(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117255790 A
(43)申请公布日 2023.12.19

(21)申请号 202280032554.2

(22)申请日 2022.05.23

(66)本国优先权数据
202110615166.4 2021.06.02 CN
202111225483.1 2021.10.21 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.11.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2022/094540 2022.05.23

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/253033 ZH 2022.12.08

(71)申请人 四川科伦博泰生物医药股份有限公司
地址 611138 四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号

(72)发明人 田强 汪小蓓 李德亮 张毅涛 叶健 胡瑞斌 宋宏梅 葛均友 王晶翼

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 杜仙

(51)Int.Cl.
C07D 403/14(2006.01)

(54)发明名称

一类化学偶联连接子及其用途

(57)摘要

本发明涉及化学偶联连接子及其用途,以及通过所述化学偶联连接子制备得到的生物活性偶联物。本发明还涉及所述生物活性偶联物用于制备预防或治疗肿瘤疾病的药物的用途。

CN 117255790 A

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 12 月 8 日 (08.12.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/253033 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 403/14 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 271/107 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/094540

(22) 国际申请日: 2022 年 5 月 23 日 (23.05.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110615166.4 2021年6月2日 (02.06.2021) CN
202111225483.1 2021年10月21日 (21.10.2021) CN

(71) 申请人: 四川科伦博泰生物医药股份有限公司 (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。

(72) 发明人: 田强 (TIAN, Qiang); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 汪小蓓 (WANG, Xiaobei); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 李德亮 (LI, Deliang); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 张毅涛 (ZHANG, Yitao); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 叶健 (YE, Jian); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 胡瑞斌 (HU, Ruibin); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 宋宏梅 (SONG, Hongmei); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 葛均友 (GE, Junyou); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 王晶翼 (WANG, Jingyi); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。

(74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限公司 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市复兴门内大街158号远洋大厦F10层, Beijing 100031 (CN)。

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

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

本国际公布:
— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
— 在修改权利要求的期限届满之前进行，在收到该修改后将重新公布 (细则48.2(h))。
— 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) **Title:** CHEMICAL COUPLING LINKER AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一类化学偶联连接子及其用途

(57) **Abstract:** The present invention relates to a chemical coupling linker and a use thereof, and a biologically active conjugate prepared by the chemical coupling linker. The present invention also relates to a use of the biologically active conjugate in the preparation of a drug for the prevention or treatment of tumor diseases.

(57) 摘要: 本发明涉及化学偶联连接子及其用途，以及通过所述化学偶联连接子制备得到的生物活性偶联物。本发明还涉及所述生物活性偶联物用于制备预防或治疗肿瘤疾病的药物的用途。

WO 2022/253033 A1

一类化学偶联连接子及其用途

本申请是以 CN 申请号为 202110615166.4，申请日为 2021 年 6 月 2 日的申请，以及 CN 申请号为 202111225483.1，申请日为 2021 年 10 月 21 日的申请为基础，并主张其优先权，该 CN 申请的公开内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

发明涉及一类用于化学偶联的新型连接子、由该连接子制备的抗体偶联药物和相关组合物，以及其制备方法和在治疗肿瘤相关疾病中的应用。

背景技术

近年来，抗体偶联药物是肿瘤精准治疗的热门方向之一，为肿瘤治疗带来希望。抗体偶联药物（Antibody－Drug Conjugates，ADC）由靶向特异性抗原的单克隆抗体药物和小分子细胞毒药物通过连接子偶联而成，兼具传统小分子化疗的强大杀伤效应及抗体药物的肿瘤靶向性。截止到 2021 年 04 月 Zynlonta 的批准，全球已有 12 款 ADC 药物获批上市，其中 7 款用于治疗血液系统肿瘤，5 款用于治疗实体瘤。

抗体偶联药物由抗体、linker、payload 及偶联方式等几部分组成。其中偶联方式是抗体和 药物-连接体的连接方式。偶联方法主要分为非定点偶联和定点偶联。早期使用的是非定点偶联法，主要由赖氨酸偶联和半胱氨酸偶联,利用化学方法直接将药物与抗体上氨基酸残基进行偶联，不涉及抗体的改造或修饰，其偶联的毒素分子个数和偶联位点都不能确定，均一性欠佳。目前常用的定点偶联方式即通过基因工程位点或者特殊的连接头进行特异性偶联，实现更均一地偶联，能在特定位点实现细胞毒素的连接。定点偶联生产的抗体偶联药物，可以减少因偶联位点和偶联个数不同而造成药效、药代以及 CMC 质控的波动。

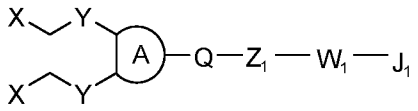
目前常见的定点偶联方式 THIOMAB 技术、非天然氨基酸偶联技术、谷氨酰胺酶促偶联技术、Sortase 转肽酶偶联技术以及 ThioBridge 技术等。其中，利用抗体工程化或者酶促偶联，对抗体的改造修饰，可能会对抗体的结构稳定性有一定影响，同时对 CMC 有一定要求。另外利用化学偶联的部分 ThioBridge 技术也有一定的缺陷，例如 DBM（dibromomaleimides）类连接子和其他含巯基的生物基团发生置换作用，而在血浆中不稳定，造成药效降低，毒副作用增加（Chem. －Eur. J., 2019, 25, 43－59.）。因此，开发新型的连接子结构对于研发出具有良好药效及安全性的抗体偶联药物仍具有重要意义。

发明内容

本申请的一个目的在于提供用于化学偶联的新型连接子，该类连接子反应活性高，偶联条件温和、操作简便，可以实现定点偶联，得到的生物活性偶联物均一性和血浆稳定性较好，体内外药效明确。

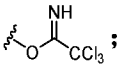
化合物

在第一个方面，本申请提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 I 的结构：



式I

其中：

X 选自离去基团，例如 Cl 、Br、I、OMs、OTs、OTf 或；

Y 不存在或选自羰基；

A 环选自取代或非取代的 C_{6-10} 芳环、5-12 元芳杂环或 5-12 元杂环；

Q 不存在或为-C(=O)-NH-；

Z_1 不存在或者选自-CH_2-或 C_{2-6} 亚炔基；

W_1 不存在或选自 C_{1-10} 亚烷基、-(CH_2CH_2O)p-、以及-(OCH_2CH_2)p-中的一种或多种；

J_1 选自-COOH、-NH_2、3-10 元含氮杂环基、磺酰脲基或羟基；

p 为 1-10 的整数。

在部分实施方案中，X 选自 Cl 、Br、I、OMs、OTs 以及 OTf 中的一种或多种。

在部分实施方案中，Y 不存在。

在部分实施方案中，Z_1 不存在或者为 C_{2-6} 亚炔基。

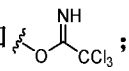
在部分实施方案中，W_1 不存在或选自 C_{1-10} 亚烷基和-(CH_2CH_2O)p-中的一种或多种。

在部分实施方案中，W_1 为 C_{1-10} 亚烷基；优选为 C_{1-6} 亚烷基，进一步优选为 C_{1-3} 亚烷基。

在部分实施方案中，J_1 为-COOH。

在部分实施方案中，A 环选自取代或非取代的 5-12 元含氮芳杂环或 5-12 元含氮杂环；优选地，A 环选自非取代或被氧代基或-COOH 取代的 5-12 元含氮芳杂环或 5-12 元含氮杂环。

