些實施方案中，L_4不存在。

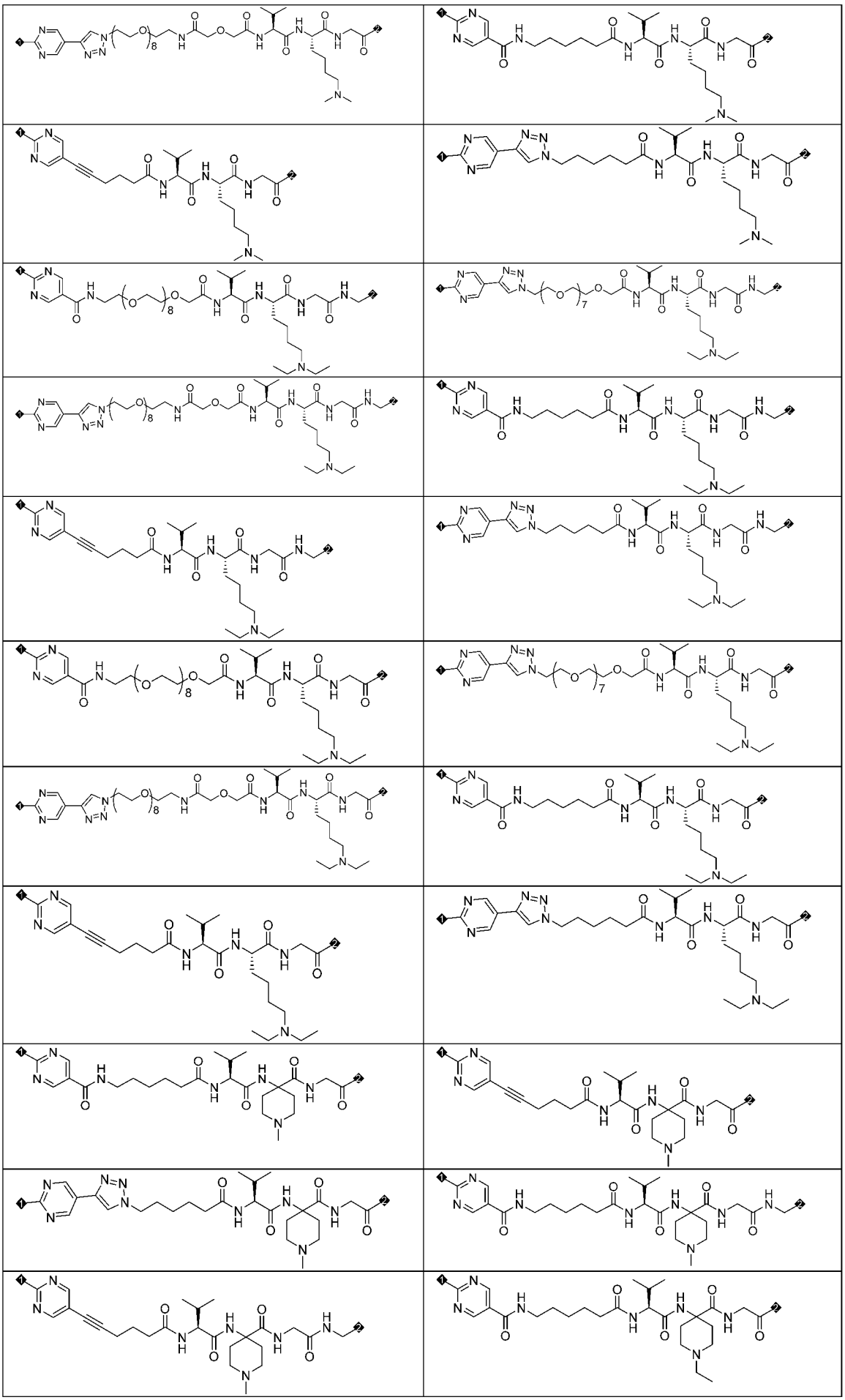
【0201】在一些實施方案中，L_4選自和  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

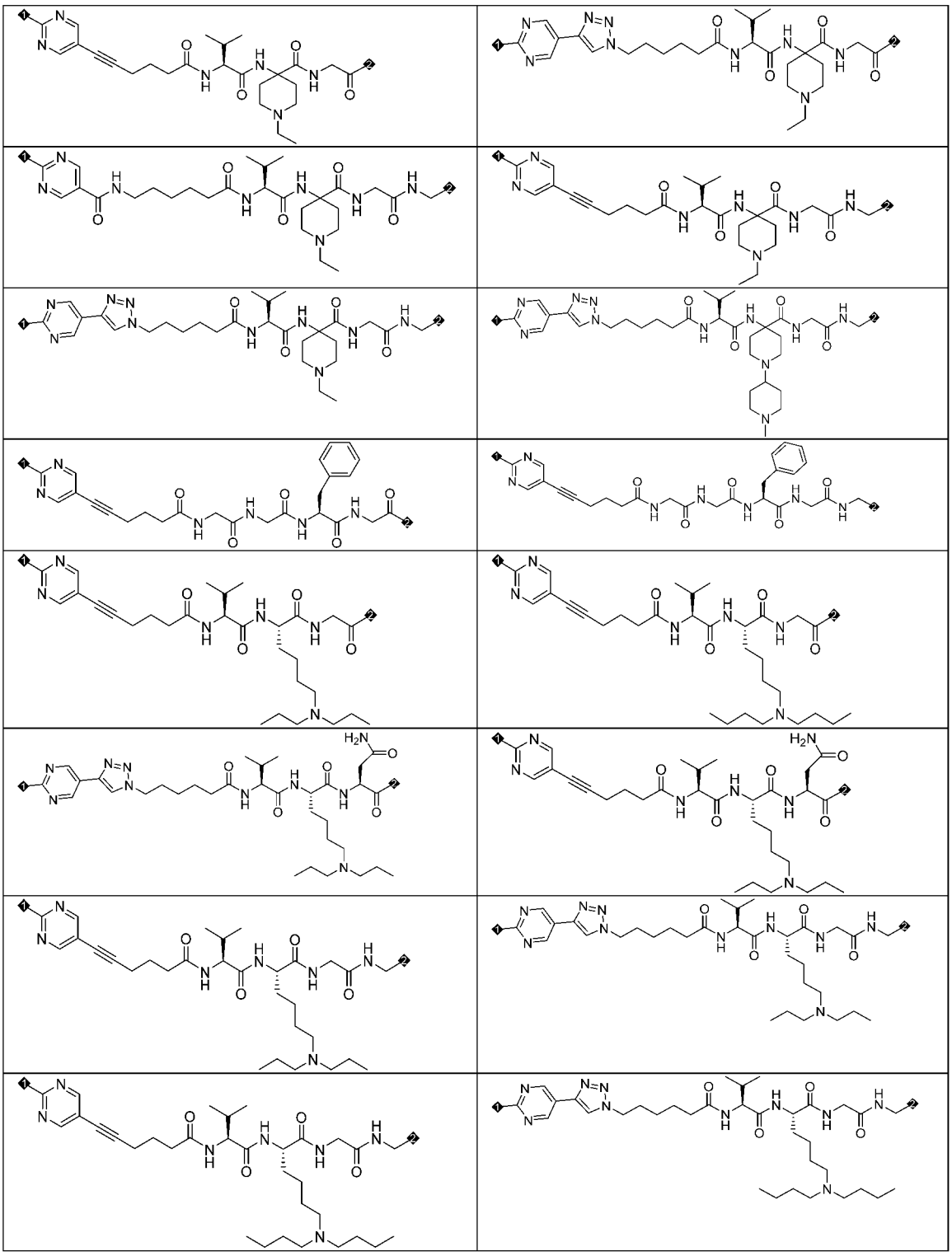
【0202】在一些實施方案中，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

【0203】需要說明的是，如前所述，W不存在或存在，由此，W不存在時，L_4的1位與L_3相連，2位與X相連；W存在時，L_4的1位與L_3相連，2位與W相連。以下關於L_4的連接關係可參照前述內容進行理解。

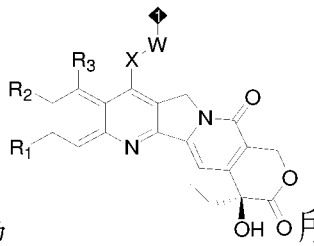
【0204】在一些實施方案中，  的結構選自以下結構片段：

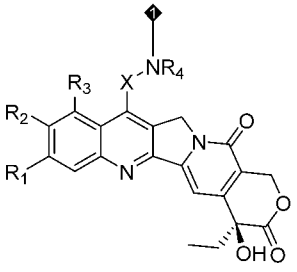
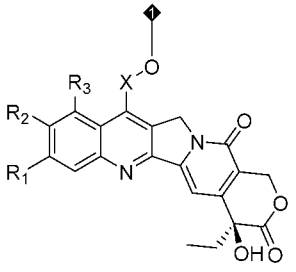
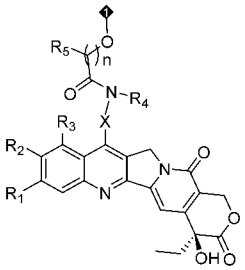


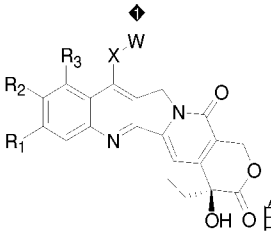


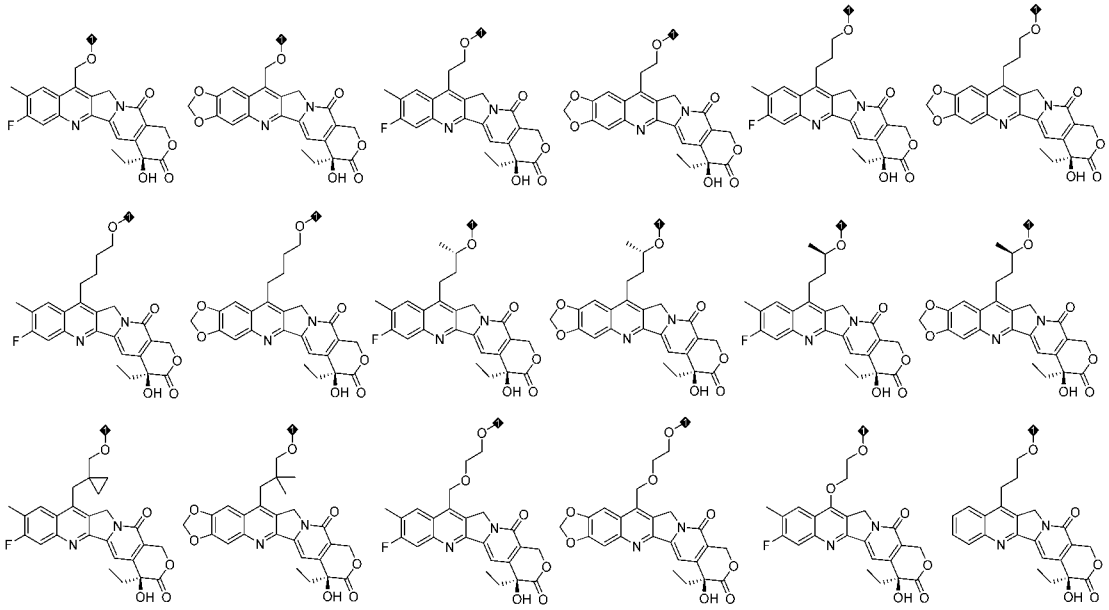


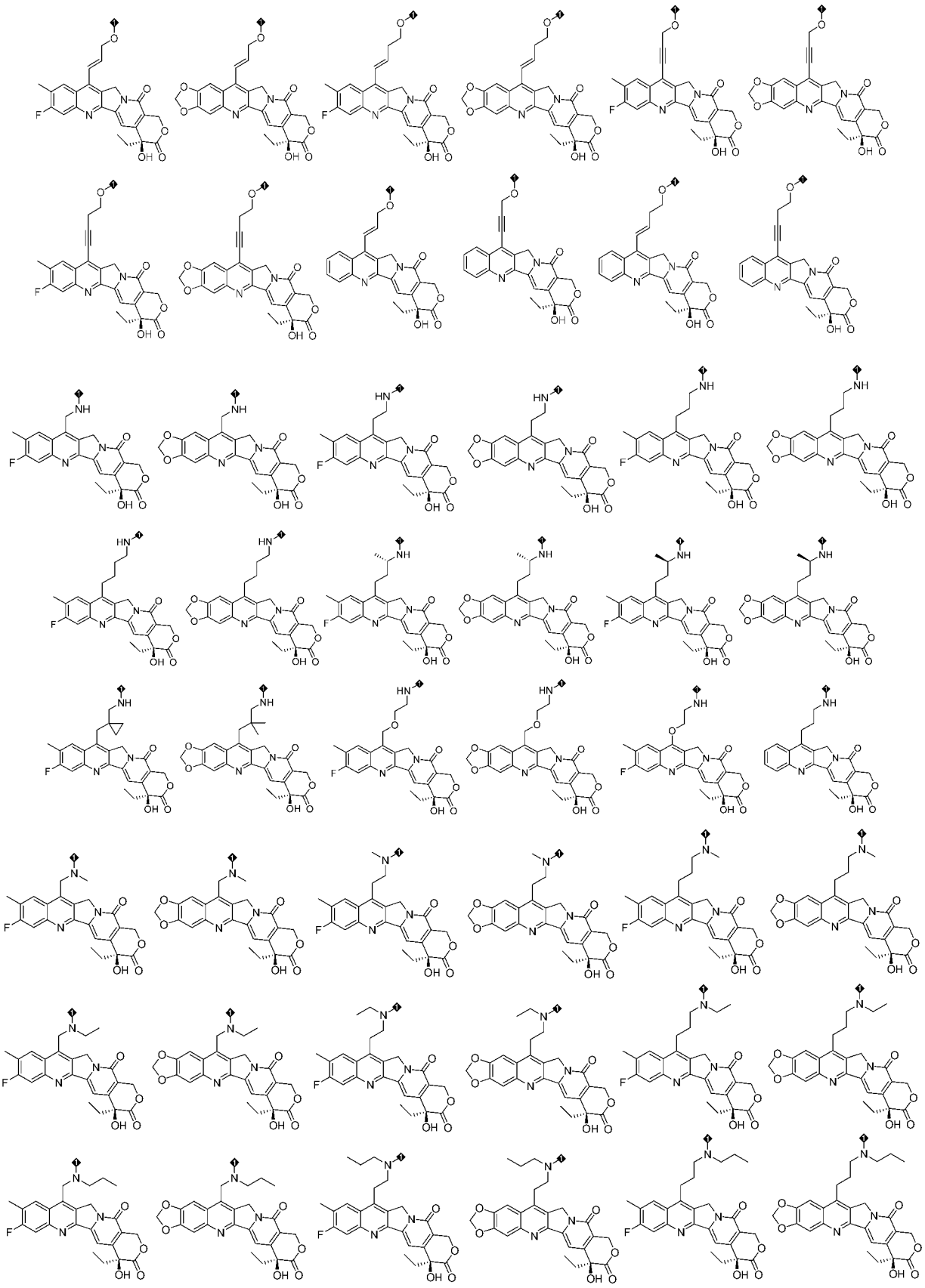
其中，1位與Tb相連，2位與W相連。

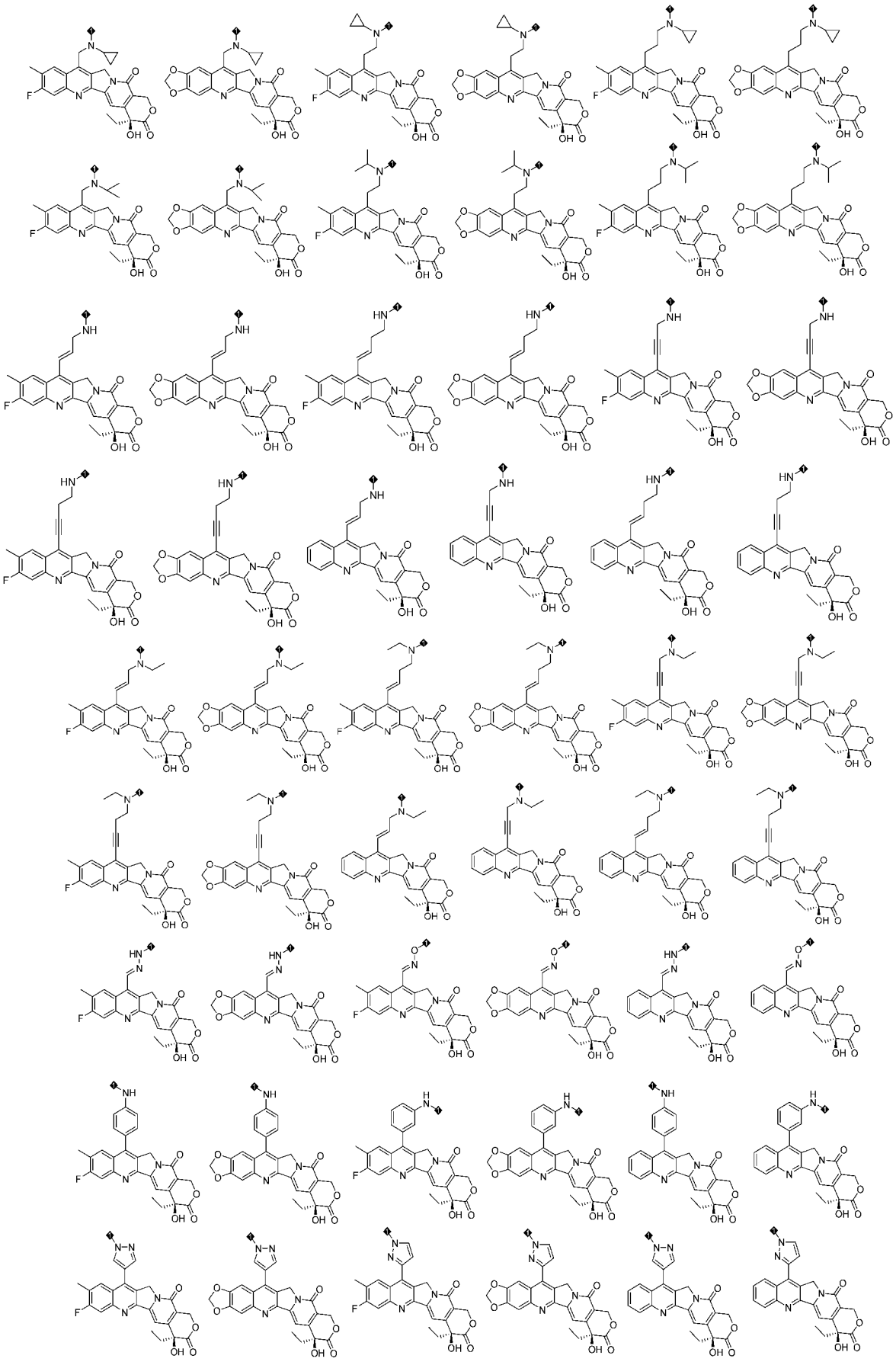
【0205】在一些實施方案中，D為  所示的結構片段；1位

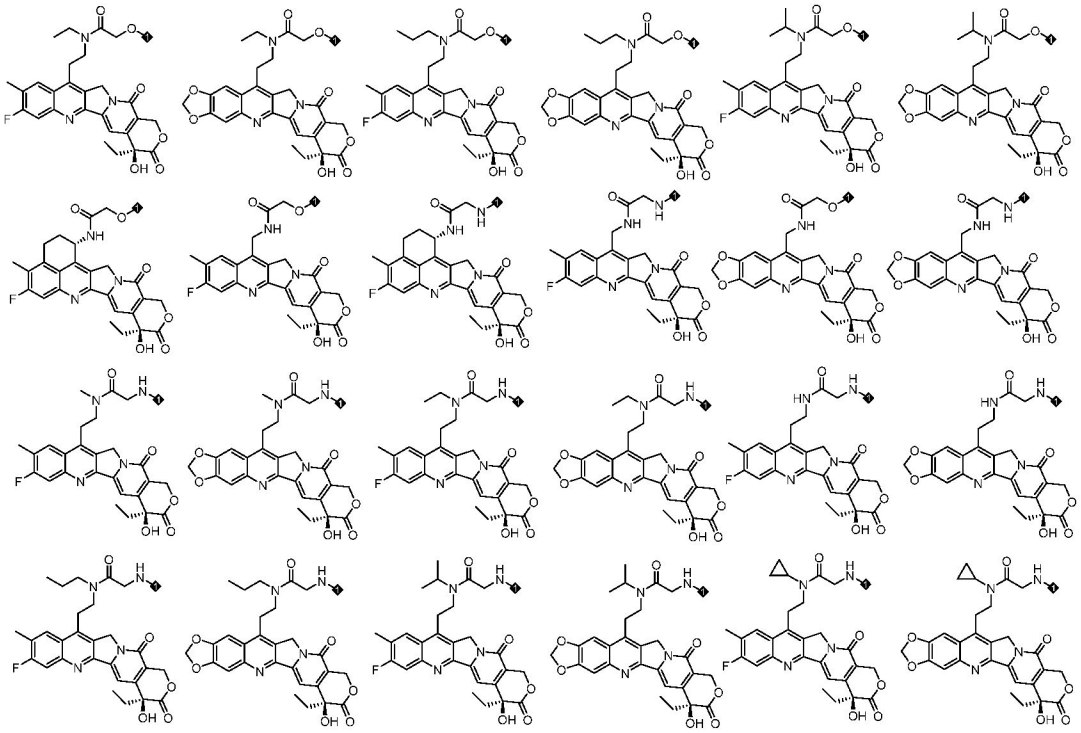
與 L_3 或 L_4 連接；例如  、  、  。

【0206】在一些實施方案中，  的結構選自以下結構片段：

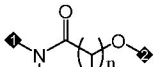
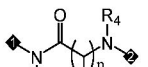
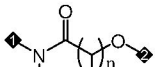


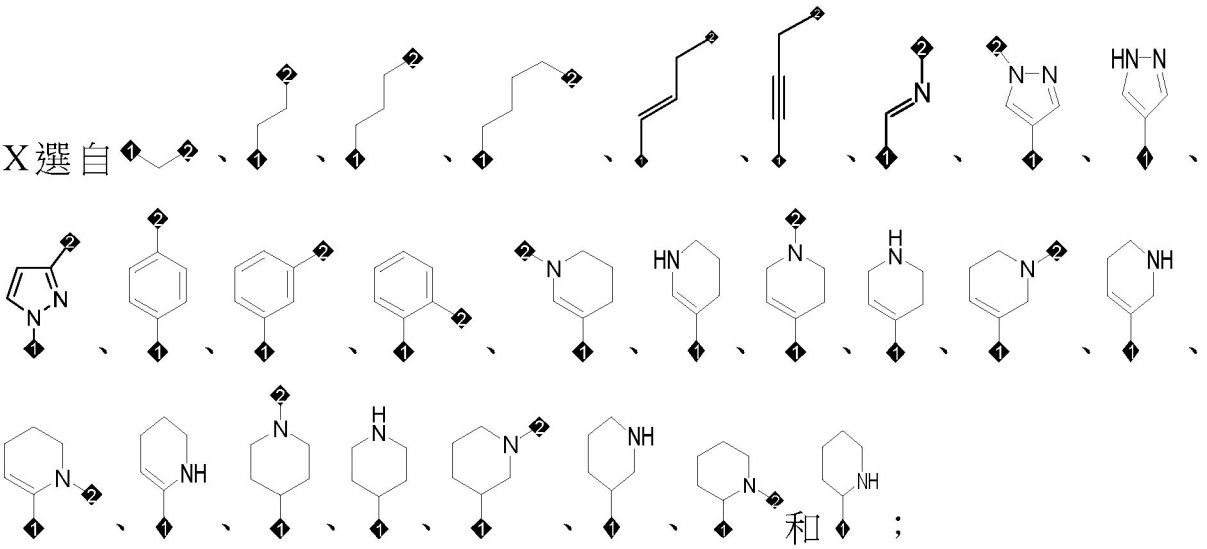


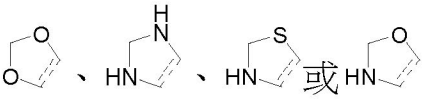




其中，1位與L_4相連；當L_4不存在時，1位與L_3相連。

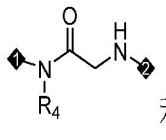
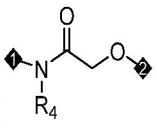
【0207】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  和  ；例如不存在、-O-、-NR_4-或  ；R_4和R_5各自獨立地選自H和C1-4烷基；n獨立地選自0、1、2、3和4；

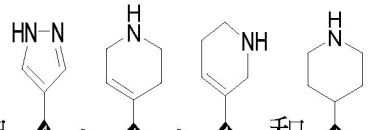
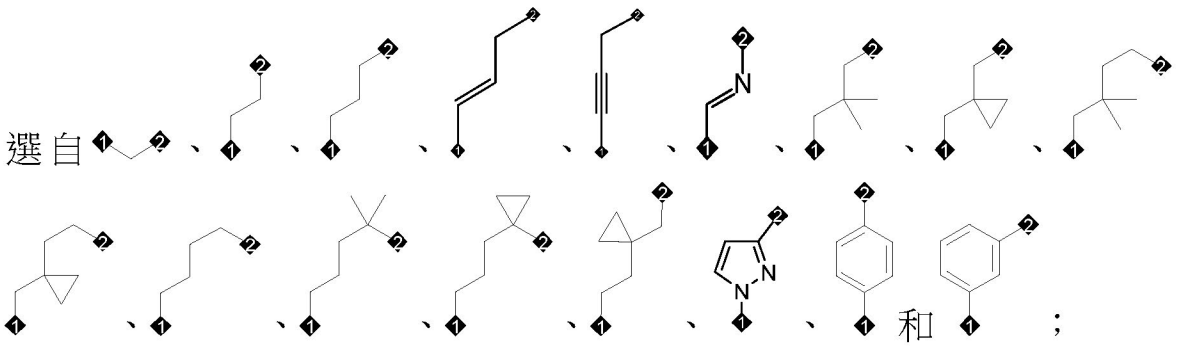
X選自  ；

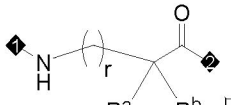
【0208】R_1選自H、鹵素，R_2選自H、C1-4烷基，或，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成  ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的

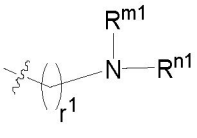
位置；

R_3選自H和C1-4烷基，或，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成5-6元碳環；

優選地，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-NR_4-（例如-NH-、-N(CH_3)-、-N(C_2H_5)-）、  和  ；R_4獨立地選自H、甲基、乙基、異丙基、正丙基、第三丁基和環丙基；

W不存在時，X選自  ，1位和母環相連；W存在時，X選自  ；

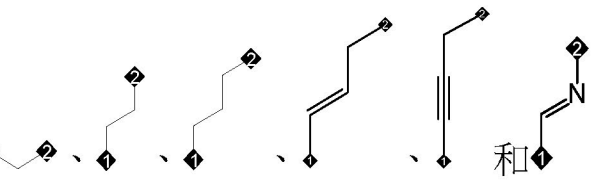
AA_1  中，r選自0、1、2、3、4和5；

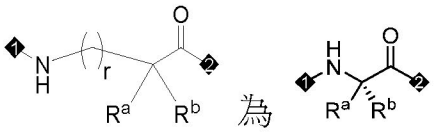
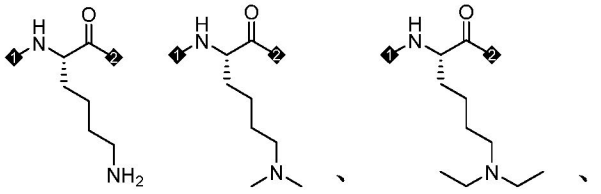
R^a、R^b中，任一個為H，另一個選自  ；或者，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環；

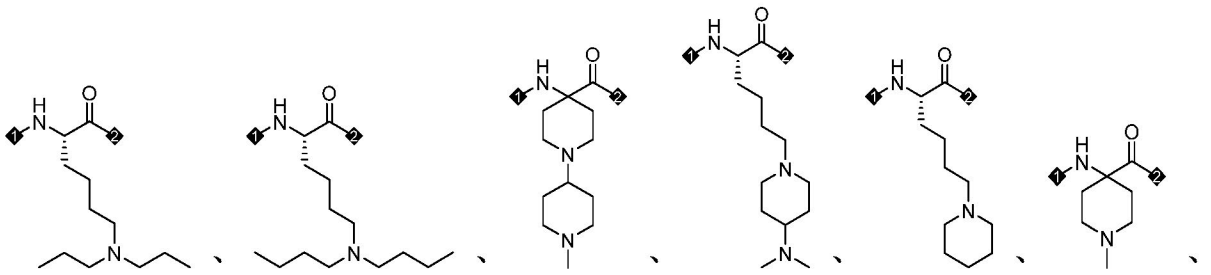
R_1選自H、鹵素，R_2選自H、C1-4烷基，或，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成 ；

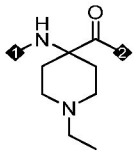
R_3選自H和C1-4烷基，或，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ；

更優選地，W 選自-O-和-NR_4-，1 位 X 相連，2 位與 L_4 或 L_3 相連；

X選自  和，1位和母環相連，2位和W相連；

 為，例如 



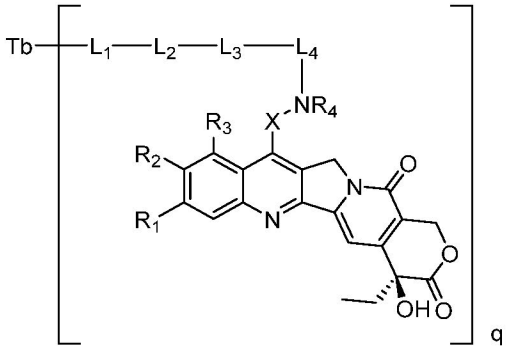
 ；

R_1為F，

R_2為甲基或R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 ；

R_3為H。

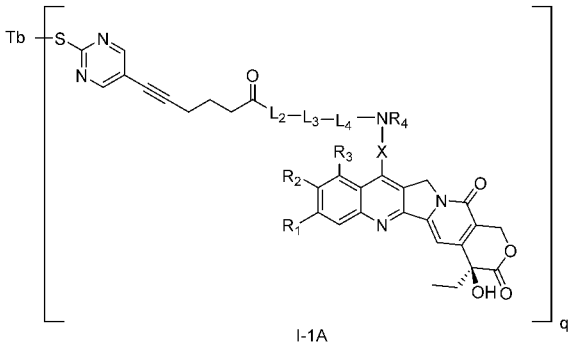
【0209】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-1所式結構：



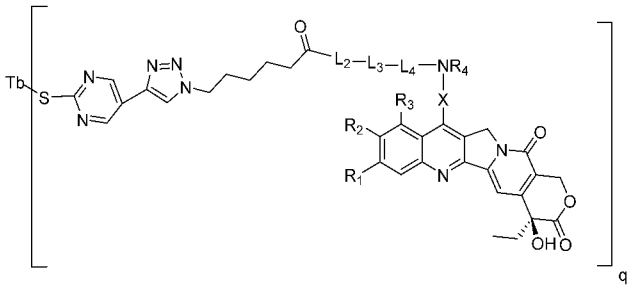
I-1 ，

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0210】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-1A或I-1B所式結構：



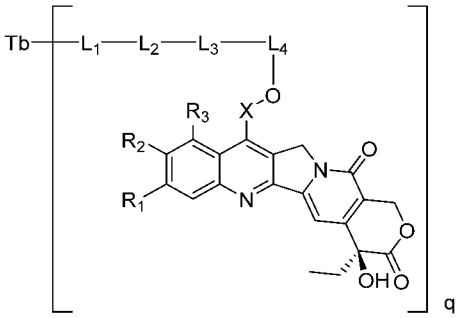
I-1A



I-1B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

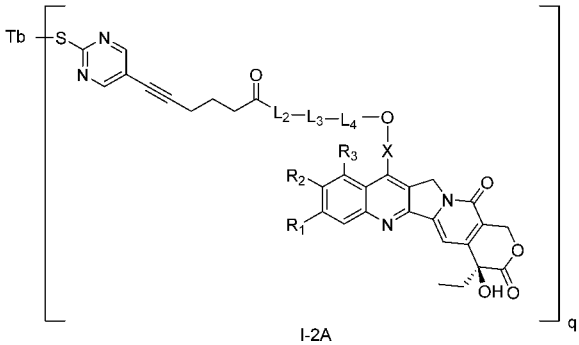
【0211】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-2所式結構：



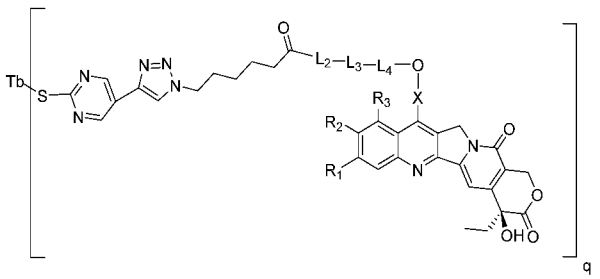
I-2

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0212】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-2A或I-2B所式結構：



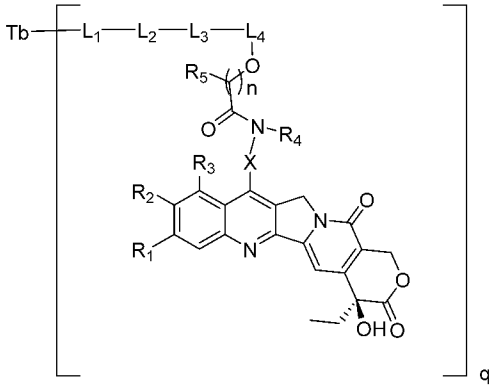
I-2A、



I-2B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

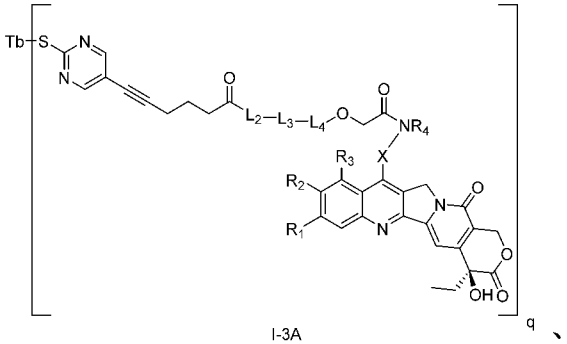
【0213】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-3所式結構：



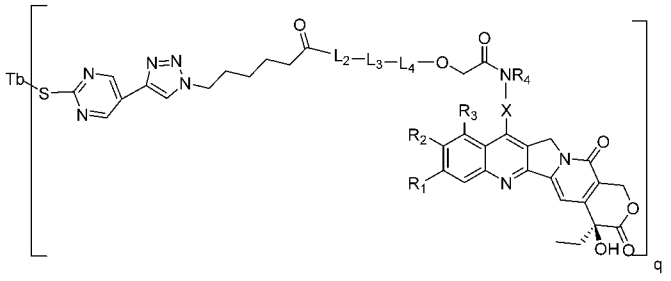
I-3

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0214】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-3A或I-3B所式結構：



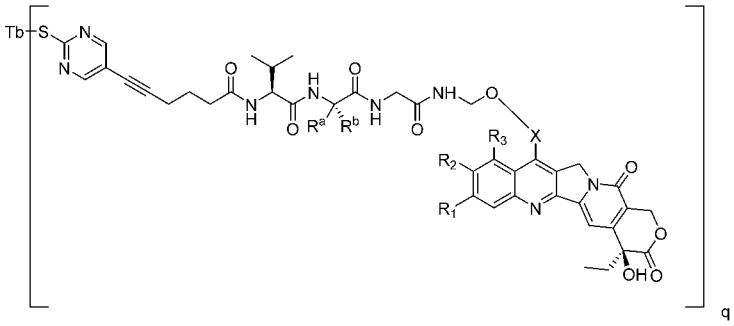
I-3A、



I-3B ，

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

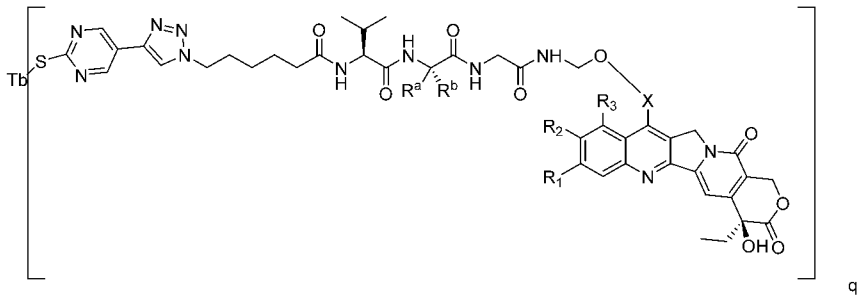
【0215】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-A所式結構：



I-A ，

其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

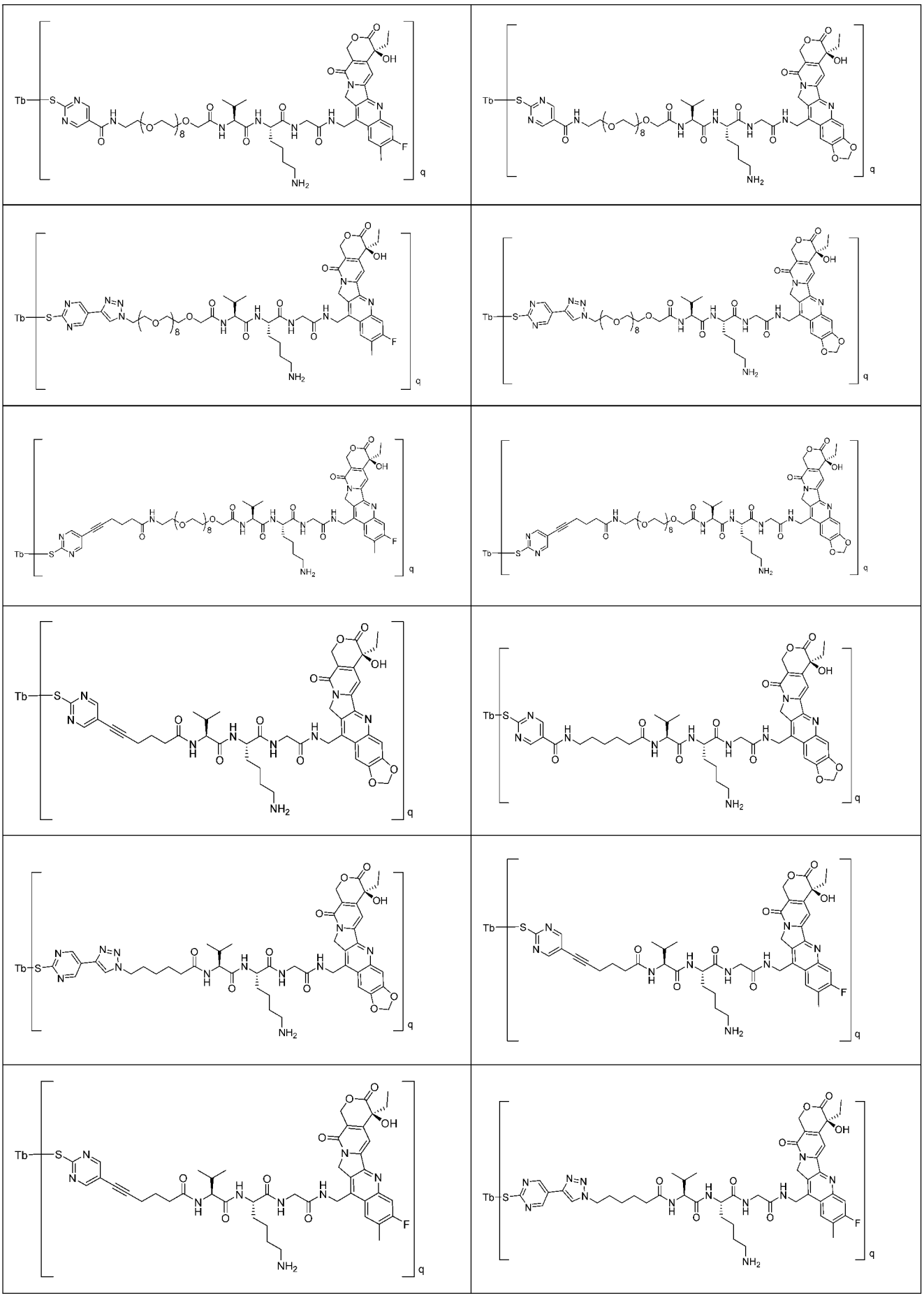
【0216】在一些實施方案中，配體藥物偶聯物具有式I-B所式結構：

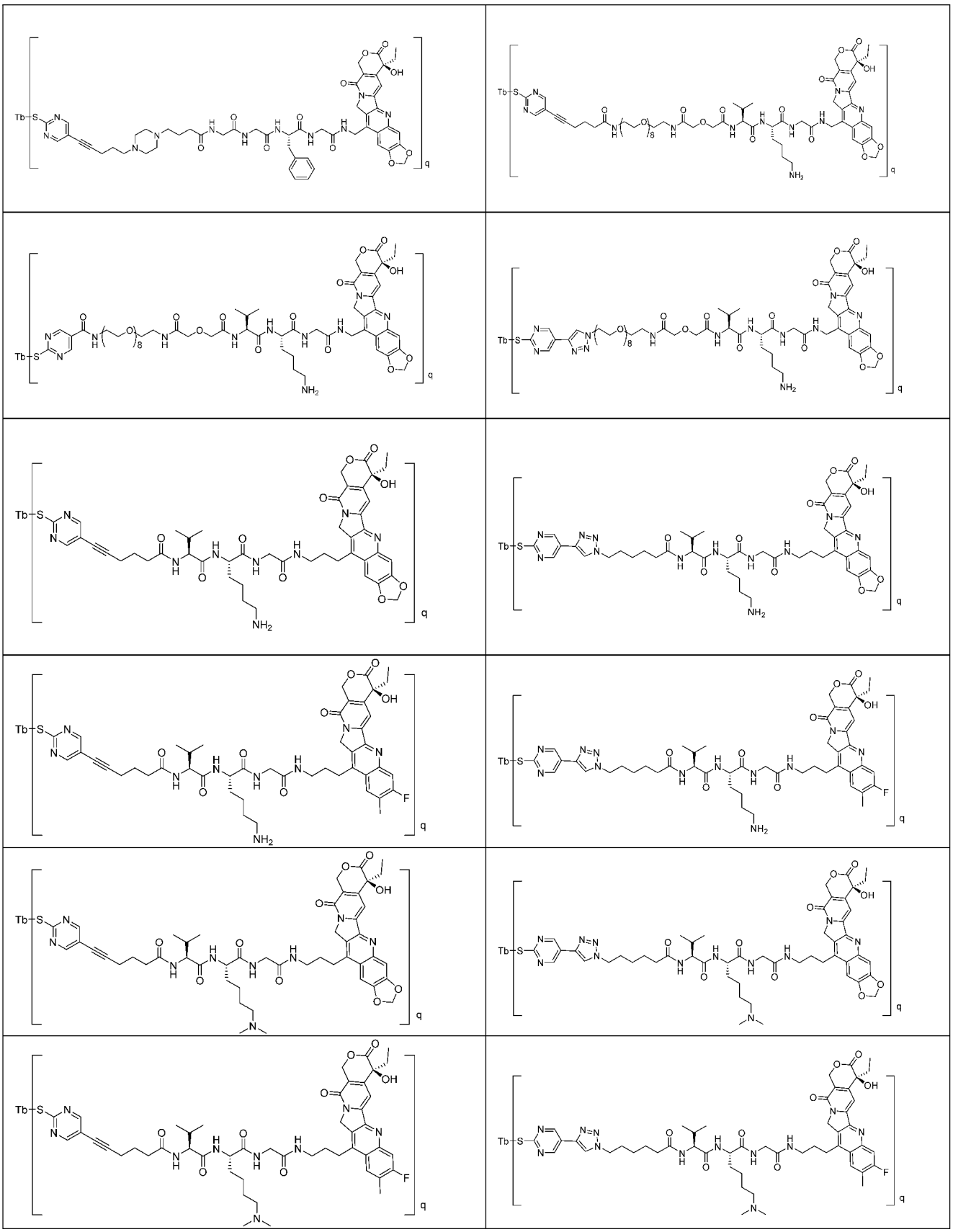


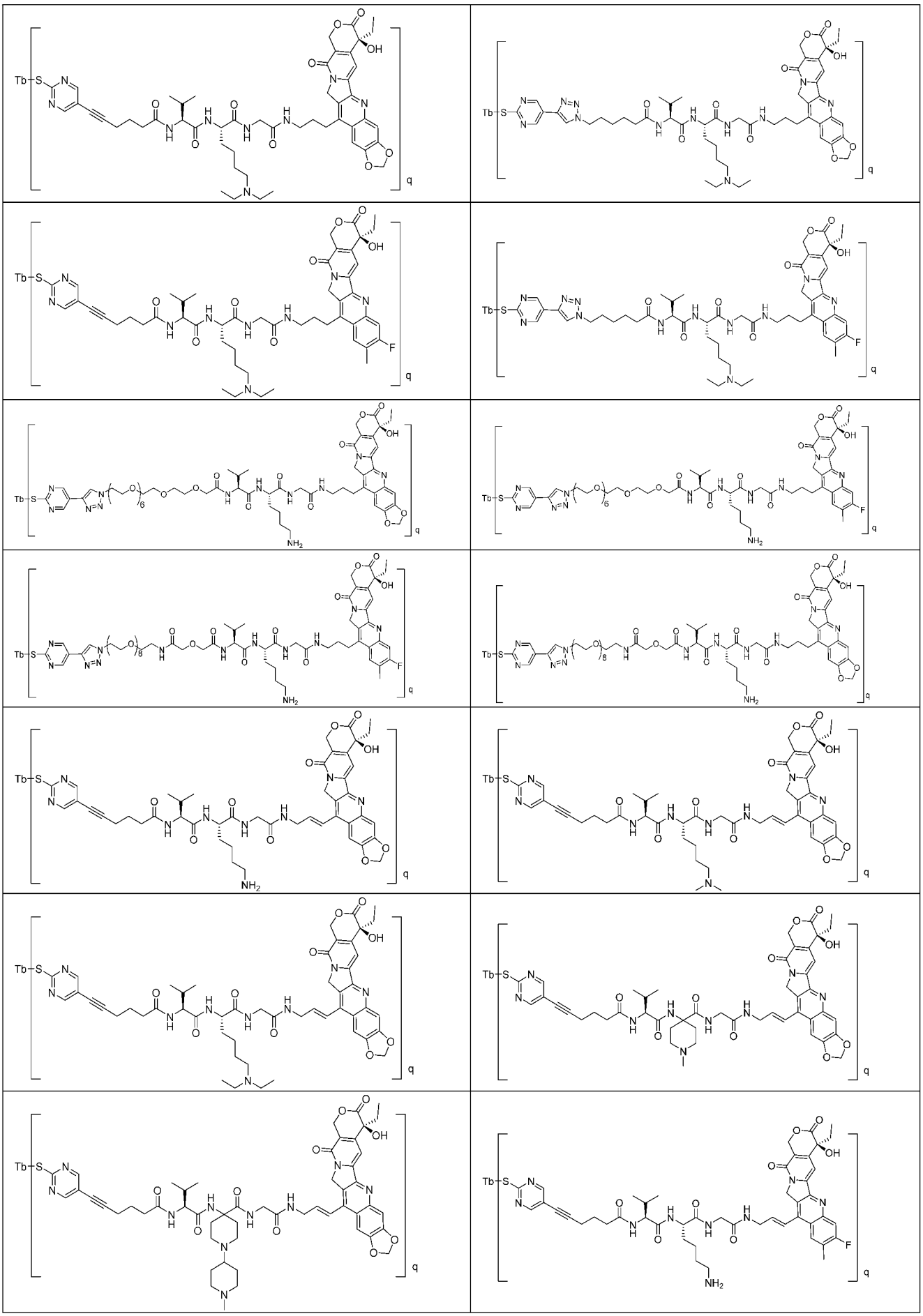
I-B ，

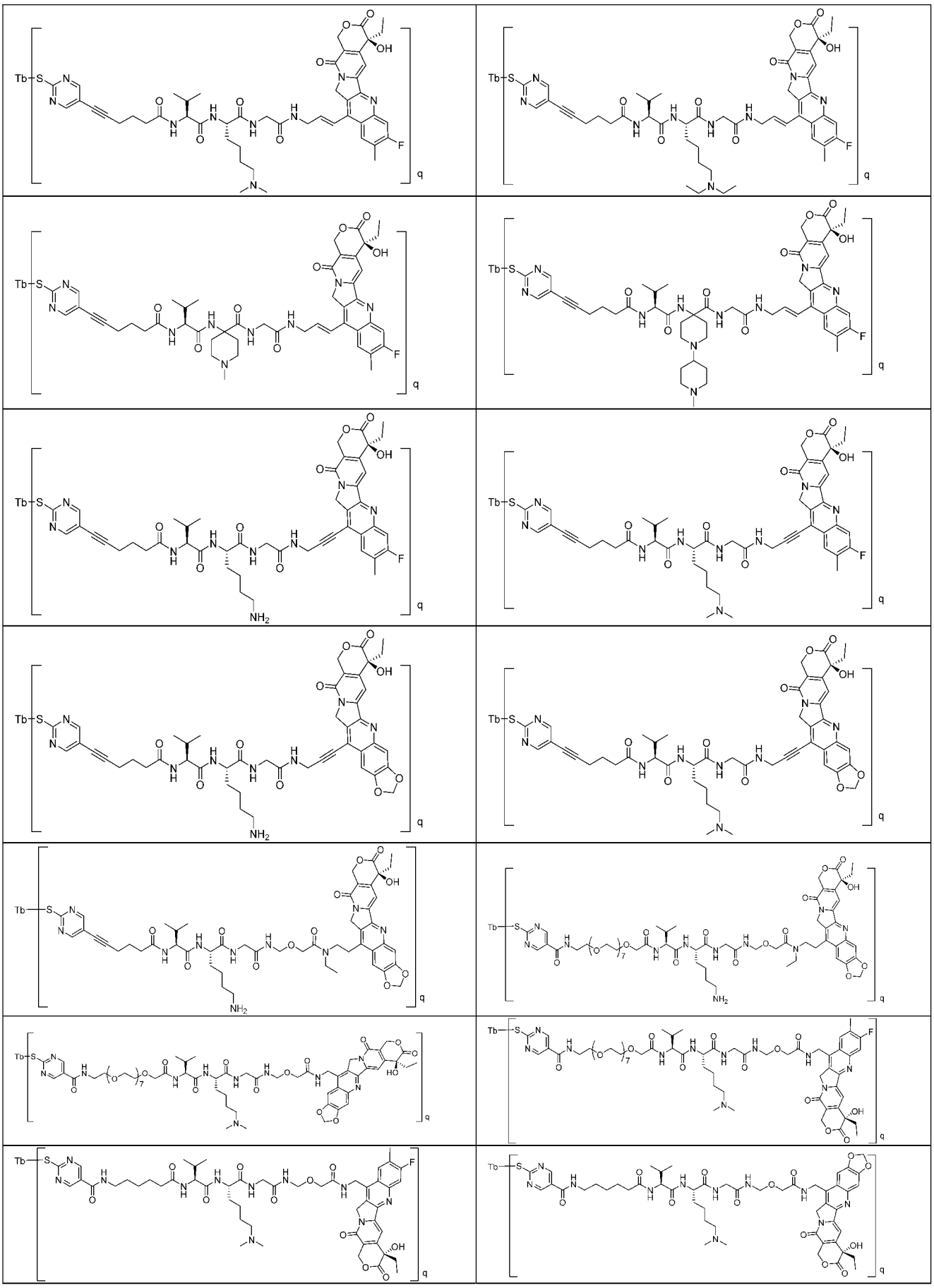
其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

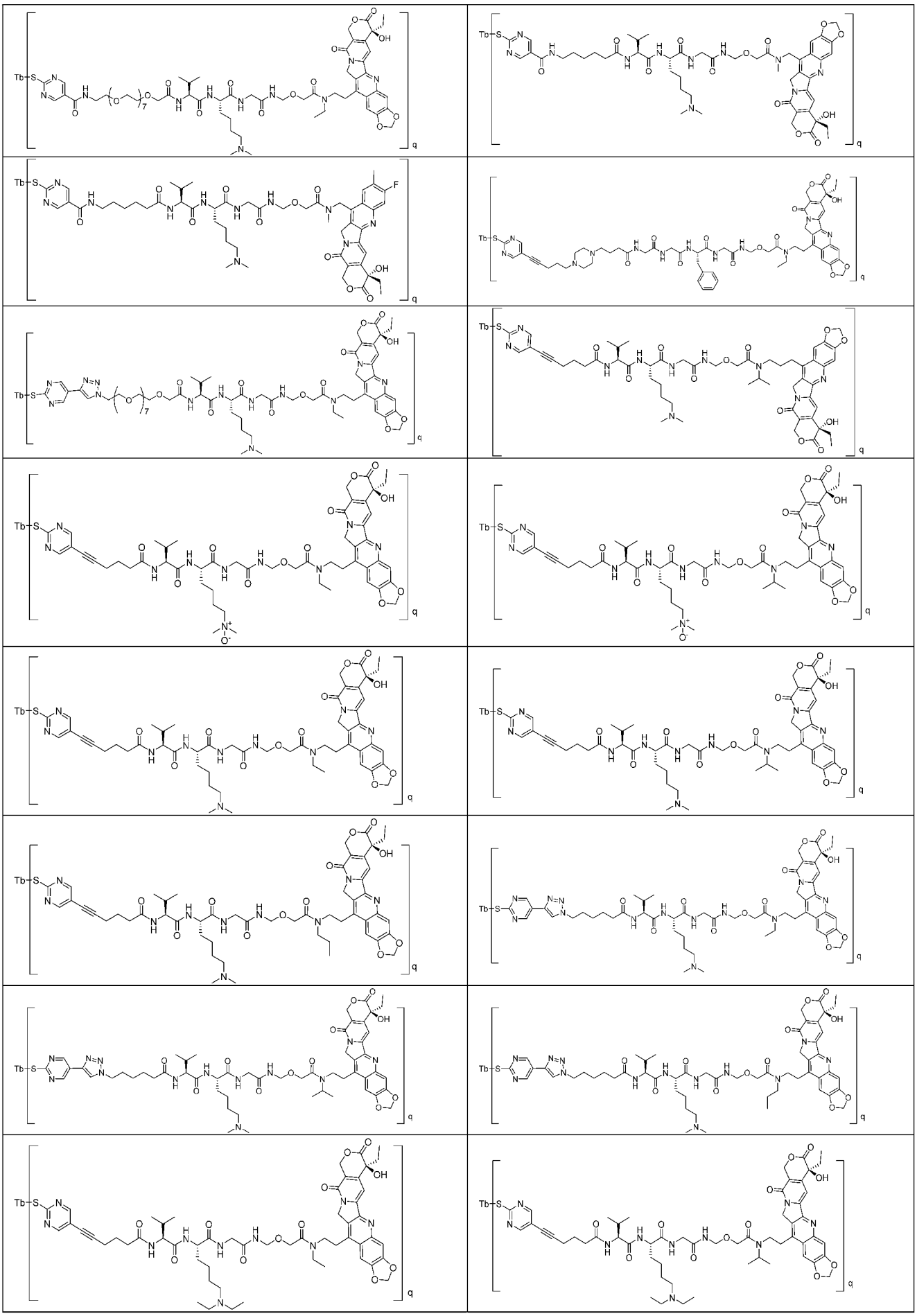
【0217】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自以下：

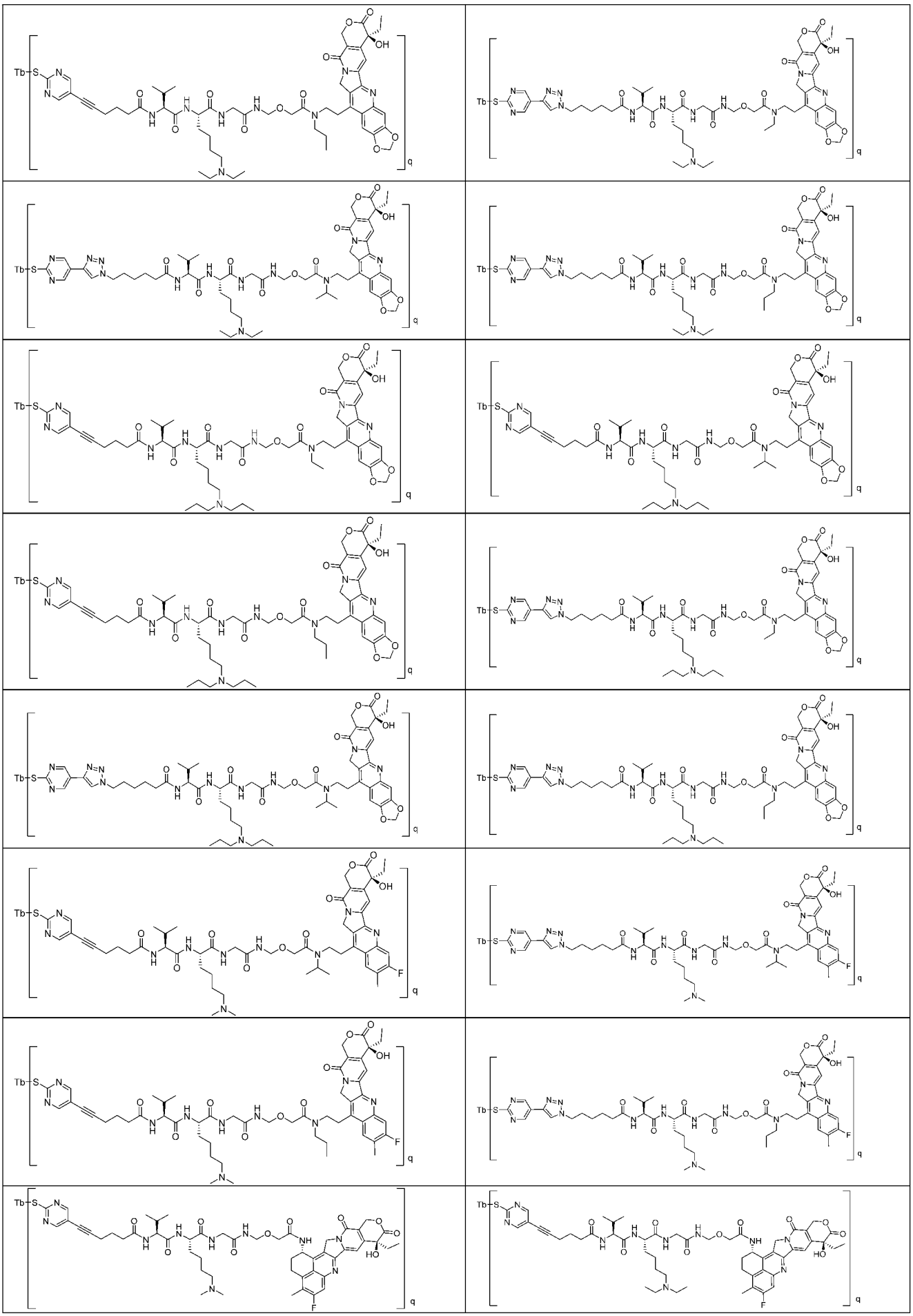


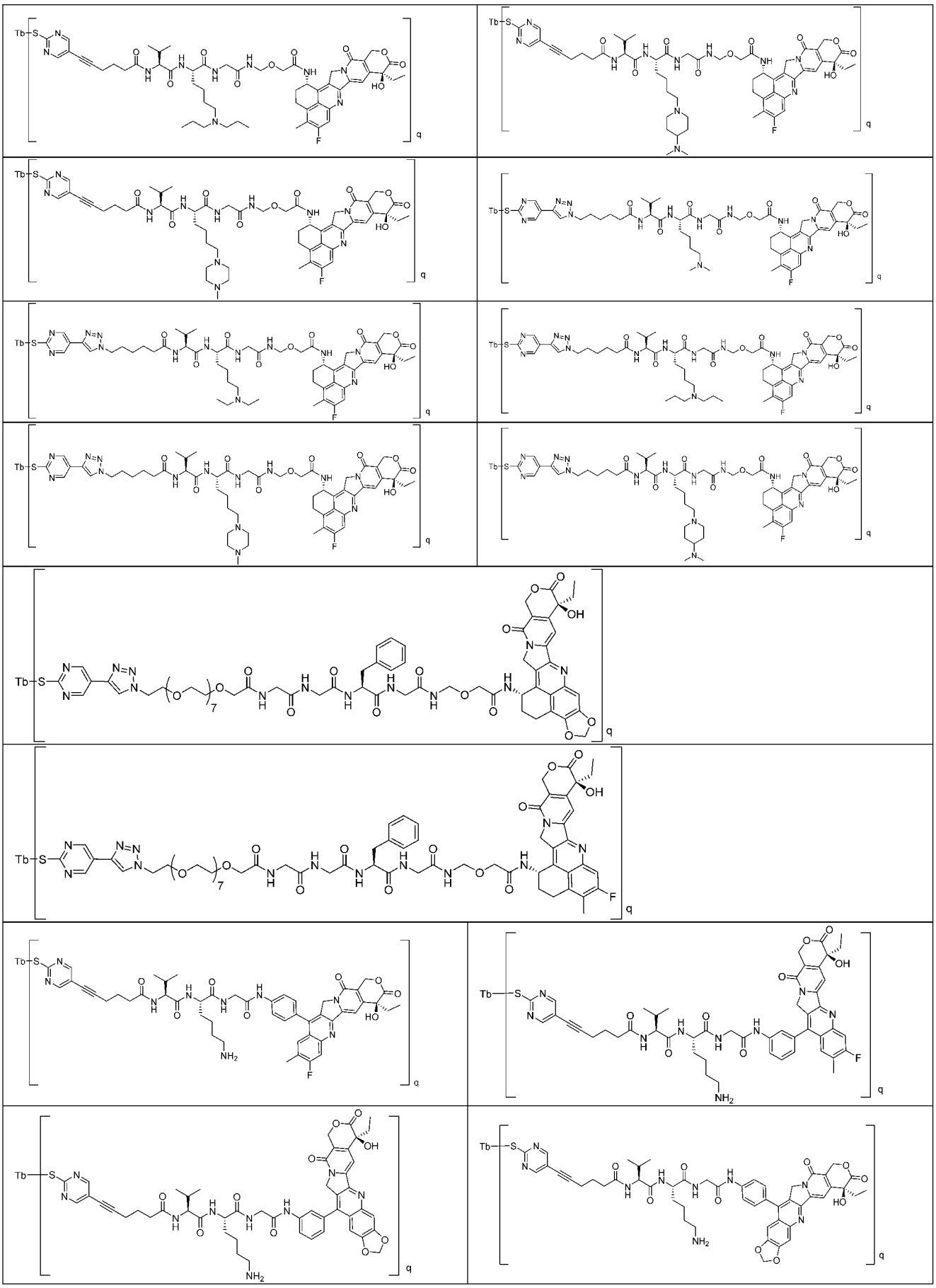




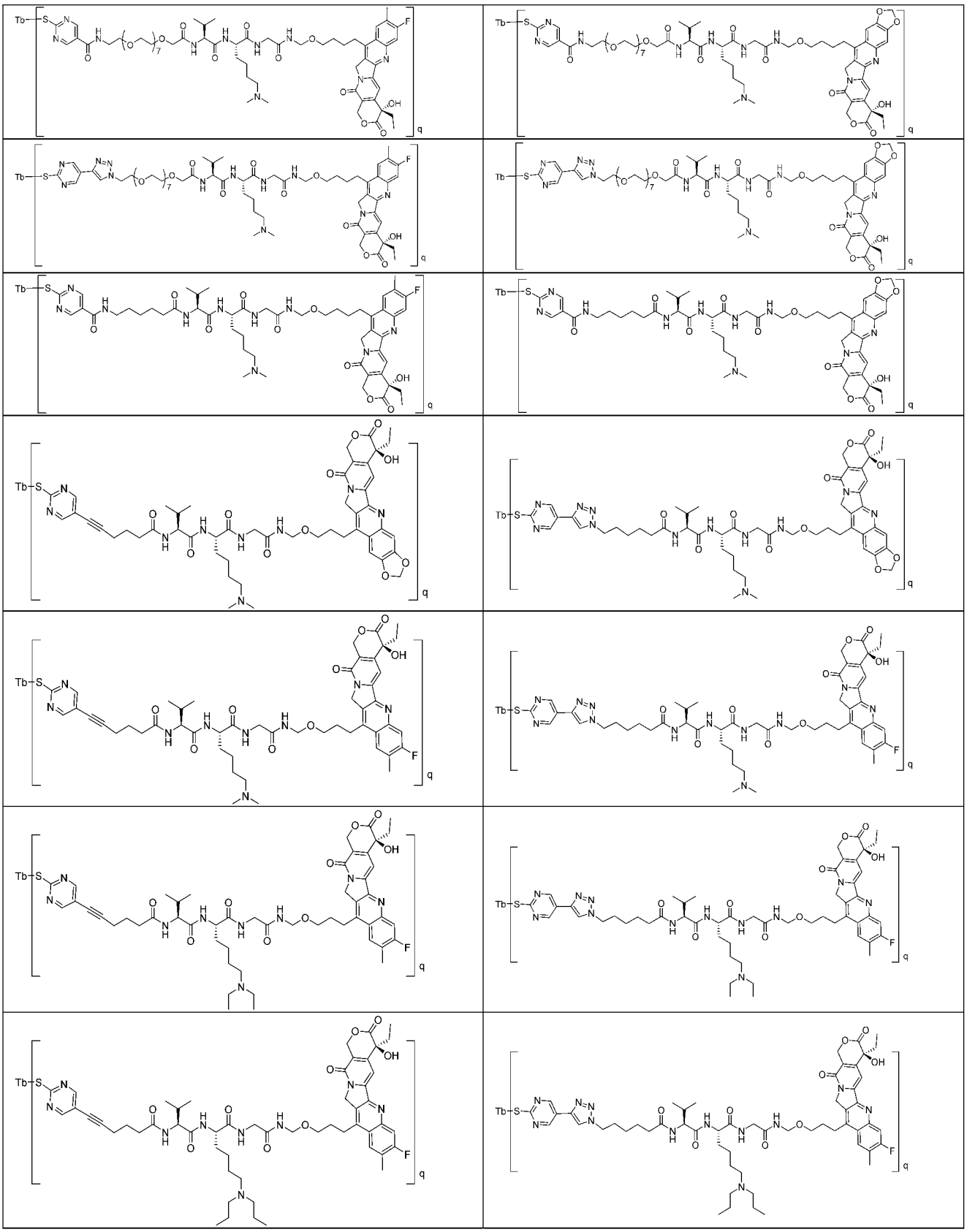


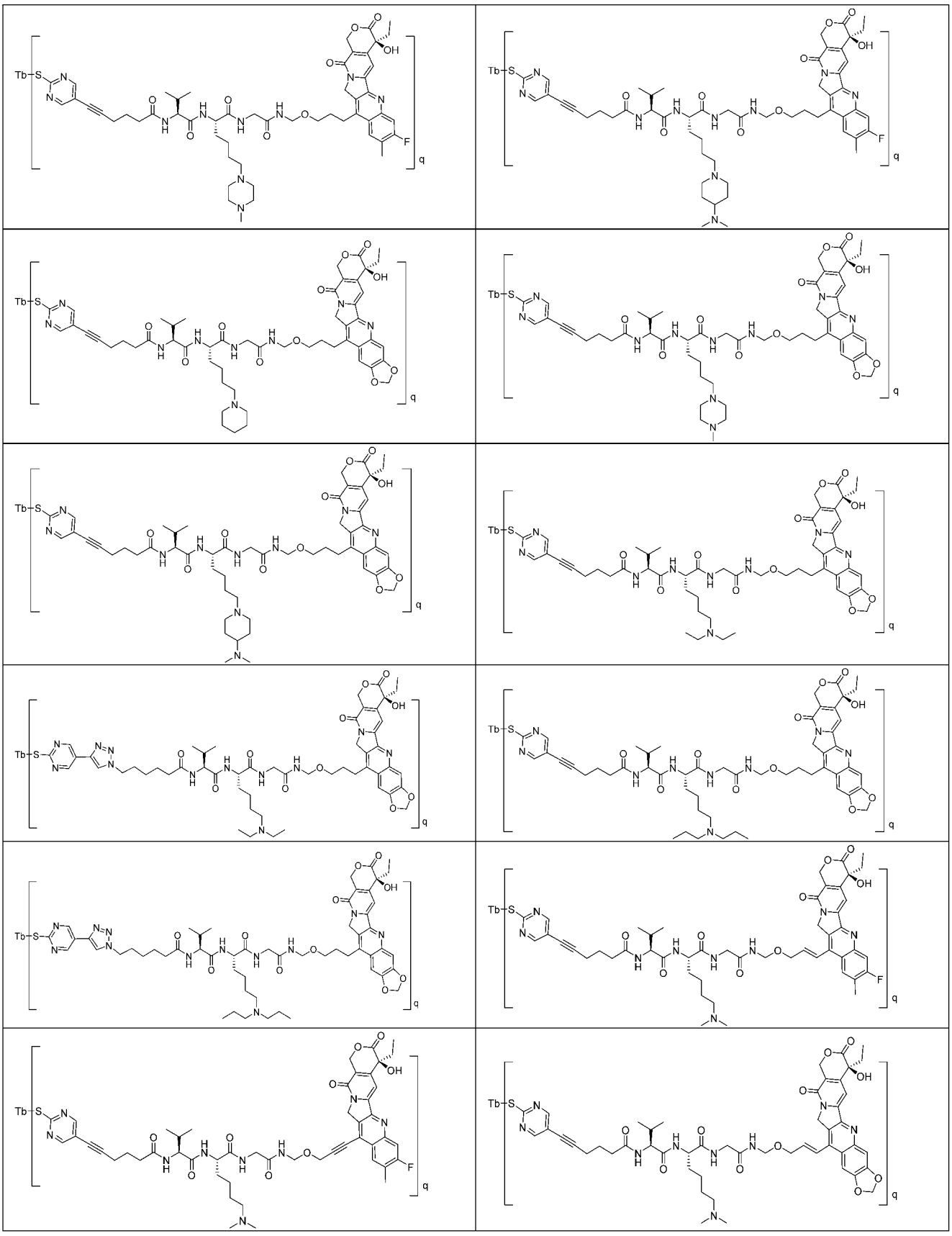


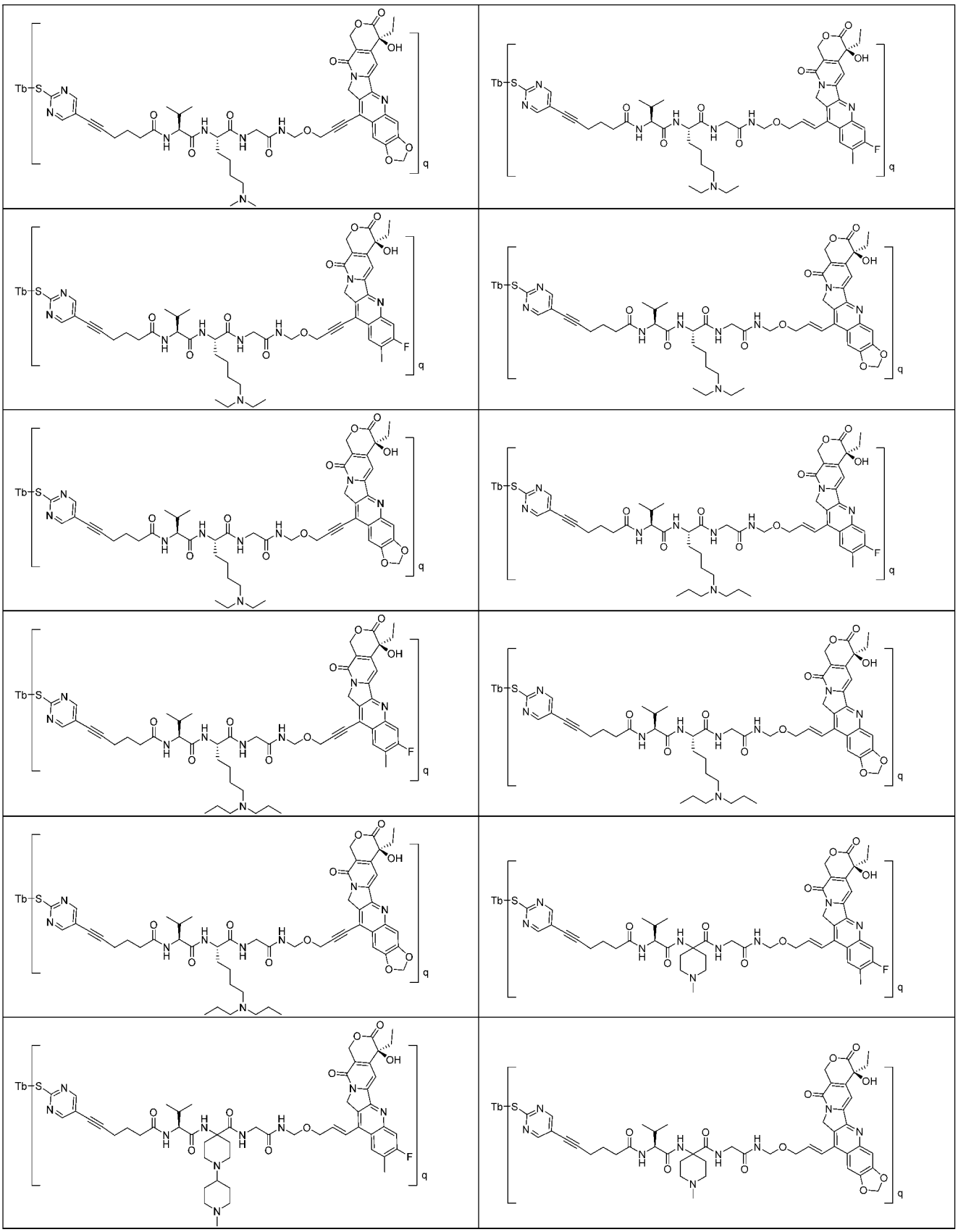




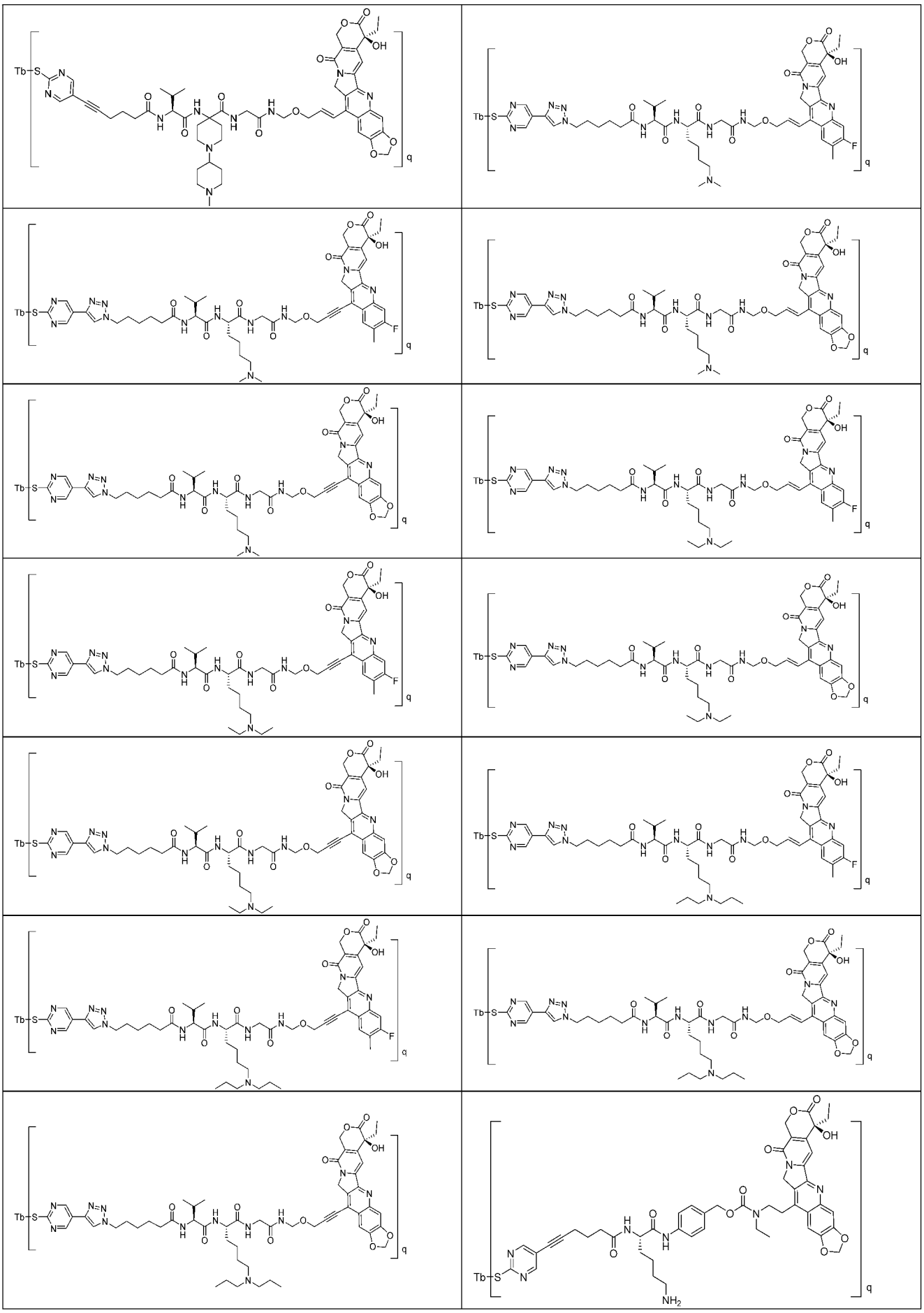
111 年 04 月 15 日修正替換



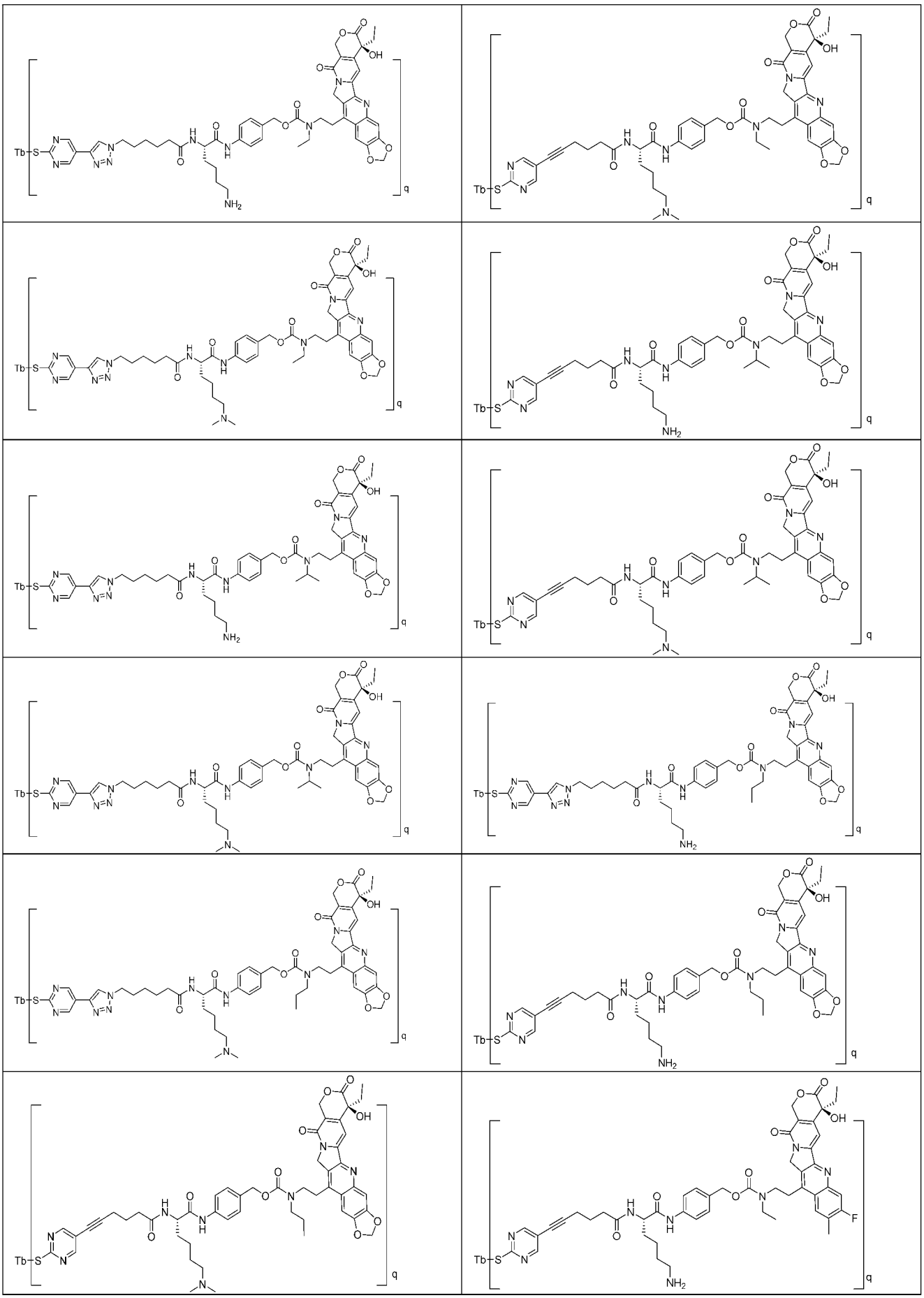


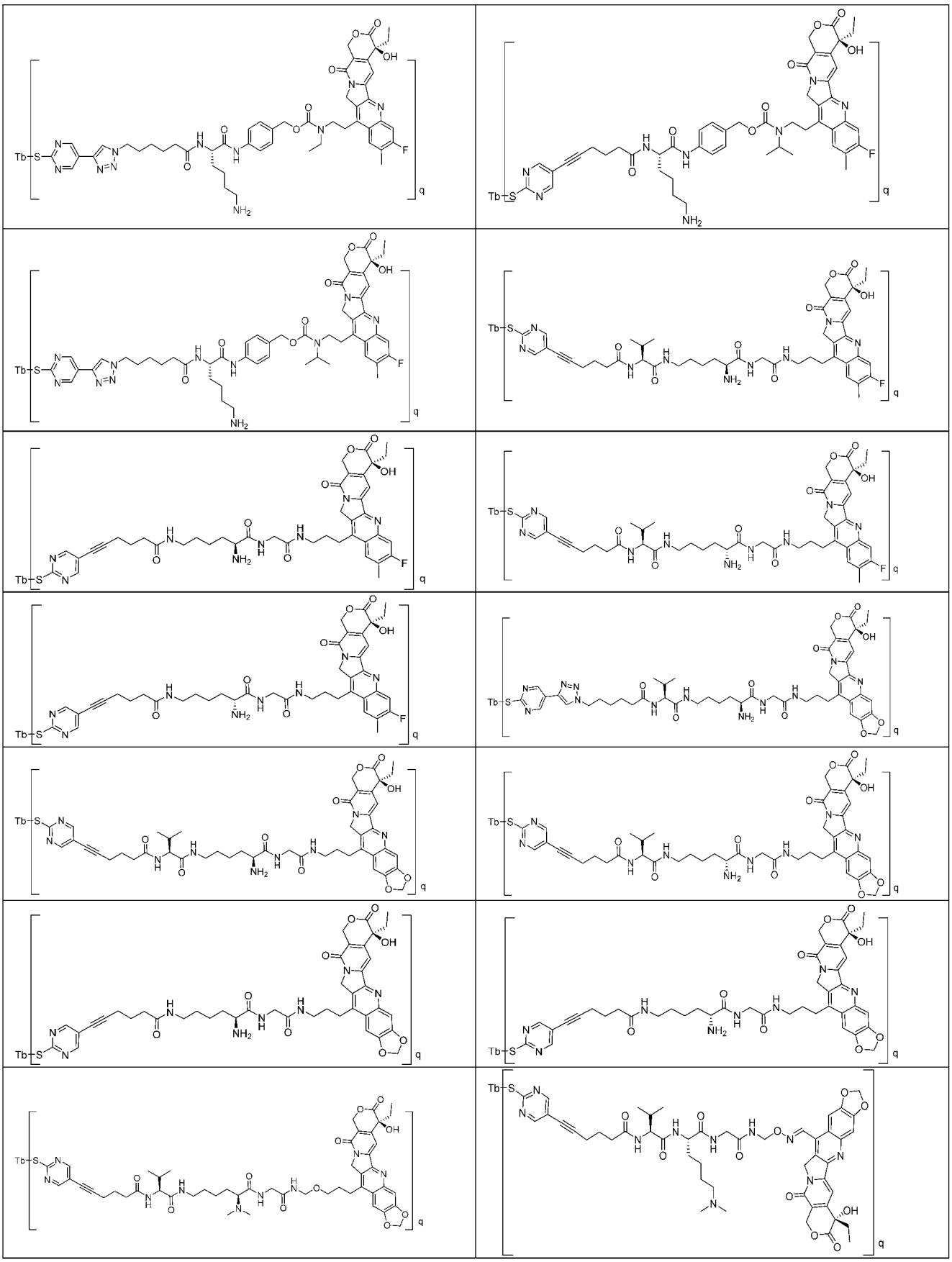


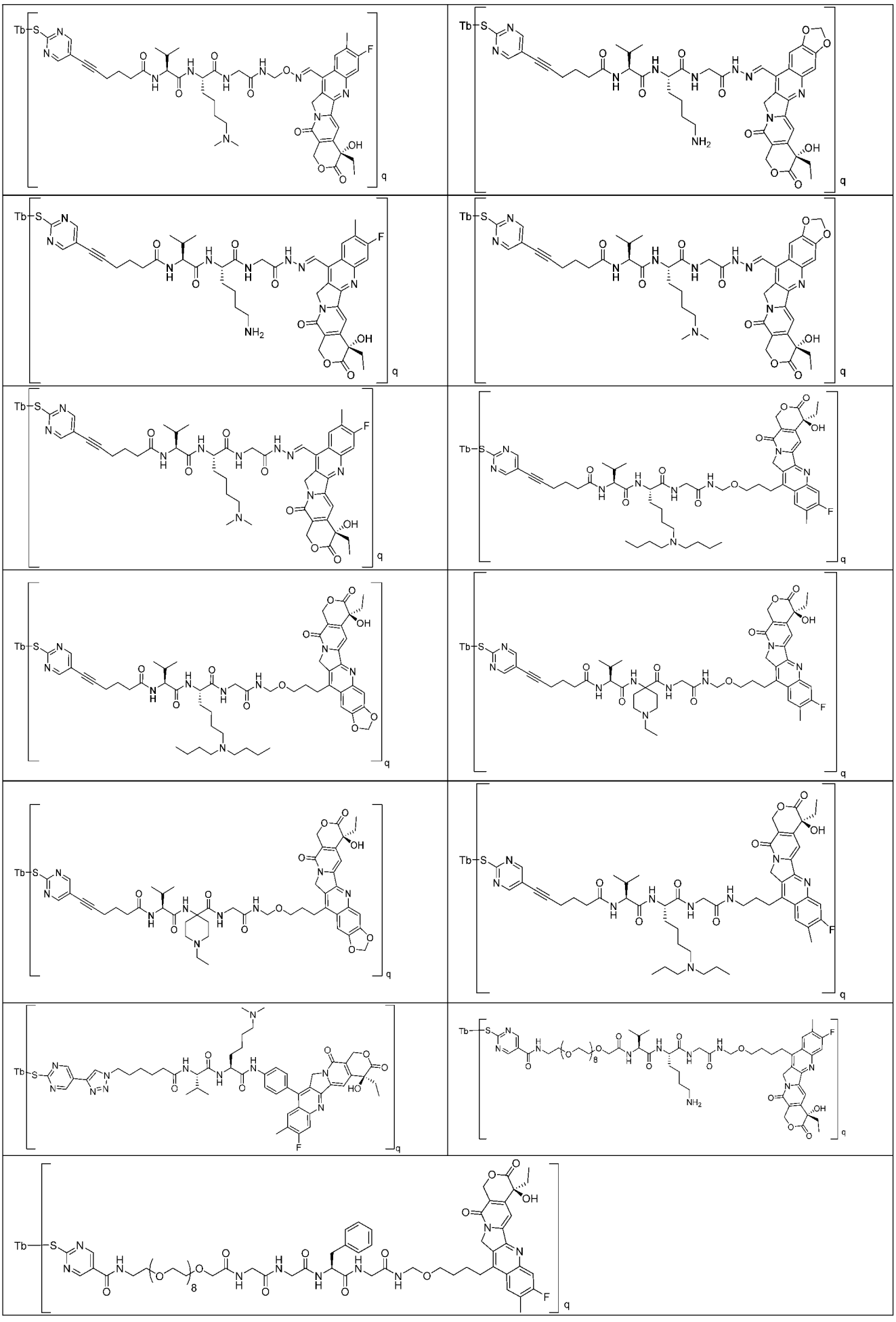
111 年 04 月 15 日修正替換

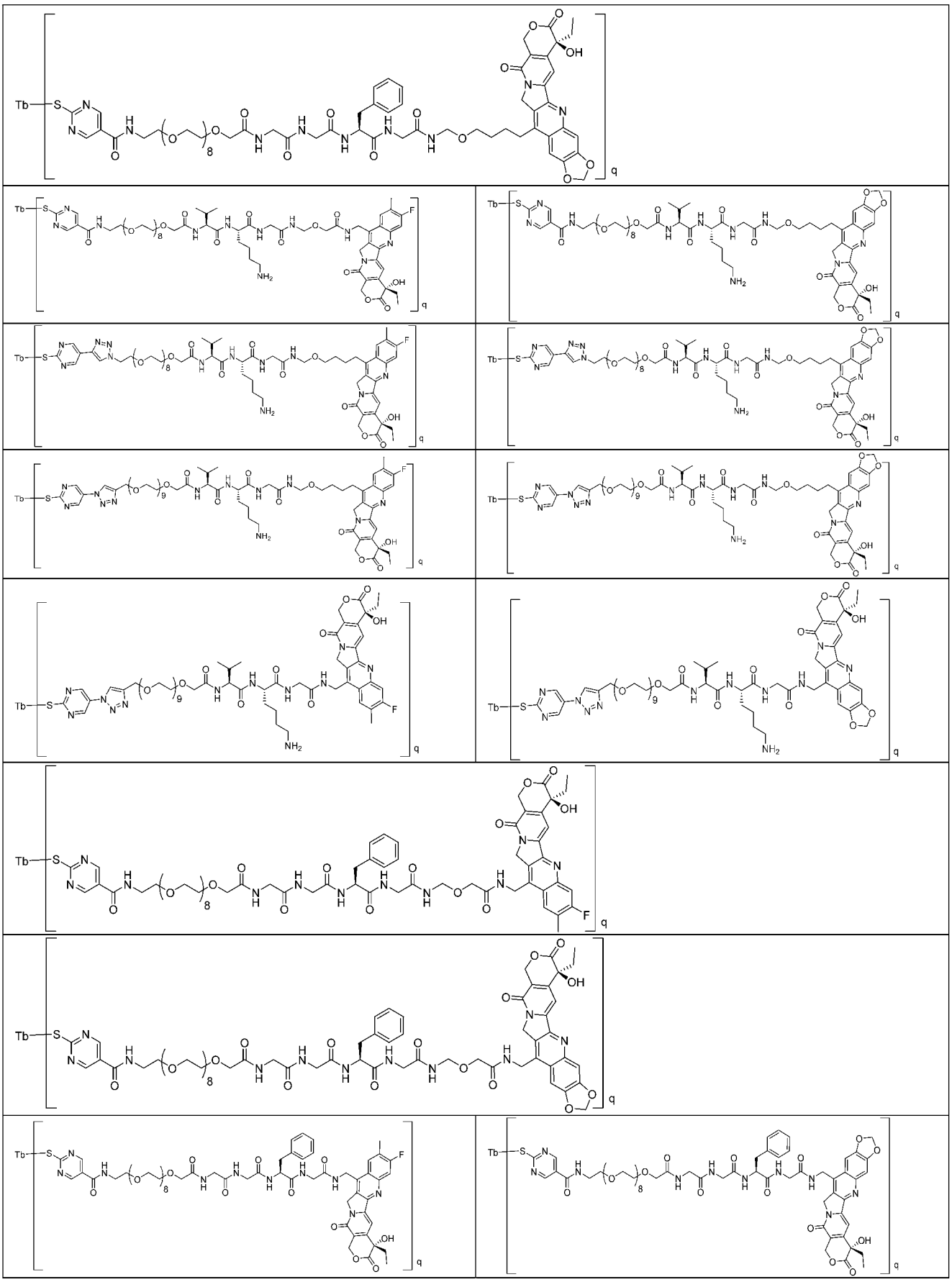


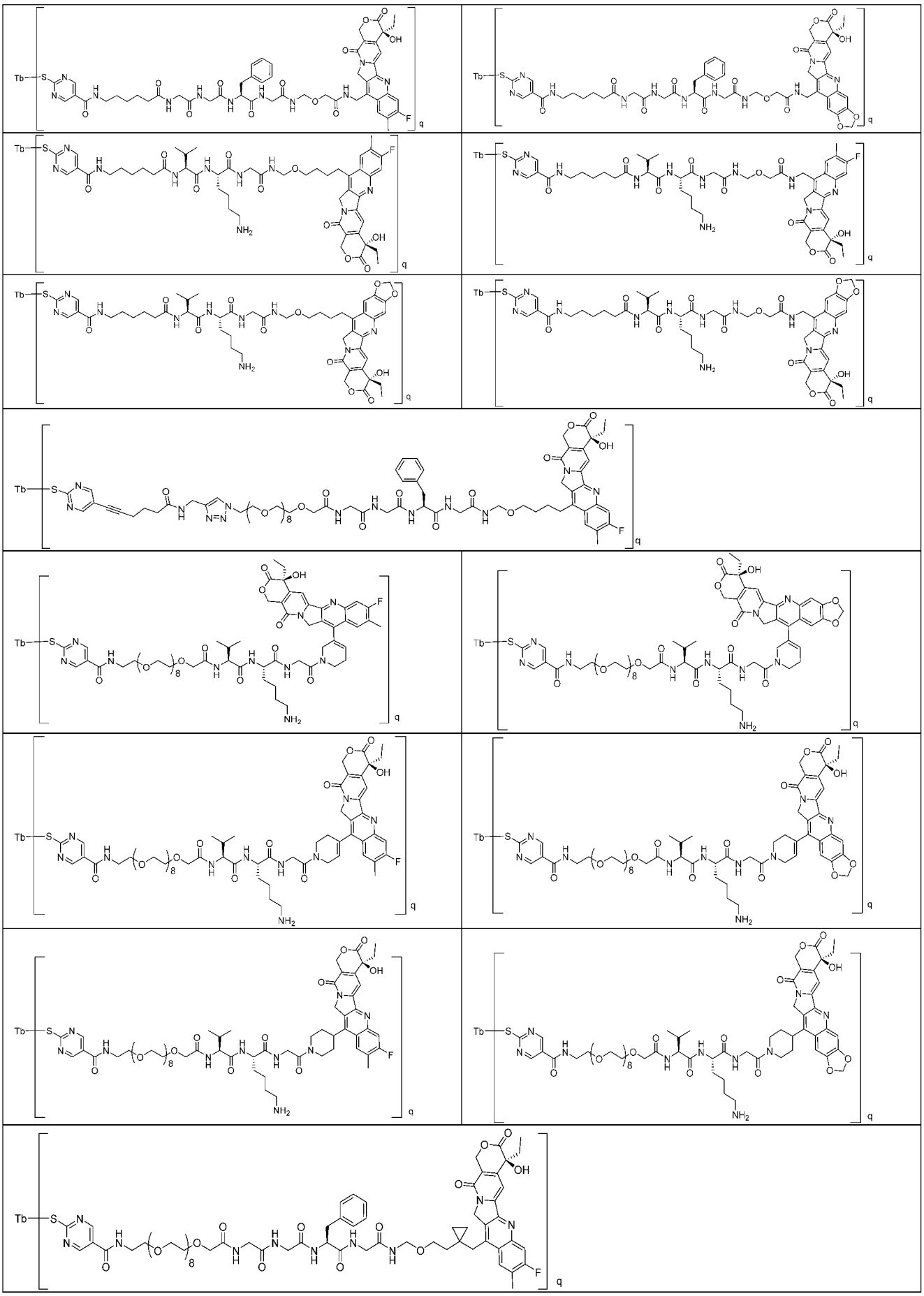
111 年 04 月 15 日修正替換

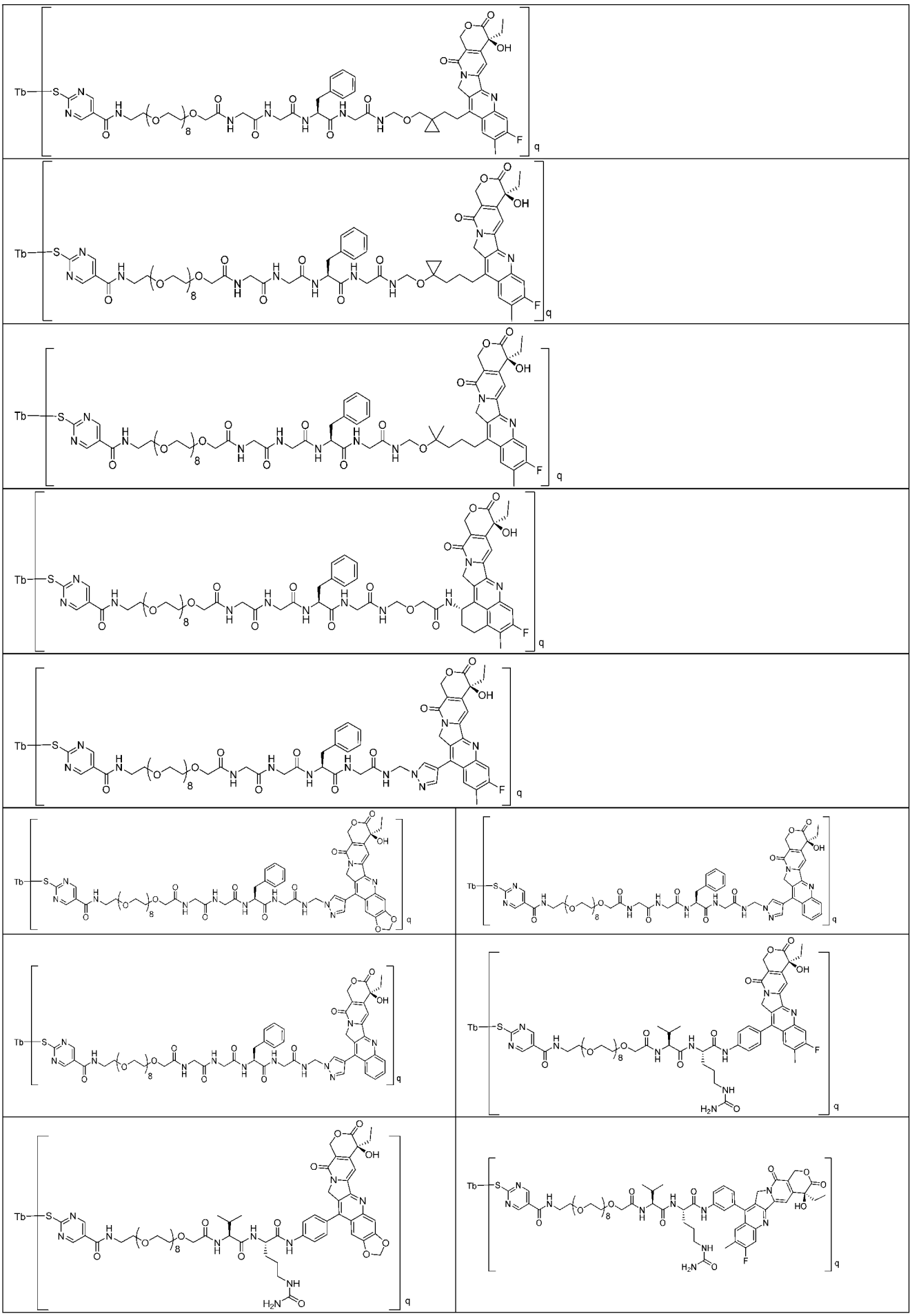


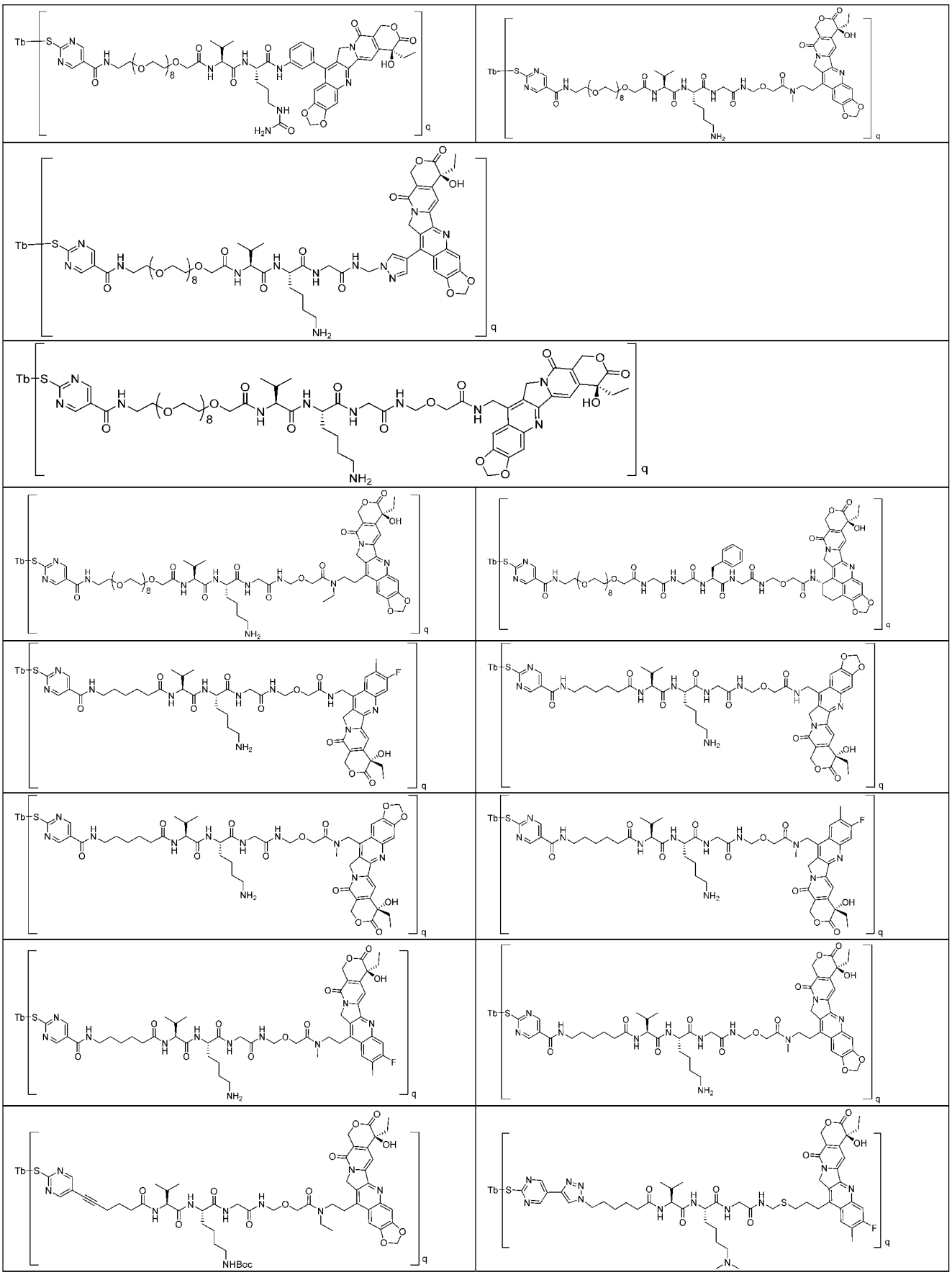


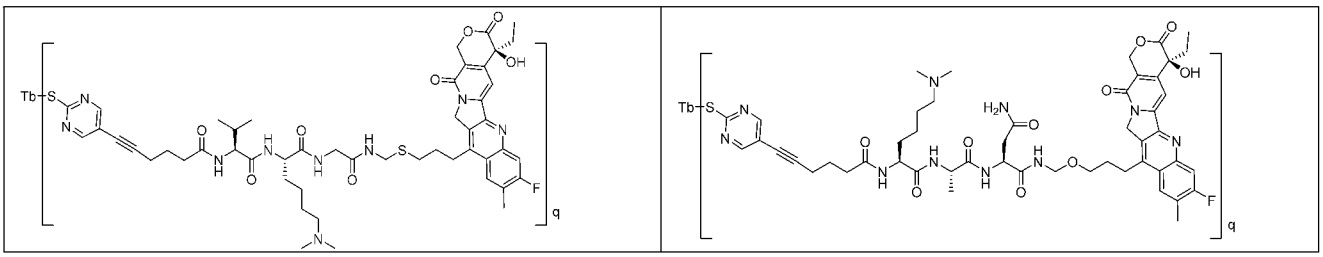












。

【0218】所述Tb的抗體或其抗原結合的片段可以本領域已知的各種方法來製備，例如通過基因工程重組技術來獲得。例如，通過化學合成或PCR擴增獲得編碼本公開抗體的重鏈和輕鏈基因的DNA分子。將所得DNA分子插入表達載體內，然後轉染宿主細胞。然後，在特定條件下培養轉染後的宿主細胞，並表達本公開的抗體。

【0219】在本公開的部分實施方案中，靶向部分為抗B7H3抗體或其抗原結合的片段。在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體包括所有現有技術中的抗B7H3抗體，例如enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab，以及參見CN112521512，WO2021027674，WO2021021543，WO2021006619，CN111662384，CN111454357，WO2020151384，WO2020140094，WO2020103100，WO2020102779，WO2020063673，WO2020047257，WO2020041626，CN110684790，CN110642948，WO2019225787，WO2019226017，US20190338030，CN110305213，WO2018209346，WO2018177393，US9150656，WO2016106004，WO2016044383，WO2016033225，WO2015181267，US20120294796，WO2011109400，CN101104639，WO2004093894，WO2002010187，WO2001018021中的抗B7H3抗體。在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段選自：CN103687945B中編號M30-H1-L4抗體和CN109069633A中編號mAb-C-

DUBA的抗體。

【0220】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR）的抗體或其抗原結合片段，其中CDR按IMGT編號系統定義：

(a)序列為SEQ ID NO:10的HCDR1，序列為SEQ ID NO:11的HCDR2，序列為SEQ ID NO:12的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:20的LCDR1，序列為GTF的LCDR2，序列為SEQ ID NO:22的LCDR3；

(b)序列為SEQ ID NO:10的HCDR1，序列為SEQ ID NO:11的HCDR2，序列為SEQ ID NO:12的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:40的LCDR1，序列為GAS的LCDR2，序列為SEQ ID NO:42的LCDR3；

(c)序列為SEQ ID NO:30的HCDR1，序列為SEQ ID NO:31的HCDR2，序列為SEQ ID NO:32的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:40的LCDR1，序列為GAS的LCDR2，序列為SEQ ID NO:42的LCDR3；

或

(d)序列為SEQ ID NO:30的HCDR1，序列為SEQ ID NO:31的HCDR2，序列為SEQ ID NO:32的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:20的LCDR1，序列為GTF的LCDR2，序列為SEQ ID NO:22的LCDR3。

【0221】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段，按

IMGT編號系統定義，包含：

含有（a）中重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有（a）輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL；

含有（b）中重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有（b）輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL；

含有（c）中重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有（c）輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL；或

含有（d）中重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有（d）輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL。

【0222】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR），其中CDR按Chothia編號系統定義：

(a)序列為SEQ ID NO:4的HCDR1，序列為SEQ ID NO:5的HCDR2，序列為SEQ ID NO:6的HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 的 LCDR3；

(b)序列為 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

(c)序列為 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列

為 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

或

(d)序列為 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 的 LCDR3。

【0223】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段，按Chothia編號系統定義，包含：

含有（a）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（a）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（b）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（b）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（c）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（c）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；或

含有（d）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（d）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

【0224】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR），其中CDR按kabat編號系統定義：

(a)序列為 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

(b)序列為 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c)序列為 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或

(d)序列為 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列為 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 的 LCDR3。

【0225】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段，按kabat編號系統定義，包含：

含有（a）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（a）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（b）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（b）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（c）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（c）輕鏈 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；或

含有（d）中重鏈 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（d）輕鏈

LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

【0226】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈可變區（VH），其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列；

(ii) 與 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 輕鏈可變區（VL），其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列；

(v)與 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0227】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ

ID NO:3所示的VH，和/或，SEQ ID NO:13所示的VL。

【0228】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH，和/或，SEQ ID NO:33所示的VL。

【0229】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH，和/或，SEQ ID NO:33所示的VL。

【0230】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH，和/或，SEQ ID NO:13所示的VL。

【0231】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(e) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)至(f)任一組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0232】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體的重鏈包含人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。在某些實施方案中，所述抗B7H3抗體輕鏈包含人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。

【0233】在一些實施方案中，恆定區被改變，例如被突變，以修飾抗B7H3抗體分子的性質（例如改變下列中的一個或多個特性：Fc受體結合、抗體醣基化、半胱胺酸殘基的數目、效應細胞功能或補體功能）。可以通過將抗體恆定區中的至少一個胺基酸殘基替換為不同殘基，產生功能改變，例如，改變抗體對效應子配體（如FcR或補體C1q）的親和力，從而改變效應子功能（例如降低）。抗體的Fc區介導幾種重要的效應子功能，例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

【0234】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段具有重鏈恆定區（CH），其選自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重鏈恆定區；特別地選自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重鏈恆定區，更特別地選自IgG1（例如是人IgG1）的重鏈恆定區。在一

些實施方案中，人IgG1重鏈恆定區如SEQ ID NO:43所示。在一些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段具有輕鏈恆定區，其選自例如κ或λ輕鏈恆定區，優選κ輕鏈恆定區（例如人κ輕鏈恆定區）。在一些實施方案中，輕鏈恆定區具有如SEQ ID NO:44所示的序列。

【0235】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:43所示的CH或其變體，所述變體與SEQ ID NO:43相比具有至多20個胺基酸的保守置換（例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換），或者與SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

【0236】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含輕鏈恆定區或其變體。在一些實施方案中，所述輕鏈恆定區包含κ輕鏈恆定區。在一些實施方案中，所述輕鏈恆定區包含SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與SEQ ID NO:44相比具有至多20個胺基酸的保守置換（例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換），或者與SEQ ID NO:44相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

【0237】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含SEQ

ID NO:43所示的重鏈恆定區（CH）和SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）。

【0238】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii)與(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 輕鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:13 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）

的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0239】在一些實施方案中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0240】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii)與(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 輕鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:33 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30

個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0241】在一些實施方案中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0242】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:45 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:46 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0243】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:47 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至

少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:48 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0244】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段是嵌合抗體，人源化抗體或全人源抗體。

【0245】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段選自scFv、Fab、Fab’、(Fab’)2、Fv片段、二硫鍵連接的Fv(dsFv)、雙抗體(diabody)。

【0246】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段是scFv。

在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(e) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0247】在一些實施方案中，本公開的抗體是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(i) SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)中所述的置換是保守置換。

【0248】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含SEQ ID NO:1或2所示的序列。

【0249】在一些實施方案中，所述抗B7H3抗體或其抗原結合片段選自：1D1抗體、1D1-01抗體、2E3抗體和2E3-02抗體。

【0250】在本公開的部分實施方案中，靶向部分為曲妥珠單抗或帕妥珠單抗（Pertuzumab）。曲妥珠單抗是抗Her2的單克隆抗體，其胺基酸序列是本發明所屬技術領域具有通常知識者已知的，其示意性序列可參見，例如CN103319599，末位Lys是容易缺失的但不影響生物活性，參見Dick, L. W. 等人，Biotechnol. Bioeng.，100: 1132-1143。

【0251】曲妥珠單抗的示例性的重鏈序列和輕鏈序列可參見例如IMGT /mAb-DB ID 97 。帕妥珠單抗的示例性的重鏈序列和輕鏈序列可參見US7560111的SEQ ID No. 16和SEQ ID No. 15，也可參見IMGT /mAb-DB ID 80。

【0252】在本公開的部分實施方案中，靶向部分為抗Her3抗體或其抗原結合的片段。在一些實施方案中，所述抗Her3抗體包括所有現有技術中的抗Her3抗體，例如，參見抗體barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，istiratumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，zenocutuzumab，202-2-1抗體、抗體CN 103189392 B中重鏈SEQ ID NO:10和輕鏈SEQ ID

NO:14所示的抗體和IMGT/mAb-DB NO:546所示的抗體。

【0253】在一些實施方案中，靶向部分為抗Her3抗體，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR）的抗體或其抗原結合片段，其中CDR按IMGT編號系統定義：

序列為SEQ ID NO:56的HCDR1，序列為SEQ ID NO:57的HCDR2，序列為SEQ ID NO:58的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:41的LCDR1，序列為AAS的LCDR2，序列為SEQ ID NO:21的LCDR3。

【0254】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段，按IMGT編號系統定義，包含：上述含有上述重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有上述輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL。

【0255】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR）的抗體或其抗原結合片段，其中CDR按kabat編號系統定義：

序列為SEQ ID NO:53的HCDR1，序列為SEQ ID NO:54的HCDR2，序列為SEQ ID NO:55的HCDR3；和/或，

序列為SEQ ID NO:59的LCDR1，序列為SEQ ID NO:60的LCDR2，序列為SEQ ID NO:21的LCDR3。

【0256】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段，按kabat編號系統定義，包含：上述含有上述重鏈HCDR1，HCDR2，HCDR3的VH和含有上述輕鏈LCDR1，LCDR2，LCDR3的VL。

【0257】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈可變區（VH），其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) SEQ ID NO:49 所示的序列；

(ii) 與 SEQ ID NO:49 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與 SEQ ID NO:49 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 輕鏈可變區（VL），其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:50 所示的序列；

(v) 與 SEQ ID NO:50 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與 SEQ ID NO:50 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0258】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含：

(a) SEQ ID NO:49 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:50 所示序列的 VL；

(b) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）

和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(c) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0259】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體的重鏈包含人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。在某些實施方案中，所述抗B7H3抗體輕鏈包含人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。

【0260】在一些實施方案中，恆定區被改變，例如被突變，以修飾抗Her3抗體分子的性質（例如改變下列中的一個或多個特性：Fc受體結合、抗體

醣基化、半胱胺酸殘基的數目、效應細胞功能或補體功能）。可以通過將抗體恆定區中的至少一個胺基酸殘基替換為不同殘基，產生功能改變，例如，改變抗體對效應子配體（如FcR或補體C1q）的親和力，從而改變效應子功能（例如降低）。抗體的Fc區介導幾種重要的效應子功能，例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

【0261】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段具有重鏈恆定區（CH），其選自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重鏈恆定區；特別地選自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重鏈恆定區，更特別地選自IgG1（例如是人IgG1）的重鏈恆定區。在一些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段具有輕鏈恆定區，其選自例如κ或λ輕鏈恆定區，優選κ輕鏈恆定區（例如人κ輕鏈恆定區）。

【0262】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:43所示的重鏈恆定區（CH）和SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）。

【0263】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:51 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6

個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:52 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0264】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段是嵌合抗體，人源化抗體或全人源抗體。

【0265】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段選自scFv、Fab、Fab’、(Fab’)2、Fv片段、二硫鍵連接的Fv(dsFv)、雙抗體(diabody)。

【0266】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(a) SEQ ID NO:49 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:50 所示序列的 VL；

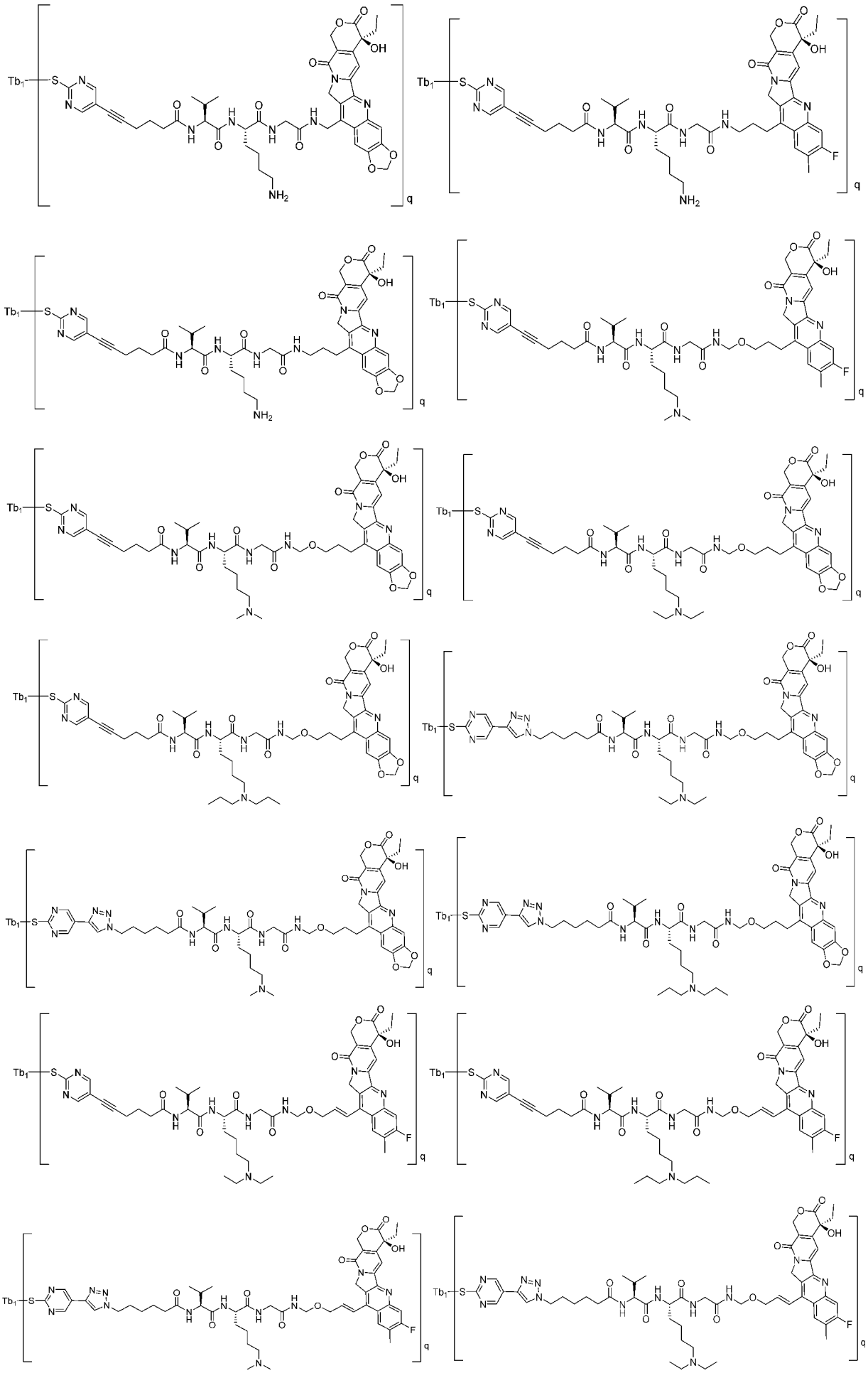
(b) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

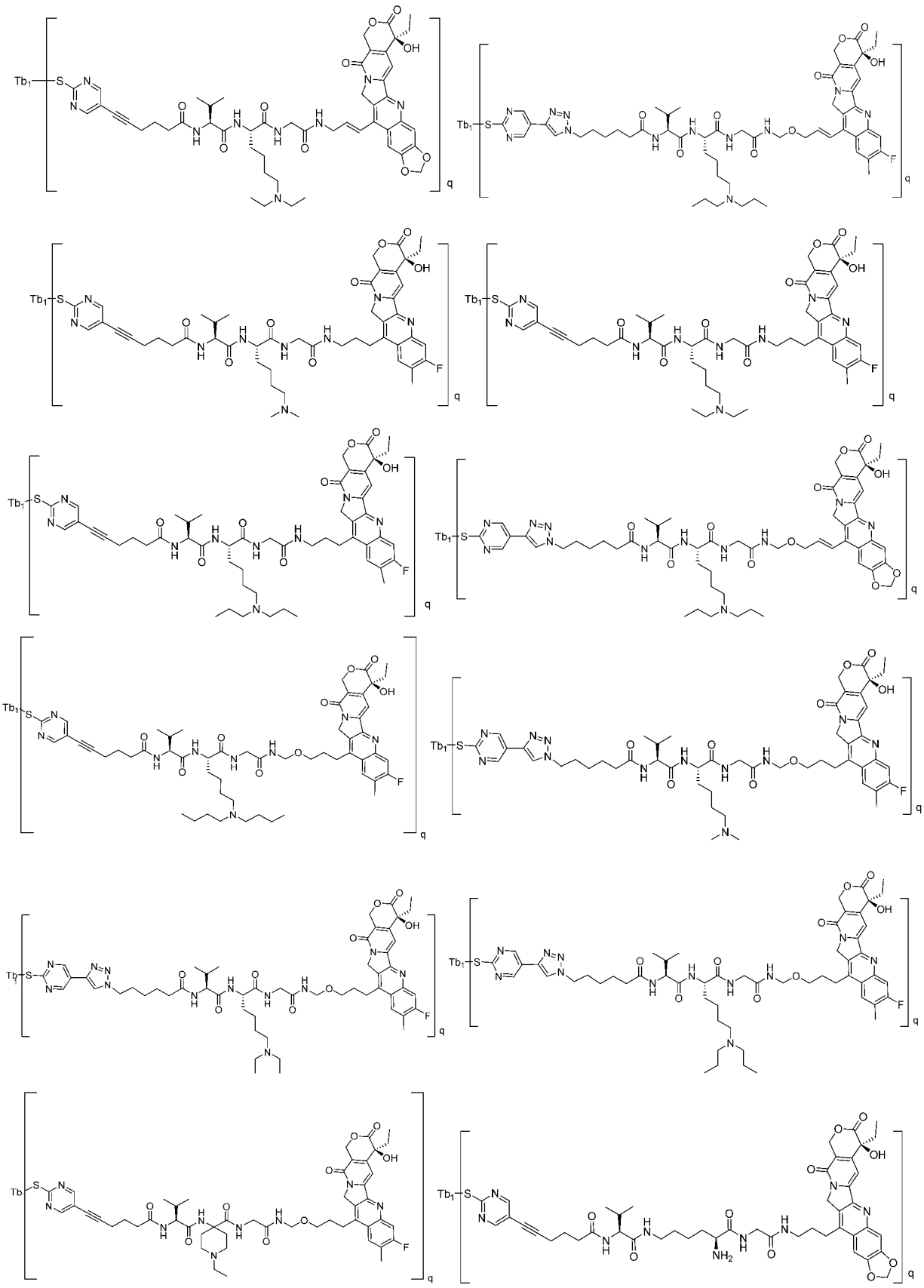
(c) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0267】在一些實施方案中，所述抗Her3抗體或其抗原結合片段選自：202-2-1抗體。

【0268】在本公開的部分實施方案中，靶向部分為西妥昔單抗（Cetuximab）。西妥昔單抗是抗EGFR的單克隆抗體，其胺基酸序列是本發明所屬技術領域具有通常知識者已知的，其示意性序列可參見，IMGT/mAb-DB ID 151所示的抗體。

【0269】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：

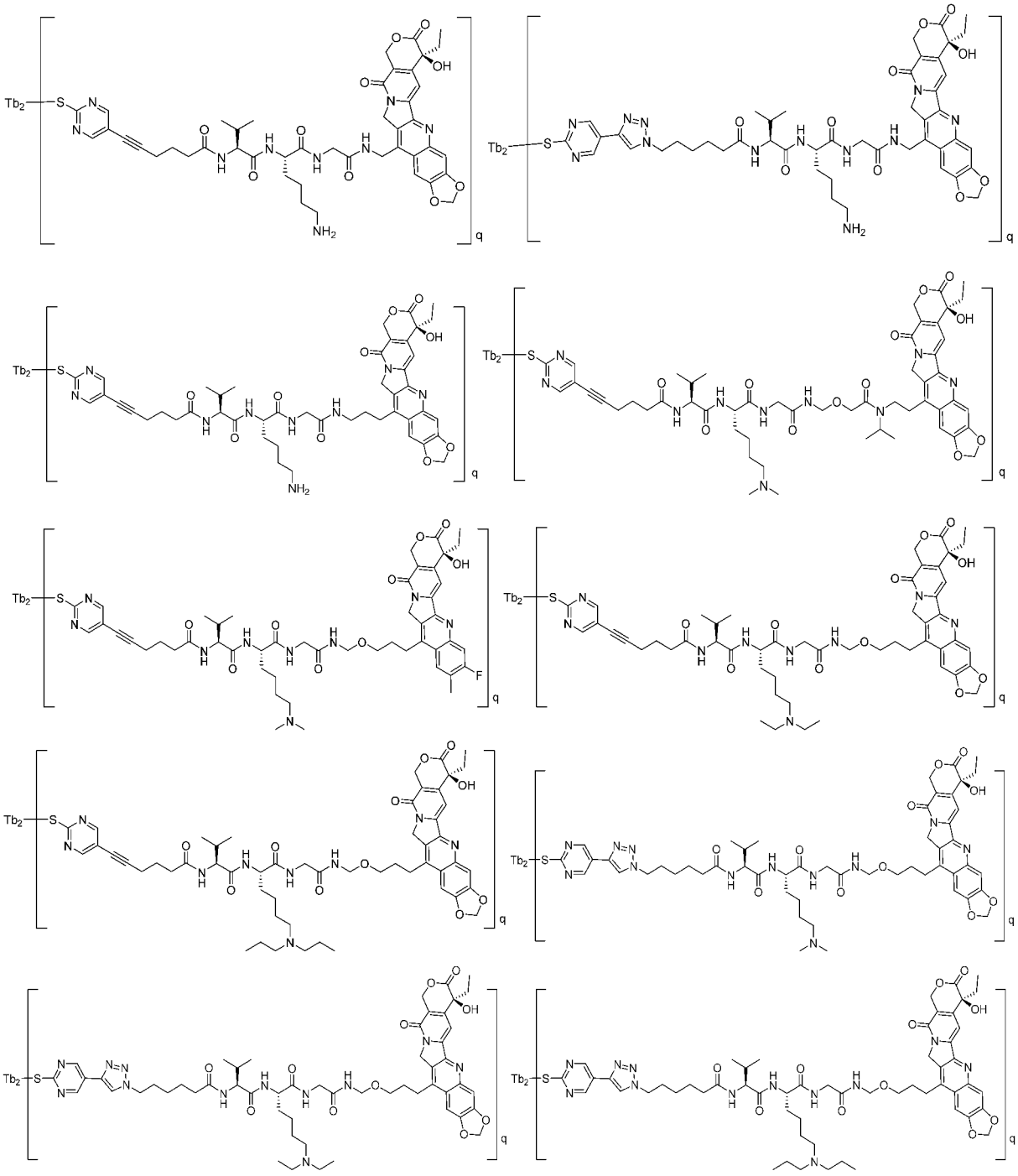




其中，Tb_1 為抗 B7H3 抗體或其抗原結合片段，例如 enoblituzumab，mirzotamab， omburtamab，1D1-01，2E3-02 抗體，優選 1D1-01 或 2E3-02

抗體；q 選自 0.1-16.0 之間的任意數值，優選 2-8 之間的任意數值。在一些實施方案中，q 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些優選地實施方案中，q 為 2、4、6 或 8。

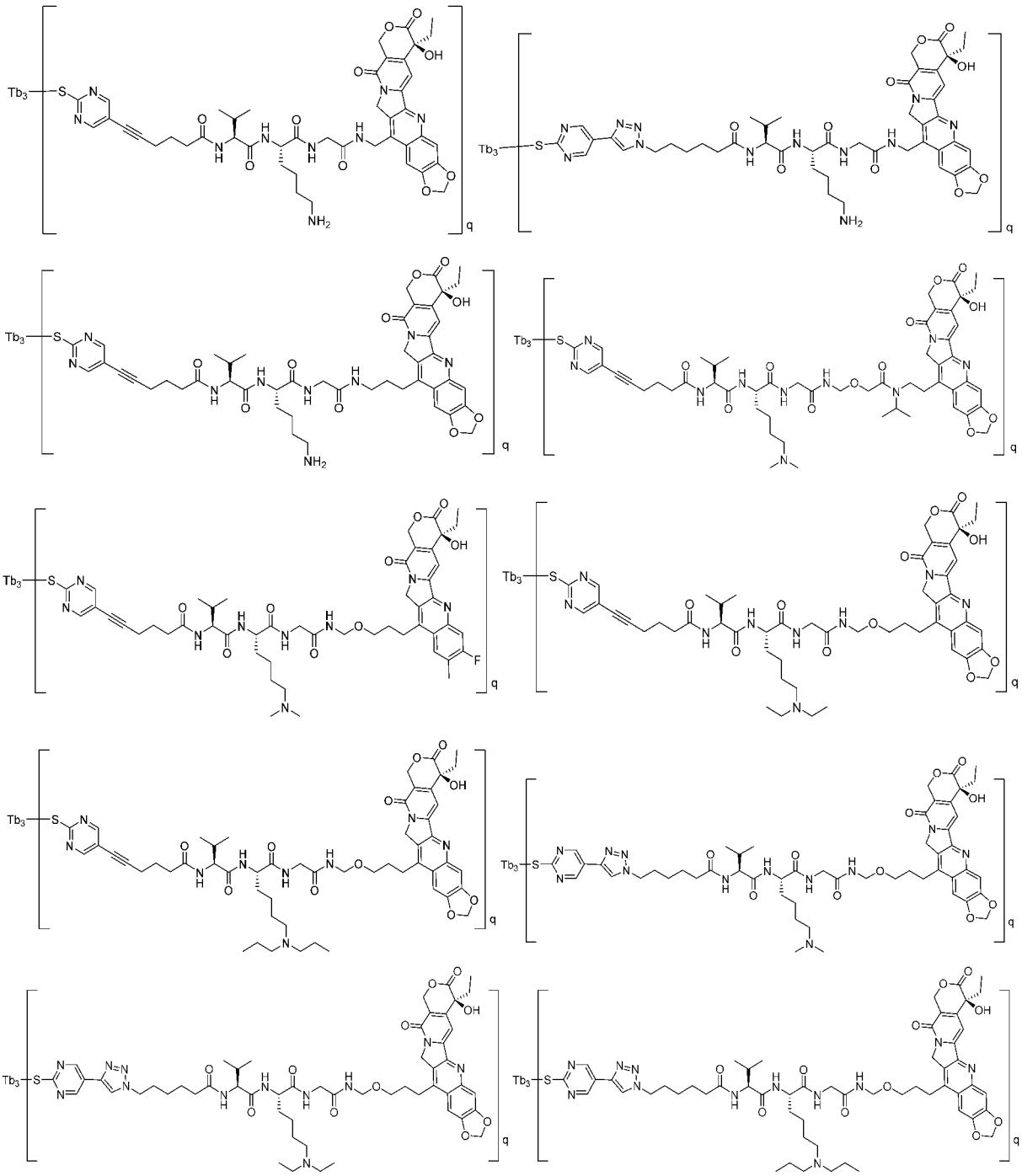
【0270】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_2 為抗 Trop-2 抗體或其抗原結合片段，例如 datopotamab，sacituzumab，優選 sacituzumab；q 選自 0.1-16.0 之間的任意數值，優選 2-8

之間的任意數值。在一些實施方案中，q 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些優選地實施方案中，q 為 2、4、6 或 8。

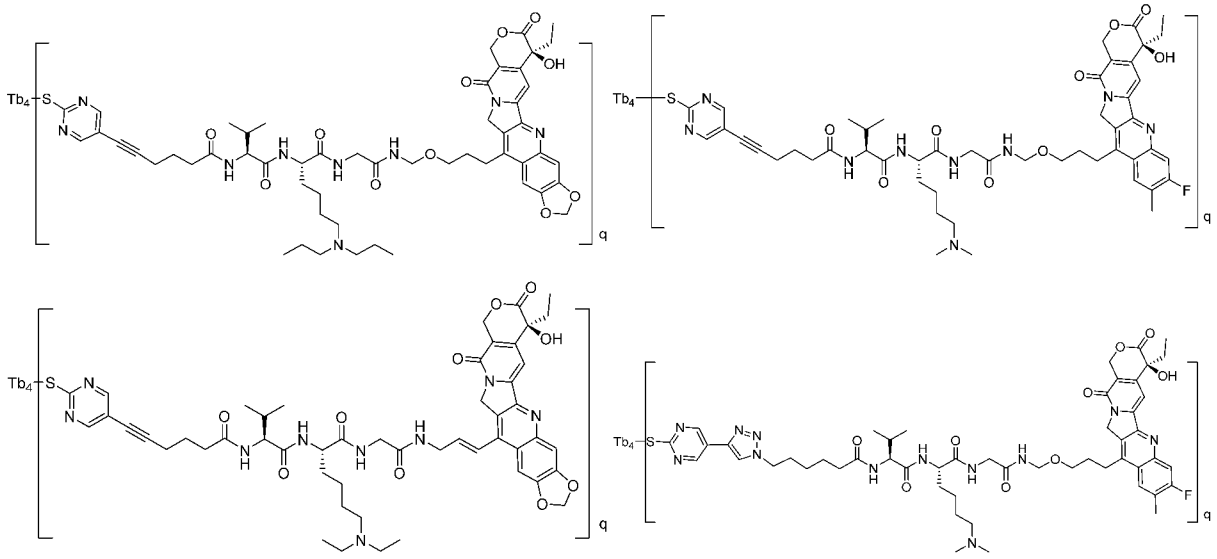
【0271】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_3 為抗 Her2 抗體或其抗原結合片段，例如 anbenitamab，coprelotamab，disitamab，gancotamab，margetuximab，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab，Pertuzumab，優選

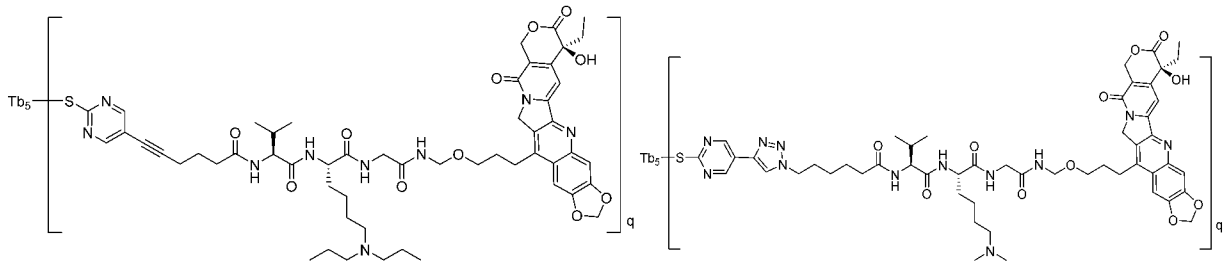
Trastuzumab 或 Pertuzumab；q 選自 0.1-16.0 之間的任意數值，優選 2-8 之間的任意數值。在一些實施方案中，q 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些優選地實施方案中，q 為 2、4、6 或 8。

【0272】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



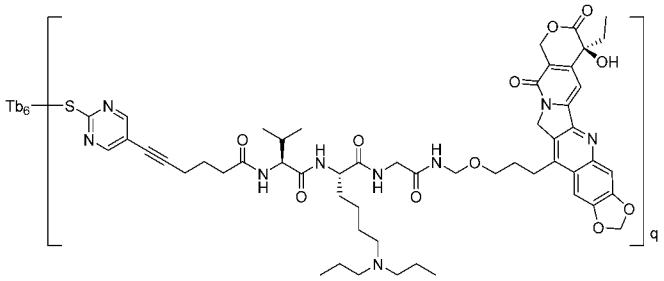
其中，Tb_4 為抗 Her3 抗體或其抗原結合片段，例如，抗體 barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，istiratumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，zenocutuzumab, 202-2-1 抗體，CN 103189392 B 中重鏈 SEQ：10 和輕鏈 SEQ：14 所示的抗體，IMGT/mAb-DB ID：564 所示的抗體，202-2-1 抗體；優選 202-2-1 抗體；q 選自 0.1-16.0 之間的任意數值，優選 2-8 之間的任意數值。在一些實施方案中，q 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些優選地實施方案中，q 為 2、4、6 或 8。

【0273】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



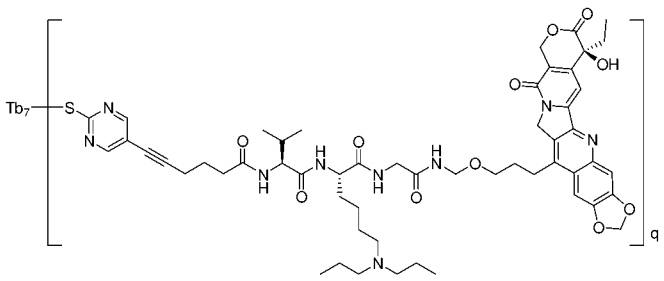
其中，Tb_5為抗EGFR抗體或其抗原結合片段，例如demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab；優選Cetuximab；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值。在一些實施方案中，q為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些優選地實施方案中，q為2、4、6或8。

【0274】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_6為無腫瘤細胞內吞活性的抗體或者結合非內吞（例如ALCAM/CD166）抗原活性的抗體，例如：人體內沒有相應細胞表面抗原的IgG同型抗體，抗CD166的抗體，優選地，為抗雞溶菌酶人IgG1同型抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值。在一些實施方案中，q為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些優選地實施方案中，q為2、4、6或8。

【0275】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_7為腫瘤細胞內吞活性較弱或無，但有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值。在一些實施方案中，q為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些優選地實施方案中，q為2、4、6或8。

【0276】在一些實施方案中，所述抗體具有結合B7H3抗原但不具有內吞活性的抗體。比如WO2021168379A1的INV721和I7-01。更具體的，Anti-B7H3的抗體具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:2的VH和SEQ ID NO:1的VL。

【0277】在一些實施方案中，所述抗體具有結合GD-2抗原但不具有內吞活性的抗體。比如WO2021168379A1的INV721和GD2-5。更具體的，Anti-GD-2的抗體具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:3的VL。

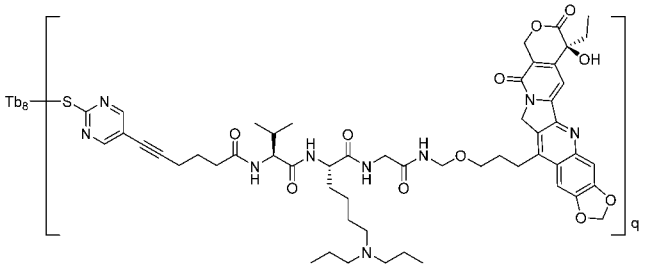
【0278】在一些實施方案中，所述抗體具有結合Her3抗原但不具有內吞活性的抗體，比如US10808032B2的SEQ ID NO: 22所示的ANTI-Her3的21F06抗體。

【0279】在一些實施方案中，所述抗體具有結合CD20抗原但不具有內吞活性的抗體。 儘管已顯示所謂的“II 型”CD20 特異性抗體很難被 CD20 陽性靶細胞內化，但已發現其他所謂的“I 型”CD20 特異性抗體某種程度上被內化並降解,這取決於與其相互作用的靶細胞上啟動和抑制 Fc γR 的表達水準。在一些實施方案中，所述抗體具有結合CD20抗原但不具有內吞活性的抗體為II 型”CD20 特異性抗體，例如obinutuzumab。

【0280】在一些實施方案中，所述抗體具有結合非內吞（例如

ALCAM/CD166）抗原活性的抗體。在一些實施方案中，所述抗體為包含EP3911682A1中SEQ ID No:73的VH和SEQ ID No:74的VL, SEQ ID No:75的VH和SEQ ID No:76的VL, SEQ ID No:77的VH和SEQ ID No:78的VL, 或，SEQ ID No:79的VH和SEQ ID No:88的VL所示的抗體。

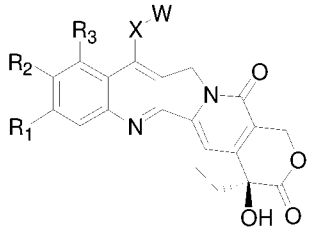
【0281】在一些實施方案中，所述配體藥物偶聯物選自：



其中，Tb_8為具有腫瘤細胞內吞活性的且有腫瘤細胞表面抗原結合活性的抗體，例如1D1-01，2E3-02抗體，sacituzumab，pertuzumab，Trastuzumab或Cetuximab抗體；q選自0.1-16.0之間的任意數值，優選2-8之間的任意數值。在一些實施方案中，q為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些優選地實施方案中，q為2、4、6或8。

【0282】另外，還需要說明的是，本發明所屬技術領域具通常知識者可以理解的是，L是與打開二硫鍵（例如，通過還原劑TCEP還原二硫鍵可以打開二硫鍵，生成巰基-SH）後Tb（如抗體）自身所含有巰基進行連接，也就是說，L與Tb之間的-S-並非另外再外接的硫原子。例如，其中，-S-並非另外外接的硫原子，而是打開雙硫鍵後的Tb自身所含有巰基與L進行連接後形成的-S-。

【0283】在本公開的第二方面，本公開提供了式II所示化合物：



式 II

或所述化合物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽、其藥學上可接受的溶劑合物或其配體藥物偶聯物，

其中：

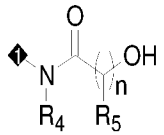
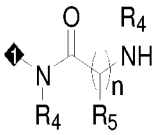
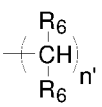
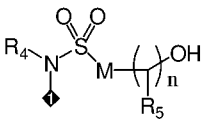
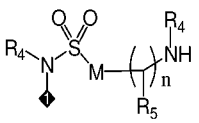
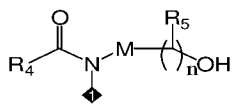
R_1、R_2 各自獨立地選自 H、鹵素、-OH、任選取代的 C1-6 烷基、任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

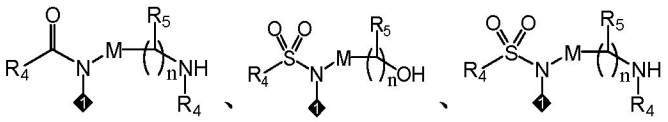
R_1 和 R_2 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

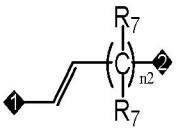
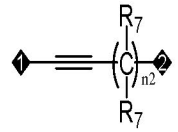
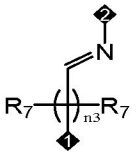
R_3 選自 H、鹵素、-OH、$-NH_2$、任選取代的 C1-6 烷基、任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3 和 X 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

R_3 和 R_2 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

W 不存在或存在，W 存在時，W 選自-OH、-SH、$-NHR_4$、  、  、  、  、  、  、


、
、
，1 位與 X 相連；

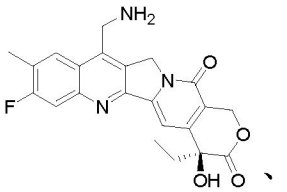
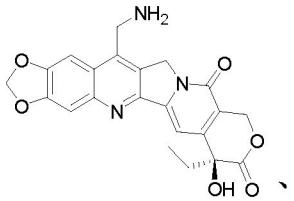
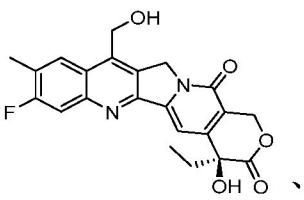
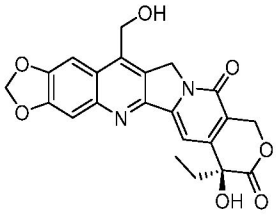
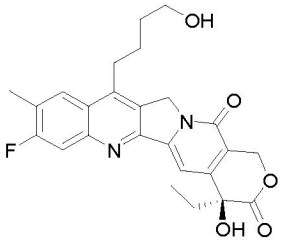
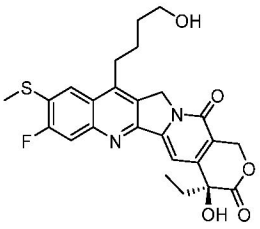
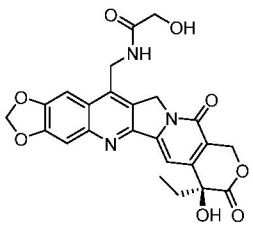
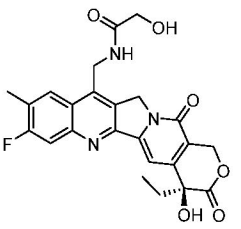
X 選自直接鍵，任選取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-N(R_4)-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、-$(CH_2)_{n1}$-、 
、 
、 
、C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 元雜芳基和 4-10 元雜環基，1 位和母環相連，2 位和 W 相連；所述取代基選自一個或多個 C1-4 烷基、C3-6 環烷基，或者多個 C1-4 烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成 C3-6 環烷基；

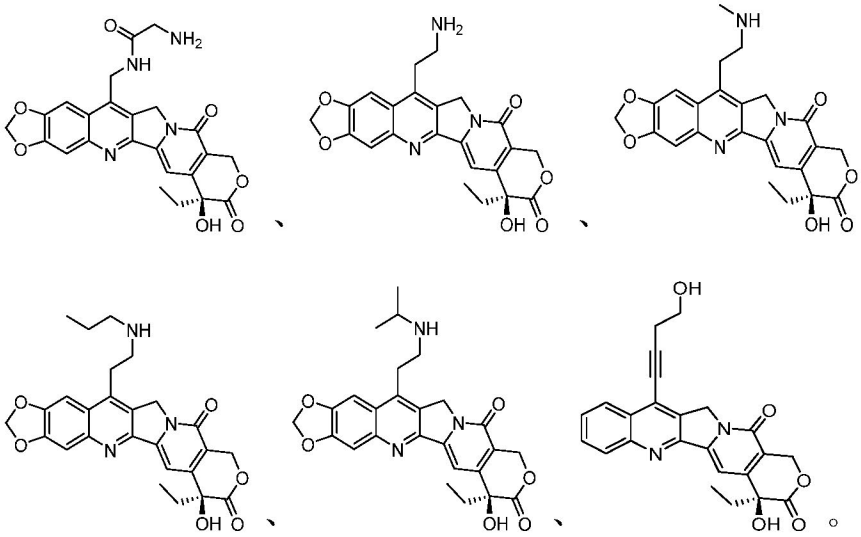
各 M 獨立地選自直接鍵、-$CR^{5a}R^{5b}$-；

R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R^7各自獨立地選自 H、任選取代的 C1-4 烷基、任選取代的 C1-4 烷氧基、任選取代的 C3-6 環烷基；

n、n’、n1、n2、n3 各自獨立地選自 0 到 6 之間的任意整數；

其中，當 R_1、R_2同時為 H，且 X 為-$(CH_2)_{n1}$-時，n1 為 1、2、3、4 時，W 不為-OH 或-NHR_4；且式 II 所示化合物不包含


、 
、 
、 
、 
、 
、 
、 
、



【0284】在一些實施方案中，R_1和R_2各自獨立地選自H、鹵素或C1-4烷基。

【0285】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-6元雜環，所述雜環含有1個、2個或3個O，S或N或其任意組合。

【0286】在一些實施方案中，R_1選自H和鹵素，R_2選自H和C1-4烷基。

【0287】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成 、 、 或 ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的位置。

【0288】在一些實施方案中，R_1為H或F，R_2為H或甲基。

【0289】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

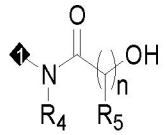
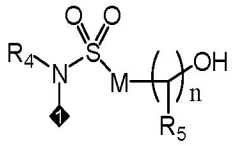
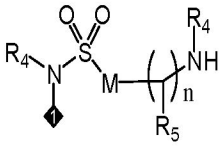
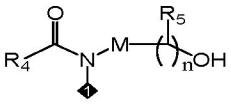
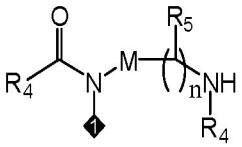
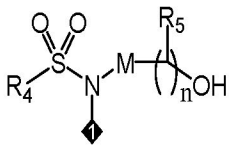
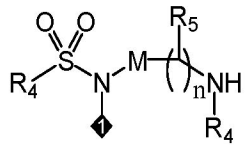
【0290】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基；或R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

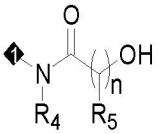
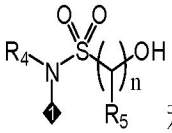
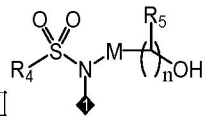
【0291】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基。

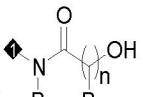
【0292】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

【0293】在一些實施方案中，R_3選自H和C1-4烷基。

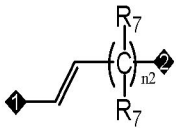
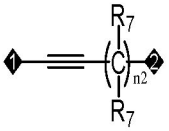
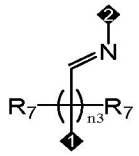
【0294】在一些實施方案中，R_3為H。

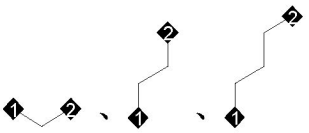
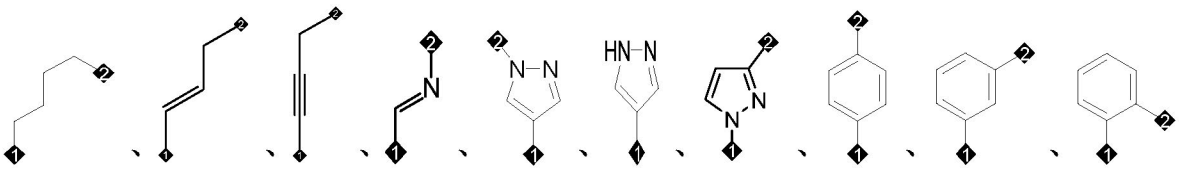
【0295】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-OH、-SH、-NHR_4、  、  、  、  、  、  、  ，1位與X相連。

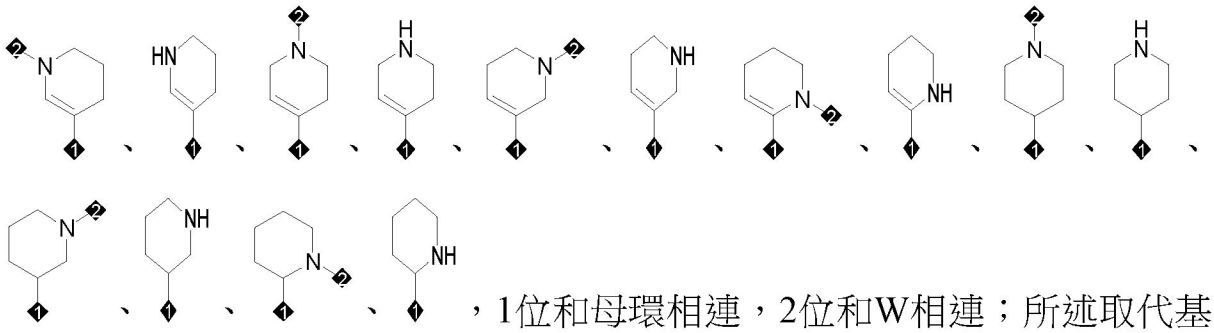
【0296】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-OH、-SH、-NHR_4、  、  和  ，1位與X相連。

【0297】在一些實施方案中，W選自-OH、-NHR_4和  ，1位與X相連。

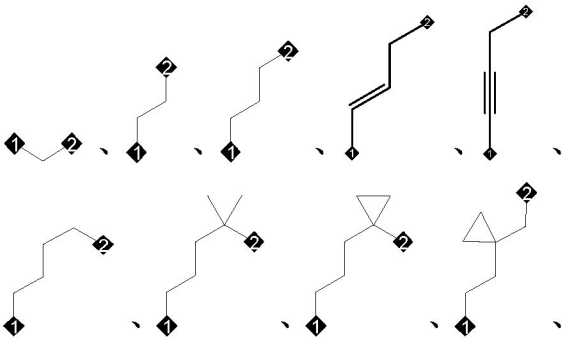
【0298】在一些實施方案中，W選自-OH和-NHR_4，1位與X相連。

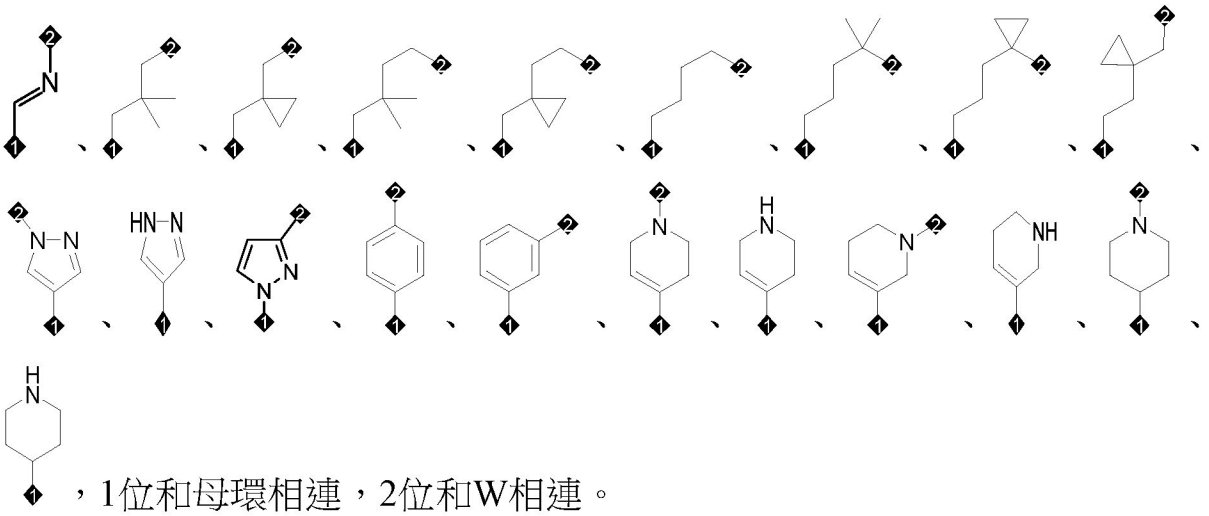
【0299】在一些實施方案中，X選自任選取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C6-10芳基、5-10元雜芳基和4-10元雜環基，1位和母環相連，2位和W相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基，或者2個C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基。

【0300】在一些實施方案中，X選自任選取代的  、  、

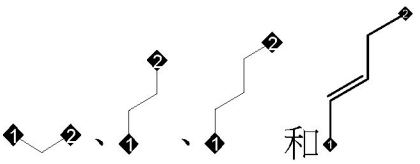


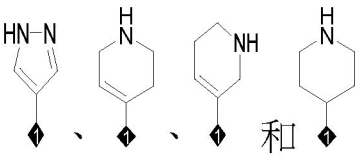
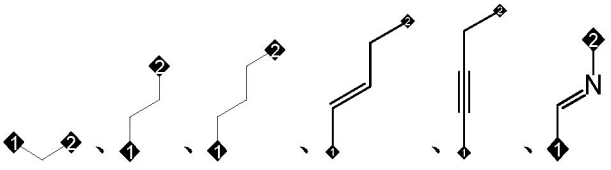
，1位和母環相連，2位和W相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基（如甲基），或者2個C1-4烷基（如甲基）和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基（如環丙基）。

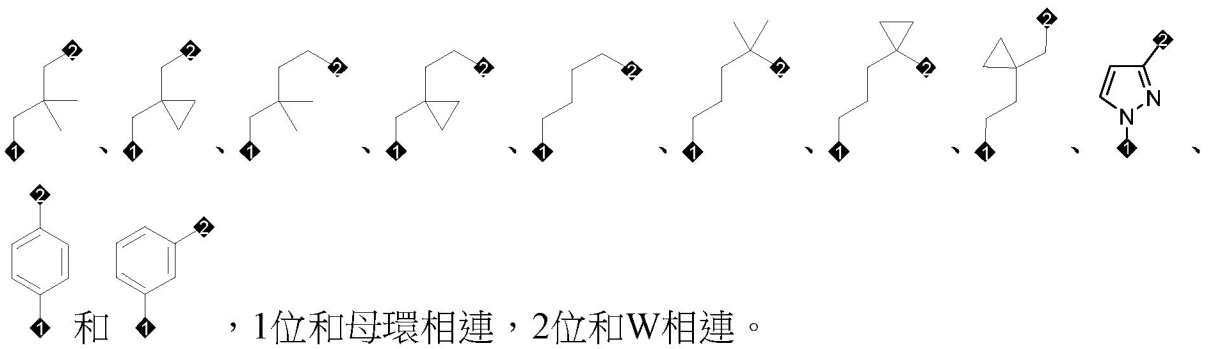
【0301】在一些實施方案中，X選自 



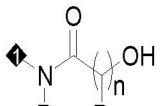
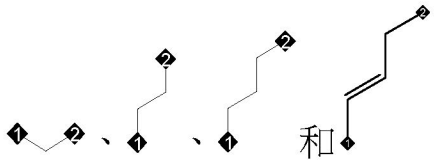
，1位和母環相連，2位和W相連。

【0302】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0303】在一些實施方案中，W不存在時，X選自  ，1位和母環相連；W存在時，X選自 



和 ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0304】在一些實施方案中，W選自-OH、-NHR$_4$和  ，1位X相連，2位與L$_4$或L$_3$相連；X選自  和 ，1位和母環相連，2位和W相連。在一些實施方案中，R$_4$和R$_5$各自獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基。

【0305】在一些實施方案中，各R$_4$獨立地選自H、C1-4烷基和C3-6環烷基，R$_5$為H。

【0306】在一些實施方案中，各R$_4$獨立地選自H、甲基、乙基、異丙基、正丙基、第三丁基和環丙基，R$_5$為H。

【0307】在一些實施方案中，R^{5a}和R^{5b}各自獨立地選自H和C1-4烷基；

【0308】在一些實施方案中，R^{5a}和R^{5b}各自獨立地選自H和甲基；

【0309】在一些實施方案中，各R^{7}獨立地選自H和C1-4烷基；

【0310】在一些實施方案中，R^{7}為H。

【0311】在一些實施方案中，n為1、2或3。

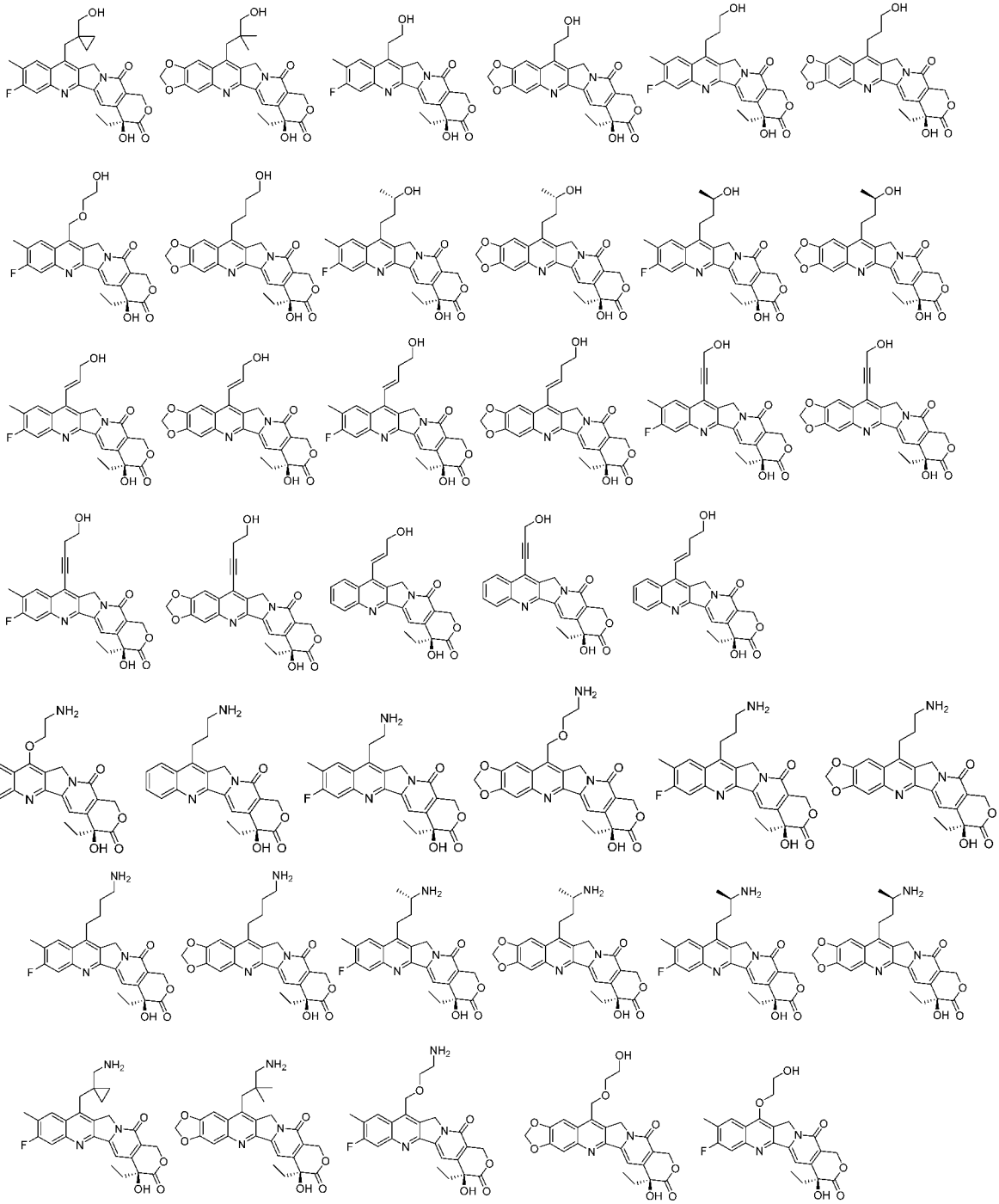
【0312】在一些實施方案中，n為1。

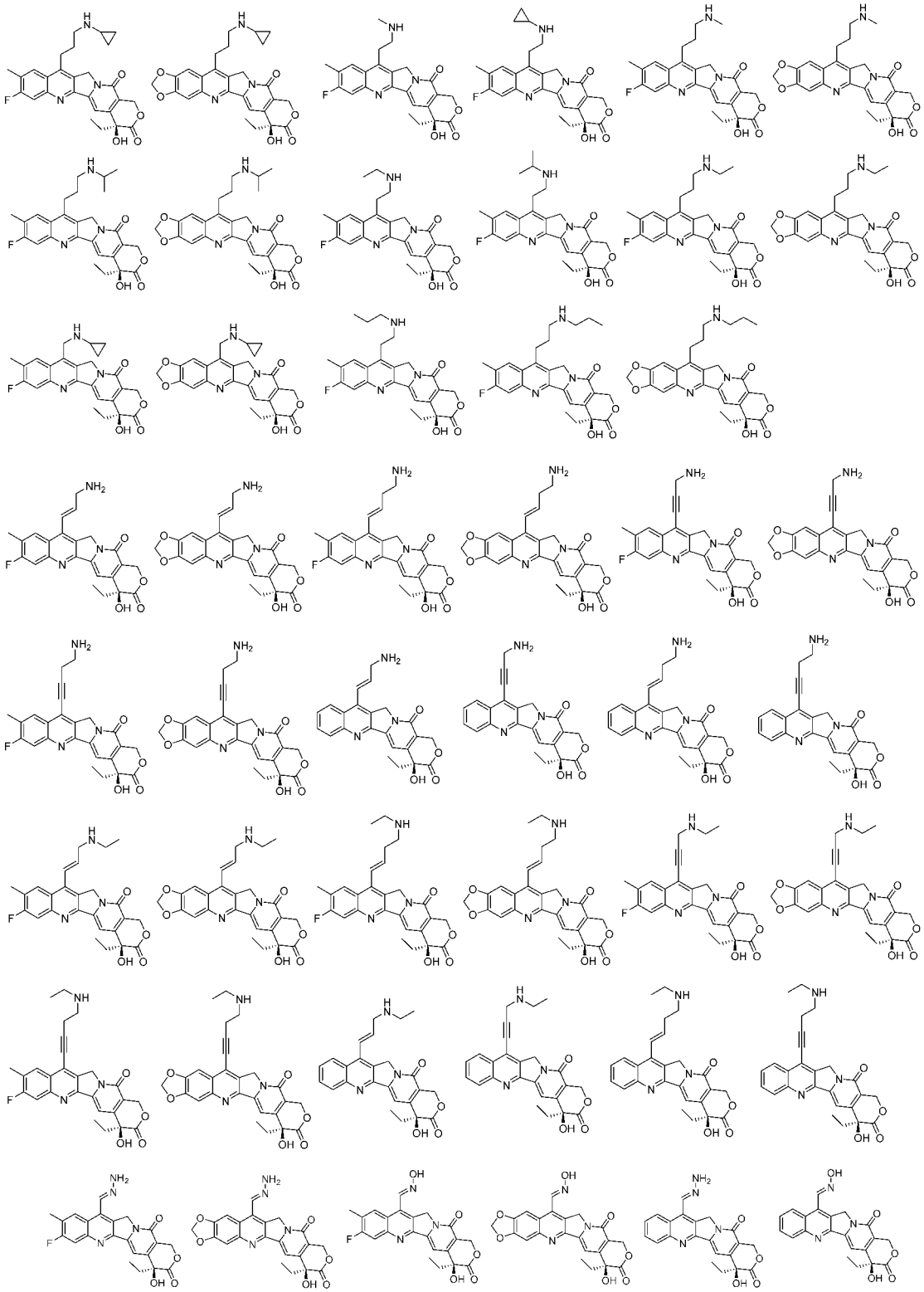
【0313】在一些實施方案中，n1為1、2、3或4。

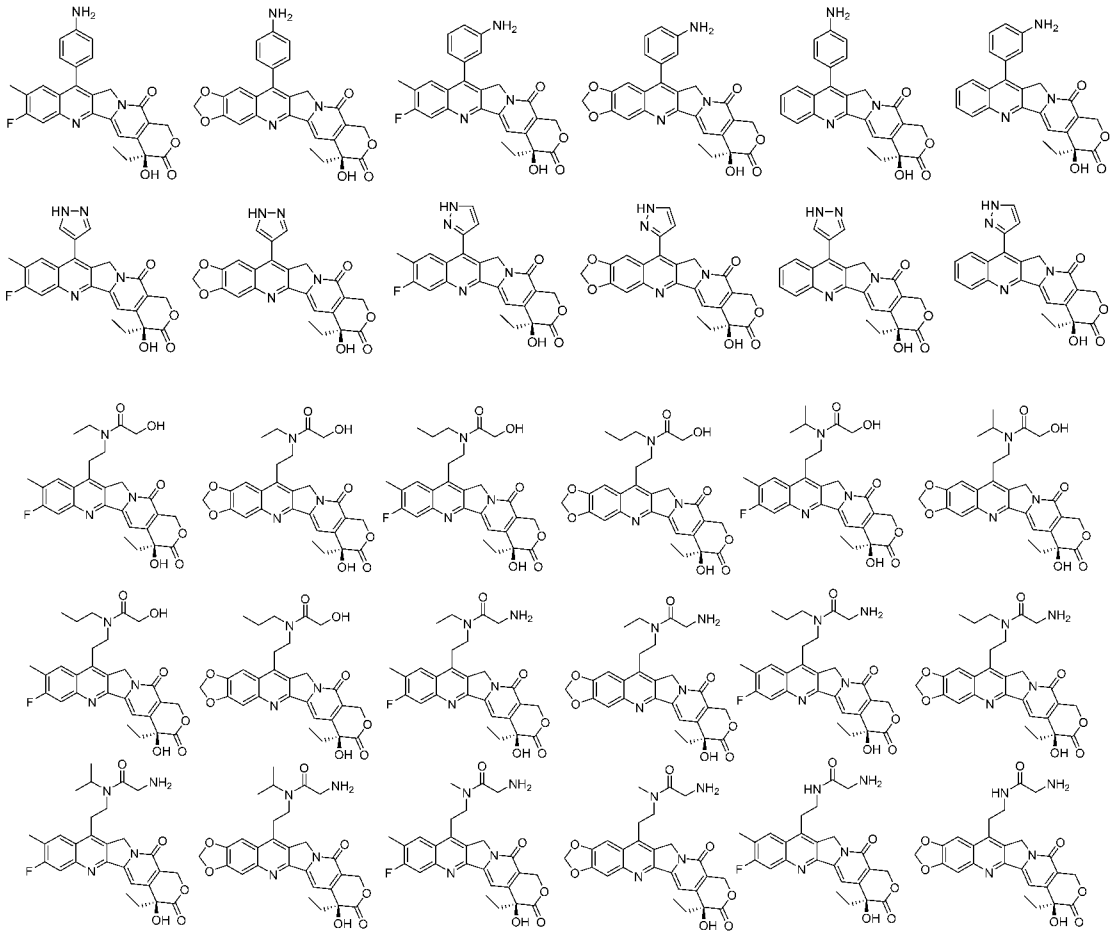
【0314】在一些實施方案中，n2為1；

【0315】在一些實施方案中，n3為0。

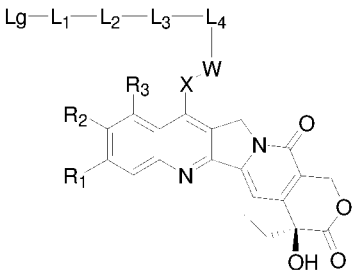
【0316】在一些實施方案中，式II所示化合物選自以下任一化合物：







【0317】在本公開的的第三方面，本公開提供了式III所示的藥物連接體偶聯物，



式 III

或所述藥物連接體偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物，

其中：

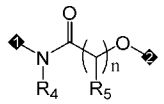
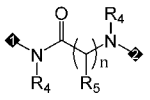
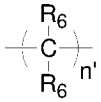
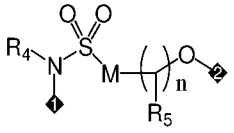
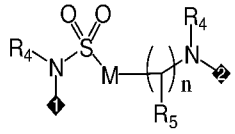
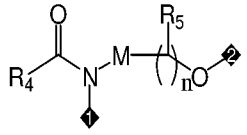
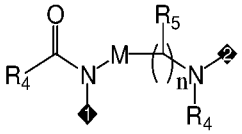
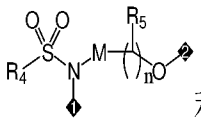
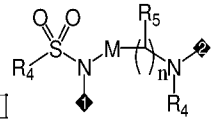
R_1 和 R_2 各自獨立地選自 H、鹵素、-OH、任選取代的 C1-6 烷基或任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

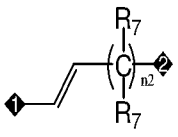
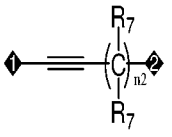
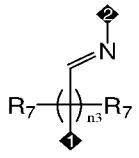
R_1和 R_2和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

R_3選自 H、鹵素、-OH、$-NH_2$、任選取代的 C1-6 烷基和任選取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3和 X 和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合，或者，

R_3和 R_2和與其相連的碳原子一起形成 5-7 元碳環或 5-7 元雜環，所述雜環含有 1 個或多個 O，S，N，羰基，亞碸基或碸基或其任意組合；

W 不存在或存在，W 存在時，W 選自-O-、-S-、$-NR_4-$、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位與 X 相連，2 位與 L_4或 L_3相連；

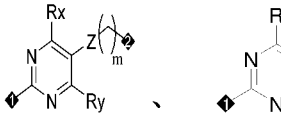
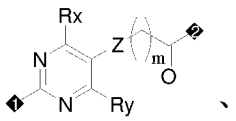
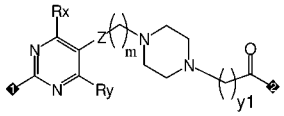
X 選自直接鍵，任選取代的$-O-(CH_2)_{n3}-$、$-N(R_4)-(CH_2)_{n3}-$、$-S-(CH_2)_{n3}-$、羰基$-(CH_2)_{n3}$、$-SO_2-(CH_2)_{n3}-$、  、  、  、$-(CH_2)_{n1}-$、C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 元雜芳基和 4-10 元雜環基，1 位和母環相連，2 位和 W 或 L_4相連；所述取代基選自一個或多個 C1-4 烷基、C3-6 環烷基，或者多個 C1-4 烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成 C3-6 環烷基；

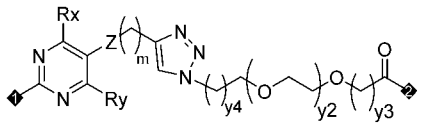
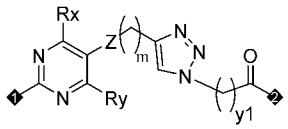
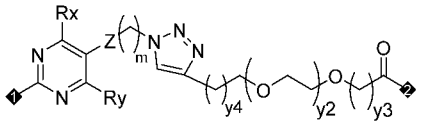
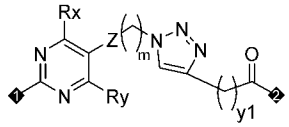
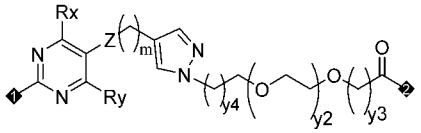
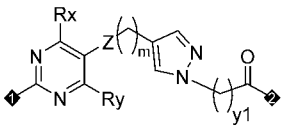
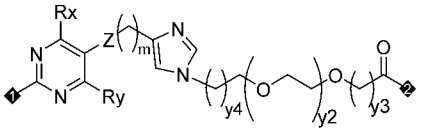
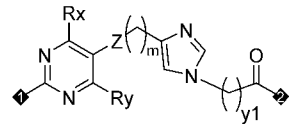
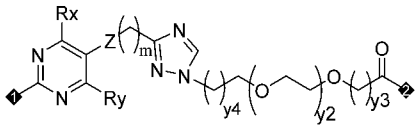
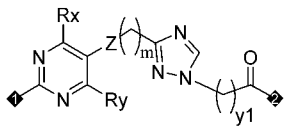
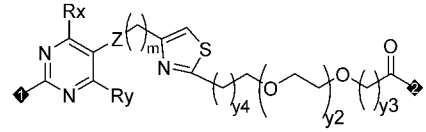
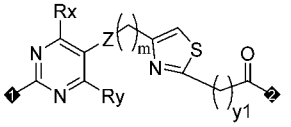
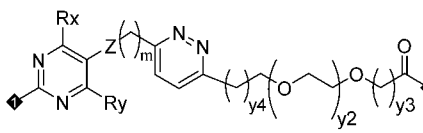
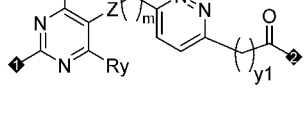
各 M 獨立地選自直接鍵、$-CR^{5a}R^{5b}-$；

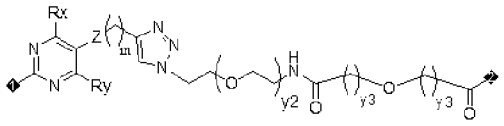
R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6 和 R_7 各自獨立地選自 H、任選取代的 C1-4 烷基、任選取代的 C1-4 烷氧基和任選取代的 C3-6 環烷基；

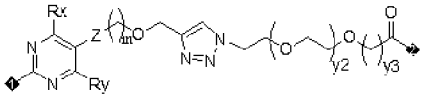
n、n'、n1、n2、n3 各自獨立地選自 0 到 6 之間的任意整數；

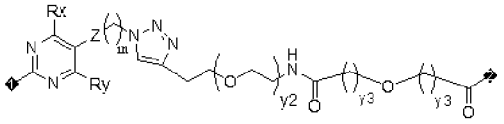
L_1 選自：

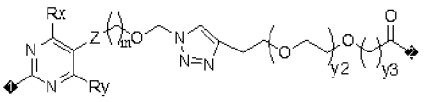

、

、


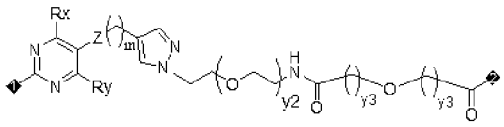















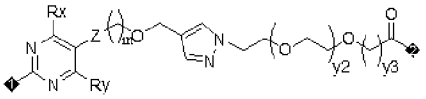


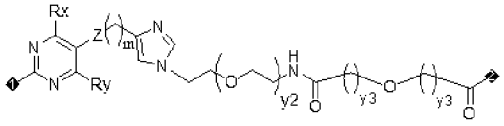


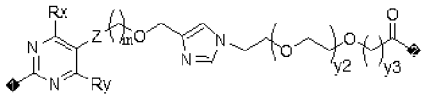


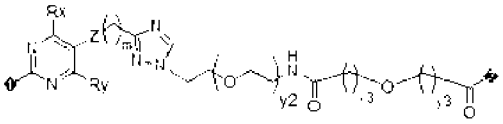


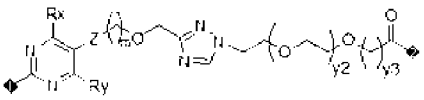


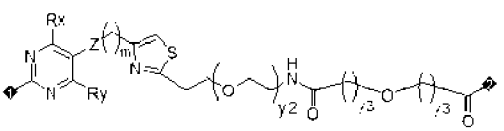


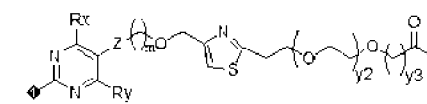


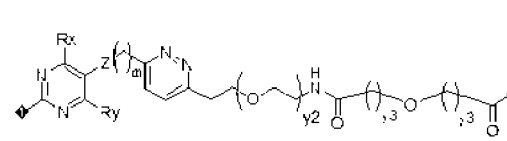


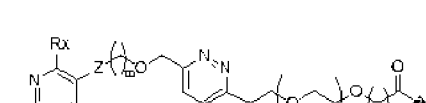


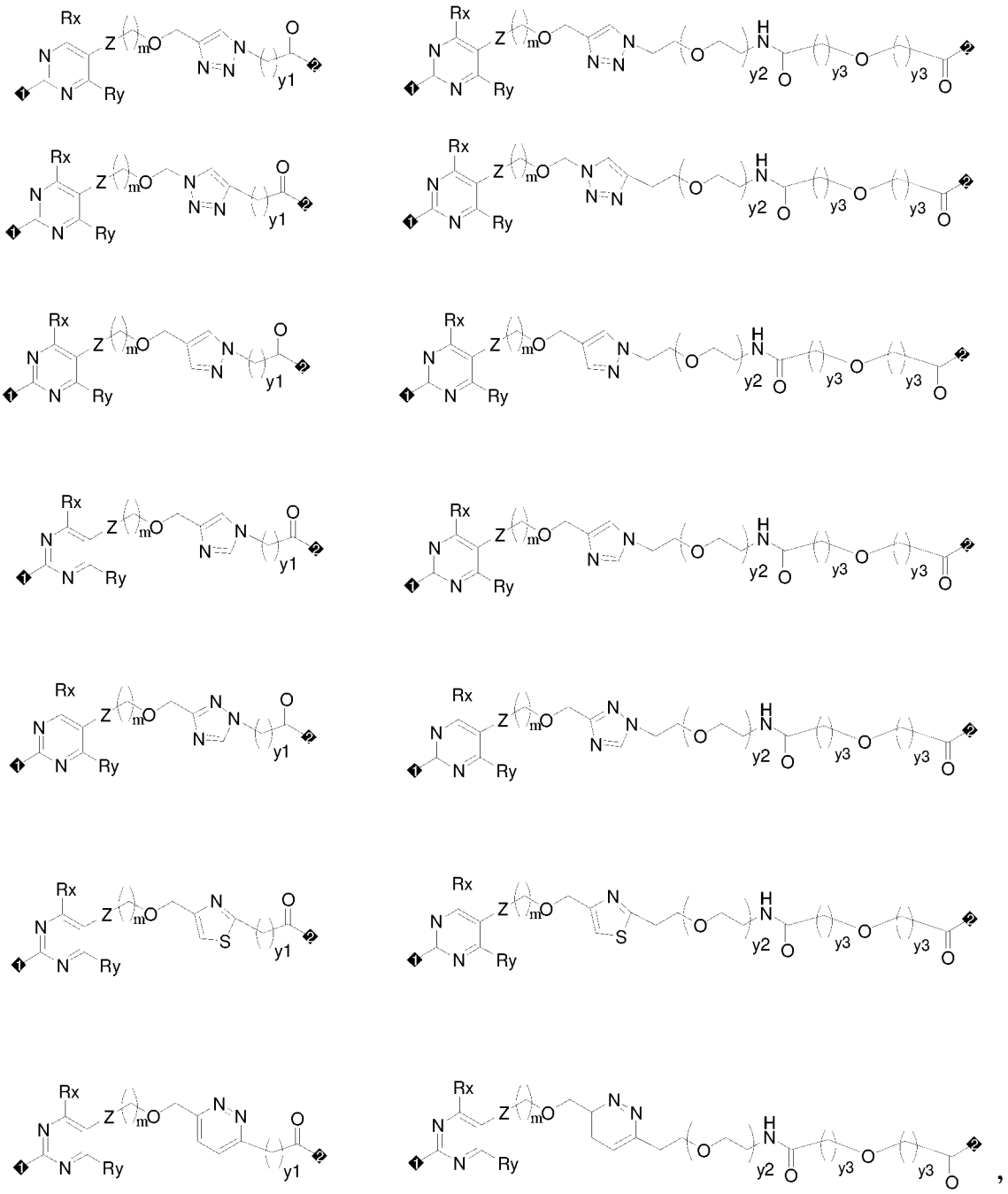






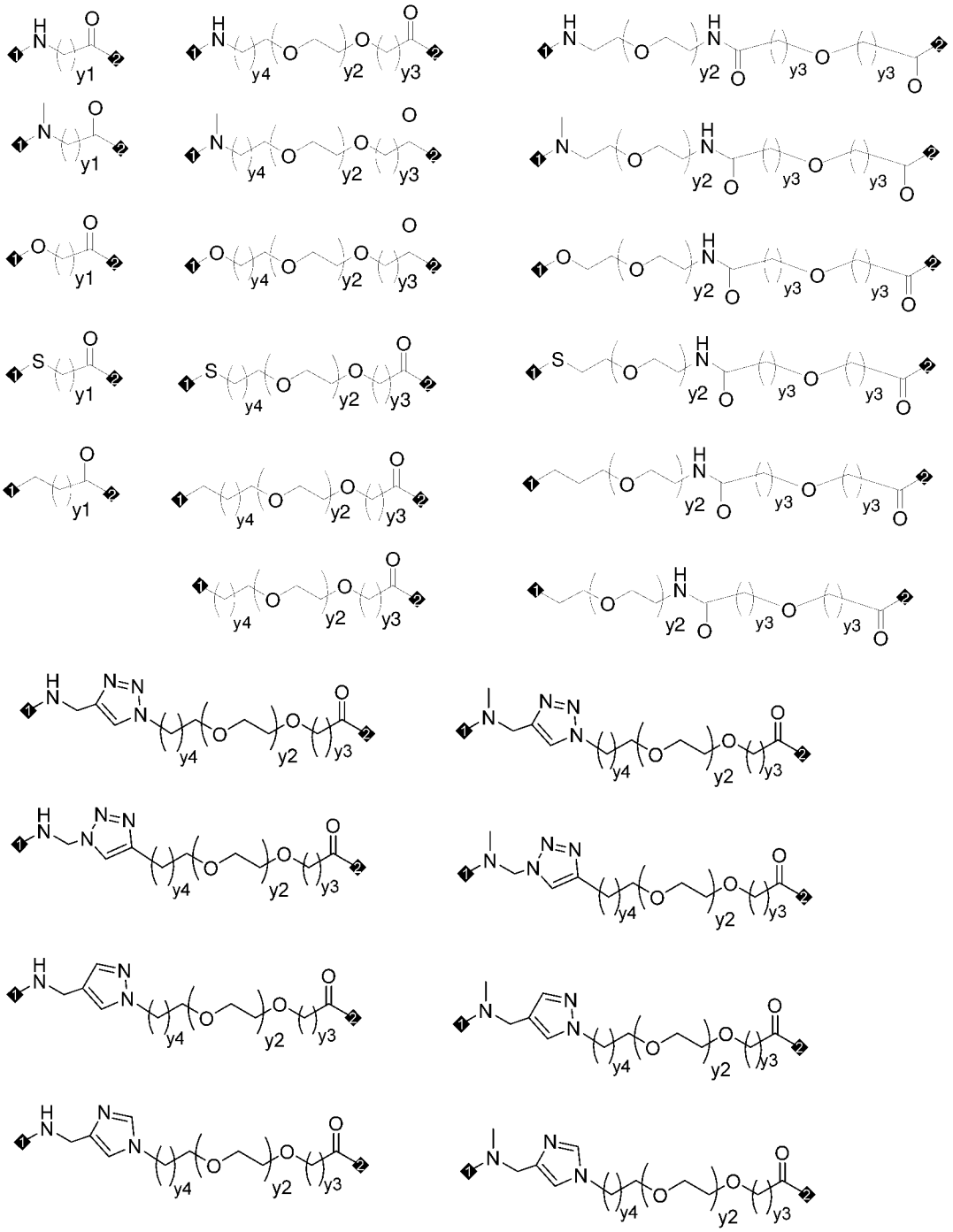


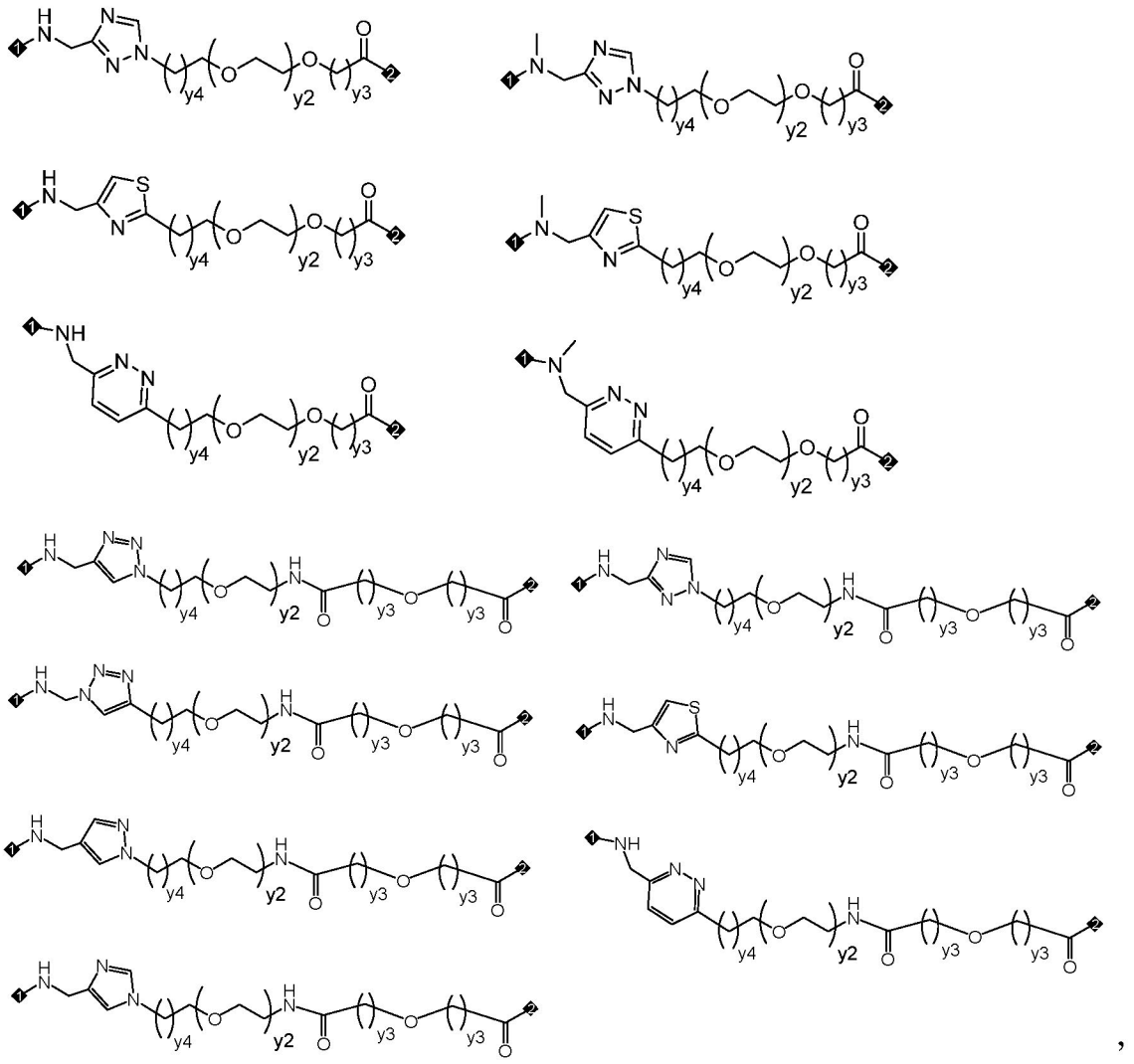




各 Z 獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10 芳基、5-10 元雜芳基、醯胺基、磺醯胺基、亞胺基、CF_2，Rx、Ry 各自獨立地選自 H、C1-4 烷基，各 m 獨立地選自 0、1、2、3、4、5、6，y1、y2、y3、y4 各自獨立地選自 0-20 之間的任意整數，1 位與 Lg 相連，2 位與 L_2 或 L_3 相連；

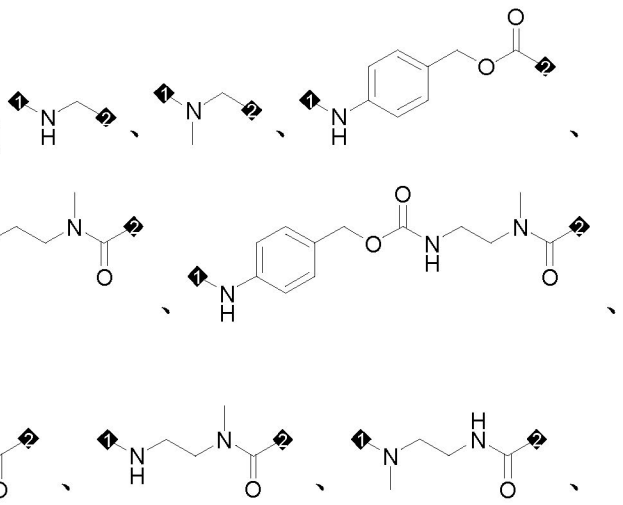
L_2 不存在或存在，L_2 存在時，L_2 選自：

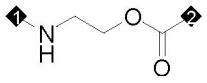




y1、y2、y3、y4 各自獨立地選自 0-20 之間的任意整數，1 位與 L_1 相連，2 位與 L_3 相連；

L_3 選自胺基酸殘基或由 2-10 個胺基酸殘基組成的短肽；

L_4 不存在或存在，L_4 存在時，L_4 選自 

 ，1 位與 L_3 相連，2 位與 W 或 X 相連；

Lg 為離去基團，Lg 選自鹵素、碸基、三級胺鹽基（Me_3N^+、Et_3N^+）、重氮鹽基、-OMs、$MeSO_2$-、CF_3SO_3-。

【0318】在一些實施方案中，R_1、R_2各自獨立地選自H、鹵素、C1-4烷基。

【0319】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成5-6元雜環，所述雜環含有1個、2個或3個O，S或N或其任意組合。

【0320】在一些實施方案中，R_1選自H、鹵素，R_2選自H、C1-4烷基。

【0321】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成 、 、 或 ，虛線表示所述雜環與苯環稠合的位置。

【0322】在一些實施方案中，R_1為H或F，R_2為H或甲基。

【0323】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基或R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

【0324】在一些實施方案中，R_1為F，R_2為甲基。

【0325】在一些實施方案中，R_1和R_2和與其相連的碳原子一起形成 。

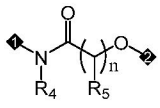
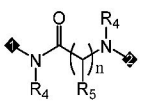
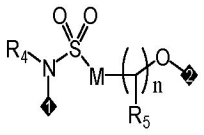
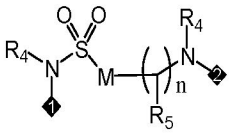
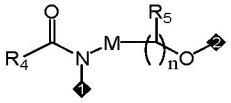
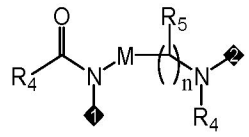
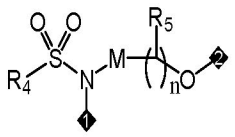
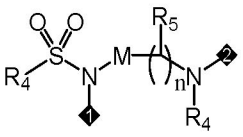
【0326】在一些實施方案中，R_3選自H、C1-4烷基。

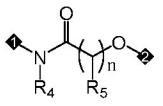
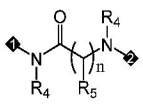
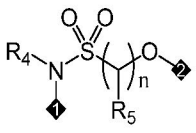
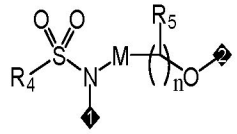
【0327】在一些實施方案中，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成5-6元碳環。

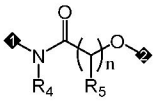
【0328】在一些實施方案中，R_3為H或R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位置。

【0329】在一些實施方案中，R_3為H。

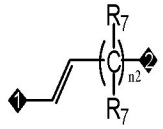
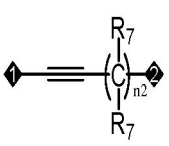
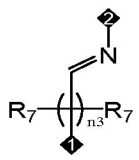
【0330】在一些實施方案中，R_3和X和與其相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位置。

【0331】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  、  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連。

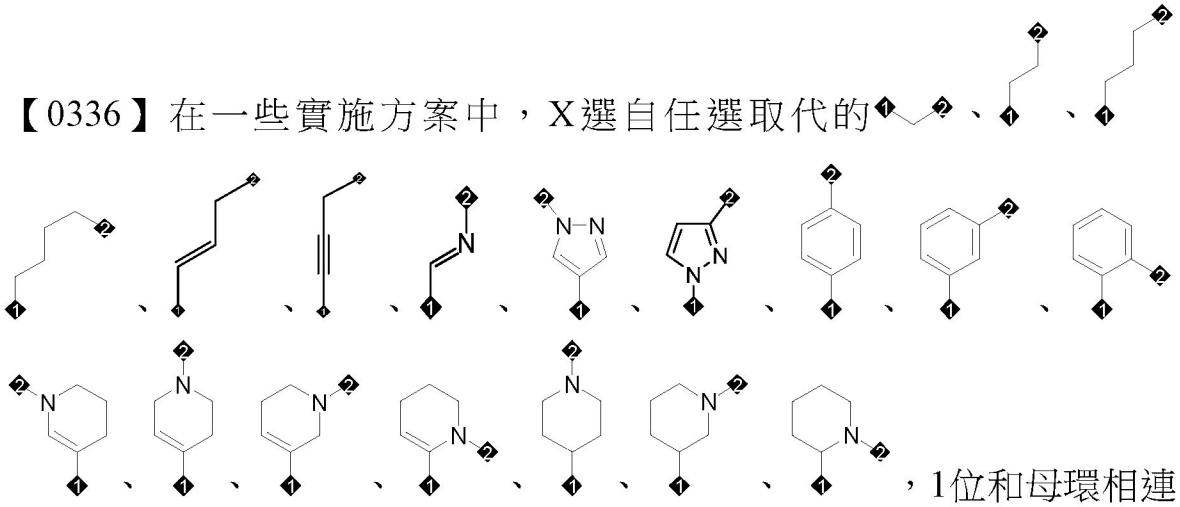
【0332】在一些實施方案中，W不存在或存在，W存在時，W選自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  ，1位與X相連，2位與L_4或L_3相連。

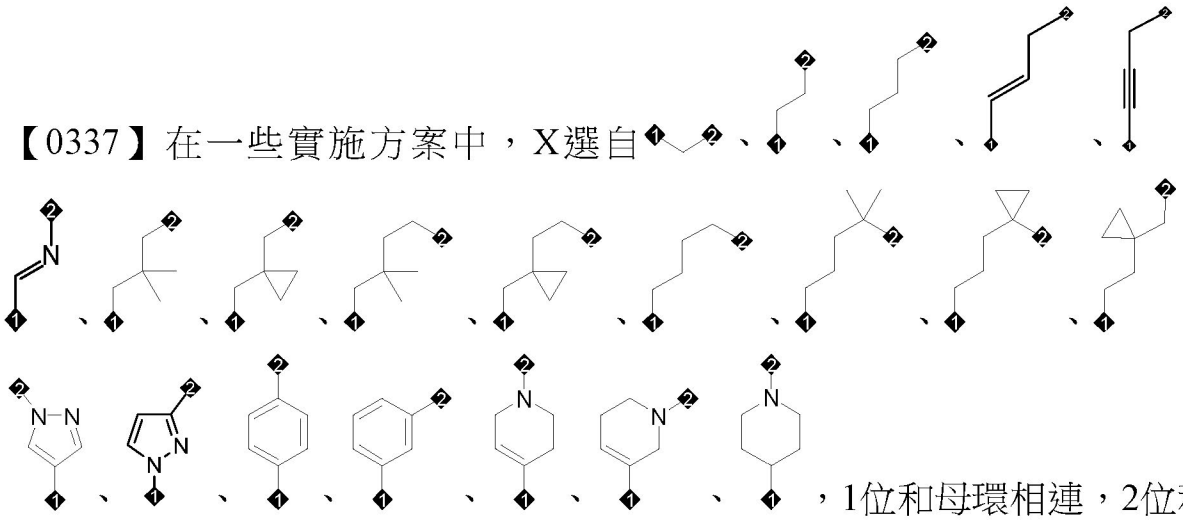
【0333】在一些實施方案中，W選自-O-、-NR_4-、  ，1位X相連，2位與L_4或L_3相連。

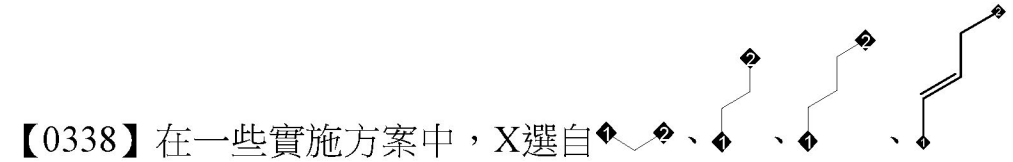
【0334】在一些實施方案中，W選自-O-、-NR_4-，1位X相連，2位與L_4或L_3相連。

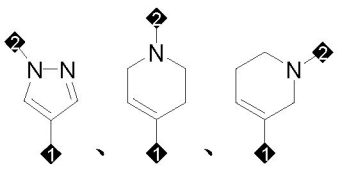
【0335】在一些實施方案中，X選自任選取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C6-10芳基、5-10元雜芳基和4-10元雜環基，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基，或者2個

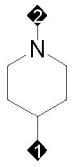
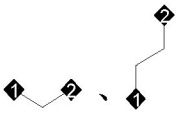
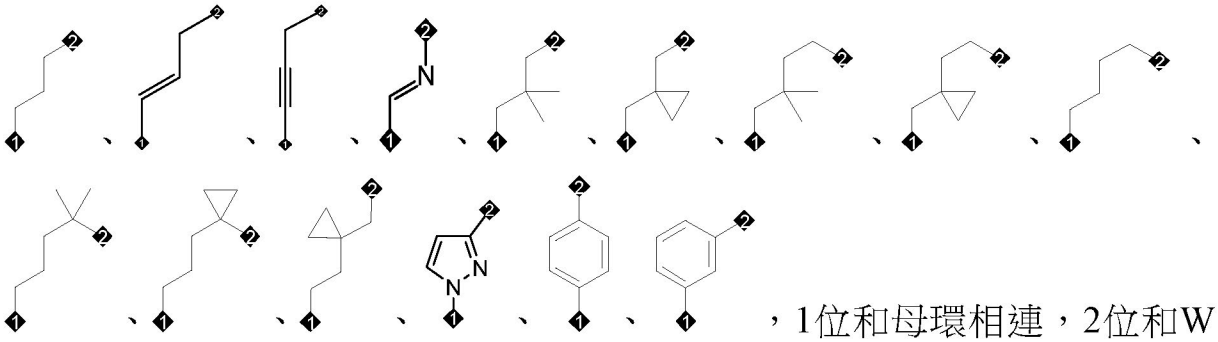
C1-4烷基和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基。

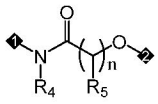
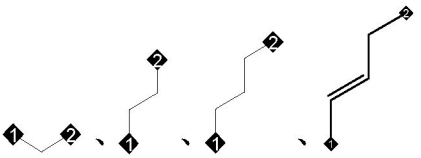
【0336】在一些實施方案中，X選自任選取代的  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連；所述取代基選自1個或2個C1-4烷基（如甲基），或者2個C1-4烷基（如甲基）和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基（如環丙基）。

【0337】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W或L_4相連。

【0338】在一些實施方案中，X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0339】在一些實施方案中，W不存在時，X選自  、

 ，1位和母環相連，2位和L_4相連；W存在時，X選自  、  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0340】在一些實施方案中，W選自-O-、-NR_4-、  ，1位X相連，2位與L_4或L_3相連；X選自  ，1位和母環相連，2位和W相連。

【0341】在一些實施方案中，R_4、R_5各自獨立地選自H、C1-4烷基、C3-6環烷基。

【0342】在一些實施方案中，各R_4獨立地選自H、C1-4烷基、C3-6環烷基，R_5為H。

【0343】在一些實施方案中，各R_4獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、異丙基、第三丁基、環丙基，R_5為H。

【0344】在一些實施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H、C1-4烷基。

【0345】在一些實施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自獨立地選自H、甲基。

【0346】在一些實施方案中，各R^7獨立地選自H、C1-4烷基。

【0347】在一些實施方案中，R^7為H。

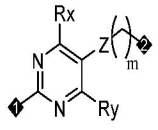
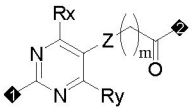
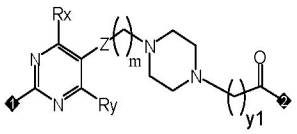
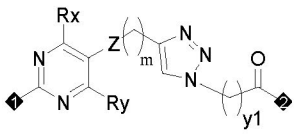
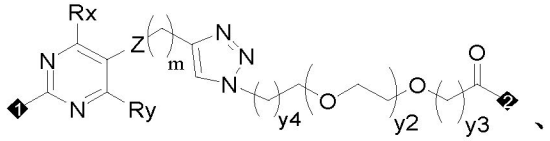
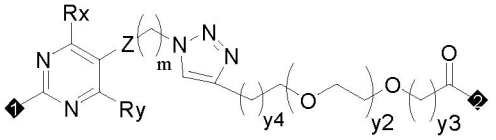
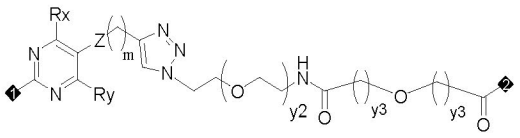
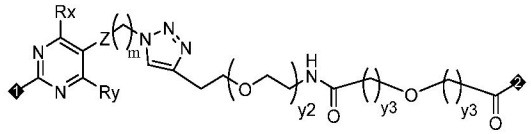
【0348】在一些實施方案中，n選自1、2或3。

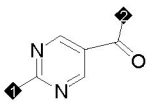
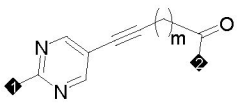
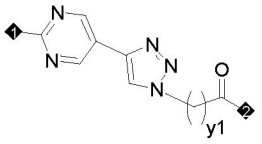
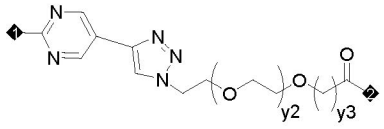
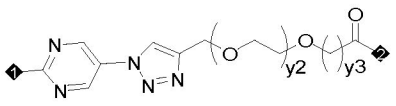
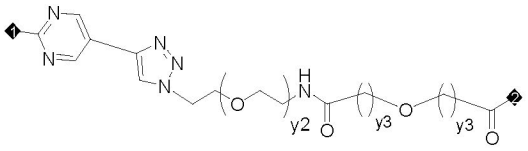
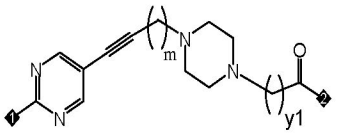
【0349】在一些實施方案中，n為1。

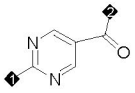
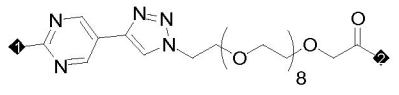
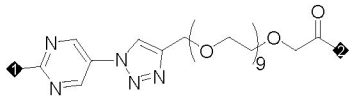
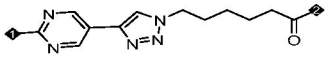
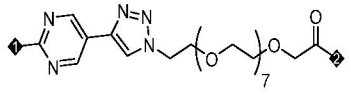
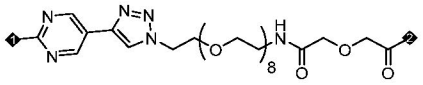
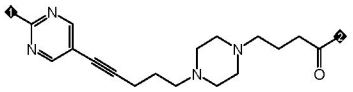
【0350】在一些實施方案中，n1選自1、2、3或4。

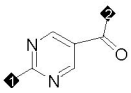
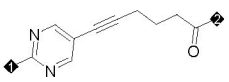
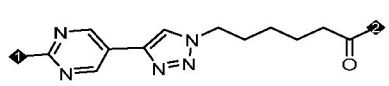
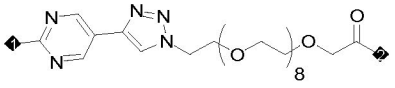
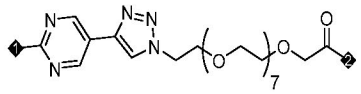
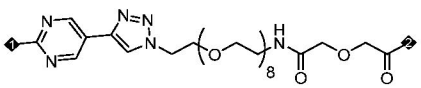
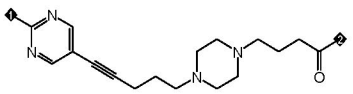
【0351】在一些實施方案中，n2為1。

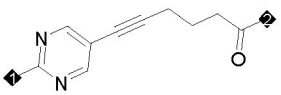
【0352】在一些實施方案中，n3為0。

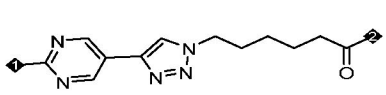
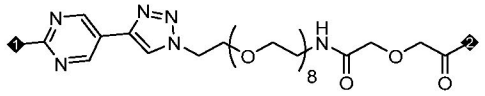
【0353】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  、  ，各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵、C6-10芳基、5-10元雜芳基、醯胺基（優選選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵），Rx、Ry各自獨立地選自H、C1-4烷基，各m獨立地選自0、1、2、3、4、5、6，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-15（如6-15）之間任意整數，各y3獨立地選自1、2或3，各y4獨立地選自0或1，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連；例如各Z獨立地選自直接鍵、碳碳三鍵、碳碳雙鍵，Rx、Ry各自獨立地選自H、C1-4烷基，各m獨立地選自0、1、2、3、4、5、6，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-15（如6-15）之間任意整數，各y3獨立地選自1、2或3，各y4獨立地選自0或1，1位通過S原子與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

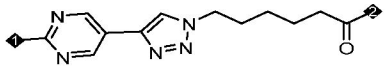
【0354】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  ，m選自2、3、4，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-10（如6-10）之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

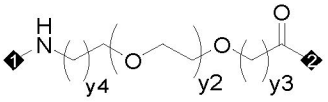
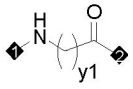
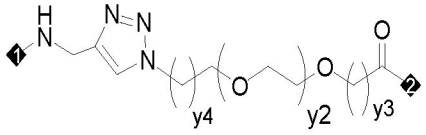
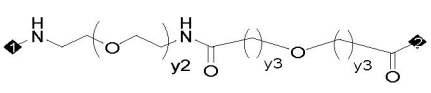
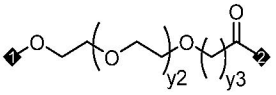
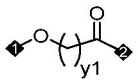
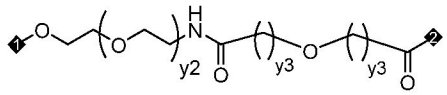
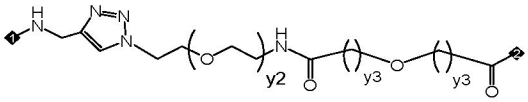
【0355】在一些實施方案中，L_1選自  、 、  、  、  、  、  、  ，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

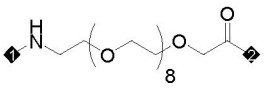
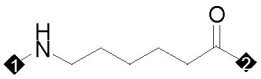
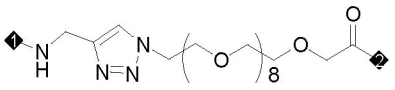
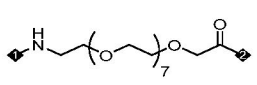
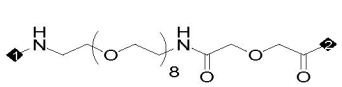
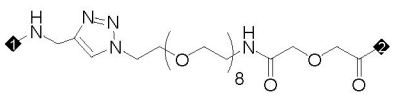
【0356】在一些實施方案中，L_1選自  、  、  、  、  、  、  ，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

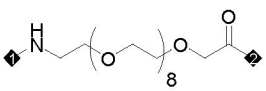
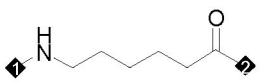
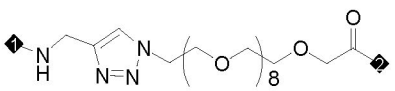
【0357】在一些實施方案中，L_1選自  、

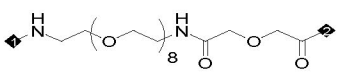
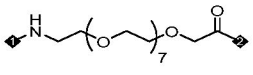
 、  ，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

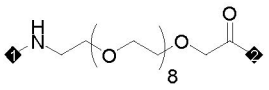
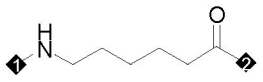
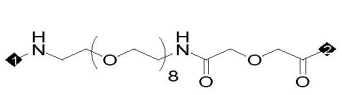
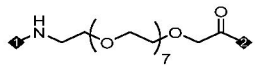
【0358】在一些實施方案中，L_1選自 、  ，1位與Lg相連，2位與L_2或L_3相連。

【0359】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  、  、  、  、  ，y1選自1-6之間任意整數（如4、5、6），各y2獨立地選自0-10（如6-10）之間任意整數，各y3獨立地選自1或2，各y4獨立地選自0或1，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

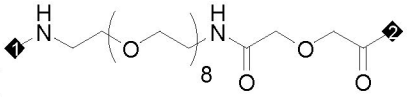
【0360】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  、  、  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0361】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、

 、  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0362】在一些實施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在時，L_2選自  、  、  、  ，1位與L_1相連，2位與L_3相連。

【0363】在一些實施方案中，L_2不存在。

【0364】在一些實施方案中，L_2選自  。

【0365】在一些實施方案中，L_3選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽；所述的胺基酸殘基選自天然胺基酸殘基、非天然胺基酸殘基、AA^1所示胺基酸殘基或其立體異構體。

【0366】在一些實施方案中，L_3選自胺基酸殘基Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1或由2-10個選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1的胺基酸殘基組成的短肽。

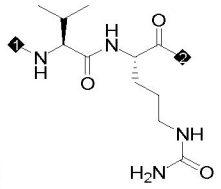
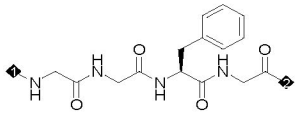
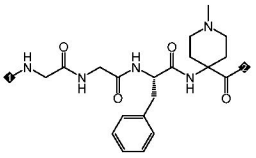
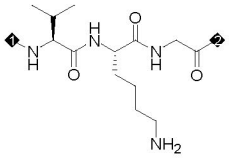
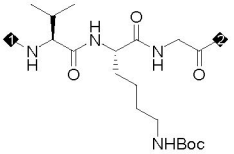
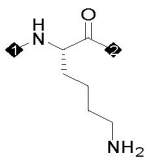
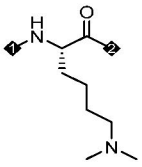
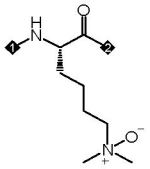
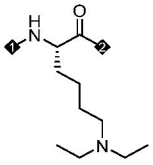
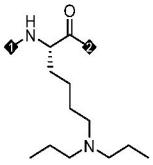
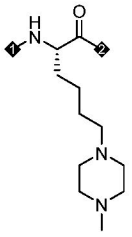
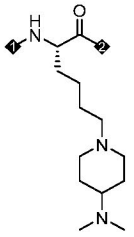
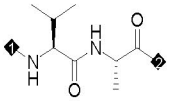
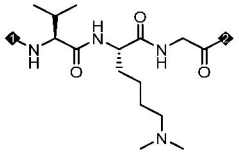
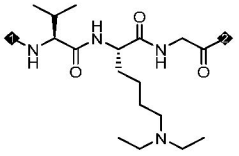
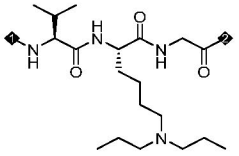
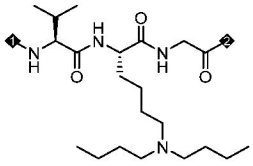
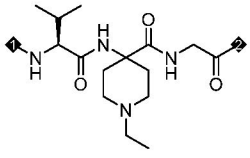
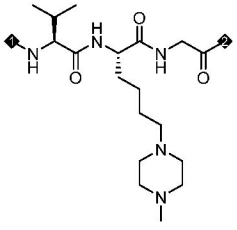
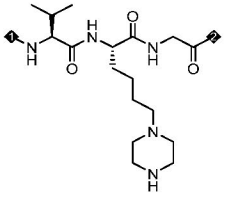
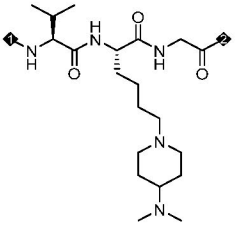
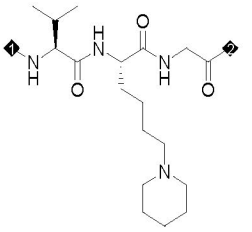
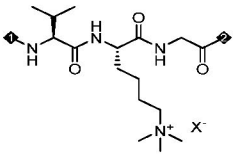
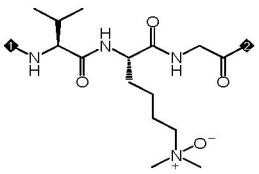
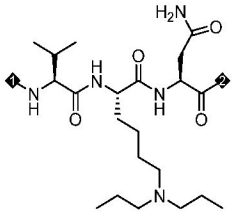
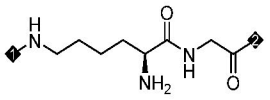
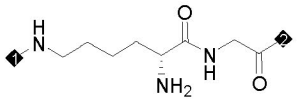
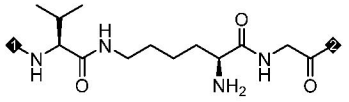
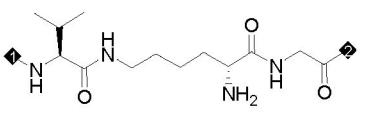
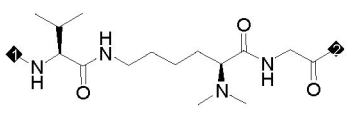
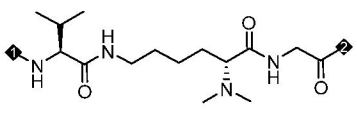
【0367】在一些實施方案中，L_3選自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys、Lys-Ala-Asn。

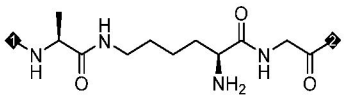
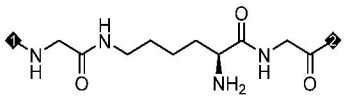
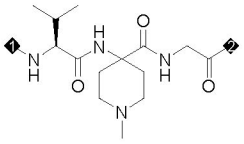
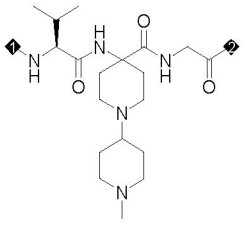
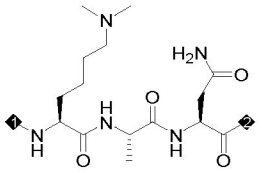
【0368】在一些實施方案中，L_3選自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-

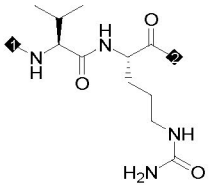
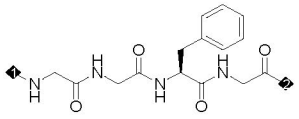
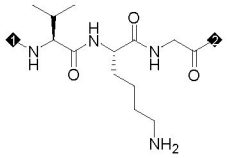
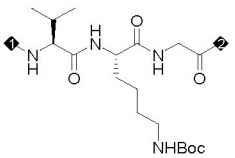
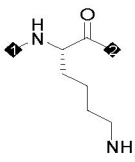
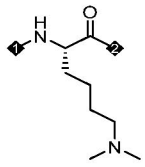
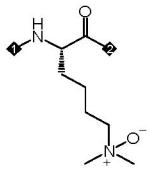
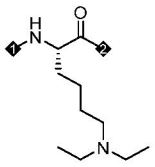
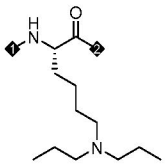
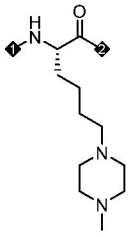
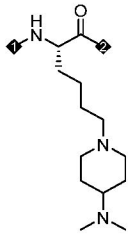
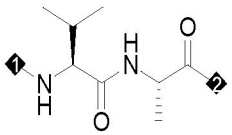
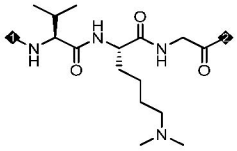
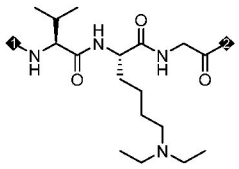
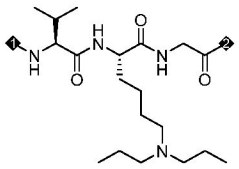
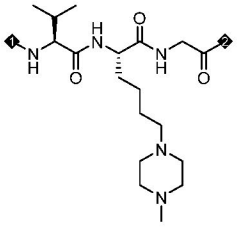
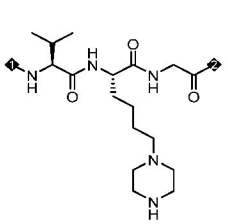
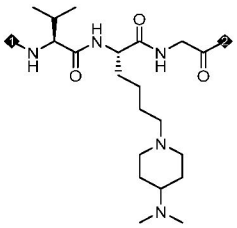
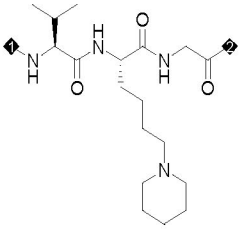
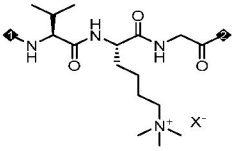
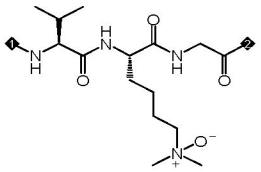
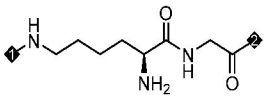
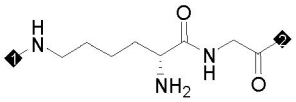
Gly、AA[1]-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe-Gly。

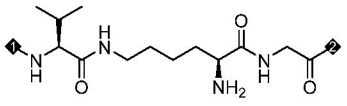
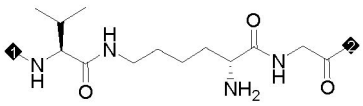
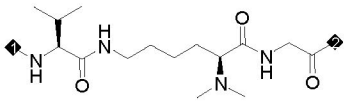
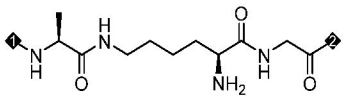
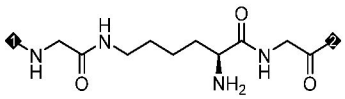
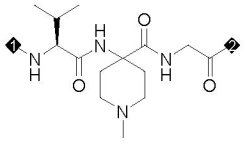
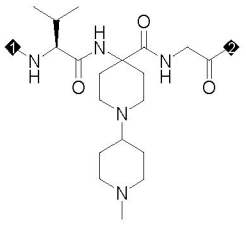
【0369】在一些實施方案中，L_3選自AA[1]、Val-AA[1]-Gly。

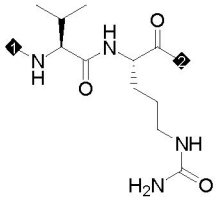
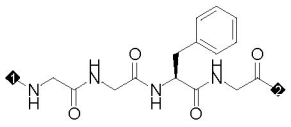
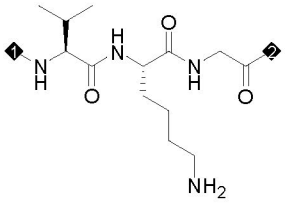
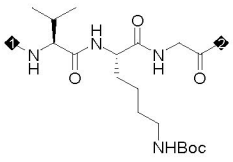
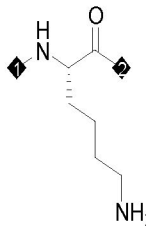
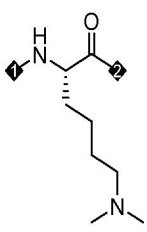
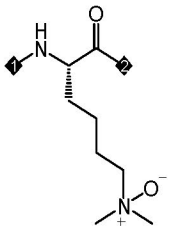
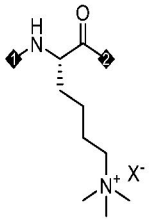
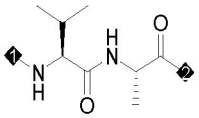
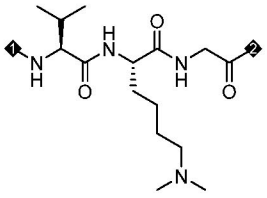
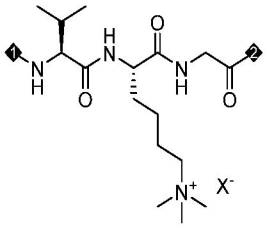
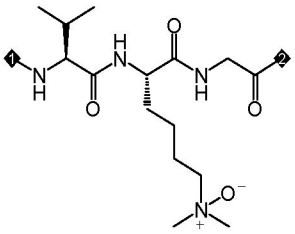
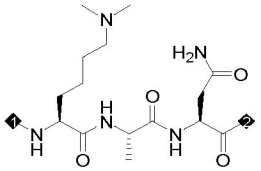
【0370】在一些實施方案中，L_3選自Val-AA[1]-Gly。

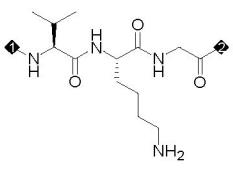
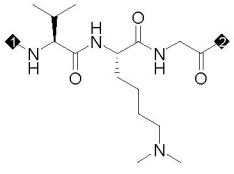
【0371】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、

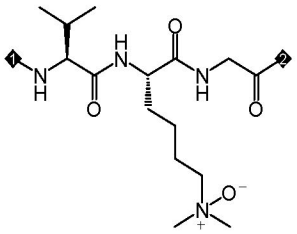
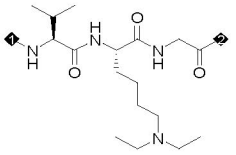
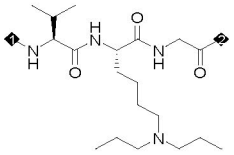
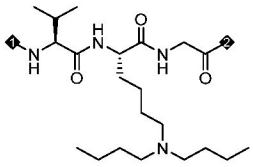
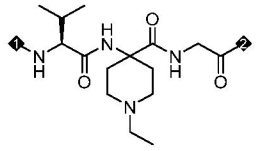
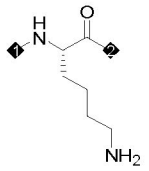
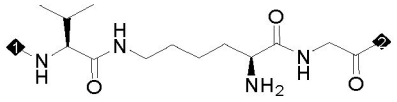
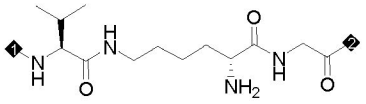
 、  、  、  、  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子、OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

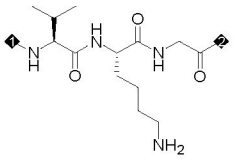
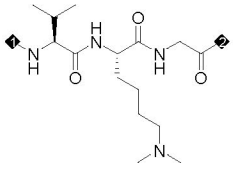
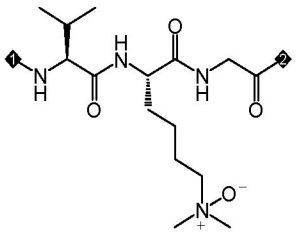
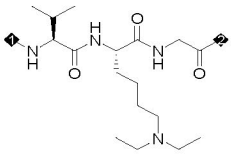
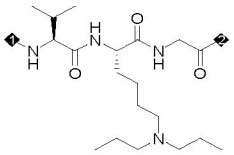
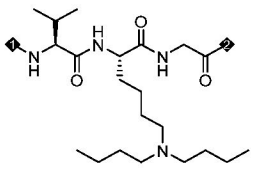
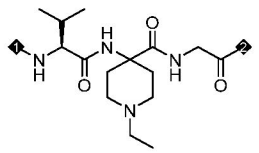
【0372】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、

 、  、  、  、  、  、  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子、OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

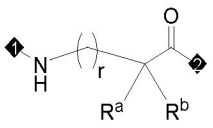
【0373】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  ，X^-選自鹵素離子、羧酸根離子、硫酸根離子、硫酸氫根離子、OH^-，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

【0374】在一些實施方案中，L_3選自  、  、

 、  、  、  、  、  、  、  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

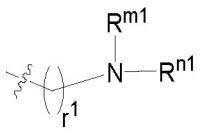
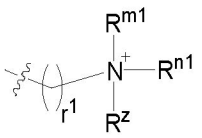
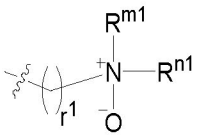
【0375】在一些實施方案中，L_3選自  、  、  、  、  、  、  ，1位與L_1或L_2相連，2位與L_4或W相連。

【0376】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基的結構如下所示，



AA^1

其中：

R^a、R^b 各自獨立地選自 H、  、  、  ，且

R^a、R^b 不同時為 H；

或者，R^a 與 R^b 和與它們共同相連的碳原子一起，形成 4-10 元雜環，所述

4-10 元雜環任選地被一個或多個 R^0 所取代；

r、r^1 各自獨立地選自 0 到 20 的任意整數；

R^{m1}、R^{n1} 各自獨立地選自 H、C1-6 烷基、C3-6 環烷基、-$COOR^{x1}$；

R^{x1} 選自 C1-6 烷基；

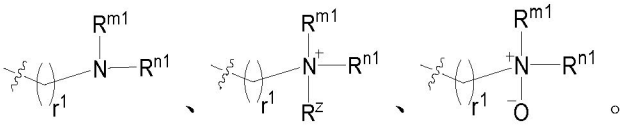
或者，R^{m1} 與 R^{n1} 和與它們共同相連的氮原子一起，形成 4-10 元雜環，所述 4-10 元雜環任選地被一個或多個 $R^{0'}$ 所取代；

R^z 選自 C1-6 烷基；

R^0、$R^{0'}$ 各自獨立地選自 C1-6 烷基、C3-6 環烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$、任選被 C1-6 烷基取代的 4-10 元雜環基；

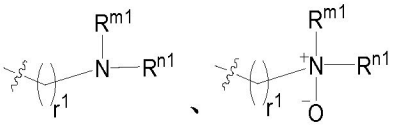
R^{m2}、R^{n2} 各自獨立地選自 H、C1-6 烷基。

【0377】在一些實施方案中，R^a、R^b 中，任一個為H，另一個選自



。

【0378】在一些實施方案中，R^a、R^b 中，任一個為H，另一個選自



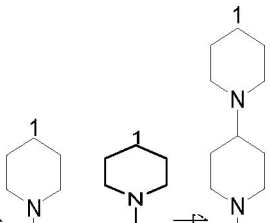
。

【0379】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元雜環。

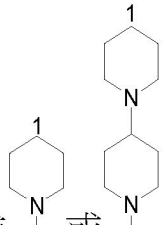
【0380】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶環或哌啡環。

【0381】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶環。

【0382】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形


成 、 或 ，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【0383】在一些實施方案中，R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形


成 或 ，1號碳原子為與R^a和R^b共同相連的碳原子。

【0384】在一些實施方案中，r、r^1各自獨立地選自0、1、2、3、4、5。

【0385】在一些實施方案中，r、r^1各自獨立地選自0、4。

【0386】在一些實施方案中，r、r^1中，任一個為0，另一個為4。

【0387】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3、-COOCH2CH2CH2CH3。

【0388】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基、C3-6環烷基、第三丁氧羰基。

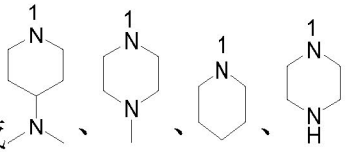
在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基。