在部分实施方案中，p 为 1，2，3，4，5，6，7，8，9，或 10。

在部分实施方案中，X 选自 Cl 、Br、I、OMs、OTs、OTf 和；

Y 不存在；

A 环选自非取代或被氧代基或-COOH 取代的 5-12 元含氮芳杂环或 5-12 元含氮杂环；

Q 不存在或为-C(=O)-NH-；

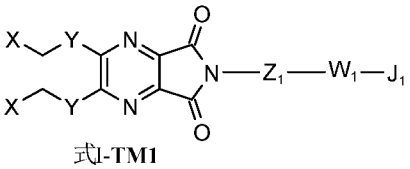
Z_1不存在或者为-CH_2-；

W_1不存在或选自 C_{1-10}亚烷基和-$(CH_2CH_2O)_p$-中的一种或多种；

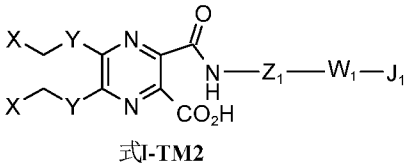
J_1为-COOH；

p 为 1-10 的整数。

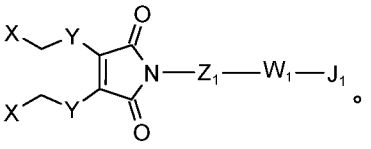
在部分实施方案中，式 I 选自如下结构：



式I-TM1

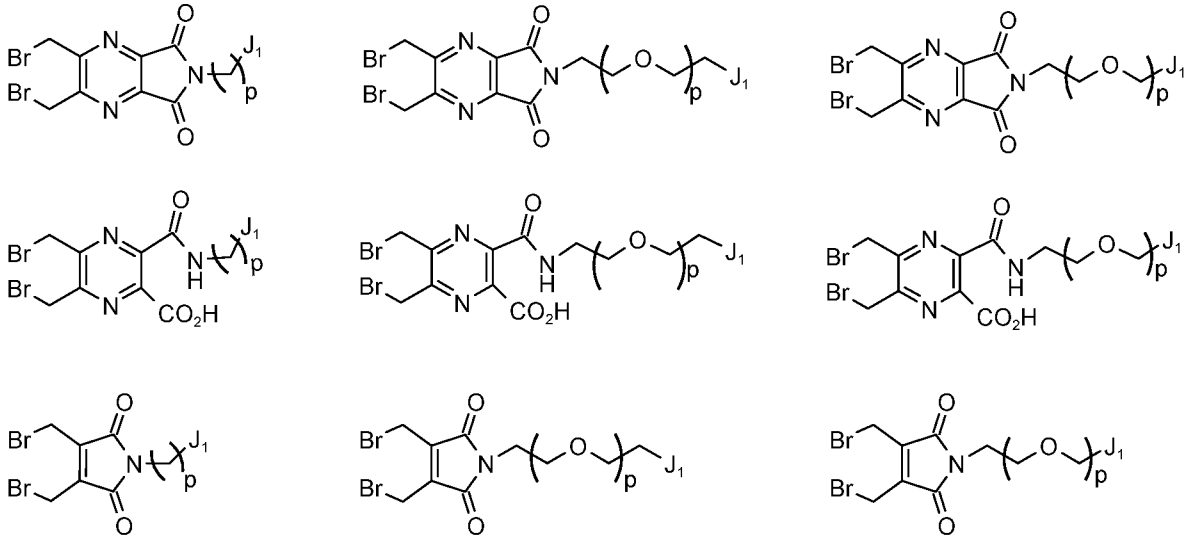


式I-TM2



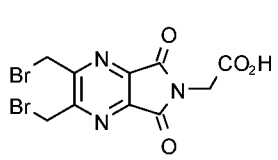
式I-TM3

在部分实施方案中，式 I 化合物具有如下结构：

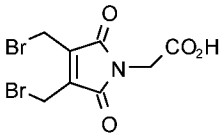


其中 p 为 1-10 的整数，J_1为-COOH 或-NH_2。

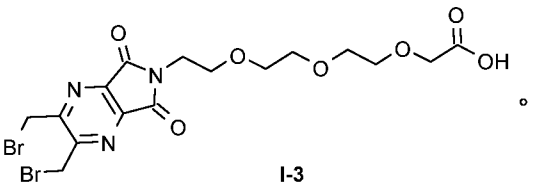
在部分实施方案中，式 I 化合物具有如下结构：



I-1

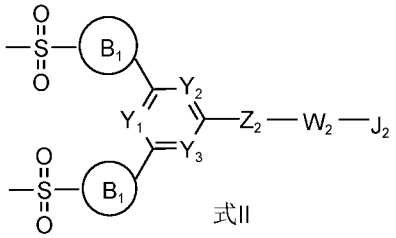


I-2



I-3

在第二个方面，本申请提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 II 的结构：



式II

其中，B_1在每次出现时，各自独立地选自单键或 5-12 元含氮芳杂环；

Y_1，Y_2及Y_3在每次出现时，各自独立的选自CH和N；

Z_2不存在或者选自-NH-、$-CH_2-$、羰基、-C(=O)NH-、-NHC(=O)-或C_{2-6}亚炔基；优选地，Z_2不存在或者选自-NH-、$-CH_2-$、羰基或C_{2-6}亚炔基；

W_2不存在或选自C_{1-10}亚烷基、$-(CH_2CH_2O)_p-$或$-(OCH_2CH_2)_p-$中的一个或多个；

J_2选自-COOH、$-NH_2$、3-10元含氮杂环基、磺酰脲基或羟基；

p为1-10的整数。

在部分实施方案中，B_1在每次出现时，各自独立地选自单键或5-6元含氮芳杂环；优选地，B_1在每次出现时，各自独立地选自单键或5-6元含氮芳杂环；进一步优选地，B_1在每次出现时，各自独立地选自单键或嘧啶环。

在部分实施方案中，Y_1，Y_2及Y_3均为N；或者Y_1为CH、Y_2及Y_3均为N；或者Y_1为N、Y_2及Y_3均为CH；或者Y_1，Y_2及Y_3均为CH。