【0389】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、甲基、乙基、正丙基。

【0390】在一些實施方案中，r、r^1中，r為4，r^1為0時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自H、C1-6烷基（如H、甲基）；r為0，r^1為4時，R^{m1}、R^{n1}各自獨立地選自C1-6烷基（如甲基、乙基、正丙基），優選選自C2-6烷基（如乙基、正丙基）。

【0391】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成任選被$R^{0'}$取代的5-6元雜環。

【0392】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成任選被$R^{0'}$取代的哌啶環或哌啡環。

【0393】在一些實施方案中，R^{m1}與R^{n1}和與它們共同相連的氮原子一起，形成  ，1號氮原子為與R^{m1}和R^{n1}共同相連的氮原子。

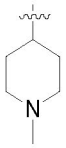
【0394】在一些實施方案中，R^{z}為甲基。

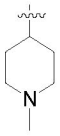
【0395】在一些實施方案中，R^{0}、$R^{0'}$各自獨立地選自C1-6烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$、任選被C1-6烷基取代的5-6元雜環基。

【0396】在一些實施方案中，R^{0}選自C1-6烷基、被C1-6烷基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基選自哌啶基、哌啡基。

【0397】在一些實施方案中，R^{0}選自甲基、乙基、被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基。

【0398】在一些實施方案中，R^{0}選自甲基、被甲基取代的5-6元雜環基，所述5-6元雜環基為哌啶基。

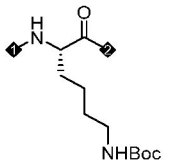
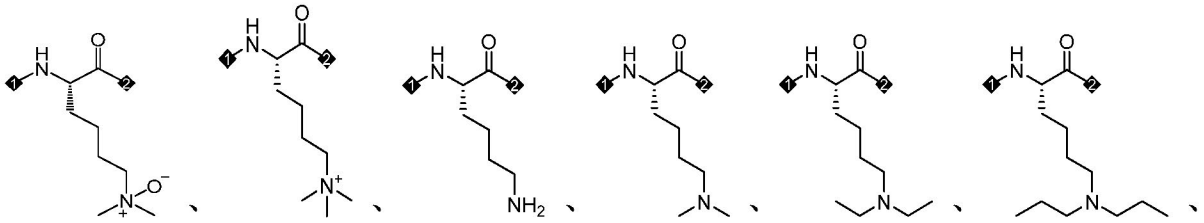
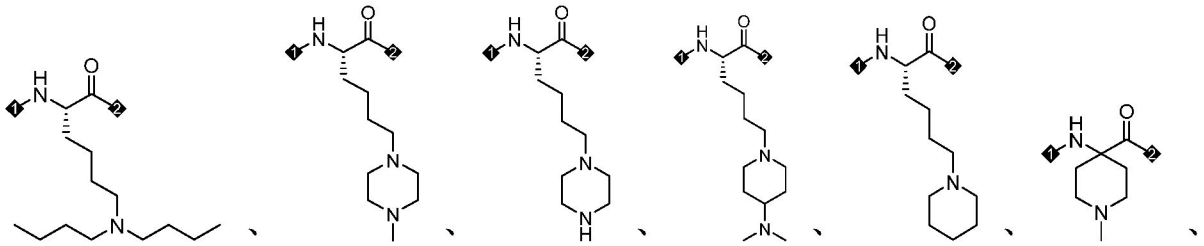
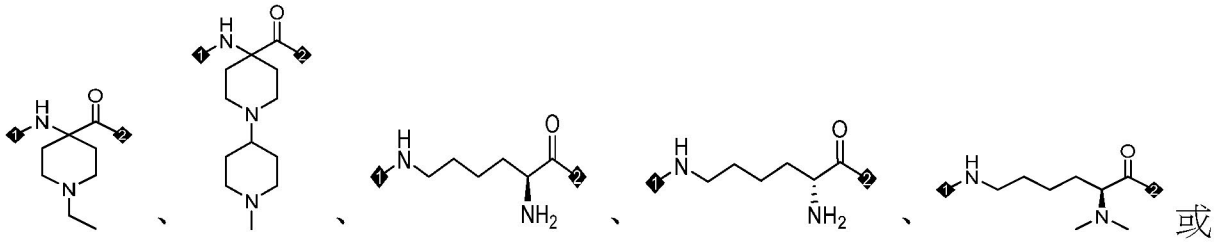
【0399】在一些實施方案中，R^{0}選自甲基、乙基、  。

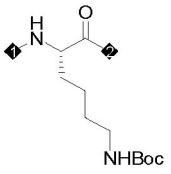
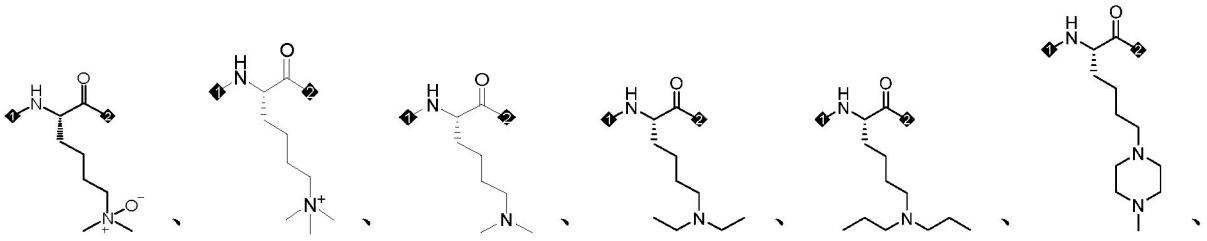
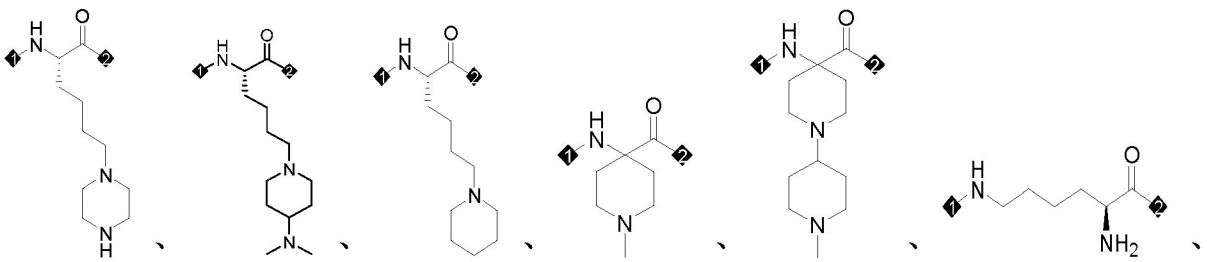
【0400】在一些實施方案中，R^{0}選自甲基、  。

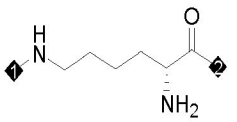
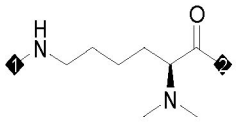
【0401】在一些實施方案中，$R^{0'}$選自C1-6烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$。

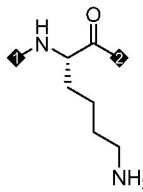
【0402】在一些實施方案中，$R^{0'}$選自甲基、-$NR^{m2}R^{n2}$。

【0403】在一些實施方案中，R^{m2}、R^{n2}為甲基。

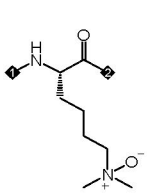
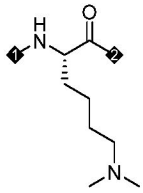
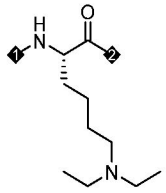
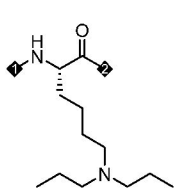
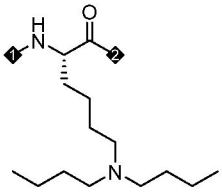
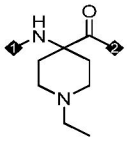
【0404】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  、  、  、 或。

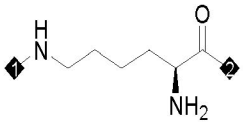
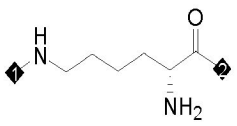
【0405】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自  、  、  。

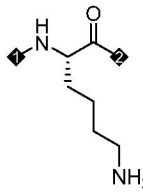
 、  。



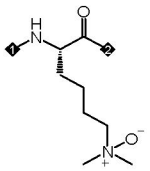
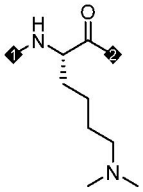
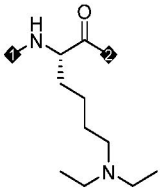
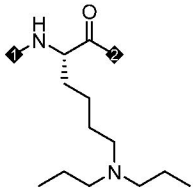
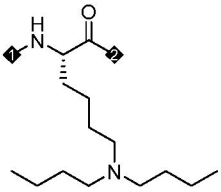
【0406】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自、

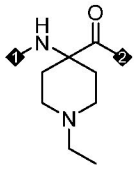
 、  、  、  、  、  、

 、  。

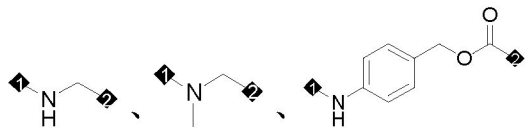


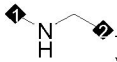
【0407】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基選自、

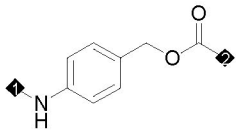
 、  、  、  、  、

 。

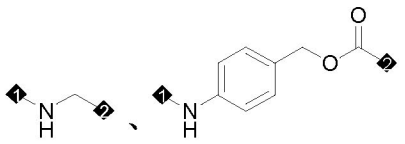
【0408】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4選自

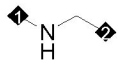
 ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

【0409】在一些實施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在時，L_4為  或

 ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

【0410】在一些實施方案中，L_4不存在。

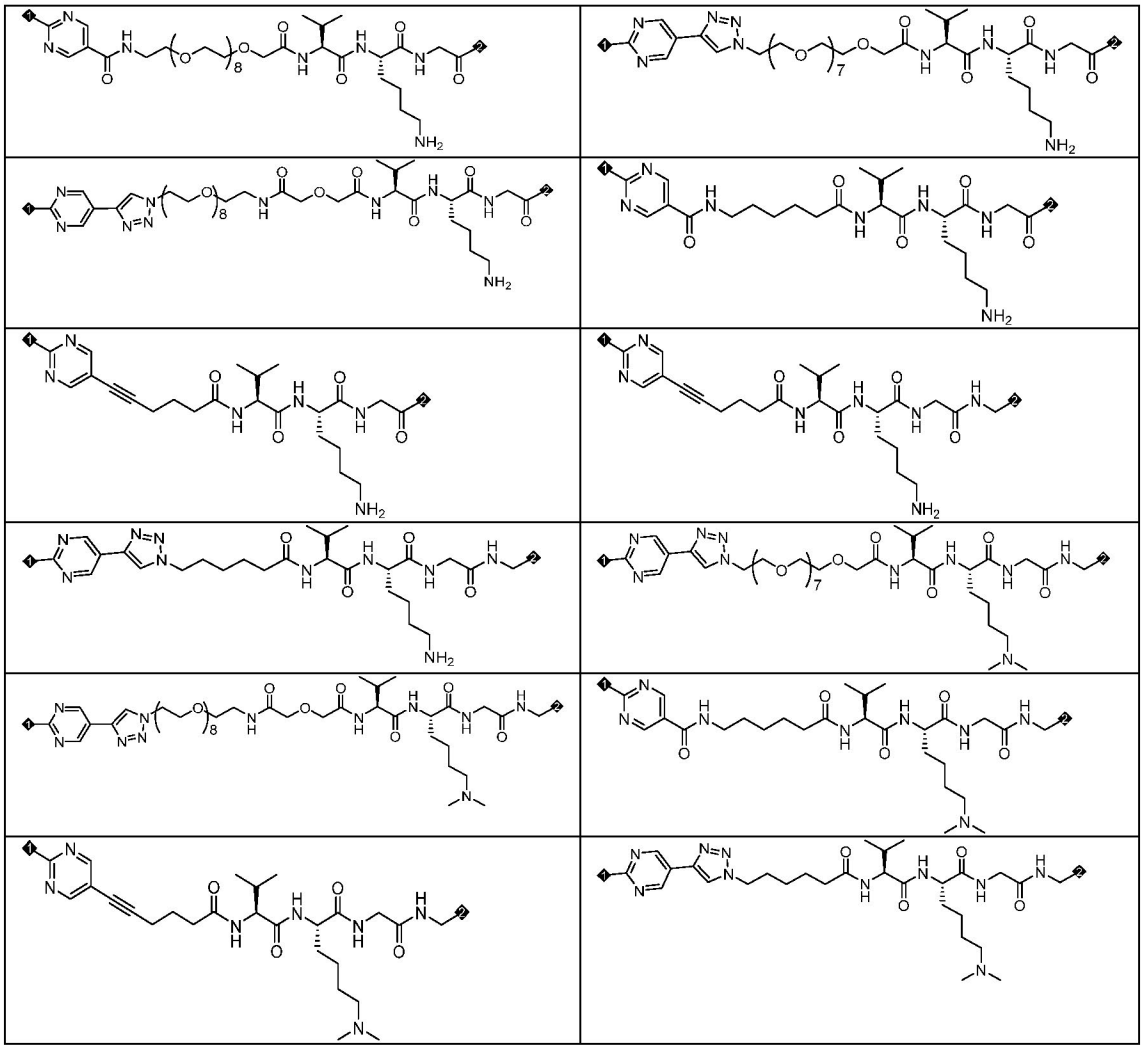
【0411】在一些實施方案中，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

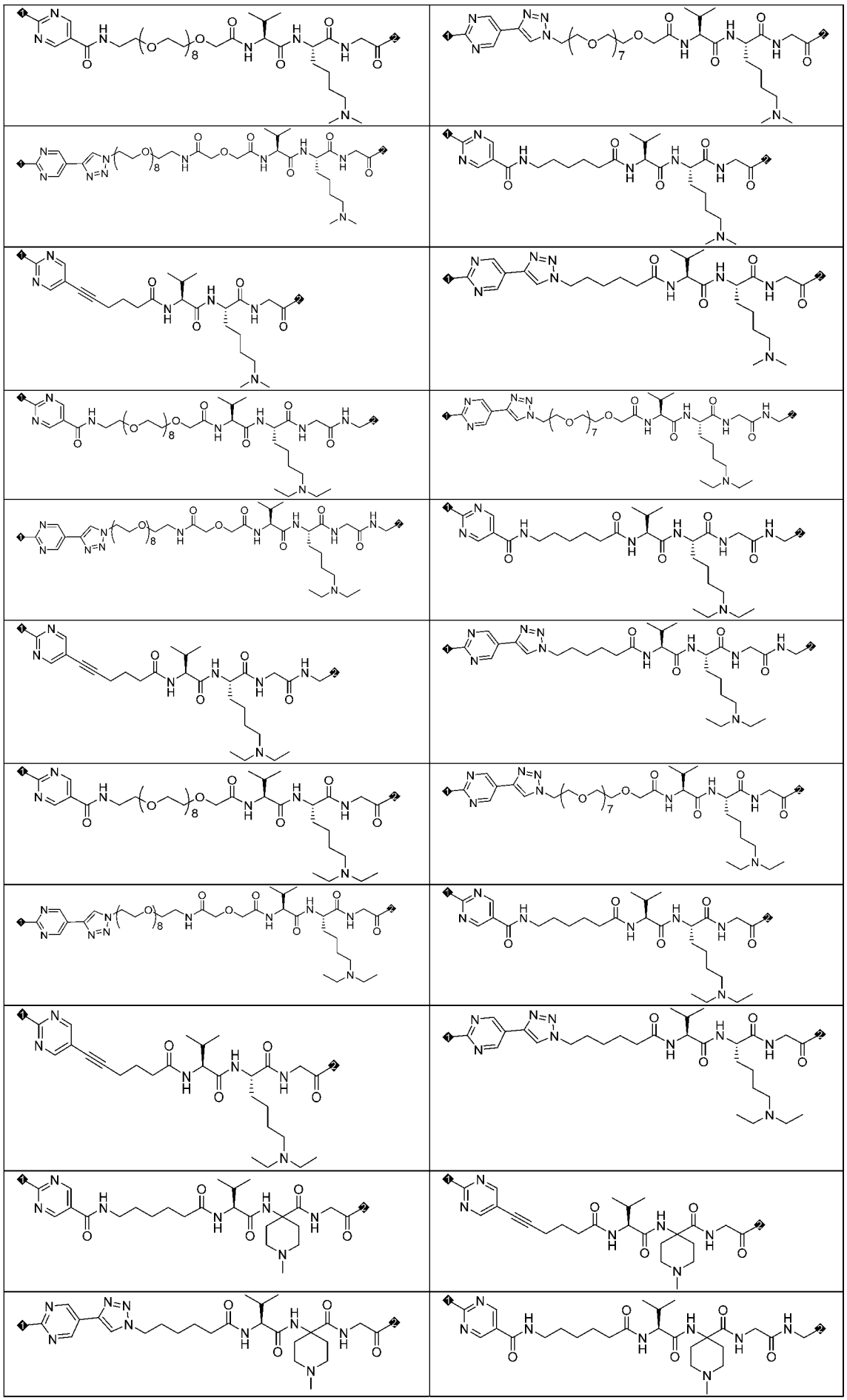
【0412】在一些實施方案中，L_4選自  ，1位與L_3相連，2位與W或X相連。

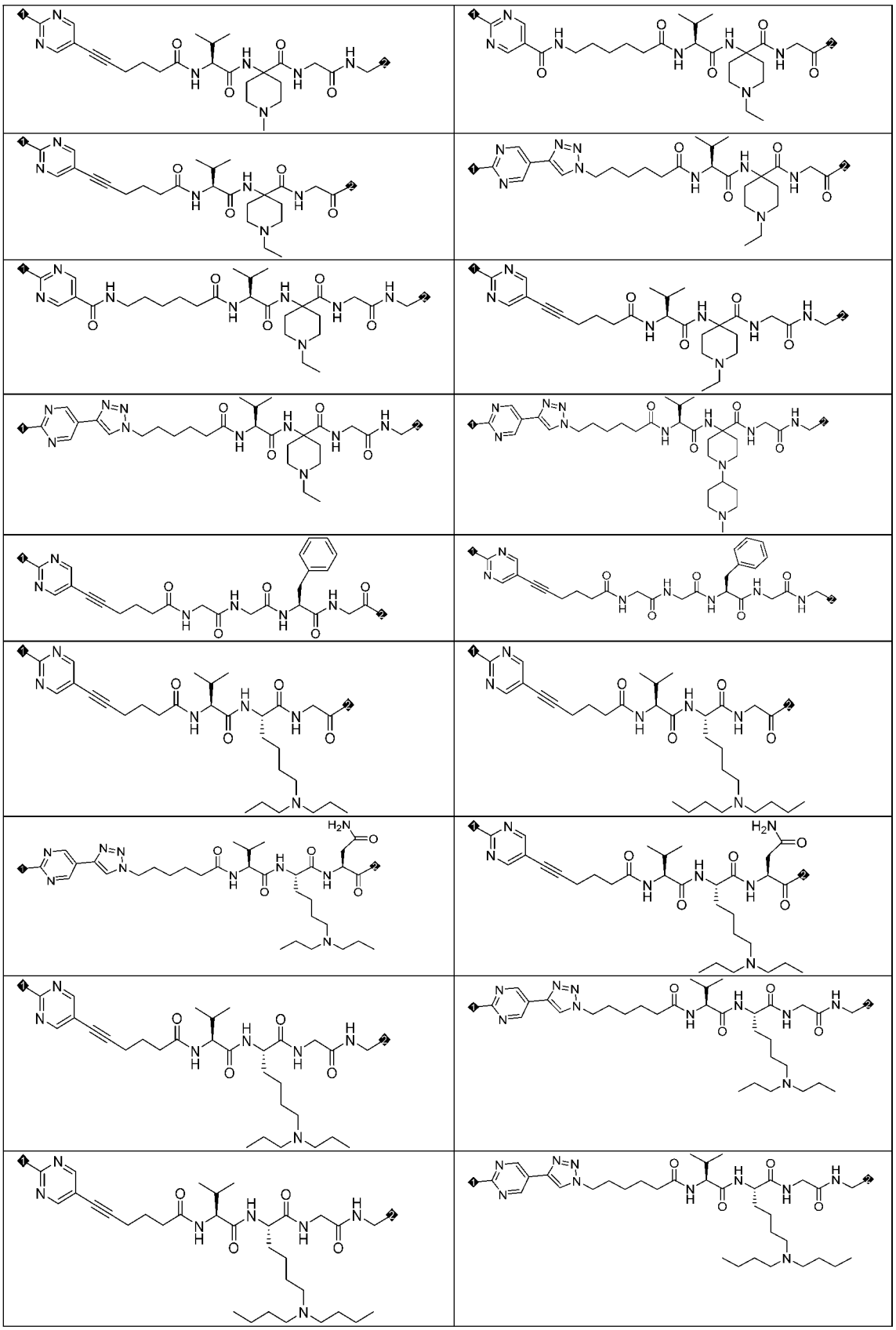
【0413】在一些實施方案中，Lg選自F、Cl、$MeSO_2$-。

【0414】在一些實施方案中，Lg選自F、$MeSO_2$-。

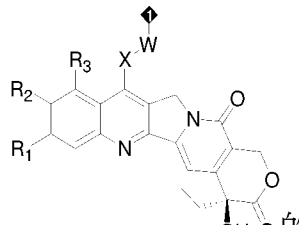
【0415】在一些實施方案中，❶—L_1—L_2—L_3—L_4—❷的結構選自以下：



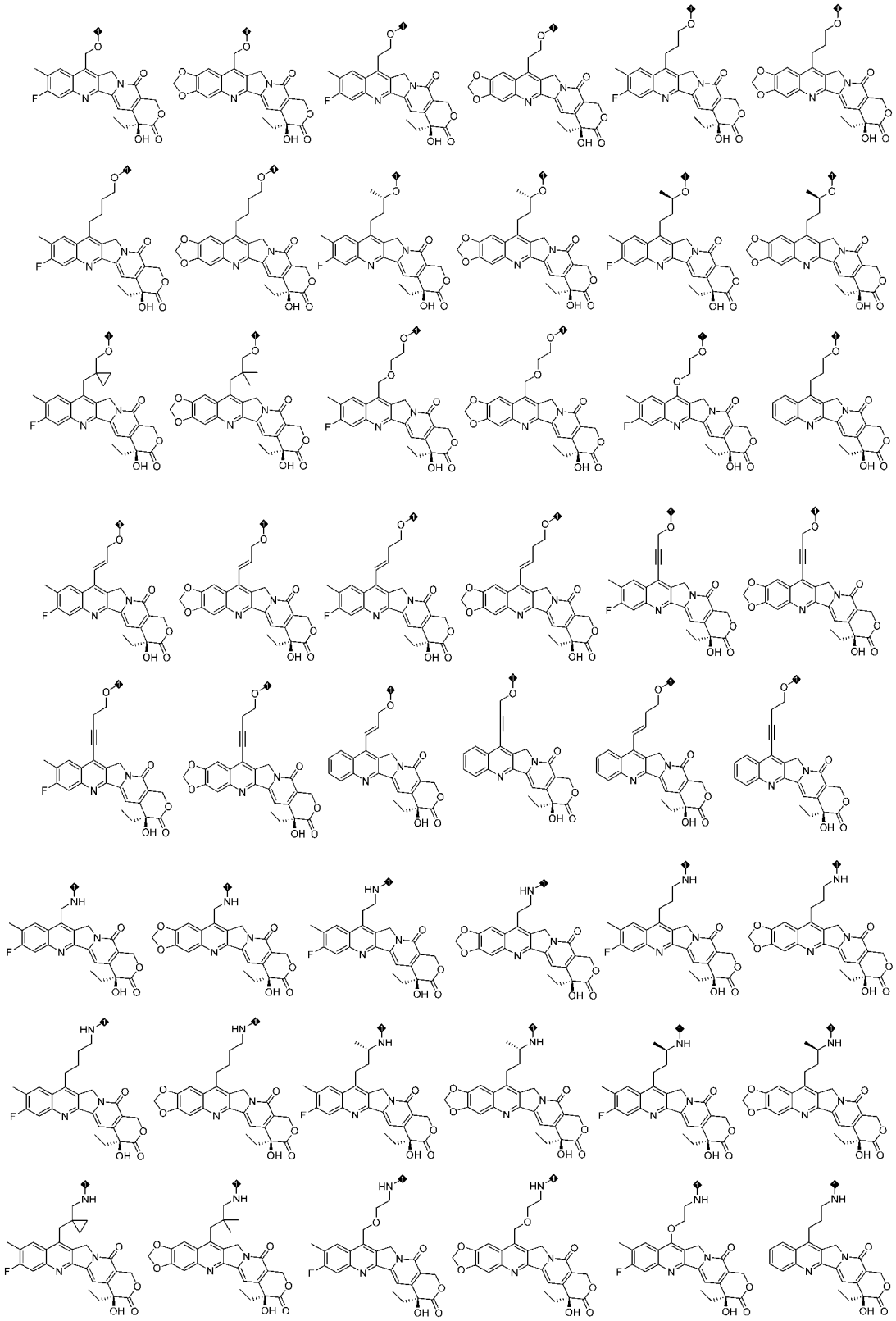


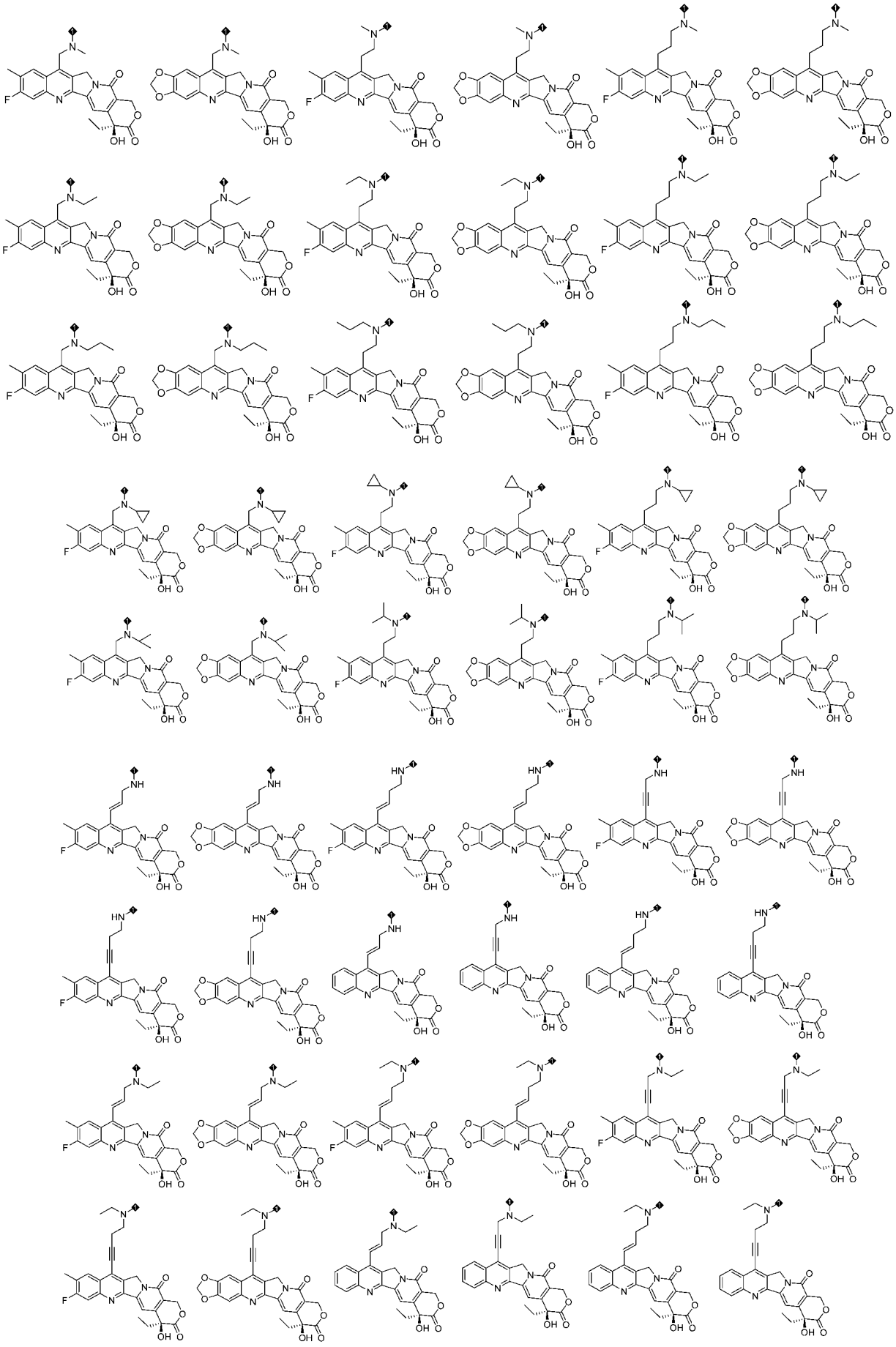


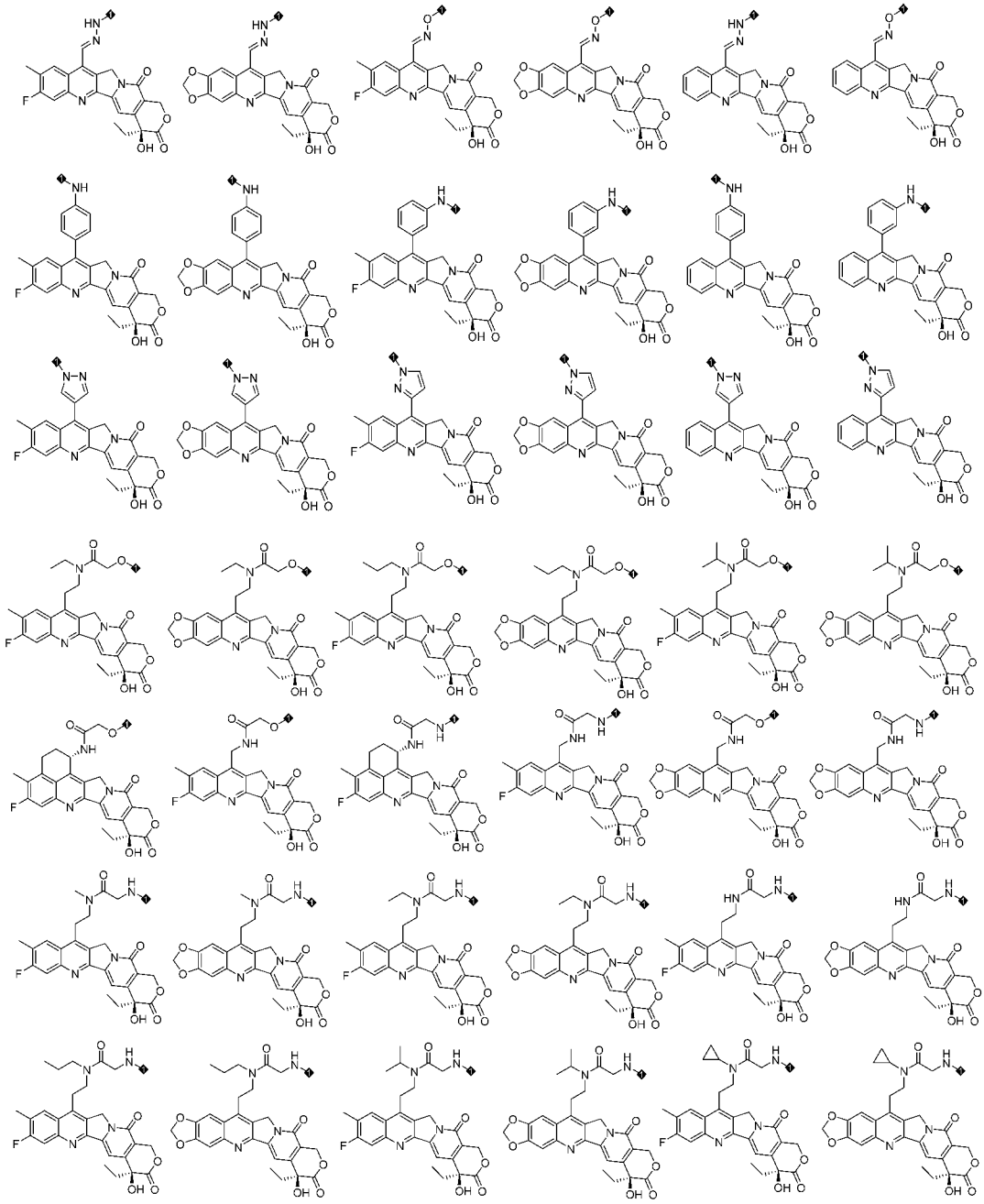
其中，1 位與 Lg 相連，2 位與 W 相連。



【0416】在一些實施方案中，的結構選自以下：

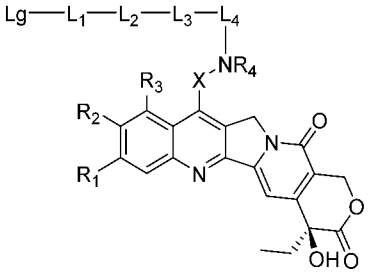






其中，1位與L_4相連；當L_4不存在時，1位與L_3相連。

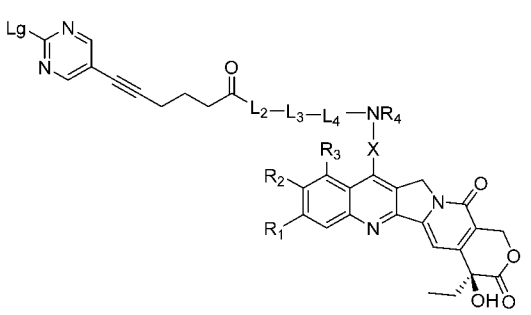
【0417】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(1)所式結構：



III-(1) ，

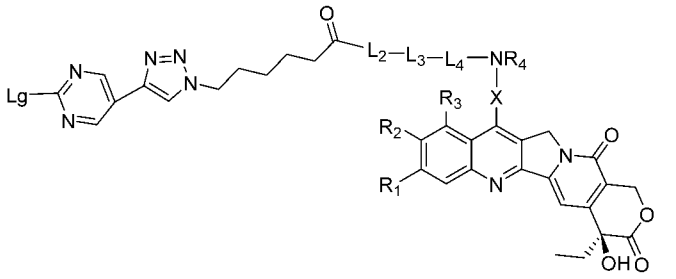
其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0418】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(1A)或III-(1B)所式結構：



III-(1A)

、

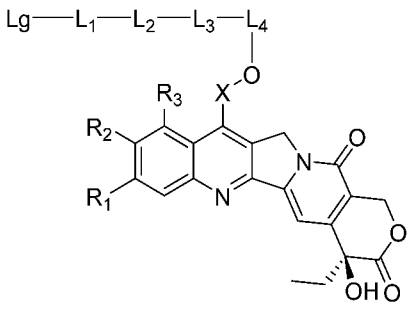


III-(1B)

，

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0419】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(2)所式結構：

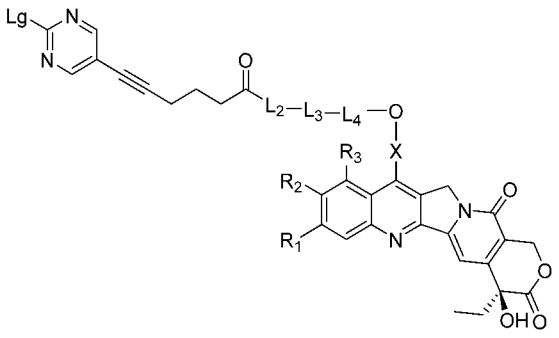


III-(2)

，

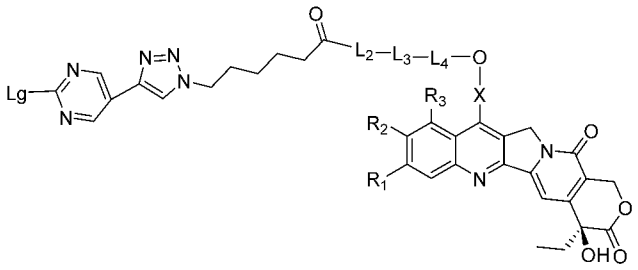
其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0420】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(2A)或III-(2B)所式結構：



III-(2A)

、

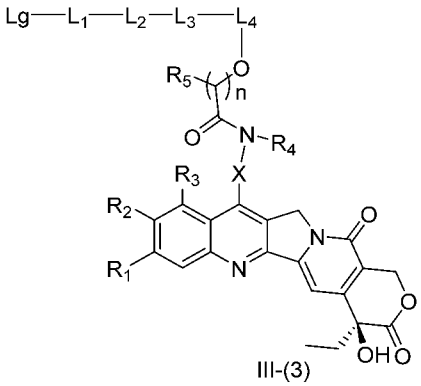


III-(2B)

，

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0421】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(3)所式結構：

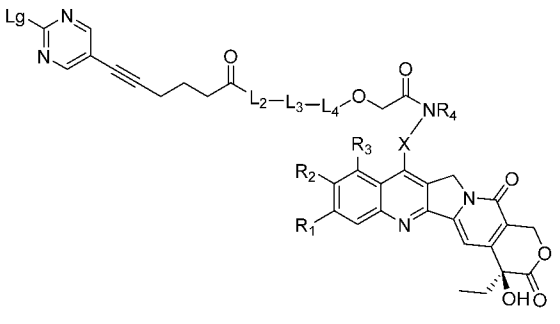


III-(3)

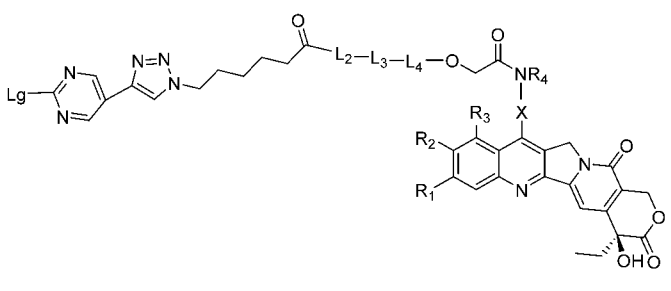
，

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0422】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-(3A)或III-(3B)所式結構：



III-(3A)

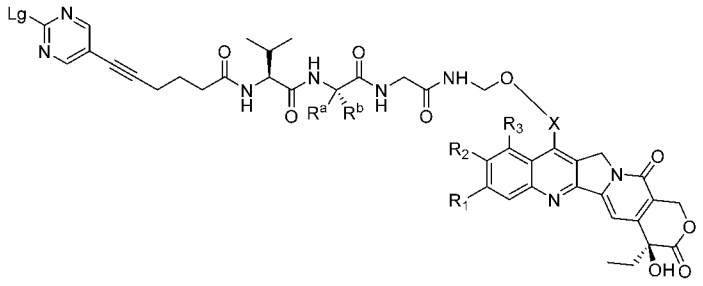


III-(3B)

，

其中，Lg、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

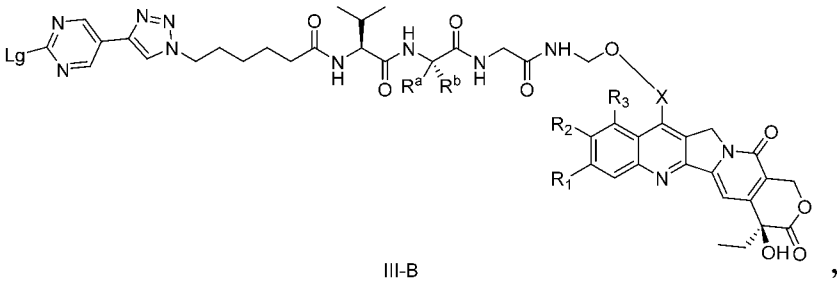
【0423】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-A所式結構：



III-A ，

其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

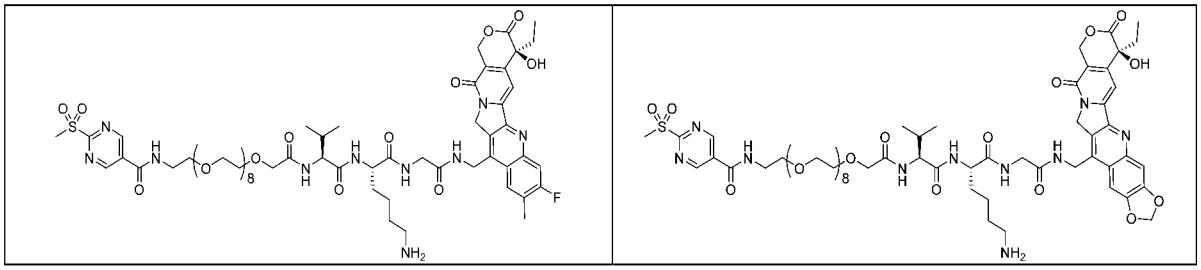
【0424】在一些實施方案中，藥物連接體偶聯物具有式III-B所式結構：

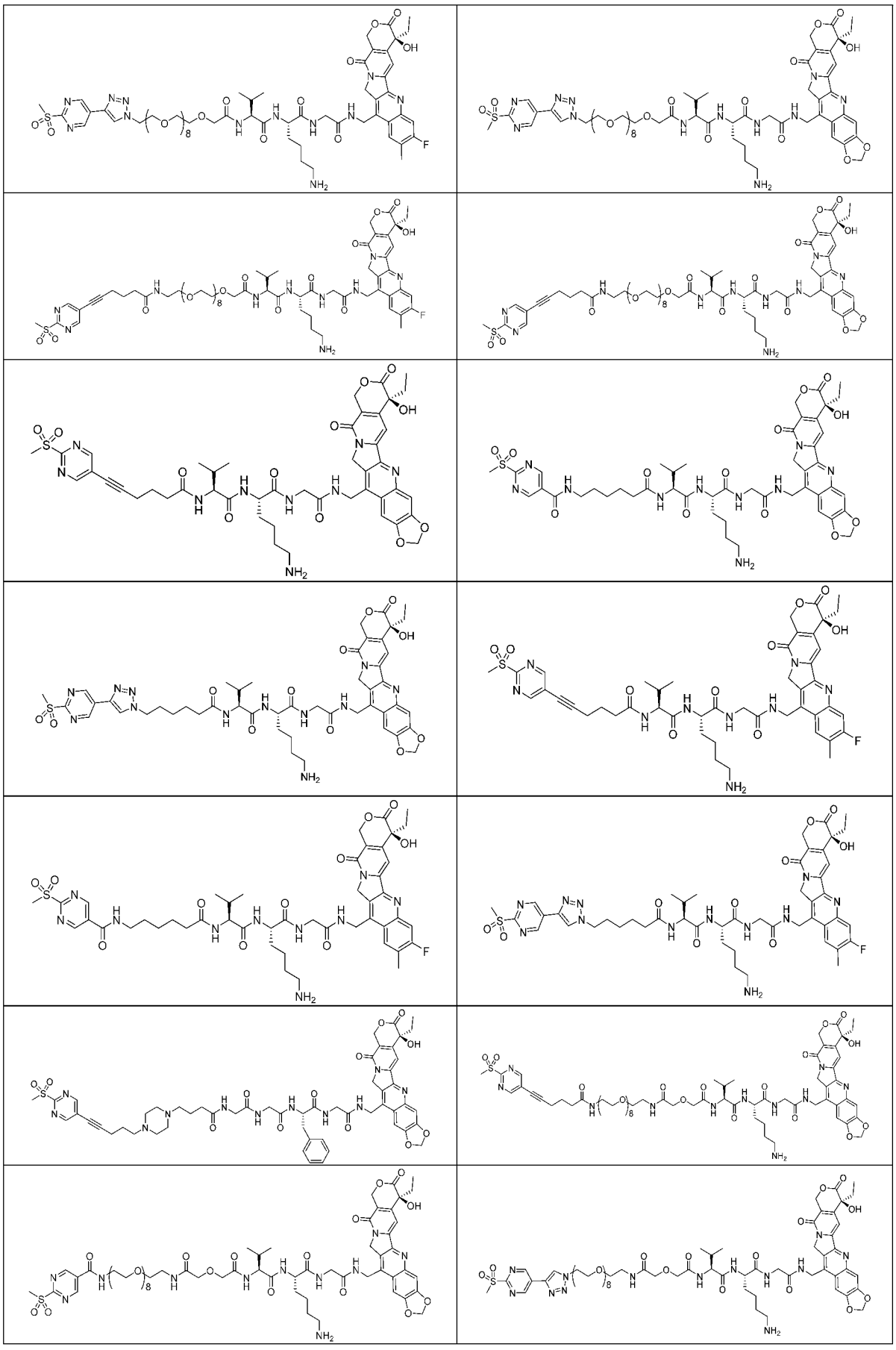


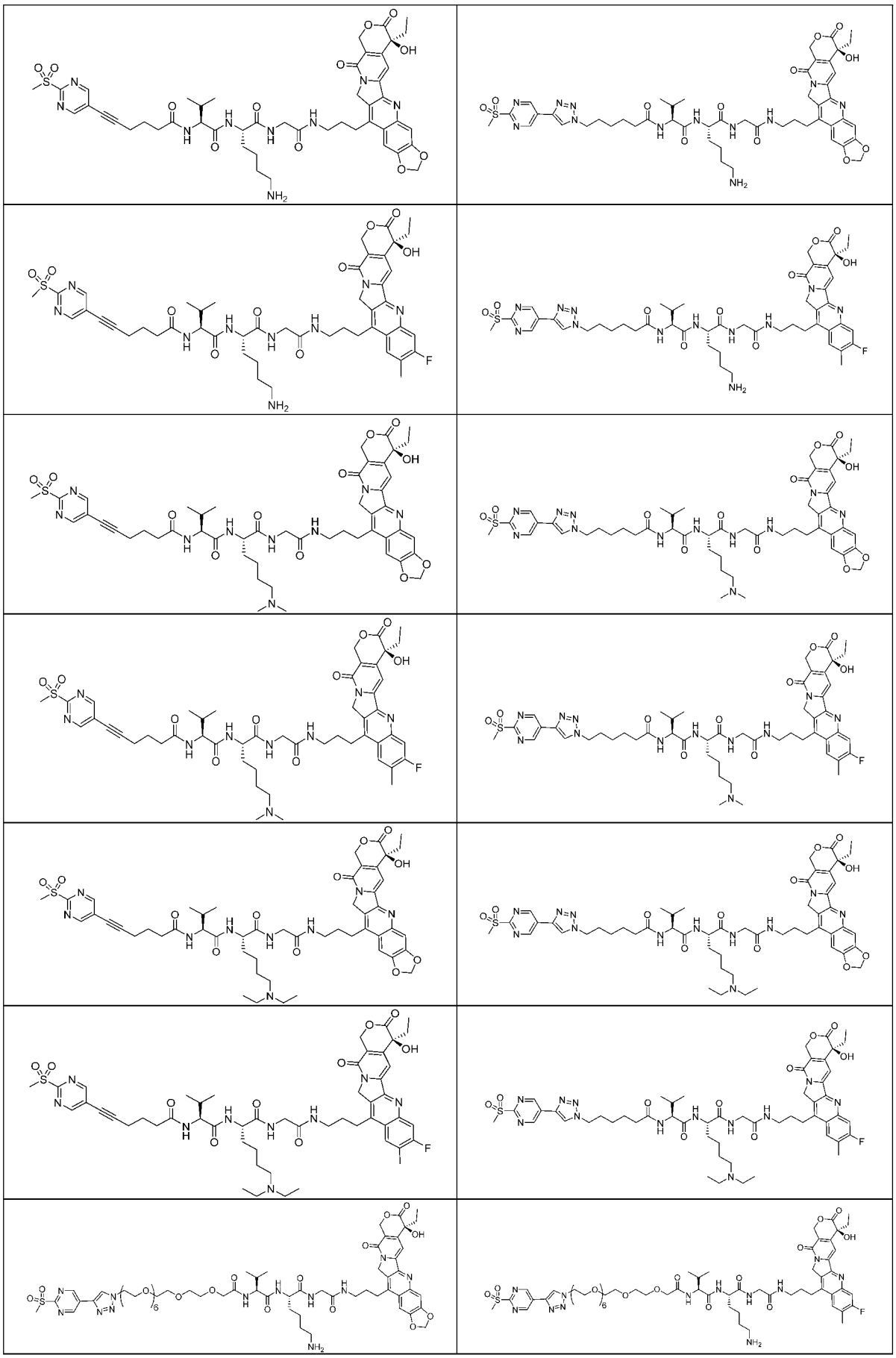
III-B ，

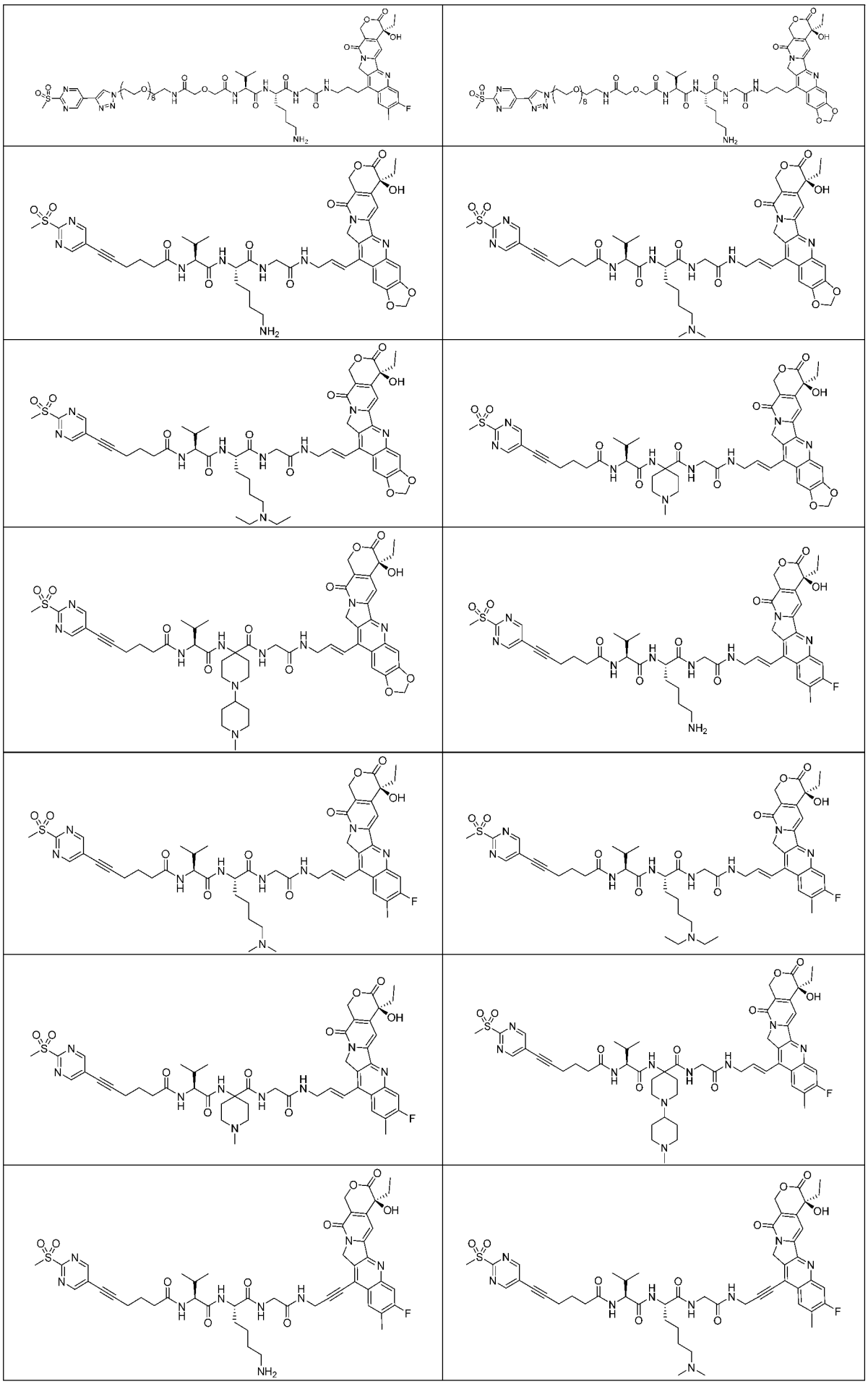
其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

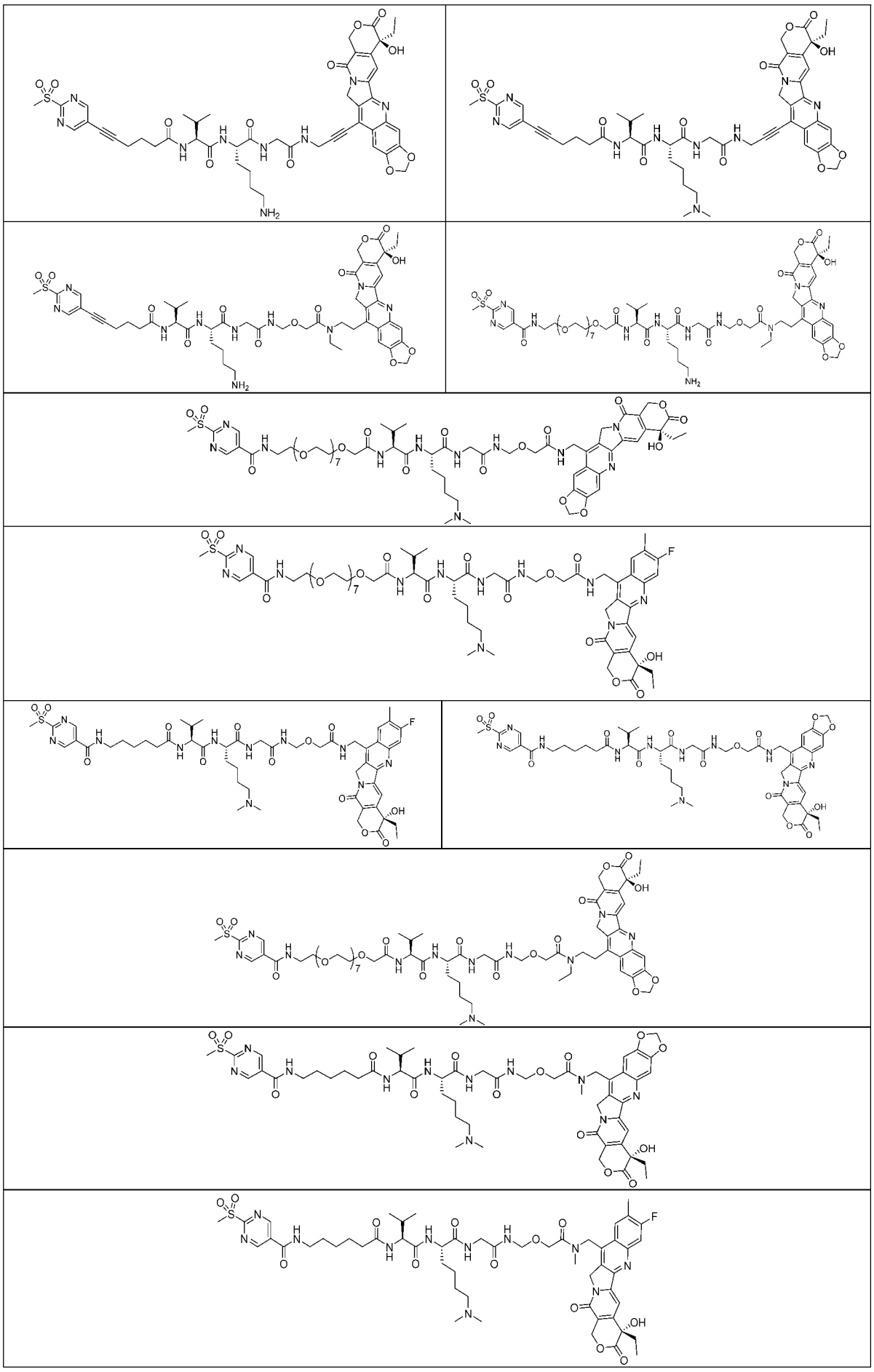
【0425】在一些實施方案中，式III所示的藥物連接體偶聯物選自以下結構：

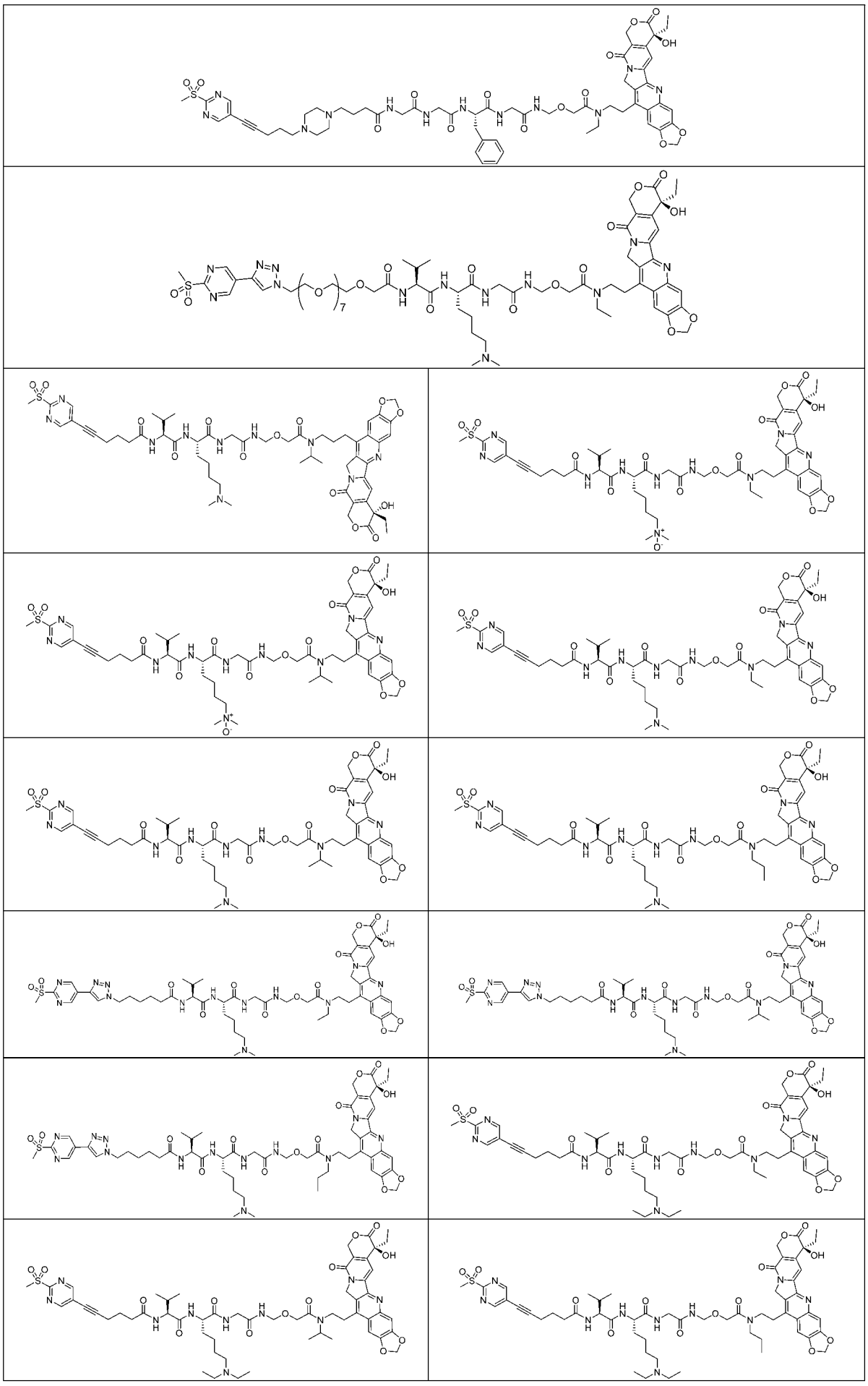


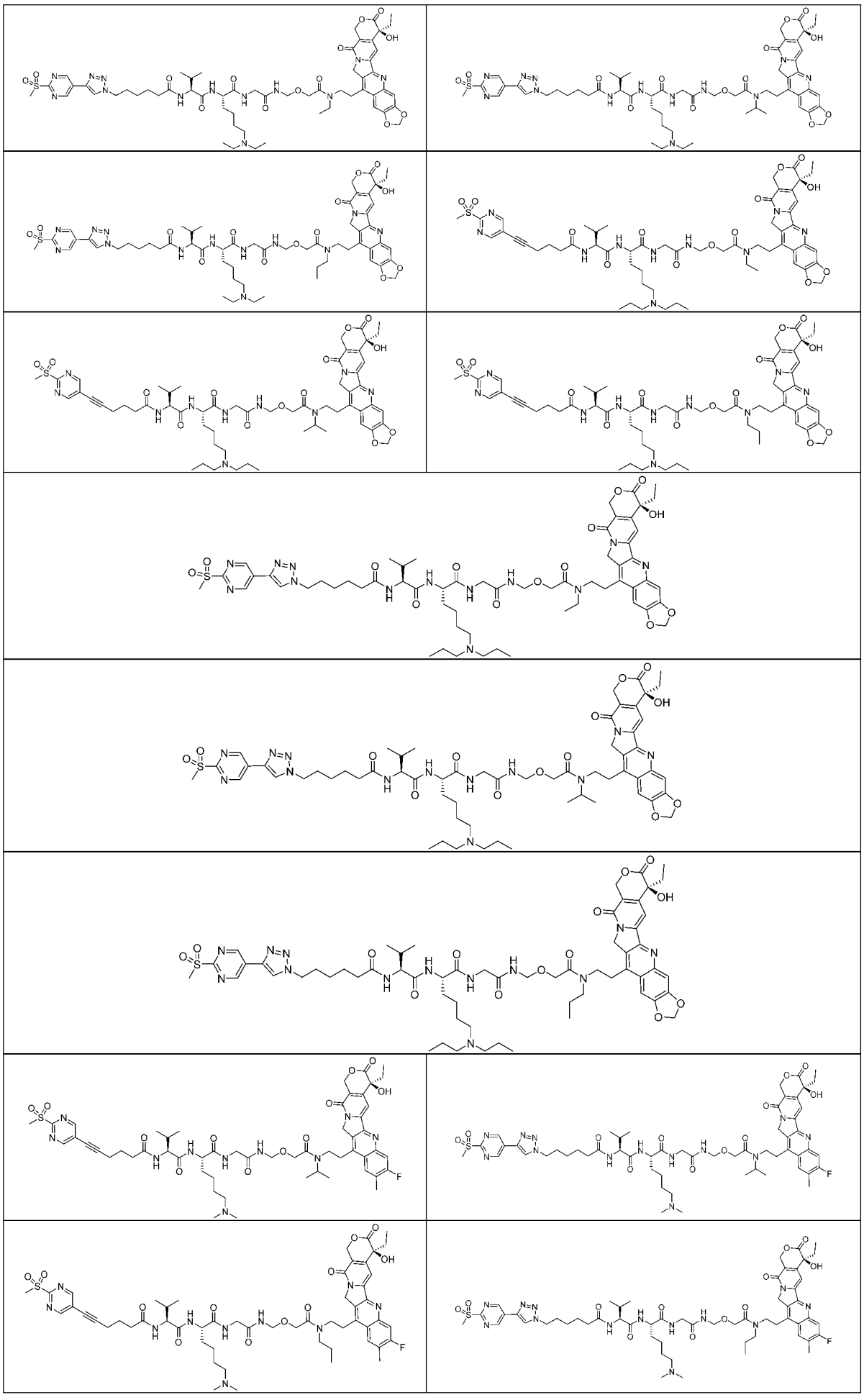


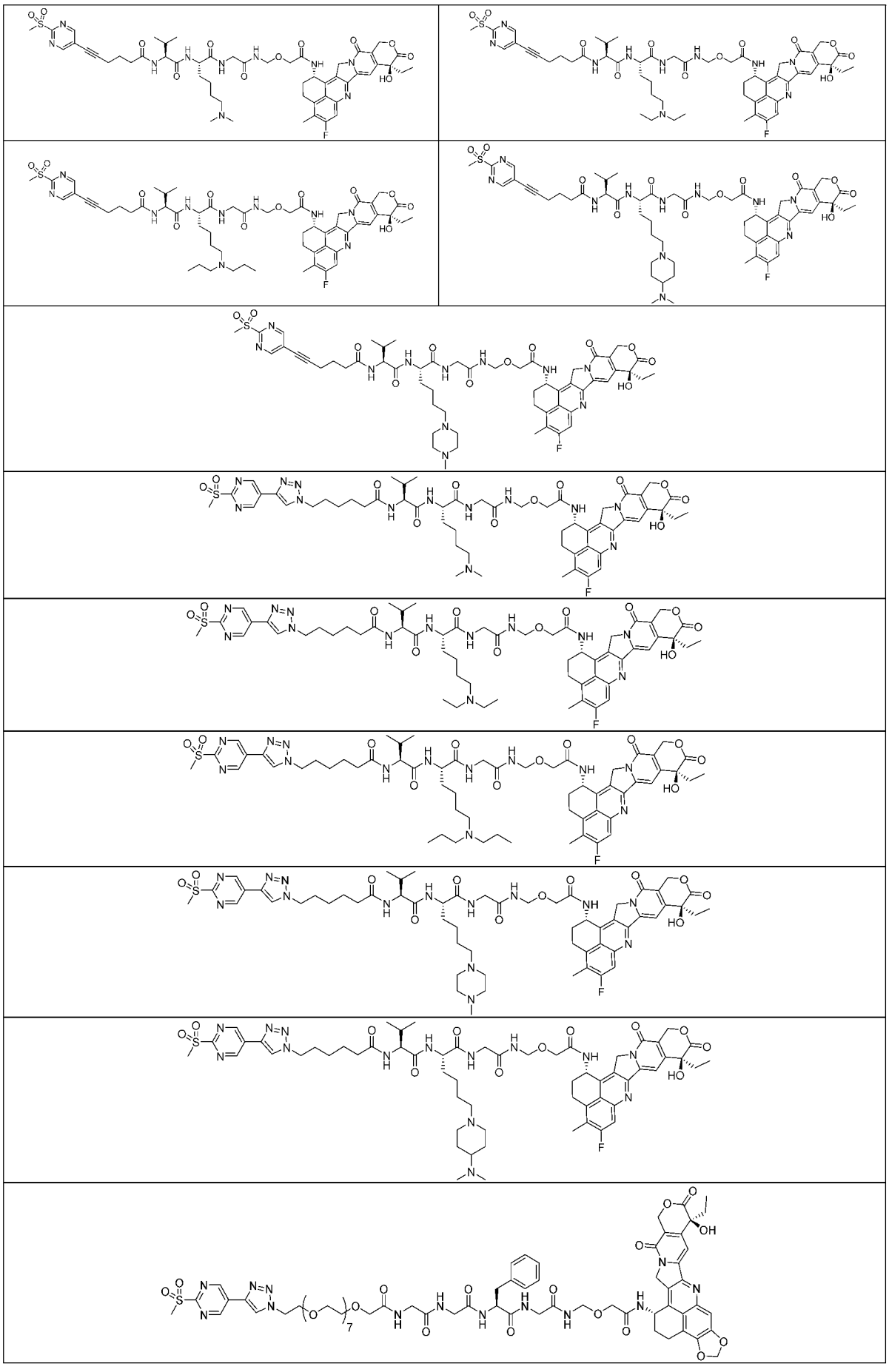


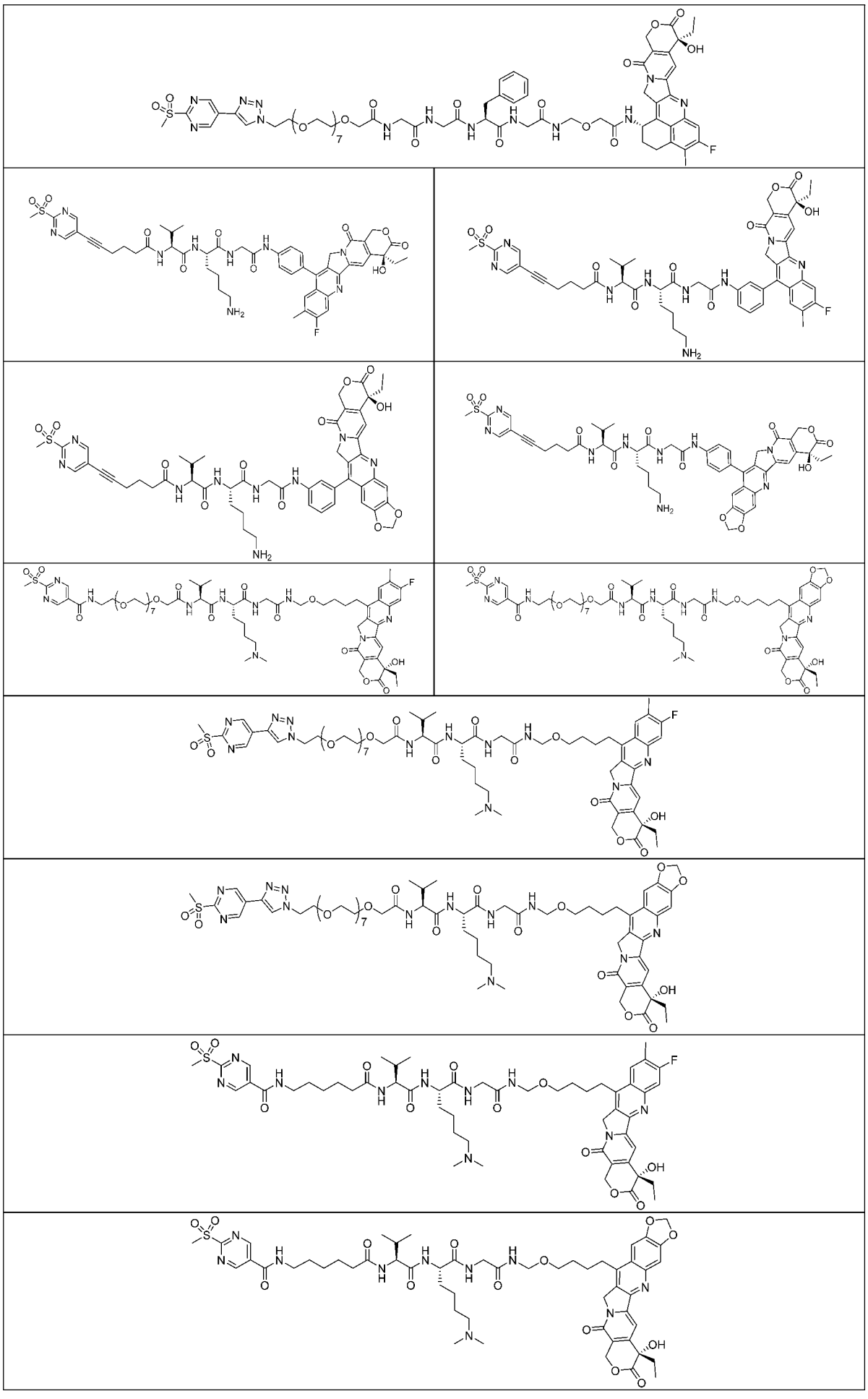


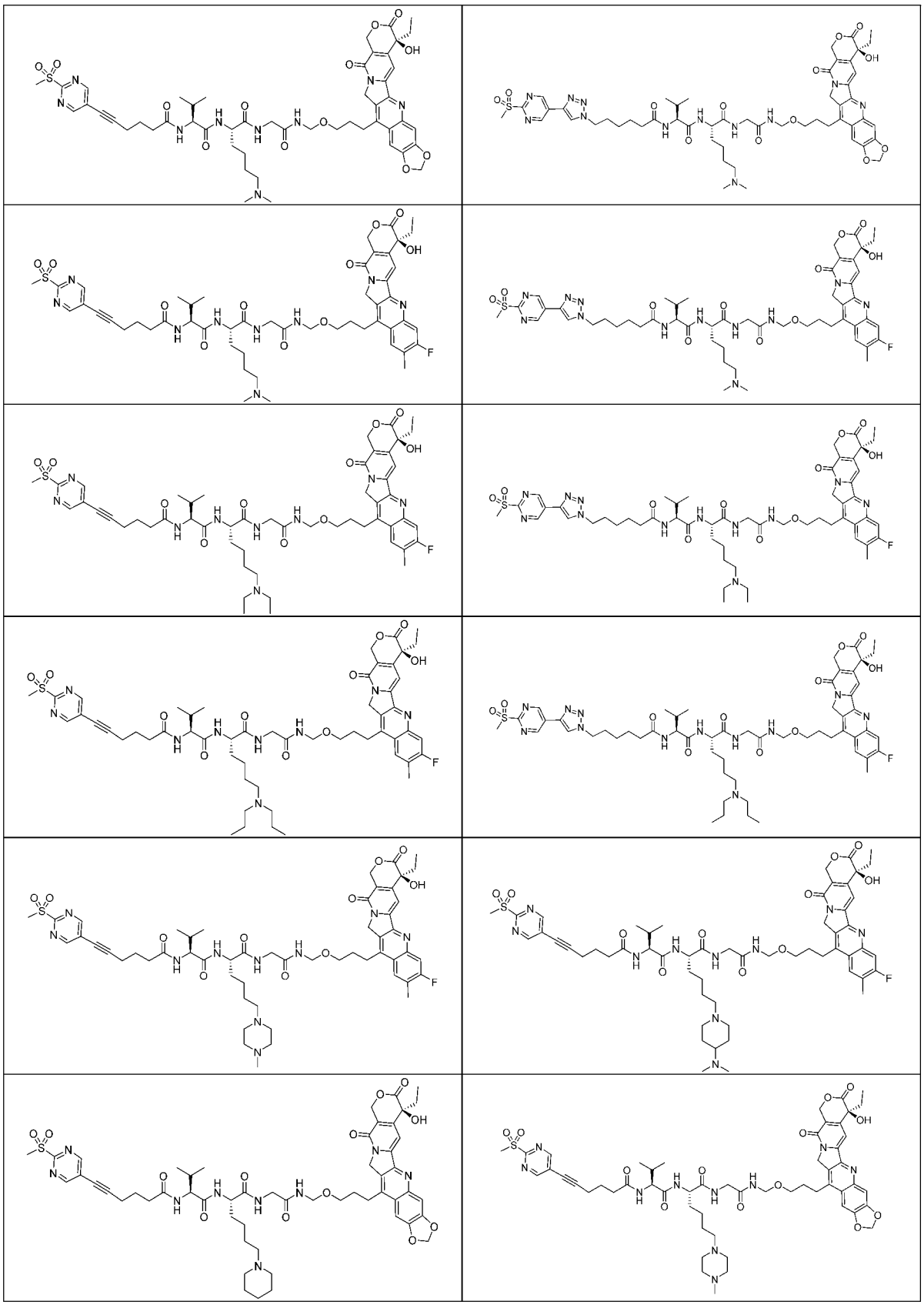


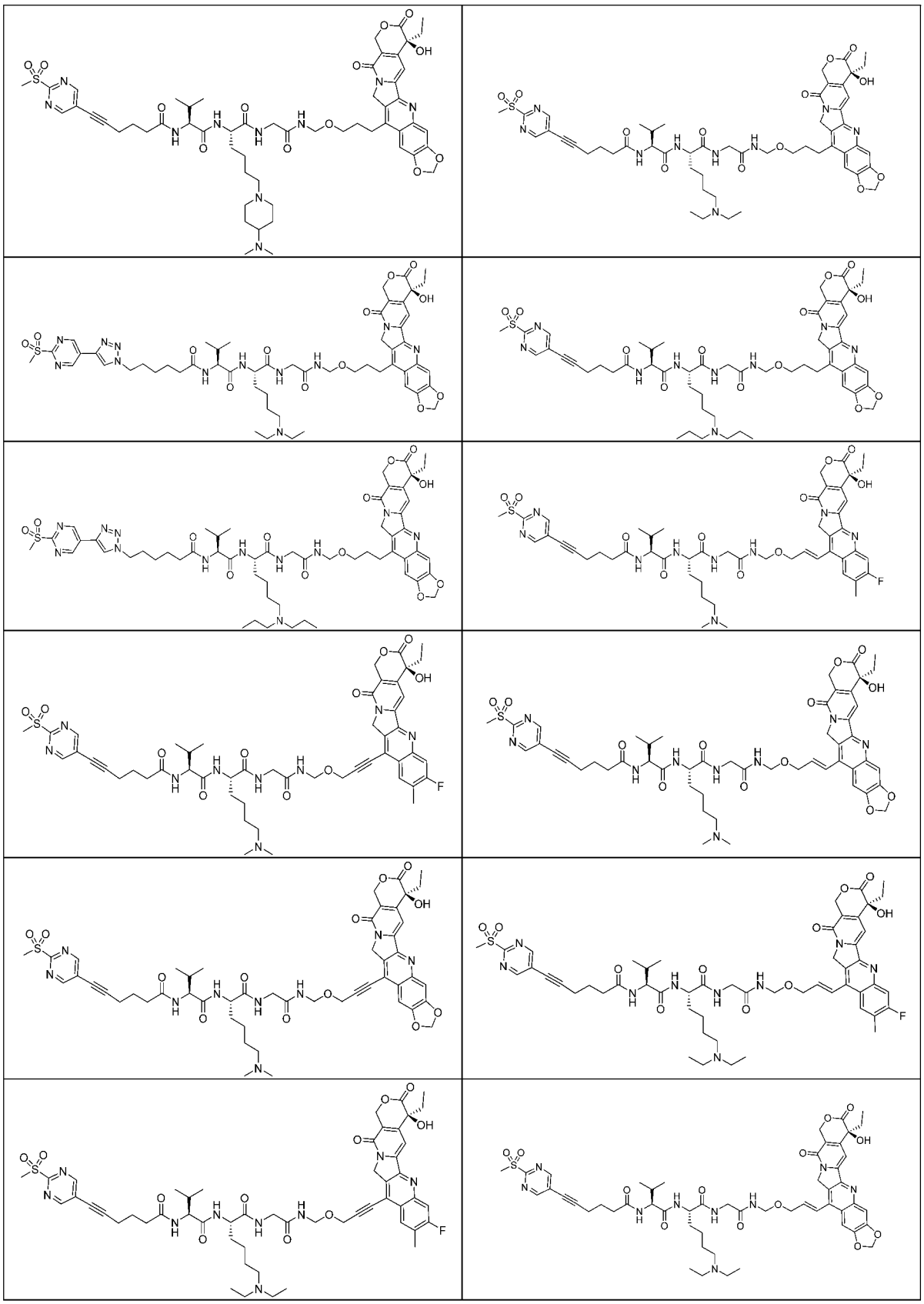


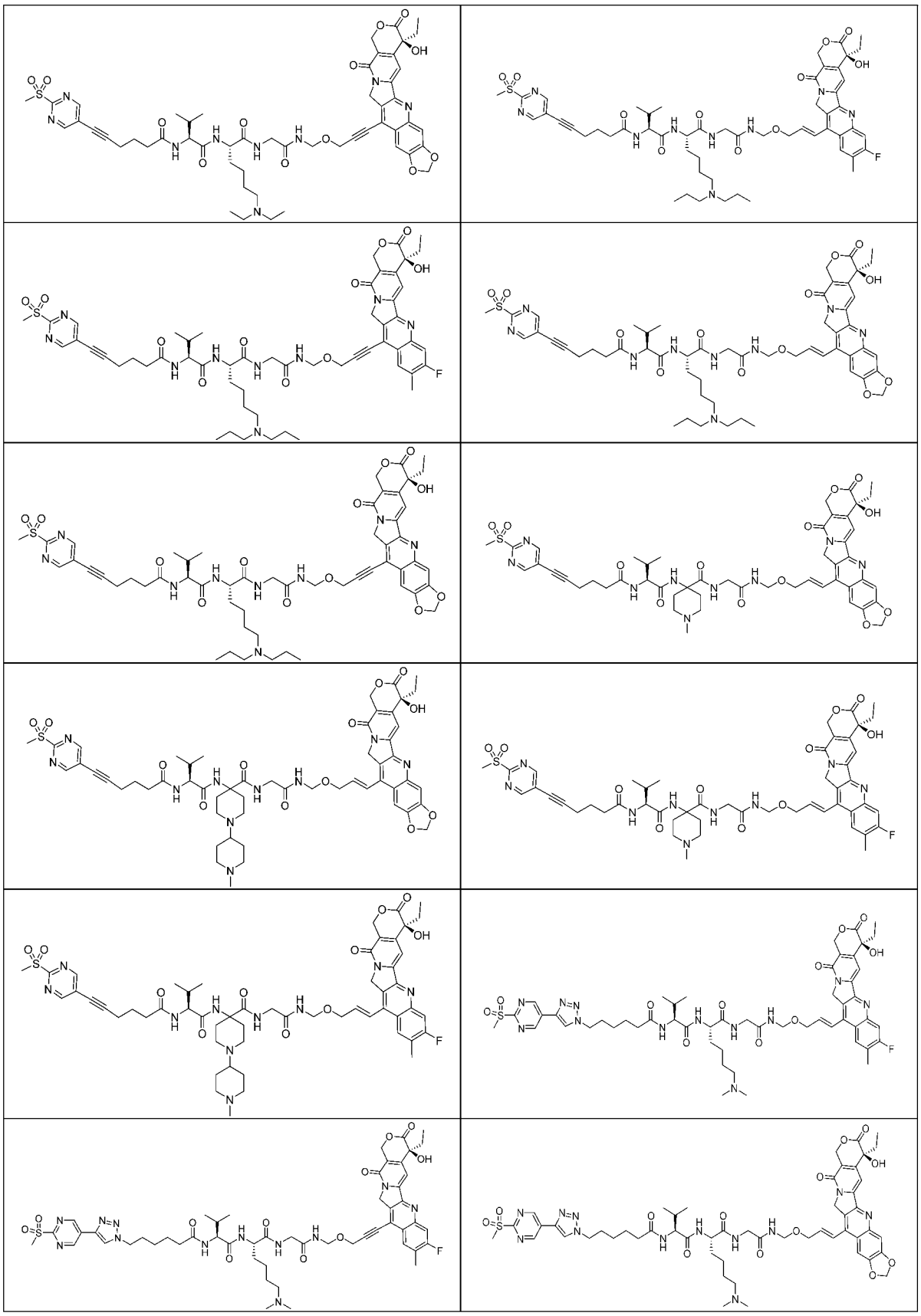


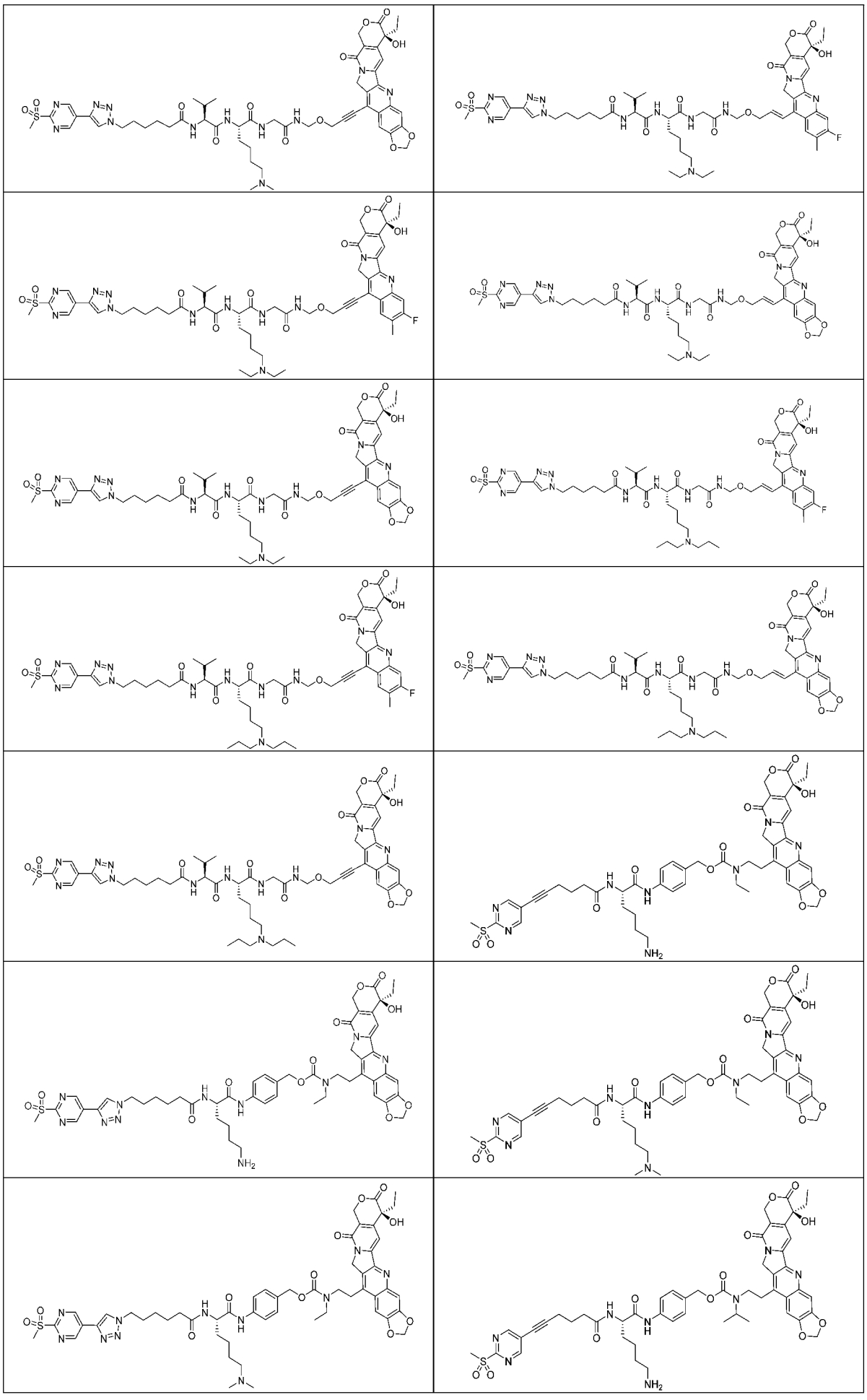


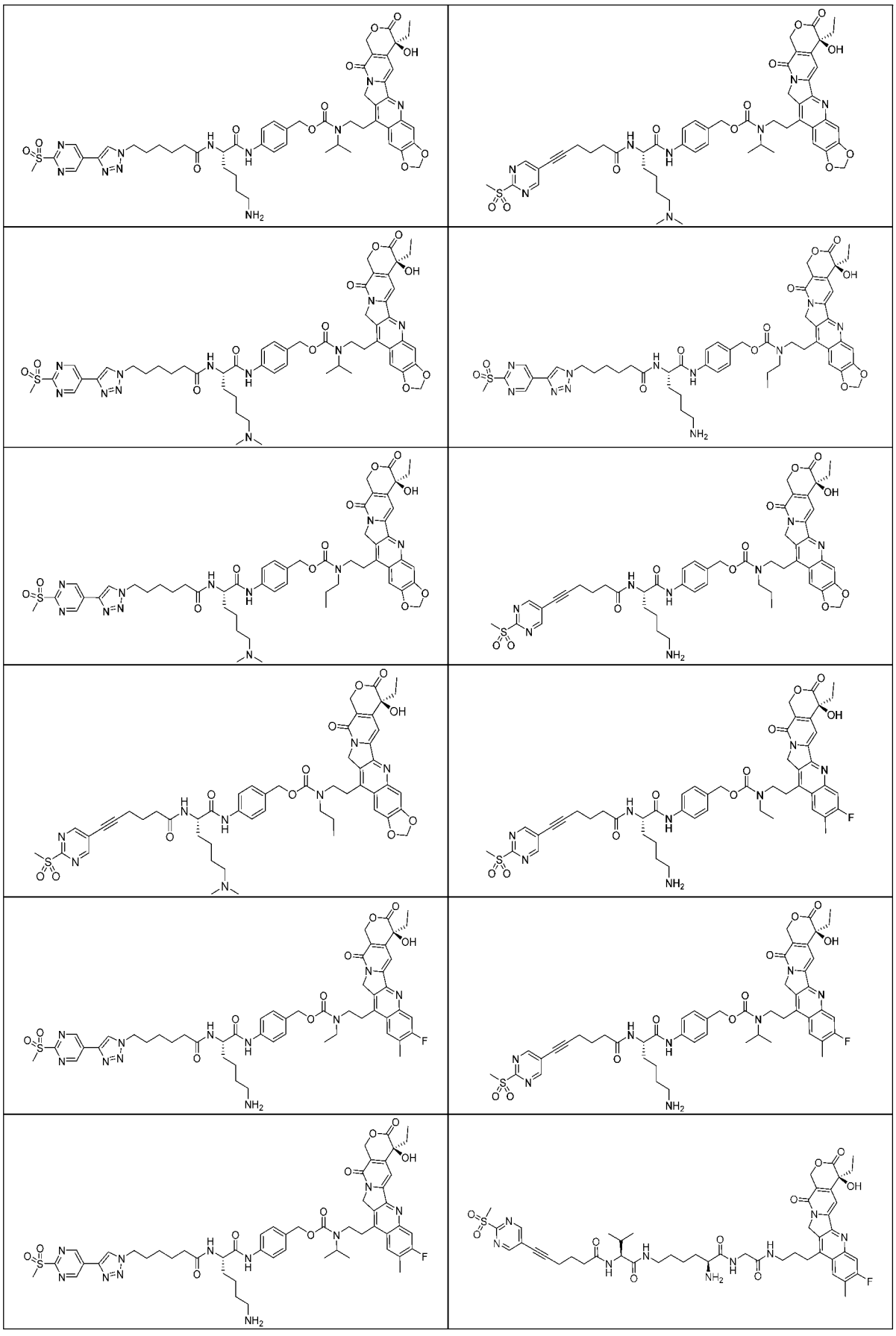


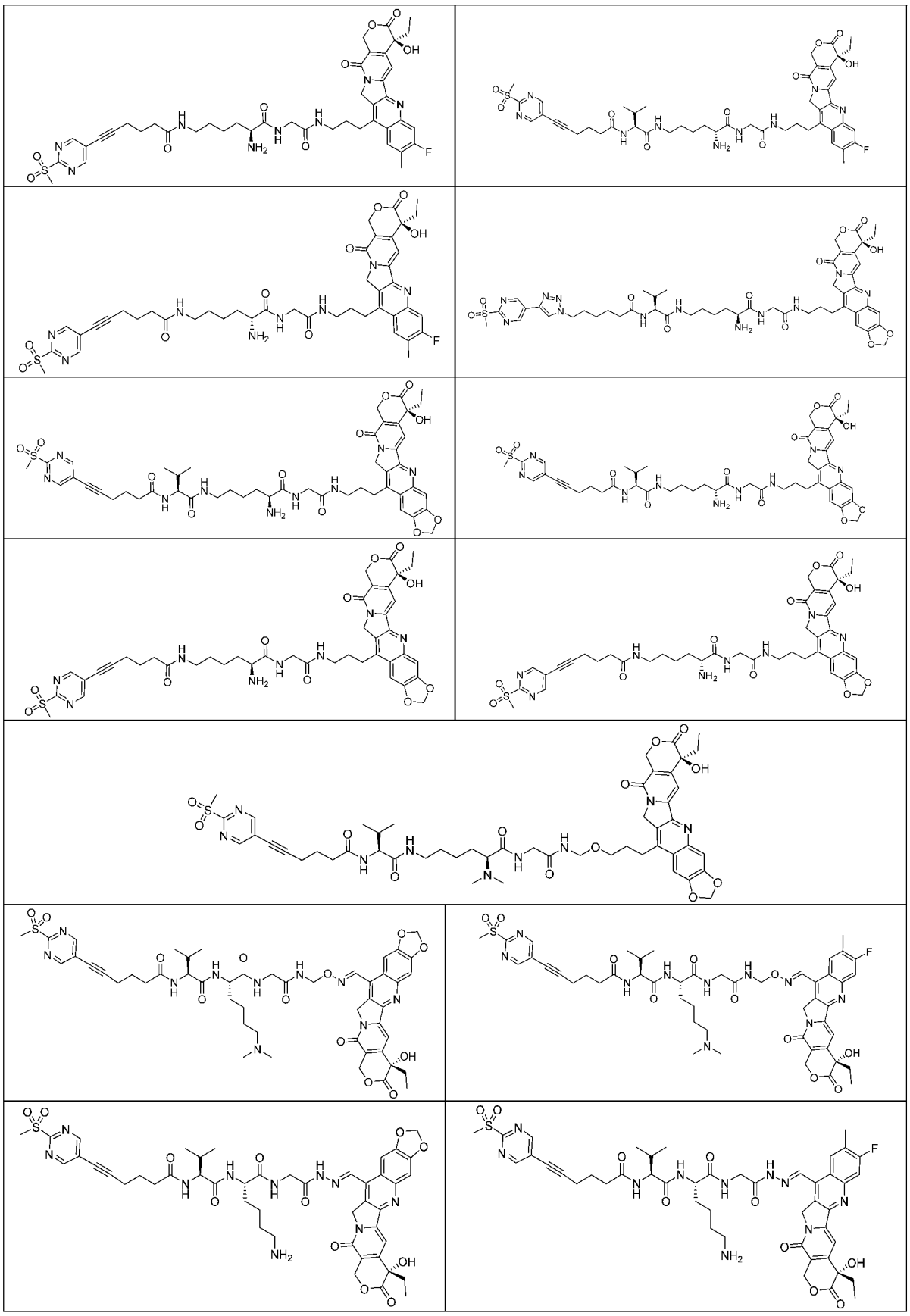


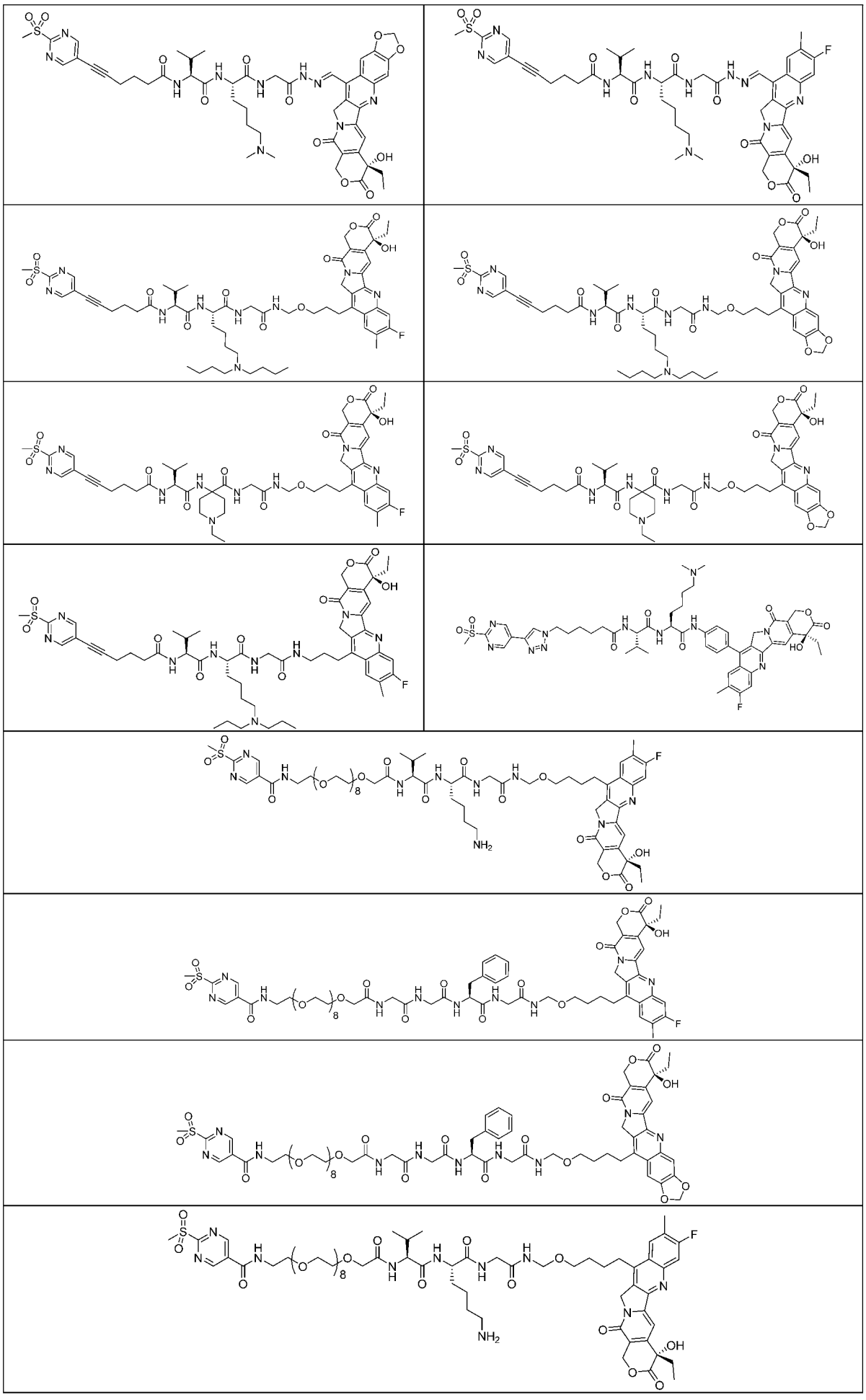


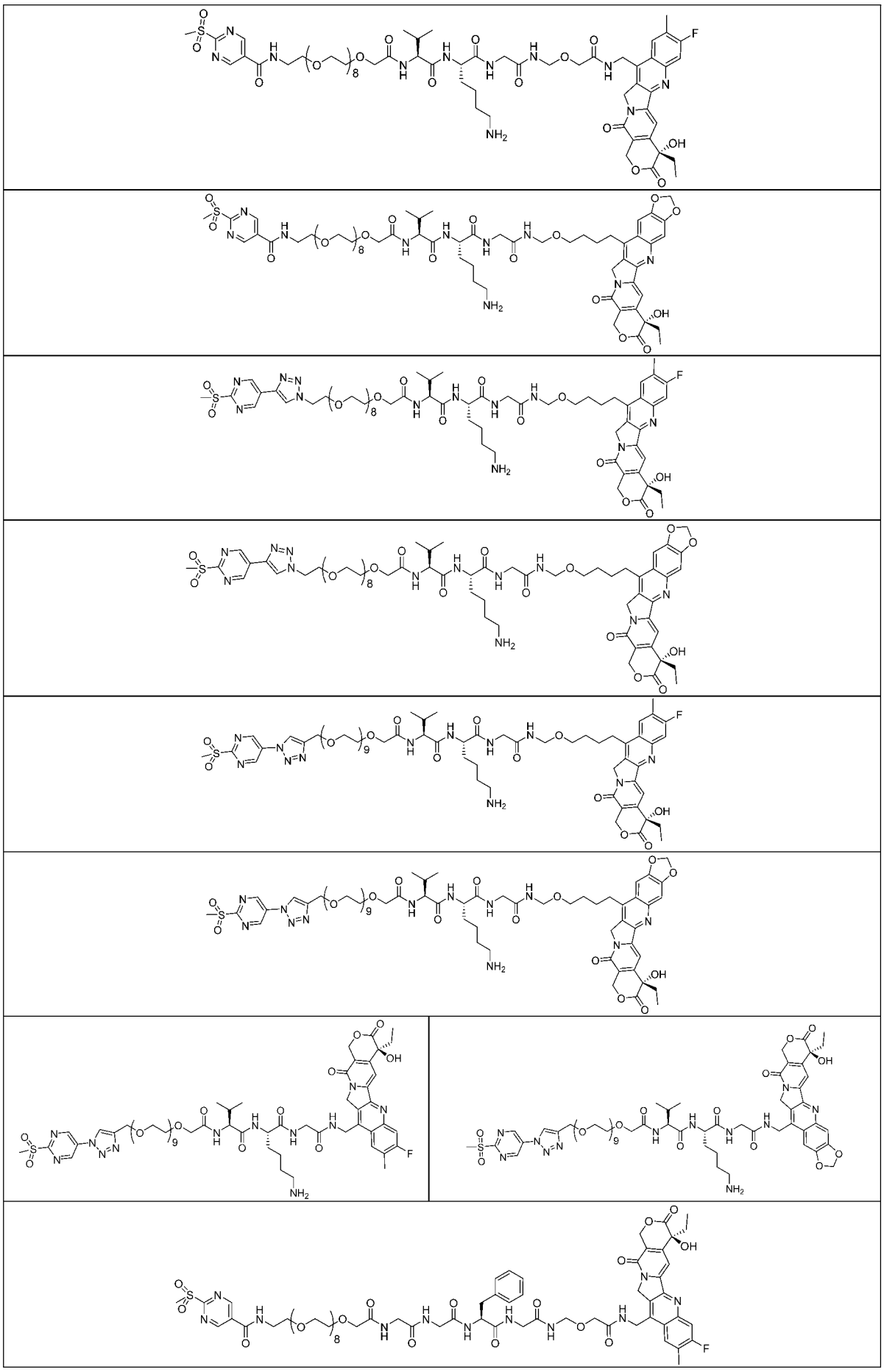


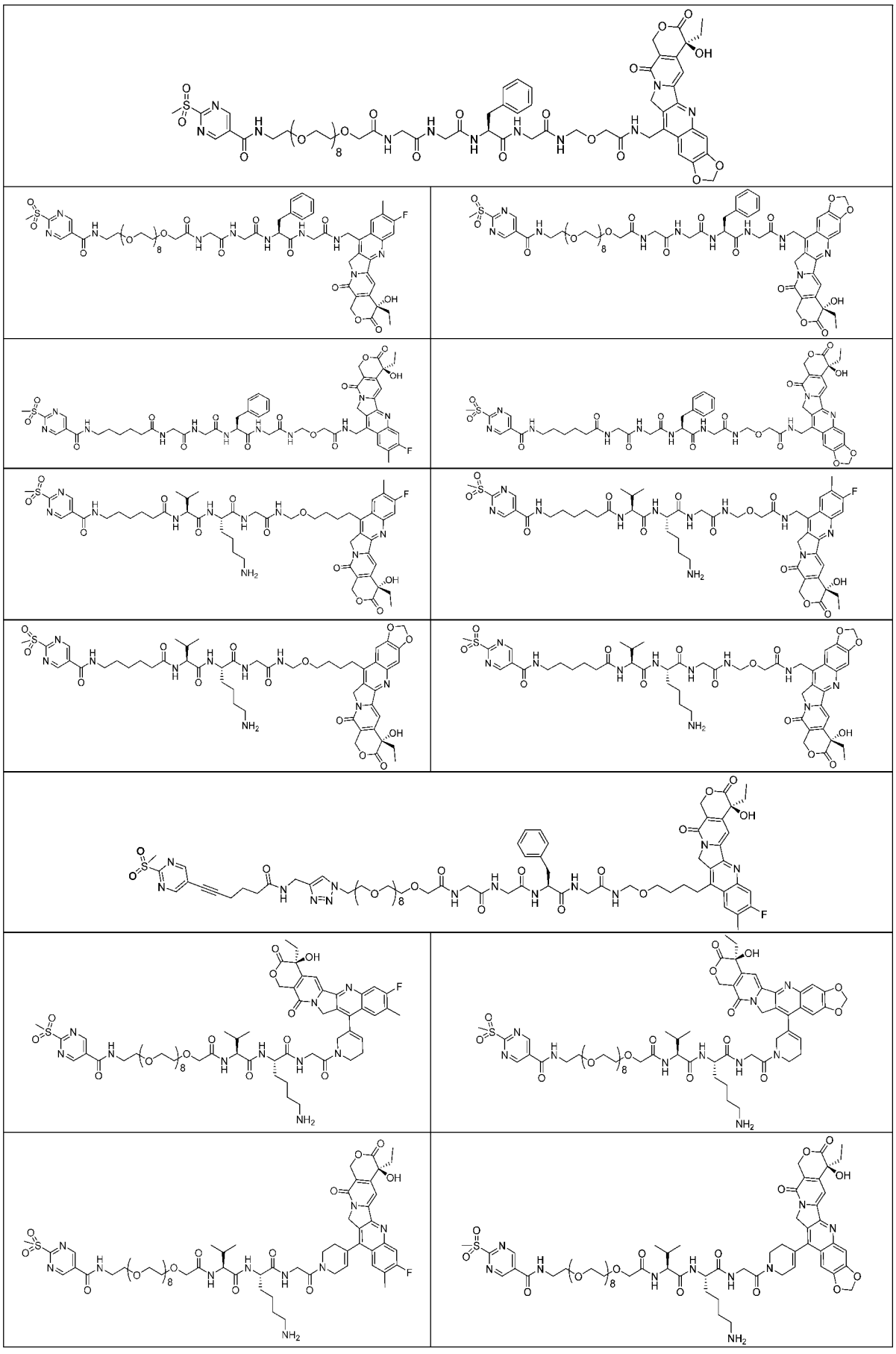


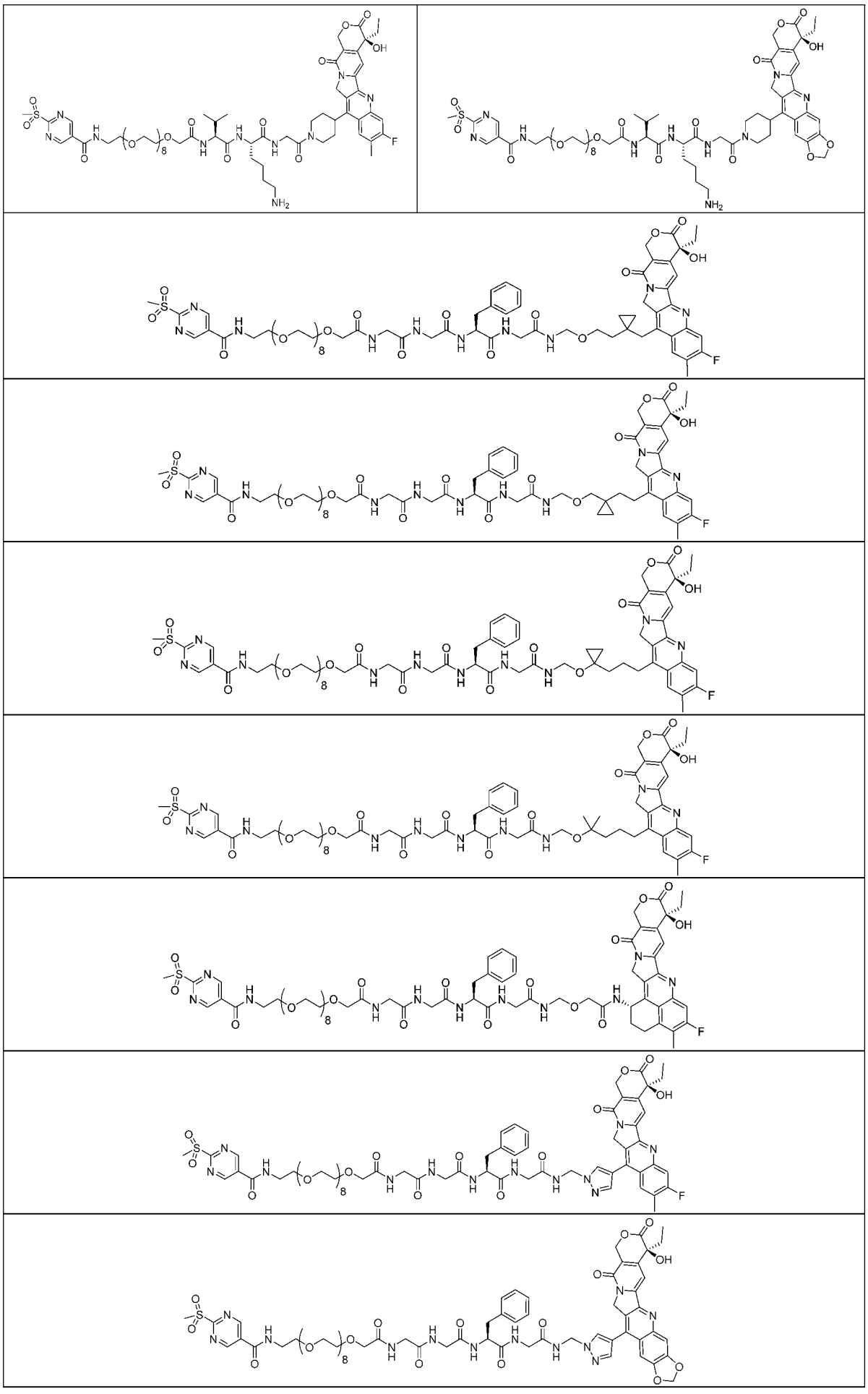


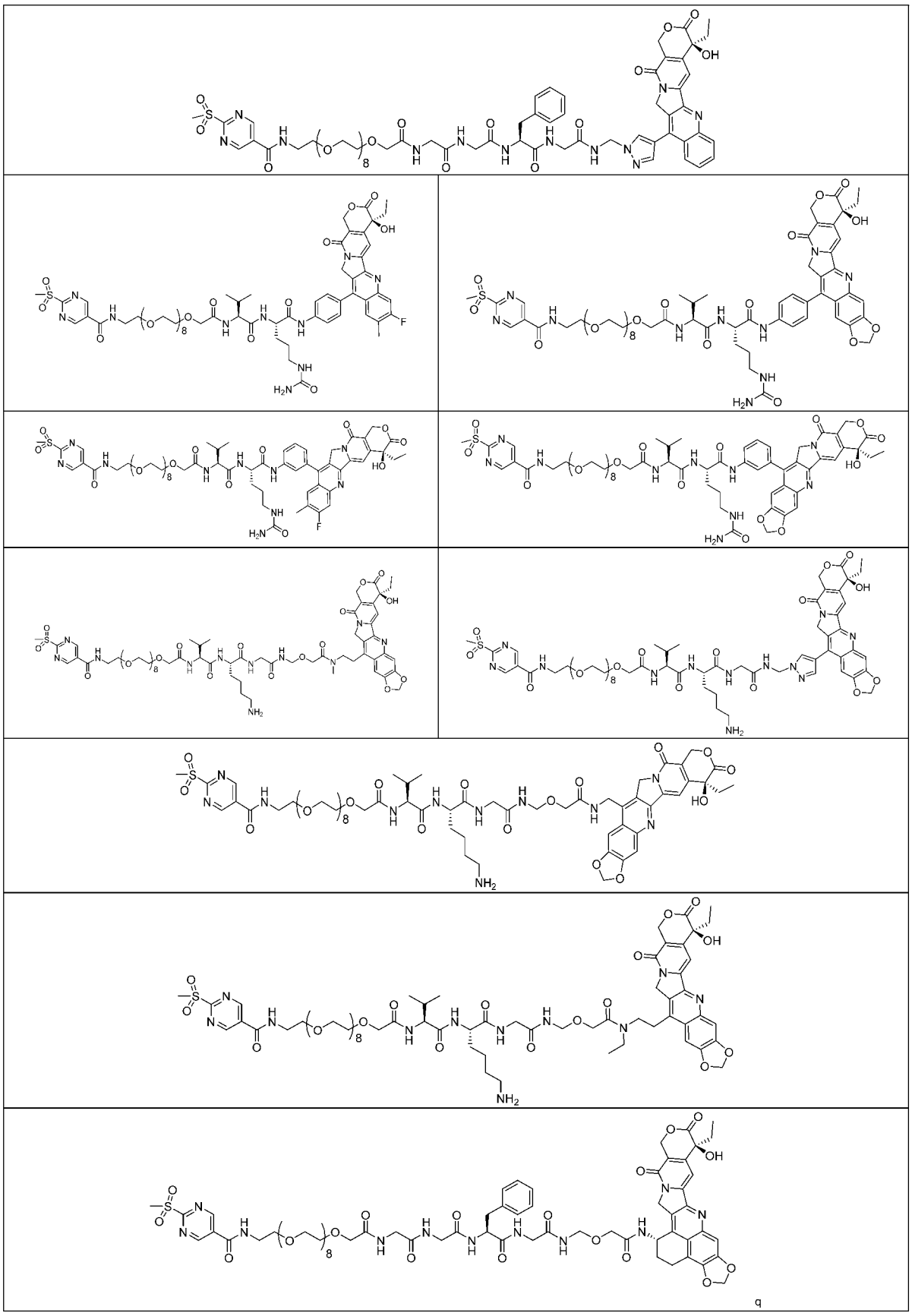


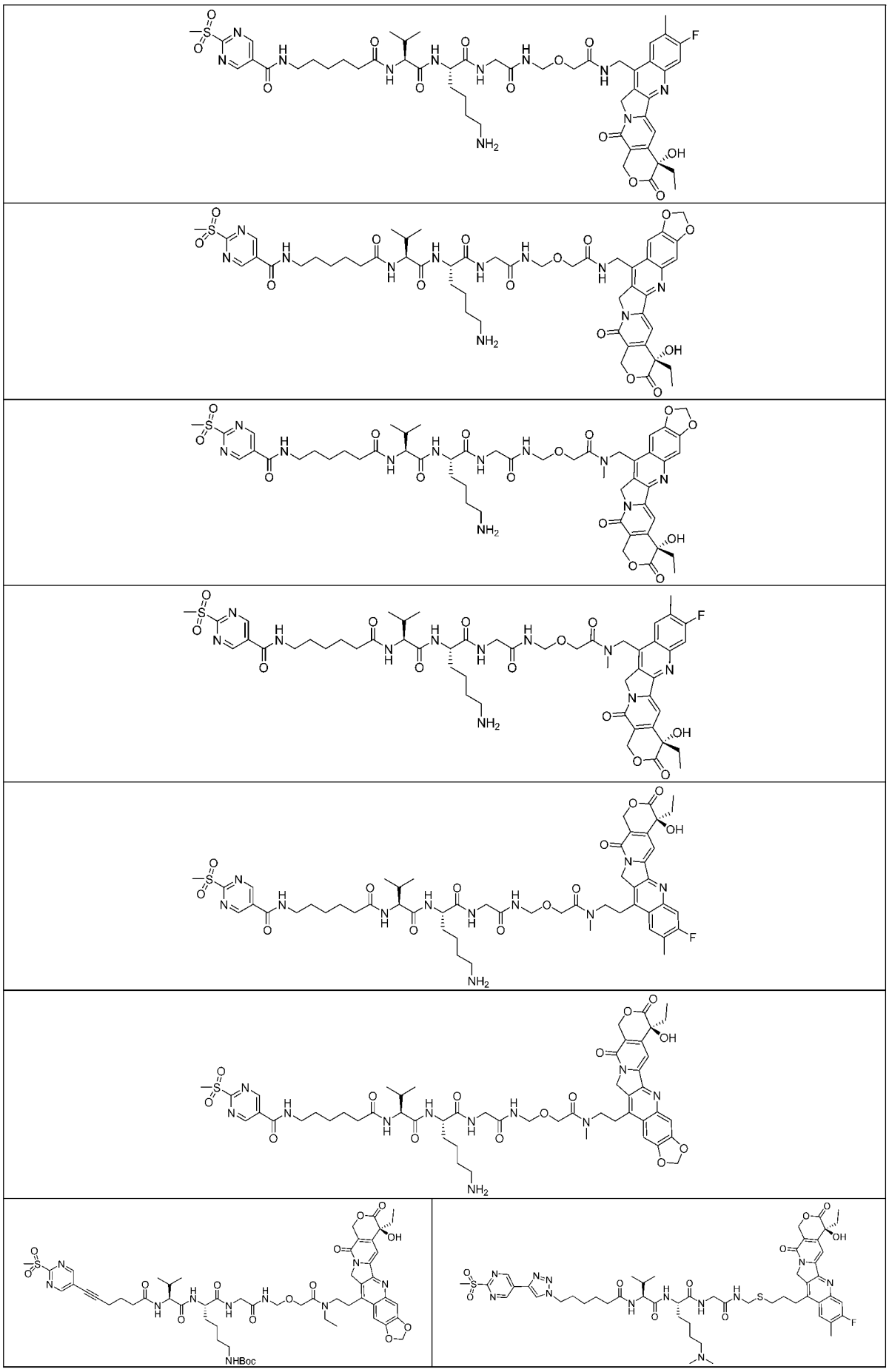


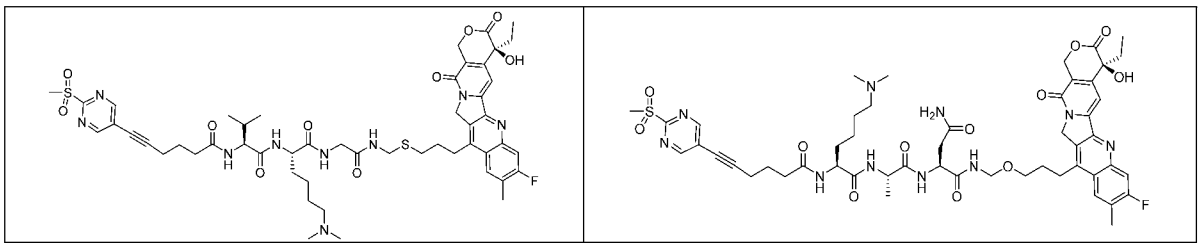








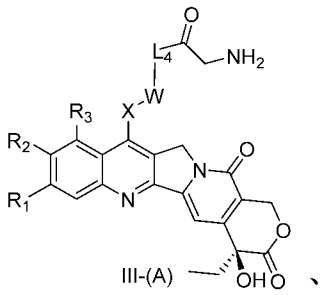




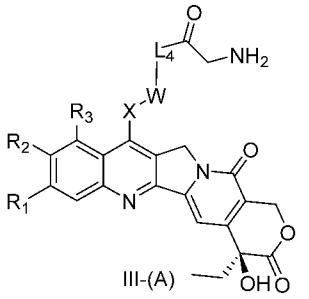
。

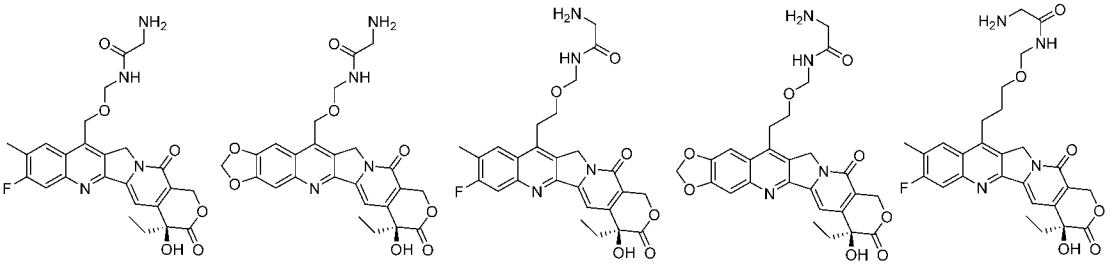
【0426】在一些實施方案中提供了化合物，其中式III所示的藥物連接體偶聯物中的L1-L2-L3單元已被部分裂解，從而留下與之鍵合的胺基酸殘基的藥物部分。