在部分实施方案中，Z_2不存在或者为C_{2-6}亚炔基。

在部分实施方案中，W_2不存在或为C_{1-10}亚烷基。

在部分实施方案中，J_2选自-COOH或$-NH_2$。

在部分实施方案中，B_1在每次出现时，各自独立地选自单键或嘧啶环；

Y_1，Y_2及Y_3均为CH；

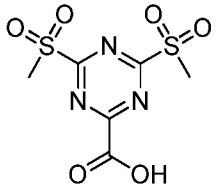
Z_2不存在或者为-C(=O)NH-；

W_2不存在或选自C_{1-10}亚烷基、$-(CH_2CH_2O)_p$中的一个或多个；

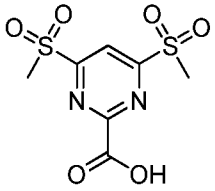
J_2为-COOH；

p为1-10的整数。

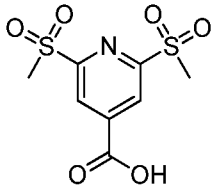
在部分实施方案中，式II化合物具有如下结构：



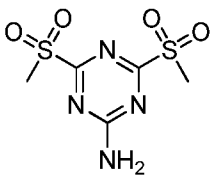
II-1



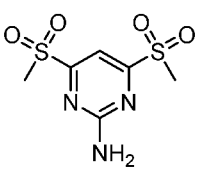
II-2



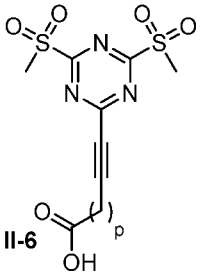
II-3



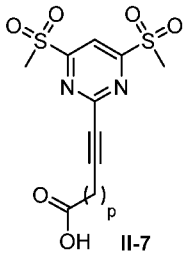
II-4



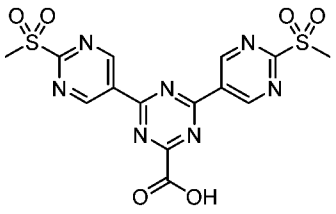
II-5



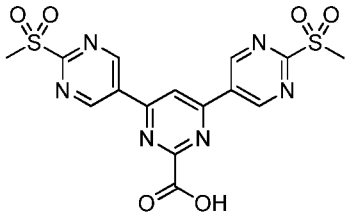
II-6



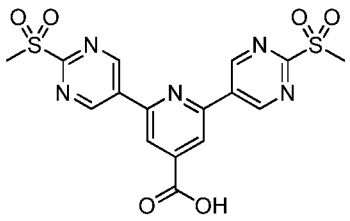
II-7



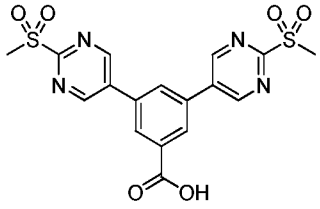
II-8



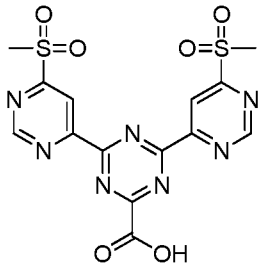
II-9



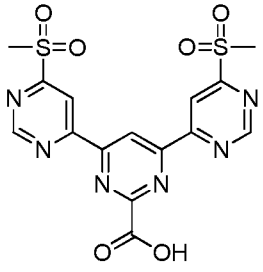
II-10



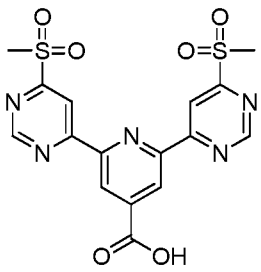
II-11



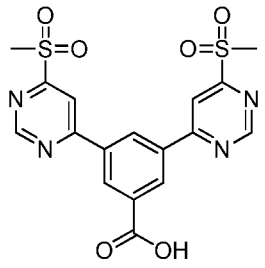
II-12



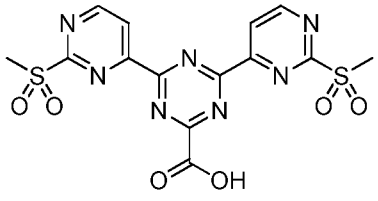
II-13



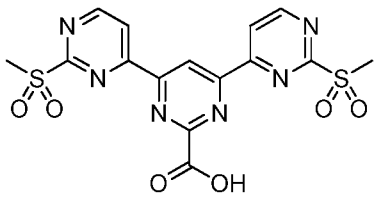
II-14



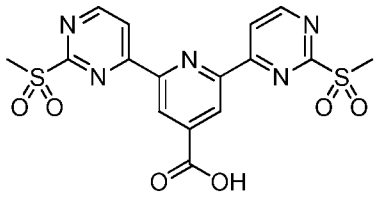
II-15



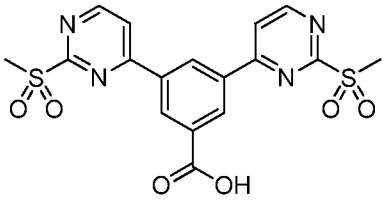
II-16



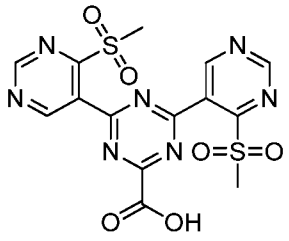
II-17



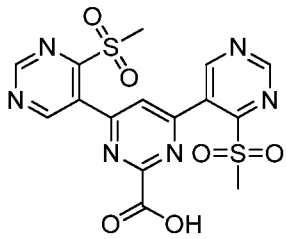
II-18



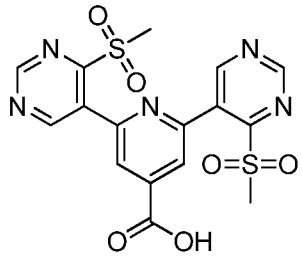
II-19



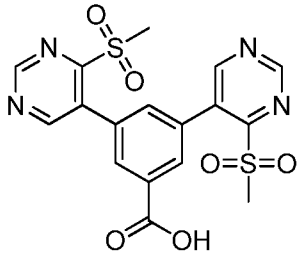
II-20



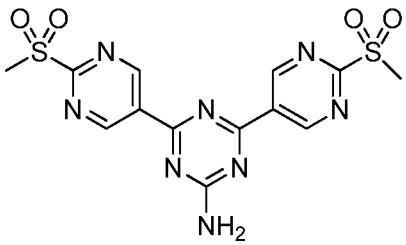
II-21



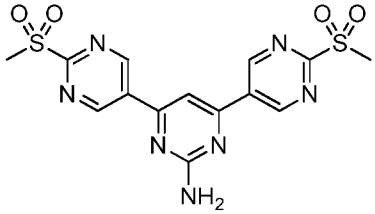
II-22



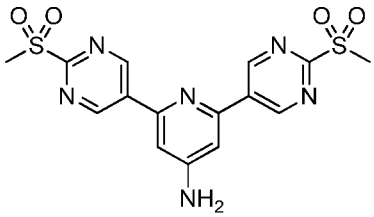
II-23



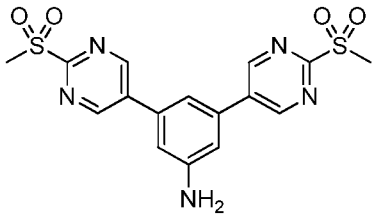
II-24



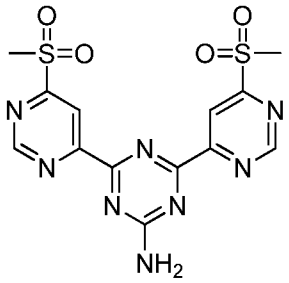
II-25



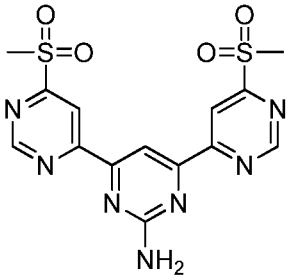
II-26



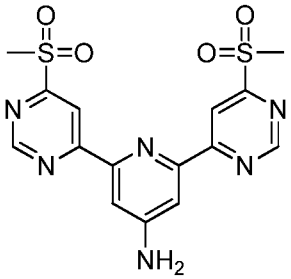
II-27



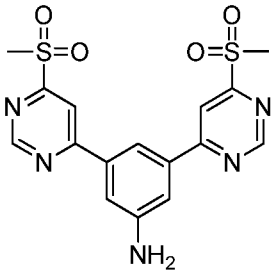
II-28



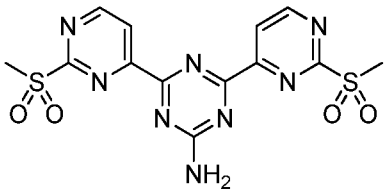
II-29



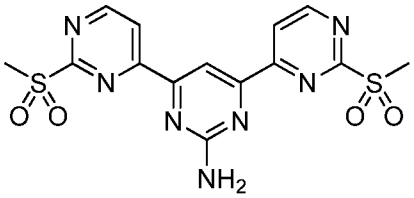
II-30



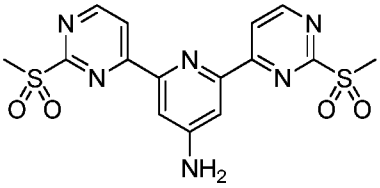
II-31



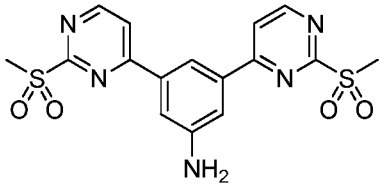
II-32



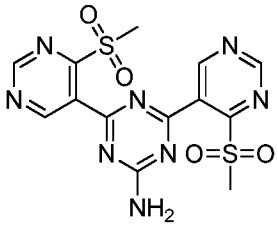
II-33



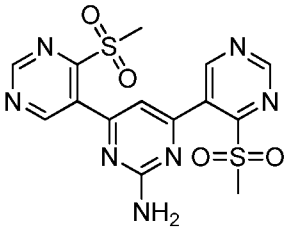
II-34



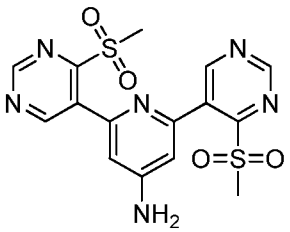
II-35



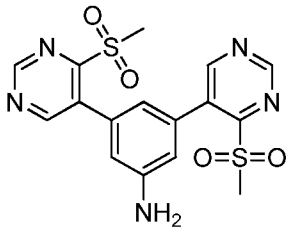
II-36



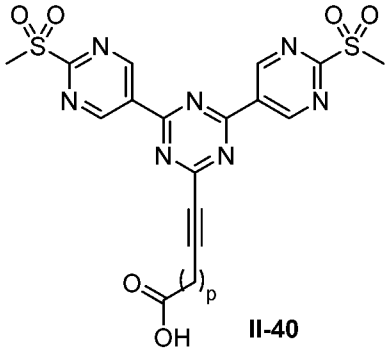
II-37



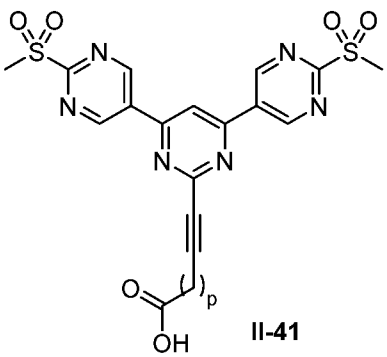
II-38



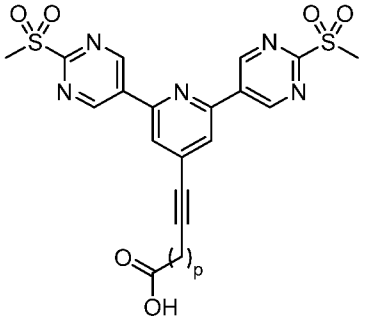
II-39



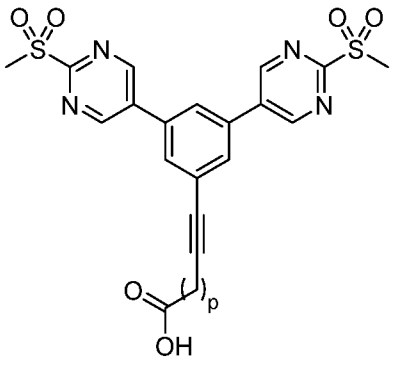
II-40



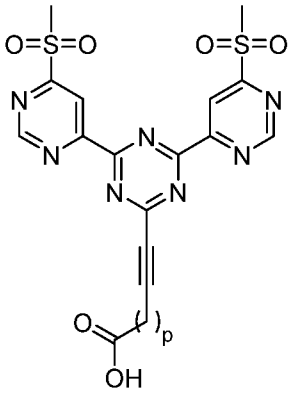
II-41



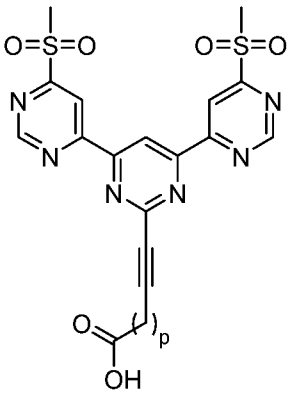
II-42



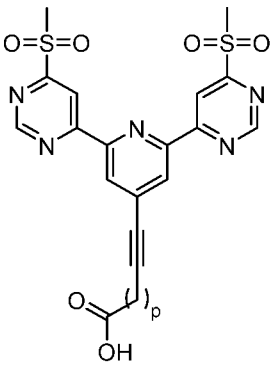
II-43



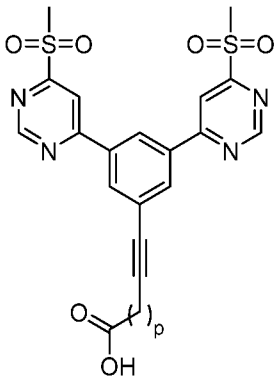
II-44



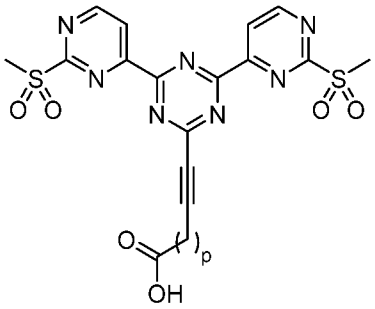
II-45



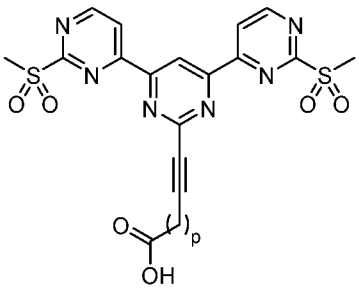