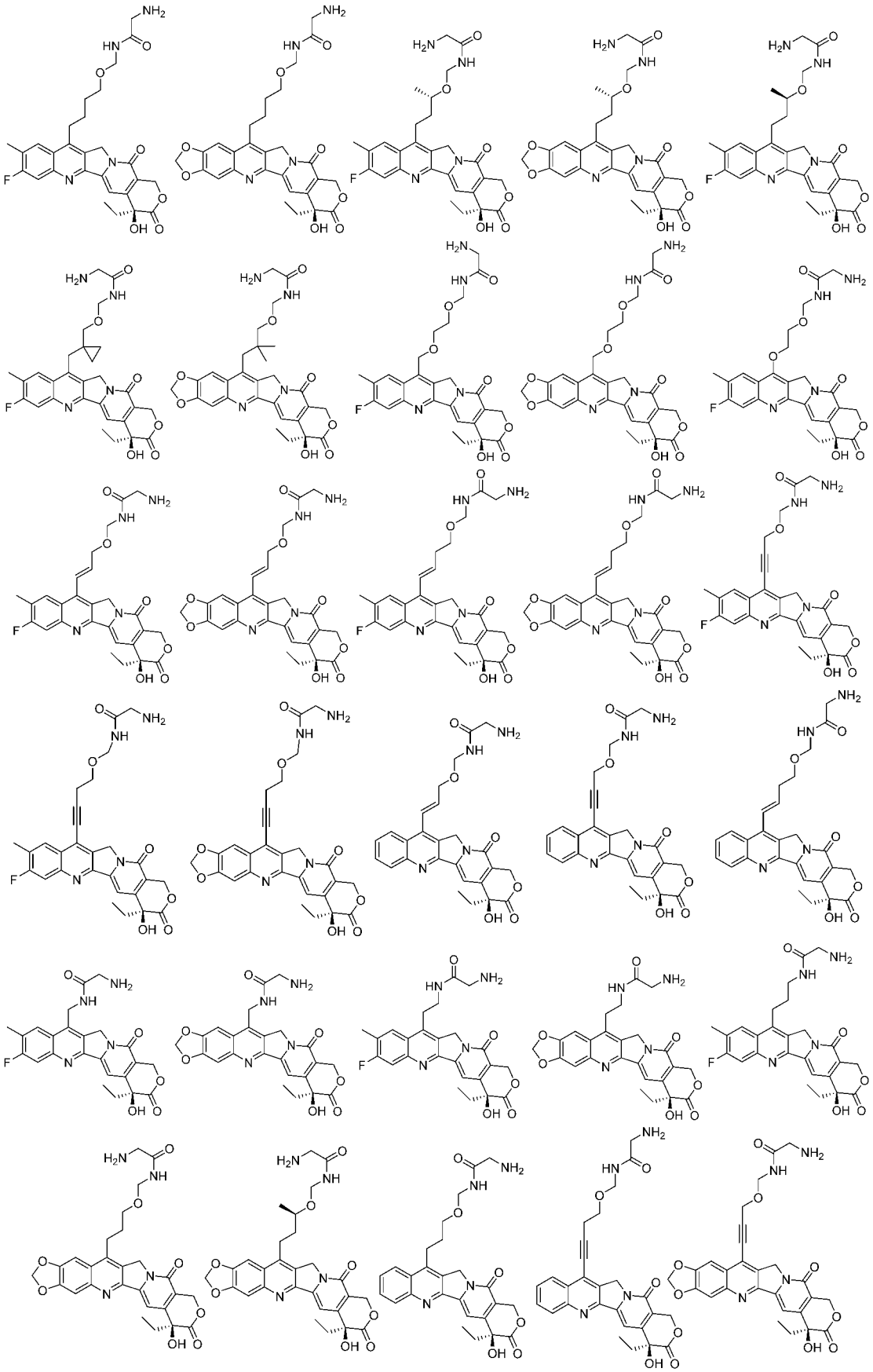
【0427】在一些實施方案中，部分釋放的游離藥物為式III-(A)的化合物：

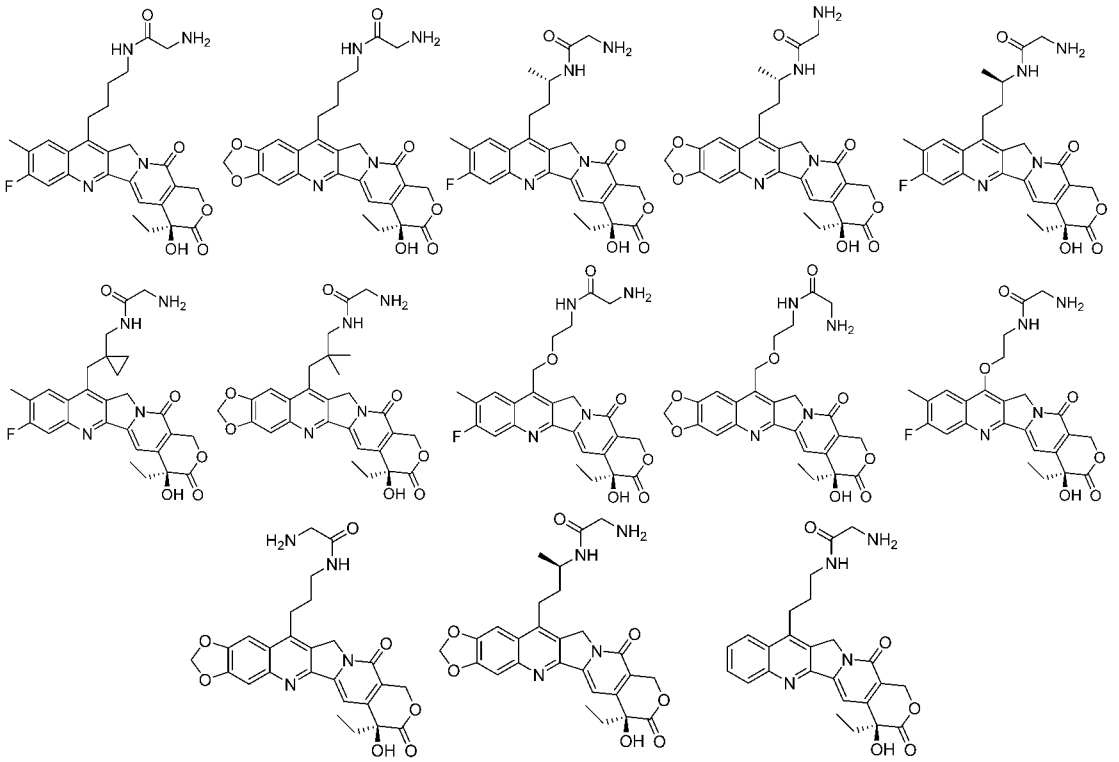


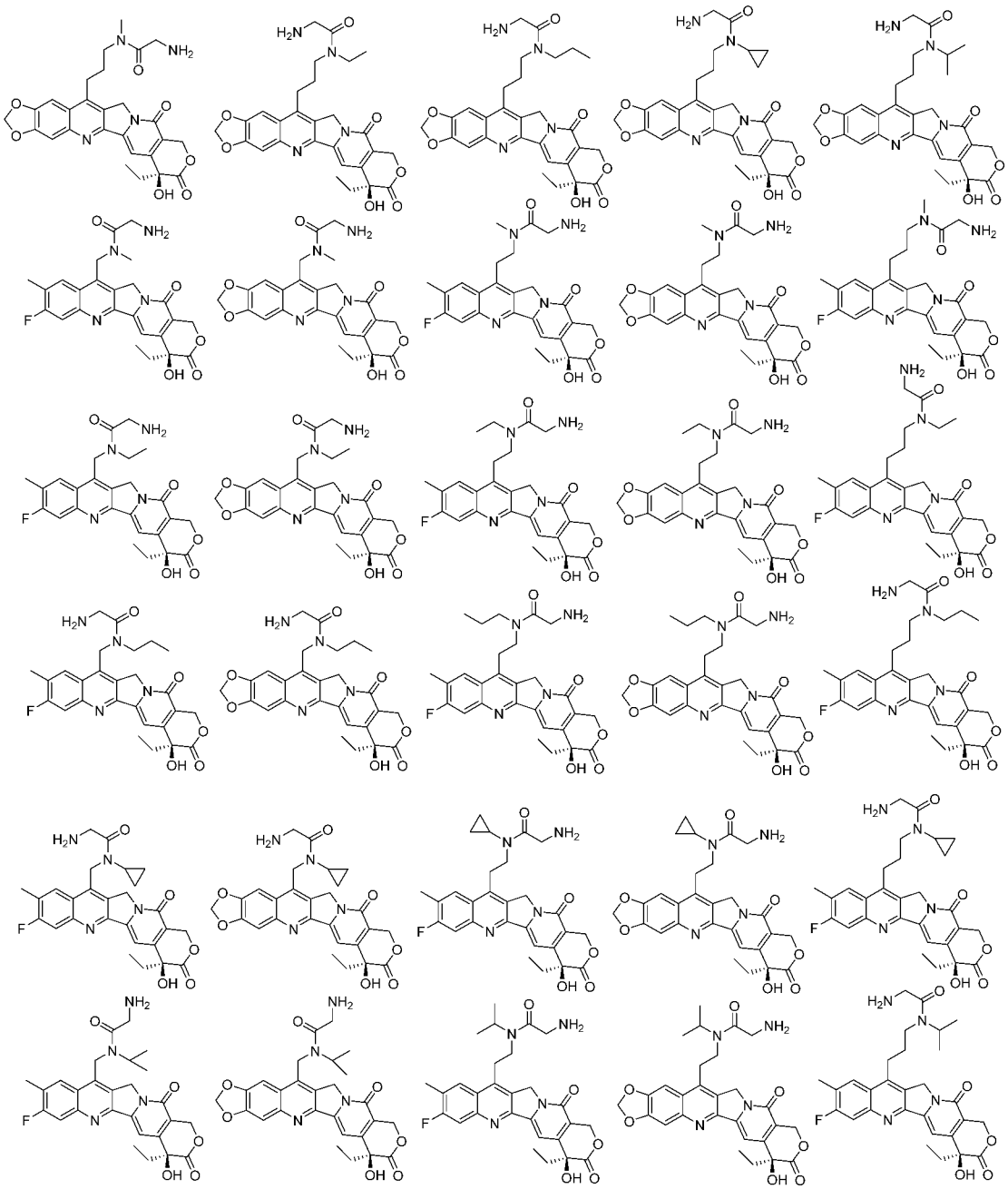
或其立體異構體或立體異構體的混合物，或其藥學上可接受的鹽，其中L_4、X、W、R_1、R_2和R_3具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

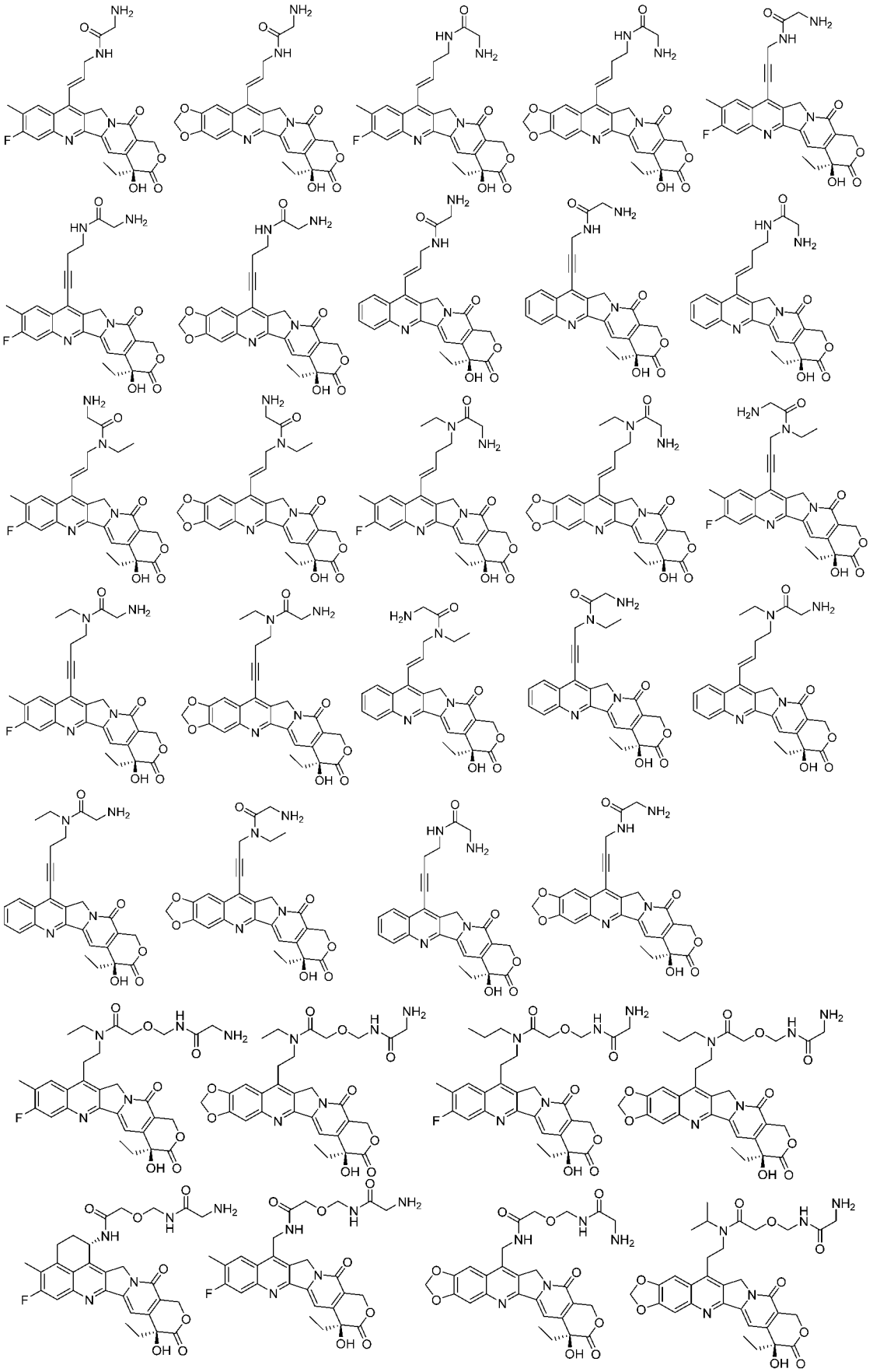
【0428】在一些實施方案中，  III-(A)的結構選自以下：

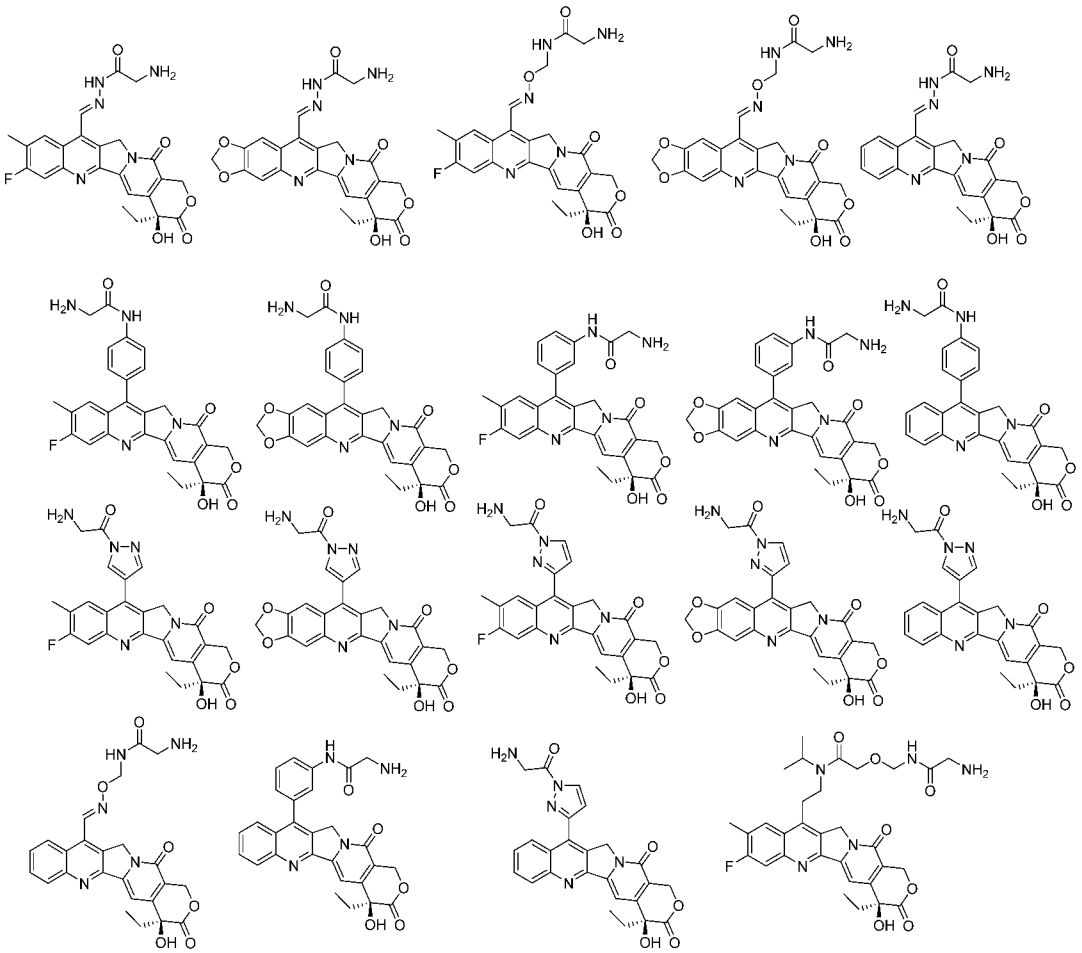




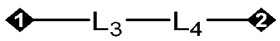






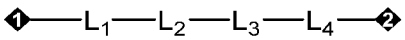


【0429】本公開還提供了一種配體藥物偶聯物中的連接體，其結構含如下所示片段：



其中，2位與生物活性分子片段相連；(1位與配體端相連，例如，當其與連接單元(例如L_2)相連，再通過延伸單元(例如L_1)與配體或靶向部分(Tb)相連；或者，當連接單元不存在時，直接與延伸單元相連，再進一步與配體相連)；

L_3、L_4的定義如本公開中任一方案所述。

【0430】在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物中的連接體，其結構如下所示： 

其中，1位與和靶點結合的配體或靶向部分相連，2位與生物活性分子片段

相連；

L_1、L_2、L_3、L_4的定義如本公開中任一方案所述；

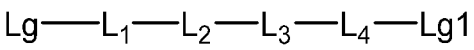
較佳地，所述的靶點結合的配體或靶向部分和所述的生物活性分子片段的定義分別如本公開中任一方案中的Tb和D所述。

【0431】在一些實施方案中，所述連接體1位與和抗體或其抗原結合片段相連，2位與生物活性分子片段相連。

【0432】在一些實施方案中，所述連接體1位與和抗體或其抗原結合片段上的半胱胺酸或離胺酸相連，2位與生物活性分子片段相連；

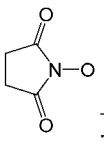
較佳地，所述的抗體或其抗原結合片段如本公開中任一方案所述。

【0433】在本公開的第四方面，本公開還提供了式III-1所示的連接體：

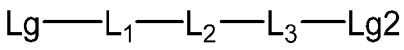


III-1

Lg、L_1、L_2、L_3和L_4具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義；Lg1為和藥物分子反應時的離去基團。

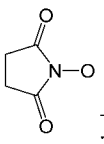
【0434】在一些實施方案中，Lg1優選為-OH、  或鹵素。

【0435】在本公開的第五方面，本公開還提供了式III-2所示的連接體：



III-2

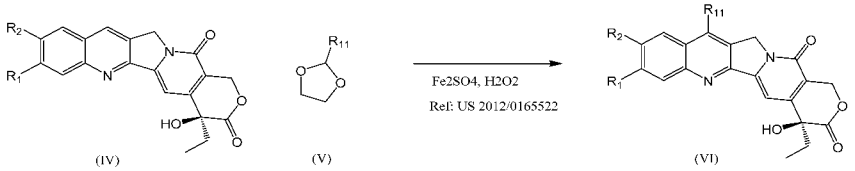
Lg、L_1、L_2和L_3具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義；Lg2為和L4或含有藥物分子的片段反應時的離去基團。

【0436】在一些實施方案中，Lg2優選為-OH、  或鹵素。

【0437】在本公開的第六方面，本公開提供了式II所示化合物（藥物分子、生物活性分子）、式III所示藥物連接體偶聯物的製備方法。

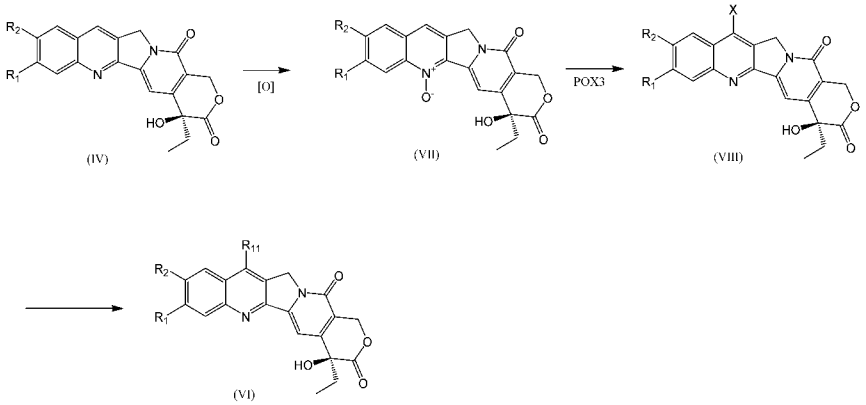
【0438】一方面，本公開提供了式II所示化合物（藥物分子、生物活性分子）的製備方法。具體地：

通式所示化合物（IV）通過和化合物（V）在鐵化合物催化下的烷基化反應或其它相關的Minisci反應可以獲得化合物（VI）。



(IV) (V) (VI)

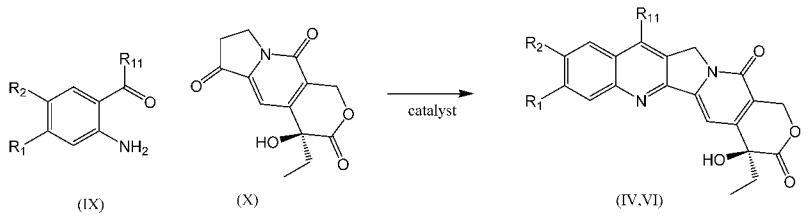
或者，化合物（IV）通過氮氧化反應生成化合物（VII），化合物（VII）通過三鹵氧磷處理後生成化合物（IV）的鹵代產物化合物（VIII）。化合物（VIII）可以通過多種形式的反應，如Heck反應，Suzuki反應，Buchwald反應，Nigishi反應，Stille反應等獲得化合物（VI）。



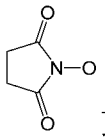
(IV) (VII) (VIII) (VI)

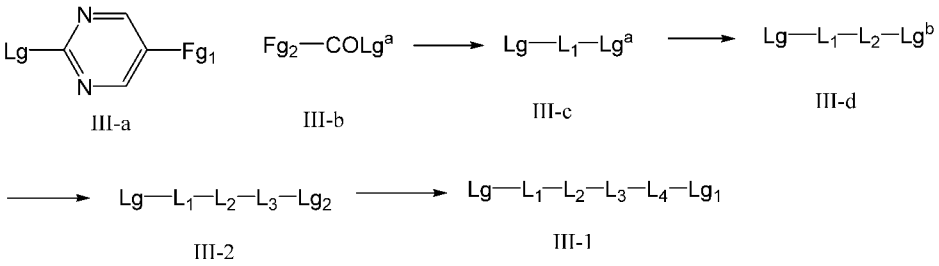
化合物（VI）中R_{11}可以通過多種化學轉化，如氧化，還原，取代等多種教科書中常見的方法合成不同的或更加複雜的分子。

或者，化合物（VI）和化合物（IV）也可以通過如下所示的化合物（IX）和化合物（X）通過關環反應獲得。



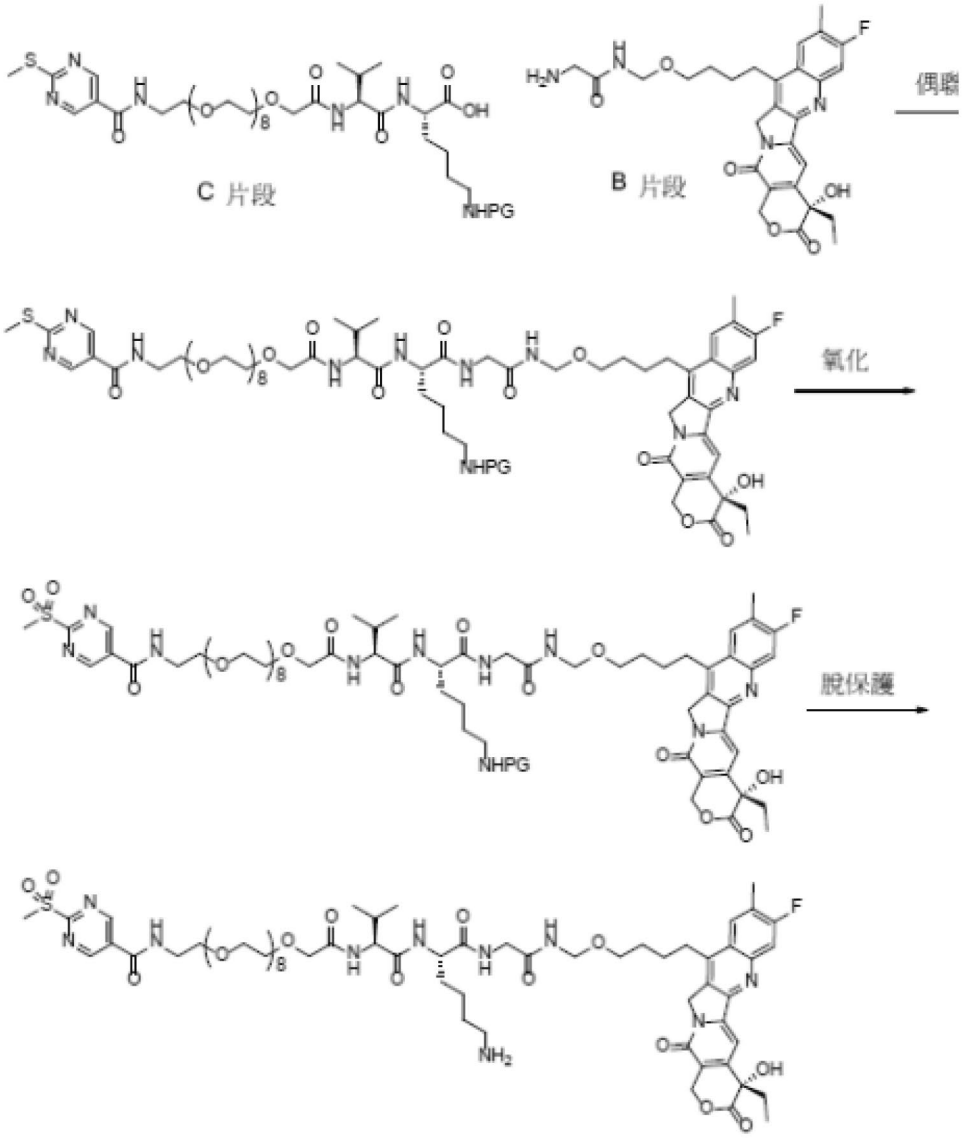
【0439】另一方面，本公開提供了式III-1和式III-2所示片段的製備方法。具體地：

化合物 III-a 通過其功能機團 Fg_1 和化合物 III-b 的功能機團 Fg_2 反應可以得到化合物 III-c， 化合物 III-c 通過其功能機團 Fg^a 可以獲得化合物 III-d，類似轉化可以獲得通式化合物 III-2 和 III-1。Lg^a，Lg^b，Lg_1，Lg_2 為可反應的離去機團，如-OH、  或鹵素等。

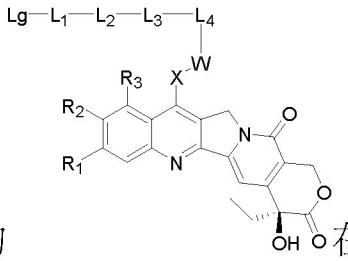


【0440】再另一方面，本公開提供了式III所示藥物連接體偶聯物的製備方法。具體地：

目標產物可以通過如下反應式所示的 B 片段和 C 片段的偶聯得到，偶聯產物經過一些常用的化學修飾，如氧化，脫保護等，即可得到通式 III 所示的藥物連接體偶聯物。



【0441】在本公開的第七方面，本公開提供了製備前述配體藥物偶聯物的方法，其包括：

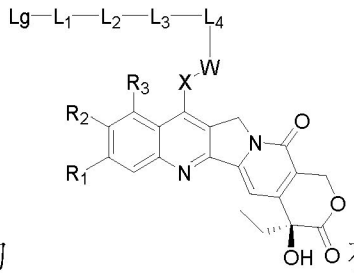


將 Tb 與式 III 所示的藥物連接體偶聯物 在合適的溶劑和條件下進行偶聯反應；

其中：

Tb 具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義；

R_1、R_2、R_3、X、W、L_1、L_2、L_3、L_4、Lg 具有上文以及本文具體敘述的任何實施方案中所提供的含義。

【0442】在一些實施方案中，所述方法包括將Tb與式III所示的藥物連接體偶聯物  在合適的溶劑和條件下進行偶聯反應形成C-S鍵的步驟。

【0443】在一些實施方案中，所述Tb與所述藥物連接體偶聯物的物質的量的比為1:（1-20），如1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:14、1:16、1:18、1:（10-20）、1:（12-20）、1:（14-20）、1:（16-20）或1:（18-20）。

【0444】在一些實施方案中，所述偶聯反應在水和/或有機溶劑中進行。

【0445】在一些實施方案中，所述有機溶劑選自N,N-二甲基甲醯胺、二甲基亞碸、N-甲基吡咯烷酮、腈類(例如乙腈)、醇類(例如甲醇、乙醇)或其任意組合。

【0446】在一些實施方案中，所述方法進一步包括將偶聯產物進行純化的步驟。

【0447】在一些實施方案中，通過層析方法對所述偶聯產物進行純化。

【0448】在一些實施方案中，所述層析方法包括離子交換層析、疏水層析、反相層析或親和層析中的一種或多種。

【0449】在本公開的第八方面，本公開提供了一種結合B7H3的抗體或其抗

原結合片段，所述抗體或其抗原結合片段包含如下的互補決定區（CDR）：

【0450】SEQ ID NO:3或23所示的重鏈可變區（VH）中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體；和/或SEQ ID NO: 13或33所示的輕鏈可變區（VL）中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0451】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 3所示的VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體; 和/或 SEQ ID NO: 13所示的VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0452】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 3所示的VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體; 和/或 SEQ ID NO: 33所示的VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0453】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 23所示的VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體; 和/或 SEQ ID NO: 33所示的VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0454】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 23所示的VH中含有的HCDR1或其序列的變體、HCDR2或其序列的變體以及HCDR3或其序列的變體; 和/或 SEQ ID NO: 13所示的VL中含有的LCDR1或其序列的變體、LCDR2或其序列的變體以及LCDR3或其序列的變體。

【0455】在某些優選實施方案中，所述序列的變體為與其來源CDR相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如1個，2個或3個胺基酸的置換、缺失或添加）的CDR。

【0456】在某些優選實施方案中，所述的置換為保守置換。

【0457】優選地，所述CDR根據AbM、Chothia、Kabat或IMGT編號系統定義。

【0458】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段的VH和/或VL中包括來自人的免疫球蛋白的構架區(FR)。

【0459】在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人B7H3和/或猴B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人2Ig B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人4Ig B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合猴4Ig B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人2Ig B7H3和人4Ig B7H3，並且更優先結合人4Ig B7H3。在某些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段結合人4Ig B7H3，而不結合人2Ig B7H3。

【0460】在一個方面，本公開提供了一種能夠結合B7H3的抗體或其抗原結合片段，所述抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL）。

【0461】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按IMGT編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:10 或與其

相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:11 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:12 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:20 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 GTF 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:22 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:30 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:31 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:32 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:40 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺

基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 GAS 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:42 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:10 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:11 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:12 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:40 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 GAS 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:42 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:30 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3

個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:31 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:32 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:20 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 GTF 的 LCDR2 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，序列為 SEQ ID NO:22 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

【0462】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按IMGT編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:12 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列為 GTF 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:22 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:12 的

HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列為 GAS 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列為 GAS 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列為 GTF 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:22 的 LCDR3。

【0463】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按Chothia編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:4 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6

或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:14 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:4 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:34 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個

或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:24 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:34 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:24 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，

2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:14 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，序列為 SEQ ID NO:16 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

【0464】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按chothia編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:4 的

HCDR1，序列為 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:16 的 LCDR3。

【0465】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按kabat編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:7 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:17 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺

基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:27 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:37 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:7 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 或

與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:37 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:27 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:17 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的

LCDR2 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，序列為 SEQ ID NO:19 或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

【0466】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中CDR按kabat編號系統定義：

(a) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 個 CDR 的重鏈可變區（VH）：序列為 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列為 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列為 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 個 CDR 的輕鏈可變區（VL）：序列為 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列為 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列為 SEQ ID NO:19 的 LCDR3。

【0467】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含下述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL），其中，與前述IMGT、chothia或kabat定義的CDR相比，所述重鏈可變區（VH）和/或輕鏈可變區（VL）中至少一個CDR含有突變，所述突變為一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如1個，2個或3個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。

【0468】優選地，本公開所述的置換為保守置換。

【0469】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的VH包含來源於人免疫球蛋白的重鏈可變區（VH）的構架區（FR），和/或所述抗體或其抗原結合片段的VL包含來源於人免疫球蛋白的輕鏈可變區（VL）的構架區（FR）。因此，在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段是人源化的。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段是全人源的。

【0470】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的VH包含來源於人免疫球蛋白的重鏈可變區（VH）的構架區（FR），和/或所述抗體或其抗原結合片段的VL包含來源於人免疫球蛋白的輕鏈可變區（VL）

的構架區（FR）。因此，在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段是人源化的。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段是全人源的。

【0471】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 人免疫球蛋白的重鏈構架區或其變體，所述變體與其所源自的胚系抗體基因編碼的胺基酸序列相比具有至多 20 個胺基酸的保守置換（例如至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的保守置換；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的保守置換）；和/或

(b) 人免疫球蛋白的輕鏈構架區或其變體，所述變體與其所源自的胚系抗體基因編碼的胺基酸序列相比具有至多 20 個胺基酸的保守置換（例如至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的保守置換；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的保守置換）。

【0472】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的人源化程度為至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

【0473】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈可變區（VH），其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列；

(ii) 與 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、

缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 輕鏈可變區（VL），其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列；

(v)與 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0474】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH，和/或, SEQ ID NO:13所示的VL。

【0475】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH，和/或, SEQ ID NO:33所示的VL。

【0476】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH，和/或, SEQ ID NO:33所示的VL。

【0477】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH，和/或, SEQ ID NO:13所示的VL。

【0478】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL.

(e) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)至(f)任一組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0479】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的重鏈包含人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8

個，9個或10個胺基酸的保守置換）。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段的輕鏈包含人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與其所源自的野生型序列相比具有至多50個胺基酸的保守置換（例如至多45個、至多40個、至多35個、至多30個、至多25個、至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換）。

【0480】在一些實施方案中，恆定區被改變，例如被突變，以修飾抗B7H3抗體分子的性質（例如改變下列中的一個或多個特性：Fc受體結合、抗體醣基化、半胱胺酸殘基的數目、效應細胞功能或補體功能）。可以通過將抗體恆定區中的至少一個胺基酸殘基替換為不同殘基，產生功能改變，例如，改變抗體對效應子配體（如FcR或補體C1q）的親和力，從而改變效應子功能（例如降低）。抗體的Fc區介導幾種重要的效應子功能，例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

【0481】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段具有重鏈恆定區（CH），其選自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重鏈恆定區；特別地選自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重鏈恆定區，更特別地選自IgG1（例如是人IgG1）的重鏈恆定區。在一些實施方案中，人IgG1重鏈恆定區如SEQ ID NO:43所示。在一些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段具有輕鏈恆定區，其選自例如κ或λ輕鏈恆定區，優選κ輕鏈恆定區（例如人κ輕鏈恆定區）。在一些實施方案中，輕鏈恆定區具有如SEQ ID NO:44所示的序列。

【0482】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID

NO:43所示的CH或其變體，所述變體與SEQ ID NO:43相比具有至多20個胺基酸的保守置換（例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換），或者與SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

【0483】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含輕鏈恆定區或其變體。在一些實施方案中，所述輕鏈恆定區包含κ輕鏈恆定區。在一些實施方案中，所述輕鏈恆定區包含SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）或其變體，所述變體與SEQ ID NO:44相比具有至多20個胺基酸的保守置換（例如至多20個、至多15個、至多10個或至多5個胺基酸的保守置換；例如1個，2個，3個，4個，5個，6個，7個，8個，9個或10個胺基酸的保守置換），或者與SEQ ID NO:16相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;

【0484】在一些實施方案中，所述抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:43所示的重鏈恆定區（CH）和SEQ ID NO:44所示的輕鏈恆定區（CL）。

【0485】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii)與(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 輕鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:13 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0486】在某些實施方案中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0487】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii)與(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 輕鏈，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:33 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、

至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

【0488】在某些實施方案中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0489】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:45 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:46 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）

的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0490】在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段包含重鏈和輕鏈，

所述重鏈包含：

(i) SEQ ID NO:47 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述輕鏈包含：

(iv) SEQ ID NO:48 所示的序列；

(v) 與(iv)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30

個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(vi) 與(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

優選地，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【0491】在某些實施方案中，本公開的抗體是嵌合抗體，人源化抗體或全人源抗體。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段選自 scFv、Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv片段、二硫鍵連接的Fv(dsFv)、雙抗體(diabody)。

【0492】在某些實施方案中，本公開的抗體是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL.

(e) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）獨立地與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 相比分別具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至

少 99%的序列同一性；或

(f) 重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中所述重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）與(a)至(d)任一組中所述的 VH 和 VL 分別相比，獨立地具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。優選地，所述的置換是保守置換。

【0493】在某些實施方案中，本公開的抗體是scFv。在某些實施方案中，本公開的scFv包含：

(i) SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列；

(ii) 與(i)所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如至多 50 個、至多 45 個、至多 40 個、至多 35 個、至多 30 個、至多 25 個、至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個，2 個，3 個，4 個，5 個，6 個，7 個，8 個，9 個或 10 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）的序列；或

(iii) 與(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

優選地，(ii)中所述的置換是保守置換。

【0494】在某些實施方案中，本公開的抗體是scFv。

【0495】在某些實施方案中，本公開的scFv包含SEQ ID NO:1或2所示的序列。

【0496】抗體衍生物

【0497】本公開的抗體或其抗原結合片段可進行衍生化，例如被連接至另一個分子（例如另一個多肽或蛋白）。通常，抗體或其抗原結合片段的衍生化（例如，標記）不會對其與B7H3（特別是人B7H3）的結合產生不利影響。因此，本公開的抗體或其抗原結合片段還意欲包括此類衍生化的形式。例如，可以將本公開的抗體或其抗原結合片段連接（通過化學偶合、基因融合、非共價連接或其它方式）於一個或多個其它分子基團，例如另一個抗體（例如，形成雙特異性抗體），檢測試劑，藥用試劑，和/或能夠介導抗體或其抗原結合片段與另一個分子結合的蛋白或多肽（例如，抗生物素蛋白或多組胺酸標籤）。

【0498】一種類型的衍生化抗體（例如，雙特異性抗體）是通過交叉連接2個或更多個抗體（屬於同一類型或不同類型）而產生的。獲得雙特異性抗體的方法是本領域公知的，其實例包括但不限於，化學交聯法、細胞工程法（雜交瘤法）或基因工程法。

【0499】另一種類型的衍生化抗體是標記的抗體。例如，可以將本公開的抗體或其抗原結合片段連接至可檢測的標記。本公開所述的可檢測的標記可以是可通過螢光、光譜、光化學、生物化學、免疫學、電學、光學或化學手段檢測的任何物質。這類標記是本領域熟知的，其實例包括但不限於，酶（例如，辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如，3H、125I、35S、14C或32P）、螢光染料（例如，異硫氰酸螢光素（FITC）、螢光素、異硫氰酸四甲基羅丹明（TRITC）、藻紅蛋白（PE）、德克薩斯紅、羅丹明、量子點或花菁染料

衍生物（例如Cy7、Alexa 750））、吖啶酯類化合物、磁珠（例如，Dynabeads®）、測熱標記物例如膠體金或有色玻璃或塑膠（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳膠，等）珠、以及用於結合上述標記物修飾的親和素（例如，鏈黴親和素）的生物素。教導該標記物的使用的專利包括，但不限於，美國專利3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；及4,366,241（全部通過引用併入本文）。如上所述的可檢測的標記可通過本領域已知的方法檢測。例如，放射性標記可使用攝影膠片或閃爍計算器檢測，螢光標記物可使用光檢測器檢測，以檢測發射的光。酶標記物一般通過給酶提供基質及檢測通過酶對基質的作用產生的反應產物來檢測，及測熱標記物通過簡單視覺化著色標記物來檢測。在某些實施方案中，此類標記能夠適用於免疫學檢測（例如，酶聯免疫測定法、放射免疫測定法、螢光免疫測定法、化學發光免疫測定法等）。在某些實施方案中，可通過不同長度的連接體（linker）將如上所述的可檢測的標記連接至本公開的抗體或其抗原結合片段，以降低潛在的位阻。

【0500】此外，本公開的抗體或其抗原結合片段還可以用化學基團進行衍生，例如聚乙二醇（PEG），甲基或乙基，或者醣基。這些基團可用於改善抗體的生物學特性，例如增加血清半衰期。

【0501】本公開的抗原結合片段可以通過水解完整的抗體分子獲得（參見Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)）。另外，這些抗原結合片段也可以直接由重組宿主細胞產生（reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)）。比如，Fab'片段可

以直接從宿主細胞中獲得；可以將Fab'片段化學偶聯形成$F(ab')_2$片段(Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。另外，Fv、Fab或$F(ab')_2$片段也可以直接從重組宿主細胞培養液中直接分離得到。本領域的具有通常知識者完全知曉製備這些抗原結合片段的其它技術。

【0502】本公開的IgG同型對照抗體是本領域的具有通常知識者完全知曉並可以購買或製備獲得的。例如人抗雞蛋溶酶體抗體(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG，anti-HEL，如human IgG1，簡稱hIgG1)，其序列來自於Acierno等人發表的Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies研究中Fab F10.6.6序列的可變區序列(Acierno等人.J Mol Biol.2007；374(1):130-46.)。製備方法如下：委託南京金斯瑞生物對human IgG抗體的重輕鏈(全序列或可變區)基因進行胺基酸的密碼子優化和基因合成，參照《分子克隆實驗指南(第三版)》介紹的標準技術，採用PCR、酶切、DNA膠回收、連接轉化、菌落PCR或酶切鑒定等標準的分子克隆技術將重輕鏈基因分別亞克隆到哺乳動物表達系統的抗體重鏈表達載體和抗體輕鏈表達載體，並進一步對重組表達載體的重輕鏈基因進行測序分析。測序驗證正確後，大量製備去內毒素級別的表達質粒並將重輕鏈表達質粒暫態共轉染HEK293細胞進行重組抗體的表達。培養7天後收集細胞培養液，進行rProtein A柱(GE)親和純化，收穫的抗體樣品用SDS-PAGE和SEC-HPLC標準分析技術對其進行品質鑒定。

【0503】在第九方面，本公開提供了一種多特異性抗體，其包含本公開第八方面任一項所述的抗體或其抗原結合片段，和另外的抗體或其片段或抗體類似物。

【0504】在某些實施方案中，所述多特異性抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體或四特異性抗體。

【0505】因此，在第十方面，本公開提供了一種分離的核酸分子，包含編碼本公開的抗體或其抗原結合片段、或其重鏈可變區和/或輕鏈可變區、或其一個或多個CDR的核苷酸序列。根據本領域已知的密碼子簡併性，在某些實施方案中，所述核苷酸序列是可以根據密碼子簡併性進行替換的。在某些實施方案中，所述核苷酸序列是密碼子最優化的。

【0506】在某些實施方案中，本公開所述分離的核酸分子包含：（i）分別編碼本公開的抗體或其抗原結合片段的重鏈可變區和輕鏈可變區的第一核酸和第二核酸，或（ii）分別編碼本公開的抗體或其抗原結合片段的重鏈可變區和重鏈恆定區的第一核酸，和輕鏈可變區和輕鏈恆定區的第二核酸，或（iii）分別編碼本公開的抗體或其抗原結合片段的重鏈和輕鏈的第一核酸和第二核酸。在某些實施方案中，所述第一核酸和第二核酸包含與上述（i）-（iii）中任一第一核酸和第二核酸的簡並序列或基本上相同序列的核酸。在某些實施方案中，所述簡並序列或基本上相同序列指與（i）-（iii）中所述核酸分子相比具有至少大約85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列或具有一個或更多個核苷酸取代的序列，或相差不超過3、6、15、30或45個核苷酸的序列。

【0507】在第十一方面，提供了一種載體（例如克隆載體或表達載體），其包含本公開的分離的核酸分子。在某些實施方案中，本公開的載體是例如質粒，粘粒，噬菌體，慢病毒等。在某些實施方案中，所述載體能夠在受試者（例如哺乳動物，例如人）體內表達本公開的抗體或其抗原結合片

段。

【0508】第十二方面，提供了一種宿主細胞，其包含本公開的分離的核酸分子或本公開的載體。宿主細胞可以是真核細胞（例如哺乳動物細胞、昆蟲細胞、酵母細胞）或原核細胞（例如大腸桿菌）。合適的真核細胞包括但不限於NS0細胞、Vero細胞、Hela細胞、COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞、BHK細胞、和MDCKII細胞。適宜的昆蟲細胞包括但不限於Sf9細胞。在某些實施方案中，本公開的宿主細胞是哺乳動物細胞，例如CHO（例如CHO-K1、CHO-S、CHO DXB11、CHO DG44）。

【0509】第十三方面，提供了製備本公開的抗體或其抗原結合片段、或多特異性抗體的方法，其包括，在允許所述抗體或其抗原結合片段、或多特異性抗體表達的條件下，培養本公開的宿主細胞，和從培養的宿主細胞培養物中回收所述抗體或其抗原結合片段。

【0510】第十四方面，提供一種抗體-藥物偶聯物，其中抗體為上述抗B7H3的抗體, 其通過連接體與偶聯部分連接。所述偶聯部分選自：可檢測的標記、放射性同位素、螢光物質、發光物質、有色物質、酶、聚乙二醇（PEG）、核素、核酸、小分子毒素、具有結合活性多肽、蛋白、受體、配體，以及其它抑制腫瘤細胞生長、促進腫瘤細胞凋亡或壞死的活性物質。

【0511】在一些實施例中，抗體-藥物偶聯物包含下式的抗B7H3抗體藥物綴合物(B7H3-ADC)：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)n,$$

其中：

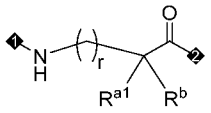
Ab 是在第八方面抗體或其抗原結合片段，並且；

D是小分子毒素藥物部分；

L是鍵或連接分子，其共價連接Ab和D；

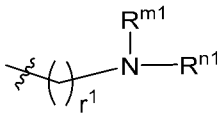
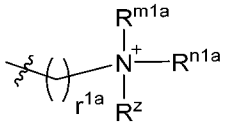
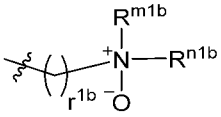
n是1-16之間的整數，且表示共價連接至Ab的L-D的數目。

【0512】在一些實施例中，抗體-藥物偶聯物的L包含選自胺基酸殘基或由2-10個胺基酸殘基組成的短肽；所述的胺基酸殘基選自天然胺基酸殘基、非天然胺基酸殘基、AA^1所示胺基酸殘基或其立體異構體；



AA^1

AA^1所示的胺基酸殘基中：

R^{a1}和R^b各自獨立地選自H、  、  和  ；

或者，R^{a1}與R^b和與它們共同相連的碳原子一起形成4-10元雜環，所述的4-10元雜環中，雜原子選自O、N和S中的1個、2個、3個或4個；所述的4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代；

r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自獨立地為0到20的任意整數；

R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b}和R^{n1b}各自獨立地為H、C_{1-6}烷基、C_{3-6}環烷基或-$COOR^{x1}$，其中，R^{x1}為C_{1-6}烷基；

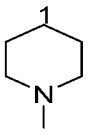
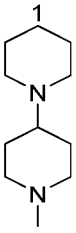
或者，R^{m1}和R^{n1}、R^{m1a}和R^{n1a}、以及R^{m1b}和R^{n1b}和與它們共同相連的氮原子一起，形成4-10元雜環，所述的4-10元雜環中，雜原子選自O、N和S中的1個、2個、3個或4個；所述的4-10元雜環任選地被一個或多個$R^{0'}$

所取代；

R^z選自 C_{1-6}烷基；

R^0、$R^{0'}$各自獨立地選自 C_{1-6}烷基、C_{3-6}環烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$和任選被 C_{1-6}烷基取代的 4-10 元雜環基；所述的 4-10 元雜環中，雜原子選自 O、N 和 S 中的 1 個、2 個、3 個或 4 個；

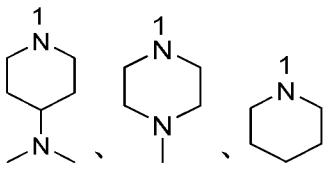
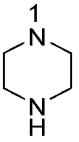
R^{m2}和 R^{n2}各自獨立地選自 H 和 C_{1-6}烷基。

【0513】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基中，R^{a1}與R^b和與它們共同相連的碳原子一起形成5-6元雜環，所述的5-6元雜環中，雜原子為N，雜原子數為1個或2個；所述的5-6元雜環任選地被一個或多個R^0所取代。所述的5-6元雜環優選為哌啶環或哌咔環，進一步優選為哌啶環，例如  或  ，1號碳原子為與R^{a1}和R^b共同相連的碳原子。

【0514】在一些實施方案中，r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自獨立地為0、1、2、3、4或5；優選為地，r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自獨立地為0或4；進一步優選為地，r為0，r^1、r^{1a}和r^{1b}為4；或者r為4，r^1、r^{1a}和r^{1b}為0。

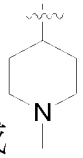
【0515】在一些實施方案中，r、r^1、r^{1a}和r^{1b}不同時為0。

【0516】在一些實施方案中，R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b}和R^{n1b}各自獨立地為H、C_{1-6}烷基或$-COOR^{x1}$，其中，R^{x1}為C_{1-6}烷基；優選為各自獨立地為H、甲基、乙基、正丙基、$-COOCH_3$、$-COOCH_2CH_3$、$-COOCH_2CH_2CH_3$、$-COOCH(CH_3)_2$、$-COOC(CH_3)_3$或$-COOCH_2CH_2CH_2CH_3$。

【0517】在一些實施方案中，R^{m1}和R^{n1}、R^{m1a}和R^{n1a}、以及R^{m1b}和R^{n1b}和與它們共同相連的氮原子一起形成5-6元雜環，所述的5-6元雜環中，雜原子選自1個或2個N原子；所述的5-6元雜環任選地被一個或多個$R^{0'}$所取代；所述的5-6元雜環優選為哌啶環或哌啡環；進一步優選為  、  或，1號氮原子為與R^{m1}和R^{n1}共同相連的氮原子。

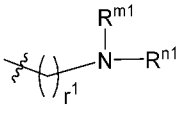
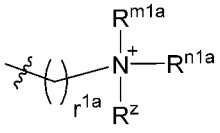
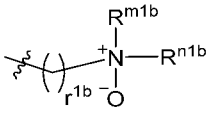
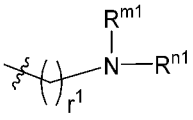
【0518】在一些實施方案中，R^{z}優選為C_{1-6}烷基；更優選為甲基。

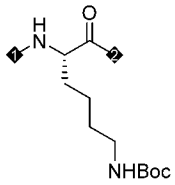
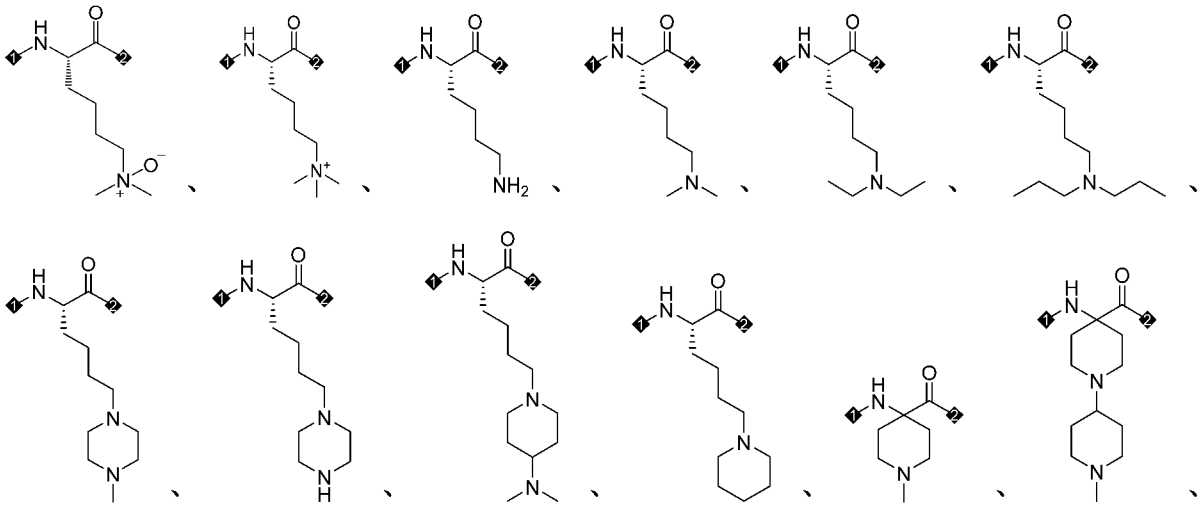
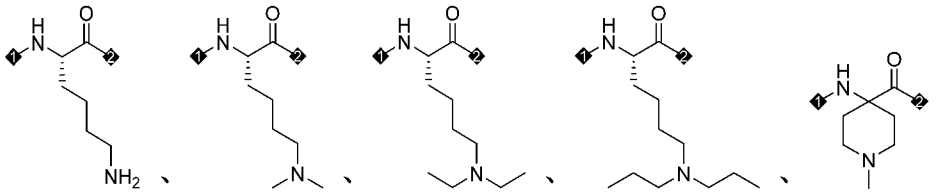
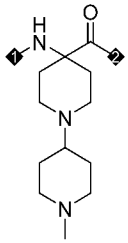
【0519】在一些實施方案中，R^{0}和$R^{0'}$各自獨立地為C_{1-6}烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$或任選被C_{1-6}烷基取代的5-6元雜環基；所述的5-6元雜環中，雜原子選自1個或2個N原子。

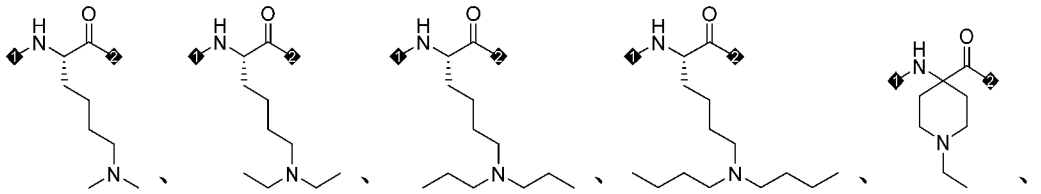
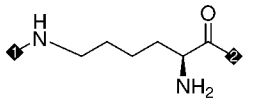
【0520】在一些實施方案中，R^{0}優選為C_{1-6}烷基或被C_{1-6}烷基取代的5-6元雜環基，所述的5-6元雜環基為哌啶基或哌啡基；進一步優選為甲基或被甲基取代的哌啶基；例如甲基或  。

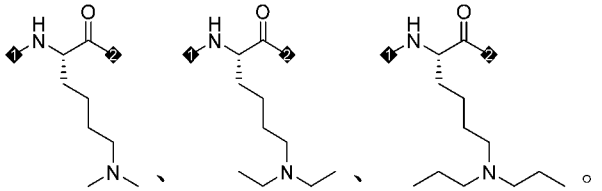
【0521】在一些實施方案中，$R^{01'}$各自獨立地優選為C_{1-6}烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$或任選被C_{1-6}烷基取代的5-6元雜環基；所述的5-6元雜環中，雜原子為1個或2個N；進一步優選為C_{1-6}烷基或$-NR^{m2}R^{n2}$；更優選為甲基或$-NR^{m2}R^{n2}$，其中，R^{m2}和R^{n2}各自獨立地優選為H或C_{1-6}烷基，更優選為甲基。

【0522】在一些實施方案中，$R^{0'}$優選為C_{1-6}烷基或$-NR^{m2}R^{n2}$；R^{m2}和R^{n2}各自獨立地優選為H或C_{1-6}烷基（例如甲基）。

【0523】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基中，R^{a1}和R^b中任一個為H，另一個為  、  和  ；優選為地，R^{a1}和R^b中的任一個為H，另一個選自  。

【0524】在一些實施方案中，AA^1所示胺基酸殘基優選為  、  進一步優選為  或  ；

更優選為  、  ；

最優選為  。

【0525】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自：微管阻斷藥物，DNA損傷藥物，Bcl-xL抑制劑等。

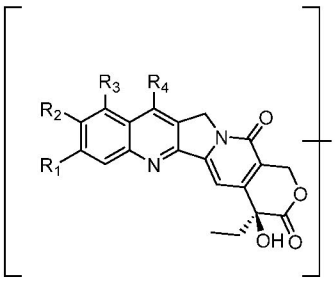
【0526】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自：金盞花素Auristatins（例如MMAF，MMAE），美登素衍生物（例如DM1，DM4），微管溶素，隱粘菌素，抗有絲分裂抑制劑，吡咯苯並氮卓類和吲哚氯苯並氮卓類，杜卡黴素，喜樹鹼, 卡奇黴素等。

【0527】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自喜樹鹼（CPT）及其衍生物。

【0528】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自拓撲異構酶I抑制劑。

【0529】在一些實施方案中，抗體-藥物偶聯物由抗體-連接體-藥物組成，其中所述藥物選自: SN-38, DXd。

【0530】在一些實施方案中，所述抗體-藥物偶聯物的，D為具有式II所示的藥物單元：



II 、

其中，

R_1 為 H 或 F，

R_2 為 H 或甲基；

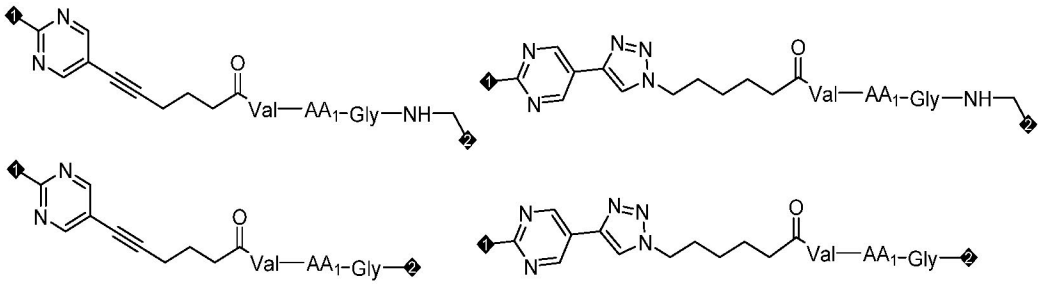
或者 R1 和 R2 和與其相連的碳原子一起形成 ；

R_3 為 H；

R_4 選自 H、-(C1-C4 烷基)-OH，-(C1-C4 烯基)-OH，-(C1-C4 烷基)-NH2，或-(C1-C4 烯基)-NH2；

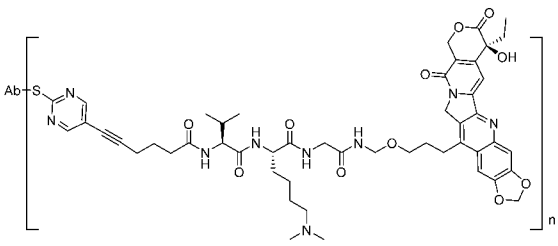
其中 L 通過 D 上存在的羥基或胺基連結。

【0531】在一些實施方案中，所述抗體-藥物偶聯物的L選自；



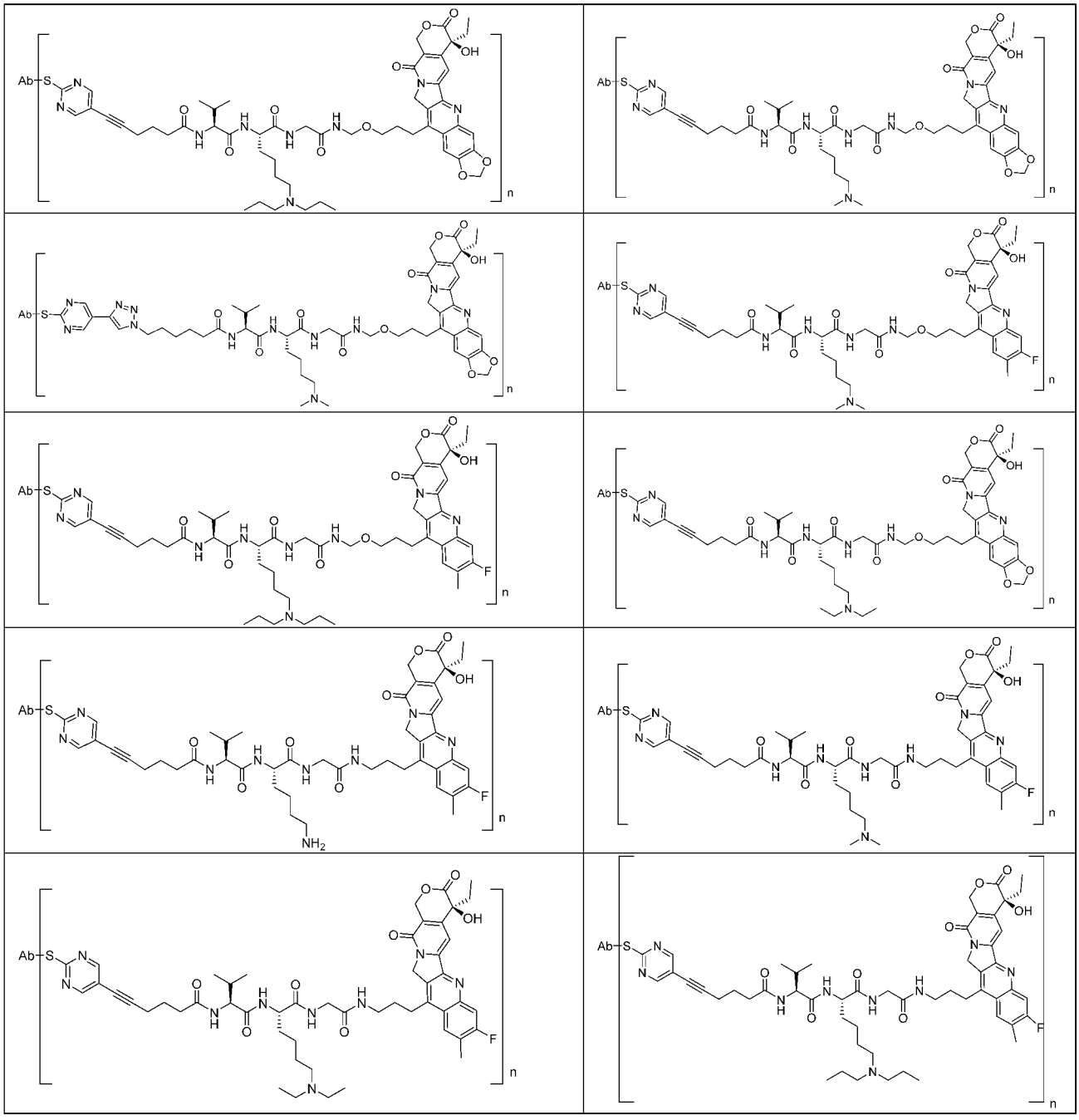
其中，1位與Ab相連，2位與D相連；AA1如上文所定義。

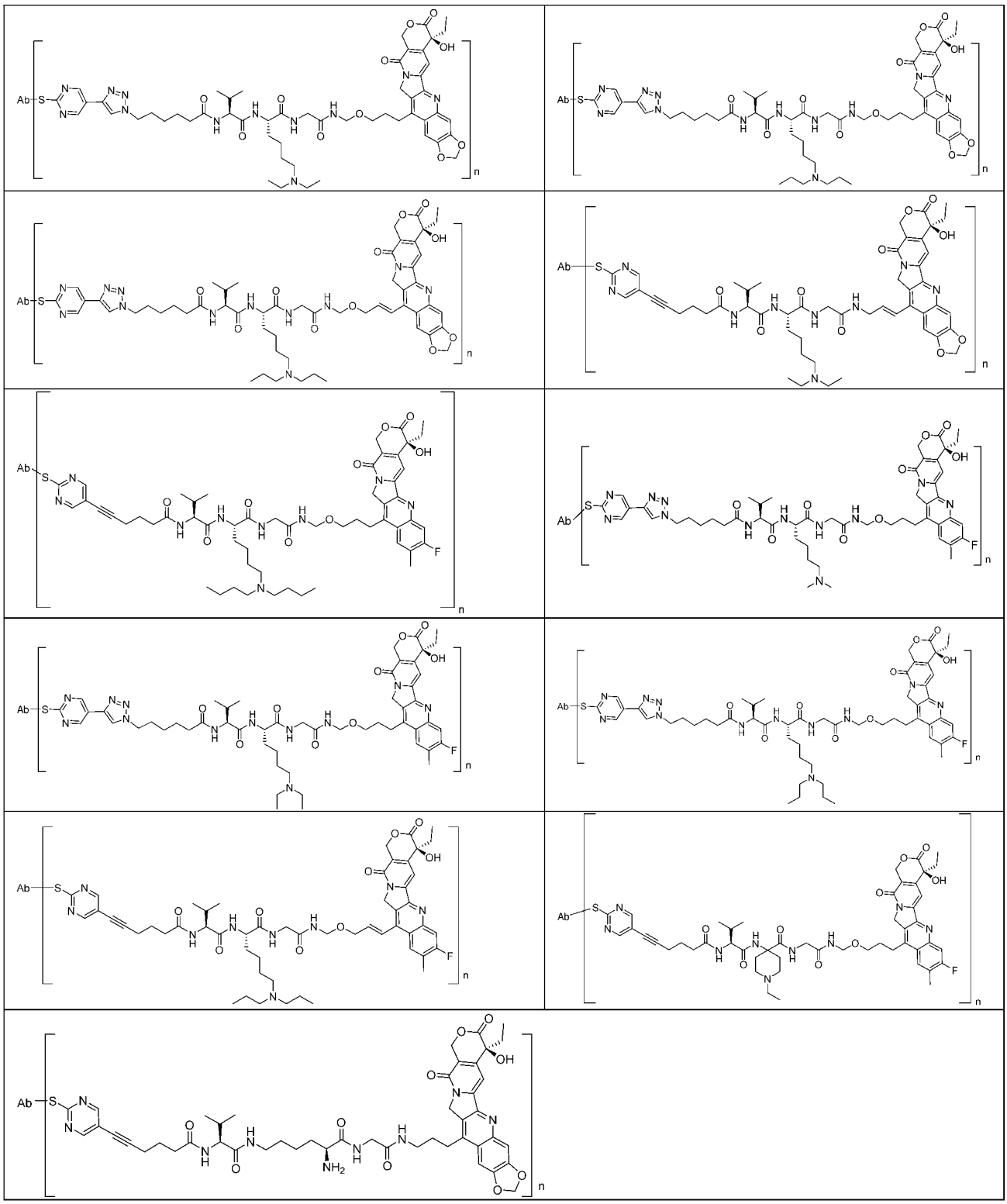
【0532】另外，還需要說明的是，本發明所屬技術領域具有通常知識者可以理解的是，L是與打開二硫鍵（例如，通過還原劑TCEP還原二硫鍵可以打開二硫鍵，生成巰基-SH）後Ab（如抗體）自身所含有巰基進行連接，也就是說，L與Ab之間的-S-並非另外再外接的硫原子。例如，



中，-S-並非另外外接的硫原子，而是打開雙硫鍵後的Tb自身所含有巰基與L進行連接後形成的-S-。

【0533】在一些優選的實施方案中，所述抗體-藥物偶聯物，選自：





其中Ab為B7H3抗體1D1-01或2E3-02，n為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16，q優選1、2、3、4、5、6、7、8。

【0534】在本公開的第十五方面，本公開提供了一種配體藥物偶聯物，其包含本公開上前述的配體藥物偶聯物或前述的抗體-藥物偶聯物，所述的配

體藥物偶聯物具有兩種或多種q值，所述的抗體-藥物偶聯物具有兩種或多種n值。所述配體藥物偶聯物是指包含異質DAR分佈的配體藥物偶聯物或抗體-藥物偶聯物(ADC)。

【0535】在一些實施方案中，當所述的配體藥物偶聯物中的一種q值或n值的配體藥物偶聯物占大部分時，q值或n值和DAR接近。

【0536】在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物中的藥物與抗體的比例（DAR）選自1-10中的整數或小數。

【0537】在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物中的藥物與抗體的比例（DAR）選自2、2.5、3、3.5、4、4.5,5、5.5、6、6.5、7、7.2、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.7、8.9和9。

【0538】在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物ADC含有具有1至8的DAR的分佈的ADC，例如，1.5、2、4、6、和8(即，1.5、2、4、6、 和8的載藥種類)。值得注意的是，可以產生降解產物，使得所述的配體藥物偶聯物中也可以包含1、3、5和7的DAR。此外，所述的配體藥物偶聯物中的ADC也可具有大於8的DAR。所述的配體藥物偶聯物由鏈間二硫化物還原然後偶聯產生。在一些實施方案中，所述的配體藥物偶聯物包含如下兩者：DAR為4或更低(即，載藥種類為4或更低)的所述的配體藥物偶聯物以及DAR為6或更高(即，載藥種類為6或更高)的所述的配體藥物偶聯物。

【0539】在另一個方面，提供了本公開的抗體或其抗原結合片段在製備試劑盒中的用途，所述試劑盒用於檢測B7H3在樣品中的存在或其水準。在另一個方面，本公開提供了診斷性或治療性試劑盒，其包括一個或多個以下物質：本公開所述的抗體或其抗原結合片段、核酸、載體、宿主細胞、多

特異性抗體、綴合物或者藥物組合物。可選地，所述診斷性或治療性試劑盒還包括使用說明書。

【0540】在本公開的第十六方面，本公開提供了藥物組合物，其包含物質A，以及任選的一種或多種藥用輔料；所述的物質A為前述的配體藥物偶聯物、或所述配體藥物偶聯物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物、或前述的抗體或其抗原結合片段、核酸分子、載體、宿主細胞、多特異性抗體、和/或配體藥物偶聯物、綴合物，或前述的抗體-藥物偶聯物，或者前述的化合物、或所述化合物的立體異構體、其前藥、其藥學上可接受的鹽或其藥學上可接受的溶劑合物。所述的物質A可為治療有效量的。

【0541】在某些實施方案中，本公開的藥物組合物包含本公開的抗體或其抗原結合片段，以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【0542】在某些實施方案中，本公開的藥物組合物包含本公開的宿主細胞，以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑，其中所述宿主細胞包含如前所述的分離的核酸分子或載體。

【0543】在某些實施方案中，本公開的藥物組合物包含本公開的多特異性抗體，以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【0544】在某些實施方案中，本公開的藥物組合物包含本公開的綴合物以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【0545】在本公開的第十七方面，本公開提供了前述的物質A或者前述的藥物組合物在製備治療和/或預防與細胞活動異常相關的疾病（例如癌症疾病）的藥物中的用途。所述的物質A或者前述的藥物組合物可為治療有效

量的。

【0546】在一些實施例中，提供本公開的抗體或其抗原結合片段、核酸、載體、宿主細胞、抗體藥物偶聯物，或者多特異性抗體在製備藥物中的用途，所述藥物用於調整（抑制或阻斷）B7H3的活性。

【0547】在一些實施例中，提供本公開的抗體或其抗原結合片段、核酸、載體、宿主細胞、抗體藥物偶聯物，或者多特異性抗體在製備藥物中的用途，所述藥物用於治療或預防與B7H3的活性有關的疾病。

【0548】在一些實施例中，提供本公開的抗體或其抗原結合片段、核酸、載體、宿主細胞、抗體藥物偶聯物，或者多特異性抗體在製備藥物中的用途，所述藥物用於治療或預防與B7H3的活性有關的腫瘤。

【0549】在一些實施方案中，所述癌症疾病選自食管癌（例如食管腺癌和食管鱗狀細胞癌）、腦瘤、肺癌（例如小細胞性肺癌，非小細胞性肺癌或肺腺癌）、鱗狀上皮細胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、頭頸癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸癌（例如人結腸腺癌）、直腸癌、結直腸癌、肝癌、腎癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中樞神經系統腫瘤（例如神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、膠質瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲狀腺癌。

【0550】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2、Her2、B7H3、Her3、EGFR相關的癌症疾病。在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2或Her2相關的癌症疾病。

【0551】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2相關的癌症疾病。

【0552】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Her3相關的癌症疾病。

【0553】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與EGFR相關的癌症疾病。

【0554】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與B7H3相關的癌症疾病。

【0555】在一些實施方案中，所述癌症疾病為實體腫瘤。

【0556】在一些實施方案中，所述癌症疾病為乳腺癌或肺癌（優選非小細胞肺癌）。

【0557】在本公開的第十七方面，本公開提供了前述的物質A或者前述的藥物組合物，其用於治療和/或預防與細胞活動異常相關的疾病（例如癌症疾病）。

【0558】在一些實施方案中，所述癌症疾病選自食管癌（例如食管腺癌和食管鱗狀細胞癌）、腦瘤、肺癌（例如小細胞性肺癌、非小細胞性肺癌或肺腺癌）、鱗狀上皮細胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、頭頸癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸癌（例如人結腸腺癌）、直腸癌、結直腸癌、肝癌、腎癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中樞神經系統腫瘤（例如神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、膠質瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲狀腺癌。

【0559】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2、Her2、B7H3、Her3 、EGFR相關的癌症疾病。在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2或Her2相關的癌症疾病。

【0560】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2相關的癌症疾病。

【0561】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Her3相關的癌症疾病。

【0562】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與EGFR相關的癌症疾病。

【0563】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與B7H3相關的癌症疾病。

【0564】在一些實施方案中，所述癌症疾病為實體腫瘤。在一些實施方案中，所述癌症疾病為乳腺癌或肺癌（優選非小細胞肺癌）。

【0565】在本公開的第十八方面，本公開提供了預防和/或治療與細胞活動異常相關的疾病（例如癌症疾病）的方法，其包括：給予有需要的個體預防和/或治療有效量的前述的物質A，或者前述的藥物組合物。

【0566】在一些實施方案中，所述癌症疾病選自食管癌（例如食管腺癌和食管鱗狀細胞癌）、腦瘤、肺癌（例如小細胞性肺癌、非小細胞性肺癌或肺腺癌）、鱗狀上皮細胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、頭頸癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸癌（例如人結腸腺癌）、直腸癌、結直腸癌、肝癌、腎癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中樞神經系統腫瘤（例如神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、膠質瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲狀腺癌。

【0567】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2、Her2、B7H3、Her3、EGFR相關的癌症疾病。

【0568】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2或Her2相關的癌症疾病。

【0569】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Trop-2相關的癌症疾病。

【0570】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與Her3相關的癌症疾病。

【0571】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與EGFR相關的癌症疾病。

【0572】在一些實施方案中，所述癌症疾病為與B7H3相關的癌症疾病。

【0573】在一些實施方案中，所述癌症疾病為實體腫瘤。

【0574】在一些實施方案中，所述癌症疾病為乳腺癌或肺癌（優選非小細

胞肺癌）。

【0575】在本公開中，除非另有說明，否則本文中使用的科學和技術名詞具有本發明所屬技術領域具有通常知識者所通常理解的含義。並且，本文中所用的細胞培養、分子遺傳學、核酸化學、免疫學實驗室操作步驟均為相應領域內廣泛使用的常規步驟。同時，為了更好地理解本公開，下面提供相關術語的定義和解釋。

【0576】如本文所使用，術語“藥學上可接受的鹽”的例子是由形成藥學上可以接受的陰離子的有機酸形成的有機酸加合鹽，包括但不限於甲酸鹽、乙酸鹽、丙酸鹽、苯甲酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、檸檬酸鹽、抗壞血酸鹽、α-酮戊二酸鹽、α-甘油磷酸鹽、烷基磺酸鹽或芳基磺酸鹽；優選地，所述烷基磺酸鹽為甲基磺酸鹽或乙基磺酸鹽；所述芳基磺酸鹽為苯磺酸鹽或對甲苯磺酸鹽。也可形成合適的無機鹽，包括但不限於鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硝酸鹽、碳酸氫鹽和碳酸鹽、硫酸鹽或磷酸鹽等。

【0577】如本文所使用的，術語“藥學上可接受的載體和/或賦形劑”是指在藥理學和/或生理學上與受試者和活性成分相容的載體和/或賦形劑，其是本領域公知的(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，並且包括但不限於：pH調節劑，表面活性劑，佐劑，離子強度增強劑，稀釋劑，維持滲透壓的試劑，延遲吸收的試劑，防腐劑。

【0578】藥學上可接受的鹽可使用本領域熟知的標準程式獲得，例如，通過將足量的鹼性化合物和提供藥學上可以接受的陰離子的合適的酸反應。

【0579】本公開中，所述藥用輔料是指生產藥品和調配處方時，使用的賦形劑和附加劑，是指除活性成分外，在安全性方面已進行了合理的評估，並且包含在藥物製劑中的物質。藥用輔料除了賦型、充當載體、提高穩定性外，還具有增溶、助溶、緩控釋等重要功能，是可能會影響到藥品的品質、安全性和有效性的重要成分。根據其來源可分為天然物、半合成物和全合成物。根據其作用與用途可分為：溶劑、拋射劑、增溶劑、助溶劑、乳化劑、著色劑、黏合劑、崩解劑、填充劑、潤滑劑、濕潤劑、滲透壓調節劑、穩定劑、助流劑、矯味劑、防腐劑、助懸劑、包衣材料、芳香劑、抗黏著劑、抗氧劑、螯合劑、滲透促進劑、pH調節劑、緩衝劑、增塑劑、表面活性劑、發泡劑、消泡劑、增稠劑、包合劑、保濕劑、吸收劑、稀釋劑、絮凝劑與反絮凝劑、助濾劑、釋放阻滯劑等；根據其給藥途徑可分為口服、注射、黏膜、經皮或局部給藥、經鼻或口腔吸入給藥和眼部給藥等。同一藥用輔料可用於不同給藥途徑的藥物製劑，且有不同的作用和用途。

【0580】所述藥物組合物可根據給藥途徑製成各種適宜的劑型。例如片劑、膠囊劑、顆粒劑、口服溶液劑、口服混懸劑、口服乳劑、散劑、酊劑、糖漿劑、注射劑、栓劑、軟膏劑、乳膏劑、糊劑、眼用製劑、丸劑、植入劑、氣霧劑、粉霧劑、噴霧劑等。其中，所述的藥物組合物或適宜的劑型可以含有0.01mg至1000mg的本公開的化合物或其藥學上可接受的鹽或偶聯物，適宜含有0.1mg至800mg，優選含有0.5-500mg，優選含有0.5至350mg，特別優選1-250mg。

【0581】所述藥物組合物可以注射劑形式用藥，包括注射液、注射用無菌

粉末與注射用濃溶液。其中，可使用的載體和溶劑包括水、林格氏溶液和等滲氯化鈉溶液。另外，滅菌的非揮發油也可用作溶劑或懸浮介質，如單甘油酯或二甘油酯。

【0582】本文使用的術語“治療”一般是指獲得需要的藥理和/或生理效應。該效應根據完全或部分地預防疾病或其症狀，可以是預防性的；和/或根據部分或完全穩定或治癒疾病和/或由於疾病產生的副作用，可以是治療性的。本文使用的“治療”涵蓋了對患者疾病的任何治療，包括：(a)預防易感染疾病或症狀但還沒診斷出患病的患者所發生的疾病或症狀；(b)抑制疾病的症狀，即阻止其發展；或(c)緩解疾病的症狀，即，導致疾病或症狀退化。

【0583】在本公開中，術語“個體”包括人或非人動物。示例性人個體包括患有疾病(例如本文所述的疾病)的人個體(稱為患者)或正常個體。本公開中術語“非人動物”包括所有脊椎動物，例如非哺乳動物(例如鳥類、兩棲動物、爬行動物)和哺乳動物，例如非人靈長類、家畜和/或馴化動物(例如綿羊、犬、貓、奶牛、豬等)。

【0584】本公開中，術語“有效劑量”指被給藥後會在一定程度上緩解所治療病症的一種或多種症狀的化合物的量。

【0585】本公開中，術語“配體藥物偶聯物”是指生物活性分子（藥物分子）與靶向部分連接得到的物質。在本公開的部分實施方案中，生物活性分子與靶向部分通過連接體相連。所述連接體在特定環境（例如腫瘤內的水解酶和/或低pH值環境）中或特定作用（例如溶酶體蛋白酶的作用）下能夠斷裂，從而使生物活性分子與靶向部分分離。在本公開的部分實施方

案中，所述連接體包含可切割或不可切割的單元，例如肽或二硫鍵。在本公開的部分實施方案中，生物活性分子與靶向部分直接通過共價鍵相連，所述共價鍵在特定環境或作用下能夠斷裂，從而使生物活性分子與靶向部分分離。在本公開的部分實施方案中，所述配體藥物偶聯物包含靶向部分、連接體以及本公開的式II化合物片段。

【0586】本公開中，術語“生物活性物”、“生物活性分子”或“藥物分子”指抑制或防止細胞的功能和/或引起細胞死亡或破壞的物質，在本公開的部分實施方案中，偶聯物中的生物活性物、生物活性分子或藥物分子為具有抗腫瘤生物活性的分子。例如：放射性同位素，例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}和Lu的放射性同位素；金屬配合物，例如金屬鉑配合物、金屬金配合物，奧沙利鉑等；糖肽類抗生素，例如博來黴素、平陽黴素；DNA拓撲異構酶抑制劑，例如拓撲異構酶I抑制劑，喜樹鹼、羥基喜樹鹼、9-胺基喜樹鹼、SN-38、伊立替康、拓撲替康、貝洛替康、盧比替康，拓撲異構酶II抑制劑，放線菌素D、阿黴素、多柔比星、多卡米星，柔紅黴素、米托蒽醌、鬼臼毒素、依託泊苷等；干擾DNA合成藥物，例如甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他濱、巰嘌呤、噴司他丁、氟達拉濱、克拉屈濱、奈拉濱等；作用於結構蛋白的藥物，例如微管蛋白抑制劑，長春花生物鹼類、長春新鹼、長春鹼、紫杉醇、多西他賽、卡巴他賽等；腫瘤訊號通路抑制劑，例如絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑、天冬胺酸激酶抑制劑或組胺酸激酶抑制劑等；還包括蛋白酶體抑制劑、組蛋白去乙醯化酶抑制劑、腫瘤新生血管生成抑制劑、細胞週期蛋白抑制劑、美登素衍生物、卡裡奇黴素衍生物、奧

瑞他汀衍生物、Pyrrolobenzodiazepines（PBD）衍生物、美法侖、絲裂黴素C、苯丁酸氮芥、或其它抑制腫瘤細胞生長、促進腫瘤細胞凋亡和壞死的活性物質；酶及其片段，諸如核溶酶；抗生素；毒素，諸如小分子毒素或者細菌、真菌、植物或動物起源的酶活性毒素，包括其片段和/或變體；生長抑制劑；藥物模組。術語“毒素”指能夠對細胞的生長或增殖產生有害效果的物質。

【0587】本公開中，術語“小分子”是指具有生物活性的小分子藥物。術語小分子毒素具有細胞損傷活性，即以某種形式造成細胞的病理學變化的狀態，並且細胞損傷不限於直接損傷，包括對細胞的結構和功能的所有種類的損傷，諸如DNA 裂解、鹼基-二聚體形成、染色體裂解、對細胞分裂機制的損傷和不同酶促活性的下降。

【0588】本公開中，術語“連接體”是指將生物活性分子（藥物分子）與靶向部分連接起來的片段。

【0589】本公開中，術語“靶向部分”是指偶聯物中能夠與細胞表面的靶標（或靶標的部分）特異性結合的部分。通過靶向部分與靶標的相互作用，偶聯物可以被遞送至特定的細胞群。

【0590】本公開中，當偶聯物中的靶向部分為抗體時，偶聯物可被稱為“藥物-抗體偶聯物”。

【0591】本公開中，抗體或其抗原結合片段包括衍生化的抗體或其抗原結合片段，例如具有巰基的抗體或其抗原結合片段，其中所述衍生化使得抗體具有與藥物連接體偶聯物反應的基團或能力。所述巰基-SH可以打開二硫鍵（例如，通過還原劑TCEP還原）衍生獲得。

【0592】本文中使用的術語“癌症”和“腫瘤”以相同的含義使用。

【0593】本文中使用的術語“基因”不僅包括DNA，而且包括其mRNA、其cDNA和其cRNA。

【0594】本文中使用的術語“多核苷酸”以與核酸相同的含義使用，並且還包括DNA、RNA、探針、寡核苷酸和引物。

【0595】本文中使用的術語“Tb”為“target binding”的縮寫，包括抗體或與靶標結合的任意分子，術語“Ab”為“antibody”的縮寫，與“抗體”無區別地使用。

【0596】本文中使用的術語“多肽”和“蛋白”無區別地使用。

【0597】本文中使用的術語“細胞”也包括動物個體內的細胞和培養的細胞。

【0598】本公開中所述的抗B7H3抗體中涉及的B7H3可為本領域常規的B7H3，例如可溶性B7H3、膜形式B7H3等，並且還表示B7H3變體1和/或B7H3變體2。

【0599】KD指獲得自Kd(具體結合分子-靶蛋白相互作用的解離速率)與Ka(具體結合分子-靶蛋白相互作用的結合速率)之比(或Kd/Ka，以莫耳濃度(M)表示)的解離常數。可使用本領域充分建立的方法測定KD值。測定結合分子的KD的優選方法是通過使用表面等離子共振，例如生物感測器系統，如Biacore TM(GE Healthcare Life Sciences)系統。

【0600】術語“B7H3變體”是指一種多肽，其與B7H3多肽，B7H3片段，抗B7H3抗體或其抗體片段具有相似或相同的功能，但非必需包含相似或相同的B7H3多肽，B7H3片段，抗B7H3抗體或其片段的胺基酸序列，或具有相

似或相同的B7H3多肽，B7H3片段，抗B7H3抗體或其片段的結構。

【0601】術語“Her3變體”是指一種多肽，其與Her3多肽，Her3片段，抗Her3抗體或其抗體片段具有相似或相同的功能，但非必需包含相似或相同的Her3多肽，Her3片段，抗Her3抗體或其片段的胺基酸序列，或具有相似或相同的Her3多肽，Her3片段，抗Her3抗體或其片段的結構。

【0602】如本文所用，兩個胺基酸序列之間的百分比同源性等於兩個序列之間的百分比同一性(identity)。兩個序列之間的序列百分比同一性是序列共用的相同位置的數目的函數(即，%同源性＝相同位置的數目/位置總數目X100)，其中考慮缺口(gap)的數目和每一缺口的長度，需要將其引入用於兩個序列的最優對比。可用本領域通常所知的方法進行序列比較和確定序列間的百分比同一性，可用數學演算法實現這種序列比較和百分比同一性的確定。例如，可用Meyers和Miller，1988Comput.Appl.Biosci.4：11-17的演算法(已整合入ALIGN程式(版本2.0))來確定胺基酸序列之間和/或核苷酸序列之間的百分比同一性。此外，可用從Accelrys線上獲得的GCG套裝軟體中的GAP程式(使用其缺省參數)來確定胺基酸序列之間或核苷酸序列之間的百分比同一性。在一個實施方案中，所述兩個序列是等長的。

【0603】術語“表位”是指在動物體優選哺乳動物體內具有抗原性或免疫原性活性的B7H3多肽或蛋白的一部分。B7H3本公開的抗體或其抗原結合片段的表位可以通過現有技術測定，例如合成肽法，免疫資訊學預測，多肽活性的測定，表位元肽掃描法，噬菌體展示技術，X射線衍射和核磁共振分析，抗體同源建模蛋白對接預測法。本文中使用的短語“結合相同表位的抗體”表示，結合共同表位的不同抗體。如果第二抗體結合第一抗體所

結合的部分肽或部分三級結構，那麼可以確定，所述第一抗體和所述第二抗體結合相同表位。

【0604】本公開中，術語“抗體”取其最廣義的解釋，包括完整的單克隆抗體、多克隆抗體以及由至少兩個完整抗體形成的多特異性抗體(例如雙特異性抗體)，只要它們具有所需的生物學活性。在本公開中，“抗體”和“免疫球蛋白”可以互換使用。如本文所述的“抗體分子”或“抗體”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即含有免疫特異性結合抗原的抗原結合位點的分子。因此，術語抗體廣義上不僅涵蓋完整抗體分子，還包括所述抗體的片段以及所述抗體和抗體片段的變體(包括衍生物)。當“抗體分子”或“抗體”與抗原結合片段在同一語境下使用時，“抗體分子”或“抗體”指完整抗體分子或全長抗體。在本說明書中所述術語抗體分子例如包括但非限於單鏈Fv(scFv)，Fab片段，Fab’片段，F(ab’)2，二硫鍵連接的Fv(sdFv)，Fv，及完整抗體或全長抗體。術語“單鏈Fv”或“scFv”是指一種多肽，其包含與抗體VH結構域連接的抗體的VL結構域。例如免疫特異性結合B7H3的抗體可以與其它抗原發生交叉反應。優選地，免疫特異性結合B7H3的抗體與其它抗原不發生交叉反應。免疫特異性結合B7H3的抗體可以例如通過免疫測定或其它本發明所屬技術領域具有通常知識者已知的方法鑒別。“完整”抗體或“全長”抗體指包含兩條重鏈(H)和兩條輕鏈(L)的蛋白，所述重鏈和輕鏈通過二硫鍵相互連接，所述蛋白包含：(1)就重鏈而言，包含可變區(本文縮寫為“VH”)和含有三個結構域CH1、CH2、CH3的重鏈恆定區；和(2)就輕鏈而言，包含輕鏈可變區(本文縮寫為“VL”)和含有一個結構域CL的輕鏈恆定區。本公開的抗體包括但非限於單克隆，多特異

性，人或嵌合抗體，單鏈抗體，Fab片段，F(ab′)片段，抗獨特型(抗-Id)抗體(包括例如本公開抗體的抗-Id抗體)，和上述任何抗體的表位結合片段。本公開的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白的任何類型(例如IgG，IgE，IgM，IgD，IgA和IgY)，類別(例如IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA1和IgA2)或亞類。優選地，本公開的抗體包含或由具有序列及其具體資訊表所述任一胺基酸序列或其片段或變體的VH結構域，VH CDR（本文中多用HCDR表示），VL結構域，或VL CDR（本文中多用LCDR表示）組成。

【0605】在本公開中，術語“單克隆抗體”指抗體來自一群基本均一的抗體，即構成該集群的各抗體完全相同，除了可能存在的少量天然突變。單克隆抗體具有針對抗原的一個決定簇(表位)的高特異性，而與其相對的多克隆抗體則包含針對不同決定簇(表位)的不同抗體。除了特異性之外，單克隆抗體的優點還在於合成時可以不受其他抗體的污染。此處修飾語“單克隆”表示該抗體的特徵在於來自一個基本均一的抗體群，而不應理解成需由特殊方法制得。

【0606】在本公開的部分實施方案中，單克隆抗體還特別包括嵌合抗體，即重鏈和/或輕鏈的一部分與某種、某類或某亞類抗體相同或同源，其餘部分則與另一種、另一類或另一亞類抗體相同或同源，只要它們具有所需的生物學活性(參見例如US 4,816,567；和Morrison等人，1984，PNAS，81:6851-6855)。可用於本公開的嵌合抗體包括靈長類化(primatized)抗體，其包含來自非人靈長類(例如古猴、猩猩等)的可變區抗原結合序列和人恆定區序列。

【0607】術語“抗原結合片段”是指抗體的一部分，優選是抗原結合區或可

變區。抗體片段的實例包括Fab、Fab’、F(ab’)2、Fd、Fv、dAb和互補決定區片段，二抗體(diabody)，線性抗體和單鏈抗體分子。本文中使用的術語“抗原結合片段”表示抗體的具有抗原結合活性的部分片段，其中所述片段具有抗體的完全或部分功能，包括非限於單鏈Fv(scFv)，Fab，Fab’，F(ab’)2，二硫鍵連接的Fv(sdFv)，Fv，di-scFv等。該術語也包括Fab’，其為在還原條件下處理F(ab’)2得到的抗體的可變區的單價片段。但是，該術語不限於這些分子，只要所述片段具有與抗原的結合親和力即可。此外，這些功能片段不僅包括用適當的酶處理抗體蛋白的全長分子得到的片段，而且包括使用遺傳修飾的抗體基因在適當宿主細胞中生產的蛋白。

【0608】本文中使用的術語“Fab’”表示如上所述在還原條件下處理F(ab’)2得到的抗體的可變區的單價片段。但是，本公開的Fab’也包括使用遺傳修飾的抗體基因生產的Fab’。

【0609】如本文中所使用的，術語“scFv”是指，包含VL和VH結構域的單個多肽鏈，其中所述VL和VH通過連接體（linker）或直接相連（參見，例如, Bird等人, Science 242:423-426 (1988)；Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)；和Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷， Roseburg 和Moore 編，Springer-Verlag，紐約，第269-315頁(1994)）。此類scFv分子可具有一般結構：NH2-VL-連接體-VH-COOH或NH2-VH-連接體-VL-COOH。合適的現有技術連接體由重複的GGGGS胺基酸序列或其變體組成。例如，可使用具有胺基酸序列(GGGGS)4的連接體，但也可使用其變體（Holliger等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448）。可用於本公開的其他連接體由Alfthan等人

(1995)，Protein Eng. 8:725-731，Choi等人(2001)，Eur. J. Immunol. 31: 94-106，Hu等人(1996)，Cancer Res. 56:3055-3061，Kipriyanov等人(1999)，J. Mol. Biol. 293: 41-56和Roovers等人(2001)，Cancer Immunol.描述。在一些情況下，scFv的VH與VL之間還可以存在二硫鍵。如本文中所使用的，術語“di-scFv”是指，由兩個scFv連接形成的抗體片段。

【0610】如本文所用，在所述抗體或其抗原結合片段中的即使含有變體、胺基酸的置換、缺失或添加，也仍然具有結合所述抗原的活性。

【0611】術語“雙特異性抗體”亦稱為“雙功能抗體偶聯物”，是指由第一抗體(片段)和第二抗體(片段)通過偶聯臂所形成的偶聯物，該偶聯物保留了各自抗體的活性，故具有雙功能和雙特異性。

【0612】術語“多特異性抗體”包括例如三特異性抗體和四特異性抗體，前者是具有三種不同抗原結合特異性的抗體，而後者是具有四種不同抗原結合特異性的抗體。

【0613】術語“完整抗體”或“全長抗體”指包含抗原結合可變區和輕鏈恆定區(CL)、重鏈恆定區(CH1、CH2和CH3)的抗體。恆定區可以是天然序列(例如人天然恆定區序列)或其胺基酸序列變體。完整抗體優選是具有一種或多種效應功能的完整抗體。

【0614】術語“前抗（Probody）”是一種修飾的抗體，包括一種抗體或一種抗體片段，能專門與其靶點結合，能夠與掩蔽基團耦合，其中掩蔽基團指對抗體或抗體片段與其靶點的結合能力的裂解常數比沒有耦合掩蔽基團的抗體或抗體片段與其靶點的結合能力的裂解常數至少大100倍或1000倍、或者10000倍。

【0615】在本公開中，非人(例如鼠)抗體的“人源化”形式指包含最少量非人免疫球蛋白序列的嵌合抗體。大多數人源化抗體是人接受者免疫球蛋白的超變區殘基被置換成具有所需特異性、親和力和功能的非人(例如小鼠、大鼠、兔或非人靈長類)超變區殘基(供者抗體)。在一些實施方案中，人免疫球蛋白的框架區(FR)殘基也被置換成非人殘基。而且，人源化抗體還可以包含受者抗體或供者抗體中沒有的殘基。這些修飾是為了進一步優化抗體的性能。人源化抗體一般包含至少一個，通常是兩個可變區，其中所有或幾乎所有超變環(hypervanable loops)與非人免疫球蛋白的相對應，而FR則完全或幾乎完全是人免疫球蛋白的序列。人源化抗體還可以包含免疫球蛋白恆定區(Fc，通常是人免疫球蛋白Fc)的至少一部分。有關細節參見例如Jones等人，1986，Nature，321: 522-525；Riechmann等人，1988，Nature，332: 323-329；和Presta，1992，Curr Op Struct Bwl 2: 593-596。

【0616】完整抗體可根據重鏈恆定區的胺基酸序列分為不同的“類”。主要的五類是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中幾類還可以分為不同的“亞類”(同種型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。抗體不同類的重鏈恆定區分別稱為α、β、ε、γ和μ。免疫球蛋白不同類的亞基結構和三維構型是本領域中公知的。

【0617】在本文中，本公開的抗體或其抗原結合片段含有的CDR可根據本領域已知的各種編號系統確定。在某些實施方案中，本公開的抗體或其抗原結合片段含有的CDR優選地通過Kabat、Chothia或，AbM或IMGT編號系統確定。其中根據IMGT編號系統，其CDR和FR對應的編號如下：

	FR1-	CDR1-	FR2-	CDR2-	FR3-	For germline	For rearranged

	IMGT	IMGT	IMGT	IMGT	IMGT	V-GENE (*) CDR3-IMGT	V-J-GENEs and V-D-J-GENEs	
						Germline CDR3-IMGT	Rearranged CDR3-IMGT	FR4-IMGT
胺基酸編號	1 --> 26 (C 23)	27 --> 38	39 --> 55 (W 41)	56 --> 65	66 --> 104 (C 104)	105 --> 116	105 --> 117 (112.1, 111.1, 112.2, 111.2, etc.)	118 --> 129
胺基酸個數	25-26 aa	5-12 aa	16-17 aa	0-10 aa	36-39 aa	2-12 aa	2-13 aa (more than 13 aa)	10-12 aa

【0618】如本文中所使用的，術語“構架殘基區”或“FR殘基”是指，抗體可變區中除了如上定義的CDR殘基以外的那些胺基酸殘基。

【0619】如本文中所使用的，術語“胚系抗體基因”是非淋巴細胞表達的免疫球蛋白的編碼基因，它沒有經歷導致表達特異免疫球蛋白的遺傳學重排及成熟的成熟過程。本公開的各種實施方案所提供的一個優點來源於一種認識，那就是胚系抗體基因編碼的胺基酸序列比成熟抗體基因編碼的胺基酸序列更多地保留了動物物種個體的特徵性的重要胺基酸序列結構。因此當被治療性應用於該物種時，更少地被該物種識別為外源物質。

【0620】作為胺基酸取代，在本說明書中，保守的胺基酸取代是優選的。保守的胺基酸取代表示，在與胺基酸側鏈有關的胺基酸集合內發生的取代。優選的胺基酸集合如下：酸性集合(天冬胺酸和麩胺酸)；鹼性集合(離胺酸、精胺酸和組胺酸)；非極性集合(丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、異亮胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸和色胺酸)；和不帶電荷的極性家族(甘

胺酸、天冬醯胺、麩胺醯胺、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸和酪胺酸)。更優選的胺基酸集合如下：脂族羥基(絲胺酸和蘇胺酸)；含有醯胺的集合(天冬醯胺和穀氨醯胺)；脂族集合(丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸和異亮胺酸)；和芳族集合(苯丙胺酸、色胺酸和酪胺酸)。這樣的胺基酸取代優選地在不會損害具有原始胺基酸序列的物質的性能的集合內進行。

【0621】此外，已知的是，缺失在培養的哺乳動物細胞中生產的抗體的重鏈的羧基端的離胺酸殘基(Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995))，還已知的是，缺失在培養的哺乳動物細胞中生產的抗體的重鏈的羧基端的2個胺基酸殘基(甘胺酸和離胺酸)，並且新位於羧基端處的脯胺酸殘基被醯胺化(Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007))。但是，重鏈序列的這樣的缺失和修飾不會影響抗體的抗原結合親和力和效應子功能(補體的活化、抗體依賴性的細胞的細胞毒性等)。

【0622】本文涉及的二十個常規胺基酸的編寫遵循常規用法。參見例如，

Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates , Sunderland, Mass. (1991))，其以引用的方式併入本文中。在本文中，術語“多肽”和“蛋白質”具有相同的含義且可互換使用。並且在本公開中，胺基酸通常用本領域公知的單字母和三字母縮寫來表示。例如，丙胺酸可用A或Ala表示；精胺酸可用R或Arg表示；甘胺酸可用G或Gly表示；穀胺醯胺可用Q或Gln表示。

【0623】如本文中所使用的，術語“預防”是指，為了阻止或延遲疾病或病症或症狀（例如，腫瘤和傳染病）在受試者體內的發生而實施的方法。如本文中所使用的，術語“治療”是指，為了獲得有益或所需臨床結果而實施

的方法。為了本公開的目的，有益或所需的臨床結果包括但不限於，減輕症狀、縮小疾病的範圍、穩定（即，不再惡化）疾病的狀態，延遲或減緩疾病的發展、改善或減輕疾病的狀態、和緩解症狀（無論部分或全部），無論是可檢測或是不可檢測的。此外，“治療”還可以指，與期望的存活期相比（如果未接受治療），延長存活期。

【0624】如本文中使用的，術語“受試者”是指哺乳動物，例如靈長類哺乳動物，例如非人靈長類哺乳動物或人。在某些實施方式中，所述受試者（例如人）腫瘤和傳染病，或者，具有患有上述疾病的風險。

【0625】如本文中所使用的，術語“有效量”是指足以獲得或至少部分獲得期望的效果的量。例如，預防疾病（例如，腫瘤和傳染病）有效量是指，足以預防，阻止，或延遲疾病（例如，腫瘤和傳染病）的發生的量；治療疾病有效量是指，足以治癒或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其併發症的量。測定這樣的有效量完全在本發明所屬技術領域具有通常知識者的能力範圍之內。例如，對於治療用途有效的量將取決於待治療的疾病的嚴重度、患者自己的免疫系統的總體狀態、患者的一般情況例如年齡，體重和性別，藥物的施用方式，以及同時施用的其他治療等等。

【0626】如本文中所使用的，術語“效應子功能（effector function）”是指，那些可歸因於抗體Fc區（天然序列Fc區或胺基酸序列變體Fc區）的生物學活性，且其隨抗體同種型而變化。

【0627】術語“藥學上可接受的”指當分子本體、分子片段或組合物適當地給予動物或人時，它們不會產生不利的、過敏的或其他不良反應。可作為藥學上可接受的載體或其組分的一些物質的具體示例包括糖類（如乳

糖）、澱粉、纖維素及其衍生物、植物油、明膠、多元醇（如丙二醇）、海藻酸等。

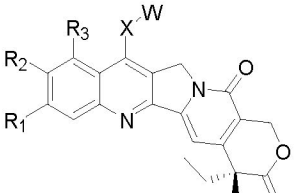
【0628】使用實驗動物可以確定抗體和抗體-藥物偶聯物對癌症的體內治療效果，例如，將抗體施用給植入了表達B7H3的腫瘤細胞系的裸鼠，並測量癌細胞的任何變化。

【0629】在本公開中，儘管大多數情況下抗體中的胺基酸取代是被L-胺基酸取代，但也不限於此。在一些實施方案中，抗體肽鏈中可以包括一個或多個D-胺基酸。包含D-胺基酸的肽在口腔、腸道或血漿中比僅包含L-胺基酸的肽更加穩定而不易降解。

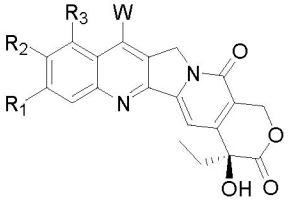
【0630】本公開所用的單克隆抗體可以由許多方法生產。例如，用於本公開的單克隆抗體可以通過雜交瘤方法，使用許多物種(包括小鼠、倉鼠、大鼠和人的細胞)獲得(參見例如Kohler等人，1975，Nature，256: 495)，或者通過重組DNA技術制得(參見例如US 4,816,567)，或者從噬菌體抗體庫中分離得到(參見例如Clackson等人，1991，Nature，352: 624-628；和Marks等人，1991，Journal of Molecular Biology，222: 581-597)。

【0631】本文中，除非以其他方式明確指出，在本文中通篇採用的描述方式“各…獨立地選自”和“…各自獨立地選自”可以互換，均應做廣義理解，其既可以是指在不同基團中，相同或不同的符號之間所表達的具體選項之間互相不影響，也可以表示在相同的基團中，相同或不同的符號之間所表達的具體選項之間互相不影響。

【0632】本文中，術語“直接鍵”表示其兩側的基團直接相連，例如，式II

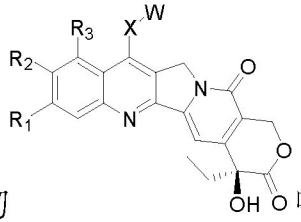


所示的化合物 中，若X為直接鍵，則其結構式為

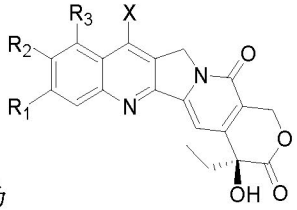


。其餘直接鍵可參照前述內容進行理解。

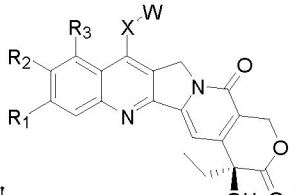
【0633】本文中，術語“不存在”表示該基團不存在，例如，式II所示的化



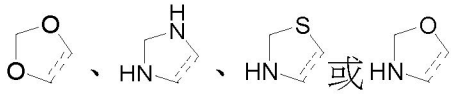
合物 中，若W不存在，則其結構式為



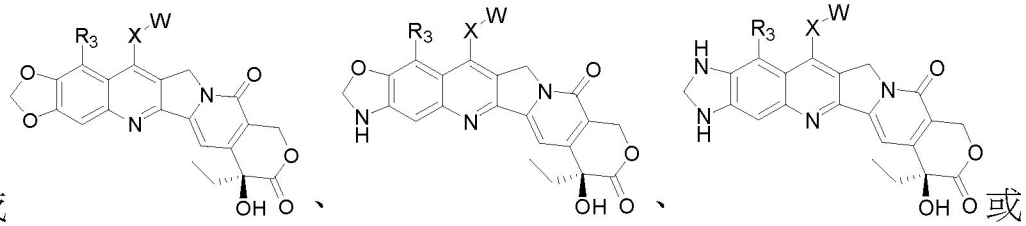
。



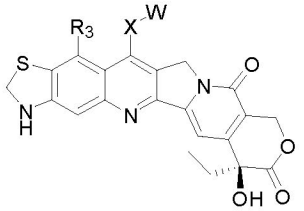
式II所示的化合物 中，R_1和R_2和與其相連的碳原子形成



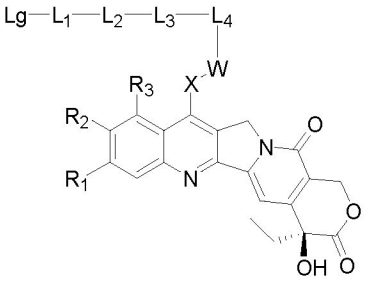
，“虛線”鍵表示所述雜環與苯環稠合的位置，



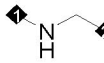
例如，形成 、 、 或

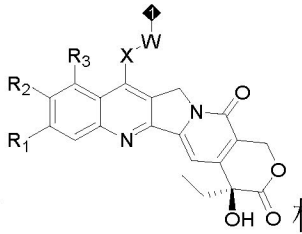


。

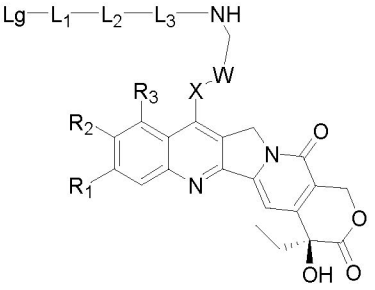


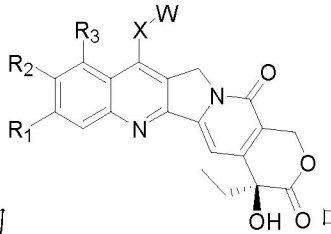
【0634】本文中，式III所示的藥物連接體偶聯物

中，L_4為  時，其中的標號1、2表示L_4與其餘基團的連接位置，具體



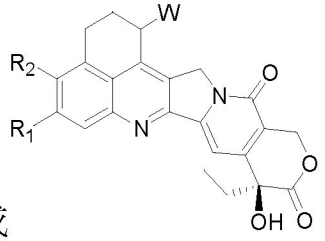
地，1位與L_3相連，2位與藥物分子即相連時，形成

 。其餘標號1、2可參照前述內容進行理解。



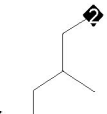
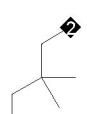
【0635】本文中，式II所示的化合物中，R_3和X和與其

相連的碳原子一起形成 ，虛線表示所述碳環與苯環和吡啶環稠合的位

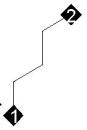
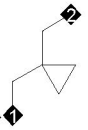


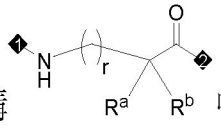
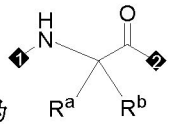
置，形成。

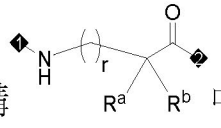
【0636】本文中，X的定義例如為，“X選自任選取代的 ，所述取代基

選自1個或2個C1-4烷基（如甲基）”，則X例如可以為  或  。X其餘

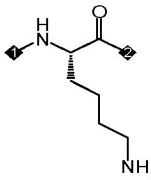
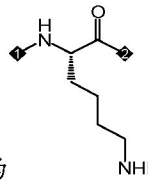
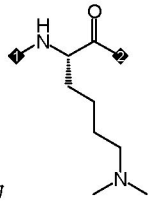
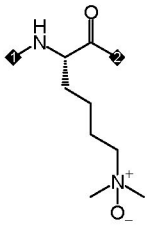
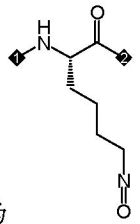
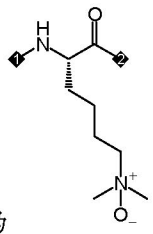
類似的定義可參照前述內容進行理解。