II-46



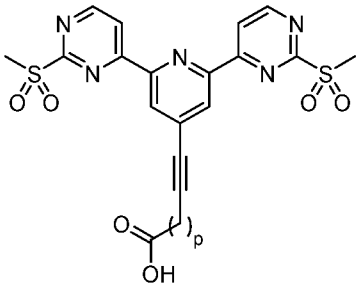
II-47



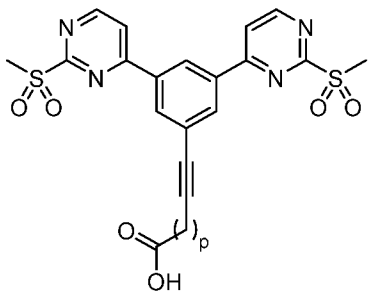
II-48



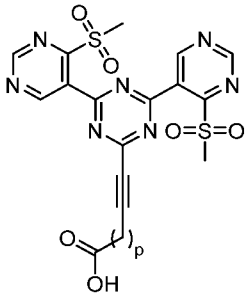
II-49



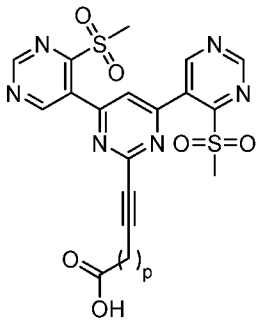
II-50



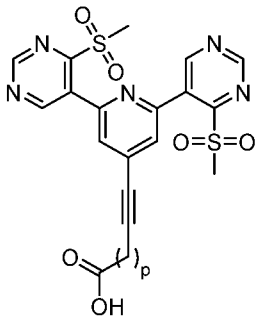
II-51



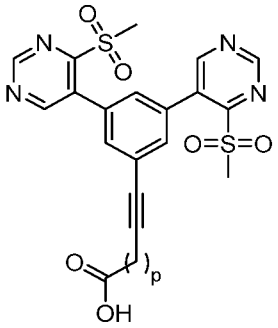
II-52



II-53

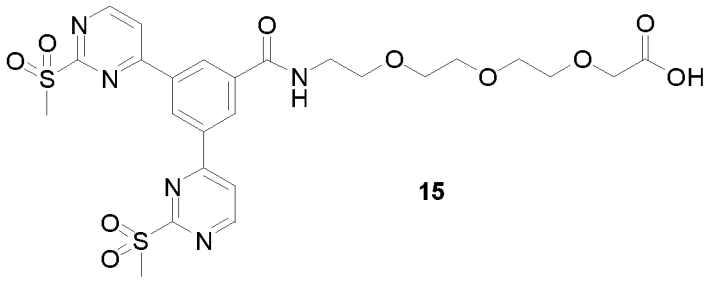


II-54



II-55

;

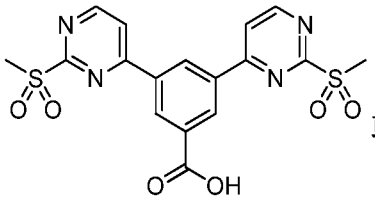


15

p 为 1-10 的整数。

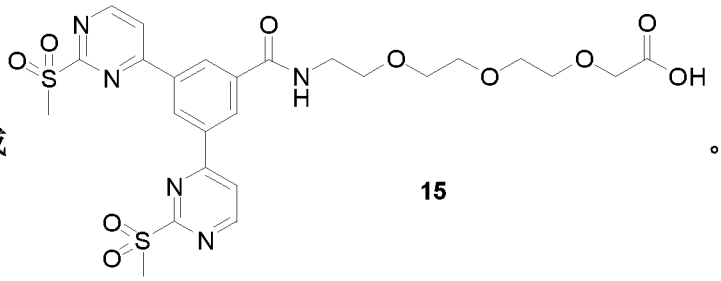
在部分实施方案中，p 为 1-8 的整数；进一步优选 p 为 1-5 的整数。

在部分实施方案中，式 II 化合物具有如下结构：



II-19

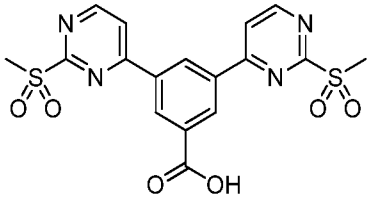
或



15

。

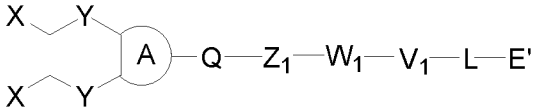
在部分实施方案中，式 II 化合物具有如下结构：



II-19

。

在第三个方面，本申请提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 III 的结构：

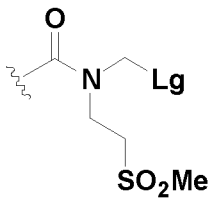
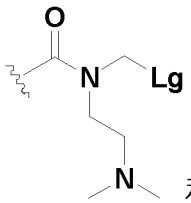
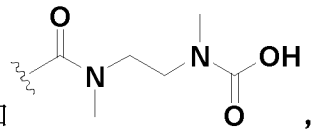
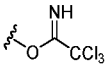


式 III

其中：

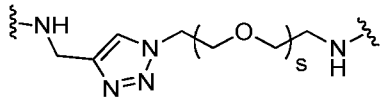
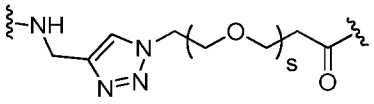
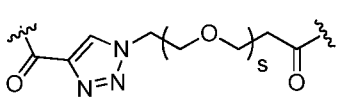
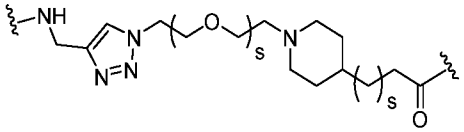
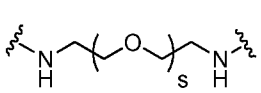
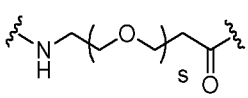
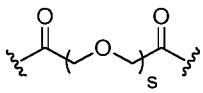
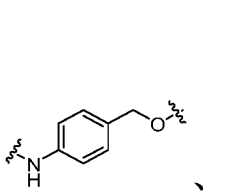
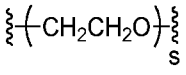
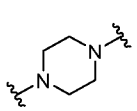
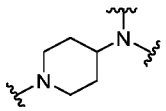
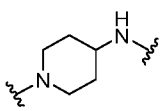
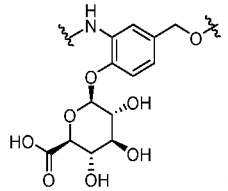
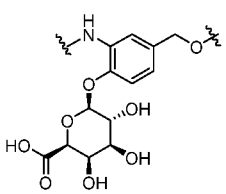
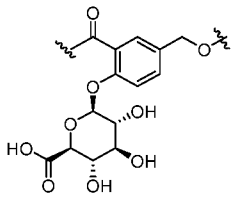
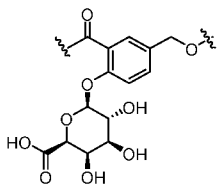
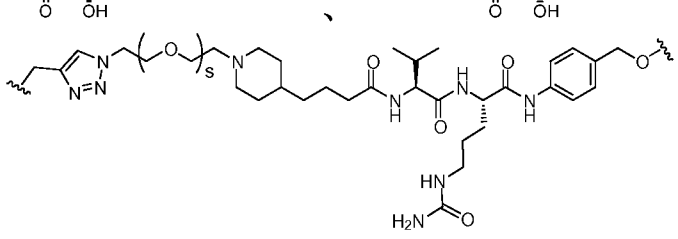
V_1为本申请第一方面式 I 化合物中 J_1与 L 连接时形成的基团；优选地，V_1选自-CO-、-N(R_1)-、-O-、3-10 元含氮杂环基或磺酰脲基，其中 R_1为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；进一步优选地，V_1选自-C(O)-和-N(R_1)-，其中 R_1为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；

L 是连接 V_1和 E’之间的连接子；

E’选自 H、-$NHCH_2$-Lg、-COOH、、和，其中，Lg 表示离去基团，例如 Cl 、Br、I、OMs、OTs、OTf 或；

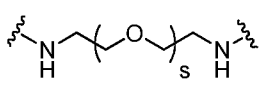
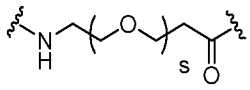
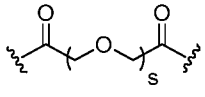
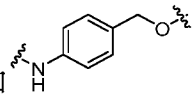
X 、Y、A、Q、Z_1、W_1如前文第一方面任一项中所定义。

在部分实施方案中，L 选自以下基团中的一个或多个： C_{1-6}亚烷基、-N(R_6)-、羰基、-O-、Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Phe、Ala、Asn、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly、

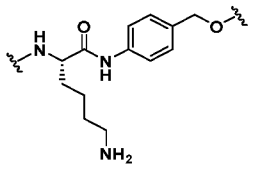
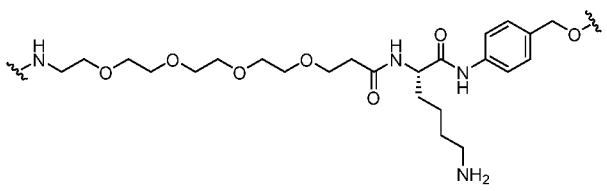
、、、、、、、、、、、、、、、、

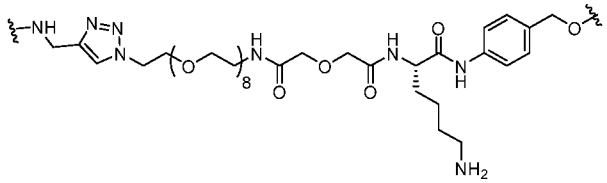
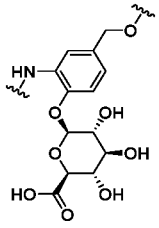
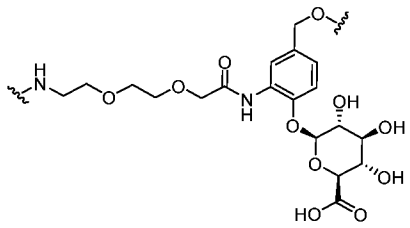
其中 R_6为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基，s 为 1-10 的整数。

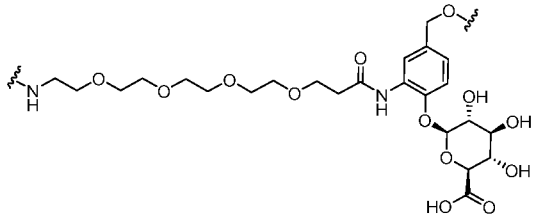
在部分实施方案中，L 选自以下基团中的一个或多个： Val、Cit、Gly、Phe、Ala、

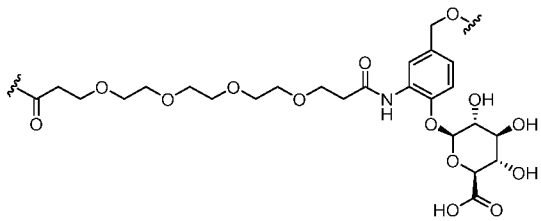
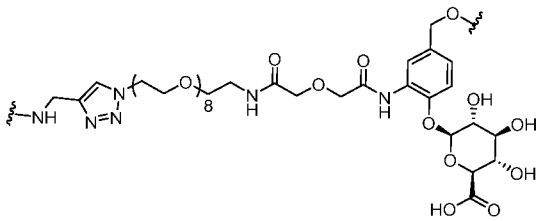
Val-Cit、Val-Ala、Gly-Gly-Phe-Gly、、、和。

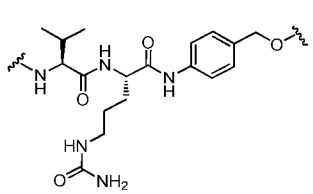
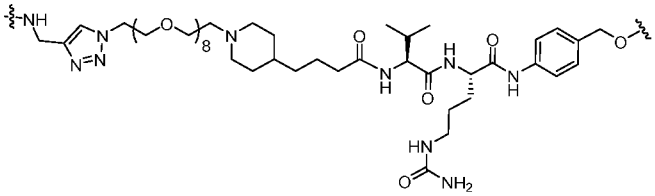
在部分实施方案中，L选自

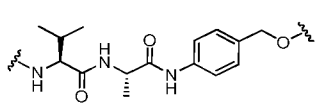
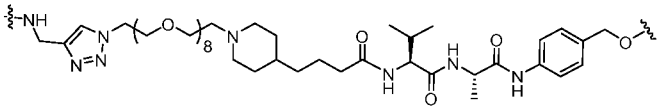
，，

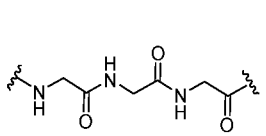
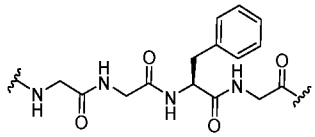
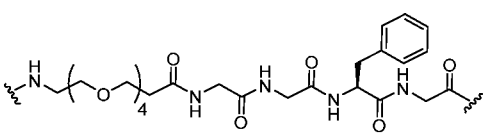
，，，

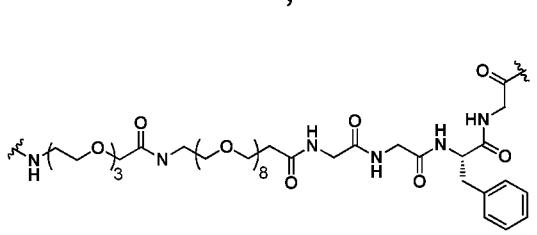
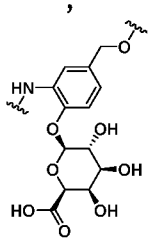
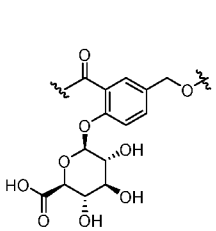
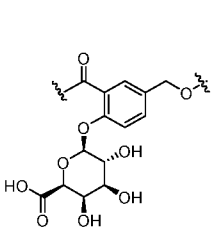
，

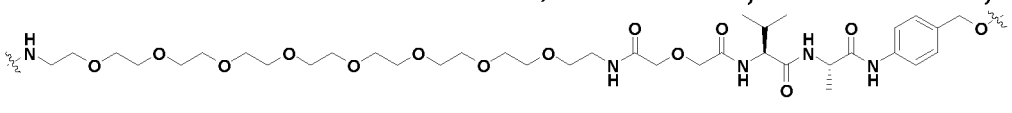
，，

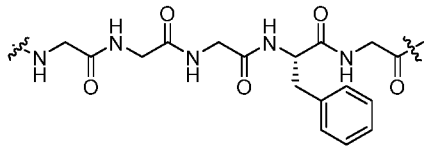
，，

，，

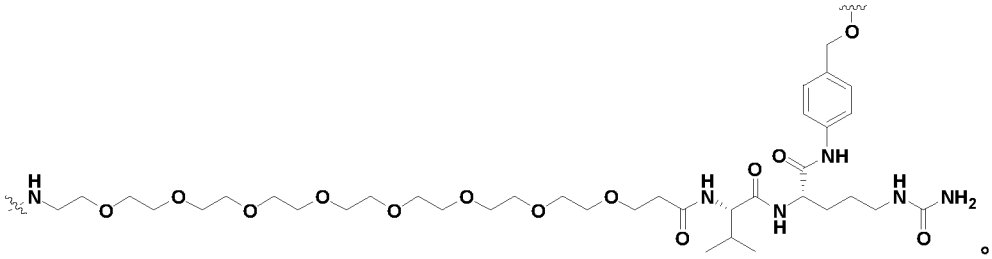
，，，

，，，，

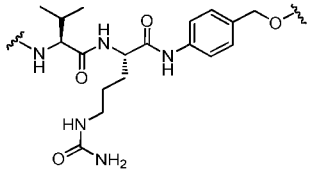
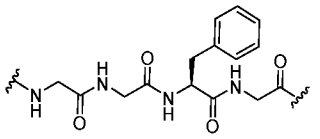
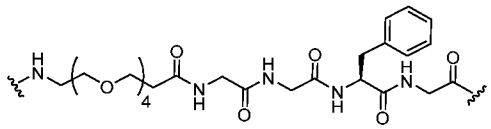
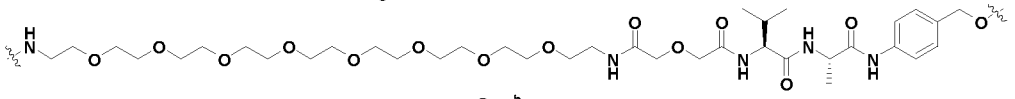
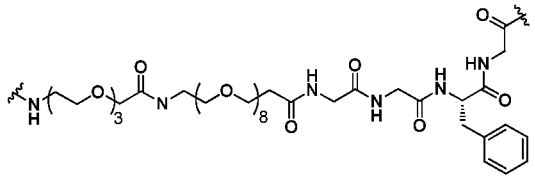
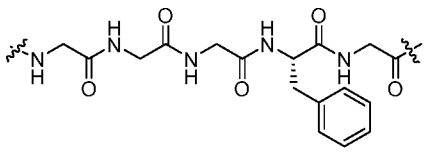
，

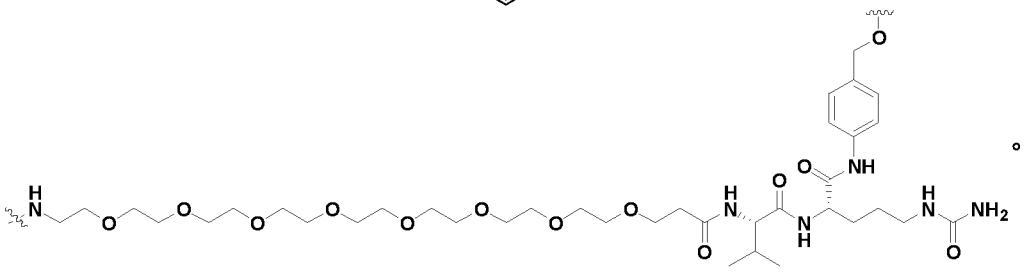


和



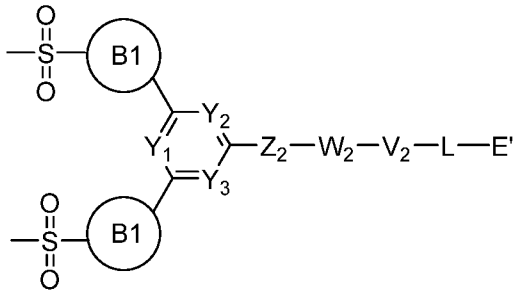
。

在部分实施方案中，L 选自 ，，，，，，和



。

在第四个方面，本申请提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 IV 的结构：



式 IV

其中，

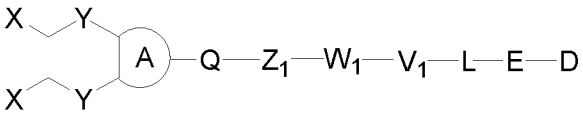
V_2为本申请第二方面式 II 化合物中 J_2与 L 连接后得到的基团；优选地，V_2选自-CO-、

-N(R_2)-、-O-、3-10 元含氮杂环基或磺酰脲基，其中 R_2 为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；进一步优选地，V_2选自-C(O)-和-N(R_2)-，其中 R_2 为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；