【0637】本文中，X的定義例如為，“X選自任選取代的  ，所述取代基選自2個C1-4烷基（如甲基）和與它們同時相連的碳原子一起形成C3-6環烷基（如環丙基）”，則X例如可以為  。X其餘類似的定義可參照前述內容進行理解。

【0638】AA^1所示胺基酸殘基的結構  中，若r為0，則本發明所屬技術領域具有通常知識者可以理解的是，AA^1所示胺基酸殘基的結構將變為  。

【0639】AA^1所示胺基酸殘基的結構  中，若R^a與R^b和與它們共同相連的碳原子一起，形成4-10元雜環，所述4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代，其中，術語“所述4-10元雜環任選地被一個或多個R^0所取代”的含義為，所述4-10元雜環可以不被取代，也可以被一個或多個R^0所取代，且所述多個R^0中，各R^0的定義可以相同，也可以不同。其餘類似的定義可以參照前述內容進行理解。

【0640】本文中，例如，L_3選自Lys、Val-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Ala、Lys-Ala-Asn時，“所述離胺酸（Lys）的遠端胺基任選地被1個、2個或3個選自第三丁氧羰基、C1-6烷基（優選甲基）、O的取代基所取代”的含義為，所述L_3各選項中的Lys的遠

端胺基任選地被1個、2個或3個選自第三丁氧羰基、C1-6烷基（優選甲基）、O的取代基所取代。其中，“Lys的遠端胺基”指的是離胺酸殘基  中裸露的胺基-NH_2。“所述離胺酸（Lys）的遠端胺基任選地被1個、2個或3個選自第三丁氧羰基、C1-6烷基（優選甲基）、O的取代基所取代”表示所述離胺酸（Lys）的遠端胺基可以不被取代，也可以被1個、2個或3個選自第三丁氧羰基、C1-6烷基（優選甲基）、O的取代基所取代，例如，可以被1個第三丁氧羰基取代，即變為  ，或者，可以被2個甲基取代，即變為  ，或者被2個甲基和1個O同時取代，即變為  。需要說明的是，“所述離胺酸（Lys）的遠端胺基被O取代”指的是所述離胺酸（Lys）的遠端胺基被氧代，即變為  ，若該遠端胺基進一步被兩個甲基所取代，則其變為  。

【0641】在本說明書的各部分，本公開化合物的取代基按照基團種類或範圍公開。特別指出，本公開包括這些基團種類和範圍的各個成員的每一個獨立的次級組合。例如，術語“C1-6烷基”特別指獨立公開的甲基、乙基、C3烷基、C4烷基、C5烷基和C6烷基。

【0642】在本文中，術語“C1-6烷基”表示直鏈或支鏈的含有1-6個碳原子的烷基，包括例如 “C1-3烷基”或 “C1-4烷基”，甲基，乙基等，具體實例包括但不限於：甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、己基。

【0643】在本文中，術語“C_{1-4}烷基”表示直鏈或支鏈的含有1-4個碳原子的烷基，包括例如 “C_{1-3}烷基”，甲基，乙基等，具體實例包括但不限於：甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基。

【0644】在本文中，術語“C_{2-6}烯基”是指含有至少一個雙鍵且碳原子數為2-6的直鏈、支鏈或環狀的烯基，包括例如“C_{2-4}烯基”等。其實例包括但不限於：乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、1,3-丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,4-己二烯基、環戊烯基、1,3-環戊二烯基、環己烯基、1,4-環己二烯基等。

【0645】在本文中，術語“C_{2-6}炔基”是指含有至少一個三鍵且碳原子數為2-6的直鏈或支鏈的炔基，包括例如“C_{2-4}炔基”等。其實例包括但不限於：乙炔基、丙炔基、2-丁炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-甲基-2-戊炔基、2-己炔基、3-己炔基、5-甲基-2-己炔基等。

【0646】在本文中，術語“鹵素”包括氟、氯、溴、碘。

【0647】在本文中，術語“3-6元環烷基”或“C_{3-6}環烷基”是指含有3-6個碳原子的飽和環狀烷基，包括環丙烷基（即環丙基）、環丁烷基（即環丁基）、環戊烷基（即環戊基）、環己基。

【0648】在本文中，術語“3-7元碳環烷基”或“C_{3-7}環烷基”是指含有3-7個碳原子的飽和環狀烷基，包括環丙烷基、環丁烷基、環戊烷基、環己基、環庚基。

【0649】在本文中，術語“C1-6烷氧基”是指通過氧原子連接至母體分子部分的如上文所定義的烷基。具體實例包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、異丁氧基、第三丁氧基、戊氧基、己氧基等。

【0650】在本文中，術語“C_{1-4}烷氧基”是指通過氧原子連接至母體分子部分的如上文所定義的烷基。具體實例包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、異丁氧基、第三丁氧基等。

【0651】在本文中，術語“4-10元雜環基”是指含有4-10個環原子(其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的環狀基團。術語“4-6元雜環基”是指含有4-6個環原子(其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的環狀基團。任選地，環狀結構中的環原子（例如碳原子、氮原子或硫原子）可以被氧代。“4-8元雜環基”包括例如“4-8元含氮雜環基”、“4-8元含氧雜環基”、“4-7元雜環基”、“4-7元含氧雜環基”、“4-7元雜環基”、“4-6元雜環基”、“5-7元雜環基”、“5-6元雜環基”、“5-6元含氮雜環基”，包括但不限於氧代環丁烷基、吡咯烷基、四氫呋喃基、哌

啶基、哌咔基、四氫吡喃基、高哌咔基等。

【0652】在本文中，術語“4-10元雜環”是指含有4-10個環原子(其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的環。術語“5-6元雜環”是指含有5-6個環原子(其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的環，包括但不限於吡咯烷、四氫呋喃、哌啶、哌咔、四氫吡喃等環。

【0653】在本文中，術語“芳基”是指具有芳香性的單環或多環烴基，例如6-10元芳基、5-8元芳基等。具體的實例包括但不限於苯基、萘基、蒽基、菲基等。所述“6-10元芳基”是指含有6-10個環原子的芳基。所述“C6-10芳基” 是指含有6-10個碳原子的芳基。

【0654】在本文中，術語“雜芳基”是指具有芳香性的環狀基團，其中至少一個環原子為雜原子，例如氮原子、氧原子或硫原子。任選地，環狀結構中的環原子（例如碳原子、氮原子或硫原子）可以被氧代。具體實例包括但不限於5-10元雜芳基、5-6元雜芳基、5-10元含氮雜芳基、6-10元含氧雜芳基、6-8元含氮雜芳基、5-8元含氧雜芳基等，例如呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、異噻唑基、噻二唑基、噁唑基、異噁唑基、噁二唑基、咪唑基、吡唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、吡啶基、2-吡啶酮基、4-吡啶酮基、嘧啶基、1,4-二氧雜環己二烯基、2*H*-1,2-噁咔基、4*H*-1,2-噁咔基、6*H*-1,2-噁咔基、4*H*-1,3-噁咔基、6*H*-1,3-噁咔基、4*H*-1,4-噁咔基、噠咔基、吡咔基、1,2,3-三咔基、1,3,5-三咔基、1,2,4,5-四咔基、氮雜環庚三烯基、1,3-二氮雜環庚三烯基、氮雜環辛四烯基等。

【0655】本文用波浪線“~~”表示的結構式中的鍵意在表示，該結構表示順式或反式異構體，或任意比例的順式和反式異構體的混合物。

【0656】術語“藥物與抗體比”或“DAR”是指藥物的數量，例如，與ADC的抗體附接的小分子毒素。ADC的DAR可以在1到16的範圍內，但是取決於抗體上的連接位點的數量，更高的負載(例如20)也是可能的。提及負載到單個抗體上的藥物的數量時，或可替代地，提及一組ADC的平均或均值DAR時，可以使用術語DAR。

【0657】發明的有益效果

【0658】本公開通過大量研究獲得高活性和高細胞滲透性的生物活性藥物（生物活性分子或payload）、高體內迴圈穩定性和高化學穩定性的連接體、通過調節連接體的理化性質（如鹼性和親油性）實現抗體偶聯藥物（ADC）對腫瘤微環境的富集、連接體特有的體內酶切特性以及與靶向部分的偶聯方式、結合大量體內體外藥效的篩選驗證，獲得一類新穎的抗體生物活性分子偶聯物。利用上述方式獲得的偶聯物，能夠實現多種下述的驚奇的技術效果：

【0659】根據上述方式得到的偶聯物具有更好的溶解度和優異的化學穩定性，如不發生傳統ADC中馬來醯亞胺連接方式引起的可逆Michael加成反應，因此可以獲得高藥物-抗體比，在一些實施方案中，所述偶聯物的DAR值能夠達到6-8；

具有極高的偶聯效率，在一些實施方案中，所述偶聯效率能夠達到或超過90%；

通過大量研究發現了一類具有高血漿穩定性，但同時又能在腫瘤微環境中

（腫瘤細包內和腫瘤細胞外均可）裂解的連結子，因此可以在抗原低表達或者抗原不表達腫瘤中產生好的抗腫瘤效果；

根據上述方式得到的偶聯物（ADC）通過對連接體和整體 ADC 分子的理化性質的調整，提高了整個 ADC 分子在相對酸性腫瘤環境中的暴露量，因而 ADC 具有更好的腫瘤組織靶向性，即在腫瘤微環境中的富集能力，增加了生物活性分子在瘤內和血液濃度比，降低了 ADC 分子的機理相關的毒性（ADC 結合非腫瘤組織中細胞表面抗原並內吞後產生的毒性，或者又叫“on-target 毒性”），因此具有更高的治療指數；

根據上述方式得到的偶聯物具有很高的在體內迴圈中的穩定性，減少了藥物分子在非靶組織中的脫落，減少了非靶組織中毒素脫落引起的“off-target”毒性；

所述偶聯物的生物活性分子具有更高的抗腫瘤細胞活性，因此具有優異的旁觀者效應（by-stander effect），ADC 能夠更有效地殺死抗原高表達腫瘤細胞以及腫瘤組織中抗原低表達或抗原不表達的腫瘤細胞；

本公開的毒素-連接體，利用其連接體在腫瘤微環境中的胞外裂解能力，可以和沒有細胞內吞能力的抗體組成抗體偶聯藥物，這類抗體偶聯藥物依然具有高抗腫瘤活性；

本公開的毒素-連接體，利用其連接體在腫瘤微環境中的胞外裂解能力以及其在腫瘤微環境中的富集能力，可以和沒有細胞內吞能力的抗體以及沒有腫瘤細胞外抗原結合能力的抗體組成抗體偶聯藥物，這類抗體偶聯藥物依然具有高抗腫瘤活性；

本公開提供的抗體具有極高的人源化程度或者全人源抗體，從而可安全地

施用給人受試者，而不引發免疫原性反應。具有能夠很高的結合人和非人B7H3 的能力，尤其涉及與非人靈長類動物(例如食蟹猴)的 B7H3 具有交叉反應性的抗體的分子；

綜上，本發明的連接體、抗體和ADC具有重大的臨床價值。

【圖式簡單說明】

【0660】

圖1A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與人B7H3-4IgG-His蛋白ELISA結合檢測。

圖1B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與人B7H3-4IgG-His蛋白ELISA結合檢測。

圖2A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與猴B7H3-4IgG-His蛋白ELISA結合檢測。

圖2B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與猴B7H3-4IgG-His蛋白ELISA結合檢測。

圖3A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與MCF-7腫瘤細胞流式結合檢測。

圖3B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與MCF-7腫瘤細胞流式結合檢測。

圖4A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與A549腫瘤細胞流式結合檢測。

圖4B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與A549腫瘤細胞流式結合檢測。

圖5所示為抗B7H3抗體2E3-02與PC-3腫瘤細胞流式結合檢測。

圖6A 所示為抗B7H3抗體1D1-01與B7H3蛋白特異性結合檢測。

圖6B 所示為抗B7H3抗體2E3-02與B7H3蛋白特異性結合檢測。

圖7A 所示為腫瘤細胞A549對候選抗體1D1-01內吞檢測。

圖7B 所示為腫瘤細胞A549對候選抗體2E3-02內吞檢測。

圖7C 所示為腫瘤細胞A549對候選抗體202-2-1內吞檢測。

圖8 所示為偶聯前後的SEC圖譜。

圖9 所示為抗B7H3-ADC在NCI-HT29移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試之一。

圖10 所示為抗B7H3-ADC在NCI-HT29移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試之二。

圖11 所示為抗B7H3-ADC在 NCI-H358移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試。

圖12 所示為抗B7H3-ADC在 食管鱗癌PDX模型中抑制腫瘤生長的測試。

圖13 所示為抗B7H3-ADC在 前列腺PDX模型中抑制腫瘤生長的測試。

圖14 所示為抗Her3-ADC在 NCI-H358移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試。

圖15所示為抗Her3-ADC在 SW480移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試之一。

圖16所示為抗Her3-ADC在 SW480移植瘤模型抑制腫瘤生長的測試之二。

圖17 所示為HT29模型中A1.9在血漿和腫瘤中的分佈比。

圖18 所示為HT29模型中ADC在血漿和腫瘤中的分佈比。

圖19A 所示為抗體-藥物偶聯物在腫瘤勻漿中孵育並檢測結果。

圖19B 所示為抗體-藥物偶聯物在肌肉組織勻漿中孵育結果。

【實施方式】

【0661】以下通過具體實施方式的描述對本公開作進一步說明，但這並非是對本公開的限制。本發明所屬技術領域具有通常知識者根據本公開的教導，可以做出各種修改或改進，而不脫離本公開的基本思想和範圍。所用試劑或儀器未注明生產廠商者，均為可以通過市購獲得的常規產品。

【0662】本公開中的縮寫具有以下含義：

OMs	甲磺酸酯基	FA	甲酸

OTs	對甲苯磺酸酯基	ACN	乙腈
OTf	三氟甲磺酸酯基	CCK8 試劑	2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑單鈉鹽
TBS	第三丁基二甲基矽基	FBS	胎牛血清
MMT	對甲氧基苯基二苯甲基	DMSO	二甲基亞碸
PB/PBS	磷酸鹽緩液	HBTU	O-苯並三氮唑-四甲基脲六氟磷酸鹽
HOBT	1-羥基苯並三唑	HATU	2-(7-氮雜苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽
NBS	N-溴代琥珀醯亞胺	TFA	三氟乙酸
PPTS	吡啶對甲苯磺酸鹽	DCM	二氯甲烷
THF	四氫呋喃	DMF	N,N-二甲基甲醯胺
EDC	1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽	IgG	免疫球蛋白 G
CDR	免疫球蛋白可變區中的互補決定區	HRP	辣根過氧化物酶
FR	抗體構架區：抗體可變區中除 CDR 殘基以外的胺基酸殘基	hFc	人 IgG 抗體 Fc 段
VH	抗體重鏈可變區	KD	平衡解離常數
VL	抗體輕鏈可變區	HCDR1	免疫球蛋白重鏈可變區中的互補決定區 1
AbM	AbM CDR 定義方式來源於 Martin 的相關研究（Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA	HCDR2	免疫球蛋白重鏈可變區中的互補決定區 2

	86:9268–9272），此定義方法整合了 Kabat 及 Chothia 兩者的部分定義。		
Kabat	由 Elvin A. Kabat 提出的免疫球蛋白比對及編號系統 (參見，例如 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。	HCDR3	免疫球蛋白重鏈可變區中的互補決定區 3
Chothia	由 Chothia 等人提出的免疫球蛋白編號系統，其是基於結構環區的位置鑒定 CDR 區邊界的經典規則 (參見，例如 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883)。	LCDR1	免疫球蛋白輕鏈可變區中的互補決定區 1
IMGT	基於由 Lefranc 等人發起的國際免疫遺傳學資訊系統 (The international ImMunoGeneTics information system ® (IMGT))的編號系統，可參閱 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003。	LCDR2	免疫球蛋白輕鏈可變區中的互補決定區 2
mAb	單克隆抗體	LCDR3	免疫球蛋白輕鏈可變區中

			的互補決定區 3
EC50	產生 50%功效或結合的濃度	SEC-HPLC	分子排阻高效液相色譜
ELISA	酶聯免疫吸附測定	HC	疫球蛋白重鏈
PCR	聚合酶鏈式反應	LC	疫球蛋白輕鏈

【0663】序列及其具體資訊：

SEQ ID NO	序列名稱	胺基酸序列
1	scFv 1D1	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMN WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVQGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRMYSSG WYWGAFDMWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLA WNQQKPGQAPRLLIYGTFKRATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRLEIK
2	scFv 2E3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVQGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARSGYD YFFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWYQQKP GQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTKVEIK
3	1D1-01 VH	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMN WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVQGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRMYSSG WYWGAFDMWGQGTMVTVSS
4	1D1-01 chothia HCDR1	GFTISSY
5	1D1-01 chothia HCDR2	KQDGSE

6	1D1-01 chothia HCDR3	RMYSSGWYWGAFDM
7	1D1-01 kabat HCDR1	SYWMN
8	1D1-01 kabat HCDR2	NIKQDGSEKYYVDSVQG
9	1D1-01 kabat HCDR3	RMYSSGWYWGAFDM
10	1D1-01 IMGT HCDR1	GFTISSYW
11	1D1-01 IMGT HCDR2	IKQDGSEK
12	1D1-01 IMGT HCDR3	ARRMYSSGWYWGAFDM
13	1D1-01 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWN QQKPGQAPRLLIYGTFKRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRLEIK
14	1D1-01 chothia LCDR1	RASQSVSSIYLA
15	1D1-01 chothia LCDR2	GTFKRAT
16	1D1-01 chothia	QQYDTSSIT

	LCDR3	
17	1D1-01 kabat LCDR1	RASQSVSSIYLA
18	1D1-01 kabat LCDR2	GTFKRAT
19	1D1-01 kabat LCDR3	QQYDTSSIT
20	1D1-01 IMGT LCDR1	QSVSSIY
\	1D1-01 IMGT LCDR2	GTF
21	202-2-1 kabat/IMGT LCDR3	QQLNSYPLT
22	1D1-01 IMGT LCDR3	QQYDTSSIT
23	2E3-02 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVQGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARSGYD YFFDYWGQGTLVTVSS
24	2E3-02 chothia HCDR1	GFTFSSY
25	2E3-02 chothia	SGSGGS

	HCDR2	
26	2E3-02 chothia HCDR3	ARSGYDYFFDY
27	2E3-02 kabat HCDR1	SYAMN
28	2E3-02 kabat HCDR2	GISGSGGSTYYADSVQG
29	2E3-02 kabat HCDR3	ARSGYDYFFDY
30	2E3-02 IMGT HCDR1	GFTFSSYA
31	2E3-02 IMGT HCDR2	ISGSGGST
32	2E3-02 IMGT HCDR3	AKARSGYDYFFDY
33	2E3-02 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWY QQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTKVEIK
34	2E3-02 chothia LCDR1	RASQRISSSFLA
35	2E3-02 chothia LCDR2	GASSRAT

36	2E3-02 chothia LCDR3	QQYSNSPLT
37	2E3-02 kabat LCDR1	RASQRISSSFLA
38	2E3-02 kabat LCDR2	GASSRAT
39	2E3-02 kabat LCDR3	QQYSNSPLT
40	2E3-02 IMGT LCDR1	QRISSSF
\	2E3-02 IMGT LCDR2	GAS
41	202-2-1 IMGT LCDR1	QGISSY
42	2E3-02 IMGT LCDR3	QQYSNSPLT
43	IgG1 CH，即 IgG1 恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS

		FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
44	Kappa CL，即 kappa 恆定區	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
45	1D1-01 HC，即 1D1-01 重鏈	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMN WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVQGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRMYSSG WYWGAFDMWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	1D1-01 LC，即 1D1-01 輕鏈	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWN QQKPGQAPRLLIYGTFKRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

47	2E3-02 HC，即 2E3-02 重鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVQGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARSGYD YFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	2E3-02 LC，即 2E3-02 輕鏈	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWY QQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
49	202-2-1 VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWYDVSHKYYADSVKGRF TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGDP DAFDIWGQGTMVTVSS
50	202-2-1 VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK
51	202-2-1 HC，即 202-2-1 重鏈	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWYDVSHKYYADSVKGRF TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGDP DAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP

		KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	202-2-1 LC，即 202-2-1 輕鏈	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
53	202-2-1 kabat HCDR1	TYGMH
54	202-2-1 kabat HCDR2	VIWYDVSHKYYADSVKG
55	202-2-1 kabat HCDR3	DWGDPDAFDI
56	202-2-1 IMGT HCDR1	GFTFSTYG
57	202-2-1 IMGT HCDR2	IWYDVSHK
58	202-2-1 IMGT HCDR3	ARDWGDPDAFDI
59	202-2-1 kabat	RASQGISSYLA

	LCDR1	
60	202-2-1 kabat LCDR2	AASTLQS
\	202-2-1 IMGT LCDR2	AAS

【0664】現參照下列意在舉例說明本公開(而非限定本公開)的實施例來描述本公開。

【0665】除非特別指明，本公開中所使用的分子生物學實驗方法和免疫檢測法，基本上參照J. Sambrook等人，分子克隆：實驗室手冊，第2版，冷泉港實驗室出版社，1989，以及F. M. Ausubel等人，精編分子生物學實驗指南，第3版，John Wiley & Sons, Inc.，1995中所述的方法進行。本發明所屬技術領域具有通常知識者知曉，實施例以舉例方式描述本公開，且不意欲限制本公開所請求保護的範圍。

【0666】製備方案

【0667】以下的實施例中記載的化合物的結構通過核磁共振(^{1}H NMR)或質譜(MS)來確定。

【0668】核磁共振(^{1}H NMR)的測定儀器使用Bruker 400 MHz核磁共振儀；測定溶劑為氘代甲醇(CD_3OD)、氘代氯仿($CDCl_3$)或六氘代二甲基亞碸(DMSO-d_6)；內標物質為四甲基矽烷(TMS)。

【0669】實施例中使用的核磁共振(NMR)圖譜中的縮寫示於以下。

【0670】s：單峰(singlet)、d：二重峰(doublet)、t：三重峰(triplet)、q：四重峰(quartet)、dd：雙二重峰(double doublet)、qd：四二重峰(quartet

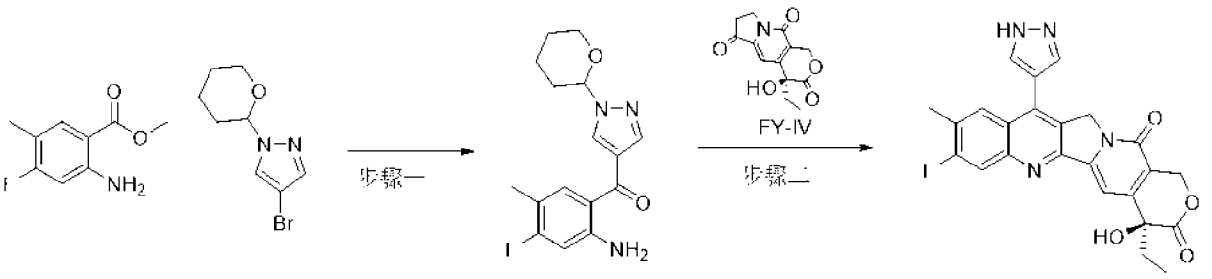
doublet)、ddd：雙雙二重峰(double double doublet)、ddt：雙雙三重峰(double double triplet)、dddd：雙雙雙二重峰(double double double doublet)、m：多重峰(multiplet)、br：寬峰(broad)、J：偶合常數、Hz：赫茲、DMSO-d_6：氘化二甲基亞碸。δ值用ppm值表示。

【0671】質譜(MS)的測定儀器使用Agilent (ESI)質譜儀，型號為Agilent 6120B。

【0672】一、生物活性分子和合成“藥物-連接體化合物”過程使用的中間體的合成

【0673】A、生物活性分子的合成

【0674】實施例A1.1： (S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7] 吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.1）的合成

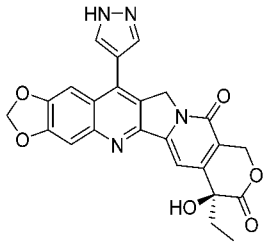


步驟一：4-溴-1-(四氫-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑（4.6g）溶於無水四氫呋喃中（50ml），上述溶液在氮氣保護下乾冰-丙酮冷卻到-78°C，然後滴加正丁基鋰（12ml, 2M），反應液在-78°C 攪拌 20 分鐘，然後加入 2-胺基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯（1.83g），加完後，反應自然升至室溫，並連續攪拌反應 5 小時。反應甲甲醇（3ml）猝滅後加入乙酸乙酯（200ml），溶液用水洗（100ml x 3），有機相乾燥後除去有機溶劑，用矽膠柱色譜分離得到目標

產物 (2-胺基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氫-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮，ESI-MS (m/z): 304 $[M+H]^+$。

步驟二： (S)-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃[3,4-f]中氮茚並-3,6,10(4H)-三酮（2.63g）， (2-胺基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氫-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮 (3.03g), 對甲苯磺酸（1.74g）溶於二氯甲烷（50ml）中，然後除去溶劑，混合物在氮氣保護下加熱至 120°C 反應 4 小時。混合物溶於乙酸乙酯（300ml），有機相水洗（100ml x 2），乾燥後除去有機溶劑，殘留物用矽膠柱層析分離得到目標產物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7] 吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.1）。 ESI-MS (m/z): 447 $[M+H]^+$。

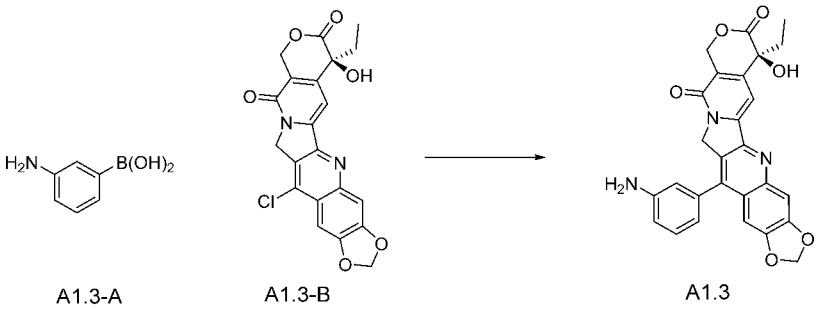
【0675】實施例A1.2： (S)-7-乙基-7-羥基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7] 吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.2）的合成



用實施例A1.1相同的方法和反應條件，用6-胺基苯並[d][1,3]二氧環戊烷-5-羧酸甲酯代替2-胺基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯，得到目標產物 (S)-7-乙基-7-羥基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7] 吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.2）。ESI-MS (m/z): 459 $[M+H]^+$。

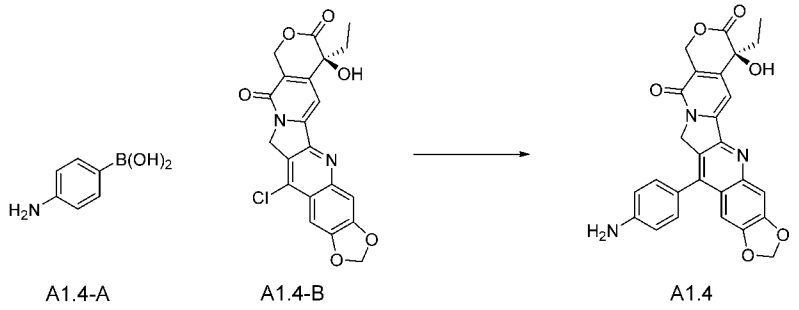
【0676】實施例A1.3：(S)-14-(3-胺基苯基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-

二酮（A1.3）的合成



化合物（A1.3-A）（1.4g），化合物（A1.3-B）（2.2g），$Pd_2(DBA)_3$ (300 mg), 三環己基磷（300 mg），醋酸鉀（1.1g）依次加入二氧六環（30ml）和水（5ml）的混合溶劑中，混合物在氮氣保護下100°C加熱攪拌反應12小時。冷卻後加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml），乾燥後，矽膠柱層析分離得到目標產物 (S)-14-(3-胺基苯基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.3）。ESI-MS (m/z): 484 $[M+H]^+$。

【0677】實施例A1.4：(S)-14-(4-胺基苯基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.4）的合成



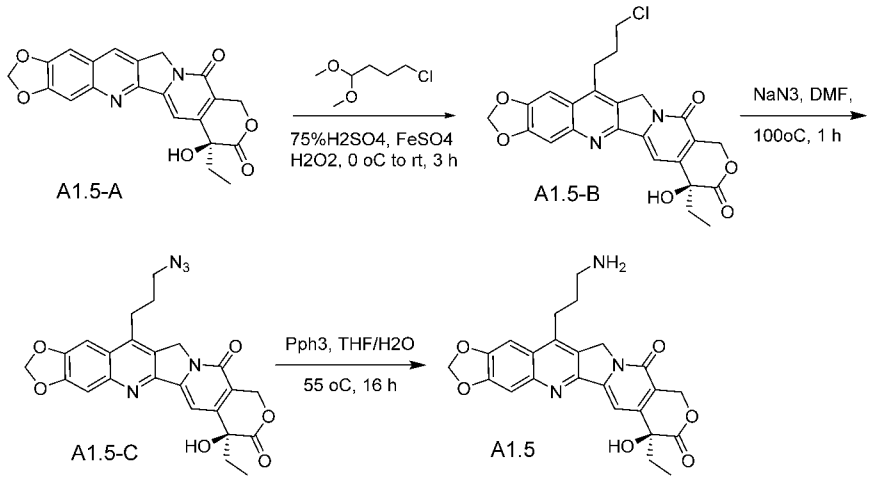
化合物（A1.4-A）（1.4g），化合物（A1.4-B）（2.2g），$Pd_2(DBA)_3$(300mg), 三環己基磷（300mg），醋酸鉀（1.1g）依次加入二氧六環（30ml）和水（5ml）的混合溶劑中，混合物在氮氣保護下100°C加熱攪拌反應12小時。

冷卻後加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml），乾燥後，矽膠柱層析分離得到目標產物 (S)-14-(4-胺基苯基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.4）。

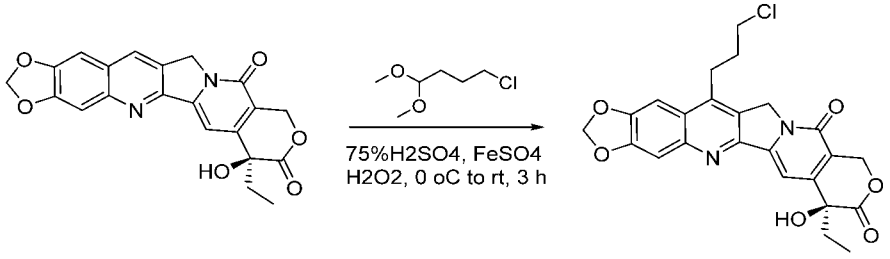
ESI-MS (m/z): 484 $[M+H]^+$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.56 (s, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.26 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 1.96 – 1.78 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

【0678】實施例A1.5：(S)-14-(3-胺基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.5）的合成



步驟一：(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

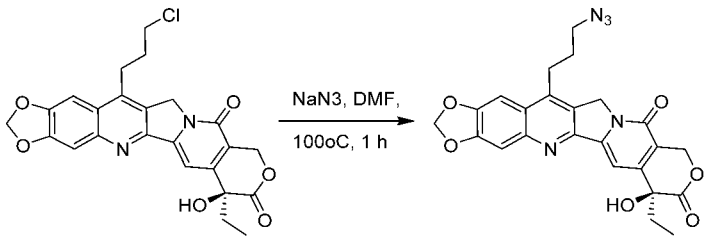


冰浴條件下，向化合物（*S*） 7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]茚並[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.5-A，500 mg）的75%硫酸溶液（5 mL）中加入七水合硫酸亞鐵（570 mg七水合硫酸亞鐵溶於1mL水中)，和4,4-二甲氧基氯丁烷（3.89 g），反應液攪拌三分鐘後滴加雙氧水（29%，2.5 mL）。反應液在0 °C下攪拌反應5分鐘後升至室溫，並攪拌反應3小時。反應液加入水（50 mL）稀釋，乙酸乙酯（80 mL×2）萃取，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗產品，粗產品用C18柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物（黃色固體，400 mg，收率：67%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：468.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

步驟二：(S)-14-(3-疊氮基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成



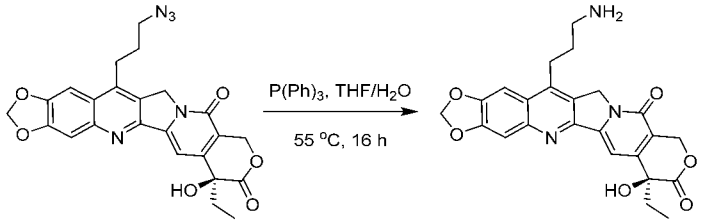
向化合物(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（200 mg）的N, N-二甲基甲醯胺溶液（3 mL）中，加入疊氮化鈉（284 mg），反應液在100 ℃下攪拌反應1小時。向反應液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（60

mL×2）萃取，有機相用經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物(S)-14-(3-疊氮基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（黃色固體，180 mg ，收率：88%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：476；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.53 – 3.49 (m, 2H), 3.16 – 3.12 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

步驟三：(S)-14-(3-胺基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

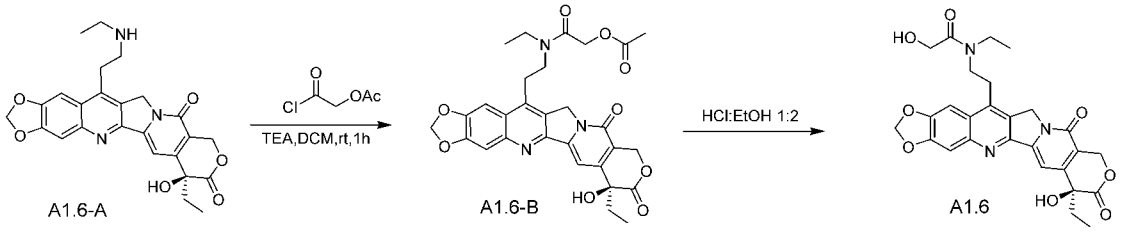


向化合物(S)-14-(3-疊氮基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成（130 mg，0.274 mmol）的四氫呋喃（3 mL）和水（1 mL）混合溶液中加入三苯基膦（108 mg，0.411 mmol），在 55 ℃下反應 16 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入水（5 mL），用 2N 鹽酸（3 mL）調至酸性，用乙酸乙酯（10 mL）萃取。水相經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物(S)-14-(3-胺基丙基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成 (A1.5，黃色固體，15 mg, 收率：12%)。

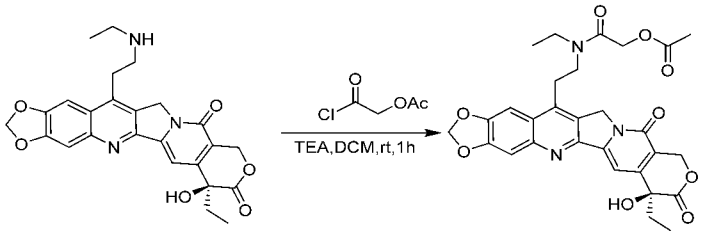
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：449.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 3.15 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.03 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.96 – 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0679】實施例A1.6：(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.6）的合成



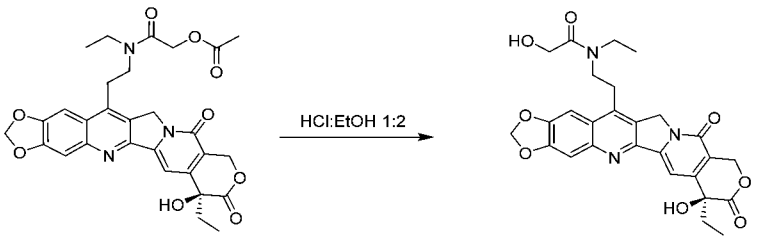
步驟一：（S） -2-（乙基（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）胺基）-2-氧乙基乙酸酯（A1.6-B）的製備：



將化合物（S） -7-乙基-14-（2-（乙胺基）乙基）-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.6-A，50 mg），乙醯氧基乙醯氯，（73 mg），三乙胺（50 mg）依次加入二氯甲烷（5 mL）中，室溫攪拌反應 1 小時。反應液旋蒸除去溶劑，得到粗品油狀化合物 75mg。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：564.2。

步驟二：(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.6）的合成



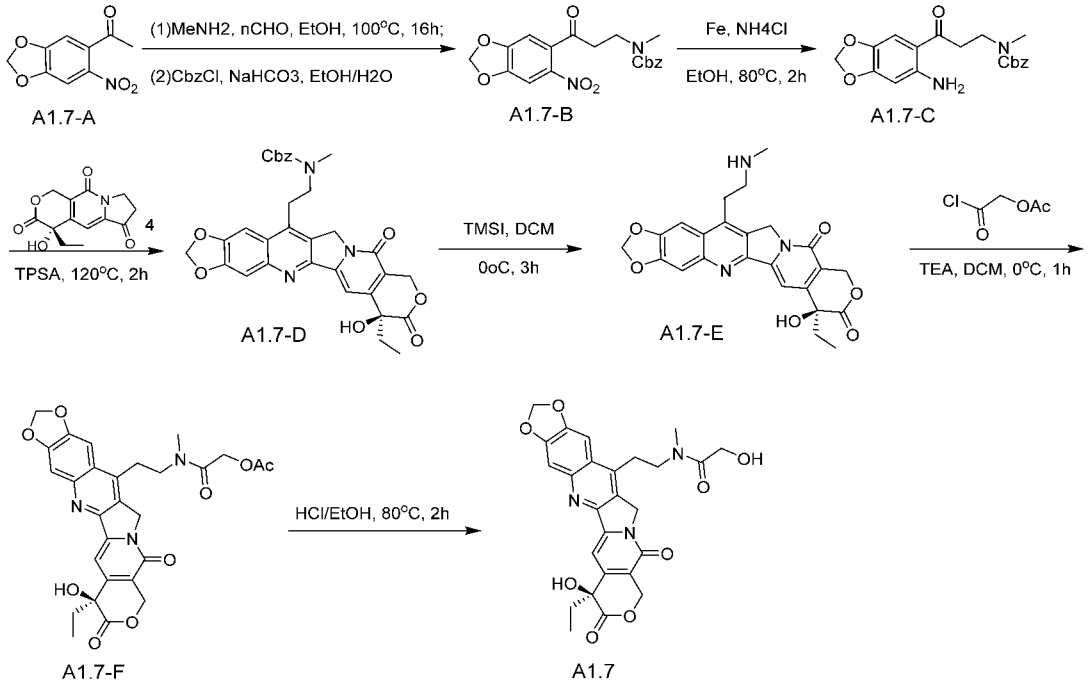
將粗品化合物（S）-2-（乙基（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）胺基）-2-氧乙基乙酸酯（75mg，0.13 mmol）溶在濃鹽酸和無水乙醇混合溶液（體積比為 1/2，3 mL）中，然後反應液 85 ℃回流反應 1 小時。LCMS 顯示反應完成。反應液濃縮，粗產品經製備色譜(0.01% 三氟乙酸的水溶液，乙腈)純化得到目標化合物(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.6）（15 mg，收率：26%）為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：522.0；

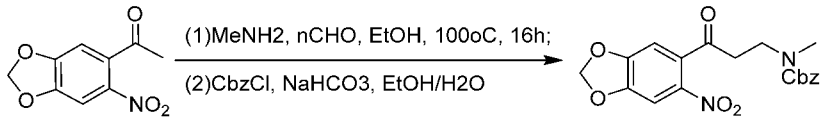
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.92 (s, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.34 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.07 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 2.00 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.16 – 1.04 (m, 3H), 0.89 – 0.83 (m, 3H)。

【0680】實施例A1.7：(S)-N-甲基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並

[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.7）的合成



步驟一：化合物甲基苄基（3-（6-硝基苯並[d][1,3]二氧雜環-5-基）-3-氧丙基）胺基甲酸酯的製備

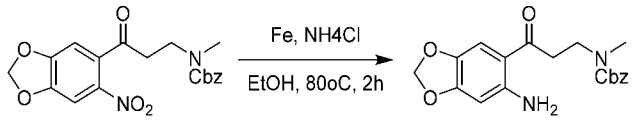


將化合物1-（6-硝基苯並[*d*][1,3]二噁英-5-基）乙烷-1-酮（A1.7-A，500 mg），甲胺鹽酸鹽（1.6 g）和多聚甲醛（714 mg）溶在乙醇（8 mL）中，100°C下悶罐反應16小時。反應液降至室溫並減壓濃縮，所得殘渣用二氯甲烷（80 mL）溶解，有機相經水（50 mL × 3）萃取。所得水相用碳酸氫鈉調至PH=9，然後加入氯甲酸苄酯（513 mg, 3.0 mmol），在室溫下反應16小時。反應液用乙酸乙酯（30 mL × 3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濃縮得到粗品，粗產品經C18分離純化 (乙腈/水含0.05%甲酸=5~95%)得到目標化合物（A1.7-B，180 mg，收率23%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：387.1.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H), 7.35 (m, 5H), 7.32 (m, 1H), 6.17 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.03 (m, 3H), 2.99 – 2.86 (m, 2H)。

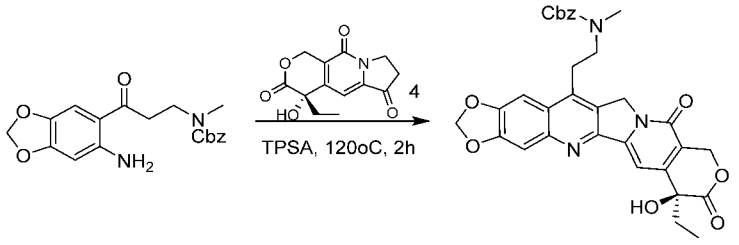
步驟二：化合物苄基（3-（6-胺基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）（甲基）胺基甲酸酯（A1.7-C）的製備



將化合物A1.7-B甲基苄基（3-（6-硝基苯並[d][1,3]二氧雜環-5-基）-3-氧丙基）胺基甲酸酯（180 mg, 0.47 mmol）溶於飽和氯化銨水溶液（8 mL）和乙醇（8 mL）混合溶液中，然後向反應液中加入鐵粉（130 mg），反應在80°C下攪拌2小時。將反應液過濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經TLC分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=2/1)得到目標化合物 A1.7-C（76 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：357.0。

步驟三：苄基（S）-（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）胺基甲酸酯（A1.7-D）的製備

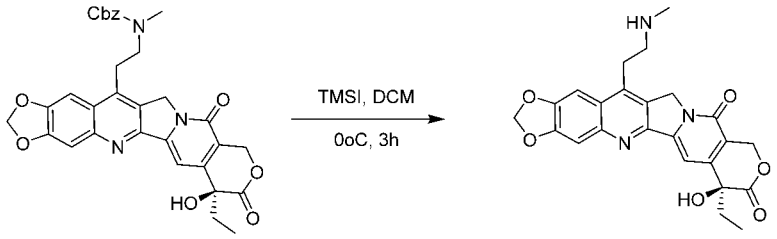


室溫下，將化合物A1.7-C苄基（3-（6-胺基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）（甲基）胺基甲酸酯（38 mg），化合物（S） -4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲哚啉-3,6,10（4H）-三酮（29 mg） 和對甲苯磺酸（23 mg）溶於二氯甲烷（5 mL）溶液中，溶液澄清混勻後減壓濃縮，用

油泵抽至真空，反應在120°C真空下反應2小時。將反應液降至室溫，加入水（30 mL）並用二氯甲烷（30 mL × 3）萃取。合併有機相依次經無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物A1.7-D（50 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 584.0。

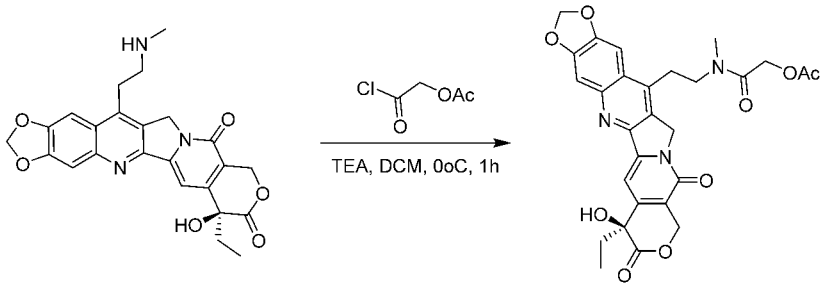
步驟四：（S） 7-乙基-7-羥基-14-（2-（甲胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.7-E）的製備



室溫下，將化合物 A1.7-D 苄基（S）-（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）胺基甲酸酯（50 mg）溶於二氯甲烷（5 mL）溶液中，於 0°C 下加入三甲基碘矽烷（51 mg，0.26 mmol），反應 3 小時。將反應液濃縮除去溶劑，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到褐色固體化合物 A1.7-E（15 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：450.0。

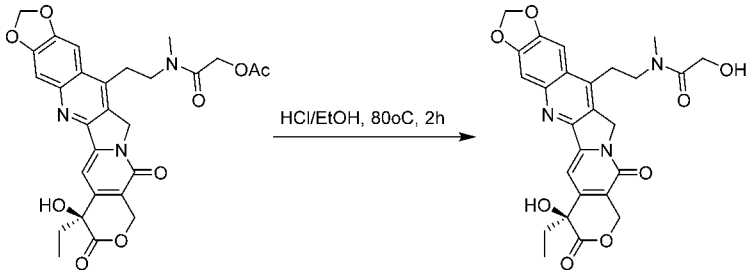
步驟五：化合物（S）-2-((2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）胺基）-2-氧乙基乙酸酯（A1.7-F）的製備



將化合物 A1.7-E（S） 7-乙基-7-羥基-14-（2-（甲胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（15 mg）和三乙胺（15 mg）溶於二氯甲烷（5 mL）溶液中，於 0°C 下加入乙醯氧基乙醯氯（20 mg）反應 1 小時。將反應液濃縮除去溶劑得到粗品，所得固體直接用於下一步，未做進一步純化。

LCMS (ESI) $[M5+H]^+$ = 550.1。

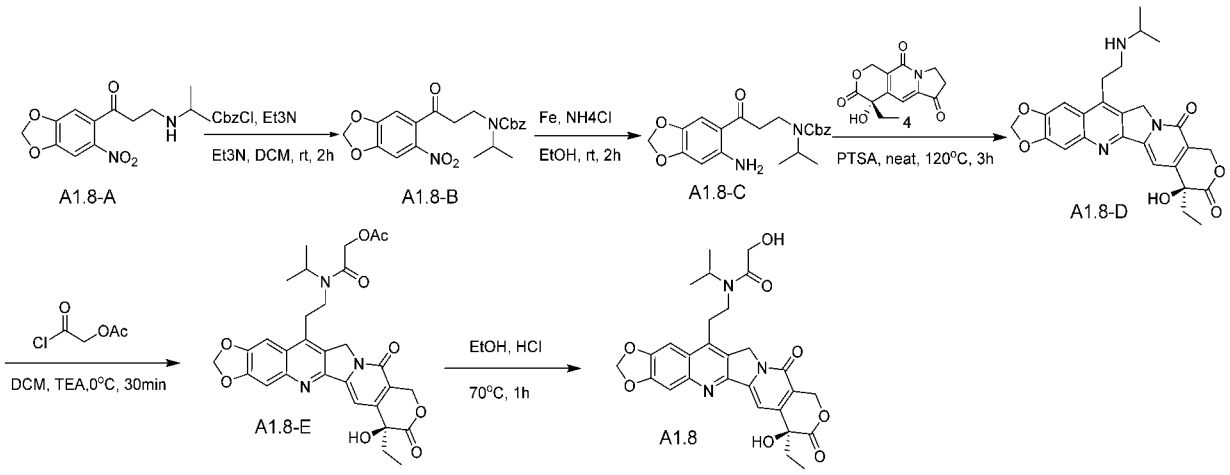
步驟六：化合物（S） -N-（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）-2-羥基-N-甲基乙醯胺（A1.7）的製備



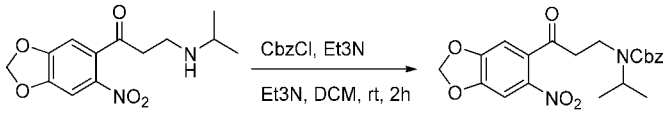
將化合物 A1.7-F（S） -2-((2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基）乙基)（甲基）胺基）-2-氧乙基乙酸酯（15 mg）溶於乙醇（5 mL）溶液中，加入濃鹽酸（1.5 mL），於 80°C 下反應 2 小時。將反應液濃縮除去溶劑，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到白色固體化合物 A1.7（1.6 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：508.2。

【0681】實施例A1.8：(S)-N-異丙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基乙醯胺（A1.8）的合



步驟一：化合物異丙基苄基（3-（6-硝基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）胺基甲酸酯（A1.8-B）的製備



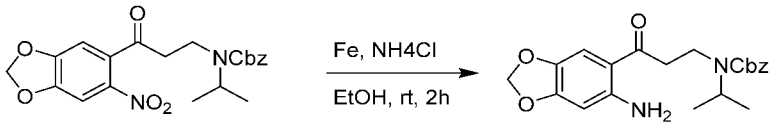
向化合物（A1.8-A）3-（異丙胺基）-1-（6-硝基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）丙-1-酮（900 mg）的二氯甲烷溶液（10 mL）中，依次加入三乙胺（1.8 g）和苄氧基碳醯氯（734 mg，4.3 mmol），在室溫下反應2小時。反應液加水（50 mL）稀釋，用二氯甲烷（50 mL×3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗品，粗產品經柱層析分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=3/1)得到目標化合物（A1.8-B）（600 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：414.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, 1H), 7.34 (br s, 6H), 6.31 (s, 2H),

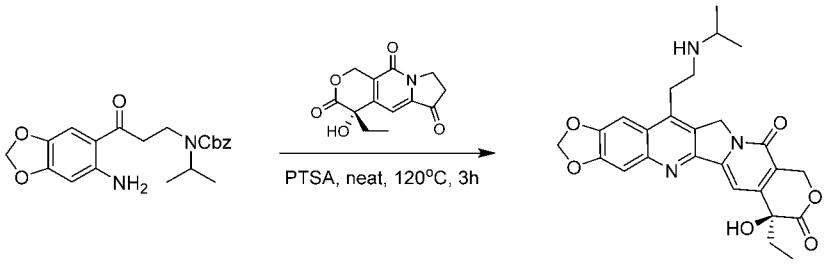
5.08 (s, 2H), 4.14 – 4.10 (m, 1H), 3.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.03 (s, 2H), 1.13 - 1.11 (m, 6H)。

步驟二：化合物苄基（3-（6-胺基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）（異丙基）胺基甲酸酯（A1.8-C）的製備



將化合物（A1.8-B）異丙基苄基（3-（6-硝基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）胺基甲酸酯（200 mg, 0.48 mmol）溶於飽和氯化銨（3 mL）和乙醇（3 mL）混合溶液中，然後向反應液中加入鐵粉（135 mg），反應在室溫下攪拌 2 小時。將反應液過濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=3/1)得到目標化合物（A1.8-C）（65 mg）。LCMS (ESI) $[M+H]^+$：395.2。

步驟三：（S） 7-乙基-7-羥基-14-（2-（異丙胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.8-D）的製備



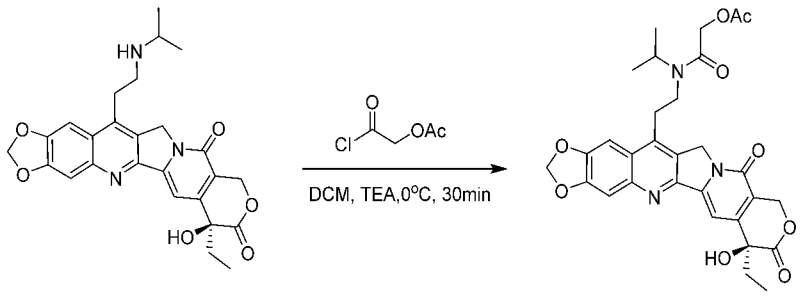
室溫下，將化合物（A1.8-C）苄基（3-（6-胺基苯並[d][1,3]二噁英-5-基）-3-氧丙基）（異丙基）胺基甲酸酯（65 mg），化合物（S） -4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲哚啉-3,6,10（4H）-三酮（45 mg）和對甲苯磺酸（33 mg，0.17 mmol）溶於二氯甲烷（10 mL）溶液中，溶液澄清混勻

後減壓濃縮，用油泵抽至真空，反應在 120°C 真空下反應 2 小時。將反應液降至室溫，加入水（50 mL），用二氯甲烷（30 mL×3）萃取，合併有機相依次並無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷/甲醇=10/1)得到目標化合物（A1.8-D）（40 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：478.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.46 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.33 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 3.41 (br s, 2H), 3.23 (br s, 3H), 1.94 – 1.78 (m, 2H), 1.25 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

步驟四：化合物（（S） -2-（（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（異丙基）胺基）-2-氧代乙酸乙酯（A1.8-E）的製備

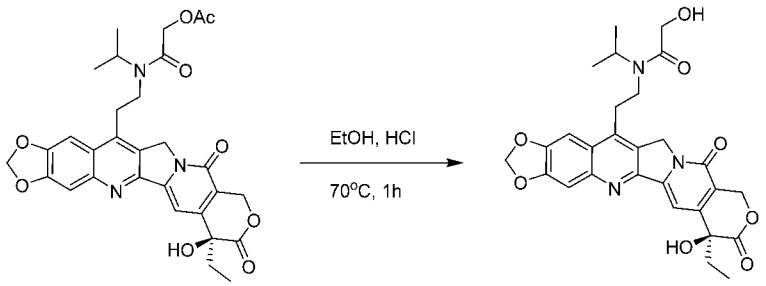


冰浴下，向化合物（S） -7-乙基-7-羥基-14-（2-（異丙胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.8-D）（40 mg）的二氯甲烷溶液（2 mL）中加入三乙胺（35 mg），2-氯-2-氧乙基乙酸酯（57 mg），在零度下反應 30 分鐘。將反應液減壓濃縮得到化合物 A1.8-E，直接應用於下一步。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：578.0。

步驟五：化合物（S） -N-（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-

10H-[1,3]二氧並[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）-2-羥基-N-異丙基乙醯胺（A1.8）的製備

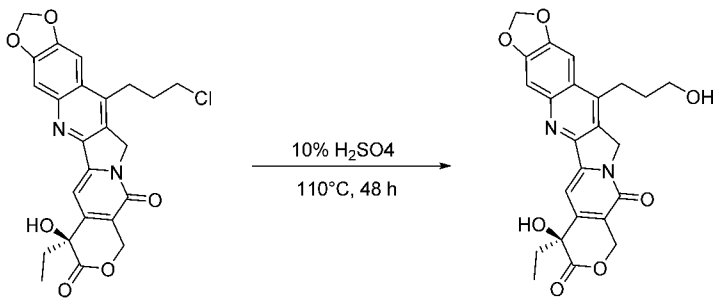


向化合物（S） -2-（（2-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（異丙基）胺基）-2-氧代乙酸乙酯（A1.8-E，50 mg）的乙醇溶液（3 mL）中，加入濃鹽酸（0.5 mL），在 70°C 下反應 1 小時。將反應液濃縮得到粗產品。再經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物（A1.8，3 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：464.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.99 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.99 – 3.94 (m, 1H), 3.44 (dd, *J* = 16.7, 7.8 Hz, 2H), 3.33 – 3.21 (m, 2H), 1.95 – 1.79 (m, 2H), 1.19 (dd, *J* = 16.4, 5.8 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

【0682】實施例A1.9：(S)-7-乙基-7-羥基-14-(3-羥基丙基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.9）的合成

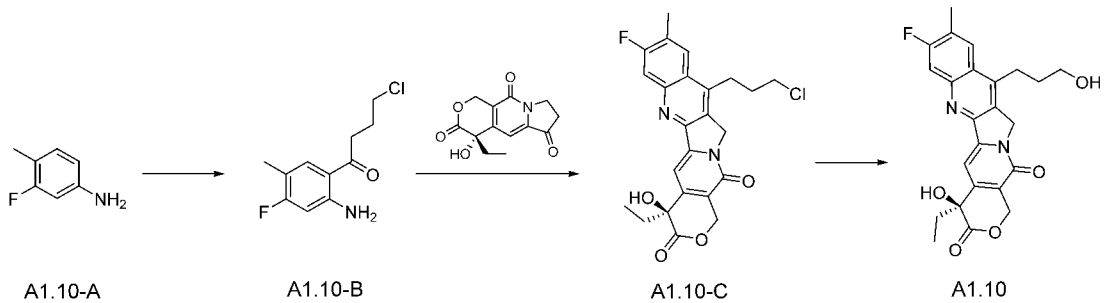


將化合物(S)-7-乙基-7-羥基-14-(3-氯丙基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（100 mg，0.213 mmol）溶於 10%硫酸（5 mL）溶液中，反應在 110°C 下反應 48 小時。向反應液中加入飽和碳酸氫鈉（30 mL）溶液，用二氯甲烷（10 mL X 5）萃取，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到粗產品。經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到(S)-7-乙基-7-羥基-14-(3-羥基丙基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.9，1.78 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：451.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.63 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.47 – 5.37 (m, 2H), 5.32 – 5.19 (m, 2H), 3.51 – 3.46 (m, 2H), 3.17 – 3.13 (m, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 4H), 0.90 – 0.84 (m, 3H)。

【0683】實施例A1.10：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-羥基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.10）的合成



步驟一：0°C 下，向化合物 A1.10-A（10 g ）的 1,2-二氯乙烷（200 mL）溶液，滴加 1mol/L 三氯化硼（96 mL），4-氯丁腈（9.9 g）。80 ℃下攪拌反應 2 小時。反應液降至室溫，加入 2 mol/L 鹽酸 (90 mL)並在 80 ℃下回流攪拌 0.5 小時。反應液降至室溫, 加入少量水稀釋，用二氯甲烷（200 mL X 3）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濃縮得到粗品，粗產品經柱層析分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=10/1)得到目標化合物 A1.10-B（4 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：230.0。

步驟二：向化合物 A1.10-B（50 mg）中加入（S） -4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲哚啡-3,6,10（4H）-三酮（35 mg），一水合對甲苯磺酸（41.4 mg）, 溶於二氯甲烷（30 mL）溶液中，溶液澄清混勻後減壓濃縮，用油泵抽至真空，反應在 120°C 真空下反應 3 小時。LCMS 顯示反應完全。將反應液降至室溫，加入水（20 mL），用二氯甲烷（20 mL X 3）萃取。合併有機相依次並無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到粗產品。粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷比甲醇=20 比 1)得到目標化合物 A1.10-C（80 mg）為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：457.0。

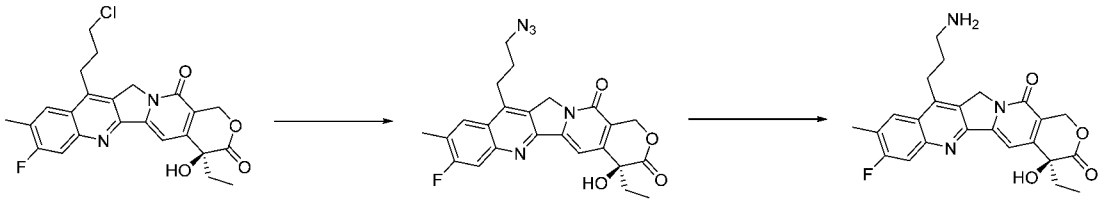
步驟三：將化合物 A1.10-C（75 mg）溶於六甲基磷醯三胺，加入純水（0.8 mL）反應液在 100 °C 下攪拌 72 小時。LCMS 檢測反應完成。經製備色譜(0.01% TFA in water，MeCN)純化得到目標化合物（10 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：439.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.67 (t, *J* = 4.9 Hz,

1H), 3.55 – 3.47 (m, 2H), 3.28 – 3.20 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.93 – 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0684】實施例 A1.11：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.11）的合成



步驟一：向 A1.10-C（395 mg）的 N'N-二甲基甲醯胺（10 mL）溶液中加入疊氮化鈉 (432 mg)，反應液 80 °C 反應 16 小時，然後冷卻至室溫，加入水（50 mL）稀釋，用乙酸乙酯（80 mL*3）萃取，合併有機相，無水硫酸鈉乾燥，抽濾濃縮得到目標產物 A1.11-A（290 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：464.0。

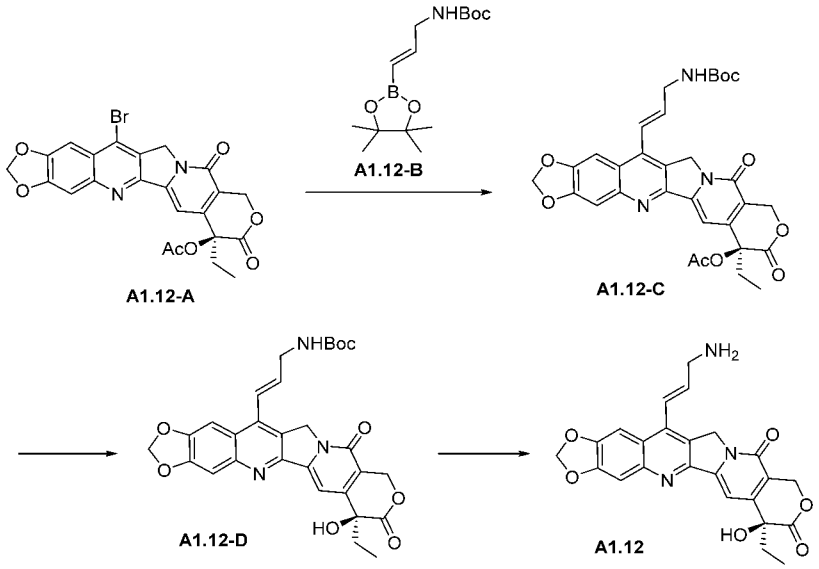
步驟二：將化合物 A1.11-A（93 mg）溶於四氫呋喃（5 mL）中，加入三苯基膦（78 mg），室溫反應 4 小時。然後向反應液中加入鹽酸（4M，1mL），反應液升至 55 °C 反應 16 小時，LCMS 監測反應完全。反應液直接濃縮，粗品經過反相柱（流動相 A 為 0.05%甲酸水溶液，B 為乙腈）提純得到目標產物 A1.11（28 mg，收率：36%）為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：438.4；

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.52 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 5.49 (ABq, *J* = 78.9, 16.3 Hz, 2H), 5.31 (br s, 2H), 3.35 – 3.32 (m, 2H), 3.22 – 3.10 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.13 – 2.11 (m, 2H),

1.96 – 1.94 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)。

【0685】實施例A1.12：(S,E)-14-(3-胺基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.12）的合成



步驟一：將化合物 A1.12-A（200 mg，0.39 mmol），化合物 A1.12-B（112 mg，0.39 mmol），氟化銫（152 mg，0.975 mmol）和四三苯基膦鈀（45 mg，0.039 mmol）加入 1,4-二氧六環溶液（8 mL）。在氮氣氣氛下 120°C 微波反應 0.5 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液加入二氯甲烷（20 mL）和甲醇（10 mL）混合溶液稀釋，過濾。濾液濃縮，粗品通過製備 TLC 純化（二氯甲烷：甲醇=30:1）得到目標化合物 (S,E)-14-(3-((第三丁氧羰基)胺基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-7-基 乙酸酯（A1.12-C，60 mg，收率：26%）為棕色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 590.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.63 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.09

(d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.45 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.34 – 5.24 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 2.21 (br s, 3H), 2.03 – 1.96 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.91 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H).

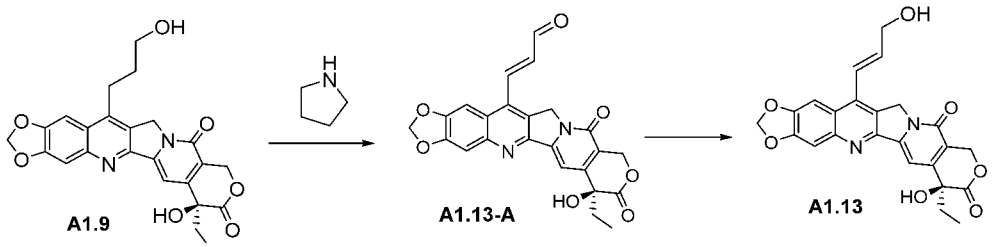
步驟二：向化合物(S,E)-14-(3-((第三丁氧羰基)胺基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-7-基乙酸酯（A1.12-C ，50 mg，0.085 mmol）的甲醇溶液（15 mL）和加入甲醇鈉（9.2 mg，0.17 mmol），在 50℃下攪拌反應 2 小時。LCMS 顯示反應完全。將反應液濃縮得到目標化合物(S,E)-14-(3-((第三丁氧羰基)胺基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.12-D，50 mg）粗品為棕色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 548；

步驟三：向化合物(S,E)-14-(3-((第三丁氧羰基)胺基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.12-D，50 mg，0.091 mmol）的二氯甲烷溶液（2 mL）中，加入三氟乙酸（1 mL），在室溫下攪拌反應 30 分鐘。LCMS 顯示反應完全。將反應液濃縮，粗品經高效液相製備純化（乙腈/0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物(S,E)-14-(3-胺基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.12）（8.1 mg，收率 21%）為棕色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 448.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.20 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 – 6.46 (m, 2H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H),

5.27 (s, 2H), 3.86 (br s, 2H), 1.90 – 1.83 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

【0686】實施例A1.13：(S,E)-14-(3-羥基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.13）的合成



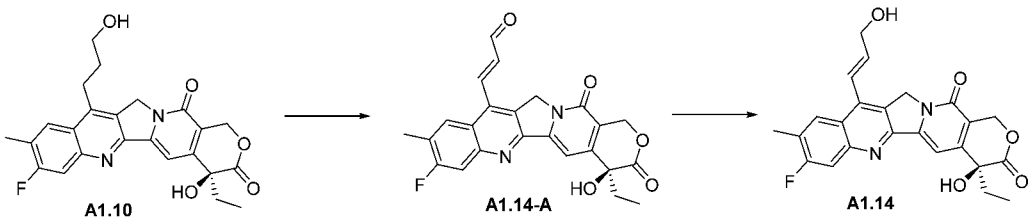
步驟一：將化合物 A1.9 (200 mg, 0.444 mmol) 溶在二甲亞碸 (2 mL) 中，加入 IBX (311 mg, 1.11 mmol)，室溫下攪拌 2 小時，然後補加入 IBX (186 mg, 0.666mmol) 於反應液中，再向反應液中加入四氫吡咯（6.3 mg, 0.089 mmol）和乙腈（3 mL）,反應液在室溫下攪拌過夜。LCMS 檢測反應完成, 用乙酸乙酯萃取 (20 mL x 3)，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，旋乾，得到粗產品，粗產品通過矽膠柱純化(DCM : MeOH = 50 : 1 to 10 : 1) 得到目標化合物(S,E)-14-(3-氧代-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羥基-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.13-A，100 mg, 純度 50.0 %, 收率 25.0%) 為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 447.1。

步驟二：將化合物 A1.13-A (40 mg, 0.09 mmol) 溶在四氫呋喃 (1 mL) 中,然後向反應液中加入氰基硼氫化鈉(28 mg, 0.448mmol), 在室溫下攪拌過夜。LCMS 顯示反應完成。將反應液濃縮得粗產品，粗產品純化通過 prep-HPLC (HCl in water/MeCN) 得目標化合物 (3.56 mg, 純度 93.6 %, 收率 9.0 %) 為淡黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 449.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.61 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 6.69 – 6.59 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 5.16 (br s, 1H), 4.34 (br s, 2H), 1.93 – 1.81 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

【0687】實施例A1.14：(S,E)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-羥基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉--3,14(4H)-二酮（A1.14）的合成



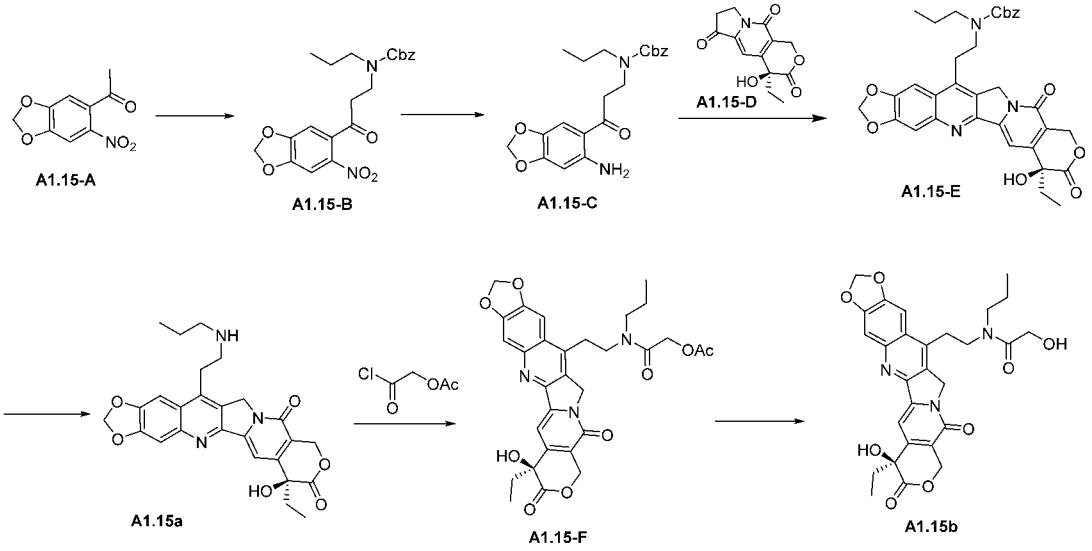
步驟一：向 25 mL 的單口瓶中加入化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-（3-羥丙基）-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮（A1.10，100 mg, 0.228 mmol)，DMSO(0.5 mL)和乙腈(0.75 mL)，依次加入 IBX(160 mg, 0.571 mmol)和(*R*)-二苯基(吡咯烷-2-基)甲醇 (12 mg, 0.047 mmol)，室溫下繼續攪拌反應 16 小時，然後向反應液中加入甲醇和二氯甲烷混合溶劑 (200 mL)（DCM:MeOH=10:1），飽和食鹽水(300 mL)萃取，合併有機相，水洗、乾燥、過濾，濾液減壓蒸乾溶劑得粗品，粗品用快速 Flash 純化（DCM:MeOH=10:1）得到目標化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-（3-氧代丙基）-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮 (A1.14-A, 40 mg，收率 40%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 435.1.

步驟二：向 50 mL 的三口瓶中加入化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-（3-氧代丙基）-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮 (A1.14-A, 40 mg, 0.228 mmol)，無水 THF(5 mL)，N_2 保護下降溫至-78℃，緩慢滴加三第二丁基硼氫化鋰的 THF 溶液(0.11 mL，1N)，保持-78℃繼續攪拌 1 小時。反應完成後加入飽和氯化銨水溶液淬滅反應，升至室溫，用飽和食鹽水稀釋(50 mL)，用乙酸乙酯萃取(20 mL X 3)，合併有機相水洗、乾燥、過濾，減壓蒸乾溶劑得到(S,E)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-羥基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉--3,14(4H)-二酮（A1.14，28 mg）為類白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 437.1$。

【0688】實施例A1.15：(S)-7-乙基-7-羥基-14-(2-(正丙基胺基)乙基)-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.15a）和(S)-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羥基-N-正丙基乙醯胺（A1.15b）的合成



步驟一：將化合物 A1.15-A（5.0 g，23.9 mmol），丙基胺鹽酸鹽（22.8 g，239 mmol）和多聚甲醛（7.18 g，239 mmol）溶在乙醇（100 mL）中，110 °C 下悶罐反應 12 小時。LCMS 檢測反應完全。反應液降至室溫並減壓濃縮，向反應固體中加入二氯甲烷（100 mL），用水（80 mL X 3）洗滌，水相用碳酸氫鈉調至 pH = 9。向水溶液中加入苄氧基碳醯氯（3.7 g，21.8 mmol），在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。用二氯甲烷（100 mL X 3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濃縮得到粗品，粗產品經柱層析分離純化 (石油醚：乙酸乙酯=10/1)得到目標化合物 A1.15-B（1.5 g，收率 20.1%）為黃色油狀液體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 415.1$；

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H), 7.35 (m, 6H), 6.18 (s, 2H), 5.17 – 5.12 (m, 2H), 3.69 – 3.67 (m, 2H), 3.32 – 3.30 (m, 2H), 3.09 – 2.90 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 0.90 (m, 3H)。

步驟二：將化合物 A1.15-B（1.5 g, 3.63 mmol）溶在飽和氯化銨（20 mL）和乙醇（20 mL）混合溶液中，然後向反應液中加入鐵粉（1.02 g，18.1 mmol），反應在 80°C 下攪拌 1 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品用 C18 柱反相分離純化(乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 A1.15-C (600 mg, 收率 43.0%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 385.2$, $t_R = 1.329$ min.

步驟三：室溫下，將化合物 A1.15-C（350 mg，0.91 mmol），化合物（S）-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲哚啡-3,6,10（4H）-三酮（A1.15-D，218 mg，0.83 mmol）和對甲苯磺酸（170 mg，0.87 mmol）溶

於二氯甲烷（5 mL）溶液中，溶液澄清混勻後減壓濃縮，用油泵抽至真空，反應在 120°C 真空下反應 2 小時。LCMS 顯示反應完全。將反應液降至室溫，加入水（50 mL），用二氯甲烷（30 mL X 3）萃取，合併有機相依次並無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到化合物 A1.15-E（390 mg，收率 76%）為褐色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 612.0。

步驟四：室溫下，將化合物 A1.15-E（390 mg，0.638 mmol）溶於二氯甲烷（5 mL）溶液中，0°C 氮氣保護下滴加三甲基碘矽烷（510 mg，2.55 mmol），反應體系室溫攪拌 2 小時。向反應液中加入乙醚（2 mL）和濃鹽酸（4 mL），攪拌 30 分鐘，用飽和碳酸氫鈉將反應體系調至 H = 9，用二氯甲烷（50 mL X 5）萃取，合併有機相經無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到粗產品。經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到化合物 A1.15a（200 mg，收率 66.1%）為米白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 478.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.30 (s, 1H, HCO_2H), 7.67 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.62 – 6.41 (m, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.27 – 3.25 (m, 2H), 2.91 – 2.79 (m, 2H), 2.58 – 2.56 (m, 2H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.44 – 1.42 (m, 2H), 0.90 – 0.84 (m, 6H)。

步驟五：室溫下，將化合物 A1.15a（120 mg，0.251 mmol）溶於二氯甲烷（5 mL）中，0°C 下滴加化合物乙醯氧基乙醯氯（167 mg，1.25 mmol）和三乙胺（133 mg，1.25 mmol），反應在 0°C 下攪拌反應 30 分鐘。LCMS 檢測反應完全。將反應液減壓濃縮得到粗品化合物 A1.15-F（120 mg，收率

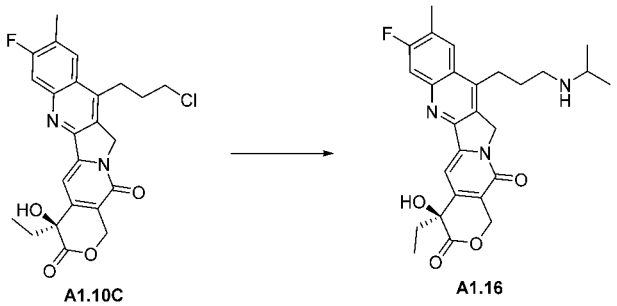
82.8%）為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 578.3。

步驟六：室溫下，將化合物 A1.15-F（120 mg，0.207 mmol）溶於乙醇（4 mL）中，然後向反應液中加入濃鹽酸（2 mL），反應在 70°C 下攪拌反應 1 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液加入水（20 mL），用二氯甲烷（30 mL X 5）萃取，合併有機相依次並無水硫酸鈉乾燥、過濾，濾液減壓濃縮得到粗產品。經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到化合物 A1.15b（20 mg，收率 18.1%）為米白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 536.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.93 (s, 0.7H), 7.69 (s, 0.3H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.35 (s, 1.5H), 5.29 (s, 0.5H), 4.65 – 4.62 (m, 1H), 4.13 - 3.97 (m, 2H), 3.51 – 3.49 (m, 2H), 3.33 – 3.30 (m, 2H), 3.24 – 3.20 (m, 2H), 1.86 – 1.84 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 2H), 0.89 – 0.86 (m, 6H)。

【0689】實施例A1.16：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-異丙基胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.16）的合成



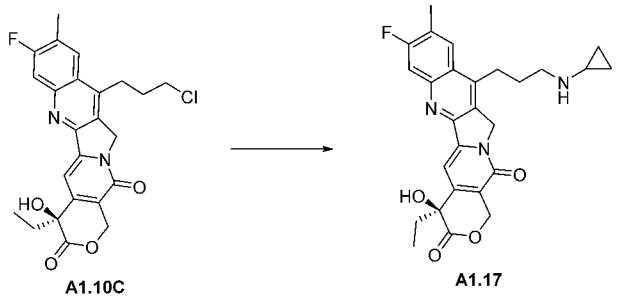
向 A1.10-C（200 mg，0.439 mmol）和異丙基胺（50 mg，0.877 mmol）的 DMF 溶液（10 mL）中加入二異丙基乙胺（170 mg，1.32 mmol）和碘化鈉（99 mg，0.659 mmol），反應在 50°C 封管下反應 2 小時。向反應液中加入

乙酸乙酯，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到粗品。粗品經 pre-TLC 分離純化 (二氯甲烷:甲醇=10:1)後得到黃色固體，化合物繼續經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到目標化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-異丙基胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.16，2.03 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 480.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H, HCO2H) 7.92 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 33.30 – 3.22 (m, 3H), 3.18 – 3.10 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.06 – 1.94 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 2H), 1.26 – 1.20 (m, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0690】實施例A1.17：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-環丙基胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.17）的合成



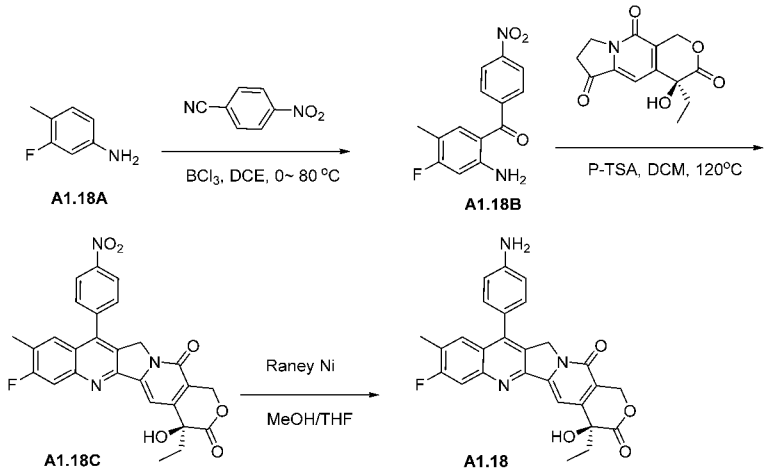
向 A1.10C（200 mg，0.439 mmol）和環丙基胺（52 mg，0.881 mmol）的 DMF 溶液（10 mL）中加入二異丙基乙胺（165 mg，1.28 mmol）和碘化鈉（96 mg，0.640 mmol)，反應在 50°C 封管下反應 2 小時。 LCMS 監測反應完全。向反應液中加入乙酸乙酯，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到粗品。粗品經 TLC 分離純化 (二氯甲烷:甲醇=10:1)後繼續經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到目標化合

物(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(3-環丙基胺基丙基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.17，5.12 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 478.2$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.22 (br s, 2H, one is HCO2H), 7.86 (br s, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.24 – 3.19 (m, 2H), 2.75 – 2.68 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.16 – 2.09 (m, 1H), 1.95 – 1.76 (m, 4H), 0.91 – 0.83(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.43 – 0.33 (m, 2H), 0.31 – 0.21 (m, 2H)。

【0691】實施例A1.18：(S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(4-胺基苯基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.18）的合成



步驟一：氮氣保護下，將3-氟-4-甲基苯胺 (A1.18A，2.0 g，16.3 mmol) 溶在1,2-二氯乙烷 (40 mL) 中，在0 °C下向其中滴加三氯化硼 (19.2 mL, 19.2 mmol) 後，再緩慢加入對硝基苯腈 (2.8 g, 19.2 mmol)，加入完畢將反應液升至80 °C攪拌過夜。將反應液冷卻至室溫向其中加入鹽酸 (40 mL, 2M)，後升溫至80 °C繼續攪拌30分鐘，經LCMS檢測反應完全後，向反應液中加入水 (80 mL)，用二氯甲烷萃取 (100 mL x 3)，合併有機相經無水硫酸鈉乾燥，過濾，旋乾，粗產品經矽膠柱色譜(PE:EA=10:1) 純化得目標化合物

(A1.18B，2.0 g, 收率46.5%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 275.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.39 (s, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H)。

步驟二：將化合物 A1.18B (620 mg，2.28 mmol)，(S)-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]中氮茚-3,6,10(4H)-三酮 (600 mg, 2.28 mmol), 對甲苯磺酸(560 mg, 2.96 mmol) 加入到反應瓶中, 用二氯甲烷將其溶解均勻，將二氯甲烷旋乾，抽真空，在真空狀態下將其加熱到 120 ℃，在此溫度下保持六個小時，經 LCMS 檢測反應完成後，向體系中加入甲醇 (10 mL)，再加入水 (80 mL) 有大量沉澱析出，沉澱過濾後乾燥得到目標化合物 (A1.18C，800 mg, 收率 80.0%) 為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 502.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.13 – 7.89 (m, 3H), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.06 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.94 – 1.84 (m, 2H), 0.87 (m, 3H)。

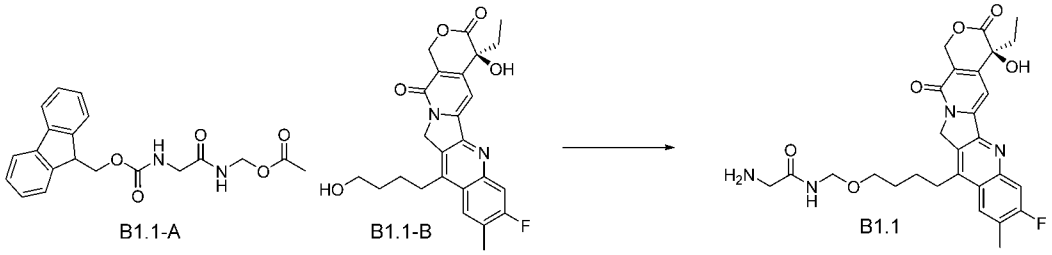
步驟三：將雷尼鎳 (609 mg, 10.5 mmol) 加入到化合物 A1.18C (1.0 g，2.1 mmol) 的甲醇 （25 mL) 和四氫呋喃 (50 mL) 混合溶液中，反應液在室溫氫氣氛圍下攪拌 5 小時。LCMS 檢測反應完全，將反應液過濾，濾液旋乾得到目標化合物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-(4-胺基苯基)-9-甲基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.18，650 mg，收率 67%) 為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 472.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.93 – 7.81 (m, 2H), 7.40 – 7.25 (m, 3H), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.93 – 1.80 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

【0692】B、含生物活性分子片段中間體的合成

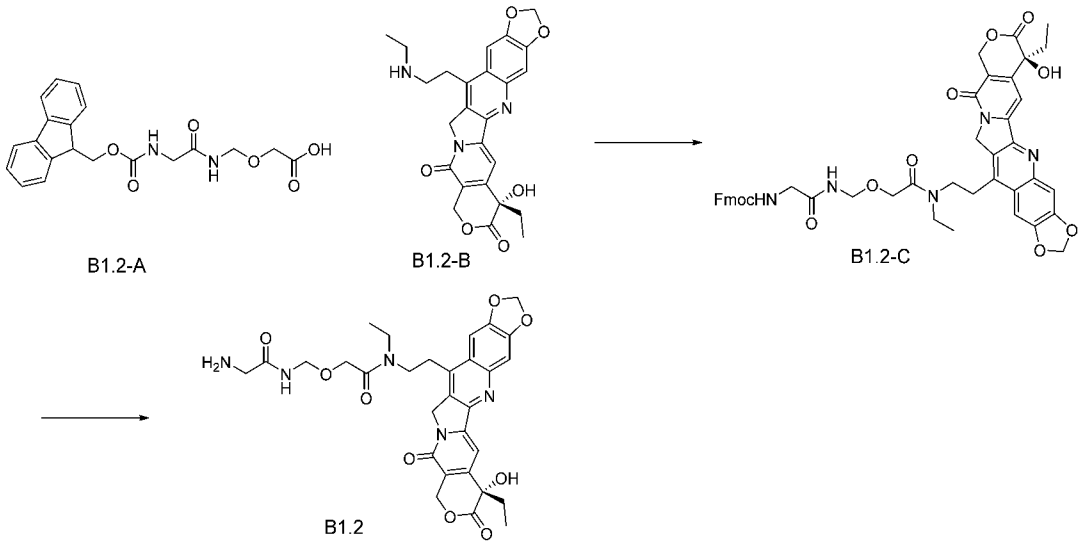
【0693】實施例B1.1：(S)-2-胺基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙醯胺（B1.1）的合成



化合物（B1.1-A）（368mg），化合物（B1.1-B）（452mg）和對甲苯磺酸吡啶鹽（PPTS）（25mg）在二氯甲烷（20ml）中回流 20 小時，然後用碳酸氫鈉水溶液和鹽酸水溶液分別洗滌，減壓除去有機溶劑，殘留物溶於 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物攪拌 20 分鐘，溶於減壓除去大部分低沸點組分，殘留物製備 HPLC 分離得到目標產物 (S)-2-胺基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙醯胺（B1.1）。

ESI-MS (m/z): 539 $[M+H]^+$。

【0694】實施例B1.2：(S)-2-((2-胺基乙醯胺基)甲氧基)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙醯胺（B1.2）的合成



步驟一：依次將化合物 B1.2-A（274 mg），二異丙基乙胺（334 mg）和 HBTU（369 mg）加入 N,N-二甲基甲醯胺（10 mL）中，隨後加入化合物 B1.2-B（300 mg）。反應液在室溫下攪拌 2 小時。向反應液中加入乙酸乙酯（50 mL），用飽和食鹽水（30 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物 B1.2-C（300 mg）。

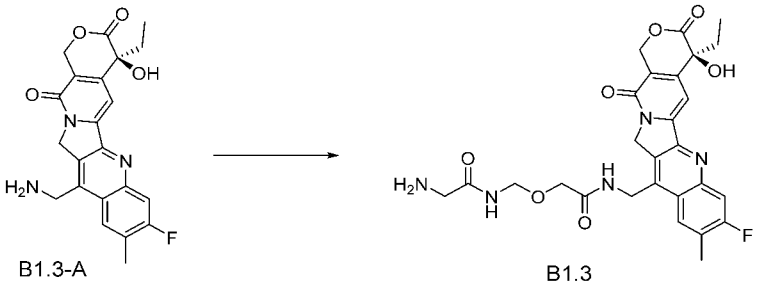
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：830.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.74 (s, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.80 – 7.67 (m, 2H), 7.65 – 7.54 (m, 2H), 7.53 – 7.46 (m, 1H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 7.25 – 7.23 (m, 1H), 6.57 – 6.44 (m, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.50 – 5.19 (m, 4H), 4.71 – 4.57 (m, 2H), 4.32 – 3.97 (m, 7H), 3.80 – 3.53 (m, 4H), 3.20 – 3.14 (m, 2H), 1.92 – 1.80 (m, 2H), 1.28 – 1.22 (m, 3H), 0.87 – 0.82 (m, 3H).

步驟二：向化合物 B1.2-C（300 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺（4 mL）溶液加入哌啶（1 mL），反應液在室溫下攪拌 20 分鐘。反應液除去低沸點組分後得到目標產物，直接用於下步合成。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 608.0。

【0695】實施例B1.3：(S)-2-胺基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基甲基胺基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙醯胺（B1.3）的合成

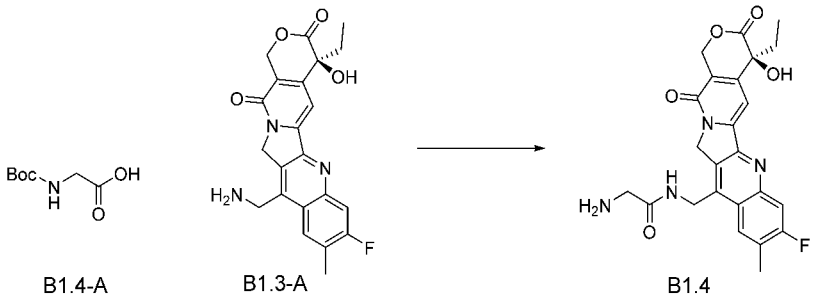


B1.3-A　　B1.3

用實施例 B1.1 相同的方法和反應條件，用化合物（B1.3-A）代替（B1.2-B），得到目標產物 (S)-2-胺基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)胺基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙醯胺（B1.3）。

ESI-MS (m/z): 554 $[M+H]^+$。

【0696】實施例B1.4： (S)-2-胺基-N-((4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙醯胺（B1.4）的合成



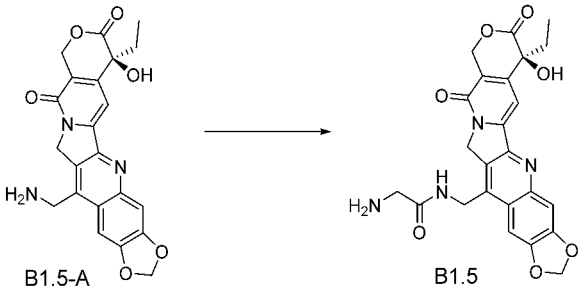
B1.4-A　　B1.3-A　　B1.4

向化合物（B1.4-A） (175mg)，化合物（B1.3-A） (409mg)的 DMF (5ml)溶液中加入 DIPEA（200ul），HBTU（420mg）。化合物室溫小攪拌反應 20 小時，混合物加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），減壓除去有機溶劑，然後向殘留物中加入 1:1 DCM/TFA（10ml），室溫放置 20 分鐘。減

壓除去低沸點組分，殘留物用製備 HPLC 分離得到目標產物 (S)-2-胺基-N-((4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙醯胺（B1.4）。

ESI-MS (m/z): 467 $[M+H]^+$。

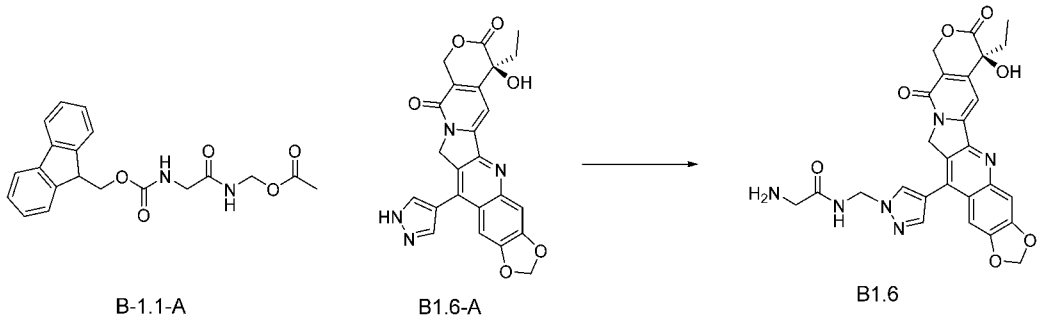
【0697】實施例B1.5：(S)-2-胺基-N-((7-乙基-7-羥基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙醯胺（B1.4）的合成



將 B1.5-A (200 mg)溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (5 mL)中，依次加入 N,N-二異丙基乙胺 (154.80 mg)，2, 5-二氧吡咯烷-1-基（第三丁氧羰基）甘胺酸(157mg)於反應液中，反應液在 25 ℃下攪拌 60 分鐘。向反應液中加入水（30 mL），抽濾，乾燥濾餅得到白色固體產物（ESI-MS (m/z): 579.4 $[M+H]^+$）。將上述白色固體產物溶於三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(體積比為 1：3；4 mL)中, 反應液室溫下攪拌 1 小時。 然後將反應液濃縮得粗產品，粗產品用 C18 柱反相分離純化(乙腈/0.05%甲酸水溶液: 5%到 50%) 得到目標產物 (S)-2-胺基-N-((7-乙基-7-羥基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙醯胺（B1.5，110mg）。

ESI-MS (m/z): 479.3 $[M+H]^+$。

【0698】實施例B1.6：(S)-2-胺基-N-((4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)乙醯胺（B1.6）的合成

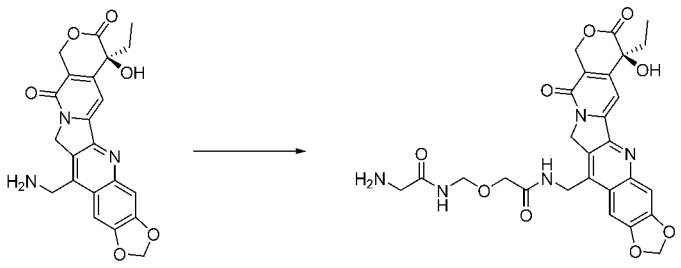


B-1.1-A　　B1.6-A　　B1.6

用實施例B1.1相同的方法和反應條件，用化合物（B1.6-A）代替化合物（B1.1-B），得到目標產物(S)-2-胺基-N-((4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)乙醯胺（B1.6）。

ESI-MS (m/z): 545 $[M+H]^+$。

【0699】實施例B1.7：(S)-2-胺基-N-((2-(((7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙醯胺（B1.7）的合成



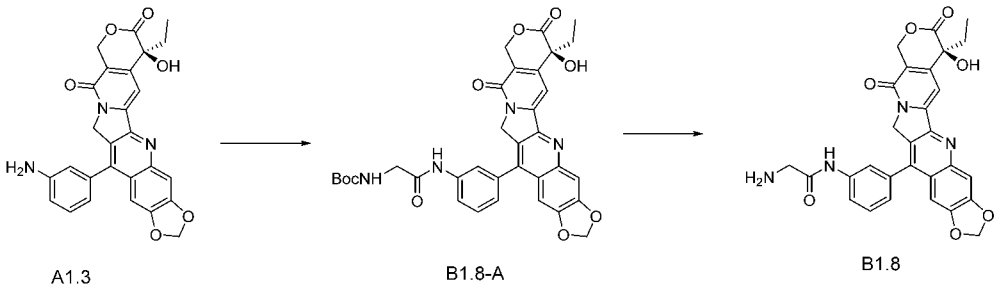
B1.5-A　　B1.7

用實施例B1.2相同的方法和反應條件，用化合物（B1.5-A）代替化合物（B1.2-B），得到含目標產物 (S)-2-胺基-N-((2-(((7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並

[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙醯胺（B1.7）的混合物，上述混合物直接用於下面合成反應。

ESI-MS (m/z): 566 [M+H]+。

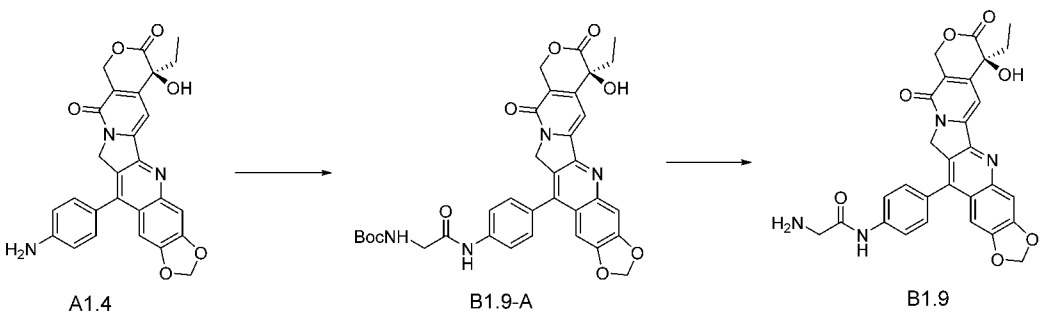
【0700】實施例B1.8：(S)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.8）的合成



用實施例B1.4相同的方法和反應條件，用化合物（A1.3）代替化合物（B1.3-A），得到目標產物(S)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.8）。

ESI-MS (m/z): 541 $[M+H]^+$。

【0701】實施例B1.9：(S)-2-胺基-N-(4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.9）的合成



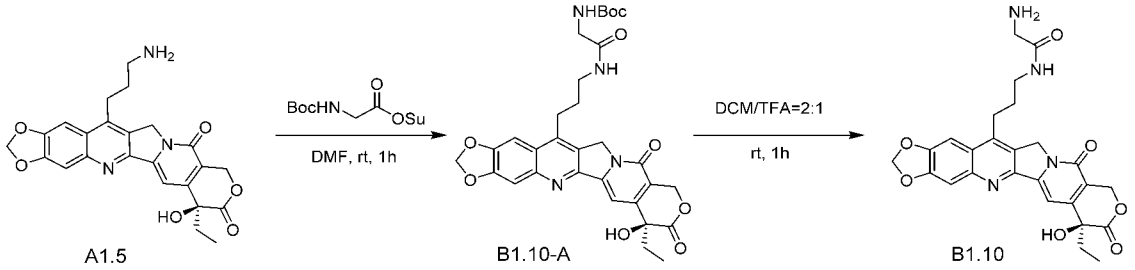
用實施例B1.4相同的方法和反應條件，用化合物（A1.4）代替化合物（B1.3-A），得到目標產物(S)-2-胺基-N-(4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.9）。或者採用下列反應條件得到目標產物。

將化合物A1.4 (60 mg，0.12 mmol) 溶在N,N-二甲基甲醯胺（3 mL），依次加入（第三丁氧羰基）甘胺酸 (26 mg，0.15 mmol)、HATU (56 mg, 0.15 mmol)，N,N-二異丙基乙胺 (48 mg, 0.37 mmol)，室溫下攪拌1小時，TLC檢測反應完成。然後直接向上述反應液中加入TFA(1.0 mL)。在室溫下繼續攪拌1小時，LCMS檢測反應完成，將反應液濃縮除去三氟乙酸得粗產物，粗產物經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 純化得到目標產物(S)-2-胺基-N-(4-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙醯胺（B1.9）（26.3 mg, 收率38%）為黃色固體。

ESI-MS (m/z): 541 $[M+H]^+$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.71 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.67-7.58 (m, 3H), 7.29 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0702】實施例B1.10：(S)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙醯胺（B1.10）的合成



步驟一：室溫下，向化合物 A1.5（200 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（67 mg）和 2,5-二氧吡咯烷-1-基（第三丁氧羰基）甘胺酸（182 mg），在室溫下反應 1 小時。反應液加入水（30 mL）稀釋，乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗產品，粗產品用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物（B1.10-A，100 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：607。

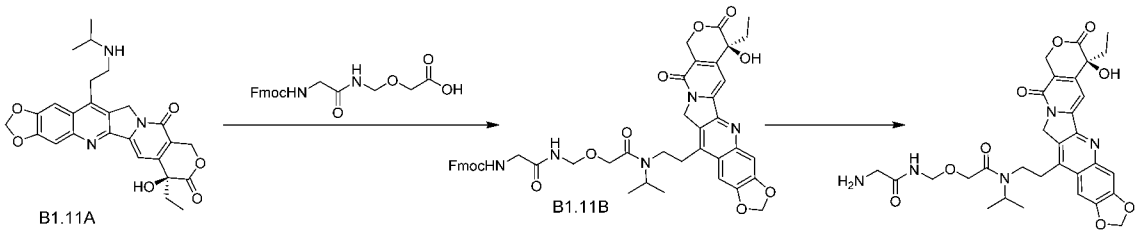
步驟二：向化合物 B1.10-A（100 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中，加入三氟乙酸（2 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液濃縮，粗品加入 N,N-二甲基甲醯胺溶液（3mL），用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物(S)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]-二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙醯胺（B1.10，80 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：507；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.26 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.30 – 3.27 (m, 2H), 3.13 – 3.07 (m, 2H), 2.04 – 1.76 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

【0703】實施例B1.11：(S)-2-((2-胺基乙醯胺基)甲氧基)-N-異丙基-N-(2-(7-

乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙醯胺（B1.11）的合成



步驟一： 將化合物 1-（9H-芴-9-基）-3,6-二氧-2,9-二氧-4,7-二氮雜環-11-甲酸 （242 mg），二異丙基乙胺（330 mg）和 N,N,N`,N`-四甲基脲六氟磷酸酯（359 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（10 mL）溶液中。隨後加入化合物（S）-7-乙基-7-羥基-14-（2-（異丙胺基）乙基）-10,13-二氫-11H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（300 mg），反應在室溫下反應 2 小時。向反應液中加入乙酸乙酯（50 mL），用飽和食鹽水（30 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物化合物 B1.11B（220 mg）。

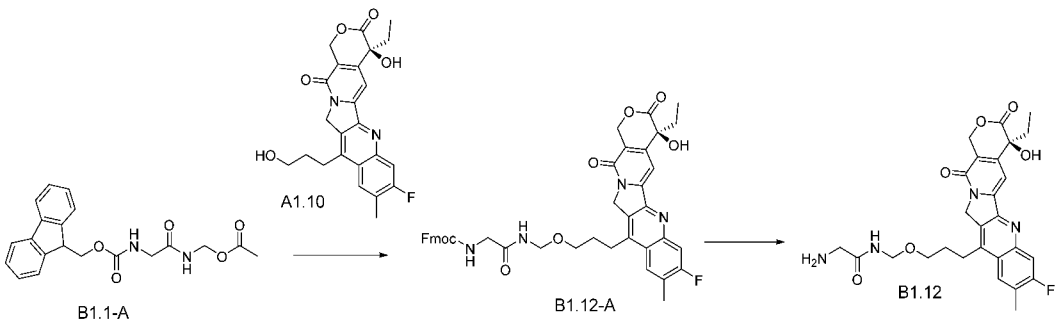
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：844.0。

步驟二：(S)-2-((2-胺基乙醯胺基)甲氧基)-N-異丙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙醯胺的製備

向化合物 B1.11B（220 mg，0.261 mmol）的 N,N-二甲基甲醯胺（4 mL）溶液中加入哌啶（1 mL），反應在室溫下攪拌 20 分鐘。LCMS 檢測反應反應完全。反應液減壓濃縮得到目標化合物（220 mg）為褐色固體，上述產物未經純化直接用於下步合成。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：622.1。

【0704】實施例B1.12：(S)-2-胺基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙醯胺（B1.12）的合成



步驟一： 將化合物 A1.10 (160 mg, 0.365 mmol) 溶在 N,N-二甲基甲醯胺 (3 mL) 中，加入(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)乙醯胺基)甲基乙酸酯（（B1.1-A，672 mg, 1.83 mmol)，然後加入鹽酸乙酸乙酯 (0.073mL, 3M) 於反應液中，反應液在室溫下攪拌過夜。LCMS 檢測反應完成。該反應液直接經反相色譜 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 純化後得目標化合物 (80 mg, 收率 29.0%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 747.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.74 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.28 – 8.17 (m, 1H), 7.99 – 7.88 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.63 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 6.58 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.32 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.26 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.71 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.29 – 3.20 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.00 – 1.86 (m, 4H), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

步驟二：B1.12-A （240mg）溶於 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物

攪拌 20 分鐘，溶於減壓除去低沸點組分，殘留物直接用於下步合成。

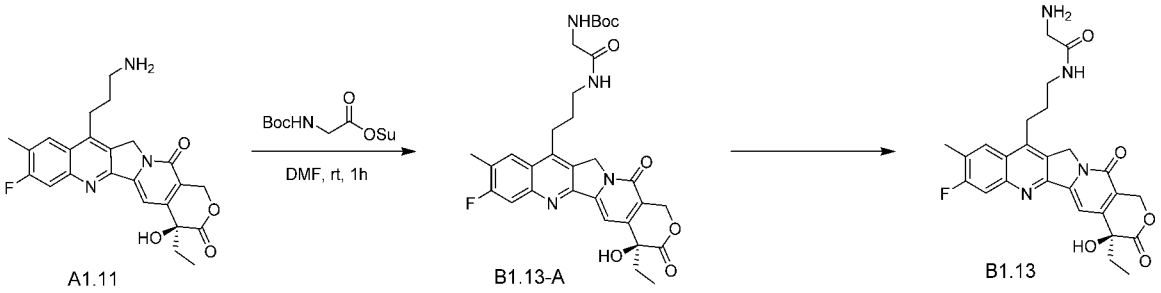
ESI-MS (m/z): 525.2 $[M+H]^+$。

少量粗產物經反相色譜 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 純化後得目標化合物。

ESI-MS (m/z): 525.1 $[M+H]^+$;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.13 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.02 (brs, 2H), 7.89 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.53 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.25-3.18 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.98-1.84 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

【0705】實施例B1.13：(S)-2-胺基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙醯胺（B1.13）的合成



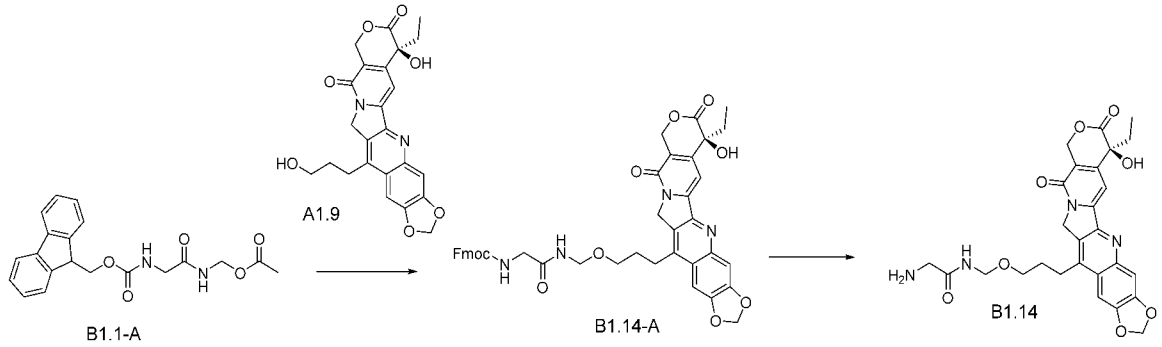
步驟一：室溫下，向化合物 A1.11（200 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（67 mg）和 2,5-二氧吡咯烷-1-基（第三丁氧羰基）甘胺酸（182 mg），在室溫下反應 1 小時。反應液加入水（30 mL）稀釋，乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗產品，粗產品用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物（B1.13-A，104 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：595。

步驟二：向化合物 B1.13-A（100 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中，加入三氟乙酸（2 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液濃縮，粗品加入N,N-二甲基甲醯胺溶液（3mL），用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）進一步純化得到目標化合物(S)-2-胺基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙醯胺（B1.13，88 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：495。

【0706】實施例B1.14： (S)-2-胺基-N-((3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙氧基)甲基)乙醯胺（B1.14）的合成



步驟一：化合物（B1.1-A）（368mg），化合物（A1.9）（440mg）和對甲苯磺酸吡啶鹽（PPTS）（25mg）在二氯甲烷（20ml）中回流 20 小時，然後用碳酸氫鈉水溶液和鹽酸水溶液分別洗滌，減壓除去有機溶劑，得到粗產物，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物化合物 B1.14A（240 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：747。

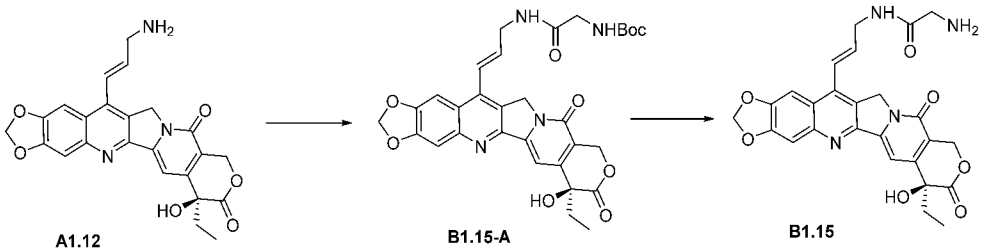
步驟二：B1.14-A （240mg）溶於 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物攪拌 20 分鐘，溶於減壓除去低沸點組分，殘留物直接用於下步合成。少

量粗產物經反相色譜 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 純化後得目標化合物。

ESI-MS (m/z): 525 $[M+H]^+$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (t, 1H)，8.04 (br, 2H), 7.58（s，1H），7.51（s，1H），7.25（s，1H），6.29（s，2H），5.43（S，2H），5.21（s, 2H），4.65（d，2H），3.63（m，2H），3.53（m，2H），3.11（m，2H），1.87（m，4H），0.88（t，3H）。

【0707】實施例B1.15：(S,E)-2-胺基-N-(3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)乙醯胺



A1.12　　B1.15-A　　B1.15

步驟一：室溫下，向化合物 A1.12（200 mg，0.447 mmol）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（135 mg，1.341 mmol）和 N-羥基-2,5-二氧吡咯烷第三丁氧羰基甘胺酸酯（183 mg，0.671 mmol），在室溫下反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入水（20 mL），用乙酸乙酯（20 mL×3）萃取，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物 B1.15A（130 mg ，收率：48%）為棕色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =605.6。

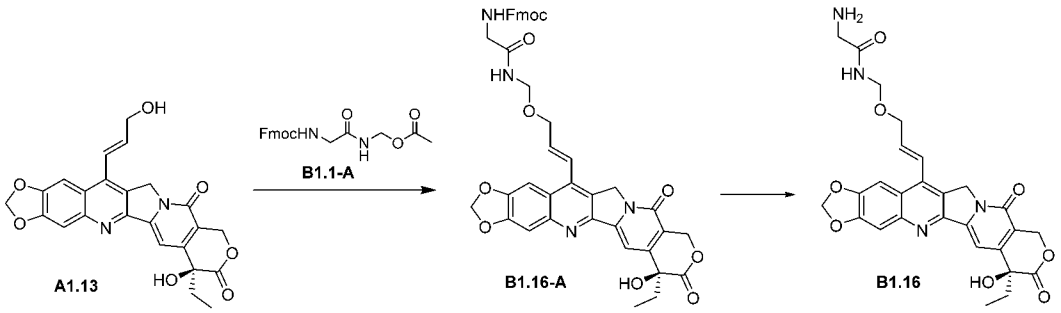
步驟二： 室溫下，將化合物 B1.15-A（130 mg，0.215mmol）用鹽酸 1，4-二氧六環溶液（5 mL）溶解，在室溫下反應 30 分鐘。LCMS 顯示反應完

全。反應液通過反向純化得到目標化合物（60 mg，收率：52%）為棕色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =505.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.85 (s, 1H), 8.15 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 1.86 – 1.82 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

【0708】實施例B1.16：(S,E)-2-胺基-N-(((3-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)乙醯胺



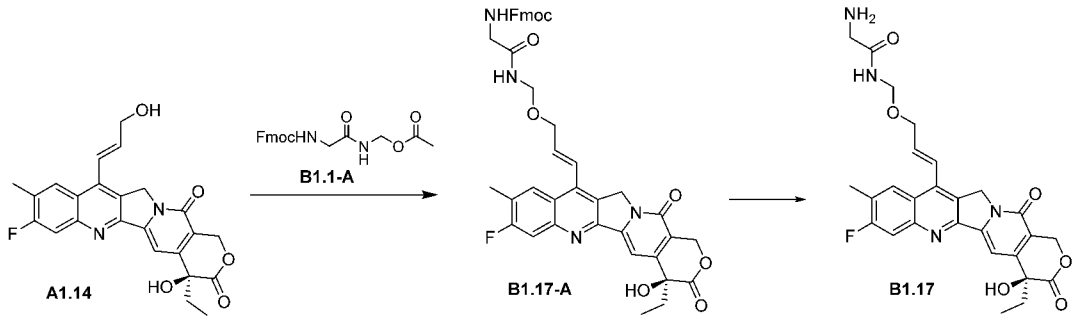
步驟一：在氮氣保護下，將原料 A1.13 (150 mg, 0.335 mmol) 溶在甲苯 (3 mL) 中，加入(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)乙醯胺基)甲基乙酸酯 (B1.1-A，308 mg, 0.84 mmol)，然後將醋酸鋅 (123 mg, 0.67 mmol) 加入到反應液中，反應液在 100°C 下攪拌過夜。LCMS 檢測反應完成。該反應液直接經反相色譜 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液: 5%到 50%) 純化後得目標化合物（9H-芴-9-基）甲基（S，E）-（2-（（（3-（7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環[4,5-g]吡喃[3'，4'：6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-14-基）烯丙基）氧基）甲基）胺基）-2-氧代乙基）胺基甲酸酯 (B1.16-A，80 mg, 收率 31%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 757.4。

步驟二：將化合物 B1.16-A (80 mg, 0.11 mmol) 溶在 N,N-二甲基甲醯胺 (2 mL) 中,然後向反應液中加入哌啶(0.05 mL)，在室溫下攪拌 1 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液濃縮得粗產品，粗產品用 C18 柱反相分離純化(乙腈/0.05%氨水的水溶液: 5%到 50%)得到目標化合物(35 mg, 收率 62%)為棕色固體。

LCMS (ESI) [M+H]+ = 535.2, tR = 1.070 min.