B_1、Y_1、Y_2、Y_3、Z_2和 W_2如前文第二方面任一项中所定义；

L 和 E’如前文第三方面任一项中所定义。

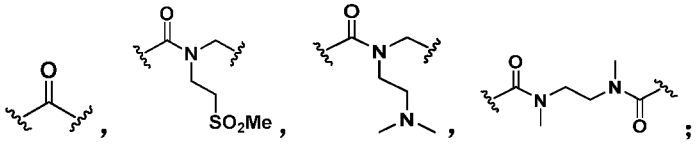
在第五个方面，本申请提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 V 的结构：



式 V

其中：

E 选自单键、-NH-CH_2-，或以下结构：



D 是生物活性分子（例如细胞毒性药物）片段；

X 、Y、A、Q、Z_1、W_1如前文第一方面任一项中所定义；

V_1和 L 如第三方面任一项中所定义。

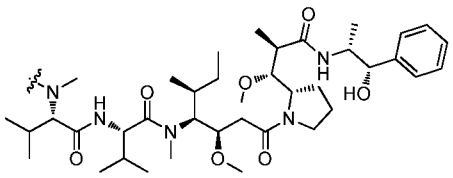
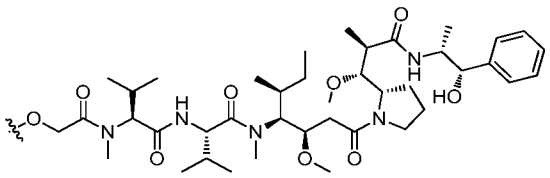
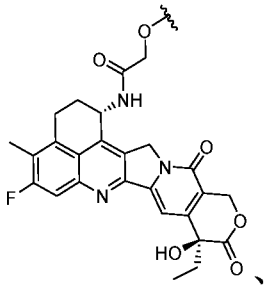
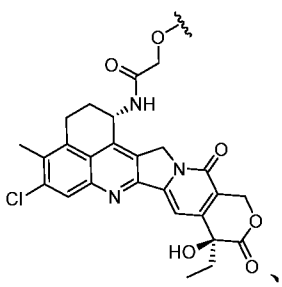
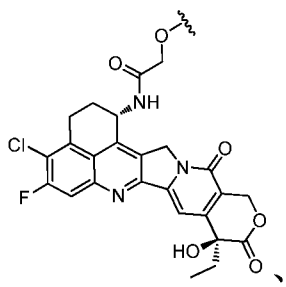
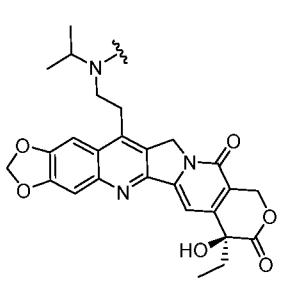
在部分实施方案中，所述生物活性分子选自下组：抗微管蛋白剂、DNA 嵌入剂、DNA 拓扑异构酶抑制剂和 RNA 聚合酶抑制剂。

在部分实施方案中，所述生物活性分子选自下组：微管蛋白抑制剂奥瑞他汀类化合物、美登素类化合物；DNA 嵌入剂 吡咯并苯二氮卓(PBD)；DNA 拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 I 抑制剂(诸如喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、卢比替康)或拓扑异构酶 II 抑制剂(诸如阿霉素、多柔比星、PNU-159682、多卡米星、柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素或依托泊苷)；RNA 聚合酶抑制剂 α-鹅膏草碱（α-amanitin）等；及其药学上可接受的盐、酯和类似物。

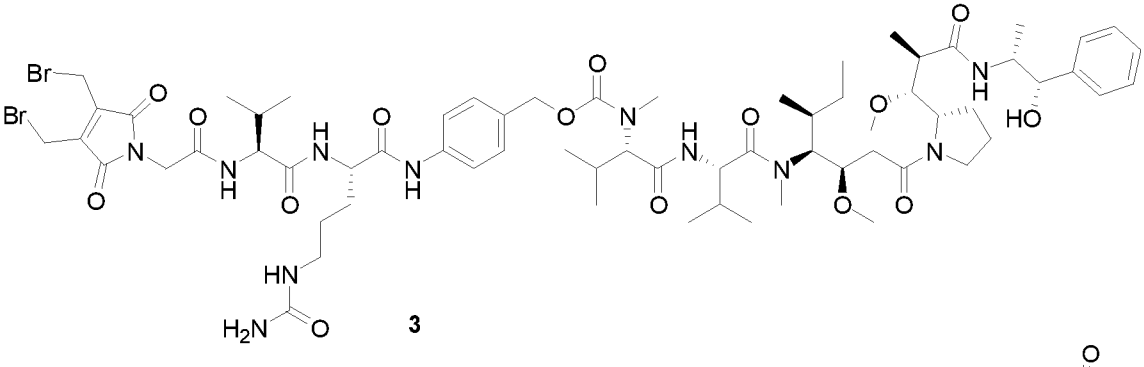
在部分实施方案中，所述生物活性分子选自：拓扑异构酶 I 抑制剂(诸如喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、卢比替康)、MMAE 以及 MMAE 衍生物。