【0709】實施例B1.17：(S,E)-2-胺基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)胺基)甲基)乙醯胺



步驟一：將化合物 A1.14 (80 mg, 0.183 mmol)和化合物(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)乙醯胺基)甲基乙酸酯 (B1.1-A，135 mg, 0.367 mmol)溶於甲苯 (4 mL), 加入醋酸鋅 (190 mg, 1.03 mmol)，反應液在 100 攝氏度下攪拌 48 小時。冷卻至室溫，向其中加入水 (10 mL)，用乙酸乙酯 (10 mL×3) 萃取。合併有機相經無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮得到粗產物，粗產物經反相色譜 (0.05% FA 的水溶液/乙腈: 5%到 100%) 純化後得到目標化合物(S,E)-2-（Fmoc 胺基）-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)

甲基)乙醯胺 (B1.17-A，30mg)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 745.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.82 (m 1H), 8.21 (m, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.61 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 4H), 6.72 – 6.55 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.75 (m, 2H), 4.34 (m, 2H), 4.28 – 4.24 (m, 2H), 4.20 (m, 1H), 3.70 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

步驟二：將化合物 4 (25 mg, 0.034 mmol)， 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL) 中, 然後加入二乙胺(0.2 mL)，加畢，反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，將反應液直接減壓蒸乾溶劑得到粗產品目標化合物(S,E)-2-胺基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙醯胺為黃色粘稠狀產品。

LCMS (ESI) [M+H]+ = 523.2；

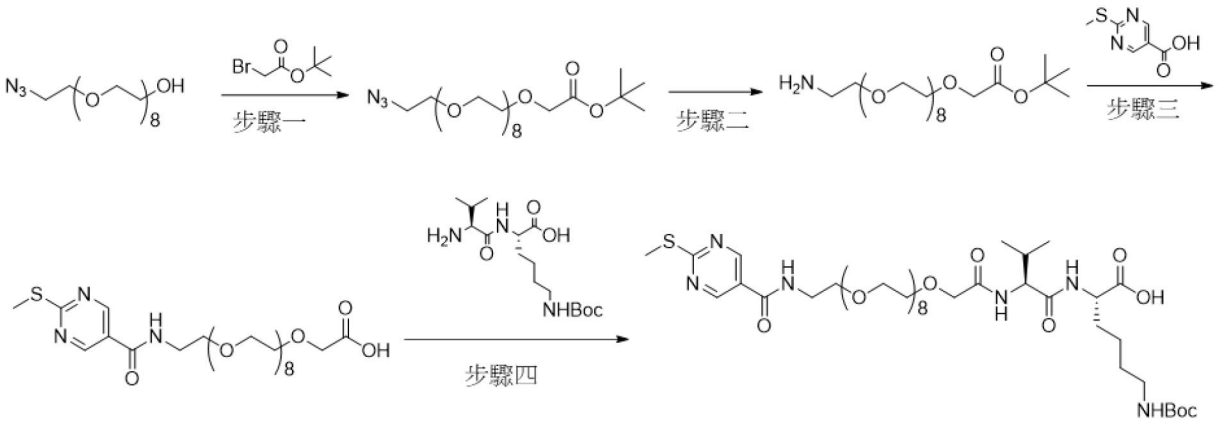
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 523.1, t_R = 0.446 min, 1.311 min.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.26 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.06 (s, 2H), 7.91 (m, 1H), 7.40 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.70 – 6.60 (m, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 3.68 (d, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.90 – 1.84 (m, 2H), 0.88 (m, 3H)。

【0710】C、含偶聯連接段分子片段中間體的合成

【0711】實施例C1.1：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離

胺酸（化合物C1.1）



步驟一： 29-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯

向 26-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜-26-烷-1-醇（4.39g）的 DMF（40ml）溶液中加入 NaH（0.6g，60%）。上述混合物攪拌 30 分鐘後，加入溴乙酸第三丁酯（2.4g）。混合物在乾燥條件下攪拌 20 小時。然後向混合物中加入乙酸乙酯（200ml）和水（200ml，開始時慢慢加入），有機相水洗（100ml x 3），無水硫酸鈉乾燥，減壓除去溶劑，殘留物經過矽膠柱色譜分離得到目標產物，29-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯。

ESI-MS (*m/z*): 554 $[M + H]^+$。

步驟二：29-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯

向 29-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯（1.16g） 的乙酸乙酯（20ml）溶液中加入鈀碳催化劑（Pd/C，10%，100mg）。上述溶液在氫氣氣氛下攪拌 5 小時，然後濾去鈀碳後，減壓除去溶劑得到目標產物。

ESI-MS (*m/z*): 528 $[M + H]^+$。

步驟三：1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷酸

29-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯（527mg）和 2-甲硫基-嘧啶-5-羧酸（170mg）加入乾燥 DMF (10ml), 然後在冰浴冷卻下向上述溶液中依次加入 DIPEA（0.2ml），HBTU（420mg）。上述混合物室溫小攪拌 20 小時。然後用乙酸乙酯（100ml）稀釋，水洗（100ml x 4）,有機相無水硫酸鈉乾燥後，減壓除去有機溶劑，殘留物溶於 DCM（10ml），然後加入 TFA（10ml），混合物室溫下攪拌 1 小時，然後減壓除去低沸點組分，殘留物經過製備 HPLC 分離得到 1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷酸。

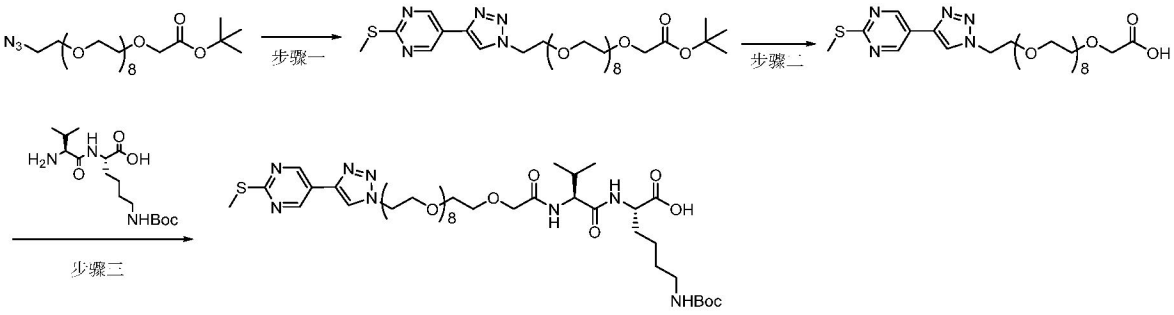
ESI-MS (*m/z*): 624 $[M + H]^+$。

步驟四：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸

【0712】1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷酸（623mg）溶於DMF（10ml），0°C下加入DIPEA（300ul），HBTU （420mg）。混合物攪拌30分鐘，然後加入纈胺酸-（Boc）離胺酸二肽化合物（345mg）。反應攪拌20小時，然後加入乙酸乙酯（100ml），稀鹽酸（20ml x 3）洗，有機相乾燥後減壓除去有機溶劑，粗產物通過製備HPLC分離得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.1）。

ESI-MS (*m/z*): 951 $[M + H]^+$。

【0713】實施例C1.2：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.2）



步驟一：29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯

29-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯 （1.7g），2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶（450mg）溶於 DMSO-水（20ml，4:1）中，向混合物中加入溴化亞銅（50mg）。反應液室溫下攪拌 2 小時，然後加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），乾燥後減壓除去有機溶劑，粗產物用矽膠柱層析分離得到目標產物 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯。

MS (*m/z*): 704 $[M + H]^+$。

步驟二：29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸

29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸第三丁酯（1g）溶於二氯甲烷（10ml），然後加入 TFA（5ml）。混合物室溫靜置 1 小時，然後減壓除去低沸點組分得到目標產物 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-

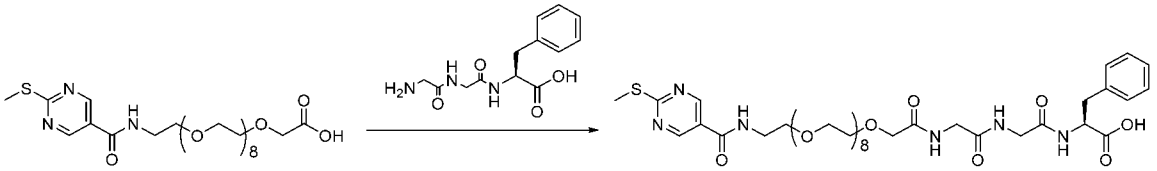
烷酸。

MS (*m/z*): 648 $[M + H]^+$。

步驟三：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷酸（647mg）溶於 DMF（10ml），0°C 下加入 DIPEA（300ul），HBTU （420mg）。混合物攪拌 30 分鐘，然後加入纈胺酸-離胺酸二肽化合物（345mg）。反應攪拌 20 小時，然後加入乙酸乙酯（100ml），稀鹽酸（20ml x 3）洗，有機相乾燥後減壓除去有機溶劑，粗產物通過製備 HPLC 分離得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-29-烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物 C1.2）。

ESI-MS (*m/z*): 975 $[M + H]^+$。

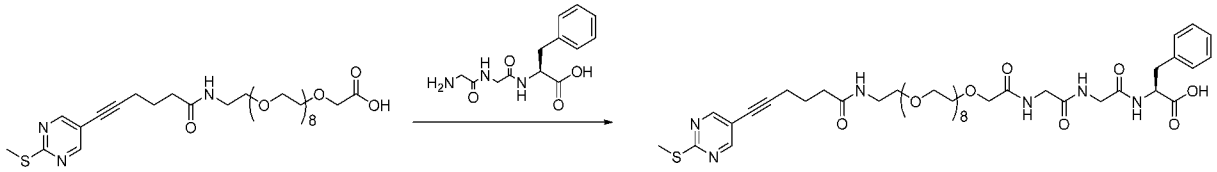
【0714】實施例 C1.3：(1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-甘胺酸-甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物C1.3）



用實施例 C1.1 步驟四相同的方法和反應條件，用相應的原料，得到目標產物 (1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧雜-2-氮雜-31-烷醯基)-甘胺酸-甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物 C1.3）。

ESI-MS (m/z): 885 $[M+H]^+$。

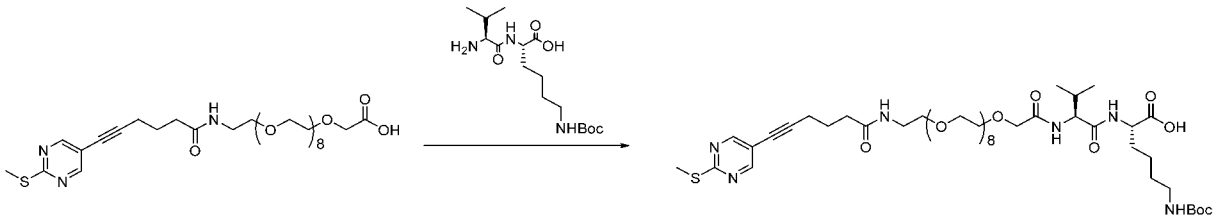
【0715】實施例C1.4：(36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-30-氮雜-三十六-(35-炔)-醯基)甘胺酸甘胺酸苯丙胺酸（化合物C1.4）



用實施例C1.1步驟四相同的方法和反應條件，用反應式所示的原料，得到目標產物(36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-30-氮雜-三十六-(35-炔)-醯基)甘胺酸甘胺酸苯丙胺酸（化合物C1.4）。

ESI-MS (m/z): 951 $[M+H]^+$。

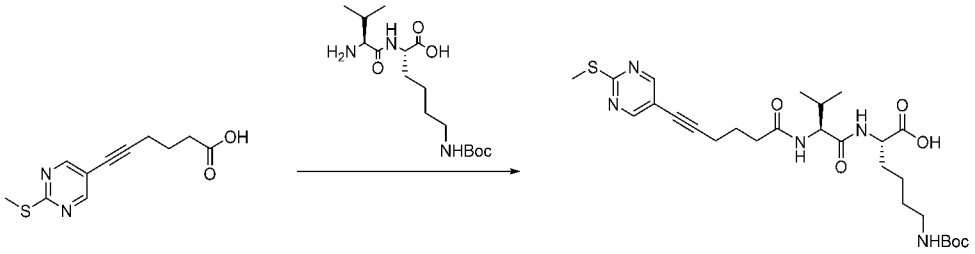
【0716】實施例C1.5：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-30-氮雜-三十六-(35-炔)-醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.5）



用實施例C1.1步驟四相同的方法和反應條件，用反應式所示的化合物作為原料，得到目標產物N6-(第三丁氧基羰基)-N2-((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜-30-氮雜-三十六-(35-炔)-醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.5）。

ESI-MS (m/z): 1017 $[M+H]^+$。

【0717】實施例C1.6：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.6）

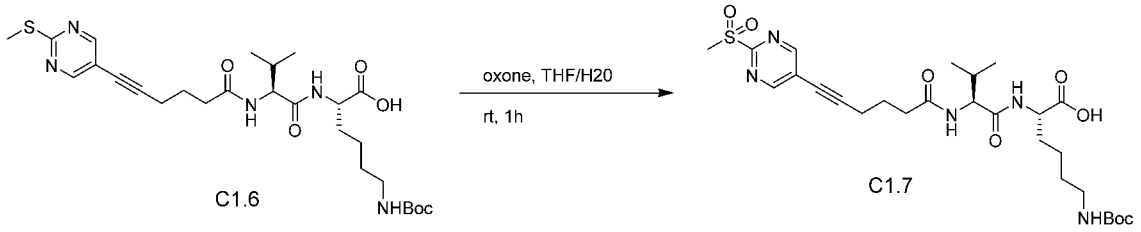


將 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 （920mg）和 N-羥基丁二醯亞胺（537 mg）溶於二氯甲烷（50mL）中，然後加入二環己基碳二亞胺（963 mg）。反應液室溫攪拌 1 小時，然後減壓除去二氯甲烷，殘留物溶於 N,N-二甲基甲醯胺（50mL），然後加入 N^2-L-纈胺酸-N^6-(Boc)-L-離胺酸 (1.5g)，反應液室溫下攪拌反應 16 小時，將反應液倒入 200mL 水中，用飽和碳酸氫鈉溶液調節 pH 至 11，上述水溶液用乙酸乙酯萃取兩次，棄掉有機相，將水相用檸檬酸調節 pH 到 4-5，用乙酸乙酯（100 mL x 3）萃取三次，有機相用飽和食鹽水（100 mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，旋蒸，得到粗產品 2.8g，粗產品用快速色譜法分離純化(DCM : MeOH = 30 : 1)得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 (1.0g) （化合物 C1.6）。

ESI-MS (m/z): 564.3 $[M+H]^+$。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.45 (s, 1H), 8.68 (s, 2H), 8.12 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.27 – 4.19 (m, 1H), 4.11 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 2.88 (d, J = 7.9 Hz, 3H), 2.73 (s, 1H), 2.59 (s, 1H), 2.52 (s, 4H), 2.40 – 2.24 (m, 3H), 2.03 – 1.88 (m, 2H), 1.77 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 1.68 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 1.60 – 1.49 (m, 1H), 1.36 (s, 15H), 0.85 (dd, J = 14.8, 6.7 Hz, 7H)。

【0718】實施例C1.7 ：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.7）

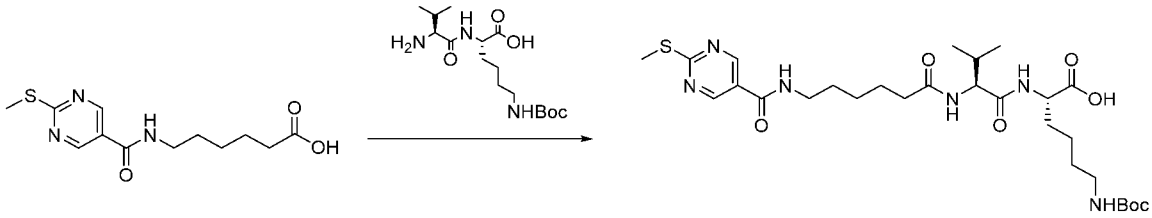


向化合物 C1.6（260 mg）的四氫呋喃（3 mL）和水（3 mL）混合溶液中加入過氧單磺酸鉀（1.414 g），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液過濾，濾液用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）純化得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物 C1.7）（120 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 596;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.48 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.14 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.24 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.12 (br s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.43 – 2.29 (m, 2H), 2.03 – 1.93 (m, 2H), 1.82 (br s, 2H), 1.63 – 1.60 (m, 4H), 1.37 (s, 12H), 0.88 – 0.83 (m, 6H)。

【0719】實施例C1.8：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲醯胺基)己醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.8）

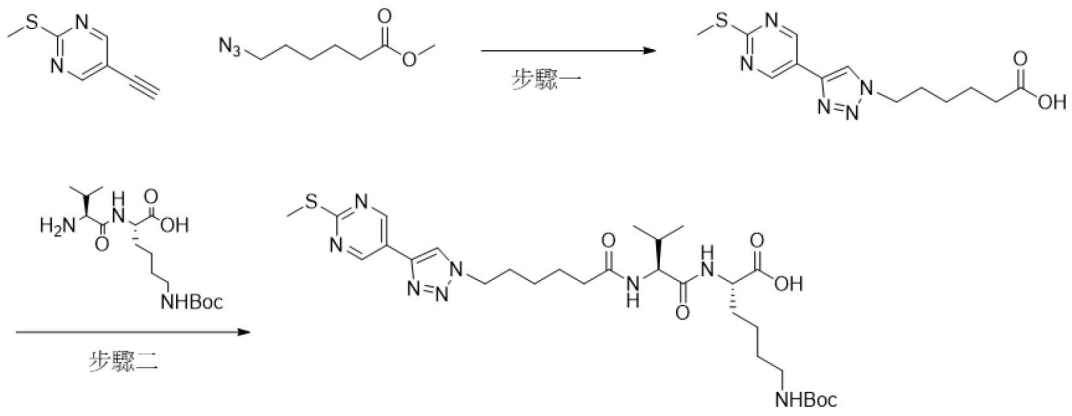


用實施例 C1.6 相同的方法和反應條件，用反應式所示的已知化合物作為原料，得到目標產物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲醯胺基)己醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物 C1.8）。

ESI-MS (m/z): 611 $[M+H]^+$。

【0720】實施例C1.9：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-

基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物C1.9）



步驟一：6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸

室溫下，將 2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶（1.5g）、6-疊氮基己酸甲酯（1.71g）溶於第三丁醇與水的混合溶劑（20 mL/25 mL）中，加入維生素 C 鈉 (5.7 g), 溴化亞銅（2.9g）攪拌反應 10 h。反應加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml x 5），乾燥後除去有機溶劑，矽膠柱層析得到 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸甲酯 （2.8g），ESI-MS (m/z): 321.9$[M+H]^+$。上述產物溶於四氫呋喃（100ml），加入氫氧化鋰（1M，20ml），混合物攪拌 3 小時，然後加入鹽酸至反應液 pH 2，然後加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml x 3），乾燥，除去有機溶劑得到目標產物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸。ESI-MS (m/z): 308.4 $[M+H]^+$。

步驟二：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯)- L-纈胺酸)-L-離胺酸

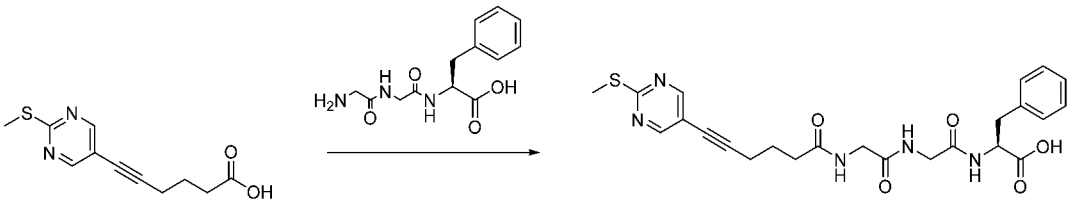
將化合物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (370 mg,)和 N-羥基丁二醯亞胺 (152 mg) 溶在二氯甲烷（5 mL）中攪拌，再加入二環乙基碳二亞胺（273 mg），然後反應液在室溫下攪拌 1 小時。向反應液中加

入 10 mL 水，用乙酸乙酯萃取（20 mL x 2），有機相用飽和食鹽水洗，用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液減壓濃縮得到粗品。將此粗品溶解在 N,N-二甲基甲醯胺(10 mL)攪拌，加入化合物 N^2-L-纈胺酸-N^6-(Boc)-L-離胺酸，反應液在室溫下反應 16 小時，向反應液中緩慢加入檸檬酸將 PH 調至 5 左右，加入水，再用乙酸乙酯萃取(3 x 10 mL)，有機相用飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到目標產物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（化合物 C1.9，400 mg）。

ESI-MS (m/z): 635.3 $[M+H]^+$；

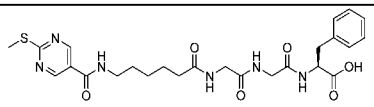
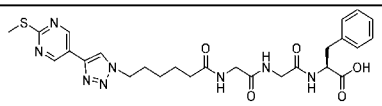
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.46 (s, 1H), 9.06 (s, 2H), 9.06 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.19 (dd, *J* = 8.9, 7.0 Hz, 1H), 4.14 – 4.05 (m, 1H), 2.92 – 2.85 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.24 – 2.10 (m, 2H), 1.97 – 1.81 (m, 3H), 1.71 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.50 (m, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.28 – 1.22 (m, 6H), 0.88 – 0.76 (m, 6H)。

【0721】實施例C1.10：(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-(5-炔)-醯基)甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物C1.10）

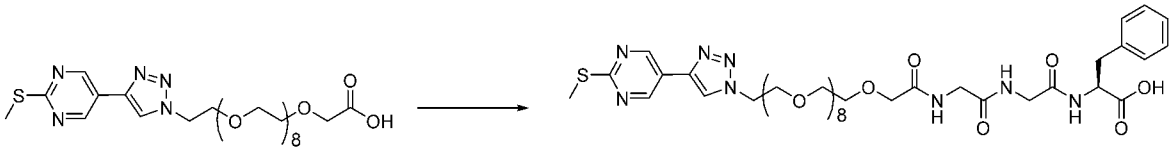


用實施例 C1.6 相同的方法和反應條件，上述反應式所示的已知原料，得到目標產物 (6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物 C1.10）。ESI-MS (m/z): 498 $[M+H]^+$。

用實施例 C1.6 相同的方法和反應條件，利用不同的反應原料，得到下表中目標產物。

化合物	化學結構	化學名稱	ESI-MS (*m/z*): $[M + H]^+$
C1.11		(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲醯胺基)己醯基) 甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸	545
C1.12		(6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基) 甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸	569

【0722】實施例C1.13：(29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜29烷醯基) 甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物C1.13）

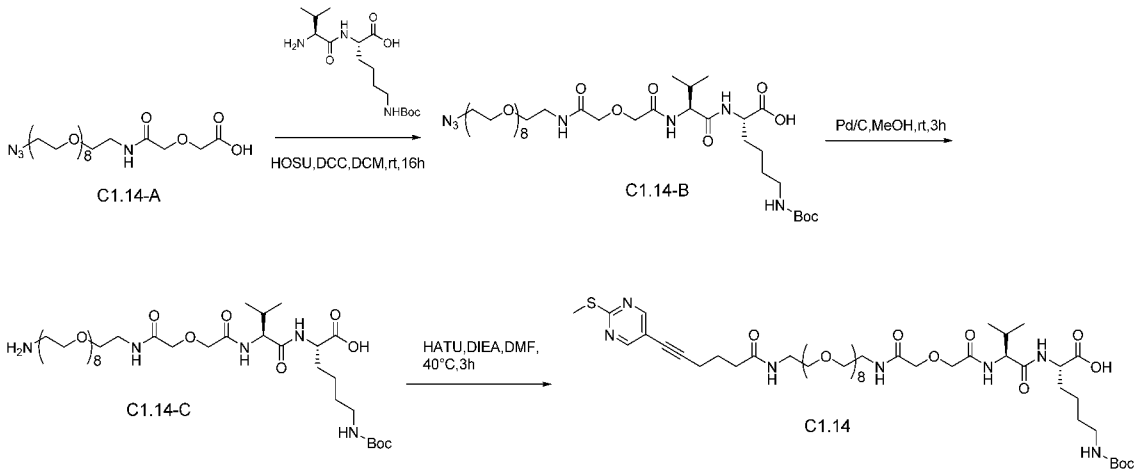


用實施例 C1.1 步驟四相同的方法和反應條件，利用已知原料，得到目標產物 (29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜 29 烷醯基)甘胺酸甘胺酸-L-苯丙胺酸（化合物 C1.13）。

ESI-MS (m/z): 909 $[M+H]^+$。

【0723】實施例C1.14：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧雜-6,33-二氮雜三十九烷-38-

炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.14）



步驟一：將化合物 C1.14-A（336mg）溶於二氯甲烷（5 mL）中，加入 N-羥基丁二醯亞胺（98 mg，0.85 mmol），二環己基碳二亞胺（175 mg，0.85 mmol）室溫攪拌反應 1 小時，然後將化合物 N^2-L-纈胺酸-N^6-(Boc)-L-離胺酸（230 mg）加入反應液，室溫攪拌反應過夜。濃縮除去溶劑得到粗產品，粗產品用 C18 柱反相分離純化（乙腈/0.01%FA 的水溶液：5%-50%）得到無色油狀目標化合物（C1.14B，290 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 882.3。

步驟二： 將化合物 C1.14-B（300 mg）溶於無水甲醇（5 mL）中，加入 Pd/C（10%, 60 mg），氫氣置換三次，室溫攪拌反應過夜，抽濾，濃縮得到目標化合物 C1.14-C（293 mg）為無色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：856.1。

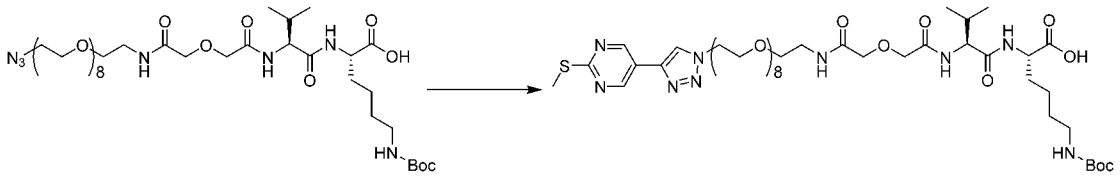
步驟三： 將 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸（84 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (3 mL)中，然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 （61 mg），HATU（108 mg）。反應液室溫攪拌 20 分鐘，然後加入化合物 C1.14-C（196 mg），40°C 攪拌反應 3 小時，粗產品用 C18 柱反相分離純化（乙腈/0.01%FA 的

水溶液：5%-65%）得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧雜-6,33-二氮雜三十九烷-38-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.14）（170 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1074.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.68 (s, 2H), 8.23 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.99 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.09 (dd, *J* = 8.8, 6.5 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.98 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 3.74 – 3.70 (m, 1H), 3.50 (s, 30H), 3.45 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.39 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.26 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.20 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.12 – 2.06 (m, 1H), 1.79 – 1.74 (m, 2H), 1.67 – 1.59 (m, 1H), 1.50 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.24 (s, 2H), 1.20 – 1.09 (m, 2H), 0.85 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H)。

【0724】實施例C1.15：N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧雜-6-氮雜三十二烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.15）

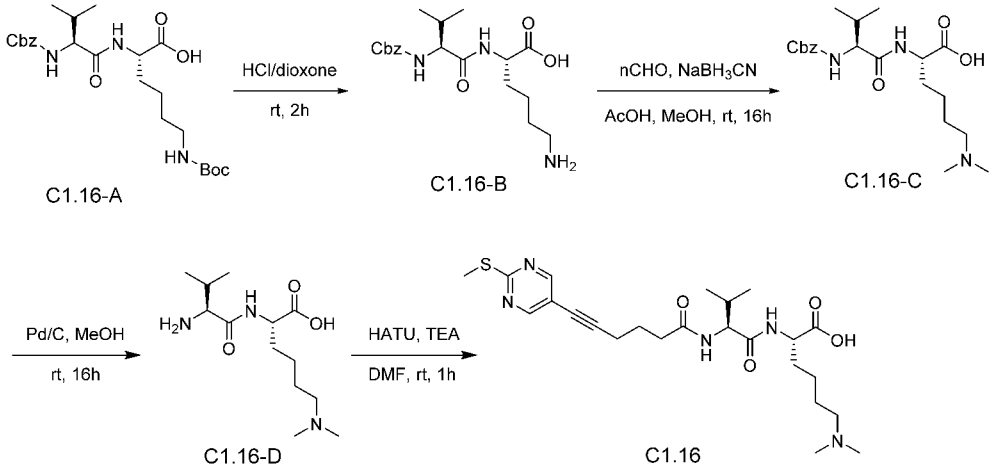


將化合物 C1.14-B（130 mg），5-乙炔基-2-甲硫基嘧啶（44 mg），維生素 C 鈉（3 mg）和硫酸銅（5 mg）加入到第三丁醇（2 mL）和水（2 mL）的混合溶液中，反應在室溫氮氣下反應 3 小時。向反應液中加入水（10 mL），用二氯甲烷（30 mL×3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濃縮得到粗品，粗產品 TLC 分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10 比

1)得到目標化合物 N^6-(第三丁氧基羰基)-N^2-((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧雜-6-氮雜三十二烷醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.15）（90 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1032.3。

【0725】實施例C1.16：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：向化合物 C1.16-A（10.0 g）加入氯化氫-二氧六環（100 mL）溶液，在室溫下反應 2 小時。反應液減壓濃縮得到白色固體目標化合物 C1.16-B（8.0 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：380.1。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.40 – 7.30 (m, 5H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.23 – 4.11 (m, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 1H), 2.78 – 2.73 (m, 2H), 2.03 – 1.94 (m, 1H), 1.77 – 1.51 (m, 4H), 1.44 – 1.31 (m, 2H), 0.87 (dd, *J* = 17.3, 6.6 Hz, 6H)。

步驟二：將化合物 C1.16-B（3.0 g）和醋酸鈉（1.90 g）溶在甲醇（100 mL）溶液中，室溫下反應 10 分鐘，向反應液中加入多聚甲醛（2.8 g），室溫下攪拌反應 30 分鐘，再向反應液中加入氰基硼氫化鈉（1.0 g），反應在室溫

下攪拌反應 16 小時。反應液過濾後濾液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.16-C (1.70 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：408.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.86 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.26 (m, 6H), 5.03 (s, 2H), 4.08 – 4.06 (m, 1H), 3.90 – 3.85 (m, 1H), 2.50 – 2.45 (m, 2H), 2.35 (s, 6H), 2.05 – 1.93 (m, 1H), 1.73 – 1.55 (m, 2H), 1.51 – 1.40 (m, 2H), 1.33 – 1.22 (m, 2H), 0.85 (dd, *J* = 16.5, 6.8 Hz, 6H)。

步驟三：室溫下，將化合物 C1.16-C（1.6 g）溶於甲醇（80 mL）中，然後向反應液中加入 Pd/C（10%，0.16 g），氫氣下室溫下攪拌反應 12 小時。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.16-D（680 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：274.2。

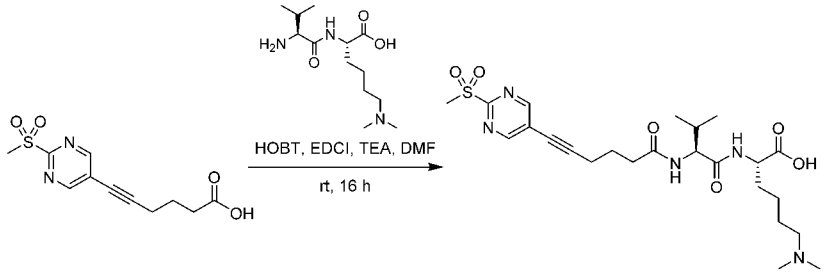
步驟四：將 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸（944 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (30 mL)中，然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 （1.3 g），2-(7-偶氮苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯（HBTU，1.8 g）。反應液室溫攪拌 20 分鐘，然後加入化合物 C1.16-D（1.1 g），40 °C 攪拌反應 3 小時，粗產品用 C18 柱反相分離純化（乙腈/0.01%甲酸的水溶液： 5%-65%）得到白色固體目標化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸 C1.16（1.2 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：492.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.68 (s, 2H), 8.00 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.20 (t, 1H), 4.08 (dd, *J* = 12.7, 7.7 Hz, 1H), 2.47 – 2.40 (m, 4H), 2.37 – 2.31 (m, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.01 – 1.92 (m, 1H), 1.82 – 1.73 (m, 2H),

1.71 – 1.56 (m, 2H), 1.49 – 1.37 (m, 2H), 1.33 – 1.23 (m, 2H), 0.88 – 0.82 (m, 6H).

【0726】實施例C1.17：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸C1.17

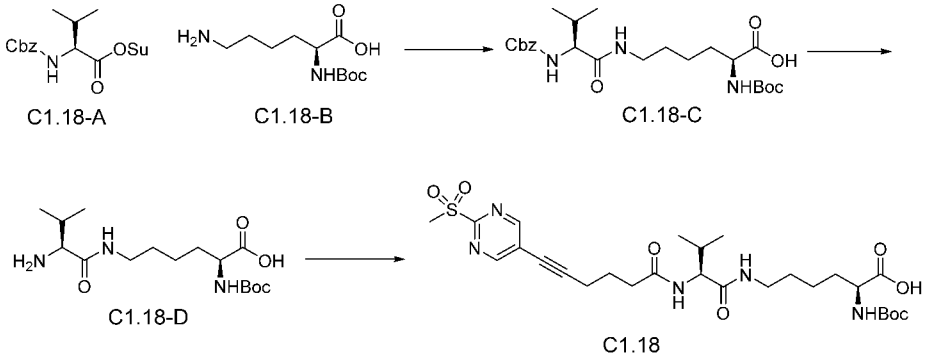


將 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg), 化合物 C1.16-D (328 mg)，三乙胺 (322 mg) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (5 mL)。然後再加入 1-羥基苯並三唑(HOBT，162 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(EDCI，229 mg) ，反應液室溫攪拌 16 小時，反應液直接經過 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 N6,N6-二甲基-N2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.17 ，白色固體，327 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：524.4。

^{1}H NMR (400 MHz,) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.21 (dd, *J* = 8.8, 6.9 Hz, 1H), 4.08 – 4.03 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.55 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.42 – 2.32 (m, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.98 (dd, *J* = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.74 – 1.55 (m, 2H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.31 – 1.23 (m, 2H), 0.85 (dd, *J* = 12.8, 6.8 Hz, 6H)。

【0727】實施例C1.18：N^2-(第三丁氧基羰基)-N^6-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：化合物 C1.18-B（3 g）溶於二氯甲烷（30 ml），加入 DIPEA（4 ml），然後加入化合物 C1.18-A（3.48 g），混合物室溫下攪拌反應 20 小時。向反應液中加入乙酸乙酯（200 ml），混合物依次用鹽酸（0.1M, 30 ml x 3）、水（30ml x 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，減壓濃縮後得到目標混合物 C1.18-C（4.7 g）。

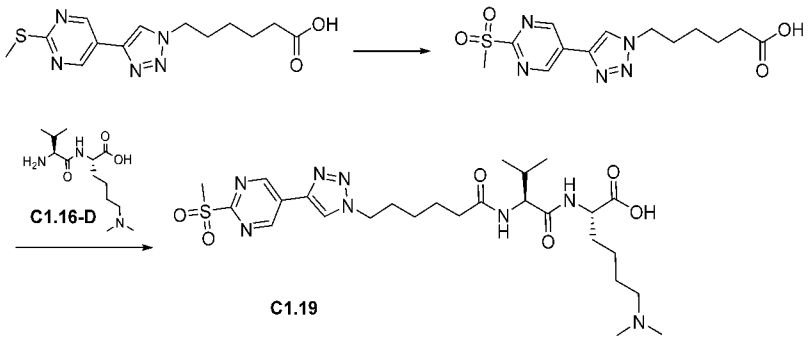
步驟二：室溫下，將化合物 C1.18-C（4.7 g）溶於甲醇（80 mL）中，然後向反應液中加入 Pd/C（10%，0.6 g），在氫氣下室溫下攪拌反應 12 小時。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.18-D（3.4 g)。LCMS (ESI) $[M+H]^+$：346.2。

步驟三：將 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (2.68 g), 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (50 mL), 然後再加入三乙胺 (3 ml), HBTU (3.8 g), 混合物室溫下攪拌 10 分鐘，然後加入乙酸乙酯（200 ml），混合物用飽和碳酸氫鈉（20 ml x 2），鹽酸（0.1M，50 ml x 2），水（50 ml x 2）洗，無水硫酸鈉乾燥，減壓濃縮得到粗產物中間體，上述粗產物溶於 DMF （30 ml），加入 DIPEA（1.6 ml），然後加入 C1.18-D (3.4 g)， 反應液室溫攪拌 3 小時，然後加入乙酸乙酯（200 ml），用鹽酸（0.1M，50 ml x 2），水（50 ml x 2）洗，無水硫酸鈉乾燥，減壓濃縮得到粗產物，經矽膠柱色譜分離提純得到目標化

合物 N^2-(第三丁氧基羰基)-N^6-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.18 ，白色固體，3.8 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：596.4。

【0728】實施例C1.19：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：將化合物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（1.0 g， 3.3mmol）溶在四氫呋喃和水（40mL，3:1）混合溶液中，加入過氧單磺酸鉀（10.0 g，16.3mmol）。室溫攪拌反應 3 小時，LCMS 檢測反應完成。反應液過濾，濾餅用 DMSO 洗滌，合併濾液。經反相純化（C18，乙腈：0.1%甲酸=5%-55%）純化，得到 6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（750mg，收率 67.9%）白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 340.1$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.48 (s, 2H), 8.95 (s, 1H), 4.49 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.22 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.61 – 1.50 (m, 2H), 1.36 – 1.26 (m, 2H)。

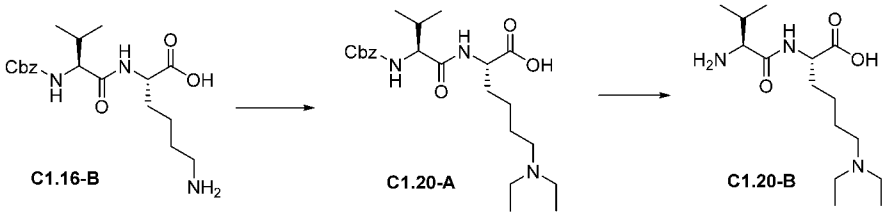
步驟二：將化合物 6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（300 mg，0.88mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（6mL），加入 HATU（337 mg，0.88mmol），DIPEA（286 mg，2.21mmol），室溫攪拌反應 30 分鐘，

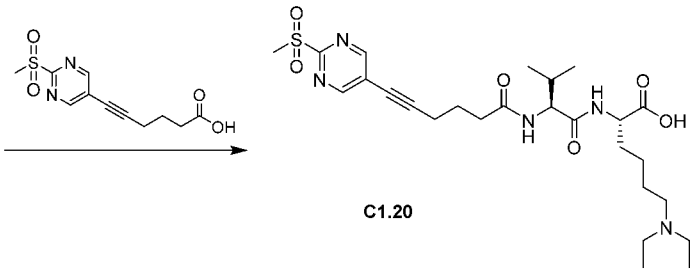
然後加入二肽 C1.16-D（243 mg，0.88 mmol），室溫攪拌反應 2 小時。LCMS 檢測反應完成，反應液通過 C18 柱分離純化（乙腈/0.01%FA 的水溶液：5%-50%）得到目標化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（300 mg，收率 57%）白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 595.5, t_R = 2.024 min。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.49 (s, 2H), 9.01 (s, 1H), 7.85 (br s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.48 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.17 – 4.15 (m, 1H), 4.02 (br s, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.42 (br s, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.18 – 2.14 (m, 2H), 1.99 – 1.96 (m, 1H), 1.88 (dd, *J* = 14.6, 7.1 Hz, 2H), 1.67 (br s, 1H), 1.59 – 1.53 (m, 2H), 1.43 (br s, 2H), 1.28 – 1.26 (m, 5H), 0.83 – 0.89 (m, 6H).

【0729】實施例C1.20：N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸





步驟一：將化合物 C1.16-B（5.0 g, 12.05 mmol）溶在二氯甲烷（100 mL）中，向反應液中加入乙醛（3.2 g, 72.3 mmol），室溫下攪拌反應 10 分鐘，再向反應液中加入三乙醯氧基硼氫化鈉（12.8 g, 60.25 mmol），反應在室溫

下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入氯化銨飽和水溶液攪拌一個小時，旋乾，過濾後濾液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.20-A (4.57 g, 收率82.0%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 436.4;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.70 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.38 – 7.26 (m, 5H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.00 (dd, *J* = 12.6, 6.5 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 14.0, 6.9 Hz, 4H), 2.64 – 2.54 (m, 2H), 2.05 – 1.94 (m, 1H), 1.72 – 1.52 (m, 2H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.18 (m, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.87 – 0.81 (m, 6H)。

步驟二：室溫下，將化合物 C1.20-A（1.6 g，3.68 mmol）溶於甲醇（80 mL）中，然後向反應液中加入 Pd/C（0.16 g），氫氣下室溫下攪拌反應 12 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.20-B（900 mg, 收率 82%)為米白色固體。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.04 (br s, 1H), 4.02 – 3.99 (m, 1H), 3.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 2.65 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.55 – 2.51 (m, 2H), 2.06 – 1.93 (m, 1H), 1.73 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.38 (m, 2H), 1.30 – 1.21 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

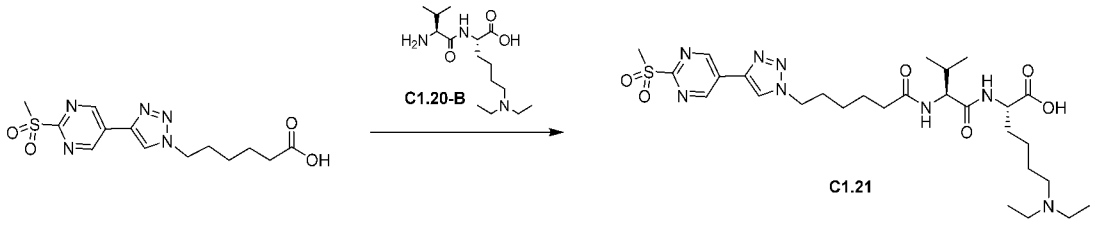
步驟三：將化合物 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg, 1 mmol)溶於 DMF（8 mL）中，依次加入 HATU（380 mg, 1 mmol）和三乙胺（322 mg, 2.5 mmol），室溫攪拌 20 分鐘後加入化合物 C1.20-B（301 mg, 1 mmol），室溫繼續攪拌 30 分鐘。LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經過 C18 柱

反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 (280 mg，收率 51%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 552.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 8.8, 6.8 Hz, 1H), 4.02 (dd, *J* = 12.8, 7.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.74 – 2.69 (m, 4H), 2.62 – 2.52 (m, 4H), 2.44 – 2.29 (m, 2H), 2.04 – 1.94 (m, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 2H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.33 – 1.23 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.87 – 0.82 (m, 6H)。

【0730】實施例C1.21：N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸

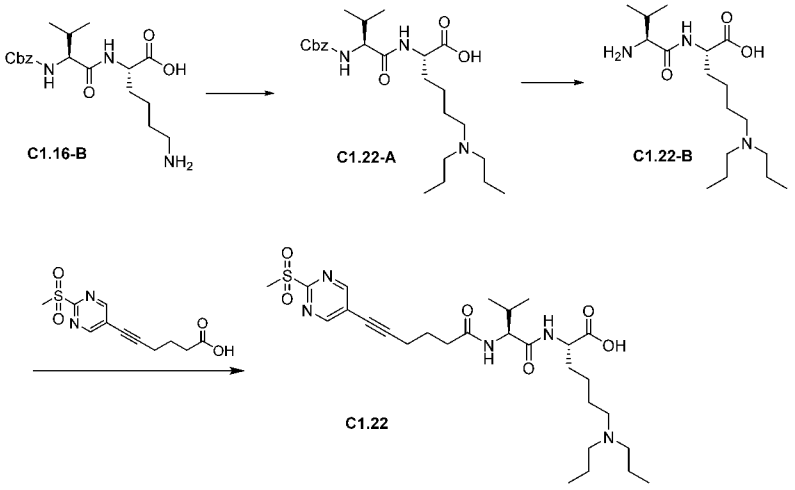


將化合物 6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (500 mg, 1.475 mmol)，溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (10 mL), 然後加入 HATU (560 mg, 1.475 mmol)，N,N-二異丙基乙胺 (476 mg, 3.688 mmol)，攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.20-B (444 mg，1.475 mmol)，反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經過 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 (330 mg，收率 34%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 623.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 9.04 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.14 (dd, *J* = 8.8, 6.6 Hz, 1H), 4.06 – 3.95 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.67 – 2.64 (m, 4H), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.21 – 2.10 (m, 2H), 2.02 – 1.94 (m, 1H), 1.92 – 1.84 (m, 2H), 1.72 – 1.63 (m, 1H), 1.72 – 1.63 (m, 3H), 1.59 – 1.54 (m, 2H), 1.32 – 1.21 (m, 4H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.81 (dd, *J* = 9.6, 6.8 Hz, 6H)。

【0731】實施例C1.22：N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：將化合物 C1.16-B（5.0 g，12 mmol）溶在二氯甲烷（100 mL）中，向反應液中加入正丙醛（4.2 g， 72.3 mmol），室溫下攪拌反應 10 分鐘，再向反應液中加入三乙醯氧基硼氫化鈉（12.8 g， 60.25 mmol），反應在室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入氯化銨飽和水溶液攪拌一個小時，旋乾，過濾後濾液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.22-A (4.57 g, 收率82.0%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 464.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.81 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 5H),

5.04 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 4.12 – 4.02 (m, 1H), 3.94 – 3.82 (m, 1H), 2.65 – 2.52 (m, 6H), 2.06 – 1.94 (m, 1H), 1.76 – 1.64 (m, 1H), 1.64 – 1.53 (m, 1H), 1.52 – 1.40 (m, 6H), 1.34 – 1.18 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 12H)。

步驟二：室溫下，將化合物 C1.22-A（2.0 g，4.32 mmol）溶於甲醇（80 mL）中，然後向反應液中加入 Pd/C（0.16 g），氫氣下室溫下攪拌反應 12 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.22-B（1.2 g, 收率 85.5%)為白色固體。

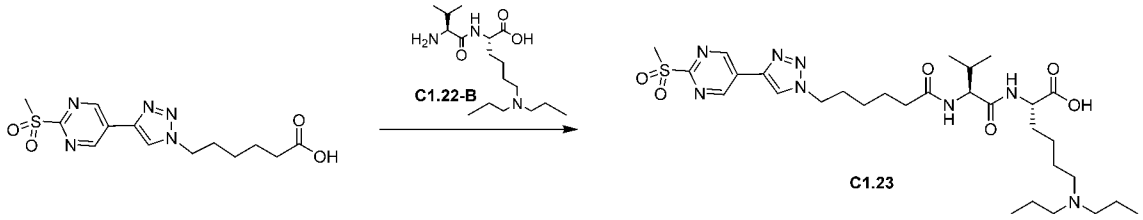
步驟三：將化合物 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (100 mg, 0.373 mmol)， 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (1 mL), 然後加入 HATU (142 mg, 0.373 mmol)，N,N-二異丙基乙胺 (120 mg, 0.93 mmol)，該體系攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.22-B (122 mg，0.371 mmol)，反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經過 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸(50 mg，收率 28%)為淡黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 580.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.24 (s, 2H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 4.24 – 4.16 (m, 1H), 4.10 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79 – 2.64 (m, 6H), 2.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.45 – 2.26 (m, 2H), 2.06 – 1.91 (m, 1H), 1.89 – 1.78 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 1H), 1.64 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.42 (m, 6H), 1.37 – 1.24 (m, 2H), 0.93 – 0.78 (m, 12H)。

【0732】實施例C1.23：N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-

1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸

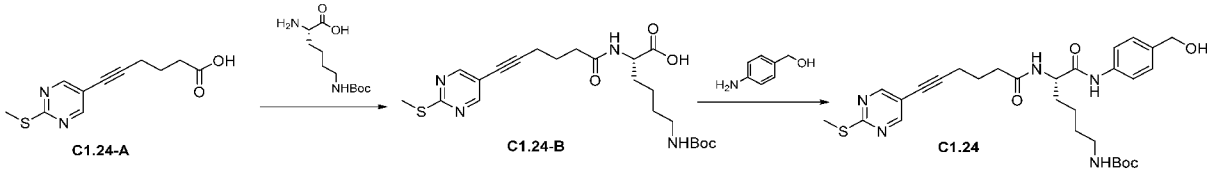


將化合物 6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (500 mg, 1.475 mmol)， 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (10 mL), 然後加入 HATU (560 mg, 1.475 mmol)， N,N-二異丙基乙胺 (476 mg, 3.688 mmol)，該體系攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.22-B (485 mg，1.475 mmol)，反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經過 C18 柱反相（乙腈和 0.05% 的甲酸水溶液體系）提純得到目標化合物 N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 (320 mg，收率 33%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 651.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 9.00 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.21 – 4.11 (m, 1H), 4.09 – 4.01 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.45 – 2.35 (m, 6H), 2.23 – 2.09 (m, 2H), 1.97 – 1.86 (m, 3H), 1.72 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.50 (m, 3H), 1.43 – 1.34 (m, 6H), 1.32 – 1.22 (m, 4H), 0.86 – 0.77 (m, 12H)。

【0733】實施例C1.24：(S)-(6-((4-(羥甲基)苯基)胺基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)-6-氧代己基)胺基甲酸第三丁酯



步驟一：將化合物 C1.24-A（3.70 g，15.7 mmol），二異丙基乙胺（11.0

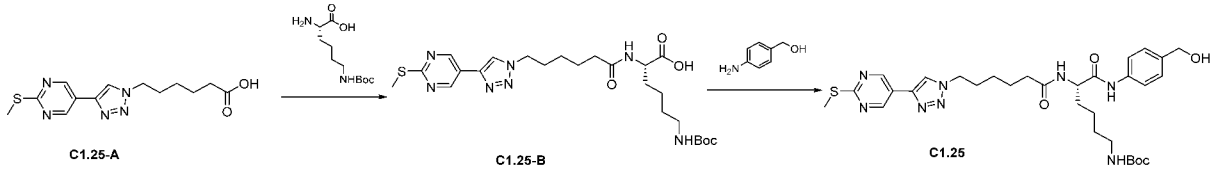
mL, 62.8 mmol）和 HBTU（8.90 g, 23.6 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（30 mL）中，反應在室溫下反應 30 分鐘。隨後加入化合物 Boc 保護的離胺酸（3.86 g，15.7 mmol），反應在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入檸檬酸水溶液（30 mL）調至 PH = 5，用二氯甲烷（50 mL X 3）萃取水溶液，合併有機相並用無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到目標化合物 C1.24-B（7.0 g, 粗品）為黃色油狀物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 465.1$, $t_R = 1.751$ min.

步驟二：將化合物 C1.24-B（7.00 g，5.60 mmol），二異丙基乙胺（10.7 mL, 60.4 mmol）和 HBTU（8.60 g, 22.7 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（100 mL）中，隨後加入對胺基苄醇（3.71 g，30.2 mmol），反應在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入乙酸乙酯（300 mL），用飽和食鹽水（100 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物 (S)-(6-((4-(羥甲基)苯基)胺基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)-6-氧代己基)胺基甲酸第三丁酯（6.00 g, 收率：69.9%）為黃色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 570.1$；

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.24 (s, 1H), 8.46 (s, 2H), 7.51 – 7.47 (m, 2H), 7.31 – 7.23 (m, 3H), 7.02 – 6.95 (m, 1H), 4.83 (br s, 1H), 4.63 – 4.60 (m, 2H), 3.19 – 2.96 (m, 4H), 2.57 (s, 3H), 2.52 – 2.48 (m, 2H), 2.47 – 2.41 (m, 2H), 1.99 – 1.92 (m, 2H), 1.87 – 1.77 (m, 2H), 1.76 – 1.63 (m, 2H), 1.43 (s, 9H)。

【0734】實施例C1.25： (S)-(6-((4-(羥甲基)苯基)胺基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)- 6-氧代己基)胺基甲酸第三丁酯



步驟一：將化合物 C1.25-A（1.60 g，5.21 mmol），二異丙基乙胺（2.68 mL, 20.8 mmol）和 HBTU（2.97 g, 7.82 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（30 mL），反應在室溫下反應 30 分鐘。隨後加入 Boc 保護的離胺酸（1.28 g，5.21 mmol），反應在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入檸檬酸水溶液（30 mL）調至 PH = 5，用二氯甲烷（50 mL X 3）萃取水溶液，合併有機相並用無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到目標化合物 C1.25-B（3.0 g, 粗品）為黃色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 536.0；

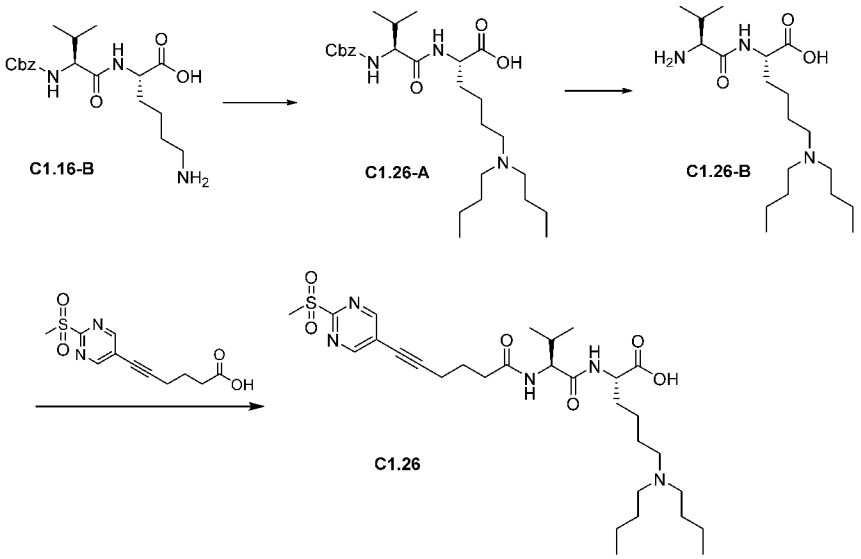
步驟二：將化合物 C1.25-B（3.00 g，5.60 mmol），二異丙基乙胺（2.89 g, 22.4 mmol）和 HBTU（3.19 g, 8.40 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（30 mL）。隨後加入對胺基苄醇（1.38 g，11.2 mmol），反應在室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入乙酸乙酯（200 mL），用飽和食鹽水（80 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經柱層析分離純化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目標化合物(S)-(6-((4-(羥甲基)苯基)胺基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)- 6-氧代己基)胺基甲酸第三丁酯（2.90 g）為黃色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 641.1；

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.13 (s, 1H), 8.95 (s, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.83 – 6.77 (m, 1H), 4.93 – 4.80 (m, 1H), 4.64 – 4.58 (m, 2H), 4.40 – 4.29 (m, 2H), 3.12 – 2.97 (m, 4H), 2.60 (s, 3H),

2.31 – 2.23 (m, 2H), 1.96 – 1.83 (m, 4H), 1.76 – 1.61 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 1.37 – 1.29 (m, 4H)。

【0735】實施例C1.26：N^6,N^6-二丁基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸



步驟一：將化合物 C1.16-B（10.0 g）溶在二氯甲烷（200 mL）溶液中，向反應液中加入正丁醛（10.4 g），室溫下攪拌反應 10 分鐘，再向反應液中分批次加入三乙醯氧基硼氫化鈉（25.6 g），反應在室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入氯化銨飽和水溶液攪拌一個小時，旋乾，過濾後濾液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.26-A (4.9 g)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 492.7；

^{1}H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.35 – 7.30 (m, 5H), 5.14 – 5.08 (m, 2H), 4.33 – 4.30 (m, 1H), 4.14 – 4.12 (m, 1H), 2.94 – 2.80 (m, 6H), 2.13 – 2.11 (m, 1H), 1.85 – 1.82 (m, 2H), 1.58 – 1.55 (m, 4H), 1.40 – 1.22 (m, 8H), 0.98 – 0.87 (m, 12H)。

步驟二：室溫下，將化合物 C1.26-A（5.0 g）溶於甲醇（100 mL）溶液中，

然後向反應液中加入 Pd/C（10%，1 g），氫氣下攪拌反應 12 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.26-B（3.68 g)為白色固體。

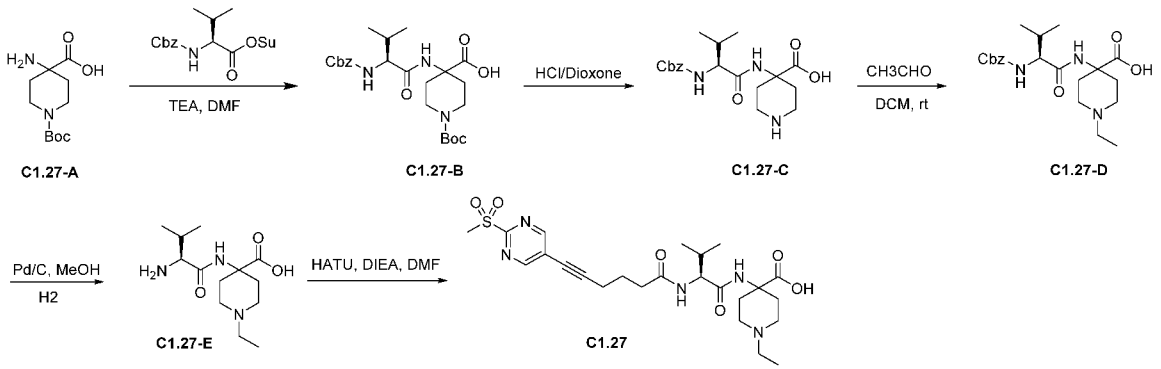
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 358.3。

步驟三：將化合物 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (1.0 g) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (15 mL), 然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 (1.2 g)，HATU (1.4 g)，反應攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.26-B (1.3 g)，反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，反應液，反應液直接經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N^6,N^6-二丁基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)- L-纈胺酸)-L-離胺酸（C1.26，500 mg）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 608.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.37 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.19 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.25 – 4.20 (m, 1H), 4.20 – 4.13 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.06 – 2.99 (m, 6H), 2.57 – 2.53 (m, 2H), 2.41 – 2.30 (m, 2H), 1.99 – 1.95 (m, 2H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.78 – 1.71 (m, 1H), 1.62 – 1.56 (m, 4H), 1.34 – 1.32 (m, 8H), 0.94 – 0.85 (m, 12H)。

【0736】實施例C1.27：(S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)哌啶-4-羧酸



步驟一：將化合物 C1.27-A（5.0 g，20.49 mmol）溶在 DMF（100 mL）中，向反應液中加入 N-（（苄氧基）羰基）-L-纈胺酸 2,5-二氧吡咯烷-N-羥基酯（7.13 g，20.49 mmol），100℃下攪拌反應 48 小時。LCMS 顯示反應完全。反應液用 C18 柱反向分離純化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.27-B (1.3 g, 收率 13.3%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M\text{-boc}]^+ = 378.2$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.38 – 7.33 (m, 5H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.14 – 5.02 (m, 2H), 3.97 – 3.87 (m, 1H), 3.70 – 3.59 (m, 2H), 3.08 – 2.95 (m, 2H), 2.04 – 1.97 (m, 1H), 1.95 – 1.87 (m, 2H), 1.76 – 1.69 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 0.91 – 0.84 (m, 6H)。

步驟二：室溫下，將化合物 C1.27-B（1.3 g，2.71 mmol）溶於乙酸乙酯中（10 mL）溶液中，然後向反應液中加入二氧六環-HCl（3N，10 mL），室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液減壓濃縮得到目標化合物 C1.27-C（1.06 g, 收率 94.4%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 378.4$。

步驟三：將化合物 C1.27-C（1.06 g，2.81mmol）溶在二氯甲烷（10 mL）中，向反應液中加入乙醛（0.75 g，16.87 mmol），室溫下攪拌反應 10 分鐘，再向反應液中發批次加入三乙醯氧基硼氫化鈉（3g，14.05 mmol），反應在

室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。向反應液中加入氯化銨飽和水溶液攪拌一個小時，減壓蒸餾除去二氯甲烷，剩餘水相經反相分離(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目標化合物 C1.27-D (1.13 g, 收率 99.23%)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 406.1$；

1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.42 – 7.25 (m, 5H), 5.22 – 5.06 (m, 2H), 3.91 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.52 – 3.36 (m, 2H), 3.25 – 2.93 (m, 4H), 2.66 – 2.54 (m, 1H), 2.47 – 2.36 (m, 1H), 2.27 – 2.14 (m, 2H), 2.13 – 2.06 (m, 1H), 1.35 – 1.29 (m, 4H), 0.98 – 0.90 (m, 6H)。

步驟四：室溫下，將化合物 C1.27-D（1.13 g，2.78 mmol）溶於甲醇（20 mL）溶液中，然後向反應液中加入 Pd/C（0.5 g），氫氣下攪拌反應 12 小時。LCMS 顯示反應完成。將反應液過濾，濾液減壓濃縮得到目標化合物 C1.27-E （0.58 g, 收率 76.18%)為白色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 272.4$。

步驟五：將化合物 6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (1 g, 3.73mmol)，溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (5 mL), 然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 (1.2 g, 9.32 mmol)，HATU (1.42 g, 3.73 mmol)，反應液攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 C1.27-E (1.01 g，3.73 mmol)，反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物(S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)哌啶-4-羧酸（C1.27，500 mg, 收率 28.7%）為黃色固體。

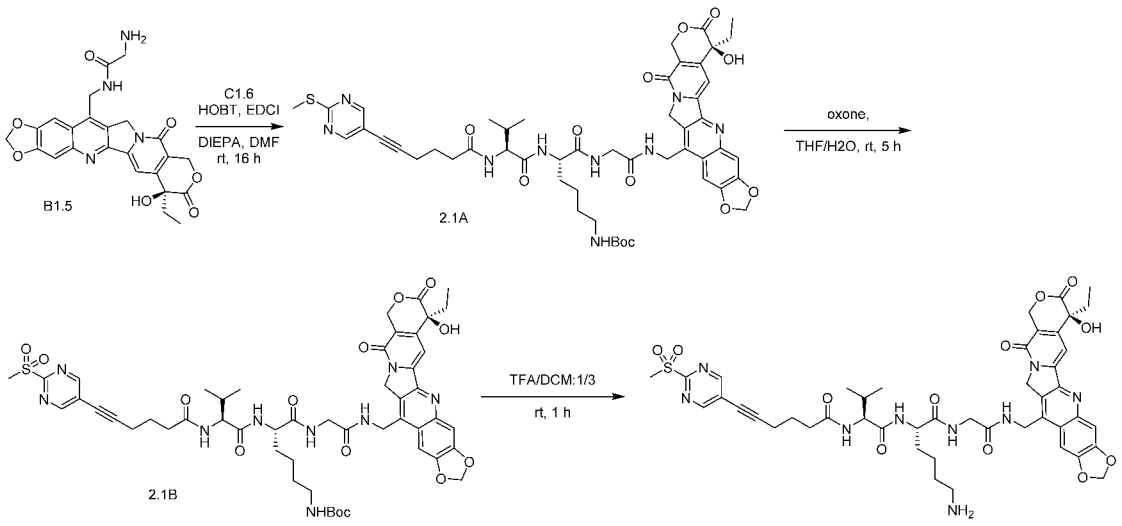
LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 522.5$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.12 (s, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz,

1H), 4.28 – 4.25 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.89 – 2.78 (m, 2H), 2.57 – 2.52 (m, 4H), 2.45 – 2.30 (m, 4H), 2.07 – 2.01 (m, 2H), 1.99 – 1.96 (m, 1H), 1.95 – 1.88 (m, 2H), 1.85 – 1.79 (m, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.88 – 0.83 (m, 6H)。

【0737】二、藥物-連接體化合物合成

【0738】實施例2.1：N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 （DL-001）



步驟一：將化合物 C1.6 (50 mg, 0.10 mol), 化合物 B1.5 (71 mg， 0.12 mol)，N,N-二異丙基乙胺 (39 mg, 0.30 mol) 溶於 DMF (5 mL)。然後依次加入 1-羥基苯並三唑(16 mg, 0.12 mmol)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(23 mg, 0.12 mmol), 上述反應液室溫攪拌 16 小時，加入 50mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品，粗產品用快矽膠柱層析分離純化(DCM : MeOH = 100 : 0 到 90 : 10)得到目標化合物 2.1A， (62 mg，黃色固體，收率 58%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1024.8。

步驟二：將化合物 2.1A (40 mg, 0.04 mmol)溶於四氫呋喃和水的混合溶液（體積比為 1/1；4 mL）中，加入過氧單磺酸鉀(246 mg, 0.4 mmol)，反應液在室溫下攪拌 5 小時，加入 30mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到目標化合物 2.1B (30 mg，黃色固體,收率 74%)。

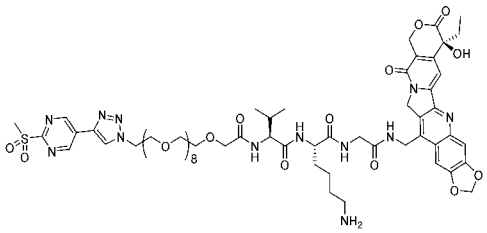
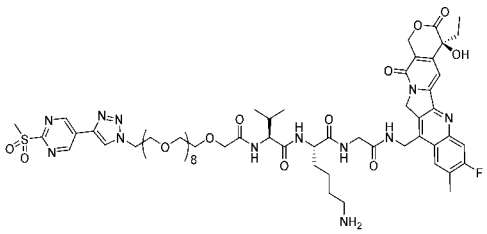
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1055.9。

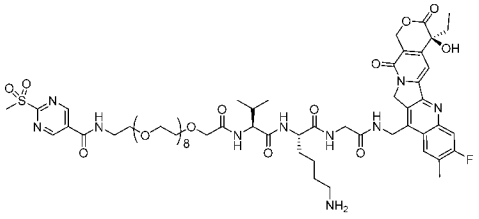
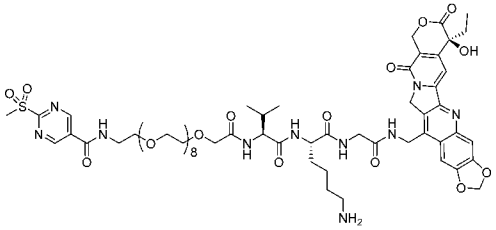
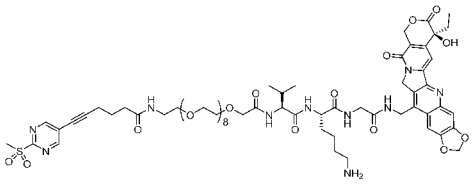
步驟三：將化合物 2.1B (30 mg, 0.03 mmol) 溶於三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(體積比為 1：3；4 mL)中, 反應液在室溫下攪拌 1 小時。然後減壓濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜(0.01% TFAin water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (9 mg, 白色固體，收率 33%)。

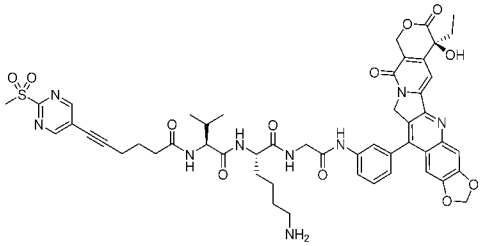
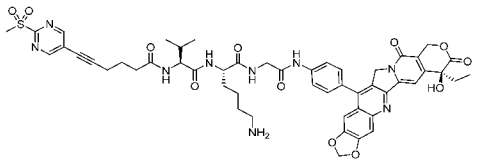
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：955.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.09 (s, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.15 (m, 2H), 7.84 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.64 (br s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.30 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 5.59 – 5.46 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.87 – 4.78 (m, 1H), 4.70 – 4.60 (m, 1H), 4.17 – 4.03 (m, 2H), 3.82 – 3.58 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.80 – 2.70 (m, 2H), 2.40 – 2.22 (m, 2H), 1.93 – 1.68 (m, 6H), 1.65 – 1.57 (m, 1H), 1.56 – 1.45 (m, 3H), 1.36 – 1.22 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H)。

用實施例 2.1 相同的方法和反應條件，用所示的不同起始原料，得到下表中實施例 2.2 到實施例 2.8 所示的目標產物。

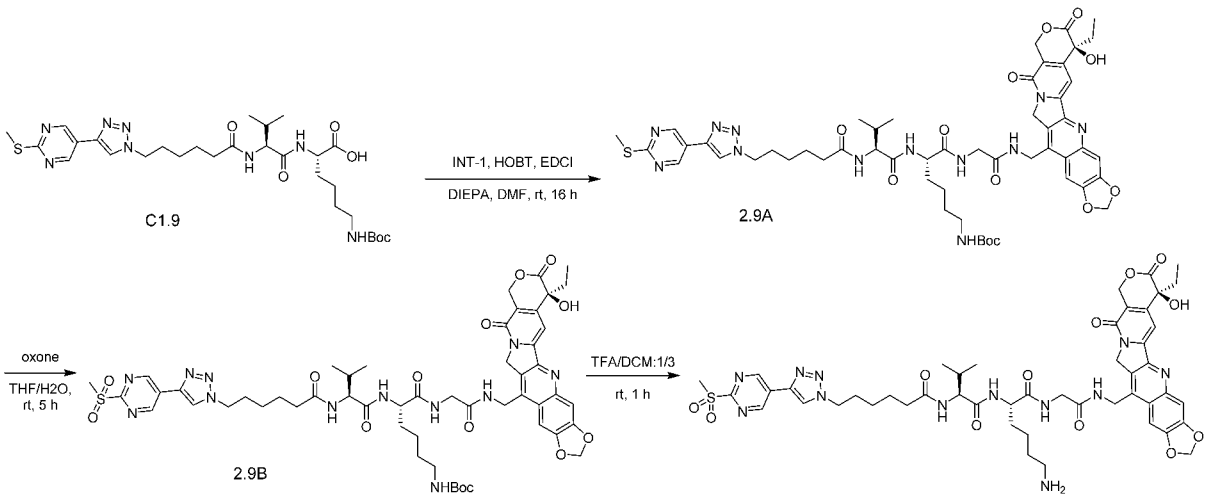
實施例	化合物	名稱	(m/z): $[M+H]^+$
實施例 2.2	 DL-002 原料：C1.2，B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代-己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代-丁-2-基)-29-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜二十九烷醯胺	1366.9
實施例 2.3	 DL-003 原料：C1.2，B1.4	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-己)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜二十九烷醯胺	1354.9

實施例 2.4	 DL-004 原料：C1.1，B1.4	N-((7S,10S)-7-(4-胺基丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-10-異丙基-3,6,9,12-四氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧雜-2,5,8,11-四氮雜四十烷-40-基)-2-(甲磺醯基)嘧啶-5-甲醯胺	1330.9
實施例 2.5	 DL-005 原料：C1.1，B1.5	N-((7S,10S)-7-(4-胺基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)- 10-異丙基-3,6,9,12-四氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧雜-2,5,8,11-四氮雜四十烷-40-基)-2-(甲磺醯基)嘧啶-5-甲醯胺	1342.8
實施例 2.6	 DL-006 原料：C1.5，B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(6-(2-(甲	1408.5

		磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜二十九烷醯胺	
實施例2.7	 DL-007 原料：C1.7，B1.8	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-己)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔-醯胺	1017.9
實施例2.8	 DL-008 原料：C1.7，B1.9	N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((4-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺	1017.8

【0739】實施例2.9：(S)-6-胺基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-

7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-009）



步驟一： 將化合物 B1.5 (30 mg), 化合物 C1.9 (48 mg)， N,N-二異丙基乙胺 (23 mg) 溶於 DMF (5 mL)。向上述溶液中加入 1-羥基苯並三唑(9 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(13 mg) ，反應室溫攪拌 16 小時，加入 50mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品，粗產品用快速色譜法分離純化(DCM : MeOH = 100 : 0 to 90 : 10)得到目標化合物 2.9A (35 mg，淡黃色固體，收率 43%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1095.8

步驟二：將化合物 2.9A (35 mg)溶於四氫呋喃和水的混合溶液（體積比為 1/1；4 mL）中，加入過氧單磺酸鉀(184 mg)，反應液室溫下攪拌 5 小時，加入 30mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到目標化合物 2.9B (25 mg，淡黃色固體，收率 71%)。

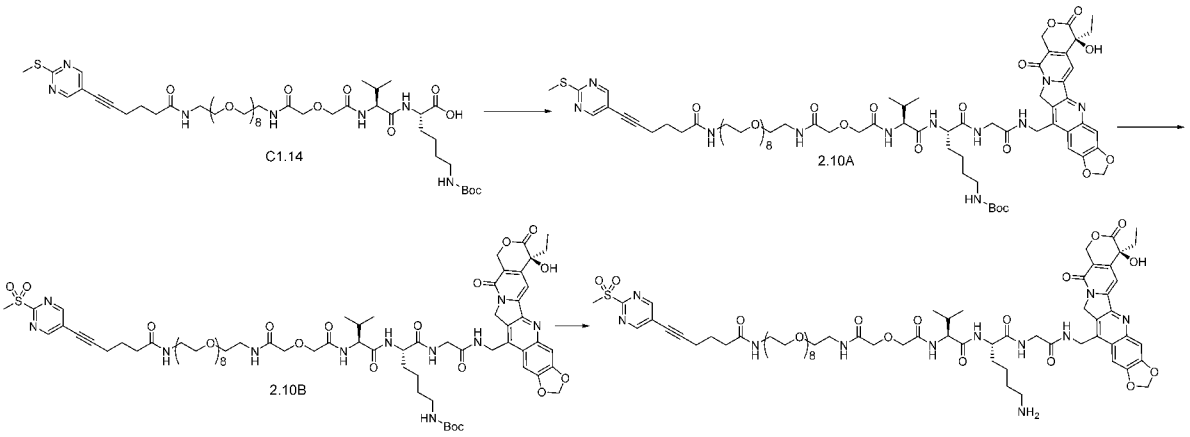
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1126.9。

步驟三：將化合物 2.9B (25 mg) 溶於三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(體積比為 1：3；4 mL)中, 反應液在室溫下攪拌 1 小時。液濃縮得粗產品，經 prep-HPLC (0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 (S)-6-胺基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺三氟乙酸鹽 (5.1 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1026.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.11 – 8.10 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73 – 7.72 (m, 1H), 7.63 (s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.29 (m, 2H), 5.61 – 5.46 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.85 – 4.83 (m, 1H), 4.63 – 4.60 (m 1H), 4.44 (s, 2H), 4.06 – 4.03 (m, 3H), 2.75 (s, 2H), 2.12 – 2.10 (m, 2H), 1.89 – 1.85 (m, 6H), 1.56 – 1.53 (m, 8H), 1.24 (br s, 4H), 0.87 – 0.84 (m, 3H), 0.77 (d, J = 6.1 Hz, 6H).

【0740】實施例2.10：N-((7S,10S)-7-(4-胺基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-10-異丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧雜-2,5,8,11,17-五氮雜四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-010）



步驟一：將化合物 C1.14（112 mg）溶在 N,N-二甲基甲醯胺（2 mL）中，依次加入三乙胺（32 mg，0.31 mmol），1-羥基苯並三唑(17 mg，0.13 mmol)，1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽 (24 mg，0.13 mmol)，攪拌 20 分鐘，然後將化合物 B1.5 (50 mg) 加入於反應液中，反應液在 40°C 下攪拌過夜。向反應液中加入 10 mL 水，二氯甲烷萃取，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，旋乾得到粗品。粗產品用 C18 柱反相分離純化（乙腈/0.01%FA 的水溶液： 0%-55%）得到白色固體目標化合物 2.10A（75 mg，收率 46%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1534.0。

步驟二：將化合物 2.10A（75 mg）溶在四氫呋喃和水（8mL，1:1）溶液中，加入過氧單磺酸鉀（211 mg）室溫攪拌反應 10 小時。向反應液中加入 10 mL 二氯甲烷，萃取，分液，無水硫酸鈉乾燥，抽濾旋乾得到目標產物 2.10B（50 mg，收率 65%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1566.2。

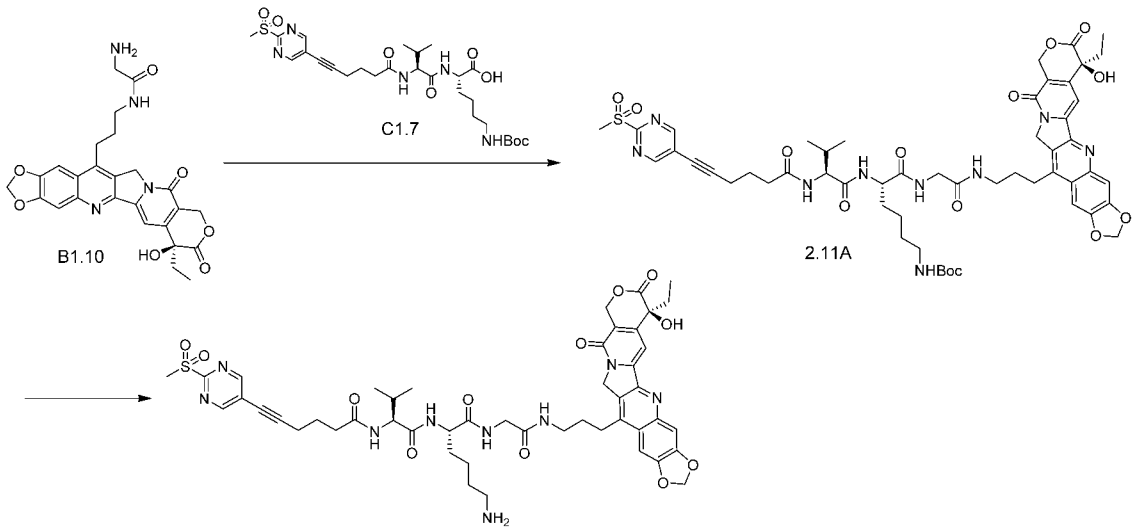
步驟三：將化合物 2.10B（50 mg）溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（體積比為 1：2：4 mL）中，然後反應液在室溫下攪拌 1 小時。將反應液濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜（0.01% TFAin water，MeCN）得到目標化

合物 N-((7S,10S)-7-(4-胺基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-10-異丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧雜-2,5,8,11,17-五氮雜四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (10.5 mg，收率 21%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1466.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12 (s, 2H), 8.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.26 – 8.11 (m, 2H), 8.03 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.93 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.61 (s, 3H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.31 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 5.46 (d, *J* = 17.2 Hz, 4H), 4.76 (dt, *J* = 14.8, 8.7 Hz, 2H), 4.20 – 4.15 (m, 4H), 4.00 (s, 3H), 3.95 (d, *J* = 5.5 Hz, 3H), 3.72 – 3.67 (m, 2H), 3.50 (d, *J* = 3.9 Hz, 30H), 3.41 (s, 3H), 3.25 – 3.19 (m, 4H), 2.76 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.90 (dd, *J* = 16.1, 7.4 Hz, 2H), 1.84 – 1.78 (m, 2H), 1.63 (s, 1H), 1.53 – 1.48 (m, 2H), 1.30 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 0.87 – 0.84 (m, 4H), 0.78 – 0.75 (m, 6H)。

【0741】實施例2.11：N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-011）



步驟一：向化合物 B1.10（75 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 C1.7（107 mg），三乙胺（45 mg），HOBT（25 mg）和 EDCI（35 mg），在 35 ℃下反應 4 小時。向反應液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物 2.11A（60 mg ，收率：37%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1084；

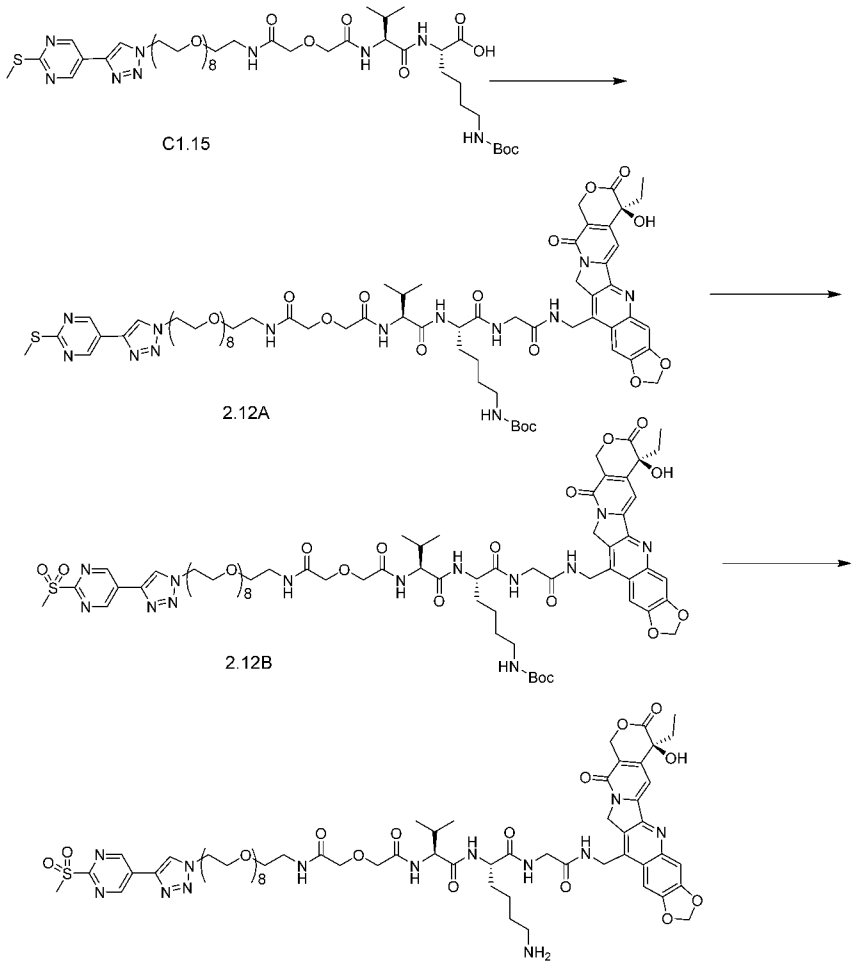
步驟二：向化合物 2.11A（60 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（體積比為 1：2：4 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液濃縮，粗品經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（9 mg，收率 18%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：983.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.08 (s, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.19

(d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.25 – 4.07 (m, 2H), 3.74 – 3.70 (m, 3H), 3.25 (d, *J* = 12.4 Hz, 3H), 3.08 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.73 (s, 2H), 2.40 – 2.19 (m, 3H), 2.01 – 1.64 (m, 10H), 1.52 (br s, 4H), 1.34 (br s, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.83 – 0.75 (m, 6H)。

【0742】實施例2.12：(S)-6-胺基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3] 二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-異丙基-35-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧雜-3,9-二氮雜三十五醯胺)己醯胺（DL-012）



步驟一：將化合物 C1.15（80 mg），化合物 B1.5（37 mg），三乙胺 (23 mg，

0.231 mo,) 溶於 DMF (5 mL)。然後再加入 1-羥基苯並三唑(12 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(17 mg)，反應液室溫攪拌 16 小時，加入 50mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品，粗產品用快速色譜法分離純化(DCM :MeOH = 100 : 0 到 90 : 10)得到目標化合物 2.12A (75 mg，收率 65%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1492.0。

步驟二：將化合物 2.12A (50 mg)溶於四氫呋喃和水的混合溶液（體積比為 1/1；4 mL）中，加入過氧單磺酸鉀(202 mg)，反應液在室溫下攪拌 5 小時，加入 30mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到目標化合物 2.12B (40 mg，收率 80%)。

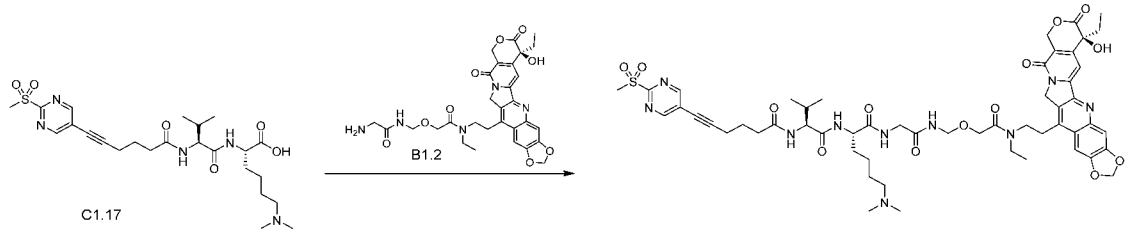
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1524.1。

步驟三：將化合物 2.12B (30 mg)溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(體積比為 1 比 3；4 mL)中,然後反應液在室溫下攪拌 1 小時。將反應液濃縮得粗產品，粗產品經 prep-HPLC(水含 0.01% 三氟乙酸, 乙腈)純化得到目標化合物(S)-6-胺基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-異丙基-35-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧雜-3,9-二氮雜三十五醯胺)己醯胺 (9 mg, 收率 30%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1423.9。

【0743】實施例2.13：N-((13S,16S)-13-(4-(二甲基胺基)丁基)-3-乙基-1-((S)-

7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-013）



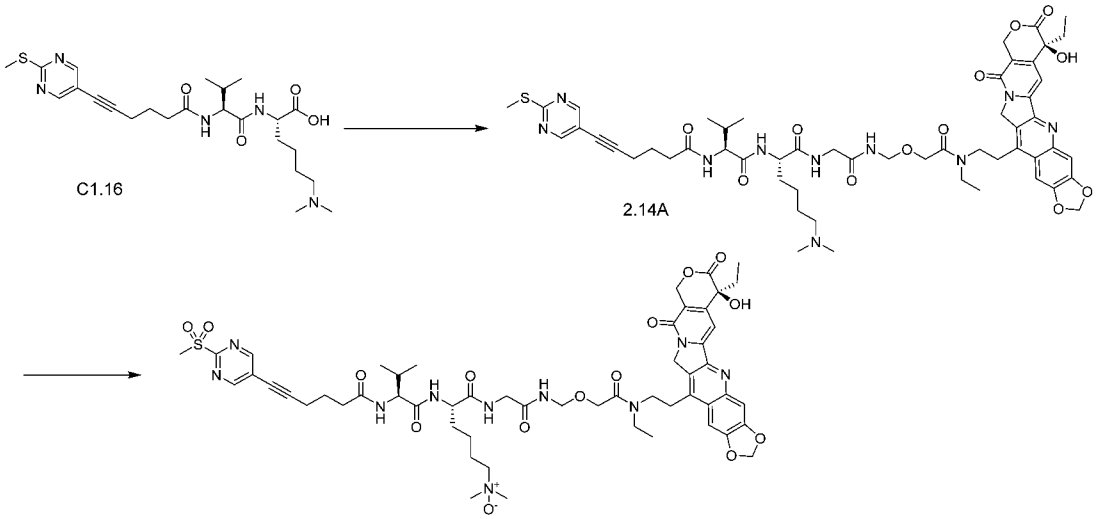
將化合物 C1.17 (50 mg), 化合物 B1.2 (58 mg)，三乙胺 (24 mg) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL)。然後依次加入 1-羥基苯並三唑(16 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(22 mg)，反應液室溫攪拌 16 小時。反應液直接經製備色譜(0.01% 甲酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物（21 mg, 收率 10%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1113.0；

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.93 (s, 2H), 8.40 – 8.33 (m, 1H), 8.30 – 8.25 (m, 1H), 8.25 – 8.21 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.22 (s, 2H), 5.47 (dd, *J* = 78.6, 16.4 Hz, 2H), 5.28 – 5.13 (m, 2H), 4.73 – 4.59 (m, 2H), 4.30 – 4.05 (m, 4H), 3.94 – 3.82 (m, 2H), 3.70 – 3.57 (m, 2H), 3.54 – 3.44 (m, 1H), 3.34 (s, 6H), 3.16 – 3.08 (m, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.58 – 2.40 (m, 4H), 2.04 – 1.83 (m, 6H), 1.80 – 1.68 (m, 3H), 1.54 – 1.36 (m, 2H), 1.24 – 1.15 (m, 3H), 1.03 – 0.86 (m, 9H)。

【0744】實施例2.14： N-((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基胺基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環

戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-014）



步驟一：將化合物 C1.16 (49 mg), 化合物 B1.2 (71 mg)， N,N-二異丙基乙胺 (39 mg) 溶於 DMF (5 mL)。然後依次加入 1-羥基苯並三唑(16 mg)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(23 mg), 加完後反應液室溫攪拌 16 小時，加入 50mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品，粗產品用快矽膠柱層析分離純化(DCM：MeOH = 100：0 到 90：10)得到目標化合物 2.14A (61 mg，收率 60%)。

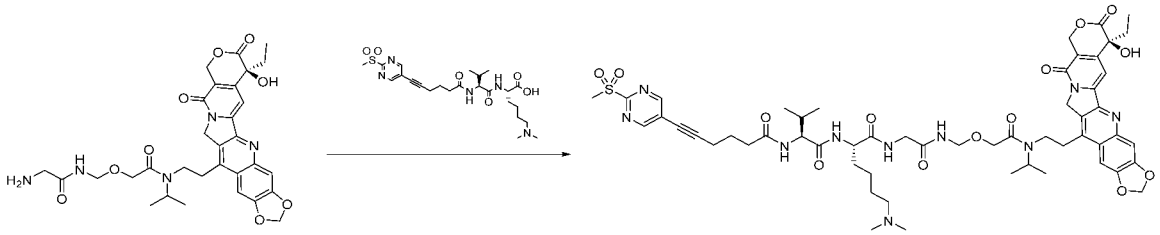
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1081.6；

步驟二：將化合物 2.14A (40 mg)溶於四氫呋喃和水的混合溶液（體積比為 1/1；4 mL）中，加入過氧單磺酸鉀(227 mg, 0.37 mmol)，反應液在室溫下攪拌 5 小時，LCMS 顯示反應完畢, 加入 30mL 乙酸乙酯稀釋，有機相用水洗滌三次（25mL x 3），無水硫酸鈉乾燥，濃縮除去乙酸乙酯得到粗品化合物 ，粗產品經製備色譜(0.01% 甲酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-

((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基胺基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (9 mg, 收率 33%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1129.0。

【0745】實施例 2.15： N-((13S,16S)-13-(4-(N,N-二甲基胺基)丁基)-3-異丙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-015）



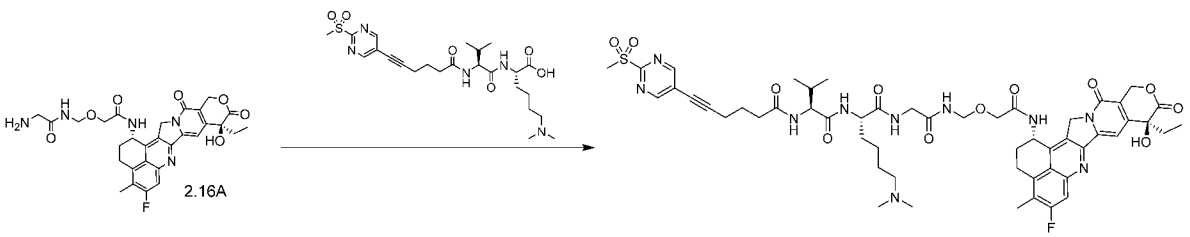
向化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（42 mg，C1.17）和化合物(S)-2-((2-胺基乙醯胺基)甲氧基)-N-異丙基-N-(2-(7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙醯胺（50 mg，B1.11)，的 N,N-二甲基甲醯胺（10 mL）溶液中，依次加入 HBTU（31 mg）和二異丙基乙胺（21 mg)。反應在室溫下攪拌 2 小時。反應液過濾後經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%三氟乙酸）得到目標化合物 N-((13S,16S)-13-(4-(N,N-二甲基胺基)丁基)-3-異丙基-1-((S)-7-乙基-7-

羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧雜-3,8,11,14-四氮雜十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（15.2 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1127.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.73 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.23 – 8.17 (m, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.97 – 7.93 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.33 – 4.21 (m, 4H), 4.20 – 4.13 (m, 2H), 3.76 – 3.74 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.40 – 3.38 (m, 1H), 3.30 – 3.21 (m, 2H), 3.04 – 2.95 (m, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.39 – 2.31 (m, 2H), 2.00 – 1.74 (m, 6H), 1.68 – 1.49 (m, 4H), 1.37 – 1.27 (m, 2H), 1.23 – 1.16 (m, 6H), 0.89 – 0.82 (m, 9H)。

【0746】實施例 2.16： N-((10S,13S)-10-(4-(N,N-二甲基胺基)丁基)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯並[de] 吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-1-基)胺基)-14-甲基-1,6,9,12-四氧代-3-氧雜-5,8,11-三氮雜十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-016）



將化合物 N6，N6-二甲基-N2-((6-（2-（甲磺醯基）嘧啶-5-基）十六烷基-5-炔醯基）-L-丙醯基）-L-離胺酸 (C1.17，52.3 mg) 溶於 N, N-二甲基甲醯

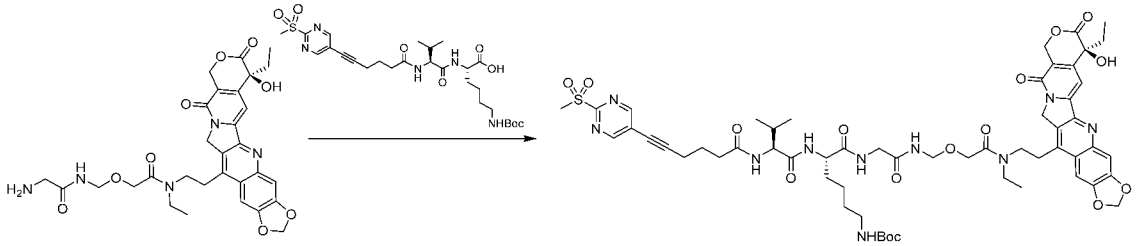
胺 (2 mL)，然後再依次加入 HBTU（38 mg, 0.10 mmol）和 N,N-二異丙基乙胺（26 mg, 0.20 mmol），加完後反應液室溫攪拌 30 分鐘，然後加入化合物 2-胺基-N-((2-(((1S，9S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氫-1H，12H-苯並[de]吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-1-基）胺基）-2-氧代乙氧基）甲基）乙醯胺 (2.16A，根據 CN104755494A 中第 147-148 頁報導的相同方法製備的，63 mg), LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜(0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((10S,13S)-10-(4-(N,N-二甲基胺基)丁基)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯並[de] 吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-1-基)胺基)-14-甲基-1,6,9,12-四氧代-3-氧雜-5,8,11-三氮雜十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（8.1 mg, 收率 7%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1085.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.31 (s, 1H), 9.11 (s, 2H), 8.72 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.63 – 5.54 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.68 – 4.58 (m, 2H), 4.26 – 4.12 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.73 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.20 – 3.10 (m, 2H), 3.05 – 2.95 (m, 2H), 2.76 (d, *J* = 4.7 Hz, 6H), 2.55 – 2.53 (m, 2H), 2.42 – 2.28 (m, 6H), 2.21 – 2.13 (m, 2H), 2.02 – 1.77 (m, 6H), 1.76 – 1.62 (m, 2H), 1.62 – 1.51 (m, 3H), 1.37 – 1.21 (m, 2H), 0.90 – 0.80 (m, 9H)。

【0747】實施例 2.17： 第三丁基 ((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二

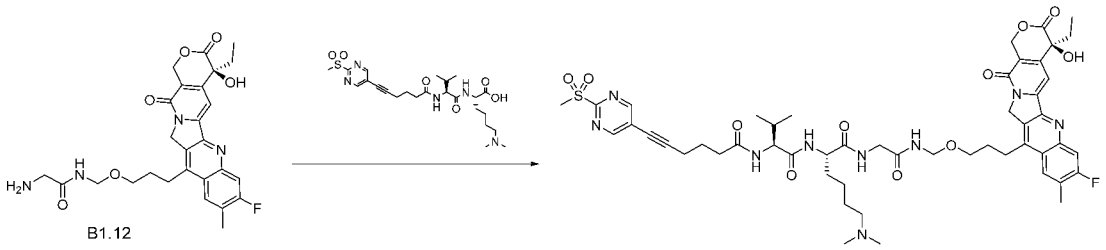
氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)-4,9,12-三氧代-6-氧雜-3,8,11-三氮雜十七烷-17-基)胺基甲酸酯（DL-017）



將化合物 C1.7（90.0 mg），二異丙基乙胺（68.0 mg）和 HATU（100 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（5 mL）中。隨後加入化合物 B1.2（80 mg），室溫下反應 2 小時。LCMS 檢測反應完全。向反應液中加入乙酸乙酯（50 mL），用飽和食鹽水（30 mL X 3）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，濾液減壓濃縮成固體，粗產品經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黃色固體化合物第三丁基 ((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)-4,9,12-三氧代-6-氧雜-3,8,11-三氮雜十七烷-17-基)胺基甲酸酯（2.06 mg，收率 10.6%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1184.9。

【0748】實施例2.18： N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-018）



B1.12

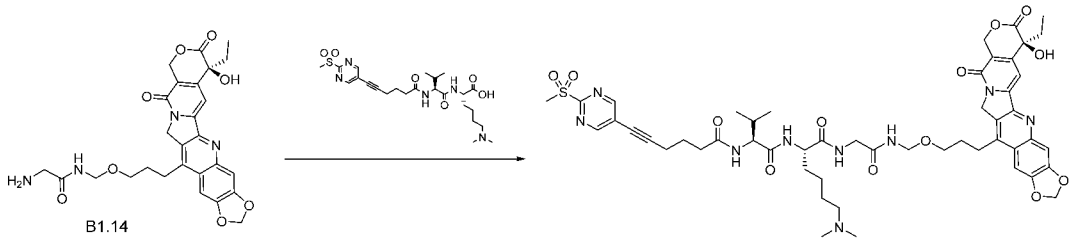
將化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸（126 mg）（C1.17），B1.12（150 mg），1-羥基苯並三唑（49 mg）， 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽（69 mg）和二異丙基乙胺（156 mg, 1.21 mmol）溶在 N,N-二甲基甲醯胺（10 mL）溶液中，反應在 40 °C 下攪拌 12 小時。LCMS 顯示反應完成。反應液過濾經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黃色固體化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-018）（12 mg，收率 6.0%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1030.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.62 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.23 – 8.13 (m, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.95 – 7.83 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.64 – 4.53 (m, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.19 – 4.11 (m, 1H), 3.76 – 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.23 – 3.19 (m, 2H), 2.67 – 2.62 (m, 2H), 2.57 – 2.54 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.42 – 2.26 (m, 3H), 2.02 – 1.77 (m, 6H), 1.68 – 1.66 (m, 1H), 1.58 – 1.45 (m, 3H), 1.36 – 1.25 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H)。

【0749】實施例2.19： N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-

7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-019）



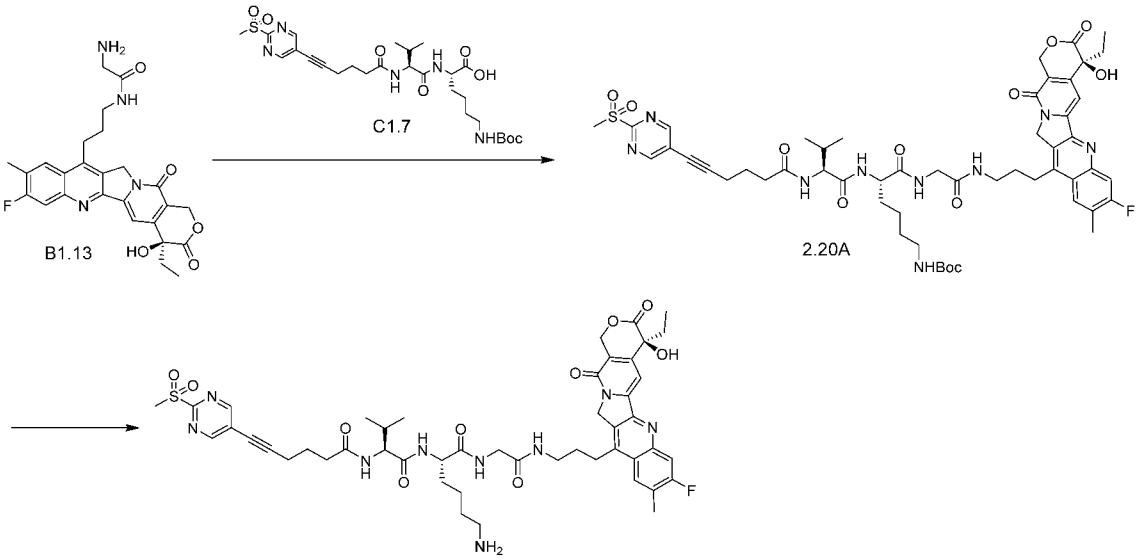
將化合物 B1.14 (100 mg, 0.186 mmol), 化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯基)-L-纈胺酸)-L-離胺酸 (100 mg， 0.191 mmol) 溶於 DMF (2 mL)。然後再加入 1-羥基苯並三唑(38 mg, 0.280 mmol)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(53 mg, 0.280 mmol), 然後再加入三乙胺 (56 mg, 0.559mmol) 加完後反應液室溫攪拌 16 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (20 mg, 收率 10%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1042.5;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.28 (s, 1H, TFA), 9.10 (s, 2H), 8.64 (br s, 1H), 8.19 (br s, 1H), 8.09 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.67 – 4.52 (m, 2H), 4.30 – 4.10 (m, 2H), 3.74 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.17 – 3.07 (m, 2H), 3.04 – 2.91 (m, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.46 – 2.24

(m, 3H), 2.04 – 1.66 (m, 9H), 1.63 – 1.46 (m, 3H), 1.32 – 1.29 (m, 2H), 0.87 – 0.82 (m, 9H)。

【0750】實施例2.20：N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-020）



步驟一：向化合物 B1.13（75 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 C1.7（107 mg），三乙胺（45 mg），HOBT（25 mg）和 EDCI（35 mg），在 35 ℃下反應 4 小時。向反應液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物 2.20A（76 mg）。

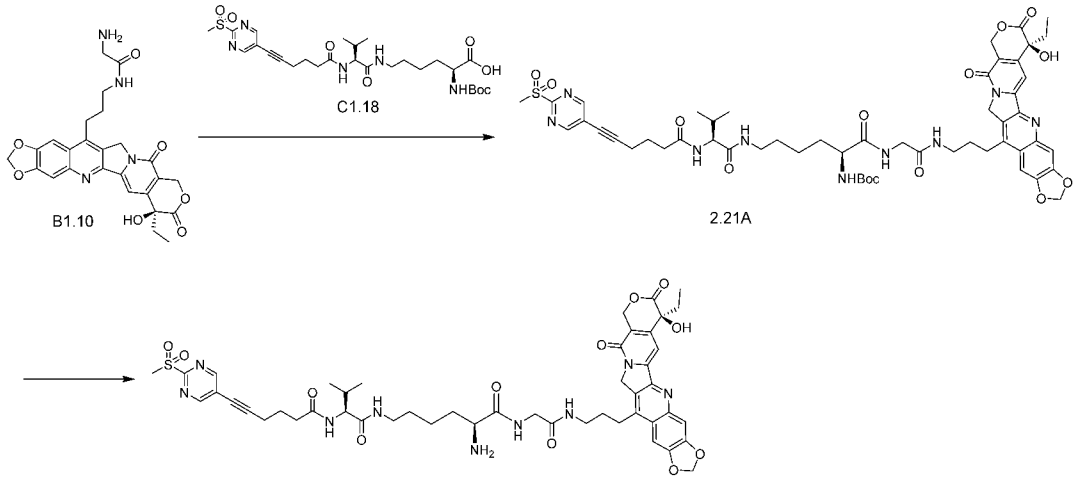
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1072.5；

步驟二：向化合物 2.20A（60 mg， 0.06 mmol）的二氯甲烷溶液（2 mL）中，加入三氟乙酸（1 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。將反應液濃縮，經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目

標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（43 mg，收率 80%）為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ ：972.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.09 (s, 2H), 8.24 – 8.17 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.99 – 7.93 (m, 1H), 7.88 – 7.84 (m, 2H), 7.64 (s, 3H, NH2-TFA), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.25 – 4.18 (m, 1H), 4.15 – 4.11 (m, 1H), 3.76 – 3.71 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.32 – 3.26 (m, 2H), 3.21 – 3.17 (m, 1H), 2.79 – 2.70 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.40 – 2.24 (m, 3H), 1.94 – 1.82 (m, 7H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.58 – 1.49 (m, 3H), 1.36 – 1.31 (m, 1H), 1.18 – 1.14 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.80 – 0.76 (m, 6H)。

【0751】實施例2.21：N-((S)-1-(((S)-5-胺基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-6-氧代己基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺



步驟一：將化合物 C1.18（430 mg）溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (5 mL)中，然

後加入 EDCI（160 mg），HOBT (115 mg)和三乙胺 （214 mg）。加完畢後反應液室溫攪拌 20 分鐘，然後加入化合物 B1.10（314 mg），室溫攪拌反應 3 小時，LCMS 檢測反應完全，加水稀釋，乙酸乙酯萃取，有機相濃縮的粗品 2.21A（350 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1084.3；

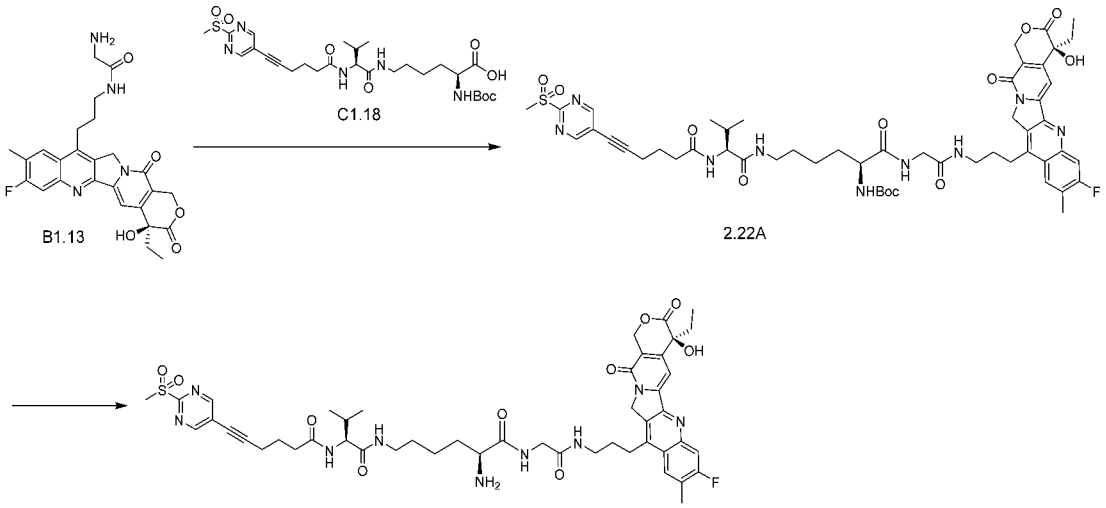
步驟二：向化合物 2.21A（350 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（體積比為 1：2：4 mL），在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應液濃縮，粗品經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-5-胺基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-6-氧代己基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（100 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：984.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.69 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.14 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.08 (s, 3H, NH2-TFA), 7.95 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.09 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.83 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.33 – 3.27 (m, 2H), 3.15 – 3.06 (m, 3H), 2.97 – 2.94 (m, 1H), 2.57 – 2.53 (m, 2H), 2.43 – 2.28 (m, 3H), 1.95 – 1.68 (m, 9H), 1.46 – 1.28 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H)。

【0752】實施例2.22：N-((S)-1-(((S)-5-胺基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]

喹啉-11-基) 丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-6-氧代己基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 DL-022）



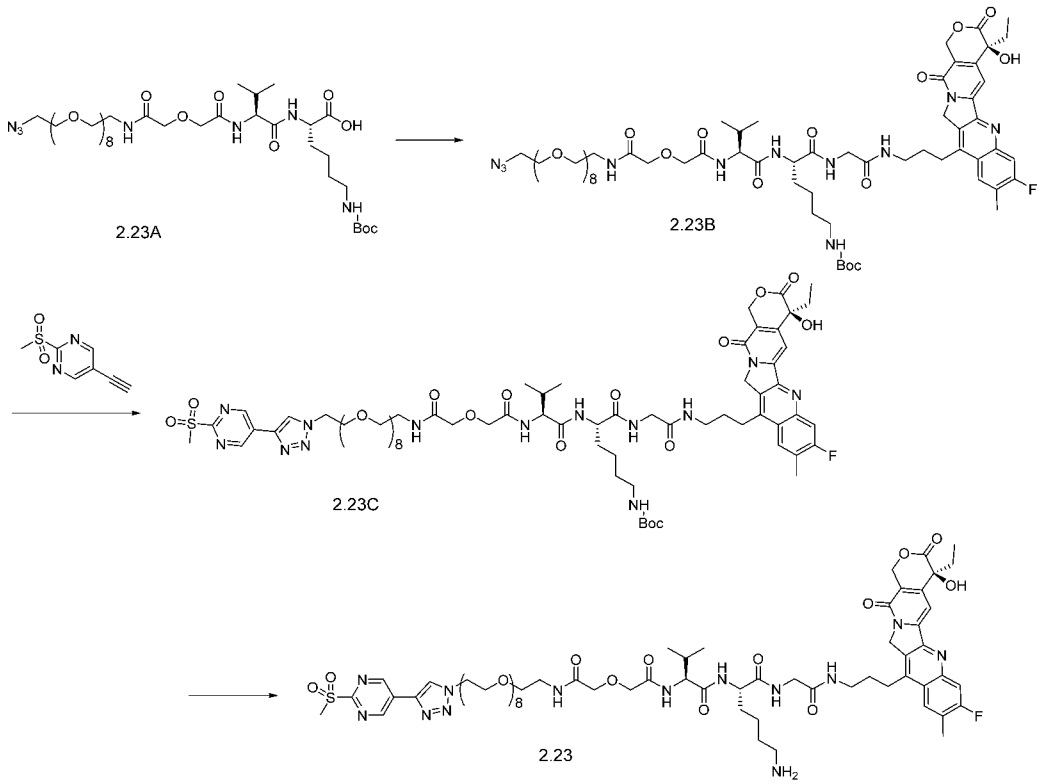
步驟一：將化合物 C1.18（136 mg，0.23 mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (5 mL)中，然後加入 EDCI（48 mg，0.25 mmol），HOBT (34 mg, 0.25 mmol) 和三乙胺 （64 mg, 0.63 mmol）。加完畢後反應液室溫攪拌 20 分鐘，然後加入化合物 B1.13（3105 mg，0.19 mmol），室溫攪拌反應 3 小時，LCMS 檢測反應完全，加水稀釋，乙酸乙酯萃取，有機相濃縮的粗品。所得化合物溶於二氯甲烷（4 mL）中， 然後加入三氟乙酸 （2 mL），反應 1 小時後，濃縮，粗品經製備提純得目標化合物 N-((S)-1-(((S)-5-胺基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基) 丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-6-氧代己基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-022）（88 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 972.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.72 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.17 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.11 (s, 3H, NH2-TFA), 7.97 (t, *J* = 5.6

Hz, 1H), 7.93 – 7.86 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.14 – 4.02 (m, 2H), 3.85 – 3.83 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.32 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.24 – 3.16 (m, 2H), 3.11 – 2.94 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.35 – 2.30 (m, 3H), 1.92 – 1.69 (m, 10H), 1.43 – 1.29 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H)。

【0753】實施例2.23：(S)-6-胺基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-異丙基-35-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧雜-3,9-二氮雜三十五烷醯胺基)己醯胺（DL-023）



步驟一：向化合物 B1.13（46 mg）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 2.23A（100 mg），三乙胺（50 ul），HOBT（16 mg）和 EDCI（23 mg），在 35 ℃下反應 4 小時。向反應液中加入水（30 mL），乙

酸乙酯（30 mL×2）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到目標化合物 2.23B（105 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1358.4；

步驟二：化合物 2.23B （105 mg），2-甲磺醯基-5-乙炔基嘧啶（45 mg）溶於 DMSO-水（2 ml，4:1）中，向混合物中加入溴化亞銅（50mg）。反應液室溫下攪拌 2 小時，然後加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），乾燥後減壓除去有機溶劑，粗產物用矽膠柱層析分離得到目標產物 2.23C（84m mg），MS (*m/z*): 1540.8 $[M + H]^+$；

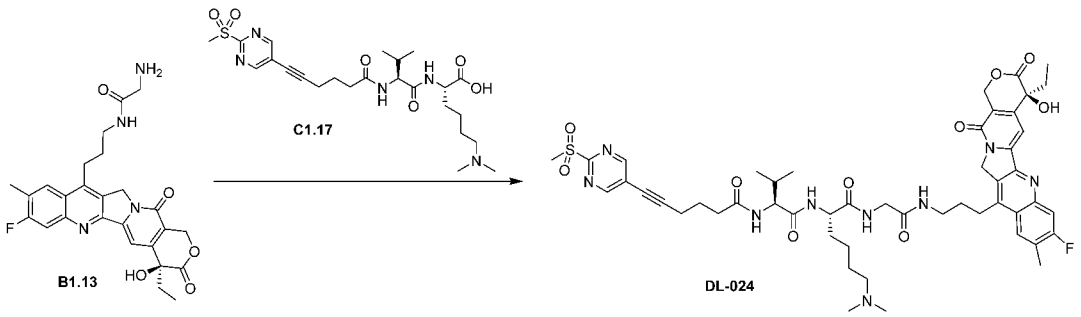
步驟三：將化合物 2.23C 溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（體積比為 1：2：4 mL）中，然後反應液在室溫下攪拌 30 分鐘。LCMS 顯示反應完成。將反應液濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜（0.01% TFA in water, MeCN）得到目標化合物(S)-6-胺基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基) 丙基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-異丙基-35-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧雜-3,9-二氮雜三十五烷醯胺基)己醯胺（DL-023, 8 mg，三氟乙酸鹽，收率 5%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1440.8;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.49 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.24 – 8.18 (m, 3H), 8.01 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 2H), 7.63 (s, 3H, TFA salt), 7.32 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.66 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 4.21 (dd, *J* = 15.2, 7.9 Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.75 – 3.72 (m, 2H), 3.56 – 3.54 (m, 2H), 3.54 – 3.38 (m, 30H), 3.33 – 3.13

(m, 5H), 2.75 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.02 – 1.94 (m, 1H), 1.91 – 1.81 (m, 3H), 1.71 – 1.65 (m, 1H), 1.58 – 1.46 (m, 3H), 1.38 – 1.29 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.81 – 0.75 (m, 6H)。

【0754】實施例 2.24：N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基) 胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己-2-基) 胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-024）



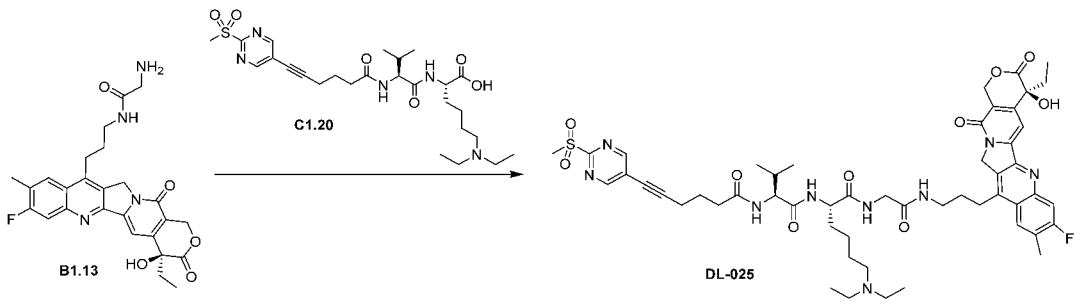
向化合物 B1.13（40 mg，0.081 mmol）和化合物 C1.17（42 mg，0.081mmol）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（2 mL）溶解中依次加入 PyBOP（41 mg，0.081），DIPEA（20 mg，0.16 mmol），反應液在室溫下攪拌 2 小時。LCMS 顯示反應完全。反應液經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%三氟乙酸的水溶液）得到化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基) 胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己-2-基) 胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（11.54 mg，收率 14%）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1000.6;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.42 (s, 1H), 9.08 (s, 2H), 8.27 – 8.18 (m,

2H), 8.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.91 – 7.77 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.15 – 4.12 (m, 1H), 3.81 – 3.65 (m, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.33 – 3.25 (m, 2H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 3.03 – 2.95 (m, 2H), 2.77 – 2.71 (m, 6H), 2.38 – 2.23 (m, 3H), 1.92 – 1.81 (m, 7H), 1.78 – 1.73 (m, 2H), 1.62 – 1.56 (m, 3H), 1.38 – 1.29 (m, 2H), 0.92 – 0.84 (m, 3H), 0.84 – 0.72 (m, 6H)。

【0755】實施例2.25：N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基) 胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己-2-基) 胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-025）

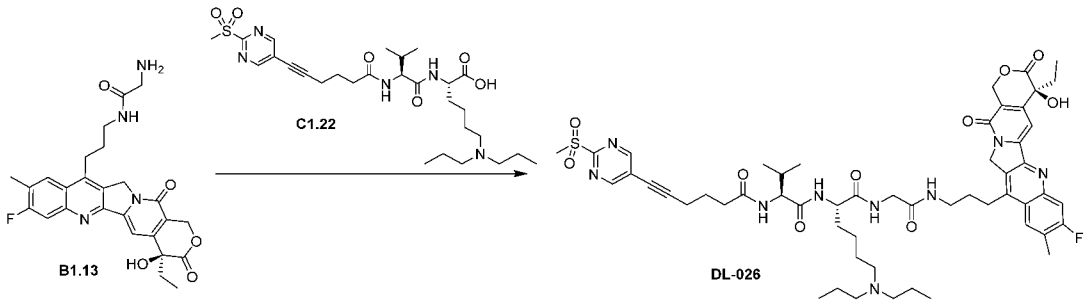


將化合物 C1.20 (30 mg, 0.054 mmol), 化合物 B1.13 (27 mg，0.054 mmol) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL)。然後再依次加入 HBTU（22 mg, 0.054 mmol）以及 N,N-二異丙基乙胺（17 mg, 0.135 mmol，加完畢後反應液室溫攪拌 30 分鐘。LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜(0.01%三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基) 胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己-2-基) 胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（23 mg, 收率 42%）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.08 (s, 2H), 9.02 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.13 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.97 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 10.6 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.28 – 4.18 (m, 1H), 4.14 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.80 – 3.65 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.31 – 3.24 (m, 2H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 3.12 – 3.06 (m, 4H), 3.02 – 2.91 (m, 2H), 2.36 – 2.23 (m, 2H), 1.95 – 1.68 (m, 9H), 1.68 – 1.49 (m, 4H), 1.38 – 1.28 (m, 2H), 1.13 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H),0.79 – 0.76 (m, 6H)。

【0756】實施例 2.26：N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-026）



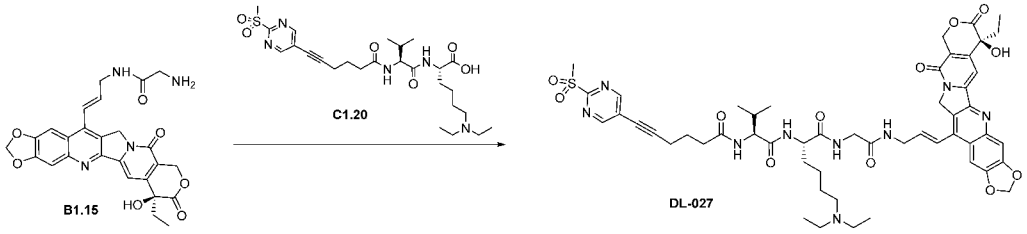
將化合物 C1.22（31 mg, 0.054 mmol, 化合物 B1.13 (27 mg，0.054 mmol) 溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL)。然後再依次加入 HBTU（22 mg, 0.054 mmol）以及 N,N-二異丙基乙胺（17 mg, 0.135 mmol，反應液室溫攪拌 30 分鐘。LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基胺基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)胺基)-2-氧代乙基) 胺基)-1-氧代己

-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（25 mg, 收率 45%）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1056.6；

H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.09 (s, 2H), 8.27 – 8.19 (m, 2H), 8.13 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.97 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.13 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.73 (dd, *J* = 14.7, 5.9 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.28 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.99 (br, 6H), 2.33 – 2.27 (m, 2H), 1.95 – 1.70 (m, 9H), 1.62 – 1.57 (m, 8H), 1.33 – 1.30 (m, 2H), 0.96 – 0.82 (m, 9H), 0.82 – 0.73 (m, 6H)。

【0757】實施例 2.27：N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基胺基)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基) 胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺



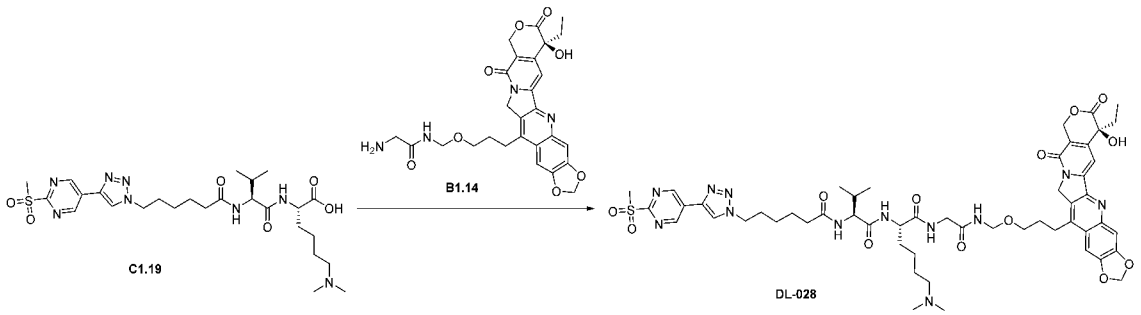
向化合物 B1.15（40 mg，0.074 mmol）和化合物 C1.20（40 mg，0.072 mmol）的 N,N-二甲基甲醯胺溶液（4 mL）溶解中依次加入 HBTU (30 mg，0.079 mmol)、DIPEA（26 mg，0.2 mmol）。反應液室溫下反應 1 小時。LCMS 顯示反應完全。反應液經高效液相製備純化（乙腈/ 0.05%三氟乙酸水溶液）得到化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基胺基)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-乙基

-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)胺基)-2-氧代乙基)胺基)-1-氧代己-2-基)胺基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（11.1 mg，收率 14%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1038.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 9.02 (s, 1H, TFA), 8.33 – 8.25 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.52 – 6.50 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.28 – 5.24 (m, 2H), 4.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.12 (br s, 2H), 3.81 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.11 – 3.07 (m, 6H), 2.97 (br s, 2H), 2.53 – 2.50 (m, 1H), 2.39 – 2.24 (m, 4H), 1.85 – 1.79 (m, 8H), 1.16 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H)。

【0758】實施例 2.28：(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺



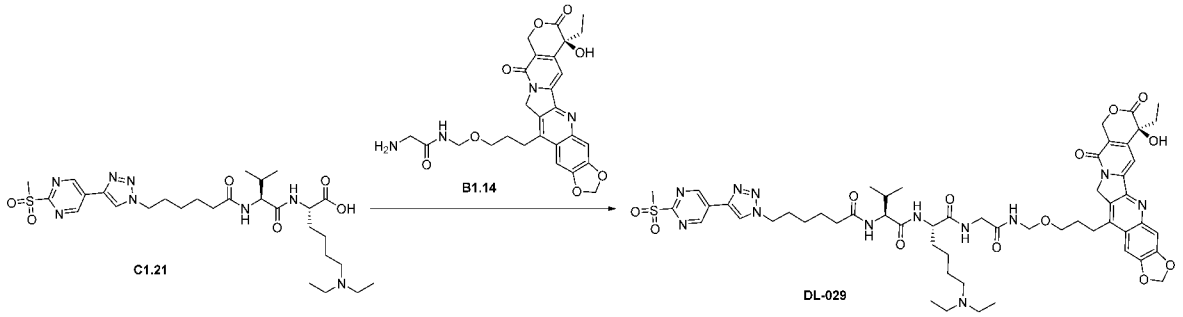
將化合物 C1.19 （40mg，0.06mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（1.5 mL），

依次加入 HBTU（26 mg，0.06 mmol）、B1.14（36 mg，0.06mmol）和 DIPEA（66 mg，0.17 mmol，室溫攪拌反應 1 小時。LCMS 檢測反應完成，反應液通過製備（乙腈/ 0.05%三氟乙酸水溶液）分離純化得到目標化合物 (S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吐喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（13.88 mg，TFA salt 收率 16%）為米黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1113.7；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.46 (s, 2H), 9.29 (s, 1H, TFA salt), 8.92 (s, 1H), 8.63 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.18 (br s, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.15 – 4.09 (m, 1H), 3.76 – 3.71 (m, 4H), 3.53 – 3.48 (m, 4H), 3.44 (s, 3H), 3.10 – 3.08 (m, 2H), 2.97 – 2.95 (m, 2H), 2.75 (d, *J* = 4.9 Hz, 6H), 2.20 – 2.09 (m, 2H), 1.92 – 1.83 (m, 5H), 1.68 – 1.65 (m, 1H), 1.63 – 1.50 (m, 5H), 0.90 – 0.74 (m, 9H)。

【0759】實施例 2.29：(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吐喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

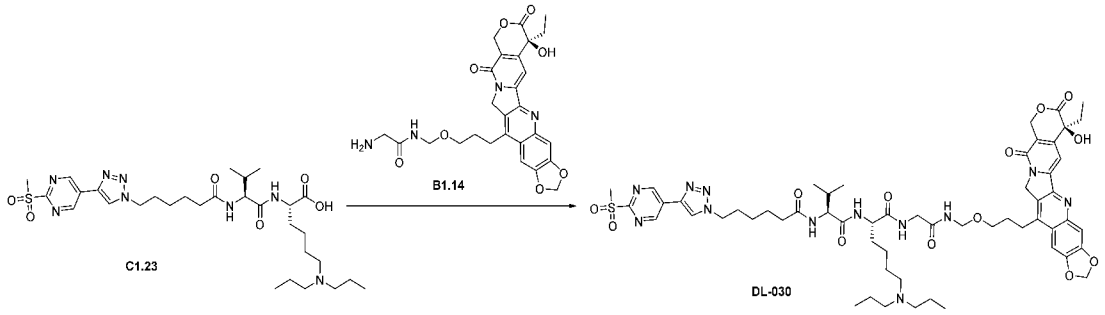


將化合物 C1.21 (58 mg, 0.09 mmol), 化合物 B1.14 (50 mg, 0.09 mmol)溶於 DMF (1 mL),然後再加入 HBTU (35 mg, 0.09 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺(30 mg, 0.23 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFAin water, MeCN)純化得到目標化合物(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (14 mg, 收率 13%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1141.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.98 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.62 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.27 – 4.23 (m, 1H), 4.11 – 4.09 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.13 – 3.06 (m, 6H), 3.01 – 2.93 (m, 2H), 2.22 – 2.07 (m, 2H), 1.91 – 1.83 (m, 6H), 1.70– 1.51 (m, 5H), 1.33 – 1.21 (m, 6H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 – 0.76 (m, 6H)。

【0760】實施例 2.30：(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺



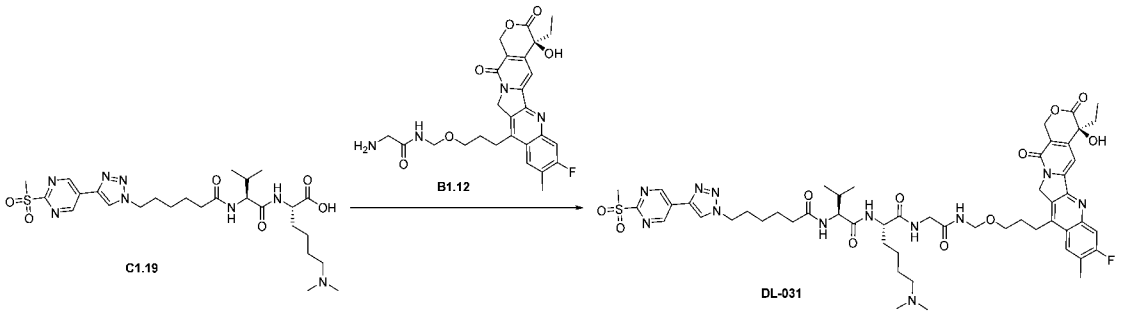
將化合物 C1.23 (61 mg, 0.09 mmol), 化合物 B1.14 (50 mg, 0.09 mmol)溶於 DMF (1 mL),然後再加入 HBTU (35 mg, 0.09 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺(30 mg, 0.23 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(21 mg, 收率 19%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1169.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 9.01 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (s,

2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.60 – 4.58 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.24 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.13 – 4.09 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.10 (br s, 2H), 3.02 – 2.95 (m, 6H), 2.19 – 2.15 (m, 2H), 1.88 – 1.86 (m, 6H), 1.71 – 1.69 (m, 1H), 1.61 – 1.56 (m, 8H), 1.28 – 1.26 (m, 6H), 0.88 – 0.83 (m, 9H), 0.81 – 0.78 (m, 6H)。

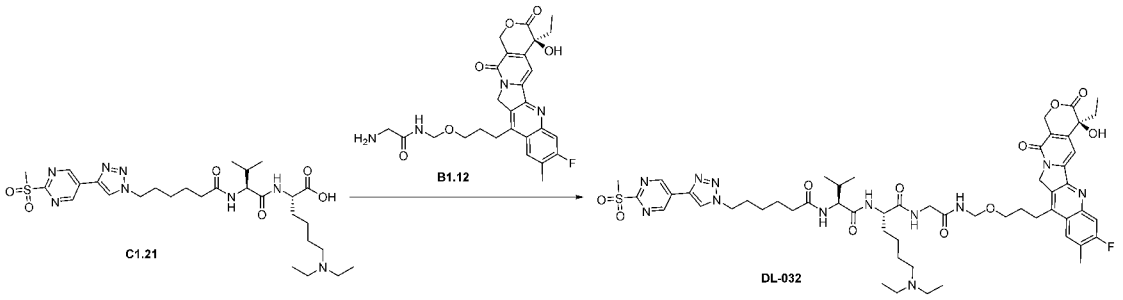
【0761】實施例 2.31：(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺



將化合物 C1.19 (113 mg, 0.19 mmol), 化合物 B1.12 (100 mg, 0.19 mmol)溶於 DMF (1 mL), 然後加入 HBTU (72 mg, 0.19 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺(61 mg, 0.48 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA 的水溶液，乙腈)純化得到目標化合物(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (16 mg, 收率 8%)為白色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1101.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.63 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.20 – 8.28 (m, 2H), 8.04 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 – 4.54 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.29 – 4.19 (m, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.24 – 3.14 (m, 2H), 3.01 – 2.91 (m, 2H), 2.72 (s, 6H), 2.53 (s, 3H), 2.23 – 2.07 (m, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 6H), 1.72 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.45 (m, 6H), 1.34 – 1.22 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 – 0.76 (m, 6H)。

【0762】實施例 2.32：(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

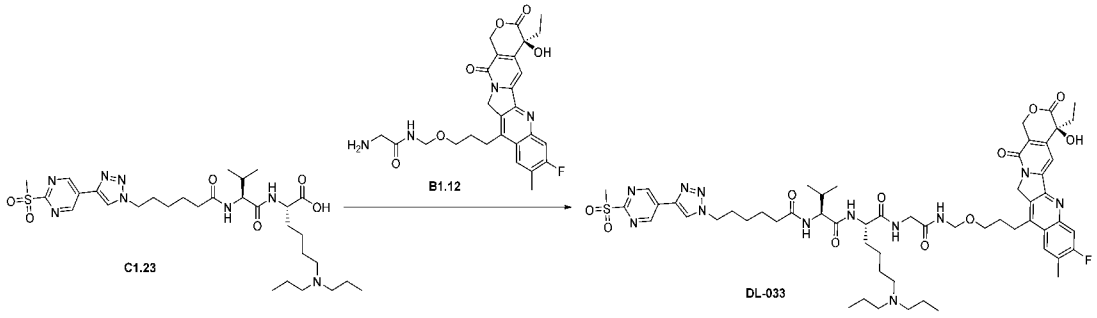


將化合物 C1.21 (59 mg, 0.10 mmol), 化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol)，溶於 DMF (1 mL), 然後再加入 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺 (31 mg, 0.24 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% 甲酸溶液, 乙腈)純化得到目標化合物(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-

1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (33.8 mg, 收率 32%)為白色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1129.7；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.24 – 8.15 (m, 2H), 8.00 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.63 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.23 – 4.18 (m, 1H), 4.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.77 – 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.17 – 3.15 (m, 3H), 2.61 (q, *J* = 6.7 Hz, 4H), 2.22 – 2.10 (m, 2H), 1.92 – 1.84 (m, 6H), 1.68 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.57 – 1.48 (m, 3H), 1.39 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.30 – 1.22 (m, 4H), 0.97 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 – 0.77 (m, 6H)。

【0763】實施例 2.33：(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

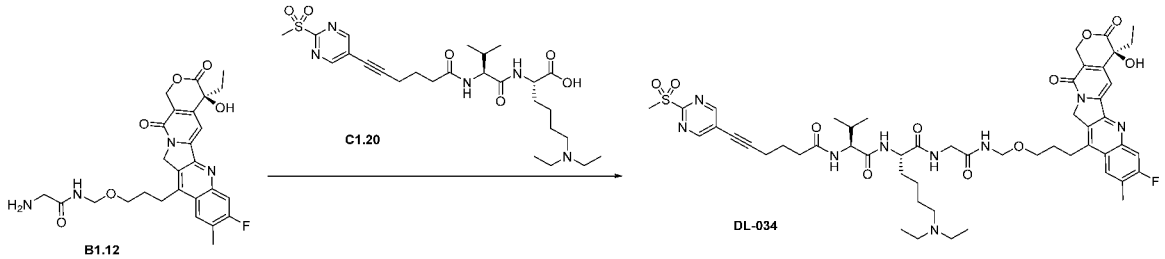


將化合物 C1.23 (62 mg, 0.10 mmol), 化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol)溶於 DMF (1 mL), 然後加入 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺(31 mg, 0.24 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜 (0.01% TFAin water, MeCN) 純化得到目標化合物(S)-

6-(二丙基胺基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (35.2 mg, 收率 32%)為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1157.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.62 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.24 (m, 1H), 4.13 – 4.07 (m, 1H), 3.74 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.23 – 3.16 (m, 2H), 3.01 – 2.95 (m, 6H), 2.50 (s, 3H), 2.22 – 2.09 (m, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 8H), 1.67 – 1.56 (m, 9H), 1.33 – 1.23 (m, 6H), 0.91 – 0.86 (m, 9H), 0.82 – 0.77 (m, 6H)。

【0764】實施例 2.34：N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-034）



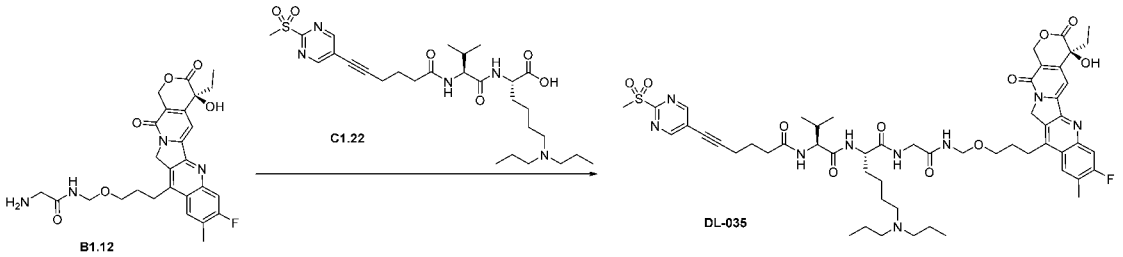
將化合物（S）-2-胺基-N-((3-（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）丙氧基）

甲基）乙醯胺（B1.12，30 mg, 0.057 mmol), N6，N6-二乙基-N2-((6-（2-（甲磺醯基）嘧啶-5-基）十六烷基-5-炔醯基）-L-丙醯基）-L-離胺酸(C1.20，31 mg， 0.057 mmol)溶於 DMF（1 mL）中。然後依次加入 HBTU（22 mg, 0.057 mmol）以及 N,N-二異丙基乙胺（18 mg, 0.143 mmol），加完畢後反應液室溫攪拌一小時。 LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% 的三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物三氟乙酸鹽 N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (3.18 mg, 收率 5%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1058.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.65 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.21 - 8.19 (m, 2H), 8.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.64 – 4.56 (m, 2H), 4.29 – 4.22 (m, 1H), 4.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.74 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.51 – 3.49 (m, 2H), 3.24 – 3.18 (m, 2H), 3.13 – 3.07 (m, 4H), 3.01 – 2.95 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.40 – 2.31 (m, 3H), 1.99 – 1.74 (m, 8H), 1.65 – 1.49 (m, 4H), 1.38 – 1.25 (m, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.89 - 0.79 (m, 9H)。

【0765】實施例 2.35：N-((11S,14S)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-035）



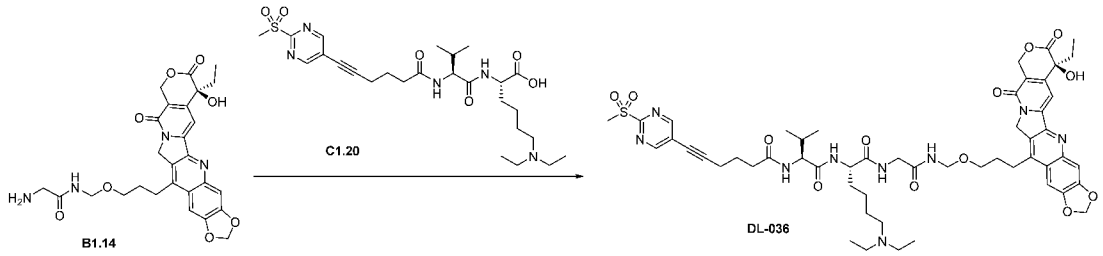
將化合物（S）-2-氨基-N-((3-（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3'，4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）丙氧基）甲基）乙醯胺（B1.12，30 mg, 0.057 mmol), N2-((6-（2-（甲磺醯基）嘧啶-5-基）己-5-炔醯基）-L-丙醯基）-N6，N6-二丙基-L-離胺酸（C1.22，33 mg， 0.057 mmol)溶於 DMF（1 mL）中。然後再依次加入 HBTU（22 mg, 0.057 mmol）以及 N,N-二異丙基乙胺（18 mg, 0.143 mmol），加完畢後反應液室溫攪拌一小時。 LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% 的三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-035）(10. 65 mg, 收率 16%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1086.7；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.65 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.28 – 8.16 (m, 2H), 8.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 – 4.52 (m, 2H), 4.31 – 4.19 (m, 1H), 4.19 – 4.08 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.24 – 3.18 (m, 2H), 3.03 – 2.94 (m, 6H), 2.55 (s, 3H), 2.46 – 2.24 (m, 3H), 2.05 – 1.67 (m, 8H), 1.66 – 1.51 (m, 8H), 1.36 – 1.22

(m, 4H), 0.91 – 0.80 (m, 15H)。

【0766】實施例 2.36：N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-036）



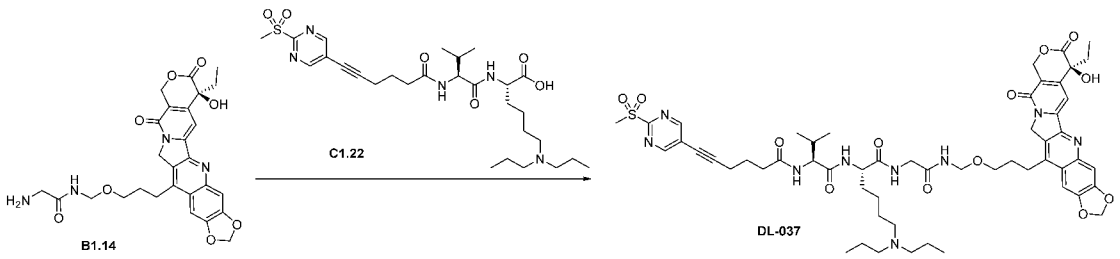
將化合物 C1.20 (40 mg, 0.075 mmol), 化合物 B1.14 (41 mg, 0.075 mmol) 溶於 DMF (1 mL)，然後再加入 HOBt (15.2 mg, 0.113 mmol)和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽 (21.5 mg, 0.113 mmol)，然後再加入三乙胺 (23 mg, 0.225mmol) 加完後反應液室溫攪拌 16 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液濃縮得粗產品，粗產品經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN) 純化得到目標化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (16 mg, 收率 20%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1070.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 – 9.08 (m, 2H), 9.01 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.20 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43

(s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.65 – 4.53 (m, 2H), 4.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.20 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.14 – 3.07 (m, 6H), 2.98 (s, 2H), 2.55 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.03 – 1.89 (m, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 7H), 1.61 – 1.56 (m, 2H), 1.32 (s, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.91 – 0.78 (m, 9H)。

【0767】實施例 2.37：N-((11S,14S)-11-(4-(二正丙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-037）



將化合物 C1.22 (43 mg, 0.074 mmol), 化合物 B1.14 (40 mg，0.075 mmol)，溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (1 mL)，然後依次加入 HBTU (28 mg, 0.075 mmol)，N,N-二異丙基乙胺 (24 mg, 0.187 mmol)， 反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜(0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物的三氟乙酸鹽（8.5 mg, 收率 10%）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H),

5.24 (s, 2H), 4.66 – 4.52 (m, 2H), 4.31 – 4.21 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.49 – 3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.15 – 3.06 (m, 2H), 3.02 – 2.95 (m, 6H), 2.59 – 2.52 (m, 3H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.05 – 1.90 (m, 2H), 1.91 – 1.77 (m, 6H), 1.63 – 1.57 (m, 6H), 1.31 – 1.29 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 15H).

採用本實施例中同樣的操作，反應液直接經製備色譜(0.1% 甲酸水溶液，乙腈)純化，凍乾，得到目標化合物的甲酸鹽（32.6 mg, 收率 39%），為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.09 (s, 2H), 8.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.14 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.48 – 5.35 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 – 4.54 (m, 2H), 4.23 – 4.07 (m, 2H), 3.79 – 3.66 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.14 – 3.08 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 2.59 – 2.52 (m, 2H), 2.36 – 2.27 (m, 8H), 2.00 – 1.76 (m, 7H), 1.72– 1.62 (m, 1H), 1.58– 1.48 (m, 1H), 1.40 – 1.20 (m, 8H), 0.88 – 0.77 (m, 15H).

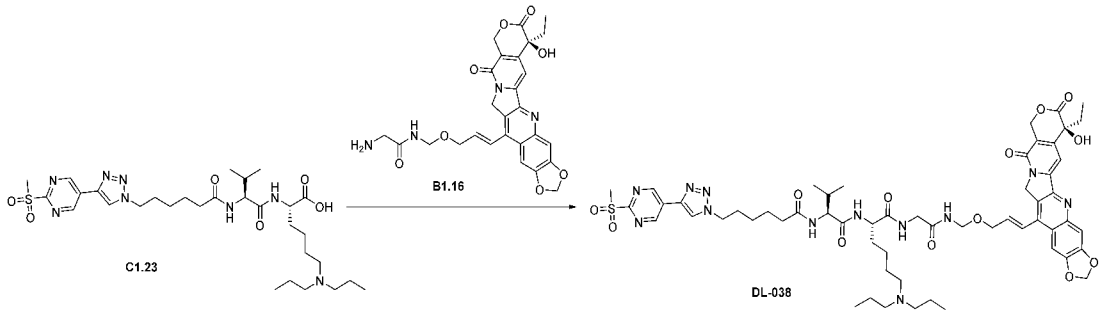
取 DL-037 甲酸鹽（16mg），通過製備 HPLC 純化（0.1% 碳酸氫銨水，乙腈），凍乾，得游離態的目標化合物（DL-037，10mg，收率 65%），為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.21 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.26 (s, 2H), 5.48 – 5.35 (m, 2H), 5.16 (s,

2H), 4.63 – 4.51 (m, 2H), 4.25 – 4.10 (m, 2H), 3.82 – 3.63 (m, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.56 – 2.51 (m, 2H), 2.41 – 2.23 (m, 8H), 1.96 – 1.76 (m, 7H), 1.71 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.48 (m, 1H), 1.37 – 1.21 (m, 8H), 0.88 – 0.78 (m, 15H).

【0768】實施例 2.38：(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代四氫二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基烯丙基氧基甲基胺基氧代乙基甲基甲磺醯基)嘧啶基三唑基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

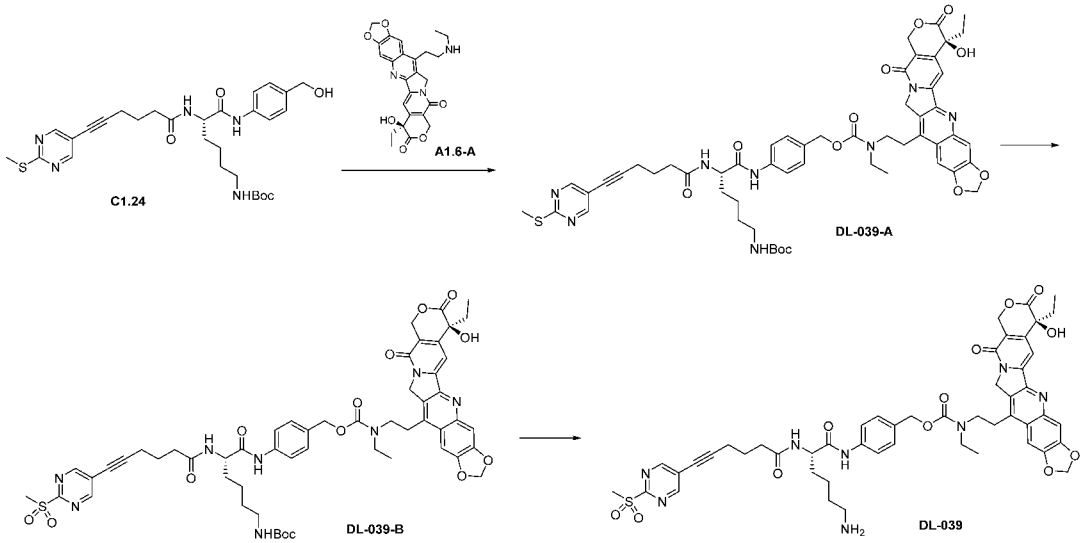


將化合物 B1.16 (30 mg, 0.06 mmol), 化合物 C1.23 (37 mg，0.06 mmol)溶於 DMF (1 mL)。然後再加入 HBTU (21 mg, 0.06 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺 (16 mg, 0.12 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 (S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺 (4 mg, 收率 6%)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1167.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (s, 2H), 8.98 (s, 1H, TFA), 8.92 (s, 1H), 8.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.25 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.58 – 6.52 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.74 – 4.67 (m, 2H), 4.46 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.01 – 2.95 (m, 8H), 2.23 – 2.18 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.00 (m, 2H), 1.90 – 1.84 (m, 6H), 1.63 – 1.57 (m, 9H), 0.88 (m, 9H), 0.81 – 0.78 (m, 6H)。

【0769】實施例 2.39：4-((S)-6-胺基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺)己醯胺基)苄基 N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯



步驟一：在 0°C 冰浴條件下，向 C1.24（150 mg，0.264 mmol）和三乙胺（89 mg，0.88 mmol）的二氯甲烷（10 mL）溶液中加入 N，N-琥珀醯亞胺基碳酸酯（DSC，90 mg，0.352 mmol），反應在 0°C 氮氣下反應 30 分鐘，隨後滴加化合物 A1.6-A（82 mg，0.176 mmol），反應在室溫下反應 12 小

時。LCMS 監測反應完全。反應液減壓濃縮成粗產品，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黃色油狀化合物 DL-039-A（27 mg，收率：14.4%)為黃色油狀物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1059.2；

步驟二：向化合物 DL-039-A（60 mg，0.057 mmol）的四氫呋喃（5 mL）和水（1 mL）的混合溶液中加入過氧單磺酸鉀（Oxone，349 mg，0.567 mmol），反應在室溫下攪拌 12 小時。TLC 檢測反應完全。向反應液中加入水（10 mL），用二氯甲烷（10 mL X 3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到目標化合物 DL-039-B（60 mg，粗品）為黃色固體。

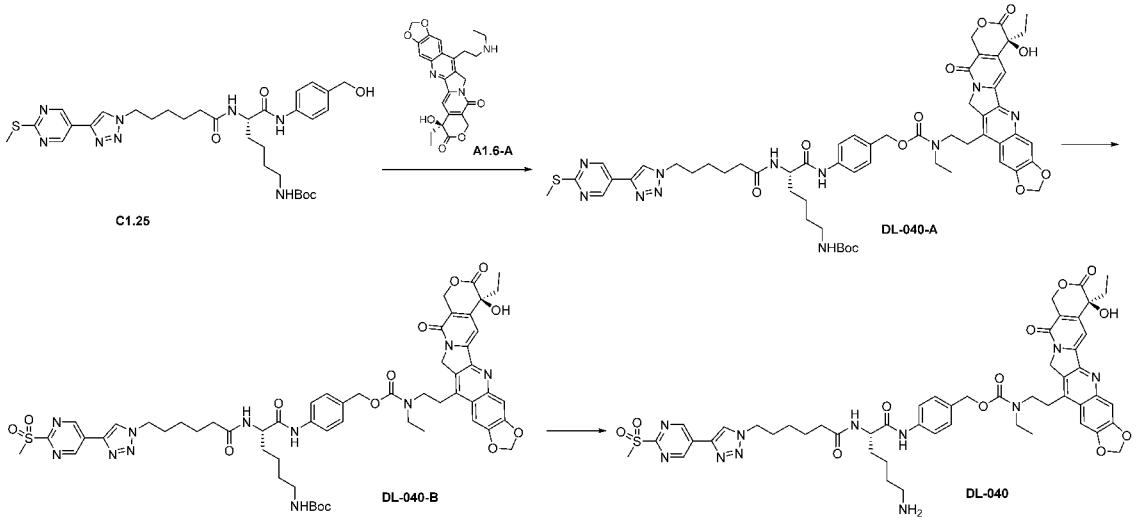
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1091.0；

步驟三：將化合物 DL-039-B（60 mg, 0.055 mmol）溶在二氯甲烷（1 mL）溶液中，0°C 下向反應液中加入二氯乙酸（1 mL），反應在室溫下攪拌 3 小時。LCMS 顯示反應完成。濾液減壓濃縮成粗產品，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%三氟乙酸）得到黃色固體化合物 4-((S)-6-胺基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺)己醯胺基)苄基 N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯（2.44 mg，收率 3.69%）。

LCMS (ESI) $[1/2M+H]^+$ = 496.3, t_R = 2.252 min。

【0770】實施例 2.40：4-((S)-6-胺基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)己醯胺基)苄基 N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羥基-

8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯(DL-040)



步驟一：在 0°C 冰浴條件下，向 C1.25（300 mg，0.469 mmol）和 三乙胺（126 mg，1.25 mmol）的二氯甲烷（10 mL）中加入 N，N-琥珀醯亞胺基碳酸酯（DSC，160 mg，0.626 mmol），反應在 0°C 反應 30 分鐘，隨後滴加化合物 A1.6-A（145 mg，0.313 mmol），然後反應在室溫下反應 12 小時。LCMS 監測反應完全。反應液減壓濃縮成粗產品，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黃色油狀化合物 DL-040-A（70 mg，收率：19.8%)為黃色油狀物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1130.1。

步驟二：向化合物 DL-040-A（70 mg，0.062 mmol）的四氫呋喃（5 mL）和水（1 mL）的混合溶液中加入過氧單磺酸鉀（Oxone，381 mg，0.619 mmol），反應在室溫下攪拌 12 小時。TLC 檢測反應反應完全。向反應液中加入水（10 mL），用二氯甲烷（10 mL x 3）萃取，有機相經飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，抽濾，減壓濃縮得到目標化合物 DL-040-B（70 mg，粗品）為黃色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1162.6, t_R = 1.710 min。

步驟三：將化合物 DL-040-B（70 mg, 0.060 mmol）溶在二氯甲烷（1 mL）

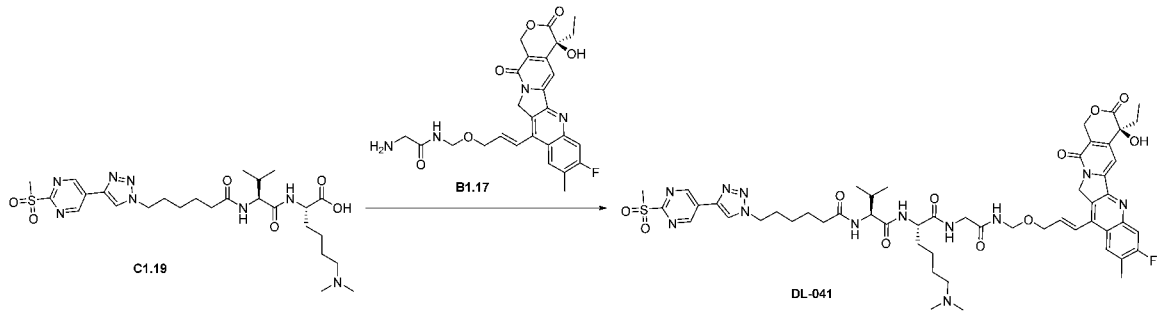
溶液中，0°C 下向反應液中加入二氯乙酸（1 mL），反應在室溫下攪拌 3 小時。LCMS 顯示反應完成。濾液減壓濃縮成粗產品，經高效液相製備純化（乙腈/水含 0.05%三氟乙酸）得到黃色固體化合物 4-((S)-6-胺基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)己醯胺基)苄基 N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯（5.54 mg，收率 8.66%）。

LCMS (ESI) $[1/2M+H]^+$ = 1062.5, t_R = 4.052 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.22 (br s, 1H), 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.22 – 8.03 (m, 1H), 7.85 (br s, 3H, NH2-TFA), 7.61 – 7.45 (m, 3H), 7.32 – 7.26 (m, 1H), 7.26 – 7.17 (m, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.35 (s, 2H), 5.91 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.37 – 5.30 (m, 1H), 5.27 – 5.20 (m, 1H), 5.10 – 5.00 (m, 1H), 4.97 – 4.78 (m, 1H), 4.52 – 4.26 (m, 3H), 3.56 – 3.46 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 2.83 – 2.71 (m, 2H), 2.21 – 2.11 (m, 2H), 1.98 – 1.78 (m, 4H), 1.67 – 1.48 (m, 6H), 1.37 – 1.22 (m, 4H), 1.09 – 0.96 (m, 3H), 0.93 – 0.78 (m, 3H)。

【0771】實施例 2.41：(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺

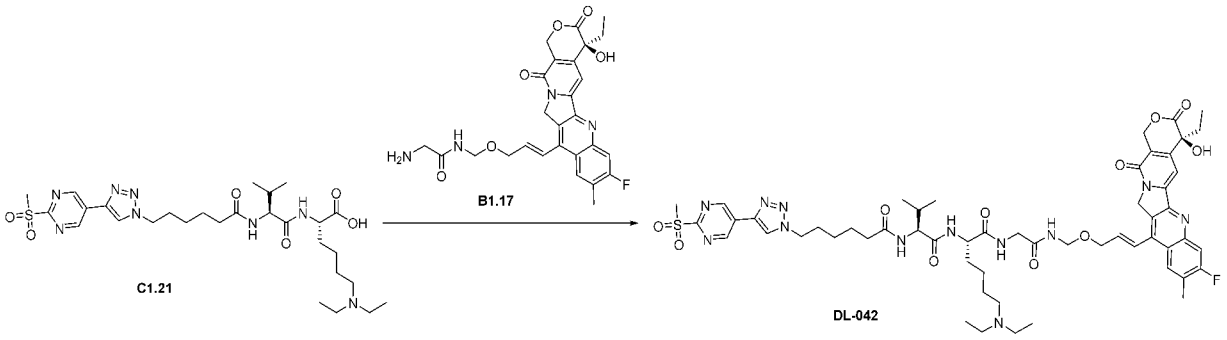
(DL-041)



將化合物 B1.17 (30 mg), 化合物 C1.19 (37 mg)溶於 DMF (1 mL)。然後再加入 HBTU (21 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(16 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(11 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1099.5。

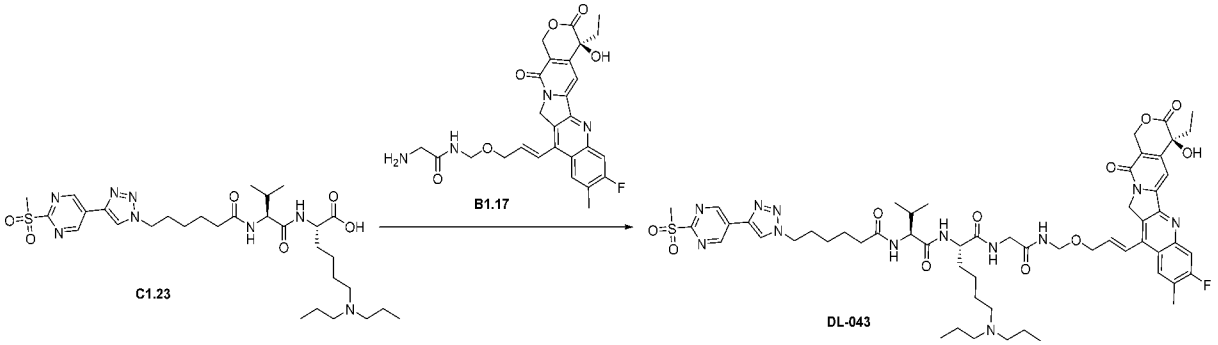
【0772】實施例 2.42：(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(DL-042)



將化合物 B1.17 (30 mg), 化合物 C1.21 (37 mg)溶於 DMF (1 mL)。然後再加入 HBTU (21 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(16 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(7 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1127.5。

【0773】實施例 2.43：(S)-6-(二丙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺(DL-043)

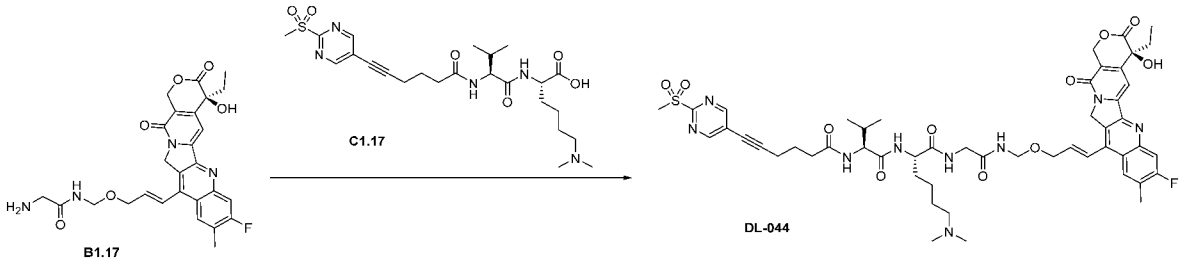


將化合物 B1.17 (17.5 mg, 0.033 mmol)和化合物 C1.23 (22 mg, 0.034 mmol)溶於 N, N-二甲基甲醯胺 (2 mL)中，然後依次加入 HOBT (7 mg, 0.051mmol)，EDCI (10 mg, 0.051mmol)，DIPEA (9 mg, 0.068 mmol)，加畢，反應液室溫攪拌 1 小時，反應液直接經製備高效液相色譜 (0.01% 三氟乙酸

水溶液, 乙腈)純化，製備液冷凍乾燥得到目標化合物(S)-6-(二乙基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（7 mg, 收率 18%）為淡黃色固體產品。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1155.5.

【0774】實施例 2.44：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基胺基)丁基乙基氟羥基甲基二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基甲磺醯基嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺(DL-044)

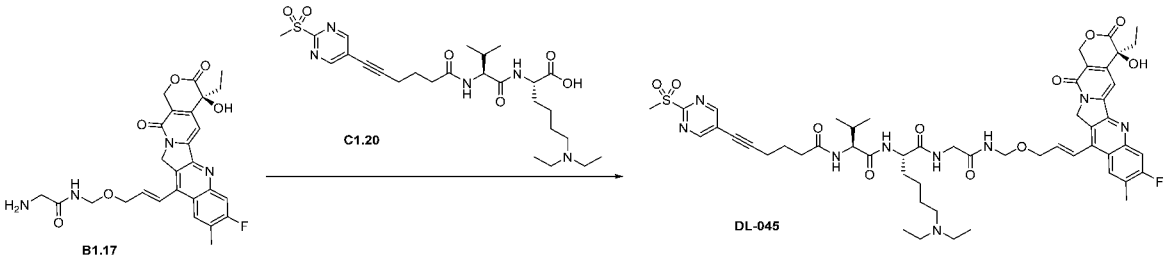


將化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.17 (80 mg)溶於 DMF (2 mL)。然後再加入 HBTU (45 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(35 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (21 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.5。

【0775】實施例 2.45：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙

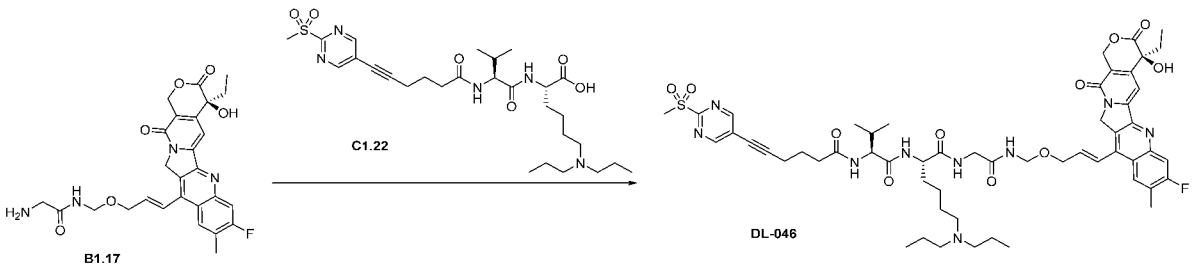
基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺(DL-045)



將化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.20 (80 mg)溶於 DMF (2 mL)。然後再加入 HBTU (45 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(35 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (29 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1056.5。

【0776】實施例 2.46：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺(DL-046)



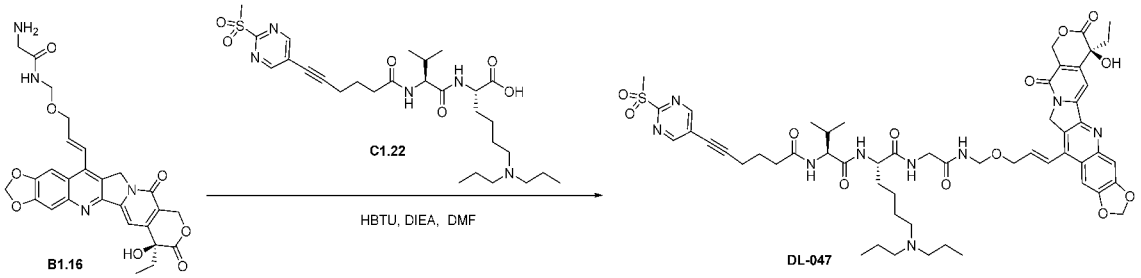
將化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.22 (80 mg)溶於 DMF (2 mL)。然後再加

入 HBTU (45 mg)和 N,N-二異丙基乙胺(35 mg), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% TFA in water, MeCN)純化得到目標化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (30 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1084.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.09 (s, 2H), 8.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.30 – 8.24 (m, 2H), 8.05 (m, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 2H), 7.38 - 7.33 (m, 2H), 6.67 – 6.60 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.37 (s, 2H), 4.73 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.34 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.26 – 4.20 (m, 1H), 4.17 – 4.13 (m, 1H), 3.86 – 3.69 (m, 4H), 3.40 (s, 3H), 2.41 – 2.30 (m, 8H), 2.02 – 1.94 (m, 2H), 1.89 – 1.85 (m, 2H), 1.82 – 1.77 (m, 2H), 1.74 – 1.63 (m, 2H), 1.60 – 1.50 (m, 2H), 1.47 – 1.39 (m, 8H), 0.90 – 0.86 (m, 6H), 0.85 – 0.80 (m, 9H)。

【0777】實施例 2.47： N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-047）



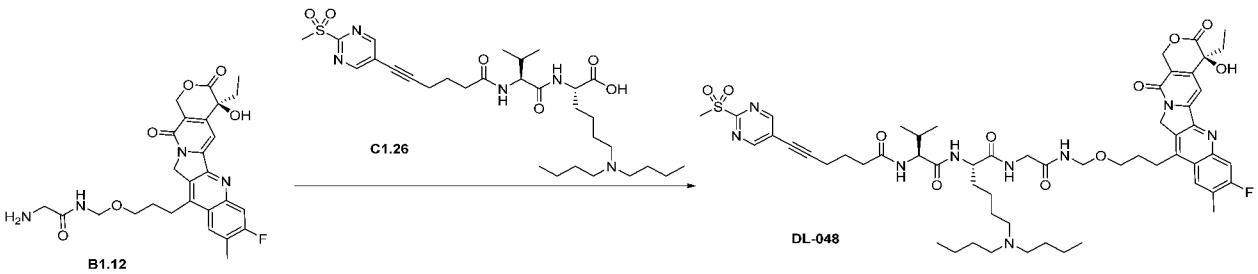
將化合物 B1.16 (45 mg, 0.08 mmol), 化合物 C1.22 (49 mg， 0.08 mmol), 溶

於 DMF (1 mL)。然後再加入 HBTU (32 mg, 0.08 mmol)和 N,N-二異丙基乙胺 (27 mg, 0.2 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜(0.01% 三氟乙酸的水溶液, 乙腈)純化得到目標化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基胺基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啡並[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺 (DL-047，10 mg)為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1096.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.10 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.75 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.26 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 – 2.24 (m, 2H), 6.65 – 6.43 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.74 – 4.69 (m, 1H), 4.31 – 4.29 (m, 2H), 4.26 - 424 (m, 1H), 4.19 – 4.12 (m, 1H), 3.79 – 2.76 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.02 – 2.95 (m, 8H), 2.55 (m, 2H), 2.39 – 2.32 (m, 2H), 2.01 – 1.93 (m, 2H), 1.92 – 1.77 (m, 5H), 1.62 – 1.58 (m, 6H), 1.36 – 1.30 (m, 2H), 0.91 – 0.83 (m, 15H)。

【0778】實施例 2.48：N-((11S,14S)-11-(4-(二丁基胺基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啡並[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧雜-6,9,12-三氮雜十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺（DL-048）

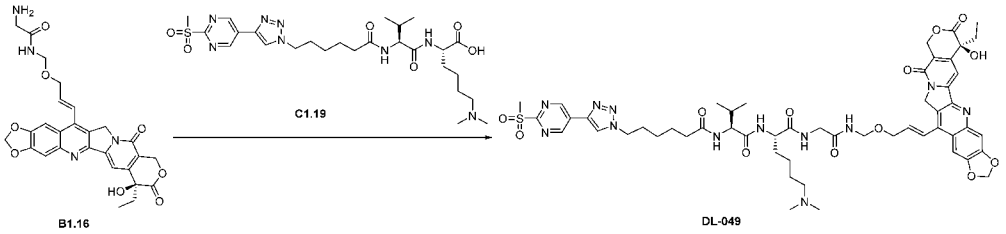


將化合物 C1.26 （50mg，0.08mmol），化合物 B1.12（43mg，0.08mmol）溶於 N,N-二甲基甲醯胺（1.5mL），然後依次加入 DIPEA（26mg，0.21mmol），HBTU（31mg，0.08mmol），室溫攪拌反應 1 小時。LCMS 檢測反應完成，反應液直接通過高效製備 (0.01% 三氟乙酸的水溶液, 乙腈)分離純化得到目標化合物（13.57mg）為黃色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1114.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.09 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.64 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.23 – 8.16 (m, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.61 - 4.59 (m, 2H), 4.24 – 4.22 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.73 – 3.70 (m, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.21 – 3.18 (m, 6H), 3.00 – 2.98 (m, 8H), 2.54 (s, 3H), 1.97 – 1.78 (m, 7H), 1.56 – 1.52 (m, 8H), 1.36 – 1.25 (m, 6H), 0.93 – 0.78 (m, 15H)。

【0779】實施例 2.49：(S)-6-(二甲基基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-049）

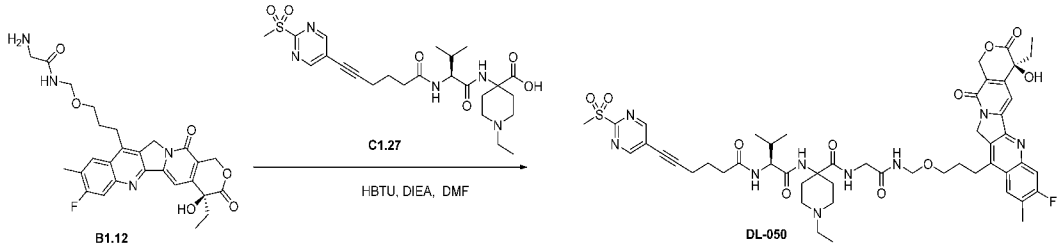


將化合物 B1.16 (45 mg, 0.08 mmol), 化合物溶於 DMF (1 mL)。然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺 (27 mg, 0.2 mmol)，HBTU (32 mg, 0.08 mmol), 加完後反應液室溫攪拌 1 小時，LCMS 檢測反應完成後，將反應液直接經製備色譜 (0.01% 的甲酸水溶液，乙腈純化得到目標化合物(S)-6-(二甲基胺基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羥基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氫-10H-[1,3]二氧雜環戊烷並[4,5-g]吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-049，3 mg)為白色固體。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1111.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (s, 2H), 8.92 (s, 1H), 8.69 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.25 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H, FA), 7.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27 (m, 2H), 6.59 – 6.48 (m, 2H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.74 – 4.67 (m, 2H), 4.44 (m, 2H), 4.30 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.83 – 3.70 (m, 4H), 3.43 (s, 3H), 2.25 (m, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.04 – 1.97 (m, 2H), 1.90 – 1.85 (m, 4H), 1.55 – 1.51 (m, 3H), 1.39 – 1.34 (m, 6H), 0.90 – 0.83 (m, 3H), 0.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H)。

【0780】實施例 2.50： 1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)

己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)哌啶-4-甲醯胺（DL-050）



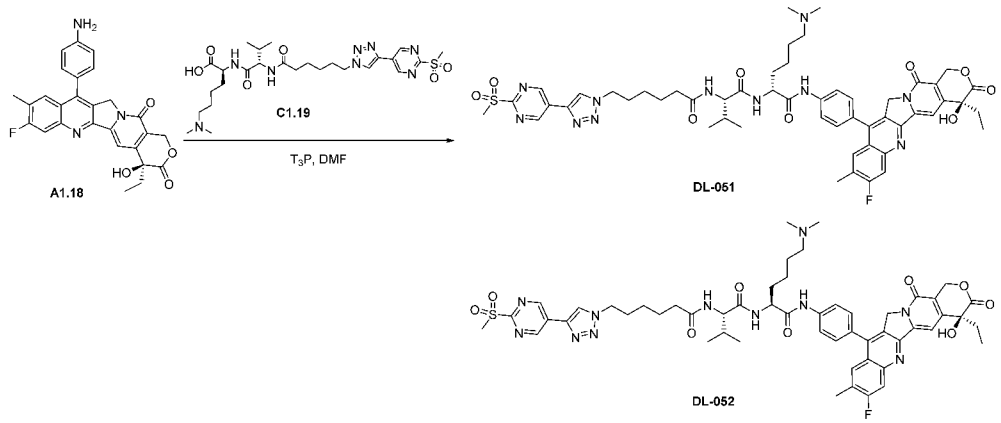
將化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol), 化合物 C1.27 (50 mg，0.10 mmol), 溶於 DMF (1 mL)。然後依次加入 N,N-二異丙基乙胺(30 mg, 0.24 mmol)和 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)，加完後反應液室溫攪拌 1 小時， LCMS 檢測反應完成後，將反應液經製備色譜 (0.01% FA in water, MeCN)純化得到目標化合物 1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)胺基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)己-5-炔醯胺基)丁醯胺基)哌啶-4-甲醯胺（DL-050，10 mg)為白色固體。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.08 (s, 2H), 8.42 (s, 1H, FA), 8.18 – 8.15 (m, 4H), 7.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.72 – 4.63 (m, 1H), 4.53 – 4.45 (m, 1H), 4.07 – 4.06 (m, 1H), 3.79 – 3.69 (m, 1H), 3.58 – 3.55 (m, 2H), 3.55 – 3.48 (m, 5H), 3.21 – 3.16 (m, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.66 – 2.64 (m, 2H), 2.40 – 2.26 (m, 5H), 1.99 – 1.71 (m, 12H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.93 – 0.85 (m, 9H)。

【0781】實施例 2.51： (R)-6-(二甲基胺基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-

基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-051）和 (S)-6-(二甲基胺基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-052）



將化合物 A1.18 (40 mg，0.08 mmol)和 C1.19 (71 mg，0.12 mmol) 溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (3 mL)。再加入 T_3P (254 mg, 0.40 mmol, 50%w/w 乙酸乙酯的混合物)，將反應液於室溫下攪拌 1 小時。LCMS 檢測反應完成後，反應液直接經製備色譜 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 純化得到目標化合物 (R)-6-(二甲基胺基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-051，8.1 mg）和 (S)-6-(二甲基胺基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4':6,7]吲哚啉並[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺醯基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺基)丁醯胺基)己醯胺（DL-052，8.8 mg）均為白色固體。

DL-051：

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1048.2, t_R = 1.258 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.12 (s, 1H), 9.40 (s, 2H), 8.84 (s, 1H), 8.55 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.99 – 7.89 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.36 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.40 (m, 3H), 4.22 – 4.10 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.30 – 2.25 (m, 2H), 2.24 – 2.20 (m, 2H), 2.19 – 2.15 (m, 6H), 2.03 – 1.93 (m, 2H), 1.92 – 1.78 (m, 6H), 1.72 – 1.66 (m, 1H), 1.61 – 1.54 (m, 2H), 1.48 – 1.42 (m, 2H), 1.30 – 1.26 (m, 2H), 0.91 – 0.86 (m, 9H)。

DL-052：

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1048.2, t_R = 1.283 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.34 (s, 1H), 9.45 (s, 2H), 8.94 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.99 – 7.85 (m, 4H), 7.75 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.52 – 4.42 (m, 3H), 4.25 – 4.17 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.30 – 2.13 (m, 8H), 2.05 – 1.97 (m, 2H), 1.95 – 1.81 (m, 7H), 1.60 – 1.55 (m, 2H), 1.50 – 1.44 (m, 2H), 1.33 – 1.28 (m, 4H), 0.95 – 0.83 (m, 9H)。

【0782】三、抗體製備與鑒定

【0783】實施例 3.1 B7H3 抗原和抗 B7H3 抗體 B7H3-C1 和 B7H3-C2 製備

選取人 2Ig B7H3 的 29-245 位胺基酸（NCBI 蛋白編號 NP_001316557.1）的核酸序列，其中 C 端添加檢測 6×His 標籤，命名為人 B7H3-2IgG-his；

選取人 4Ig B7H3 的 27-461 位胺基酸（Uniprot 蛋白編號 Q5ZPR3-1）的核酸序列，其中 C 端添加純化 6× His 標籤，命名為人 B7H3-4IgG-his；

選取猴 B7H3 4Ig 的 27-465 位胺基酸（Uniprot 蛋白編號 F7G5V3）的核酸序列，其中 C 端添加純化 6x His 標籤，命名為猴 B7H3-4IgG-his；B7H3-C1 參考 CN 103687945B 中編號 M30-H1-L4 的抗體；B7H3-C2 參考 CN109069633A 中編號 mAb-C-DUBA 的抗體。

分別合成上述三種 B7H3 抗原的基因，以及密碼子優化合成 B7H3-C1 和 B7H3-C2 抗體的基因（上海生工生物技術有限公司），構建到 PTT5 表達載體上，並大量抽提質粒。將抽提製備好的表達載體分別於 HEK293F 中瞬轉表達 7 天，表達上清經 ProteinA 化製備獲得抗原蛋白和 B7H3-C1 抗體和 B7H3-C2 抗體。

【0784】實施例 3.2 全人源噬菌體庫製備

徵集 20-30 歲左右 10 名健康男性以及 10 名健康女性志願者，抽取約 50mL 新鮮血液體，通過 Ficol 抽提新鮮 PBMC 細胞，然後通過 Trizol 抽提 mRNA 進行反轉錄獲得 cDNA。通過 VH 和 VK 引物對從 cDNA 中擴增抗體重鏈及輕鏈，再通過 Overlap PCR 獲得 ScFv 片段，通過 SfiI 酶切連接到 pTT-1 載體上，通過電轉獲得全人源 ScFv 噬菌體庫，庫容量約 $5.2*10^9$。

【0785】在 1.0L 新鮮培養基 2YT+100μg/ml Amp+2%葡萄糖中加入 1mL 文庫，菌液起始 OD600＜0 .1，在 37℃、220rpm 的條件下培養。當 OD600 為 0 .6 左右時，按細胞:噬菌體 = 1:20 的比例加入 M13K07 噬菌體，輔助噬菌粒侵染，在 37℃條件靜止培養 30min, 然後在 37℃、200rpm 條件下培養 30min，最後採用 4000rpm 條件下離心 10min，用 1.0L 等體積的 2YT+100μg/mlAmp+50μg/ml Kana 重懸，30℃培養 16h，用於表達。待表達培養完成後，取菌液於 4℃條件下，8000rpm 離心 30 分鐘，去上清。高

速離心，去掉菌體，上清中加入 1/5 體積的 PEG/NACL，沉澱上清中的 Phage，離心後將 Phage 溶解於 PBS 中，測 phage 滴度約為 $2*10^{11}$。

【0786】實施例 3.3 噬菌體庫篩選抗 B7H3 抗體

3.3.1 hB7H3-his/cynoB7H3-his/MCF-7 親和淘選

第一輪親和淘洗：將 hB7H3-his 抗原（義翹神州）用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 5μg /mL，按 100μL/孔加入酶標孔中，包被 8 孔，4℃包被過夜；第二輪親和淘洗：將 cynoB7H3-his 抗原（義翹神州）用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 2μg /mL ，按 100μL/孔加入酶標孔中，包被 4 孔，4℃包被過夜。第三輪親和淘洗: 胰酶消化 MCF -7 細胞，採用 DMEM+10%FBS 重選，50000 細胞/孔鋪於 96 孔細胞板，37℃5% CO2 培養箱中培養過夜。棄包被液或細胞培養液，PBS 洗滌 3 次，每孔加入 300μL 3% OVA-PBS 封閉液，37℃封閉 1 小時； PBS 洗滌 3 次，加入 100μL 噬菌體文庫，37℃孵育 0.5-1 小時；吸出未結合的噬菌體，用 PBST 洗滌 6-8 次，PBS 洗滌 2 次；加入 100μL Gly-HCl 洗脫液，37℃孵育 8 分鐘，洗脫特異性結合的噬菌體；將該洗脫液轉移至 1.5mL 無菌離心管中，迅速用 10μLTris-HCl 中和緩衝液中和；取 10μL 進行梯度稀釋，測定滴度，計算淘選回收率，其餘洗脫物混合後進行擴增和純化，用於下一輪親和淘選，改變淘選條件，每一輪淘選條件如下表 1。

表 1：親和淘選條件

輪次	抗原包被濃度(μg/mL)	封閉液	文庫投入量(cfu)	結合時間(h)	PBST 濃度	PBST 洗滌次數
1	5	OVA-	2×10^{11}	1	0.1%	6

		PBS				
2	2	OVA-PBS	1×10^{11}	0.75	0.25%	8
3	MCF-7 50000 細胞/孔	OVA-PBS	1×10^{11}	0.5	0.5%	8

3.3.2 噬菌體的救援

從淘選洗脫物滴度的平板上，用滅菌牙籤從第三輪滴度測定平板上各隨機挑選 96 個克隆，接種於 1mL 2×YT-A 中，37℃，230 r/min 振盪培養 8 h。取 100 μL 上述培養物，按 cell：phage = 1：20 的比例加入 M13K07 噬菌體，37℃，靜置 15 min，220 r/min 振盪培養 45 min。補加 800 μL 體積的 2×YT-AK，30℃，劇烈振盪培養過夜。第二天 12000 rpm 離心 2min，取上清，用於單克隆 ELISA 鑒定。

3.3.3 陽性噬菌體克隆的鑒定

將人 B7H3-4IgG-his 用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 1μg /mL，和 2%OVA-PBS 按 100 μL/孔分別加入酶標孔中，4℃包被過夜；棄包被液，PBST 洗滌 3 次，每孔加入 300 μL 5%脫脂牛奶，37℃封閉 1 h；PBST 洗滌 1 次， 每孔加入 50 μL 噬菌體培養菌液上清和 50μL 5%脫脂牛奶，37℃，孵育 1 h；PBST 洗滌 5 次，加入辣根過氧化物酶標記的抗 M13 抗體（用 PBS 按 1:10000 稀釋），100 μL/孔，37℃作用 1 h；PBST 洗板 6 次。加入 TMB 顯色液顯色，100 μL/孔，37℃，7min，加入終止液終止反應，50 μL/孔，於 450 nm 下測定吸光度，共篩選到 9 個抗 B7H3 的 scFv 抗體具有獨特序列，其中與腫瘤細胞結合最強的 scFv 抗體 1D1 序列如 SEQ ID NO:1 所示、2E3 序列如 SEQ ID NO:2 所示。

【0787】實施例 3.4 抗 B7H3 抗體表達

將 1D1 和 2E3 的 ScFv 的 VH 胺基酸序列 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:23 分別加上 IgG1 的恆定區胺基酸序列（SEQ ID NO:43）通過密碼子優化及基因合成（上海生工生物技術有限公司），然後構建到 PTT5 載體上，分別命名為 PTT5-01-CH 和 PPT5-02-CH；將 1D1 和 2E3 的 ScFv 的 VL 胺基酸序列 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:33 加上 Kappa 恆定區序列（SEQ ID NO:44）通過密碼子優化及基因合成（上海生工生物技術有限公司），然後構建到 PTT5 載體上，分別命名為 PTT5-01-CL 和 PTT5-01-CL；通過 PEI max 試劑將抗體 B7H3 抗體表達質粒 PTT5-01-CH/PTT5-01-CL、PTT5-02-CH/PTT5-02-CL 共轉染 HEK293F 細胞進行表達，37℃ 5%CO2 搖床表達 7 天，收集上清液，通過 ProA 磁珠進行純化，獲得抗 B7H3 抗體分別命名為 1D1-01、2E3-02。

【0788】實施例 3.5 抗 B7H3 抗體蛋白親和力檢測

通過 ELISA 實驗方法檢測 B7H3 全人源抗體與人 B7H3-4IgG-his 和猴 B7H3-4IgG-his 蛋白的親和力。具體實驗操作：將人 B7H3-4IgG-his 或猴 B7H3-4IgG-his 蛋白用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 1μg/mL 按 100 μL/孔分別加入 96 孔酶標孔中，4℃包被過夜；棄包被液，PBST 洗滌 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA），37℃封閉 1 小時；然後每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀釋好的 B7H3 全人源抗體（10μg 起始，3 倍稀釋，2 複孔)， 37℃，孵育 2h；PBST 洗滌 3 次，加入辣根過氧化物酶標記的抗人 Fc 抗體（用 PBS 按 1:10000 稀釋），100 μL/孔，37℃作用 1 小時；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 顯色液顯色，100 μL/孔，

37℃，7min，加入終止液終止反應，50 μL/孔，於 450 nm 下測吸光度。根據原始資料計算 EC50 值。

結果見圖 1A，1B，2A 和 2B，詳細結果如表 1-1 和 1-2 所示，1D1-01、2E3-02 與人 B7H3-4IgG 均具有較高親和力，分別是 43.56pM 和 17.54pM，其中 2E3-02 強於 B7H3-C1 的親和力 51.85pM；1D1-01、2E3-02 與猴 B7H3-4IgG 較高結合能力，分別是 35.82 pM 和 27.72pM。

表 1-1：1D1-01 抗體蛋白親和力檢測結果

抗體	人 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)	猴 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)
1D1-01	43.56	35.82
B7H3-C1	48.03	166.52

表 1-2：2E3-02 抗體蛋白親和力檢測結果

抗體	人 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)	猴 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)
2E3-02	17.54	27.72
B7H3-C1	51.85	3921

【0789】實施例 3.6 抗 B7H3 抗體細胞親和力檢測

B7H3 蛋白在多種實體瘤細胞上高表達，通過 FACS 實驗方法檢測 B7H3 全人源抗體與腫瘤細胞親和力。具體實驗操作：將生長至對數期的 MCF-7 乳腺癌細胞、A549 人非小細胞肺癌以及 PC3 人前列腺癌細胞通過胰酶消化，用含 2%BSA 的 PBS 緩衝液重懸到 5*10^5 細胞每毫升，加入 100uL 細胞懸液至 96 孔板中; 用含有 2%BSA 的 PBS 緩衝液稀釋 B7H3-C1、B7H3-C2，1D1-01 以及 2E3-02，起始濃度 40μg/mL, 3 倍稀釋，然後加入 100μL 抗體懸液至 96 孔板中混勻；4℃孵育 1 小時，採用預冷的 PBS 清洗 2 次，每次 300μL/孔，500g 離心 5 分鐘；加入 1：50 螢光二抗 APC anti-Human IgG 或者 PE anti-human IgG (購買自 Biolegend) 100μL/每孔，混勻；4℃孵育 0.5

小時，採用預冷的 PBS 清洗 2 次，每次 300μL/孔，500g 離心 5 分鐘，用 500μl PBS 重選，採用貝克曼流式細胞儀進行檢測平均螢光訊號值。將平均螢光訊號值計算 EC50 值，結果見圖 3A、3B、4A、4B 及圖 5，具體資料見表 2-1 和 2-2。

表 2-1：1D1-01 抗體細胞親和力檢測結果

抗體	MCF-7 腫瘤細胞		A549 腫瘤細胞	
	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI
1D1-01	0.524	94465	0.322	11288
B7H3-C1	1.709	83992	1.865	8273

表 2-2：2E3-02 抗體細胞親和力檢測結果

抗體	MCF-7 腫瘤細胞		A549 腫瘤細胞		PC-3 腫瘤細胞	
	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI
2E3-02	0.398	77732	0.150	84806	0.063	9729
B7H3-C1	1.360	63194	1.054	47956	0.618	6436
B7H3-C2	0.278	27925	未檢測	未檢測	0.167	2170

如表 2-1 和 2-2 所示，在 B7H3 高表達腫瘤細胞 MCF-7 上，1D1-01 和 2E3-02 親和力分別是 0.524nM 和 0.398nM，均遠高於 B7H3-C1，同時最大螢光訊號值比 B7H3-C1 分別高 12%和 23%，其中 2E3-02 最大螢光訊號值比對照抗體 2 高 2.78 倍。在 B7H3 中表達腫瘤細胞 A549 上，1D1-01 和 2E3-02 親和力分別是 0.322nM 和 0.150nM，均遠高於 B7H3-C1，同時最大螢光訊號值比 B7H3-C1 分別高 36%和 77%。在 B7H3 低表達腫瘤細胞 PC-3 上，2E3-02 親和力 0.06nM 遠高於 B7H3-C1 親和力 0.618nM，也高於 B7H3-C1 親和力 0.167 nM，同時最大螢光訊號值分別是 B7H3-C1 和 B7H3-C2 的 1.51 和 4.48 倍。綜合來看，抗 B7H3 抗體 1D1-01 和 2E3-02 比 B7H3-C1、

B7H3-C1 均有更好的腫瘤細胞親和力。

【0790】實施例 3.7 抗 B7H3 抗體動態親和力檢測

Fortibio 是常用的動態親和力檢測設備，通過其檢測抗 B7H3 抗體與 B7H3 蛋白的動態親和力。簡述方法如下：對人 B7H3-4IgG-His 、人 B7H3-2IgG-His 或猴 B7H3-4IgG-His 採用 PBST 進行系列稀釋，得到 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5μM、6.25nM、3.125 nM、1.5625 nM 和 0 nM。ProA 生物感測器(Pall 生命科學)在使用前用 PBST 緩衝液預濕。將抗 B7H3 抗體用 PBST 稀釋到 5μg/mL 並固化在 ProA 感測器上。然後將固化了抗體的感測器在 PBST 緩衝液中平衡 60s 以獲得基線，然後轉移到抗原稀釋液結合 60s，再在 PBST 中解離 180s。在一個分析迴圈後，感測器用 10 mM Gly (pH 1.5) 再生。使用 Date analysis 用 1：1 模型分析，確定結合(Ka)和解離(Kd)速率常數並使用其來計算解離平衡常數(KD)。

如表 3 所示，1D1-01、2E3-02 與人 B7H3-4Ig-his 動態親和力在 4.3E-11M 和 2.4E-10M，均遠高於抗體 B7H3-C1 和抗體 B7H3-C2；同時 1D1-01、2E3-02 與猴 B7H3-4Ig-his 動態親和力在 E-10M，具有良好猴 B7H3 交叉結合活性；1D1-01、2E3-02 與人 B7H3-4Ig-his/人 B7H3-2Ig-his 動態親和力倍數分別是 9.5 和 32.5。

表 3：抗 B7H3 抗體分子的動態親和力分析

抗體	人 B7H3-4Ig-his 親和力 KD（M）	人 B7H3-2Ig-his 親和力 KD（M）	猴 B7H4-4Ig-his 親和力 KD（M）
1D1-01	4.3E-11	4.1E-10	2.5E-10
2E3-02	2.4E-10	7.8E-09	4.7E-10
B7H3-C1	5.4E-10	4.8 E-08	2.0 E-10
B7H3-C2	1.8E-09	7.1E-08	2.5 E-09

【0791】實施例 3.8 抗 B7H3 抗體特異性檢測

通過 ELISA 實驗方法檢測 B7H3 抗體與 B7H3 結合特異性。具體實驗操作：將人 B7-1、人 B7-2、人 B7H1-his、人 B7H2-his、人 B7H3-his、人 B7H4-his 蛋白（購買自義翹神州生物技術有限公司）用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 1μg /mL 按 100 μL/孔分別加入 96 孔酶標孔中，4℃包被過夜；棄包被液，PBST 洗滌 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA），37℃封閉 1 h；然後每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀釋好的 B7H3 全人源抗體 10ug/mL， 37℃，孵育 2h；PBST 洗滌 3 次，加入辣根過氧化物酶標記的抗人 Fc 抗體（用 PBS 按 1:10000 稀釋），100 μL/孔，37℃作用 1h；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 顯色液顯色，100 μL/孔，37℃，7min，加入終止液終止反應，50 μL/孔，於 450 nm 下測光密度。1D1-01 和 2E3-02 結果分別如圖 6A,6B 所示。如結果所示 1D1-01、2E3-02 與人 B7H3 特異性結合，而不結合人 B7-1、人 B7-2、人 B7H1、人 B7H2、人 B7H4 蛋白。

【0792】實施例 3.9 抗 B7H3 抗體內吞活性檢測

採用 FACS 方式檢測 A549 人非小細胞肺癌細胞對抗 B7H3 抗體被細胞內吞的強弱。將生長至對數生長期的 A549 細胞採用胰酶進行消化，離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次；用 PBS（含 1%BSA）重懸細胞，分別加入待檢測抗 B7H3 抗體，濃度為 10 μg/mL，4℃孵育 1 小時；離心收集細胞，PBS 洗三次，用 DMEM+10% FBS 重懸細胞，將重懸後細胞分成 4 份，分別在 37℃孵育 0、1、2、4 小時；孵育相完成後，離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次，用 50 μL 1%BSA（in PBS）重懸細胞，每孔加入 1μL 螢光二抗 APC anti-Human IgG（Biolegend），混勻，4℃孵育 0.5 小時；離心收集細胞，預

冷 PBS 洗三次，用 200 μL PBS 重懸細胞，上機檢測。按照公式：內吞率（%）=【1-（該時間點檢測樣品平均螢光值-該時間點陰性對照樣品平均螢光值）/（0 小時檢測樣品平均螢光值-0 小時陰性對照樣品平均螢光值）】*100。1D1-01 和 2E3-02 結果分別如圖 7A 和 7B 所示，抗 B7H3 抗體 1D1-01 和 2E3-02 在 A549 腫瘤細胞上具有較強的內吞活性，4 小時能達到 40%左右，與抗體 B7H3-C1 相當。

【0793】實施例 3.10 抗 B7H3 抗體表位競爭檢測

採用競爭 ELISA 方式檢測抗 B7H3 抗體 1D1-01、2E3-02 與抗體 B7H3-C1 是否表位競爭。具體步驟如下：採用 CBS 包被液包被人 B7H3-4Ig-his 抗原，100ng/孔，4 度過夜孵育；去除包被液，用 300 μL PBS 洗孔一次，用 PBS（含 2% BSA）溶液封閉每個孔，100 μL 每孔，37 度孵育 2 小時；棄去除封閉液，將 1D1-01、2E3-02 抗體用 PBS（含 2% BSA）進行稀釋，40 μg/mL 起始，2 倍稀釋，總共 11 個稀釋點，第 12 個點用稀釋液代替，2 複孔，50 μL 每孔加入孔中；將生物素標記的 B7H3-C1 稀釋至 50 ng/mL，50 μL 每孔加入孔中，25 度孵育 2 小時；用 300 μL PBST 洗孔，重複 3 次，加入用 PBS（含 2% BSA）進行 1：5000 倍數稀釋 HRP 抗生物素二抗 100 μL/孔，25 度孵育 1 小時；用 300 μL PBST 洗孔，重複 5 次；每孔加入 100 μL TMB 顯色液（安徽湖州英創），室溫顯色 5 分鐘後每孔加入 50 μL H_2SO_4 終止反應，立即用酶標儀讀取 OD450 nm。將原始資料導入 Graph-prism 計算 EC50 值，結果見圖 8A 與 8B。結果表明，抗 B7H3 抗體 1D1-01 與抗體 B7H3-C1 存在結合表位競爭；抗 B7H3 抗體 2E3-02 與抗體 B7H3-C1 不存在結合表位競爭。

【0794】實施例 3.11 Her3 抗原製備

選取人 Her3 的 1-643 位胺基酸 (NCBI：NP_001973.2)的核酸序列，其中 C 端添加檢測 6xHis 標籤，命名為人 Her3-his。選取猴 Her3 的胺基酸序列，其中 C 端添加檢測 6xHis 標籤，命名為猴 Her3-his。選取鼠 Her3 的胺基酸序列，其中 C 端添加檢測 6×His 標籤，命名為猴 Her3-his。

【0795】實施例 3.12 抗 Her3 抗體表達

將抗體 202-2-1 重鏈可變區（SEQ ID NO:49）加上重鏈 IgG1 恆定區（SEQ NO:43），抗體 202-2-1 輕鏈可變區（SEQ NO:50）與 Kappa 恆定區序列（SEQ ID NO:44），抗體 Her3-C3（patritumab ）來自於第一三共公司，其序列來自 IMGT 資料庫 IMGT/mAb-DB ID：964 ，INN 編號：11093，以及來自於 MediaPharma 公司專利 CN 103189392 B（重鏈 SEQ ID NO:10，輕鏈 SEQ ID NO:14）的抗體 Her3-C4，通過密碼子優化及基因合成，然後分別構建到 PTT5 載體上。通過 PEI max 試劑將抗 Her3 抗體重鏈和輕鏈表達質粒分別共轉染 HEK293F 細胞進行表達，37℃ 5%CO_2搖床表達 7 天，收集上清液，通過 ProteinA 磁珠進行純化，獲得抗 Her3 抗體分別命名為：202-2-1（其重鏈序列為 SEQ ID NO 51，輕鏈序列為 SEQ ID NO 52），抗體 Her3-C3。

【0796】實施例 3.13 抗 Her3 抗體蛋白親和力檢測

通過 ELISA 實驗方法檢測抗 Her3 抗體與 Her3 蛋白的親和力。具體實驗操作：將人 Her3-his、猴 Her3-his 蛋白以及大鼠 Her3-his 用 PH 值為 9.6 的碳酸鹽緩衝液稀釋至終濃度為 1μg /mL 按 100 μL/孔分別加入 96 孔酶標孔中，4℃包被過夜；棄包被液，PBST 洗滌 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含

2%BSA），37℃封閉 1 小時；然後每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀釋好的抗 Her3 抗體（1ug 起始，3 倍稀釋，2 複孔)， 37℃，孵育 2h；PBST 洗滌 3 次，加入辣根過氧化物酶標記的抗人 Fc 抗體（用 PBS 按 1:10000 稀釋），100 μL/孔，37℃作用 1 小時；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 顯色液顯色，100 μL/孔，37℃，7min，加入終止液終止反應，50 μL/孔，於 450 nm 下測吸光度。將原始資料導入 Graph-prism 計算 EC50 值，詳細結果如表 4 所示，202-2-1 與人 Her3 蛋白以及猴 Her3 蛋白有強的結合與抗體 Her3-C4 相當，均不與大鼠 Her3 蛋白結合。

表 4 ：抗 Her3 抗體蛋白親和力檢測結果

抗體名稱	人 Her3-his EC50 (pM)	猴 Her3-his EC50 (pM)	大鼠 Her3-his EC50 (pM)
202-2-1	20.97	15.91	不結合
Her3-C4	27.72	9.275	不結合

【0797】實施例 3.14 抗 Her3 抗體內吞活性檢測

採用 FACS 方式檢測 A549-人 Her3（人非小細胞肺癌細胞）對抗 Her3 抗體被細胞內吞的強弱。將生長至對數生長期的 A549-人 Her3 細胞採用胰酶進行消化，離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次；用 PBS（含 1%BSA）重懸細胞，分別加入待檢測抗 Her3 抗體，濃度為 10 ug/mL，4℃孵育 1 小時；離心收集細胞，PBS 洗三次，用 DMEM+10% FBS 重懸細胞，將重懸後細胞分成 4 份，分別在 37℃孵育 0、1、2、4 小時；孵育相完成後，離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次，用 50 uL 1%BSA（in PBS）重懸細胞，每孔加入 1 uL 螢光二抗 APC anti-Human IgG（Biolegend），混勻，4℃孵育 0.5 小時；離心收集細胞，預冷 PBS 洗三次，用 200 uL PBS 重懸細胞，流式細胞儀（貝克曼，型號 CytoFlex）上機檢測。按照公式：內吞率（%）=【1-（該

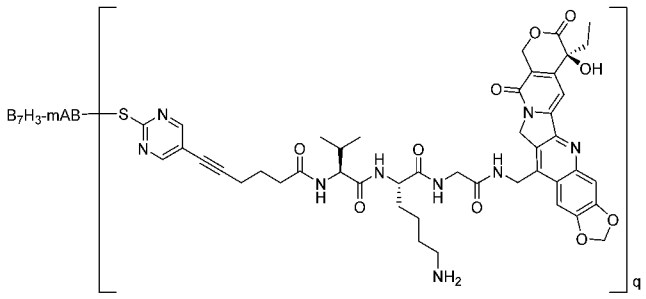
時間點檢測樣品平均螢光值-該時間點陰性對照樣品平均螢光值）/（0 小時檢測樣品平均螢光值-0 小時陰性對照樣品平均螢光值）】*100。結果如圖 7C 顯示，抗 Her3 抗體 202-2-1 在 A549-人 Her3 腫瘤細胞上具有較強的內吞活性 4 小時能達到 26.9%左右，強於抗體 Her3-C4 的 16.6%,與抗體 Her3-C3 相當。但抗 Her3 抗體 202-2-1 內吞先於 Her3-C4/ Her3-C3 達到最大內吞率，具有快於 Her3-C4/ Her3-C3 的內吞速率。

【0798】四、包含細胞生物活性分子和連接體的化合物與抗體的偶聯

【0799】實施例 4.1：B7H3-ADC 的製備

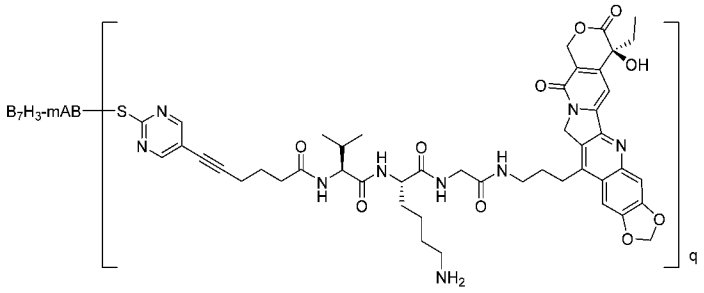
【0800】實施例 4.1.1：B7H3-ADC-01 的製備

取 0.3mL B7H3 抗體(2E3-02 抗體)33.5 mg/mL，用 0.25mL 20mM PB+150mM NaCl+20mM 依地酸鈉溶液（pH 7.6）稀釋，後加入 0.45mL 20mM PB+150mM NaCl 溶液（pH 7.6）混勻，以 1M K_2HPO_4 溶液調 pH 至 7.4，加入 10 mM TCEP（三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol）溶液混勻，室溫放置 30 min。向上述溶液體系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗體物質摩爾數量）的二甲基亞碸（0.1mL）溶液，混勻，室溫靜置 2h，完畢後加入 100mM 半胱胺酸 6.1μl 終止反應。最後採用 G-25 凝膠柱將緩衝液置換為 pH6.44 的 20 mM PB 緩衝溶液。得到 DL-001 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-01。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



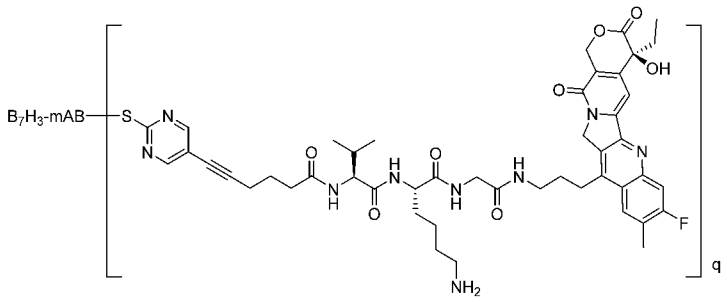
【0801】實施例 4.1.2：B7H3-ADC-02 的製備

用化合物 DL-011 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-02。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



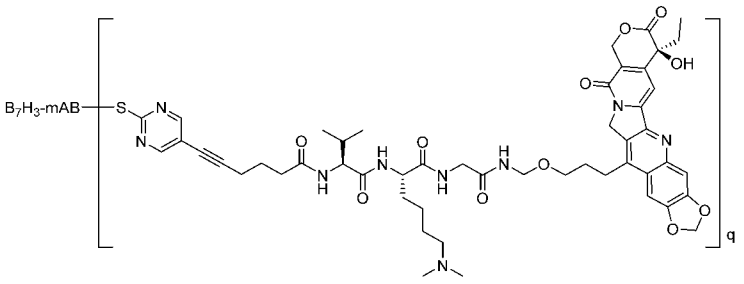
【0802】實施例 4.1.3：B7H3-ADC-03 的製備

用化合物 DL-020 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-020 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-03。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



【0803】實施例 4.1.4：B7H3-ADC-04 的製備

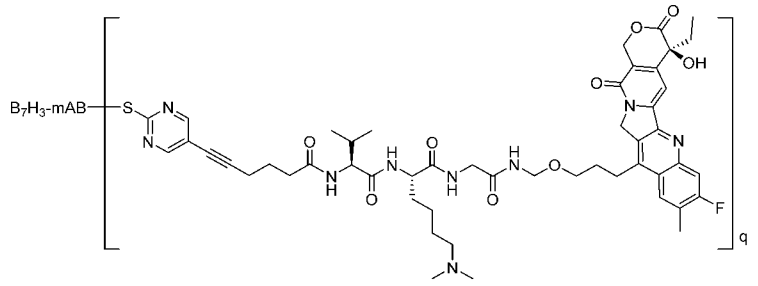
用化合物 DL-019 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-019 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-04。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



【0804】實施例 4.1.5.1：B7H3-ADC-05(DAR8)的製備

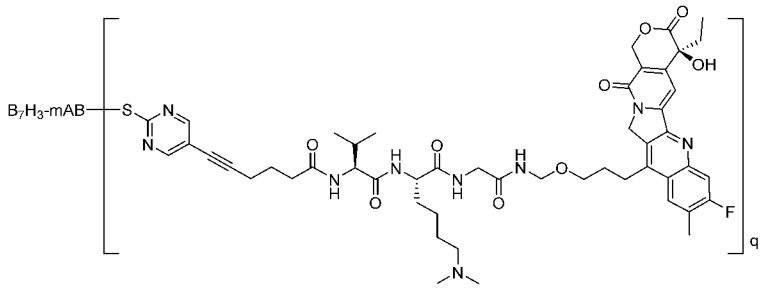
用化合物 DL-018 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 與

B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-05。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



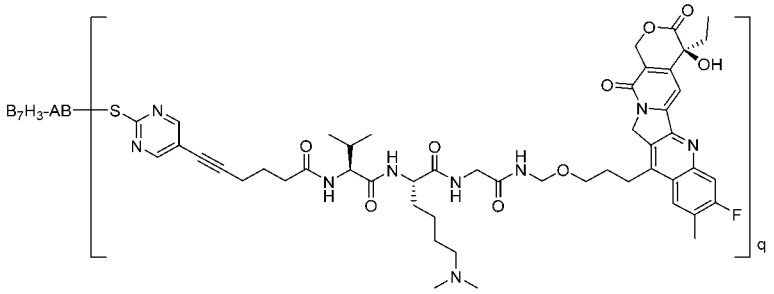
【0805】實施例 4.1.5.2：B7H3-ADC-05(DAR4)的製備

用化合物 DL-018 代替實施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，得到 DL-018 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-05（DAR4）。質譜法測定 DAR 值。



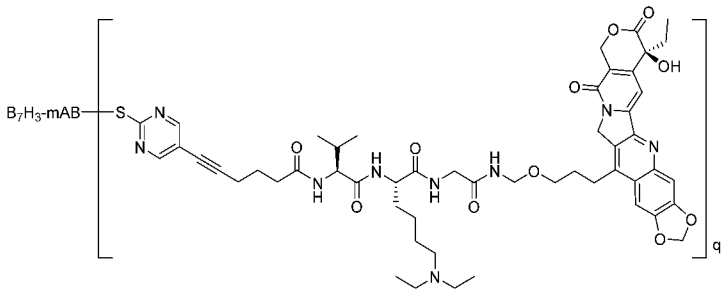
【0806】實施例 4.1.5.3：B7H3-C1-ADC-05(DAR4)的製備

用化合物 DL-018 代替實施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，將 2E3-02 抗體替換為抗體 B7H3-C1，得到 DL-018 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-C1-ADC-05（DAR4）。質譜法測定 DAR 值。

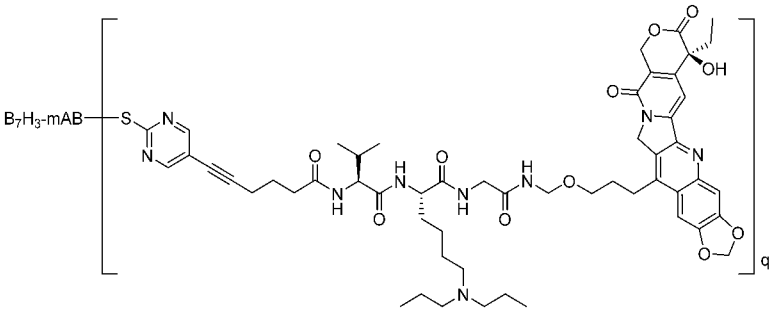


【0807】實施例 4.1.6：B7H3-ADC-06 的製備

用化合物 DL-036 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-06。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



【0808】實施例 4.1.7：B7H3-ADC-07 的製備



【0809】4.1.7.1 B7H3-ADC-07(DAR8)樣品製備

製備方法 A：用化合物 DL-037 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-07(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.7。

製備方法 B：取 25ml 2E3-02 抗體（抗 B7H3，濃度 28.5mg/ml，20mM 醋酸緩衝液），向其中加入 25ml 20mM 醋酸緩衝液稀釋，隨後添加 1ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液並混勻，用 0.5M 磷酸氫二鈉水溶液調樣品 pH 至 7.6 後加入抗體 4.5 倍當量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦鹽酸鹽）溶液並混勻，室溫下反應 90min。最後加入抗體 10 倍當量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混勻後繼續室溫反應 2h。反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有抗 B7H3 抗體 ADC 組合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR8)，質譜法測定 DAR 值為 7.98。

【0810】4.1.7.2 B7H3-ADC-07(DAR2)樣品製備

取 5ml 2E3-02 抗體（抗 B7H3，濃度 28.5mg/ml，20mM 醋酸緩衝液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸緩衝液稀釋，隨後添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液並混勻，用 0.5M 磷酸氫二鈉水溶液調樣品 pH 至 7.6 後加入抗體 4.5 倍當量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦鹽酸鹽）溶液並混勻，室溫下反應 90min。最後加入抗體 2.4 倍當量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混勻後繼續室溫反應 2h。反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有抗 B7H3 抗體 ADC 組合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR2) ，質譜法測定 DAR 值為 2.3。

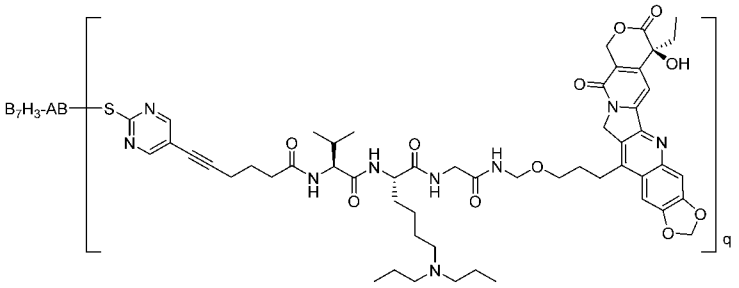
【0811】4.1.7.3

(1)B7H3-ADC-07(DAR4) 樣品製備

取 5ml 2E3-02 抗體（抗 B7H3，濃度 28.5mg/ml，20mM 醋酸緩衝液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸緩衝液稀釋，隨後添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液並混勻，用 0.5M 磷酸氫二鈉水溶液調樣品 pH 至 7.6 後加入抗體 4.5 倍當量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦鹽酸鹽）溶液並混勻，室溫下反應 90min。最後加入抗體 4.8 倍當量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混勻後繼續室溫反應 2h。反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有抗 B7H3 抗體 ADC 組合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR4) ，質譜法測定 DAR 值為 4.1。

(2)B7H3-C1-ADC-07(DAR4) 樣品製備

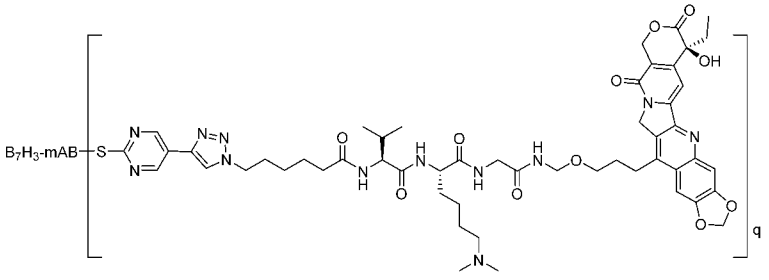
利用 B7H3-ADC-07(DAR4)製備的方法，將 2E3-02 抗體替換為抗體 B7H3-C1，獲得抗體 B7H3-C1 的 ADC 組合物的溶液 B7H3-C1-ADC-07(DAR4) ，質譜法測定 DAR 值為 4.9。



【0812】4.1.7.4 B7H3-ADC-07(DAR6)樣品製備

取 5ml 2E3-02 抗體（抗 B7H3，濃度 28.5mg/ml，20mM 醋酸緩衝液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸緩衝液稀釋，隨後添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液並混勻，用 0.5M 磷酸氫二鈉水溶液調樣品 pH 至 7.6 後加入抗體 4.5 倍當量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦鹽酸鹽）溶液並混勻，室溫下反應 90min。最後加入抗體 7.2 倍當量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混勻後繼續室溫反應 2h。反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有抗 B7H3 抗體 ADC 組合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR6)，質譜法測定 DAR 值為 5.4。

【0813】實施例 4.1.8：B7H3-ADC-08 的製備



【0814】4.1.8.1 B7H3-ADC-08(DAR8)樣品製備

用化合物 DL-028 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-08(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.3。同時，用化合物 DL-028 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-08(DAR8)，質譜法測定 DAR 值，結果如下：

肽鏈	理論值	實測值	面積	比例	DAR
LC	23335	未檢出	0	0	7.321946
LC+DAR1	24368.4	23247.05	70520268	1	
HC	50735	50371.9	409745	0.068972	
HC+DAR1	51768.4	51405.98	151226	0.025456	
HC+DAR2	52801.8	52438.75	482382	0.081199	
HC+DAR3	53835.2	53471.3	4897381	0.824373	

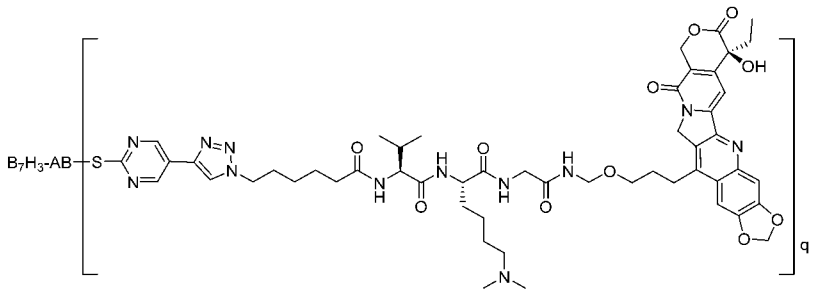
【0815】4.1.8.2

（1）B7H3-ADC-08(DAR4)樣品製備

用化合物 DL-028 代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的製備的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-08(DAR4)，質譜法測定 DAR 值為 4.7。

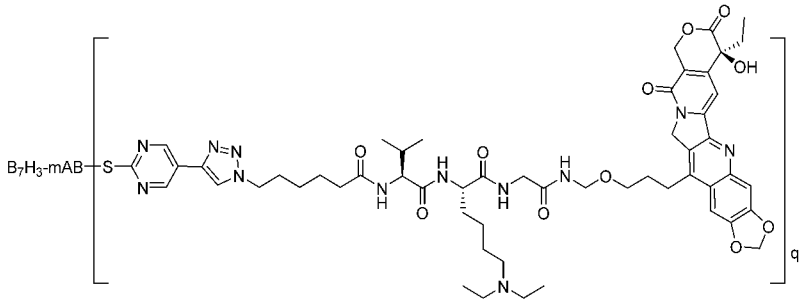
（2）B7H3-C1-ADC-08(DAR4)

用化合物 DL-028 代替實施例 4.1.7.3 B7H3-C1-ADC-07(DAR4) 的製備的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-C1-ADC-08，質譜法測定 DAR 值為 4.7。



【0816】實施例 4.1.9：B7H3-ADC-09 的製備

用化合物 DL-029 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-09。質譜法測定 DAR 值為 7.6。

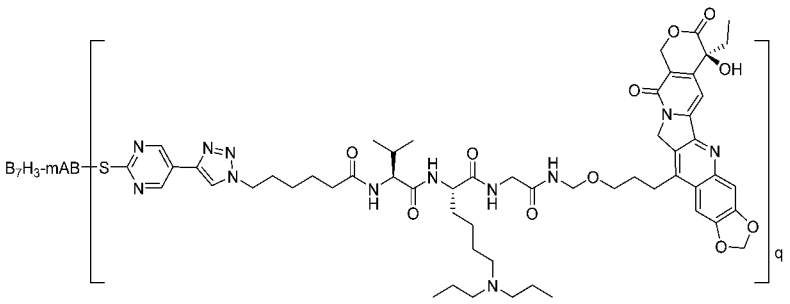


同時，用化合物 DL-029 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-029 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-09，質譜法測定 DAR 值，結果如下：

肽鏈	理論值	實測值	面積	比例	DAR
LC	23245	23247.03	6274384	0.094179	7.811641
LC+DAR1	24306	24308.41	60347328	0.905821	
HC	50367	未檢出	0	0	
HC+DAR1	51428	未檢出	0	0	
HC+DAR2	52489	未檢出	0	0	
HC+DAR3	53550	53555.46	10285189	1	

【0817】實施例 4.1.10：B7H3-ADC-10 的製備

用化合物 DL-030 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-10。質譜法測定 DAR 值為 7.6。

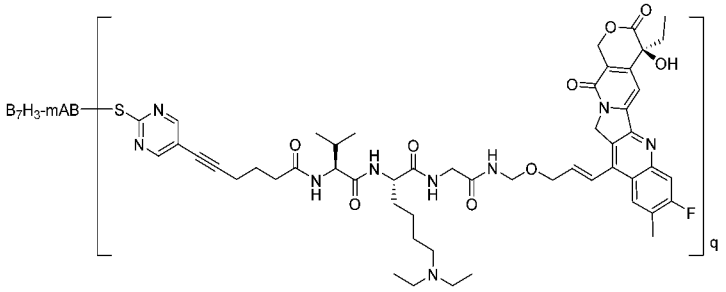


同時，用化合物 DL-030 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-030 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-10，質譜法測定 DAR 值，結果如下：

肽鏈	理論值	實測值	面積	比例	DAR
LC	23245	未檢出	0	0	8
LC+DAR1	24194.4	24336.45	66512554	1	
HC	50367	未檢出	0	0	
HC+DAR1	51316.4	未檢出	0	0	
HC+DAR2	52165.8	未檢出	0	0	
HC+DAR3	53215.2	未檢出	11529758	1	

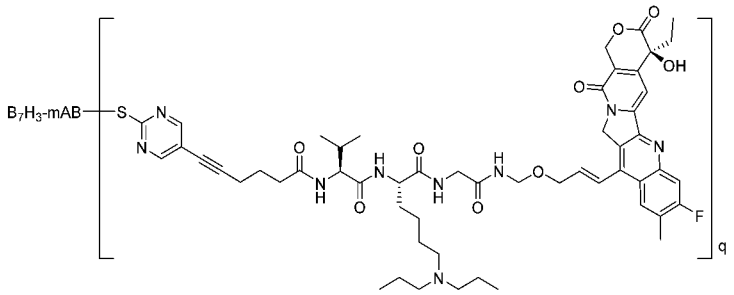
【0818】實施例 4.1.11：B7H3-ADC-11 的製備

用化合物 DL-045 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-045 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-11。質譜法測定 DAR 值為 7.5。



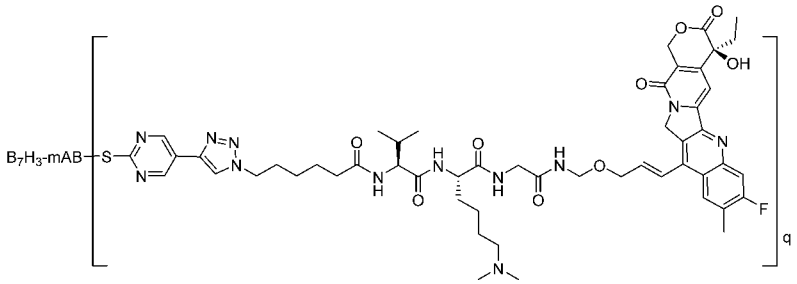
【0819】實施例 4.1.12：B7H3-ADC-12 的製備

用化合物 DL-046 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-046 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-12。質譜法測定 DAR 值為 7.6。



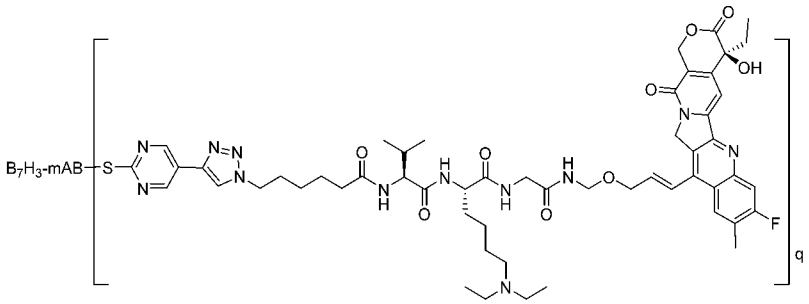
【0820】實施例 4.1.13：B7H3-ADC-13 的製備

用化合物 DL-041 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-041 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-13。質譜法測定 DAR 值為 7.8。

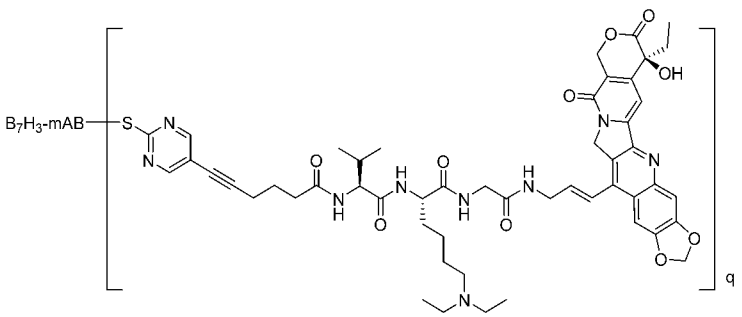


【0821】實施例 4.1.14：B7H3-ADC-14 的製備

用化合物 DL-042 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-042 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-14。質譜法測定 DAR 值為 7.9。



【0822】實施例 4.1.15：B7H3-ADC-15 的製備



【0823】4.1.15.1 B7H3-ADC-15(DAR8)樣品製備

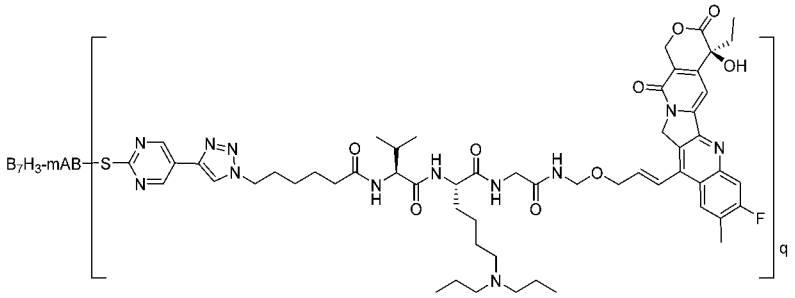
用化合物 DL-027 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-027 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-15(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.8。

【0824】4.1.15.2 B7H3-ADC-15(DAR4)樣品製備

用化合物 DL-027 代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的製備的化合物 DL-037，得到 DL-027 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-15(DAR4)，質譜法測定 DAR 值為 3.4。

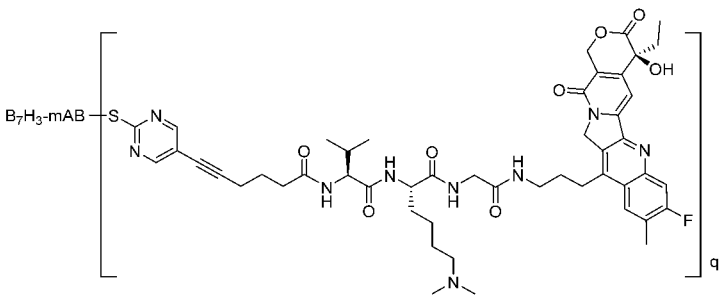
【0825】實施例 4.1.16：B7H3-ADC-16 的製備

用化合物 DL-043 代替實施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-043 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-16。質譜法測定 DAR 值為 7.4。



【0826】實施例 4.1.17：B7H3-ADC-17 的製備

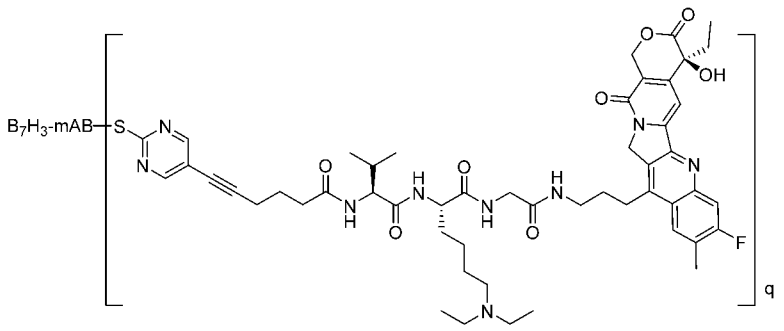
用化合物 DL-024 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-024 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-17，質譜法測定 DAR 值。



【0827】實施例 4.1.18：B7H3-ADC-18 的製備

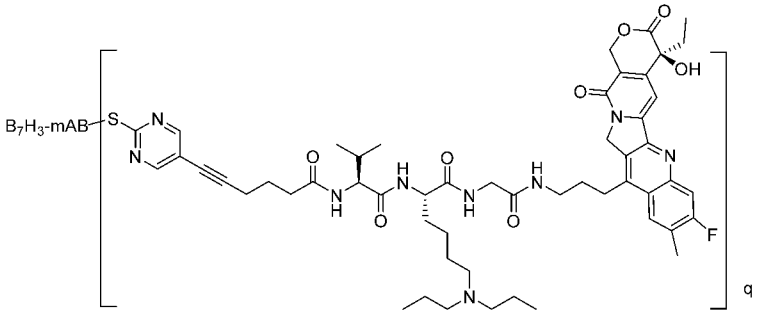
用化合物 DL-025 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到

DL-025 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-18，質譜法測定 DAR 值 8.0。



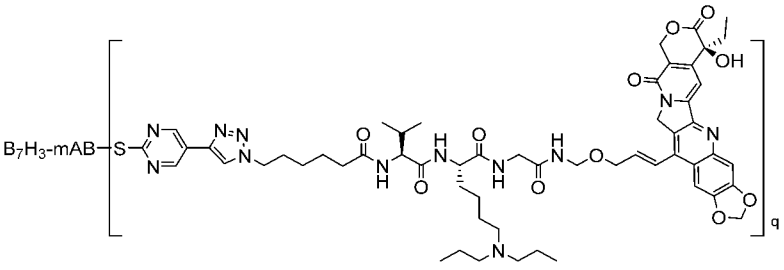
【0828】實施例 4.1.19：B7H3-ADC-19 的製備

用化合物 DL-026 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-026 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-19，質譜法測定 DAR 值 8.0。



【0829】實施例 4.1.20：B7H3-ADC-20 的製備

用化合物 DL-038 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-038 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-20，質譜法測定 DAR 值為 7.3。

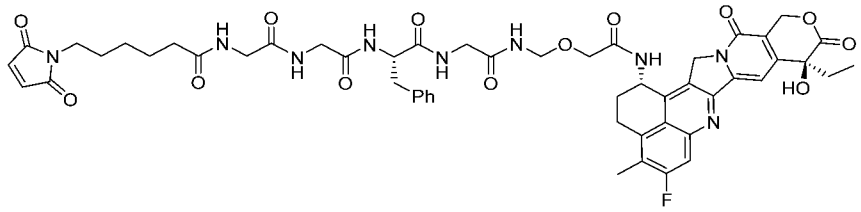


肽鏈	理論值	實測值	面積	比例	DAR
LC	23245	23247.17	29131808	0.323854	7.306055
LC+DAR1	24331.5	24334.63	60821684	0.676146	
HC	50375	未檢出	0	0	
HC+DAR1	51461	未檢出	0	0	

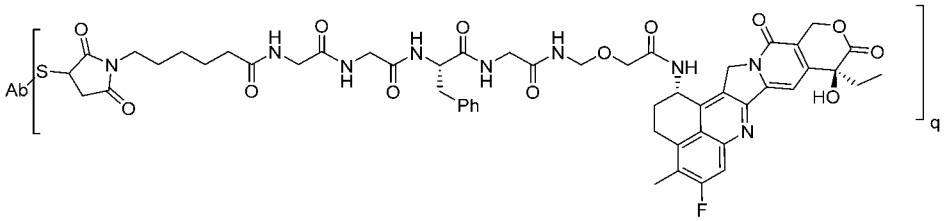
HC+DAR2	52547.83	52547.83	159238	0.023119	
HC+DAR3	53633.84	53633.84	6728635	0.976881	

【0830】實施例 4.1.21：B7H3-ADC-21 的製備

參照 CN104755494B 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



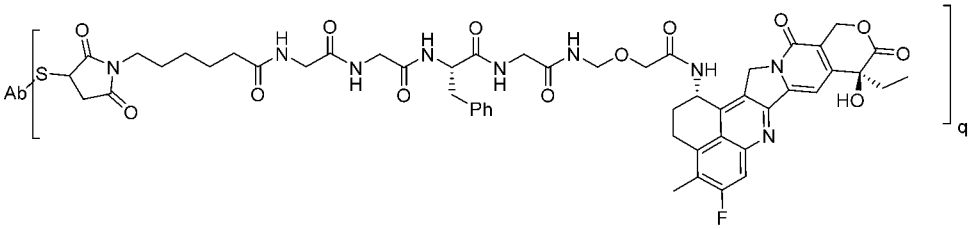
用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7.1 製備方法 B 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-21（DAR8），其結構如下，並質譜法測定 DAR 值為 7.8。



用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7.2 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-21（DAR2），其結構如下，並質譜法測定 DAR 值為 2.0。

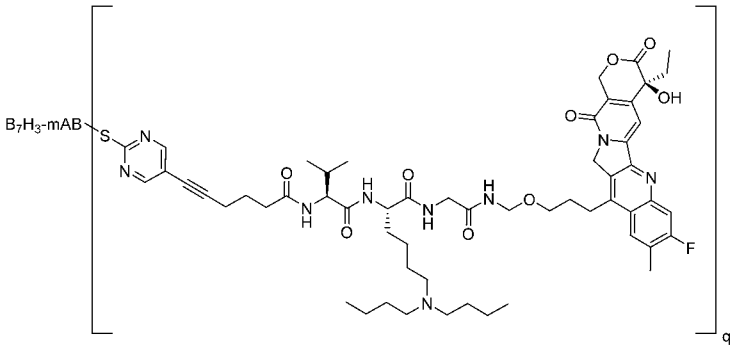
用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，對照卡尼 1 替換 2E3-02 抗體，獲得 B7H3-C1-ADC-21（DAR4），其結構如下，並質譜法測定 DAR 值為 4.5。

用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7.4 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-21（DAR6），其結構如下，並質譜法測定 DAR 值為 5.4。



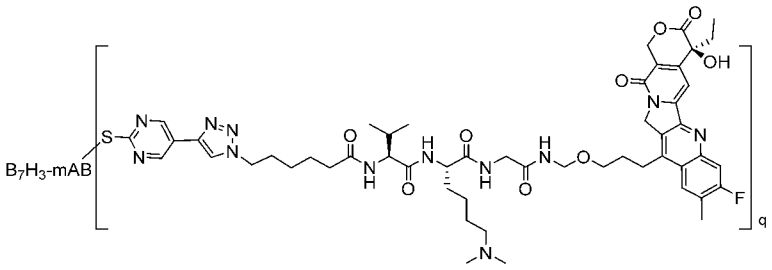
【0831】實施例 4.1.22：B7H3-ADC-22 的製備

用化合物 DL-048 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-048 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-22，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



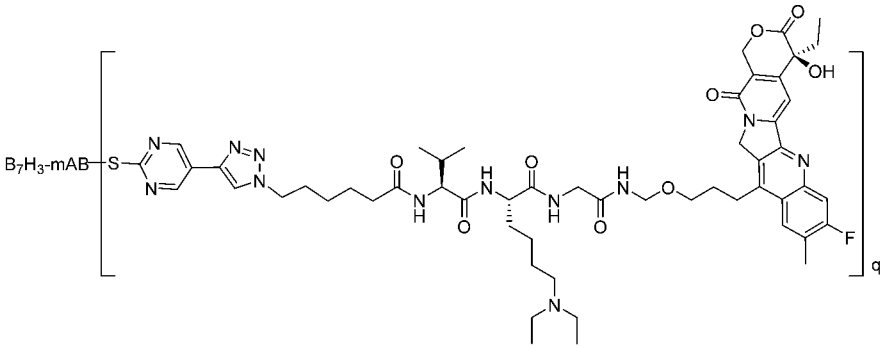
【0832】實施例 4.1.23：B7H3-ADC-23 的製備

【0833】用化合物 DL-031 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-031 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-23，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