在部分实施方案中，所述生物活性分子选自：MMAE 以及 MMAE 衍生物。

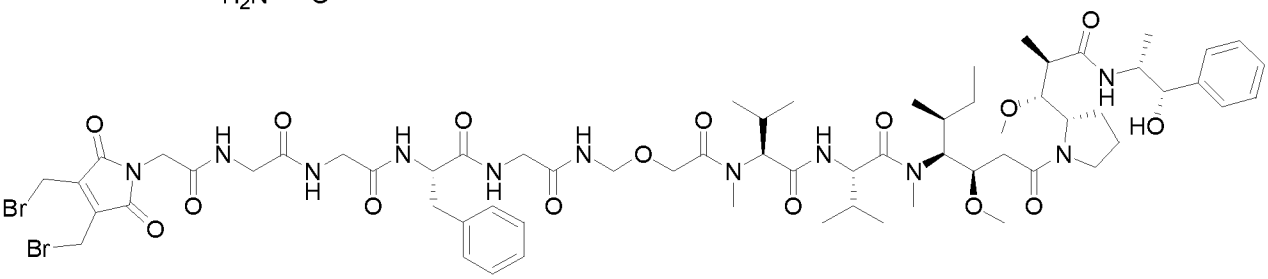
在部分实施方案中，所述 D 选自：


、

、

、

、

、

。

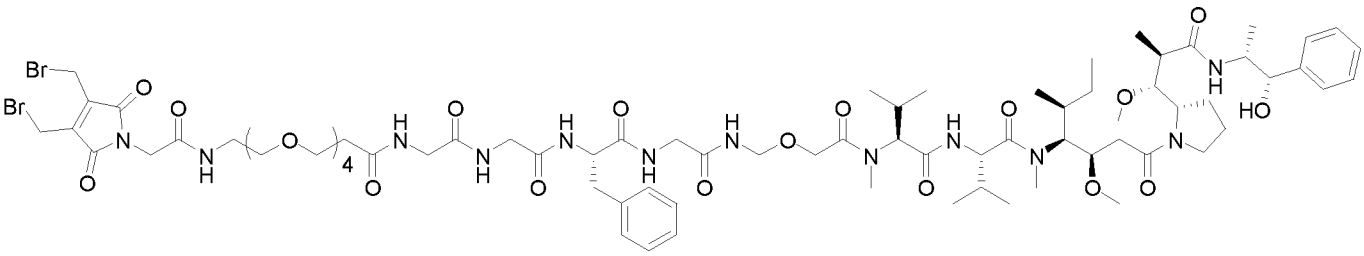
在部分实施方案中， 式 V 化合物选自：



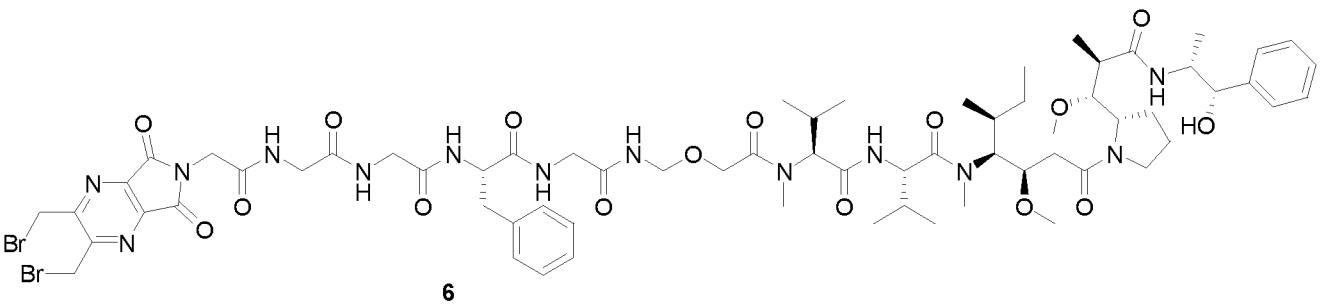
3



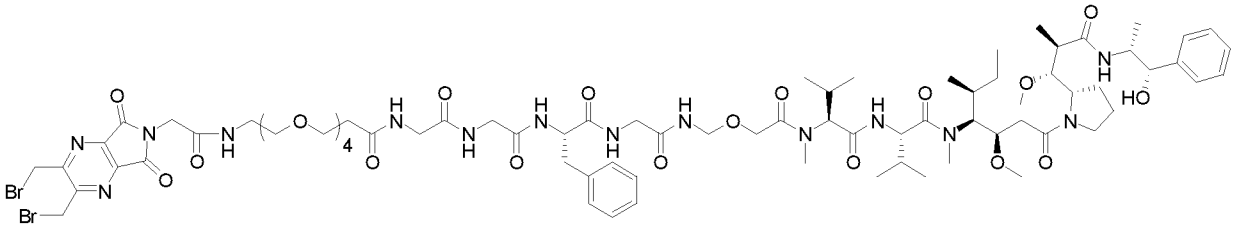
4



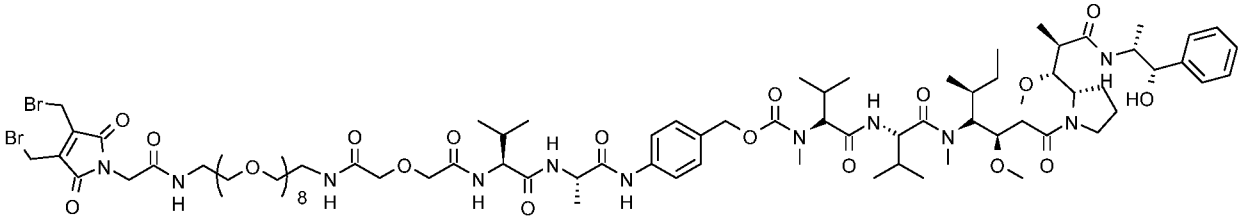
5



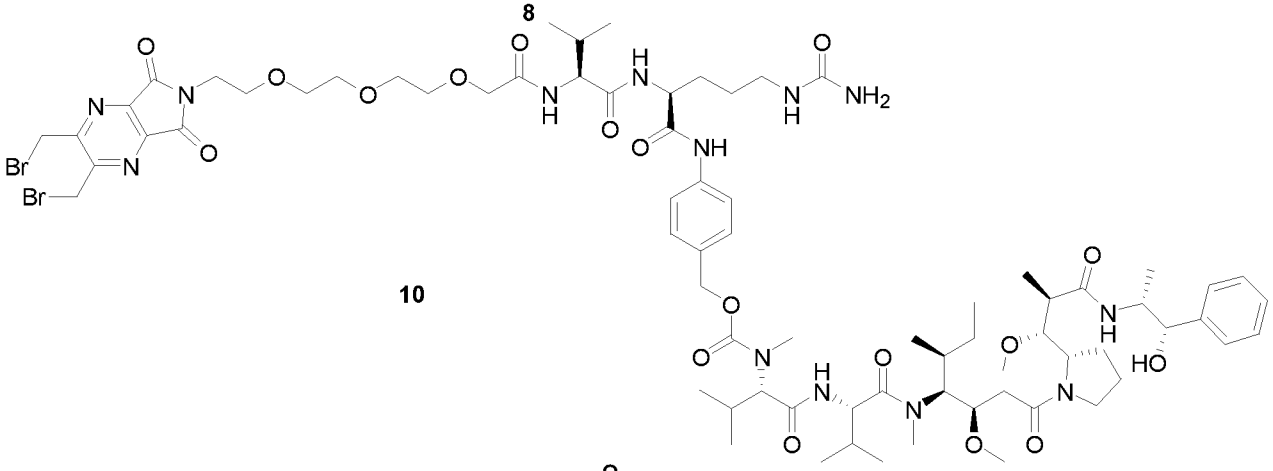
6



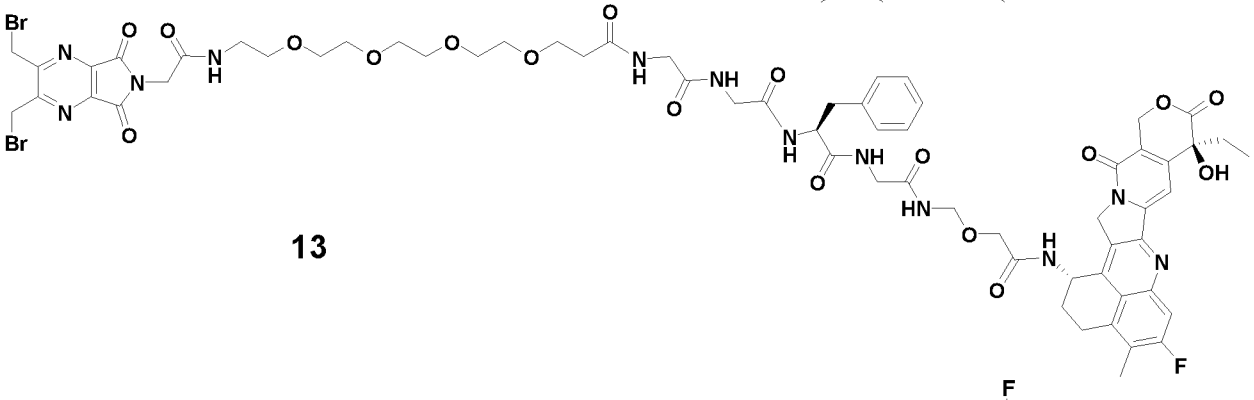
7



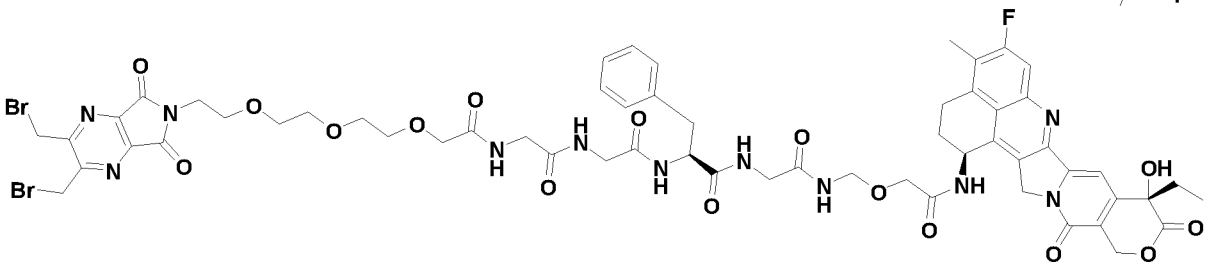
8



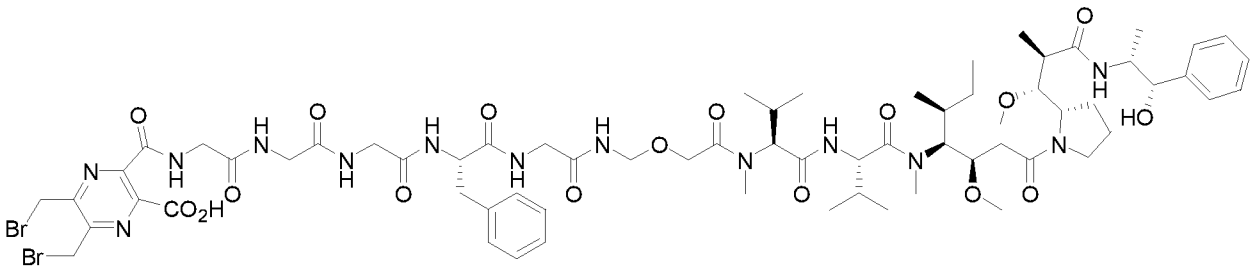
10