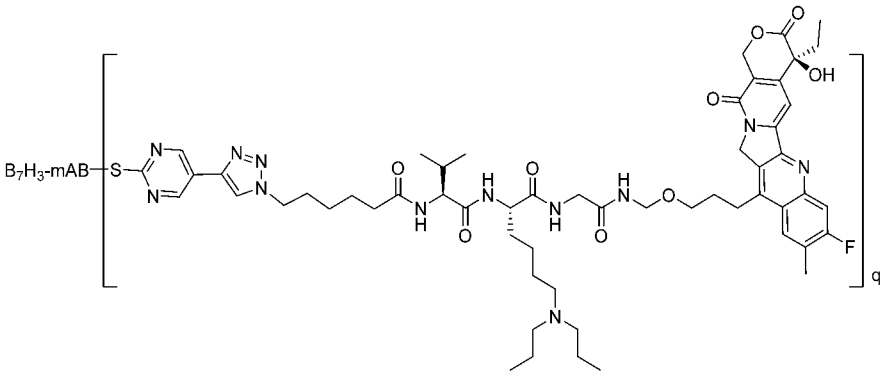
【0834】實施例 4.1.24：B7H3-ADC-24 的製備

用化合物 DL-032 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-032 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-24，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



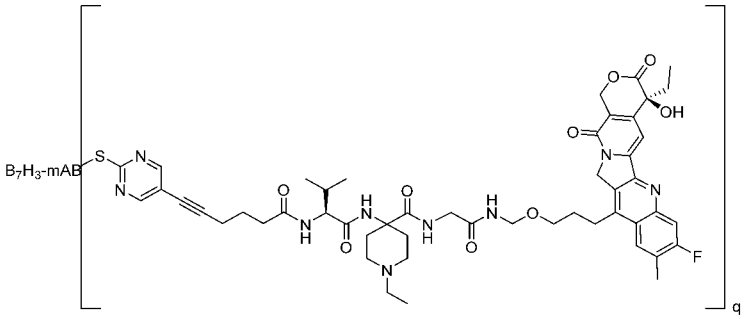
【0835】實施例 4.1.25：B7H3-ADC-25 的製備

【0836】用化合物 DL-033 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-033 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-25，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



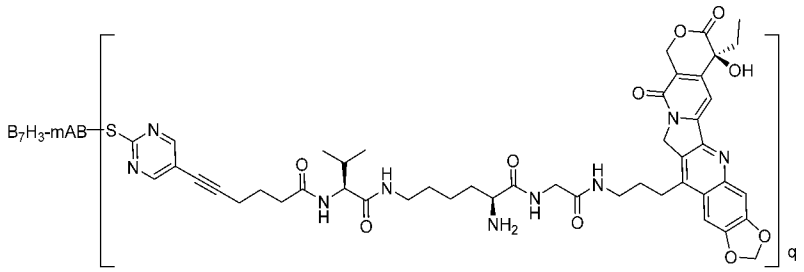
【0837】實施例 4.1.27：B7H3-ADC-27 的製備

用化合物 DL-050 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-050 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-27，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



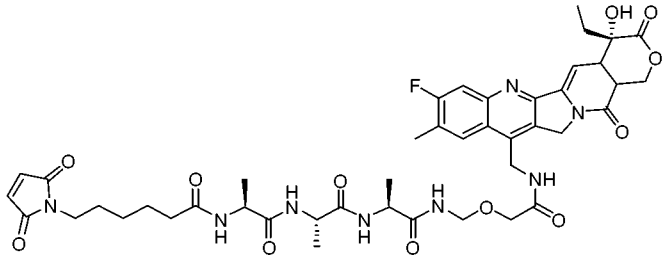
【0838】實施例 4.1.28：B7H3-ADC-28 的製備

用化合物 DL-021 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-021 與 B7H3 抗體的偶聯產物 B7H3-ADC-28，質譜法測定 DAR 值為 8.0。



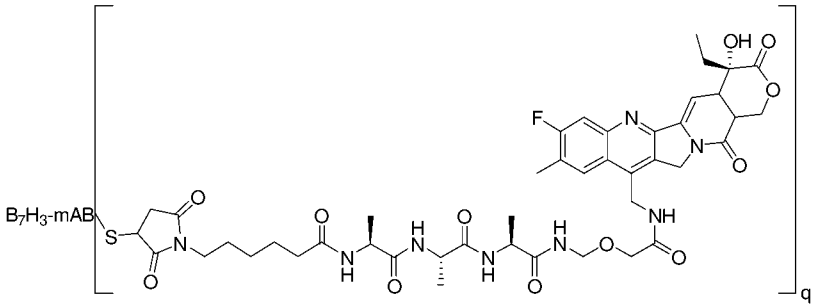
【0839】實施例 4.1.29：B7H3-ADC-32 的製備

參照 WO2020219287 實施例 16 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



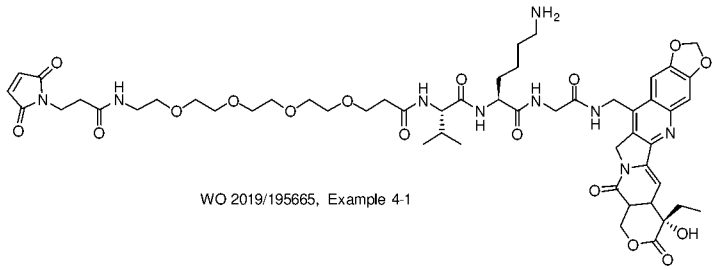
WO 2020/219287, Example 22a

用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4. 1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-32。質譜法測定 DAR 值為 7.3。

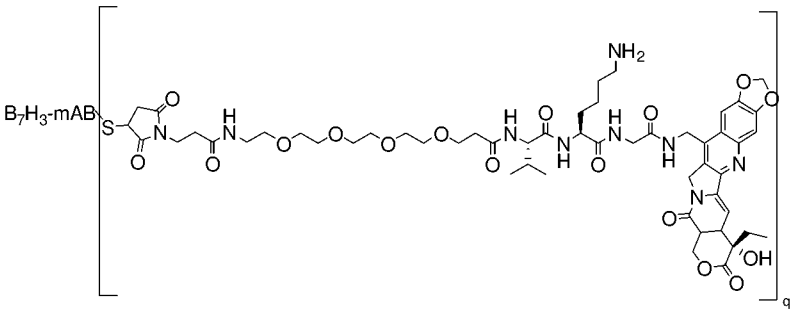


【0840】實施例 4.1.30：B7H3-ADC-33 的製備

參照 WO2019195665 實施例 4-1 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



WO 2019/195665, Example 4-1



【0841】4.1.30.1 B7H3-ADC-33(DAR8)樣品製備

用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4. 1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-33(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.4。

【0842】4.1.30.2 B7H3-ADC-33(DAR4)樣品製備

用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4. 1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的製備的化合物 DL-037，獲得 B7H3-ADC-33（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 4.9。

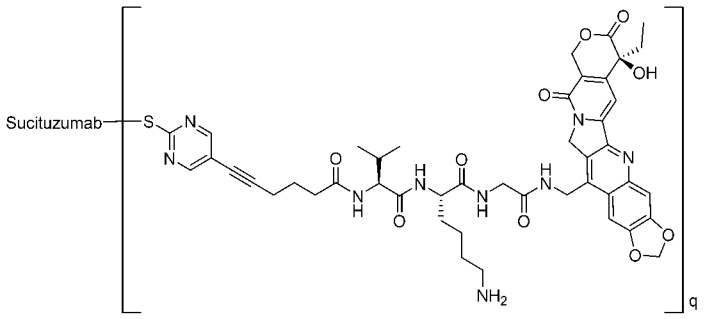
注：B7H3-mAB 為 2E3-02 抗體，B7H3-AB 為 B7H3-C1。

【0843】4.2：Trop2-ADC 的製備

【0844】實施例 4.2.1 Trop2-ADC-01（DAR8）的製備

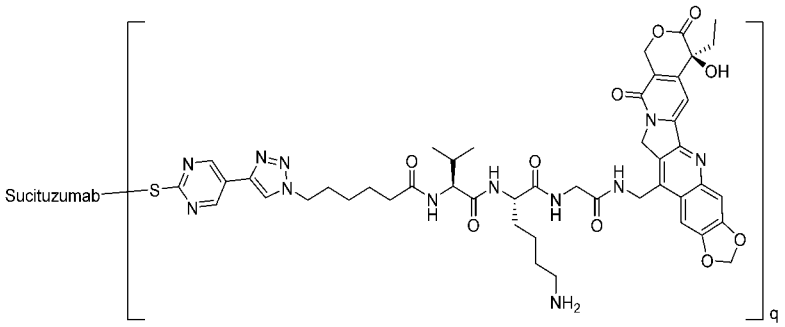
取 0.3mL Sacituzumab 抗體（抗 Trop-2，33.5mg/mL），用 0.25mL 20mM PB+150mM NaCl+20mM 依地酸鈉溶液（pH 7.6）稀釋，後加入 0.45mL 20mM PB+150mM NaCl 溶液（pH 7.6）混勻，以 1M K_2HPO_4 溶液調 pH 至 7.4，加入 10 mM TCEP（三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol）溶液混勻，室溫放置 30 min。向上述溶液體系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗體物質摩爾數量）的二甲基亞碸（0.1mL）溶液，混勻，室溫靜置 2h，完畢後加入 100mM 半胱胺酸 6.1μl 終止反應。最後採用 G-25 凝膠柱將緩衝液置換為 pH6.44 的 20 mM PB 緩衝溶液。得到 DL-001 與 Sacituzumab 抗體的偶

聯產物 Trop2-ADC-01（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



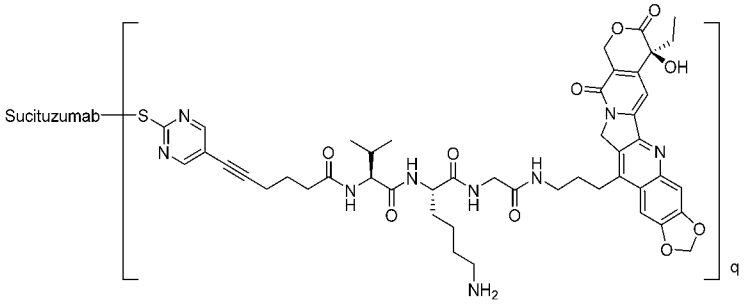
【0845】實施例 4.2.2：Trop2-ADC-02（DAR8）的製備

用化合物 DL-009 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-009 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-02（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。



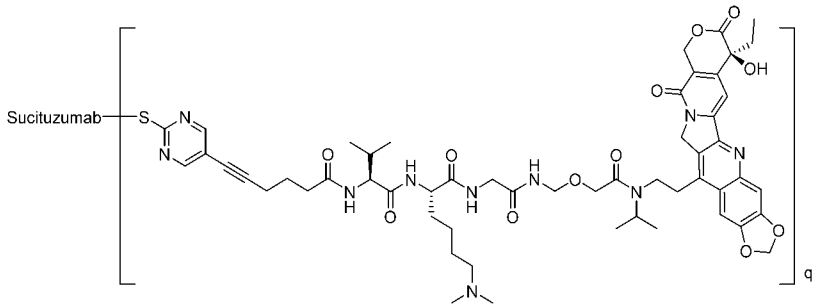
【0846】實施例 4.2.3：Trop2-ADC-03（DAR8）的製備

用化合物 DL-011 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-03（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



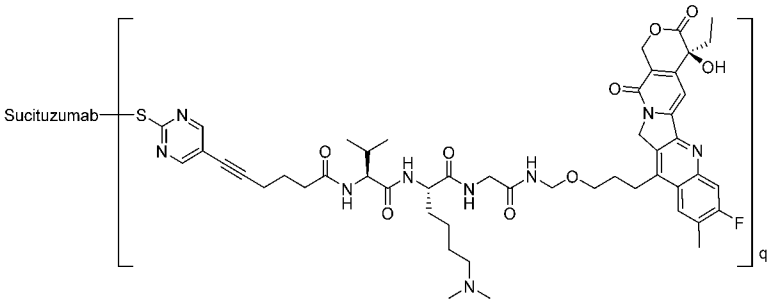
【0847】實施例 4.2.4：Trop2-ADC-04（DAR8）的製備

用化合物 DL-015 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-015 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-04（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。



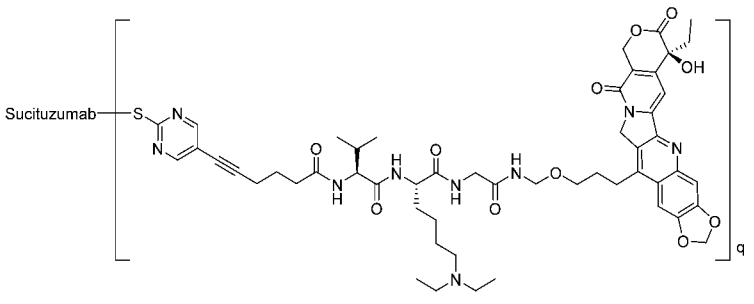
【0848】實施例 4.2.5：Trop2-ADC-05（DAR8）的製備

用化合物 DL-018 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-05（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。



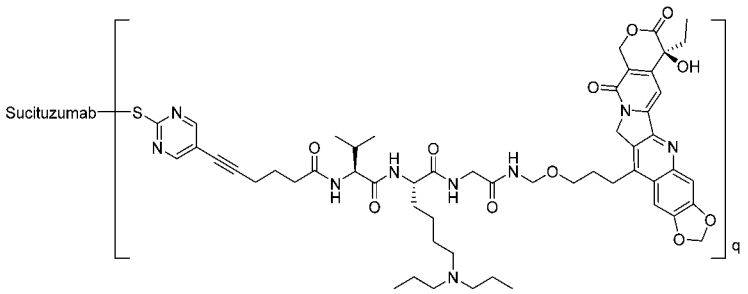
【0849】實施例 4.2.6：Trop2-ADC-06（DAR8）的製備

用化合物 DL-036 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-06（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



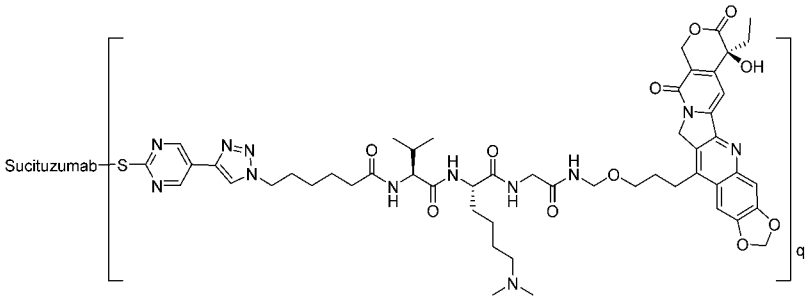
【0850】實施例 4.2.7：Trop2-ADC-07（DAR8）的製備

用化合物 DL-037 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-07（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



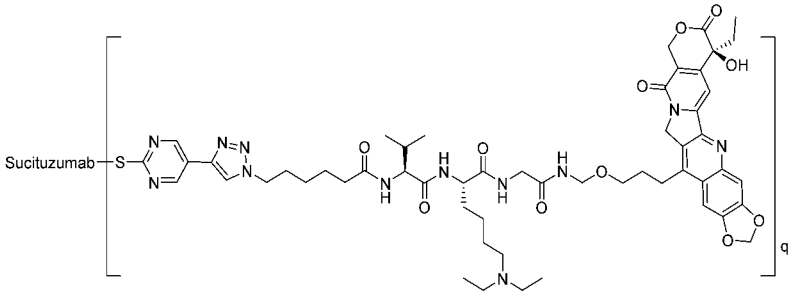
【0851】實施例 4.2.8：Trop2-ADC-08（DAR8）的製備

用化合物 DL-028 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-08（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.3。



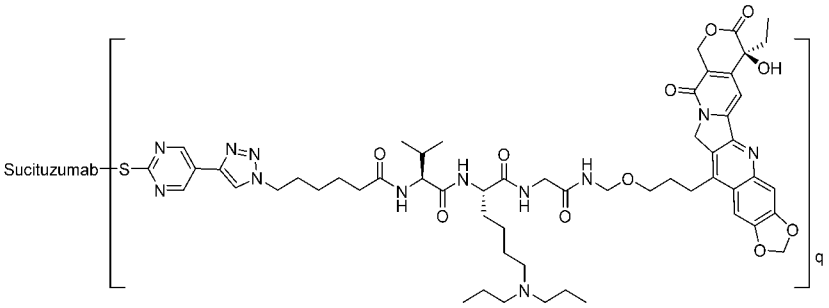
【0852】實施例 4.2.9：Trop2-ADC-09（DAR8）的製備

用化合物 DL-029 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-09（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.6。



【0853】實施例 4.2.10：Trop2-ADC-10（DAR8）的製備

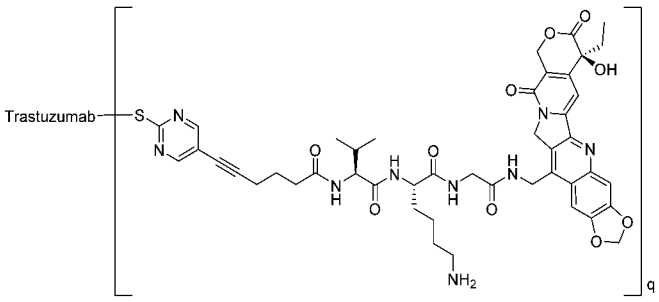
用化合物 DL-030 代替實施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 與 Sacituzumab 抗體的偶聯產物 Trop2-ADC-10（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.6。



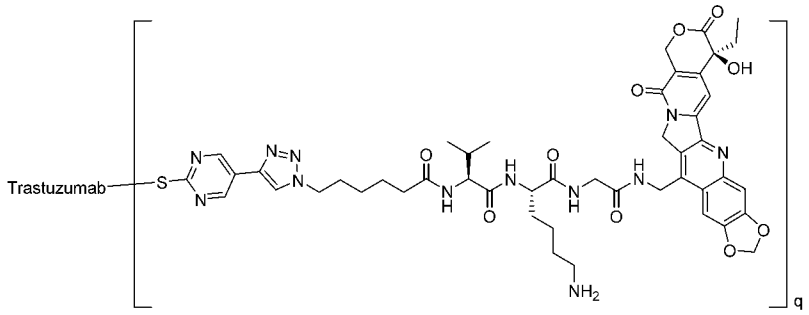
【0854】4.3：Her2-ADC 的製備

【0855】實施例 4.3.1：Her2-ADC-01（DAR8）的製備

在 37°C 條件下，向 Trastuzumab 的 PBS 緩衝溶液（pH=6.5，1ml，10.05mg/ml，0.0677μmol）加入 TCEP（10 mM，三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol），溶液混勻，37°C 條件下放置 3 小時。向上述溶液體系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗體物質摩爾數量）的二甲基亞碸（0.1mL）溶液，混勻，室溫靜置 3h，完畢後加入 100mM 半胱胺酸 6.1μl 終止反應。最後採用 G-25 凝膠柱將緩衝液置換為 pH6.44 的 20 mM PB 緩衝溶液。得到 DL-001 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-01（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

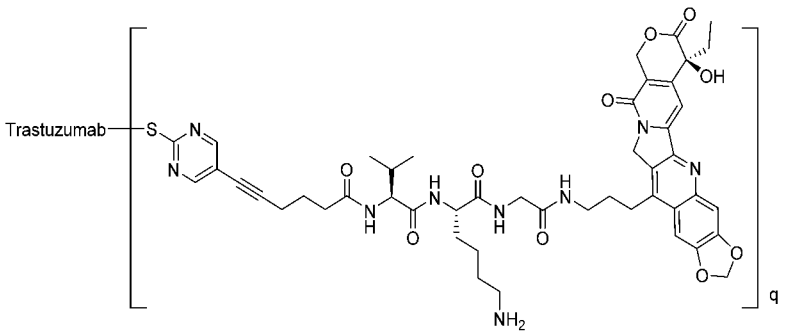


【0856】實施例 4.3.2：Her2-ADC-02（DAR8）的製備



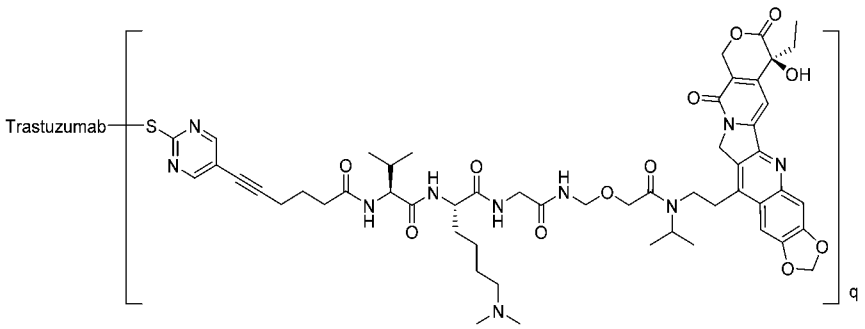
用化合物 DL-009 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-009 與 Trastuzumab 抗體偶聯的產物 Her2-ADC-02（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

【0857】實施例 4.3.3：Her2-ADC-03（DAR8）的製備



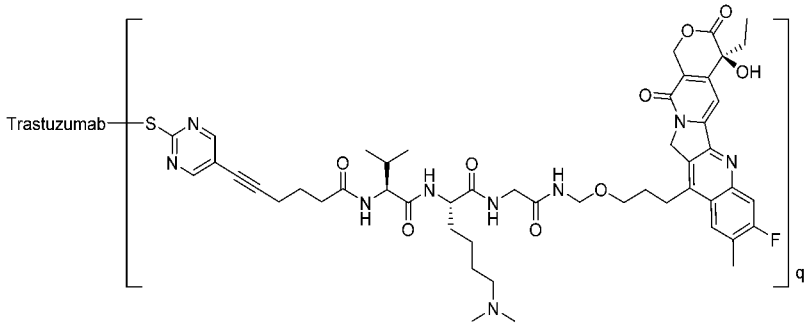
用化合物 DL-011 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 與 Trastuzumab 抗體偶聯的產物 Her2-ADC-03（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。

【0858】實施例 4.3.4：Her2-ADC-04（DAR8）的製備



用化合物 DL-015 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-015 與 Trastuzumab 抗體偶聯的產物 Her2-ADC-04（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

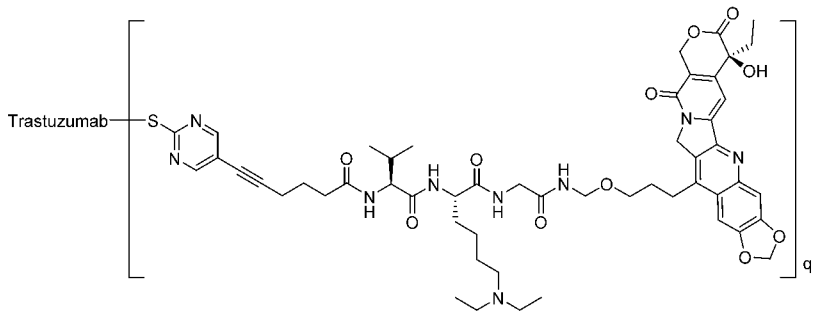
【0859】實施例 4.3.5：Her2-ADC-05（DAR8）的製備



用化合物 DL-018 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 與 Trastuzumab 抗體偶聯的產物 Her2-ADC-05（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

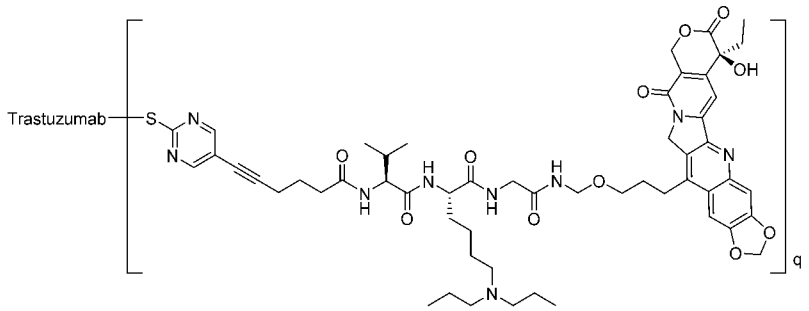
【0860】實施例 4.3.6：Her2-ADC-06（DAR8）的製備

用化合物 DL-036 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-06（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



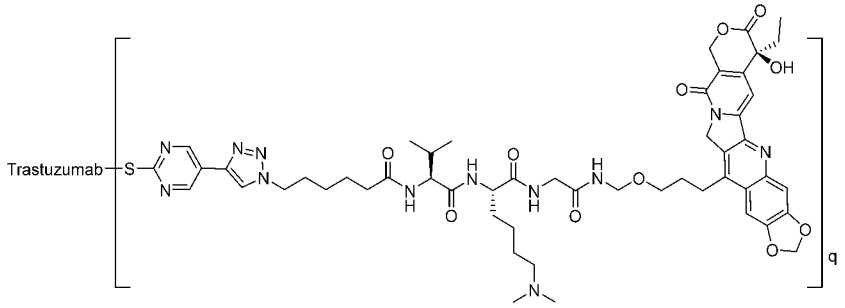
【0861】實施例 4.3.7：Her2-ADC-07（DAR8）的製備

用化合物 DL-037 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-07（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.7。



【0862】實施例 4.3.8：Her2-ADC-08（DAR8）的製備

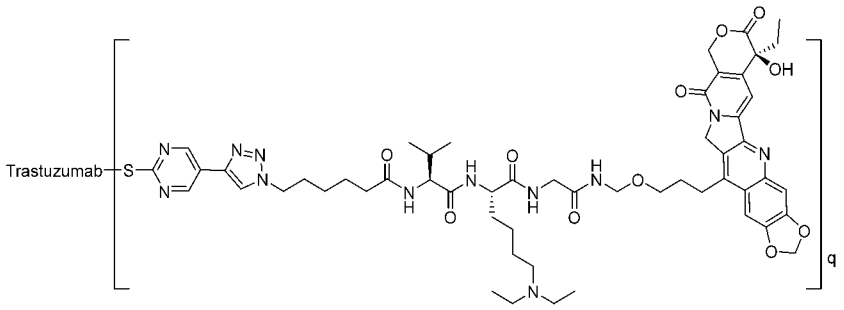
【0863】用化合物 DL-028 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-08（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.3。



【0864】實施例 4.3.9：Her2-ADC-09（DAR8）的製備

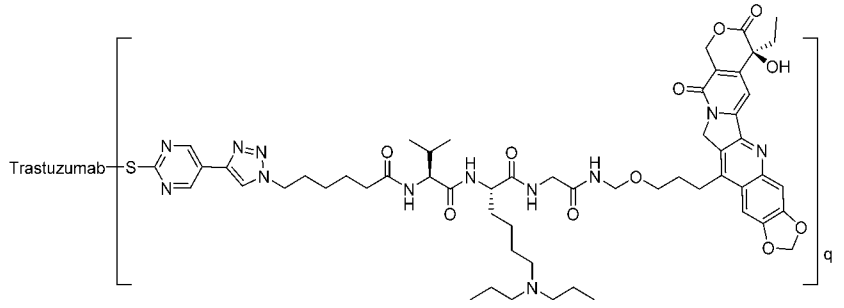
用化合物 DL-029 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-09（DAR8）。質譜法測定 DAR 值

為 7.6。



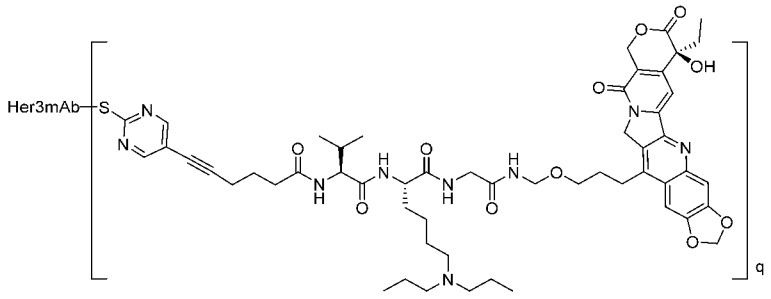
【0865】實施例 4.3.10：Her2-ADC-10（DAR8）的製備

用化合物 DL-030 代替實施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 與 Trastuzumab 抗體的偶聯產物 Her2-ADC-10（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.6。



【0866】4.4：Her3-ADC 的製備

【0867】實施例 4.4.1：Her3-ADC-07 的製備



【0868】4.4.1.1 Her3-ADC-07（DAR8）樣品製備

將抗 Her3 抗體 202-2-1 30 mg，用稀釋液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀釋，加入終濃度為 5mM 的依地酸鈉溶液，混勻；加入抗體 4.5 倍當量的 TCEP 溶液，混勻，室溫放置 30 分鐘；向上述溶液體系加入抗體

10 倍當量的溶解於二甲基亞碸中的 DL-037，混勻，室溫靜置 2 小時，得到偶聯後樣品，反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有 202-2-1 抗體 ADC 組合物的溶液 Her3-ADC-07（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.98。

【0869】4.4.1.2 Her3-ADC-07(DAR4)樣品製備

將抗 Her3 抗體 202-2-1 30 mg，用稀釋液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀釋，加入終濃度為 5mM 的依地酸鈉溶液，混勻；加入抗體 4.5 倍當量的 TCEP 溶液，混勻，室溫放置 30 分鐘；向上述溶液體系加入抗體 4.8 倍當量的溶解於二甲基亞碸中的 DL-037，混勻，室溫靜置 2 小時，得到偶聯後樣品，反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有 202-2-1 抗體 ADC 組合物的溶液 Her3-ADC-07(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.5。

【0870】4.4.1.3 Her3-ADC-07(DAR6)樣品製備

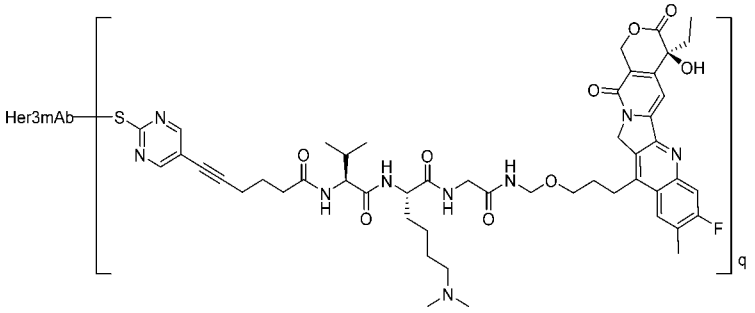
將抗 Her3 抗體 202-2-1 30 mg，用稀釋液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀釋，加入終濃度為 5mM 的依地酸鈉溶液，混勻；加入抗體 4.5 倍當量的 TCEP 溶液，混勻，室溫放置 30 分鐘；向上述溶液體系加入抗體 7.2 倍當量的溶解於二甲基亞碸中的 DL-037，混勻，室溫靜置 2 小時，得到偶聯後樣品，反應結束後使用 30KDa 的超濾管將樣品置換到 pH 為 5.5 的 10mM 組胺酸緩衝液中並去除低分子物質，最後將樣品濃縮以獲得含有 202-2-1 抗體 ADC 組合物的溶液 Her3-ADC-07(DAR6)。質譜法測定 DAR

值為 5.8。

【0871】實施例 4.4.2：Her3-ADC-05 的製備

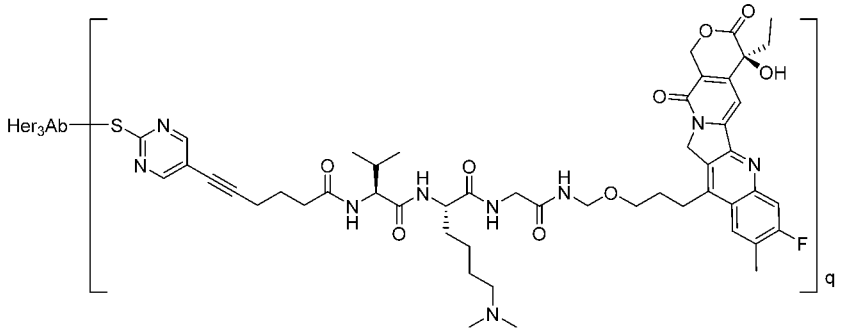
【0872】4.4.2.1 Her3-ADC-05(DAR4)樣品製備

利用 DL-018 代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到 DL-018 與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-05(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.0。

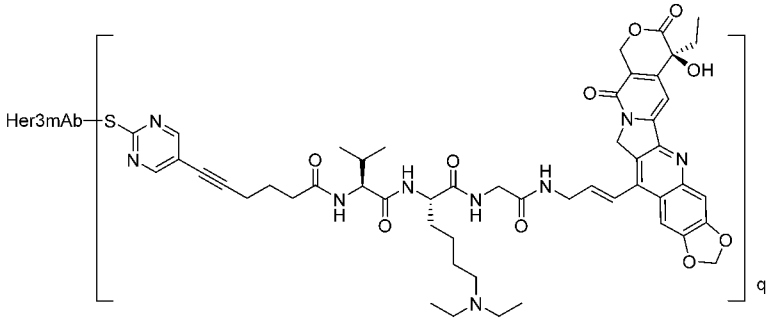


【0873】4.4.2.2 Her3-C3-ADC-05(DAR4) (DAR4)樣品製備

利用 DL-018 代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，抗體 Her3-C3 代替實施例 4.4.1.2 的抗 Her3 抗體 202-2-1，得到 DL-018 與 Her3-C3 的偶聯產物 Her3-C3-ADC-05(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.7。



【0874】實施例 4.4.3：Her3-ADC-15 的製備



【0875】4.4.3.1 Her3-ADC-15(DAR8)樣品製備

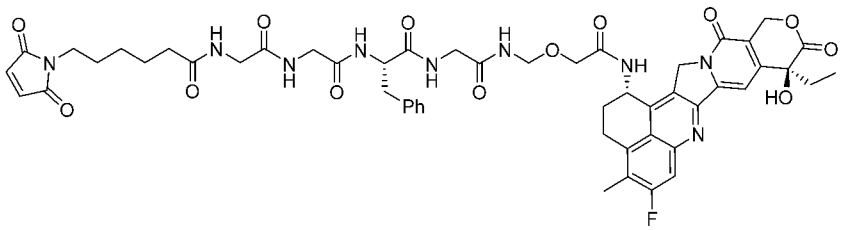
利用 DL-027 代替實施例 4.4.1.1 的化合物 DL-037，得到 DL-027 與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-15(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 7.9。

【0876】4.4.3.2 Her3-ADC-15(DAR2)樣品製備

利用 DL-027 代替實施例 4.1.7.2 的化合物 DL-037，抗 Her3 抗體 202-2-1 代替實施例 4.1.7.2 的 2E3-02 抗體，得到 DL-027 與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-15(DAR2)。質譜法測定 DAR 值為 2。

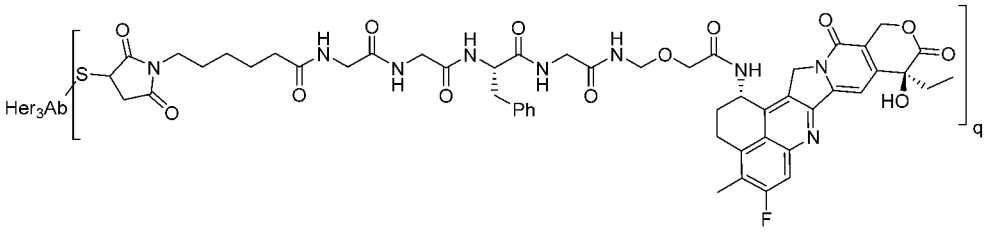
【0877】實施例 4.4.4：Her3-ADC-21 的製備

參照 CN104755494B 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



【0878】4.4.4.1 Her3-C3-ADC-21(DAR4)樣品製備

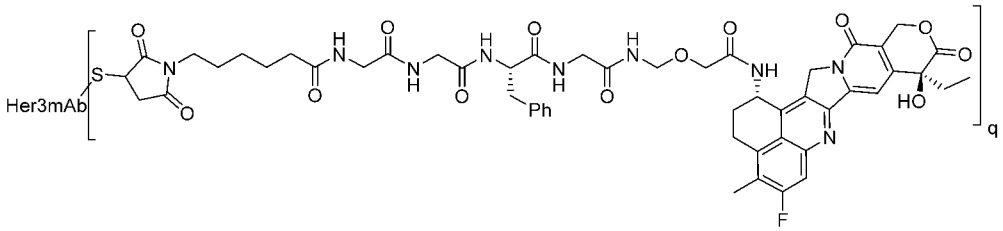
利用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，抗體 Her3-C3 代替實施例 4.4.1.2 的抗 Her3 抗體 202-2-1，得到 Her3-C3-ADC-21(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.4。



【0879】4.4.4.2 Her3-ADC-21(DAR4)樣品製備

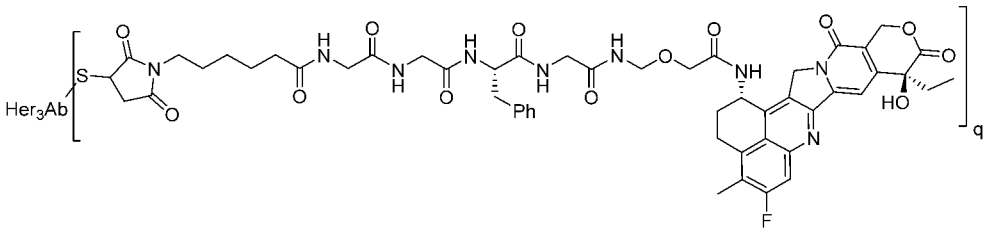
利用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到上述藥物-連接體化合物與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-21(DAR4)。質

譜法測定 DAR 值為 4.1。



【0880】4.4.4.3 Her3-C3-ADC-21(DAR8)樣品製備

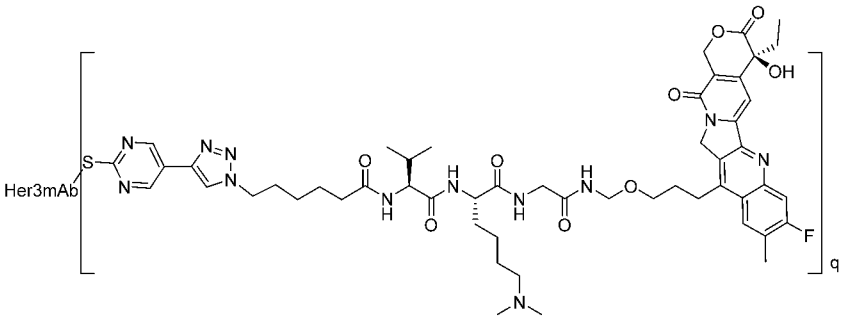
利用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.4.1.1 的化合物 DL-037，抗體 Her3-C3 代替實施例 4.4.1.1 的抗 Her3 抗體 202-2-1，得到 Her3-C3-ADC-21(DAR8)。質譜法測定 DAR 值為 9.5。



【0881】實施例 4.4.5：Her3-ADC-23 的製備

【0882】4.4.5.1 Her3-ADC-23(DAR4)樣品製備

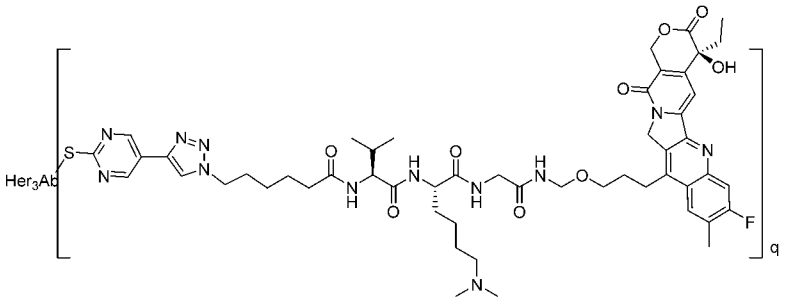
利用 DL-031 代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到 DL-031 與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-23(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.2.



【0883】4.4.5.2 Her3-C3-ADC-23(DAR4)樣品製備

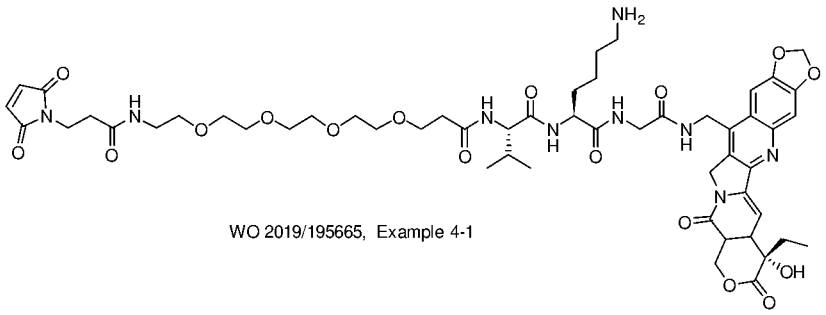
利用 DL-031 代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，用抗體 Her3-C3 代替 4.4.1.2 的 Her3 抗體 202-2-1，得到 DL-031 與抗體 Her3-C3 的偶聯產物

Her3-C3-ADC-23(DAR4)。質譜法測定 DAR 值為 4.9。

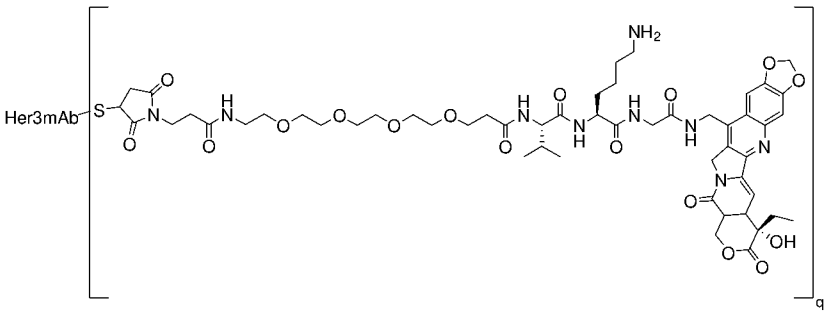


【0884】實施例 4.4.6：Her3-ADC-33 的製備

參照 WO2019195665 實施例 4-1 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



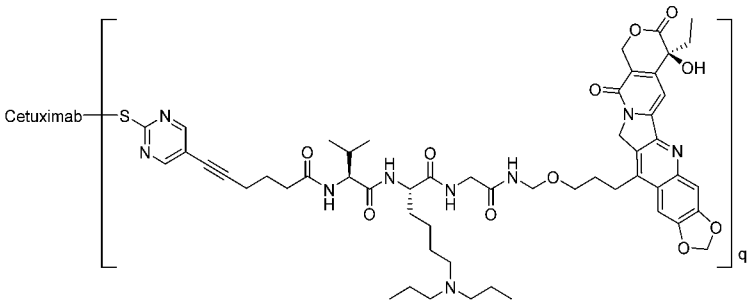
用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到上述藥物-連接體化合物與 202-2-1 抗體的偶聯產物 Her3-ADC-33（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 5.6。



注：Her3mAb 為 202-2-1 抗體，Her3Ab 為抗體 Her3-C3。

【0885】4.5：EGFR-ADC 的製備

【0886】4.5.1 EGFR-ADC-07 的製備



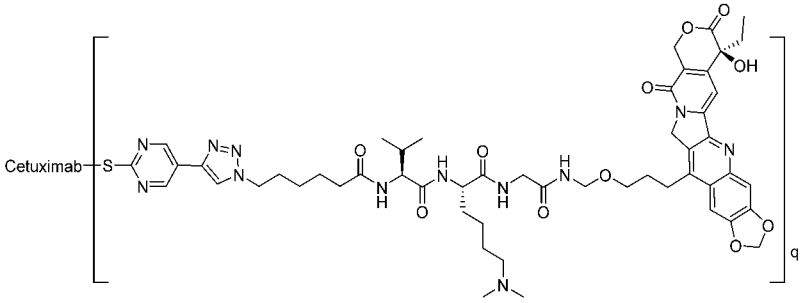
【0887】4.5.1.1 EGFR-ADC-07（DAR8）樣品製備

用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的 2E3-02 抗體，得到 DL-037 與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-07（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.8。

【0888】4.5.1.2 EGFR-ADC-07（DAR4）樣品製備

用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)製備方法的 2E3-02 抗體，得到 DL-037 與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-07（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 5.0。

【0889】4.5.2 EGFR-ADC-08 的製備



【0890】4.5.2.1 EGFR-ADC-08（DAR8）樣品製備

用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的 2E3-02 抗體，用 DL-028 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-08（DAR8）。質譜法測定 DAR 值為 7.3。

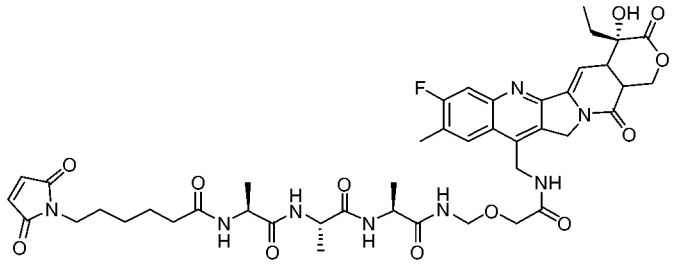
【0891】4.5.2.2 EGFR-ADC-08（DAR4）樣品製備

用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)製備方法的

2E3-02 抗體，用 DL-028 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-08（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 4.3。

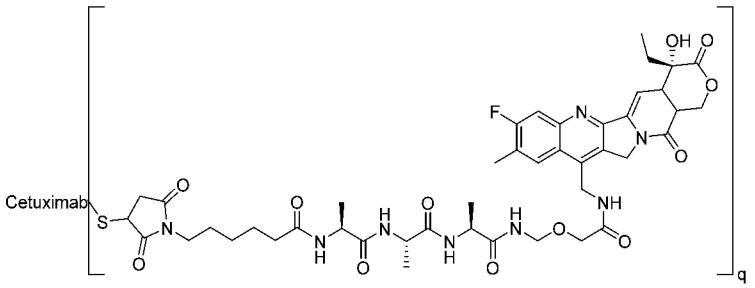
【0892】4.5.3 EGFR-ADC-32（DAR4）樣品製備

參照 WO2020219287 實施例 16 製備獲得藥物-連接體化合物如下，



WO 2020/219287, Example 22a

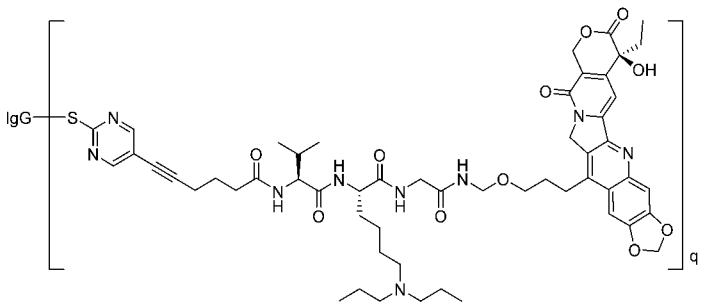
用 Cetuximab 抗體代替實施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)製備方法的 2E3-02 抗體，用上述藥物-連接體化合物代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到上述藥物-連接體化合物與 Cetuximab 抗體的偶聯產物 EGFR-ADC-32（DAR4）。質譜法測定 DAR 值為 4.9。



【0893】4.6： IgG-ADC 的製備

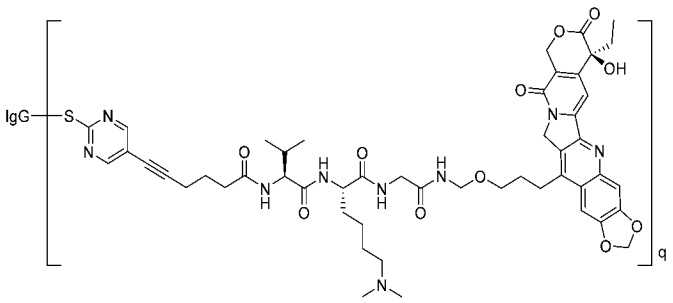
【0894】實施例 4.6.1：IgG1-ADC-07 的製備

用 IgG1 同型抗體（抗雞融菌酶抗體，蘇州宜聯生物醫藥有限公司製備）代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的 2E3-02 抗體，得到 DL-037 與 IgG1 抗體的偶聯產物 IgG1-ADC-07。質譜法測定 DAR 值為 8.0。



【0895】實施例 4.6.2：IgG1-ADC-04 的製備

用 IgG1 同型抗體（抗雞融菌酶抗體，蘇州宜聯生物醫藥有限公司製備）代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的 2E3-02 抗體，用化合物 DL-019 代替實施例 4.1.7 製備方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-019 與 IgG1 抗體的偶聯產物 IgG1-ADC-04。質譜法測定 DAR 值為 7.9。



【0896】五、ADC 的鑒定

【0897】實施例 5.1． SEC-HPLC 測定

通過 SEC-HPLC 監測偶聯反應，對抗體偶聯物的 SEC 檢測。

儀器型號：Agilent 1200

色譜條件：

色譜柱：TSKgel G3000SWXL，7.8×300mm，5μm

流動相：60mmol/L Na_2HPO_4，40mmol/L NaH_2PO_4，200mmol/L NaCl。

柱溫：室溫 樣品室溫度：8℃ 流速：0.8 ml/min

進樣量：200μg 檢測波長：280nm。

樣品處理：用超純水將樣品 B7H3-ADC-07（DAR8）稀釋至 10mg/ml，進

樣體積 20μl。

抗體偶聯前後的 SEC 色譜圖如圖 8 所示，抗體偶聯前後，主峰分子量約為 150kD，可知偶聯產物仍保持抗體的完整結構。

【0898】實施例 5.2．採用質譜法進行偶聯後樣品的 DAR 值測定之一

色譜條件：

色譜柱：PLRP-S，2.1*50mm,5μm；

流動相 A：0.1%FA /H2O; 流動相 B：0.1%FA/ACN

柱溫：30℃ 樣品室溫度：8℃ 流速：0.6 ml/min 進樣量：2μl

時間（min）	1	5	5.1	7	10
流動相 A	90	40	10	90	90
流動相 B	10	60	90	10	10

樣品處理：取 B7H3-ADC-07 樣品 50 μg，加入 1M DTT2μl，加超純水至 50μl 稀釋至約 1.0 mg/ml 濃度，混勻，室溫還原 30min。

LC/MS 型號：Agilent 1290-6545XT Q-TOF

質譜條件：Gas temp：320℃，Drying Gas： Nebulizer ：35 psi；Sheath Gas Temp ：350℃；sheath Gas Flow ：11 l/min；m/z 500~3000。

結果如下所示：

肽鏈		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理論值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
	實測值	23247.41	24265.49	未檢出	未檢出
HC	理論值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
	實測值	未檢出	未檢出	未檢出	53426.64

表中，mAb 表示未偶聯的抗體；LC 代表抗體輕鏈；HC 代表抗體重鏈；DAR1 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 1 個毒素分子的偶聯物；DAR2 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 2 個毒素分子的偶聯物；DAR3 代表包含輕鏈或重鏈偶聯

3 個毒素分子的偶聯物；其中，單抗理論分子量以 G0F 糖型計算。下文中 mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3 如上說明。

測定 2E3-02 抗體輕鏈偶聯 0~1 個毒素分子（LC，DAR1 比例分別為 1.0%，99.0%）、重鏈偶聯 0~3 個毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分別為 0%，0%，0%，100%），由此計算 B7H3-ADC-07（DAR8）的抗體-藥物偶聯比（DAR 值）為 7.98。

【0899】實施例 5.3 採用質譜法進行偶聯後樣品的 DAR 值測定之二

利用 5.2 相同的實驗條件，對樣品 B7H3-ADC-07(DAR2)，B7H3-ADC-07(DAR4)，B7H3- ADC-07(DAR6)進行分子量測定，結果如下：

樣品名稱	肽鏈		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
B7H3-ADC-07(DAR2)	LC	理論值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		實測值	23247	未檢出	未檢出	未檢出
	HC	理論值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		實測值	50372	51389	52408	53426
B7H3-ADC-07(DAR4)	LC	理論值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		實測值	23247	24265	未檢出	未檢出
	HC	理論值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		實測值	50372	51389	52408	53426
B7H3-ADC-07(DAR6)	LC	理論值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		實測值	23247	24265	未檢出	未檢出
	HC	理論值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		實測值	50372	未檢出	52408	53426

並計算 DAR 值結果為：B7H3-ADC-07(DAR2)的 DAR 值為 2.3；B7H3-ADC-07(DAR4)的 DAR 值為 4.1；B7H3-ADC-07(DAR6)的 DAR 值為 5.4。

【0900】實施例 5.4 LC-MS 測定 Trop2-ADC-01 分子量和藥物-抗體比（DAR）

對 Trop2-ADC-01 進行 LCMS 分子量分析。

色譜測定條件：

液相色譜柱：ACQUITU UPLC® Protein BEH C4 1.7μm，2.1mm x 100mm；

流動相 A：0.1%FA/98%H_2O/2%ACN；流動相 B：0.1%FA/2%H_2O/98%ACN；

流速：0.25 mL/min；樣品室溫度：8 °C；柱溫：60 °C；進樣量：1μg；

時間(分鐘)	1	7	8	9	13
流動相 A (體積%)	90	20	20	90	90
流動相 B (體積%)	10	80	80	10	10

質譜測定條件：

質譜型號：Triple TOF 5600+；

GS1 60；GS2 60；CUR30；TEM600；ISVF5000；DP300；CE10 m/z600-5000。

Trop2-ADC-01 理論分子量及實測分子量

糖型		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	理論值	23334.0	24209.7	25085.4		
	實測值	未檢出	24209.9	未檢出	未檢出	未檢出
HC-G0F	理論值	50734.0	51609.7	52485.4	53361.1	56024.7
	實測值	未檢出	未檢出	52485.3	53361.2	未檢出

表中，mAb 表示單克隆抗體；LC 代表抗體輕鏈；HC 表示抗體重鏈；DAR1 表示包含一條抗體輕鏈/重鏈和一個細胞生物活性分子的偶聯物；DAR2 表示包含一條抗體輕鏈/重鏈和兩個細胞生物活性分子的偶聯物；DAR3 表示包含一條抗體輕鏈/重鏈和三個細胞生物活性分子的偶聯物；

DAR4 表示包含一條抗體輕鏈/重鏈和四個細胞生物活性分子的偶聯物；糖型表示兩條重鏈上的糖鏈結構：G0F 表示岩藻糖化無半乳糖。

抗體與化合物 DL-001 偶聯後，輕重鏈分子量均發生變化，其中輕鏈偶聯 1 個細胞生物活性分子、重鏈偶聯 2.9 個細胞生物活性分子，由此推知整個抗體與細胞生物活性分子的偶聯比（DAR）為 7.8。

【0901】實施例 5.5 LC-MS 測定 Her3-ADC 分子量和藥物-抗體比（DAR）

檢測：對 Her3-ADC-07（DAR8）進行 LC-MS 分子量和 DAR 值分析，條件如下：

色譜條件：

色譜柱：PLRP-S，2.1*50mm,5μm；

流動相 A：0.1%FA /H2O; 流動相 B：0.1%FA/ACN

柱溫：30℃ 樣品室溫度：8℃ 流速：0.6 ml/min 進樣量：2μl

時間（min）	1	5	5.1	7	10
流動相 A	90	40	10	90	90
流動相 B	10	60	90	10	10

樣品處理：分別取樣品 50 μg，加入 1M DTT2μl，加超純水至 50μl 稀釋至約 1.0 mg/ml 濃度，混勻，室溫還原 30min。

LC/MS 型號：Agilent 1290-6545XT Q-TOF

質譜條件：Gas temp：320℃，Drying Gas： Nebulizer ：35 psi；Sheath Gas Temp ：350℃；sheath Gas Flow ：11 l/min；m/z 500~3000。

結果如下所示：

肽鏈		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理論值	23243.8	24261.2	25278.6	26296
	實測值	未檢出	24258	未檢出	未檢出

HC	理論值	50598.6	51616	52633.4	53650.8
	實測值	未檢出	未檢出	未檢出	53646

上表中，mAb 表示未偶聯的單克隆抗體；LC 代表抗體輕鏈；HC 代表抗體重鏈；DAR1 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 1 個毒素分子的偶聯物；DAR2 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 2 個毒素分子的偶聯物；DAR3 代表包含輕鏈或重鏈偶聯 3 個毒素分子的偶聯物；其中，單抗理論分子量以 G0F 糖型計算。下文中 mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3 如上說明。

檢測結果顯示，Her3-ADC-07（DAR8）上抗體輕鏈偶聯 0~1 個毒素分子（LC，DAR1 比例分別為 0%，100%）、重鏈偶聯 0~3 個毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分別為 0%，0%，0%，100%），由此計算 Her3-ADC-07（DAR8）的藥物抗體偶聯比（DAR 值）為 8.0。

可以理解，本公開的 ADC 都可以通過相同或類似的方法測定分子量和藥物-抗體比（DAR）。

【0902】六、生物活性分子以及抗體藥物偶聯的生物活性測定

【0903】實施例 6.1：生物活性分子對體外細胞活性的抑制活性檢測一

首先培養腫瘤細胞；將本公開的生物活性分子與腫瘤細胞進行共培養，然後添加 CCK8 試劑（東仁化學科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶標儀（廠家：Molecular Devices, 型號：SpectraMax M2）讀數（檢測波長為 450nm），檢測線粒體內的脫氫酶的活性，以評價生物活性分子對細胞增殖的抑制作用。

腫瘤細胞來源見表 5。

表 5.

細胞名稱	腫瘤類型	來源

NCl-H358	人非小細胞肺癌	ATCC，CRL-5807
HT29	人結腸癌細胞	ATCC，HTB-38
LS174T	人結腸腺癌細胞	ATCC，CL-187
NCl-H322M	人非小細胞肺癌	ATCC
PANC-1	人胰腺癌腫瘤細胞	ATCC，CRL-1469
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物

體外細胞活性檢測方法：用對應檢測培養基（含 2% FBS）稀釋生物活性分子（12 個濃度梯度）。使用胰酶通過常規方法對腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸。將稀釋的生物活性分子加入 96 孔板中，再加入細胞。然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 4 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗結果如表 6.1,6.2,6.3,6.4,6.5 所示。

參照 CN104755494B 製備獲得 DXD，具體結構如下，

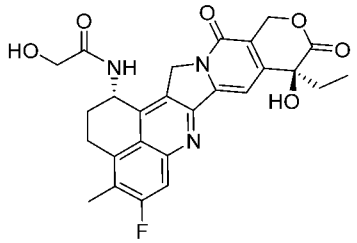


表 6.1：生物活性分子對 NCl-H358 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.10	NCl-H358	8.11
DXD		39.02

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.8D	NCl-H358	7.919
A1.15a		3.882
DXD		21.43

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.4	NCl-H358	29.91
A1.8		296.4
A1.9		60.79
A1.11		202.9

A1.12		167.1
A1.13		49.19
A1.14		122.6
DXD		148.45±10.87 (n=4)

表 6.2：生物活性分子對 HT29 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.10	HT29	5.965
DXD		49.47

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.15a	HT29	3.574
A1.15b		47.52
DXD		64.84

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.4	HT29	29.45
A1.8		367.1
A1.9		57.5
A1.11		284.5
A1.12		211.8
A1.13		96.85
A1.14		155.9
DXD		301.875±69.00 (n=4)

表 6.3：生物活性分子對 LS174T 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.15a	LS174T	19.49
A1.15b		44.62
DXD		82.05

表 6.4：生物活性分子對 NCl-H322M 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.9	NCl-H322M	30.45
DXD		76.89

表 6.5：生物活性分子對 PANC-1 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.9	PANC-1	94.54
DXD		966

表 6.6 生物活性分子對 HCC1806 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
A1.9	HCC1806 (7500 細胞/孔，3 天)	1.9
Dxd		37

測試結果表明，本公開的生物活性分子具有腫瘤細胞殺傷作用。

【0904】實施例 6.2：生物活性分子對體外細胞活性的抑制活性檢測二

首先培養腫瘤細胞 NUCG-4，PC-9，HT29，NCI-H358，KYSE520，A431 和 A549；將本公開的生物活性分子或片段與腫瘤細胞進行共培養，然後添加 CCK8 試劑（東仁化學科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶標儀（廠家：Molecular Devices, 型號：SpectraMax M2）讀數（檢測波長為 450nm），檢測線粒體內的脫氫酶的活性，以評價生物活性分子對細胞增殖的抑制作用。腫瘤細胞來源見表 7。

表 7：腫瘤細胞來源

細胞名稱	腫瘤類型	來源
NUCG-4	胃癌	南京科佰
PC-9	肺腺癌	ATCC
HT29	結腸癌	ATCC，HTB-38
NCI-H358	非小細胞肺癌	ATCC，CRL-5807
KYSE520	食管癌	ATCC
A431	人皮膚鱗狀癌（人表皮癌）細胞	ATCC
A549	非小細胞肺癌	ATCC

體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 5000-10000 細胞/孔加至 96 孔板。用 DMSO 稀釋的生物活性分子，加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 10μM 開始，3 倍稀釋（12 個濃度梯度），37℃ 5%CO_2 培養 3-4 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測

波長為 450nm）。生物活性分子及其檢測結果如表 8 所示。

表 8：A1.9 和 B1.14 的活性測定

細胞	A1.9 EC_{50} nM	B1.14EC_{50} nM	DXD EC_{50} nM
NUCG-4	8.73	184.8	43.32
PC-9	2.06	34.32	16.69
HT29	20.32	367.9	210.5
NCI-H358	46.2	581.2	261.6
A431	5.71	67.97	25.08
A549	65.86	252.3	262.2

測試結果表明，生物活性分子 A1.9 和 B1.14 具有腫瘤細胞殺傷作用，其中 A1.9 在多個腫瘤細胞中均具有強於 Dxd 的腫瘤殺傷作用。A1.9 在 KYSE520 的體外細胞活性的抑制活性檢測中，EC50 為 49.62 nM，具有殺傷 KYSE520 的作用。

【0905】實施例 6.3：生物活性分子對體外細胞活性的抑制活性檢測三

首先培養腫瘤細胞 HT29（來源同上），將本公開的生物活性分子或片段與腫瘤細胞進行共培養，然後添加 CCK8 試劑（東仁化學科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶標儀（廠家：Molecular Devices, 型號：SpectraMax M2）讀數（檢測波長為 450nm），檢測線粒體內的脫氫酶的活性，以評價生物活性分子對細胞增殖的抑制作用。

體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 5000-10000 細胞/孔加至 96 孔板。用 DMSO 稀釋的生物活性分子，加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 10μM 開始，3 倍稀釋（12 個濃度梯度），37℃ 5%CO_2 培養 3-4 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。生物活性分子及其檢測結果如表 9 所示。

表 9：生物活性分子對 HT29 細胞殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
B1.9	HT29	262.2
B1.12		85.87
B1.17		204.8
DXD		22.89

測試結果表明，生物活性分子 B1.9、B1.12 和 B1.17 具有腫瘤細胞殺傷作用。

【0906】實施例 6.4：ADC 對體外細胞活性的抑制活性檢測

使用胰酶通過常規方法對 HT29 和 NCI-H358 腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 150μg/ml 起始，3 倍稀釋（12 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 7 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。ADC 及其檢測結果如表 10,表 11 所示。

表 10：部分 ADC 的活性測定

ADC	HT29 (EC_{50}, ng/mL)	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
B7H3-ADC-07(DAR8)	23555	21131
B7H3-ADC-05(DAR8)	33135	33490
B7H3-ADC-04(DAR8)	28793	28493
B7H3-ADC-22(DAR8)	24418	20825
B7H3-ADC-12(DAR8)	5032	4068
B7H3-ADC-27(DAR8)	28510	29155
B7H3-ADC-08(DAR8)	31669	34149
B7H3-ADC-23(DAR8)	21074	19578
B7H3-ADC-20(DAR8)	1348	1325
B7H3-ADC-09(DAR8)	22479	20751
2E3-02 抗體	弱	弱
B7H3-ADC-32(DAR8)	32472	30903

測試結果表明，本公開的 ADC 分子具有腫瘤細胞殺傷作用，其中大部分

ADC 具有強於 B7H3-ADC-32(DAR8)的腫瘤細胞殺傷作用。

表 11：部分 ADC 的活性測定

ADC	HT29 (EC_{50}, ng/mL)	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
B7H3-ADC-33(DAR8)	18380	20354
B7H3-ADC-15(DAR8)	1181	1015

測試結果表明，本公開的 ADC 分子具有腫瘤細胞殺傷作用，其中 B7H3-ADC-15(DAR8)具有強於 B7H3-ADC-33(DAR8)的腫瘤細胞殺傷作用。

同時對本公開的 ADC 分子 B7H3-ADC-07(DAR8)在 B7H3 陰性細胞 Calu-3 上測試，結果顯示殺傷效果弱（IC50>10^7ng/ml），說明體外在 B7H3 陽性與陰性腫瘤細胞間，本公開的 ADC 分子具有很好的選擇靶向性殺傷。

【0907】實施例 6.5：檢測多種靶點抗體藥物偶聯物對多種腫瘤細胞的體外抑制活性

【0908】A．B7H3 ADC 的多種腫瘤抑制活性測定

ADC 樣品：根據實施例製備獲得 ADC 樣品

體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對多種腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC(見表 12)加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 150μg/ml 起始，3 倍稀釋（11 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 7 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗細胞和檢測結果如表 12 所示。

表：12

細胞	B7H3-ADC-07(DAR8)	B7H3-ADC-21(DAR8)
PC-9(EC50, ng/mL)	3618	2377
HT29(EC50, ng/mL)	10433	7442
KYSE520(EC50,ng/mL)	5845	2842

NCI-H358(EC50,ng/mL)	15800	8060
NUCG-4(EC50,ng/mL)	4855	4158
A431(EC50, ng/mL)	7624	2478

測試結果表明，表 12.ADC 具有多種腫瘤細胞殺傷作用。

【0909】B．Her3 ADC 的多種腫瘤抑制活性測定

ADC 樣品：根據實施例製備獲得 ADC 樣品 Her3-ADC-07（DAR8）

體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對 PC-9 和 NCI-H358 腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 150μg/ml 起始，3 倍稀釋（11 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 7 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗細胞和檢測結果如表 13 所示。

表 13.

細胞	Her3-ADC-07（DAR8）
PC-9(EC_{50}, nM/L)	49.26
NCI-H358(EC_{50}, nM/L)	183.3

測試結果表明，Her3-ADC-07（DAR8）具有腫瘤細胞殺傷作用。

【0910】C.EGFR ADC 的腫瘤抑制活性測定

使用胰酶通過常規方法對 KYSE520 腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC（如表 14）加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 50μg/ml 起始，3 倍稀釋（11 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 5 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 1-4 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗細胞和檢測結果如表 14 所示。

表 14.

檢測組編號	ADC 樣品	KYSE520 (EC_{50}, ng/mL)
1	EGFR-ADC-07(DAR8)	11.56
	EGFR-ADC-07(DAR4)	18.17
	EGFR-ADC-32(DAR4)	29.21
2	Her3-ADC-05(DAR4)	19.01
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	32.94

測試結果表明，EGFR- ADC-07、Her3- ADC-05 和 Her3- C3-ADC-05 都具有很強的腫瘤細胞殺傷作用。

【0911】綜合以上測試結果表明，本申請公開多種靶點（如 B7H3,Her3,EGFR）的 ADC 對多種腫瘤細胞均具有殺傷作用。

【0912】D．Trop-2 抗體藥物偶聯物對體外細胞活性的抑制作用

首先培養腫瘤細胞 HCC1806（Trop-2 陽性細胞系）和 NCI-H23（Trop-2 陰性細胞系）；將本公開的生物活性分子及 ADC 分子與腫瘤細胞進行共培養，然後添加 CCK8 試劑（東仁化學科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶標儀（廠家：Molecular Devices, 型號：SpectraMax M2）讀數（檢測波長為 450nm），檢測線粒體內的脫氫酶的活性，以評價 ADC 對細胞增殖的抑制作用。腫瘤細胞來源見表 15。

表 15.

細胞名稱	腫瘤類型	來源
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物
NCI-H23	非小細胞肺癌	康諾泰

體外細胞活性檢測：用對應檢測培養基（含 2% FBS）稀釋生物活性分子或 ADC（12 個濃度梯度）。使用胰酶通過常規方法對腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸。將稀釋的生物活性分子或 ADC 加入 96 孔板中，再加入細胞。然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 4 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。實驗條件和檢

測結果如表 16 所示。

表 16：偶聯物對 Trop-2 陽性、陰性細胞系殺傷結果

名稱	細胞名稱	EC_{50}(nM)
Trop2-ADC-01（DAR8）	HCC1806 (7500 細胞/孔，3 天)	2.1
	NCI-H23 (10000 細胞/孔，3 天)	10000
Trop2-ADC-05（DAR8）	HCC1806 (7500 細胞/孔，3 天)	3.4
	NCI-H23 (10000 細胞/孔，3 天)	10000

測試結果表明，本公開的 ADC 分子具有腫瘤細胞殺傷作用。同時在 Trop-2 陽性與陰性細胞間，具有很好的靶向性。

【0913】實施例 6.6：不同 DAR 值得抗體藥物偶聯物對體外細胞活性的抑制作用

ADC 樣品：根據實施例製備獲得 ADC 樣品，體外細胞活性檢測方法：使用胰酶通過常規方法對 NCI-H358 腫瘤細胞進行消化，收集管細胞數，用對應的檢測培養基（含 2% FBS）重懸，將 2000-5000 細胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培養基稀釋的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，濃度從 150μg/ml 起始，3 倍稀釋（11 個濃度梯度）。37℃ 5%CO_2 培養 7 天，然後每孔加入 CCK8 試劑 20μL，反應至 2-6 小時，酶標儀讀數（檢測波長為 450nm）。各組樣品和檢測結果如表 17 所示。

表 17.

檢測組編號	ADC 樣品	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
1	B7H3-ADC-07(DAR4)	30428
	B7H3-C1-ADC-07(DAR4)	22174
	B7H3-C1-ADC-21(DAR4)	31057
2	Her3-ADC-05(DAR4)	47742
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	65109

	Her3-C3-ADC-21(DAR4)	76365
3	B7H3-ADC-07(DAR6)	27858
	B7H3-ADC-21(DAR6)	20629
4	B7H3-ADC-08(DAR4)	83363
	B7H3-C1-ADC-08(DAR4)	101649
5	Her3-ADC-23(DAR4)	49330
	Her3-C3-ADC-23(DAR4)	弱
6	Her3-ADC-15(DAR2)	5572
	Her3-ADC-15(DAR8)	2562
	Her3-ADC-33(DAR4)	50774
7	B7H3-ADC-15(DAR4)	2931
	B7H3-ADC-33(DAR4)	42071
	2E3-02 抗體	弱

本實例以及實例 6.5 C 測試結果表明，本申請公開的多種 DAR 值（如 4,6,8）的 ADC 對腫瘤細胞均具有殺傷作用。

【0914】實施例 6.7：B7H3 抗體藥物偶聯物體內活性測試

【0915】6.7.1 B7H3 抗體藥物偶聯物對 NCI-HT29 移植瘤藥效測試之一

【0916】1. 實驗材料

受試化合物：B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)、B7H3-ADC-08(DAR8)、B7H3-ADC-05(DAR8)、B7H3-ADC-06(DAR8)、B7H3-ADC-17(DAR8)、B7H3-ADC-18(DAR8)、B7H3-ADC-19(DAR8)、IgG1-ADC-04(DAR8)。

實驗細胞：NCI-HT29 細胞，購自 ATCC；

實驗動物：Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周齡，購自維通利華實驗動物有限公司。

【0917】2. 實驗方案

2.1. 細胞處理

NCI-HT29 細胞用含 10 %FBS 的 1640 培養基培養於 15 cm 直徑培養皿，達 80-90 %左右融合度時用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗兩次，然後離心重懸於預冷 PBS 中，細胞計數儀計數，PBS 稀釋使細胞濃度為 5×10^7/ml。

2.2. 腫瘤細胞移植

Balb/c nu 小鼠實驗室環境適應 2-5 天，於右肋部皮下接種 NCI-HT29 細胞，接種細胞量為 5×10^6/只，接種體積為 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待腫瘤生長至 250 mm^3 左右時，進行實驗。

2.3. 動物給藥與檢測

入組的荷瘤裸鼠，按以下方案給藥：

表 18

No.	組別	動物數量	給藥劑量	給藥途徑和週期
1	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
2	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
3	B7H3-ADC-08(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
4	B7H3-ADC-05(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
5	B7H3-ADC-06(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
6	B7H3-ADC-17(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
7	B7H3-ADC-18(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
8	B7H3-ADC-19(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
9	IgG1-ADC-04(DAR8) (對照組)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3

給藥週期結束後，繼續觀察 1-2 周。最後一次瘤體積測量後，分離腫瘤，準確稱取腫瘤重量並拍照記錄。

2.4. 腫瘤體積及體重測定：

每週測量 2 次瘤體積及體重，計算 TGI%和抑瘤率（TGI）（%），計算公式為：相對腫瘤增殖率 T/C(%)= TRTV / CRTV × 100%（TRTV：治療組平均 RTV ；CRTV：對照組平均 RTV；RTV=Vt/V0，V0 為分組時該動物的瘤體

積，Vt 為治療後該動物的瘤體積）；相對腫瘤抑制率 TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）。

腫瘤體積（V）計算公式為：V＝1/2×L 長×L 短 ^{2}, 其中 L 長、L 短分別表示腫瘤長徑、短徑。

【0918】3. 實驗結果

具體結果見表 19 和附圖 9，本申請 ADC 均顯示了對腫瘤生長的抑制作用，特別是 B7H3-ADC-05, B7H3-ADC-06、B7H3-ADC-07, B7H3-ADC-08 和 B7H3-ADC-17 具有很強的抑制腫瘤的效果，B7H3-ADC-18, B7H3-ADC-19 和 B7H3-ADC-21 的抑制腫瘤的效果接近。給藥期間，各組動物無明顯體重下降和明顯的藥物毒性。

表 19：NCI-HT29 移植瘤模型資料

	腫瘤體積 mm3						T/C（%）	TGI（%）
樣品	給藥 Day1	給藥 Day4	給藥 Day8	給藥 Day11	給藥 Day15	給藥 Day18		
IgG1-ADC-04(DAR8)	244.4	381.0	543.6	1061.2	1285.6	1821.8	-	-
B7H3-ADC-21(DAR8)	244.4	335.4	414.4	781.4	862.2	1233.4	62.70	37.30

B7H3-ADC-08(DAR8)	244.4	268.6	243	418.4	456.6	555.4	19.72	80.28
B7H3-ADC-05(DAR8)	244.4	286.2	221.8	479.6	574	745.2	31.75	68.25
B7H3-ADC-06(DAR8)	245.8	293.6	302.8	482.6	592.2	669	26.83	73.17
B7H3-ADC-07(DAR8)	243.6	276	253.2	414.8	461.8	576.4	21.10	78.90
B7H3-ADC-17(DAR8)	245.4	250.2	304.2	559.2	741	970	45.94	54.06
B7H3-ADC-18(DAR8)	245.2	302.2	413.4	741.4	958.8	1218.6	61.71	38.29
B7H3-ADC-19(DAR8)	245.2	318.6	441.4	784.6	1003.6	1244.6	63.36	36.64

【0919】6.7.2 B7H3 抗體藥物偶聯物對 NCI-HT29 移植瘤藥效測試之二

利用 5.3.1 相同的方法測定 B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-08(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)的移植瘤藥效，具體的分組和給藥方案如表 20 所示，

表 20：給藥方案

組號	組別	動物	給藥劑	給藥方	給藥頻次	給藥體

		數量	量	式		積
1	生理鹽水	5	-	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
2	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	10 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
3	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
4	B7H3-ADC-08(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
5	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	10 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
6	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg

獲得結果如表 21 所示，和附圖 10。

表 21：NCI-HT29 移植瘤模型資料

分組	平均腫瘤體積（mm^3）D1	平均腫瘤體積（mm^3）D18	T/C（%）D18	抑瘤率 TGI（%）D18
生理鹽水	232.2±35.1	1281.8±170.0	-	-
B7H3-ADC-21(DAR8) 10 mg/kg	231.8±49.6	679.2±141.7***	53.1	46.92
B7H3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg	232.2±41.4	1081.6±209.7	84.4	15.62
B7H3-ADC-08(DAR8) 3 mg/kg	232.6±37.5	675.8±190.0***	52.6	47.37
B7H3-ADC-07 (DAR8)10 mg/kg	231.6±45.9	363.8±162.4***	28.5	71.54
B7H3-ADC-07 (DAR8)3 mg/kg	231.8±65.0	579.2±281.8***	45.3	54.74

D1：首次給藥的第一天； *P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001。

腫瘤體積結果顯示，至試驗結束時（D18），B7H3-ADC-21 10 mg/kg 組，B7H3-ADC-08 3 mg/kg 組，B7H3-ADC-07 10 mg/kg、3 mg/kg 組動物腫瘤

體積顯著低於 Vehicle 對照組（P<0.001），抑瘤率分別為 46.92%，47.37%，71.54%，54.74%；B7H3-ADC-21 3 mg/kg 組腫瘤體積與 Vehicle 組相比未見統計學差異。體重結果顯示，至給藥結束時（D18），所有受試劑量組給藥期間體重均增加，顯示各劑量組均耐受良好。

【0920】6.7.3 B7H3 抗體藥物偶聯物對 NCI-H358 移植瘤藥效測試

【0921】1. 研究目的

評價受試藥物在人非小細胞肺癌 NCI-H358 皮下異種移植雌性 Balb/c Nude 小鼠模型中的抗腫瘤作用。

【0922】2. 受試物信息

B7H3-ADC-21(DAR8) 、 B7H3-ADC-05(DAR8) 、 B7H3-ADC-07(DAR8) 、 B7H3-ADC-09(DAR8)、B7H3-ADC-10(DAR8)，B7H3-ADC-20(DAR8)。

【0923】3. 試驗內容

參照本實施例 6.7.1 進行細胞處理 NCl-H358（ATCC，CRL-5807）和腫瘤細胞移植。

3.1 給藥及分組

每組的動物數及詳細的給藥途徑、劑量和方案見下表 22：

表 22：給藥方案

No.	給藥組	動物數量	給藥劑量(mg/kg)	給藥途徑和週期
1	生理鹽水	5	3	i.v., QW×3
2	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
3	B7H3-ADC-05(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
4	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
5	B7H3-ADC-09(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
6	B7H3-ADC-10(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
7	B7H3-ADC-20(DAR8)	5	3	i.v., QW×3

8	B7H3-ADC-20(DAR8)	5	1	i.v., QW×3

3.2 檢測指標

腫瘤體積及體重測定，每週測量 2 次瘤體積（mm^3）及體重，計算相對腫瘤增殖率 T/C(%)和相對腫瘤抑制率 TGI(%)。

腫瘤體積（V）計算公式為：V＝1/2×L 長×L 短 ^{2}；

相對腫瘤增殖率 T/C(%)= TRTV / CRTV × 100%（TRTV：治療組平均 RTV ；CRTV：對照組平均 RTV；RTV=Vt/V0，V0 為分組時該動物的瘤體積，Vt 為治療後該動物的瘤體積）；

相對腫瘤抑制率 TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）。

3.3 試驗終點

確定給藥期結束後，繼續觀察 1-2 周，隨後解剖取瘤，稱重並拍照。

【0924】4. 實驗結果

具體結果見表 23 和附圖 11,本申請 ADC 均顯示了對腫瘤生長的抑制作用，並且 ADC-20 的 3mg/kg 劑量優於 1mg/kg 劑量的抑制腫瘤效果。給藥期間，各組動物無明顯體重下降和明顯的藥物毒性。

表 23：NCI-H358 移植瘤模型資料（腫瘤體積 mm^3）

給藥後天數 / 組別	1	3	7	10	14	17	21
生理鹽水	234	256	262	294	378	434	604
B7H3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg	234	224	182	176	164	128	126
B7H3-ADC-05 (DAR8)3 mg/kg	233	249	180	130	110	94	87
B7H3-ADC-07 (DAR8)3 mg/kg	234	225	173	120	118	95	95
B7H3-ADC-09(DAR8) 3 mg/kg	233	180	177	139	114	103	97
B7H3-ADC-10(DAR8) 3 mg/kg	233	211	232	197	154	144	125
B7H3-ADC-20(DAR8) 3 mg/kg	233	191	184	172	170	162	202
B7H3-ADC-20(DAR8) 1 mg/kg	234	230	231	238	256	308	411

【0925】6.7.4 B7H3 抗體藥物偶聯物在前列腺癌皮下異種移植 PDX 模型中的藥效測試

【0926】1. 研究目的

測試 B7H3 抗體藥物偶聯物在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 皮下異種移植 NPG 雄鼠模型中的藥效

【0927】2. 受試物

B7H3-ADC-07(DAR8)、IgG1-ADC-07（DAR8）

【0928】3. 試驗內容

3.1 實驗小鼠資訊

NPG PR9586 模型的小鼠，周齡 6-9 周（腫瘤細胞接種時的小鼠預計周齡），雄性，共 100 只小鼠，購自北京維通達生物技術有限公司。

3.2 構建荷瘤小鼠模型

從 HuPrime®前列腺癌 PR9586(種族為 Western)荷瘤小鼠收取腫瘤組織，切成直徑為 2-3mm 的瘤塊接種於 NPG 右前肩胛處皮下。

當荷瘤鼠平均腫瘤體積到達約 100-200 （~150）mm^3 時，將小鼠按照“3.3 分組及給藥”表格進行隨機分組。各組內的腫瘤體積的變異係數(CV) 用公式 CV= SD/MTV×100%計算，應小於 40%。分組當天定義為第 1 天。

3.3. 分組及給藥

每組的動物數及詳細的給藥途徑、劑量和方案見下表 24。

表 24：實驗動物分組

組別	動物數	給藥組	劑量(mg/kg)	給藥方式	給藥週期

1	8	Vehicle（生理鹽水）	/	*i.v.*	QW×3weeks
2	8	IgG1-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks
3	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	1	*i.v.*	QW×3weeks
4	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	3	*i.v.*	QW×3weeks
5	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks

注：1. 給藥體積為 10 μL/g；2. 分組當天定義為第一天(day 1)，給藥在 day 1，day8 和 day15；3. 給藥時注意避光； 4. 分組當天取一隻分剩小鼠腫瘤進行 FACS 檢測分析腫瘤細胞表面抗原表達情況，流式結果表明 B7H3 在 PR9586 模型中有明顯表達。

3.4 實驗觀察和資料收集

腫瘤細胞接種後，常規監測包括了腫瘤生長及治療對動物正常行為的影響，具體內容有實驗動物的活動性，攝食和飲水情況，體重增加或降低情況，眼睛、被毛及其它異常情況。試驗過程中觀察到的臨床症狀均記錄在原始資料中。開始給藥後，每週測量兩次小鼠的體重和腫瘤的大小。腫瘤體積計算公式：腫瘤體積（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示長徑，b 表示短徑）。實驗中使用 StudyDirector™（版本號 3.1.399.19，供應商 Studylog System, Inc.）軟體收集資料，包括腫瘤的長短徑的測量和動物體重的稱量，原始資料由天平和遊標卡尺測量後直接導入軟體，資料的任何變動都將被記錄在此軟體中。

給藥、腫瘤測量及體重稱量等全部過程都在生物安全櫃或超淨工作臺中進行。

3.5 資料分析

本實驗的主要觀察指標為：

相對腫瘤增殖率，T/C(%)，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。計算公式為：

T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%（T_{RTV}：治療組平均 RTV ；C_{RTV}：對照組平均 RTV；RTV=V_t/V_0，V_0 為分組時該動物的瘤體積，V_t 為治療後該動物的瘤體積）；

或 T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%（T_{TW}：治療組實驗終結時平均瘤重；C_{TW}：對照組實驗終結時平均瘤重）。

【0929】相對腫瘤抑制率，TGI(%)，計算公式為：

TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））

【0930】4. 實驗結果

B7H3-ADC-07（DAR8）和IgG1-ADC-07（DAR8）在PR9586模型上的藥效結果如圖12，表25和表26所示：

表 25：在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 模型中各組腫瘤體積分析表

實驗組	分組後第 22 天			
	腫瘤體積（$\bar{x}$ ±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值
第 1 組 Vehicle	874.80 ± 135.11(8)	--	--	--

第 2 組 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	129.30 ± 49.16(8)	85.73	14.27	< 0.001
第 3 組 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	135.42 ± 39.36(8)	84.00	16.00	0.009
第 4 組 B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	92.61 ± 36.73(8)	88.96	11.04	< 0.001
第 5 組 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	104.38 ± 33.65(8)	87.7	12.30	< 0.001

注：1. 資料以“平均值 ± 標準誤差”表示；2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%；

TGI% =（1-T/C）× 100%；

表 26：在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 模型中各組瘤重分析表

實驗組	瘤重 (mg)（$\bar{x}$ ±s） 分組後第 22 天	TGI（%）	T/C (%)	P 值
第 1 組 Vehicle	473.29 ± 91.75(8)			
第 2 組 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	52.96 ± 22.85(8)	88.81	11.19	0.002
第 3 組 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	52.64 ± 19.72(8)	88.88	11.12	0.006
第 4 組 B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	27.90 ± 14.59(8)	94.11	5.89	<0.001

第 5 組 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	46.40 ± 24.35(8)	90.20	9.80	0.001

注：1. 資料以“平均值 ± 標準誤差”表示；2. T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%; TGI% =（1-T/C）× 100%；

【0931】5. 結論

在PR9586模型中，腫瘤體積測量結果顯示，試驗結束時（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg和10 mg/kg組動物腫瘤體積均顯著（p<0.001）低於Vehicle（生理鹽水）組，B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg劑量組腫瘤體積抑瘤率（TGI）分別為84.00%，88.96%，88.7%。動物體重測量結果顯示，試驗結束時（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8）各劑量組給藥期間動物體重均增加與對照組無明顯差異，顯示動物對B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg劑量均耐受良好。腫瘤重量測量結果顯示，試驗結束時（Day22）B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg組與Vehicle組相比，動物平均腫瘤重量顯著降低，具有統計學意義（P < 0.001），B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、 3 mg/kg、10 mg/kg組的腫瘤重量TGI為88.88%、94.11%（P<0.001）和90.20%。無論按照腫瘤體積或者腫瘤重量，IgG1-ADC-07（DAR8）組都具有很好的腫瘤抑制效果，TGI分別為85.7% 和88.8%。結果表明本公開提供的抗體藥物偶聯物及其藥物連接物（毒素-linker）即不需要抗體的細胞內吞、也不需要腫瘤細胞表明抗原陽性表達既可以實現抗腫瘤效果。同時實驗各組體重與對照組體重無明顯區別，本公開的抗體藥物偶聯物具有良好的安全性。

【0932】6.7.5 B7H3抗體藥物偶聯物在食管鱗癌皮下異種移植PDX模型中

的藥效學評價

【0933】1. 研究目的

測試 B7H3-ADC-07（DAR8）和 IgG1-ADC-07（DAR8）在食管鱗癌 ES0204 皮下異種移植 BALB/c 雌性裸鼠模型中的藥效。

【0934】2. 受試物

B7H3-ADC-07（DAR8）、IgG1-ADC-07（DAR8）

【0935】3. 試驗內容

3.1 實驗小鼠資訊

BALB/c nude for ES0204 模型小鼠，6-9 周（腫瘤細胞接種時的小鼠預計周齡），雌性，共 100 只小鼠（40 只加上 150%富餘），購自江蘇集萃藥康生物科技有限公司。

3.2 構建荷瘤小鼠模型

從食管鱗癌 ES0204（亞型為 ECC，種族為 Asian）荷瘤小鼠收取腫瘤組織，切成直徑為 2-3mm 的瘤塊接種於 Balb/c 裸小鼠右前肩胛處皮下。

當荷瘤鼠平均腫瘤體積到達約 100-200 （~150）mm^3 時，將小鼠按照“3.3 分組及給藥”表格進行隨機分組。各組內的腫瘤體積的變異係數(CV) 用公式 CV= SD/MTV×100%計算，應小於 40%。分組當天定義為第 1 天。

3.3. 分組及給藥

每組的動物數及詳細的給藥途徑、劑量和方案見下表 27。

表 27：實驗動物分組

組別	動物數	給藥組	劑量(mg/kg)	給藥方式	給藥週期

1	8	Vehicle（生理鹽水）	/	*i.v.*	QW×3weeks
2	8	IgG1-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks
3	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	1	*i.v.*	QW×3weeks
4	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	3	*i.v.*	QW×3weeks
5	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks

注： 1. 給藥體積為 10 μL/g； 2. 分組當天定義為第一天(day 1)，給藥在 day 1，day8 和 day15； 3. 給藥時注意避光； 4. 分組當天取一隻分剩小鼠腫瘤進行 FACS 檢測分析腫瘤細胞表面抗原表達情況, 流式結果表明 B7H3 在 ES0204 模型中有明顯表達

3.4 實驗觀察和資料收集

腫瘤細胞接種後，常規監測包括了腫瘤生長及治療對動物正常行為的影響，具體內容有實驗動物的活動性，攝食和飲水情況，體重增加或降低情況，眼睛、被毛及其它異常情況。試驗過程中觀察到的臨床症狀均記錄在原始資料中。開始給藥後，每週測量兩次小鼠的體重和腫瘤的大小。腫瘤體積計算公式：腫瘤體積（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示長徑，b 表示短徑）。實驗中使用 StudyDirector™（版本號 3.1.399.19，供應商 Studylog System, Inc.）軟體收集資料，包括腫瘤的長短徑的測量和動物體重的稱量，原始資料由天平和遊標卡尺測量後直接導入軟體，資料的任何變動都將被記錄在此軟體中。

給藥、腫瘤測量及體重稱量等全部過程都在生物安全櫃或超淨工作臺中進行。

3.5 資料分析

本實驗的主要觀察指標為：

相對腫瘤增殖率，T/C(%)，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。計算公式為：

T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%（T_{RTV}：治療組平均 RTV ；C_{RTV}：對照組平均 RTV；RTV=V_t/V_0，V_0 為分組時該動物的瘤體積，V_t 為治療後該動物的瘤體積）；

或 T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%（T_{TW}：治療組實驗終結時平均瘤重；C_{TW}：對照組實驗終結時平均瘤重）。

相對腫瘤抑制率，TGI(%)，計算公式為：

TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））

【0936】4. 實驗結果

B7H3-ADC-07（DAR8）和 IgG1-ADC-07（DAR8）在 ES0204 模型上的藥效結果如圖 13，表 28 和表 29 所示：

表 28：在 HuPrime®食管鱗癌 ES0204 模型中各組腫瘤體積分析表

實驗組	分組後第 22 天			
	腫瘤體積 （$\bar{x}$±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值
第 1 組 Vehicle	959.89 ± 146.45(8)	-	-	-

第 2 組 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	182.05 ± 66.12(8)	81.28	18.72	< 0.001
第 3 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg	277.49 ± 115.05(8)	75.71	24.29	< 0.001
第 4 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	< 0.001
第 5 組 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	< 0.001

注：1. 資料以“平均值 ± 標準誤差”表示；2.T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%；

TGI% =（1-T/C）× 100%；

表 29：在 HuPrime®食管鱗癌 ES0204 模型中各組瘤重分析表

實驗組	瘤重 (mg)（$\bar{x}$ ±s） 分組後第 22 天	TGI	T/C (%)	P 值 （相較於對照組）
第 1 組 Vehicle	794.41 ± 143.85(8)	--	--	--
第 2 組 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	38.14 ± 13.37(8)	95.20	4.80	<0.001
第 3 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg	193.65 ± 90.66(8)	75.62	24.38	<0.001
第 4 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 3	0.00 ± 0.00(8)	100.0	0.00	<0.00

mg/kg		0		1
第 5 組 B7H3-ADC-07（DAR8） 10 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001

注：1. 資料以“平均值 ± 標準誤差”表示；2. T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%; TGI% =（1-T/C）× 100%；

【0937】5. 結論

在 ES0204 模型中，腫瘤體積測量結果顯示，試驗結束時（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg、3 mg/kg 和 10 mg/kg 組動物腫瘤體積均顯著低於 Vehicle（生理鹽水）組（P < 0.001），B7H3-ADC-07（DAR8）1mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 劑量組腫瘤體積抑瘤率（TGI）分別為 75.71%，100.00%，100.00%，與劑量呈正相關。動物體重測量結果顯示，試驗結束時（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8）各劑量組給藥期間動物體重均增加與對照組無明顯差異，顯示動物對 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 劑量均耐受良好。腫瘤重量測量結果顯示，試驗結束時（Day22） B7H3-ADC-07（DAR8） 1mg/kg、3mg/kg、10 mg/kg 組與 Vehicle 組相比，動物平均腫瘤重量均顯著降低，具有統計學意義（P < 0.001），腫瘤重量 TGI 為 75.62%，100.00%和 100.00%； IgG1-ADC-07（DAR8）組同樣具有很好的腫瘤抑制效果，TGI 分別為 81.3%（腫瘤體積）和 95.2%（腫瘤重量）。結果表明本公開提供的抗體藥物偶聯物及其的藥物連接物（毒素-linker）即不需要抗體的細胞內吞、也不需要腫瘤細胞表明抗原陽性表達既可以實現抗腫瘤效果。同時實驗各組體重與對照組體重無明顯區別，本公開的抗體藥物偶聯物具有良好的安全性。

【0938】實施例 6.8：Her3 抗體藥物偶聯物和 IgG1-ADC 體內活性測試

【0939】6.8.1 Her3 抗體藥物偶聯物對 NCI-H358 移植瘤藥效測試

本公開通過評價抗 Her3 抗體 ADC 藥物對 Balb/c Nude 小鼠皮下人非小細胞肺癌細胞株 NCI-H358 細胞（ATCC 來源，Her3 表達陽性率在 10%左右）移植瘤模型的抗腫瘤作用來展示體內藥效。

具體步驟如下： Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周齡，購自維通利華實驗動物有限公司。NCI-H358 細胞用含 10 %FBS 的 1640 培養基培養於 15 cm 直徑培養皿，達 80-90 %左右融合度時用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗兩次，然後離心重懸於預冷 PBS 中，細胞計數儀計數，PBS 稀釋使細胞濃度為 5×10^7/ml。Balb/c nu 小鼠實驗室環境適應 7 天，於右肋部皮下接種 NCI-H358 細胞，接種細胞量為 5×10^6/只，接種體積為 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待腫瘤生長至 300mm^3 左右時，根據腫瘤大小隨機分組，每組 5 只，分別為：抗雞溶菌酶人 IgG1 同型抗體（陰性對照，蘇州宜聯生物製備）組、IgG1-ADC-07（DAR8）、Her3-C3-ADC-21（DAR4），Her3-ADC-21（DAR4）以及 Her3-ADC-07（DAR8）劑量組。所有樣品均為尾靜脈注射，每週 1 次，共給藥 3 周。給藥後觀察並定期測量小鼠腫瘤體積及體重。相對腫瘤增殖率，T/C(%)，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。相對腫瘤抑制率，TGI(%)，計算公式為：TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））。

結果見表 30 及圖 14。

表 30：Her3-ADC-07 對人非小細胞肺癌 NCI-H358 裸小鼠皮下移植瘤的療

效

分組	平均腫瘤體積（mm^3）	平均腫瘤體積（mm^3）	T/C（%）	抑瘤率 TGI（%）	*P* 值（D29）
	D1	D29	D29	D29	
IgG1 5mg/kg	309.0±72.0	1425.0±241.2	-	-	-
IgG1-ADC-07（DAR8）5mg/kg	309.4±53.4	725.2±415.1	50.83	49.17	0.203
Her3-C3-ADC-21（DAR4）1 mg/kg	308.8±67.7	1080.8±741.8	75.89	24.11	0.996
Her3-ADC-21（DAR4）5 mg/kg	309.6±60.6	346.4±123.8**	24.26	75.74	0.002
Her3-ADC-21（DAR4）1 mg/kg	309.6±58.6	1000.6±184.1	70.08	29.92	0.214
Her3-ADC-07（DAR8）5mg/kg	309.4±43.4	205.4±56.7**	14.40	85.60	0.003
Her3-ADC-07（DAR8）1mg/kg	309.6±47.1	339.0±95.8**	23.74	76.26	0.003

由實驗結果可知，和 IgG1 組相比，5mg/kg 和 1mg/kg 劑量 Her3-ADC-07（DAR8）對 NCI-H358 人非小細胞肺癌移植瘤模型的腫瘤生長有顯著抑制作用，並且呈現劑量梯度趨勢。Her3-ADC-07 1mg/kg 組 TGI 為 76.26%，略強於 Her3-ADC-21 5mg/kg 劑量組的 TGI 75.74%。Her3-ADC-21 1mg/kg 組 TGI 為 29.92%，略強於 Her3-C3-ADC-21 1mg/kg 劑量組的 TGI 24.11%。

令人驚奇的是，和 IgG1 組相比，IgG1-ADC-07 也具有明顯的抑制腫瘤作用，說明得到的本公開偶聯物（ADC）通過在連接體實現提高了整個

ADC（無論是否具有抗原結合活性或內吞活性）在腫瘤環境中的暴露量，具有更好的腫瘤組織靶向性，從而具有更好的抑制腫瘤（無論是否表達相應抗原）效果。

另外，動物體重結果顯示，整個給藥期以及恢復期間，各給藥組動物耐受良好。

【0940】6.8.2. Her3 抗體藥物偶聯物對 SW480 移植瘤藥效測試之一

本公開通過評價抗 Her3 抗體 ADC 藥物對 Balb/c Nude 小鼠皮下人結腸癌細胞株 SW480 細胞（ATCC 來源，Her3 表達陽性率在 30%左右）移植瘤模型的抗腫瘤作用來展示體內藥效。具體步驟如下： 36 只 Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周齡，購自維通利華實驗動物有限公司。SW480 細胞用含 10 %FBS 的 1640 培養基培養於 15 cm 直徑培養皿，達 80-90 %左右融合度時用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗兩次，然後離心重懸於預冷 PBS 中，細胞計數儀計數，PBS 稀釋使細胞濃度為 5×10^7/ml。Balb/c nu 小鼠實驗室環境適應 7 天，於右肋部皮下接種 SW480 細胞，接種細胞量為 5×10^6/只，接種體積為 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待腫瘤生長至 250mm3 左右時，根據腫瘤大小隨機分組，每組 5 只，分別為抗雞溶菌酶人 IgG1 同型抗體（陰性對照，蘇州宜聯生物）組、IgG1-ADC-07、以及 Her3-ADC-07 劑量組。所有樣品均為尾靜脈注射，每週 1 次，共給藥 3 周。給藥後觀察並定期測量小鼠腫瘤體積及體重。

1) 相對腫瘤增殖率，T/C(%)，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。

2) 相對腫瘤抑制率，TGI(%)，計算公式為：TGI% =（1-T/C）× 100%（T

和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））。

具體結果見表 32 及圖 15。由實驗結果可知，10mg/kg 和 3mg/kg 劑量 Her3-ADC-07 對 SW480 人結直腸癌移植瘤模型的腫瘤生長有顯著一定抑制作用，並且呈現劑量梯度趨勢。

表 31：SW480+ Balb/c Nude 小鼠模型藥效結果

分組	平均腫瘤體積（mm^3）	平均腫瘤體積（mm^3）	T/C（%）	抑瘤率 TGI（%）	*P* 值 (D18)
	D1	D18	D18	D18	
Ig-G1 10 mg/kg	269.80±32.42	2437.80±378.82	-	-	-
IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	270.60±33.13	1129.40±856.17**	46.2	53.8	0.007
Her3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	269.20±31.17	164.80±39.81***	6.8	93.2	0.000
Her3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	270.20±31.40	939.00±744.80**	38.5	61.5	0.002
Her3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	271.60±38.35	2708.80±535.14	110.4	-10.4	0.876

【0941】6.8.3. Her3 抗體藥物偶聯物對 SW480 移植瘤藥效測試之二

參考實施例 6.8.2. 相同的模型和方法測定 IgG1，IgG1-ADC-07(DAR8),Her3-ADC-07(DAR8), Her3-C3-ADC-21(DAR8)在人結腸癌細胞株 SW480 細胞（ATCC 來源，Her3 表達陽性率在 30%左右）移植瘤模型的抗腫瘤作用。

具體測試結果見下表 32 及圖 16。

表 32.

給藥後天數 / 各組腫瘤體積（mm^3）	D1	D4	D8	D11	D15	D18	D22	D25	D29	P 值(vs IgG1)D15	T/C(%)D15	TGI(%)D15
IgG1 10mg/kg	291	483	1084	1874	2407	/	/	/	/	/	/	/
IgG1-ADC-07(DAR8) 10mg/kg	290	315	459	931	1497	1691	1939	/	/	0.035	62.36	37.64
Her3-ADC-07(DAR8) 10mg/kg	291	242	200	169	133	196	168	120	237	0.000	5.53	94.47
Her3-ADC-07(DAR8) 3mg/kg	291	254	361	589	716	967	1190	1315	/	0.000	29.71	70.29
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10mg/kg	292	258	129	125	178	228	360	390	890	0.000	7.36	92.64
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3mg/kg	292	246	525	968	1352	1894	2360	/	/	0.012	55.97	44.03

由測試結果可知，10mg/kg 和 3mg/kg 劑量 Her3-ADC-07 對 SW480 人結直腸癌移植瘤模型的腫瘤生長有顯著一定抑制作用，並且呈現劑量梯度趨勢。難以預料的是，Her3-ADC-07(DAR8)3mg/kg 組的抑瘤效果明顯強於 Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3mg/kg 組，Her3-ADC-07(DAR8)10mg/kg 組的抑瘤效果明顯強於 Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10mg/kg 組。

令人驚奇的是，和 IgG1 組相比，IgG1-ADC-07 在 SW480 人結直腸癌移植瘤模型中也具有明顯的抑制腫瘤作用，並且強於 Her3-C3-ADC-21(DAR8)3mg/kg 組的抑瘤作用，說明得到的本公開偶聯物（ADC）通過在連接體實現提高了整個 ADC（無論是否具有抗原結合活性或內吞活性）在腫瘤環境中的暴露量，具有更好的腫瘤組織靶向性，從而具有更好的抑制腫瘤（無論是否表達相應抗原）效果。

另外，動物體重結果顯示，整個給藥期以及恢復期間，各給藥組動物耐受良好。

【0942】實施例 6.9 ADC 血漿穩定性測試

通過在孵育 B7H3-ADC-07（DAR8）的人血漿中測定生物活性分子 A1.9 的釋放，在孵育 B7H3-C1-ADC-21(DAR4)的人血漿中測定 Dxd 的釋放，評價 B7H3-ADC-07（DAR8）在血漿中的穩定性。

樣品和組別

表 33

組別	受試物	孵育濃度	體系	檢測物	檢測時間點
1	B7H3-ADC-07（DAR8）	200 μg/mL	人血漿	A1.9	0 h、4h、24h、2d、3d、7d、10d、14d、17d、21d、28d
5	B7H3-C1-ADC-21(DAR4)	200 μg/mL	人血漿	Dxd	

溶液配製：用 PBS 將 B7H3-ADC-07（DAR8）及 B7H3-C1-ADC-21(DAR4) 原液稀釋至濃度 2 mg/mL 的工作溶液。用 DMSO 配製合適濃度的內標儲備液，然後用乙腈或其他試劑配製合適濃度的含內標的沉澱劑。

樣品孵育：各種屬（人、食蟹猴、ICR 小鼠）血漿和含 1%BSA 的 PBS 中均加入抑菌劑 ProClin，ProClin 終濃度為 0.1%，無菌操作。分別取 40 μL 受試物工作溶液與 360 μL 人血漿混合，制得濃度為 200 μg/mL 的孵育樣品。封板封膜，37℃ 5% CO2 培養箱中孵育， 震盪速度 80 次/分鐘。於 0 h、4h、24h、2d、3d、7d、10d、14d、17d、21d、28d 分別轉移 20 μL 血漿樣品，加入沉澱劑（含內標）200 μL，充分混勻沉澱蛋白。

所有樣品經蛋白沉澱後，離心取上清液，加水稀釋後使用 LC-MS/MS 進行

分析。分析條件為：

表 34：血漿穩定性測試的分析條件

分析物	A1.9				Dxd			
檢測方法	LC-MS/MS-6500-001				LC-MS/MS-6500-001			
內標	甲苯磺丁脲（Tolbutamide）				甲苯磺丁脲（Tolbutamide）			
質譜條件	正離子, ESI				正離子, ESI			
流動相	A: 0.1%FA in H2O				A: 0.1%FA in H2O			
	B: 0.1%FA in ACN				B: 0.1%FA in ACN			
色譜柱	Waters ,BEH C18，1.7μm，2.1*50mm				Aglient ,ZORBAX XDB-C18，3.5μm，2.1*50mm			
流速	0.5 mL/min				0.5 mL/min			
液相色譜條件	時間 (min)		泵 B (%)		時間 (min)		泵 B (%)	
	0.4		5		0.4		10	
	1.8		95		1.8		95	
	2.2		95		2.2		95	
	2.21		5		2.21		10	
	2.5		終止		2.5		終止	
檢測	化合物	m/z	去簇電壓 (v)	碰撞能量 (v)	化合物	m/z	去簇電壓 (v)	碰撞能量 (v)
	甲苯磺丁脲（Tolbutamide）	271.0-172.0	50	30	DXD	494.2-375.1	100	45
	A1.9	451.1-407.2	50	25				

獲得結果如下表 35 所示：

表 35

時間（天）	釋放比例(%)	
	A1.9	DXD
0	0.14	0.348
0.17	0.10	1.786
1	0.11	2.765
2	0.16	3.603

3	0.14	3.763
7	0.19	4.116
10	0.24	5.126
14	0.35	5.786
17	0.40	6.446
21	0.46	7.494
28	0.82	12.659

B7H3-ADC-07（DAR8）在人血漿中穩定性好，孵育 28 天後，釋放生物活性分子（A1.9）占總生物活性分子含量的 2%以下。而 B7H3-C1-ADC-21(DAR4)在人血漿中相中釋放 Dxd 明顯更多。

【0943】實施例 6.10 抗體藥物偶聯物在 HT 29 移植瘤中的中腫瘤組織分佈的測試實驗

【0944】6.10.1 實驗內容

步驟一.細胞處理

人結腸癌 HT29 細胞購自 ATCC。HT29 細胞用 15 cm^2 培養皿貼壁培養，培養條件為 1640 培養基中加 10 %胎牛血清，於 37 ℃、含 5 % CO2 空氣的培養箱中培養。當細胞呈指數生長期時，胰酶消化、收集細胞，計數，接種。

步驟二. 腫瘤細胞移植

BALB/c Nude 小鼠實驗室環境適應 2-5 天，於右肋部皮下接種 HT29 細胞，接種細胞量為 5×10^6/只，接種體積為 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待腫瘤生長至 200-300 mm3 左右時，進行實驗。

步驟三. 給藥及採樣

每組的動物數及詳細的給藥途徑、劑量和方案見下表。

表 36

組別	動物數	給藥組	劑量 (mg/kg)	給藥體積（μL/g）	給藥方式	給藥週期	採集樣本	採樣時間點
1	3	生理鹽水	/	10	i.v.	單次	腫瘤與血漿	給藥後 72 h
2	3	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	10	i.v.	單次	腫瘤與血漿	給藥後 24 h
3	3	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	10	i.v.	單次	腫瘤與血漿	給藥後 72 h

步驟四. 腫瘤組織勻漿

取腫瘤組織塊於冰上剪碎，稱重轉移至研磨管中，按 1:5（w/v）加入生理鹽水研磨，製備組織勻漿液；2~8 ℃，1800 ×g，離心 10 min，製備組織勻漿上清液，於-15~-25 ℃條件下保存備用。使用前取出於 15~25 ℃放置，平衡至室溫後使用。

步驟五. 生物樣品分析

A1.9 的分析方法參照實施例 6.9。

B7H3-ADC-07(DAR8)的分析方法

（1）包被：將抗毒素抗體用包被液（0.05M CBS）稀釋至 1 μg/mL，以 100 μL/孔加入酶標板，覆膜，2~8 °C 靜置過夜（大於 12 h）。

（2）洗板：棄去孔內溶液，用 0.05% PBST 洗滌 3 次，300 μL/孔，拍乾。

（3）封閉：加入封閉液（2%BSA-1×PBST），300 μL/孔，覆膜，37 °C 孵育 2 h±20 min。

（4）洗板：棄去孔內溶液，用 0.05% PBST 洗滌 3 次，300 μL/孔，拍乾。

（5）加樣：向酶標板中加入基質溶液、標準曲線樣本、質控樣本及待測樣本，100 μL/孔，覆膜，37°C 孵育 2 h±5 min。每個樣品均做兩個重複。

（6）洗板：棄去孔內溶液，用 0.05%PBST 洗滌 3 次，300 μL/孔，拍乾。

（7）加二抗：將 Goat Anti-Human IgG Fc-HRP 用稀釋液（2%BSA-1×PBST）稀釋 40000 倍(16 ng/ml)，100 μL/孔，覆膜，37 °C 孵育 1 h±5 min。

（8）洗板：棄去孔內溶液，用 0.05%PBST 洗滌 3 次，300 μL/孔，拍乾。

（9）顯色：加入 TMB 基質顯色液，100 μL/孔，覆膜，15~25 °C 避光顯色 2~15 min。

（10）終止：加入終止液（0.5 M H2SO4），100 μL/孔，終止反應。

（11）檢測：用酶標儀於檢測波長 450 nm（參比波長 620 nm）處讀取各孔 OD 值。

【0945】實驗結果

A1.9 的分佈結果如圖 17 所示，A1.9 分佈於腫瘤相對於血漿具有高達 18 倍的分配比差異，腫瘤組織中 A1.9 占絕大多數。

ADC 的分配結果如圖 18 所示，在腫瘤/血清中，ADC 分子具有明顯的分配比差異，並具有時間依賴性，證明本公開 ADC 分子或者含有本公開 linker 的 ADC 更傾向於分佈在腫瘤組織中。從而導致整個 ADC 分子在相對酸性腫瘤環境中的暴露量，因而具有更好的腫瘤組織靶向性，增加了生物活性分子在瘤內和血液濃度比，降低了 ADC 分子的機理相關的毒性（或者又叫“on-target 安全性“），不同 ADC 之間 on-target 相對安全性的計算公式為：

（第一種 ADC 腫瘤細胞體外 EC50 抑制濃度/第一種 ADC 相同腫瘤細胞模型體內給藥劑量）/（第二種 ADC 腫瘤細胞體外 EC50 抑制濃度/在和

第一種 ADC 體內效果接近情況下第二種 ADC 相同腫瘤細胞模型體內給藥劑量）

具體的，結合上述實施例中的資料，圖 10 中 B7H3-ADC-07 3mg/kg 組和 B7H3-ADC-21 10mg/kg 組的效果接近，B7H3-ADC-07 相對於 B7H3-ADC-21 在 HT29 的相對 on-target 安全性為：

(10433 ng/mL /150KDa/3mg/kg)/(7442 ng/mL /150 KDa /10mg/kg)= 4.66

因此 B7H3-ADC-07 相對於 B7H3-ADC-21 在 HT29 的具有 4.66 倍的相對 on-target 安全性。換句話說，由於本公開 ADC 有更好的腫瘤組織靶向性，到達相同體內抑制腫瘤效果的給藥劑量更低（例如實施例 6.7.2 B7H3-ADC-08 3 mg/kg 組和 B7H3-ADC-07 3 mg/kg 組均與 B7H3-ADC-21 10 mg/kg 的 TGI 接近）。

【0946】實施例 6.11 抗體藥物偶聯物在腫瘤組織勻漿液、肌肉組織勻漿液中的穩定性測試

【0947】研究目的:

本實驗研究的目的是類比 B7H3-ADC-07(DAR8)在腫瘤組織/腫瘤微環境裂解，對 B7H3-ADC-07 在 22RV1 Balb/c nu 裸鼠腫瘤組織勻漿液、Balb/c 小鼠肌肉組織勻漿液、勻漿液基質生理鹽水中的穩定性進行體外考察，在 B7H3-ADC-07(DAR8)的孵育體系中測定 A1.9。將腫瘤組織勻漿液結果與血漿穩定性結果進行對比，評估腫瘤組織/腫瘤微環境中毒素分子的釋放效率。

組別:

表 37

	受試物	孵育濃度	體系	檢測物	檢測時間點
1	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	22RV1 Balb/c nu 裸鼠腫瘤組織勻漿液	A1.9	0 h、4 h、24 h、48h
2	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	Balb/c 小鼠肌肉組織勻漿液	A1.9	
3	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	勻漿液基質（生理鹽水）	A1.9	

【0948】實驗步驟:

1、配製生理鹽水（0.85%）

0.85 克氯化鈉加上蒸餾水 100 毫升，即 85mg 氯化鈉加入 10ml 水

2、配製 B7H3-ADC-07

取 100μL 的 B7H3-ADC-07(DAR8)原液 4 倍稀釋，得到濃度 5 mg/ml 的工作液，即 5 μg/μl。

3、組織勻漿液稀釋

①原始勻漿為 1:4，以生理鹽水 1:2 稀釋備用（200μL 勻漿+400μL 生理鹽水）。

②再 1:9 稀釋後測蛋白濃度，肌肉勻漿為 0.8mg/ml，腫瘤勻漿為 1.2mg/ml，這一步僅為檢測用，不用於後續實驗。

③調整腫瘤勻漿的蛋白濃度至與肌肉勻漿相同：將①所得的腫瘤勻漿繼續 2:1 稀釋（600μL 勻漿+300 μL 生理鹽水），則最終孵育體系中勻漿液的蛋白濃度都為 8mg/ml 左右，肌肉稀釋了 15 倍，腫瘤稀釋了 22.5 倍。

4、孵育體系 200μL，

表 38

	受試物	孵育濃度	體系	計算
1	B7H3-ADC-07(DAR8) 5 μg/μl	100 μg/mL	B7H3-ADC-07(DAR8) 工作液 4μL 加入 196μL 勻漿液或生理鹽水	5 μg/μl×4μL÷0.2ml

5、37℃孵育，到點取 30μL 加入 300μL 沉澱劑，0 h、4 h、24 h、48h。

【0949】結果與討論：

結果如圖 19A 和圖 19B 所示。從毒素分子 A1.9 釋放來看，B7H3-ADC-07(DAR8)在腫瘤組織勻漿液中可以釋放大量的 A1.9，而在正常組織勻漿液中 A1.9 無明顯釋放。提示 B7H3-ADC-07(DAR8)的毒素 linker 具有腫瘤組織特異性釋放毒素分子的特點。

【0950】從而本公開 ADC 有更寬的治療指數和治療效果。儘管本公開的具體實施方式已經得到詳細的描述，但本發明所屬技術領域具有通常知識者將理解：根據已經公佈的所有教導，可以對細節進行各種修改和變動，並且這些改變均在本公開的保護範圍之內。本公開的保護範圍由所附申請專利範圍及其任何等同物給出。