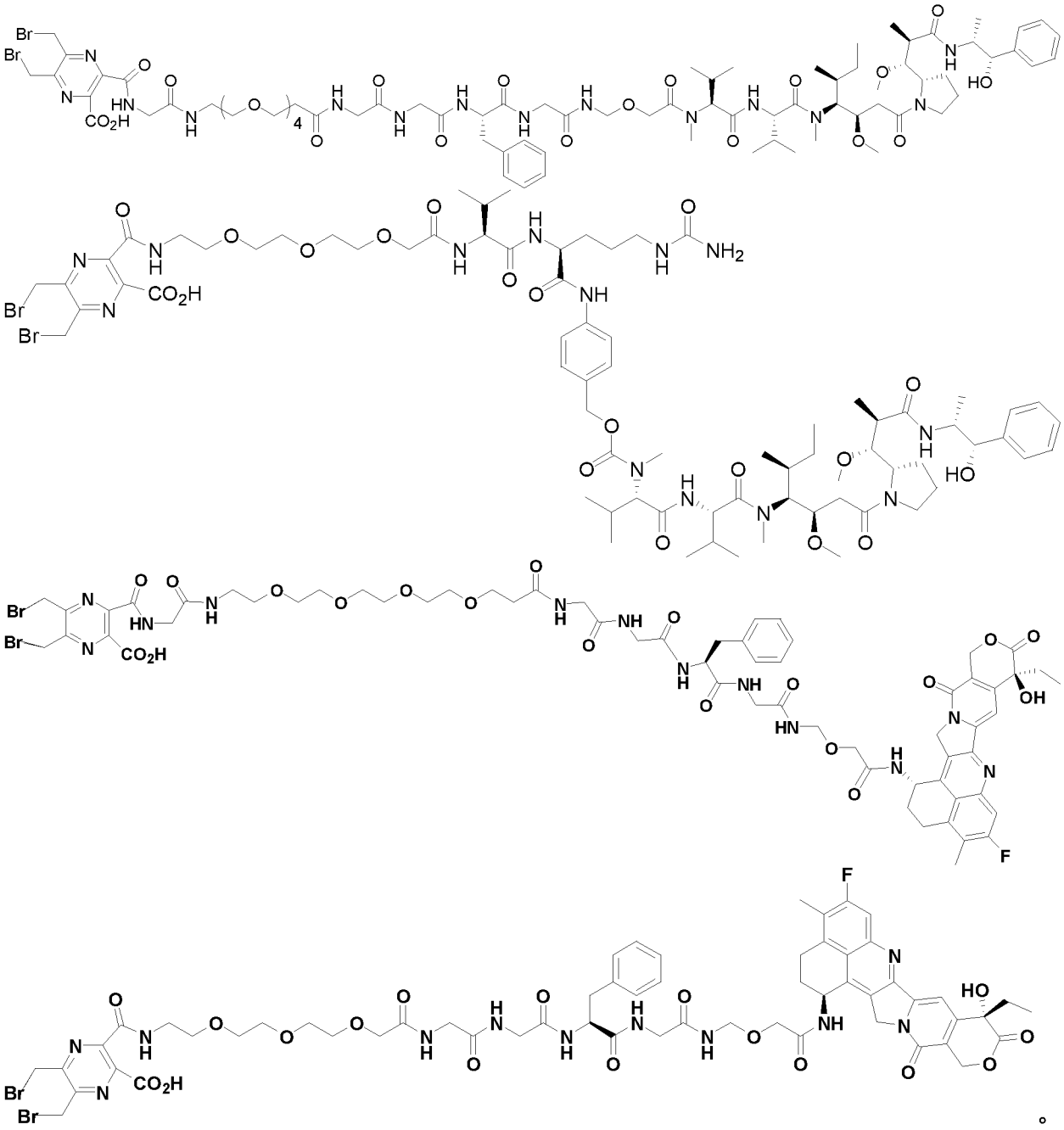
13



14

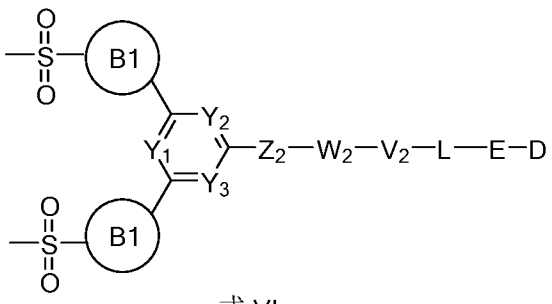


15



。

在第六个方面，本申请提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 VI 的结构：



式 VI

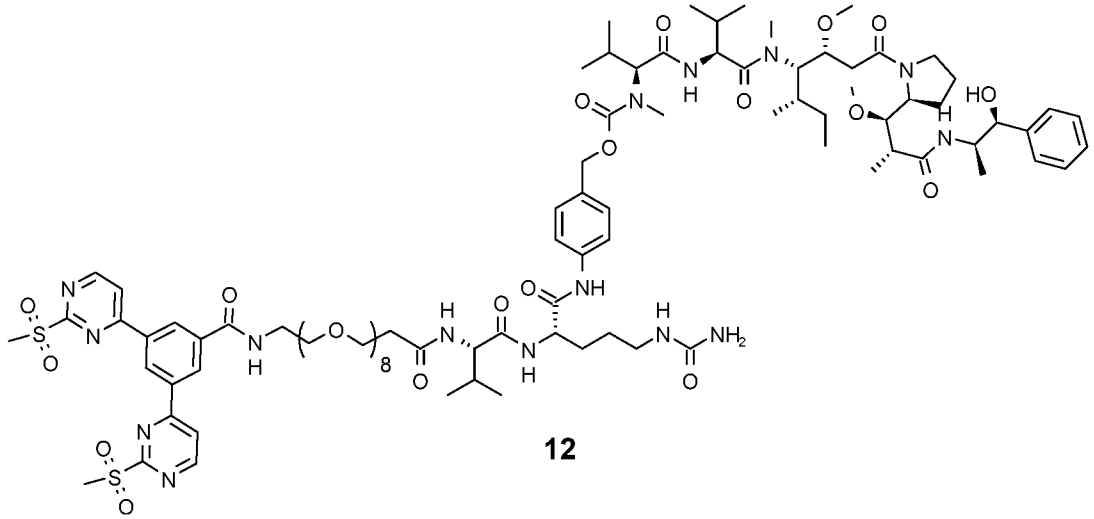
B_1、Y_1、Y_2、Y_3、Z_2和W_2如前文第二方面任一项中所定义；

L 如前文第三方面任一项中所定义；

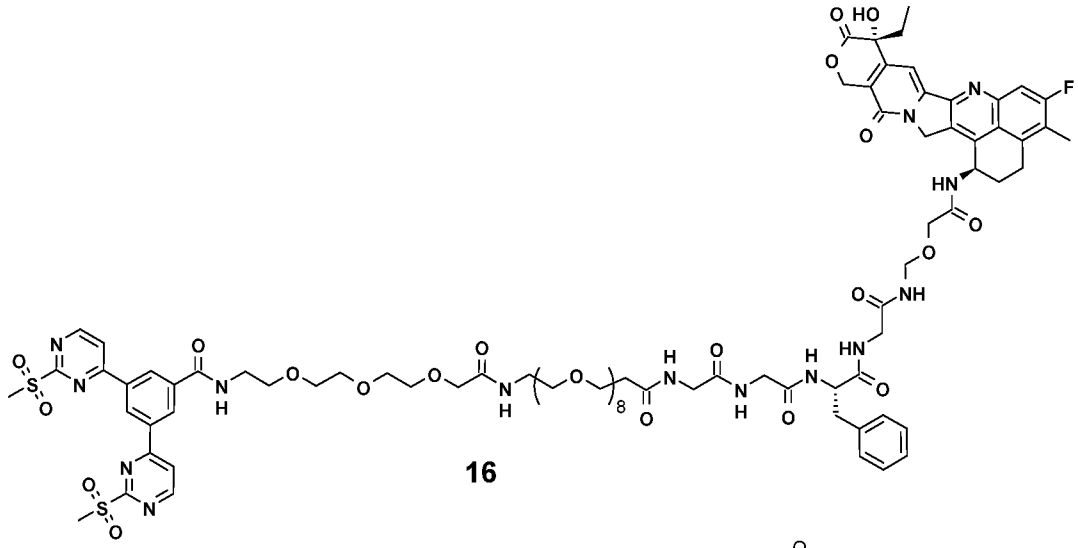
V_2如前文第四方面任一项中所定义；

E 和 D 如前文第五方面任一项中所定义。

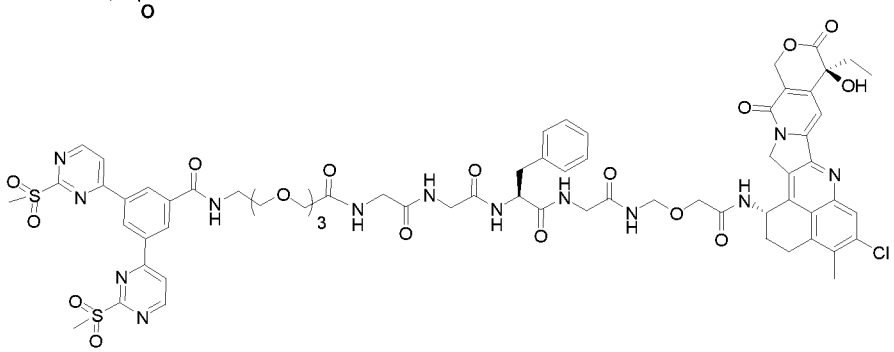
在部分实施方案中，所述式 VI 化合物为

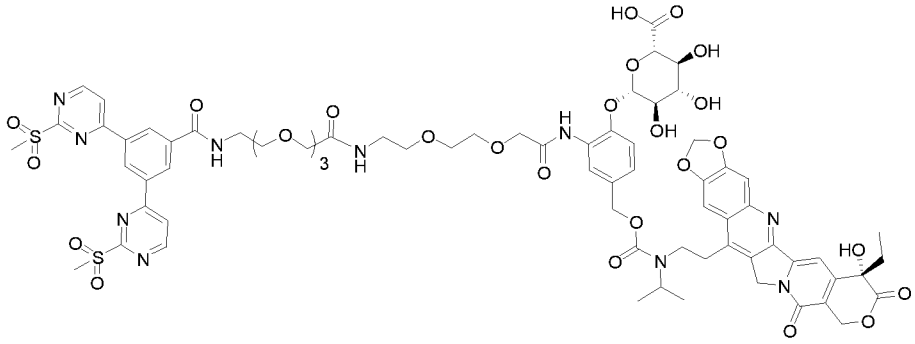


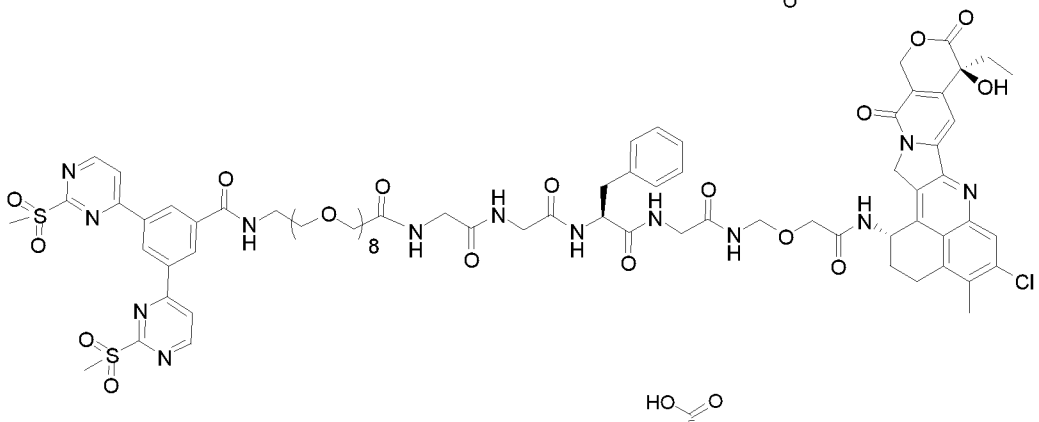
12

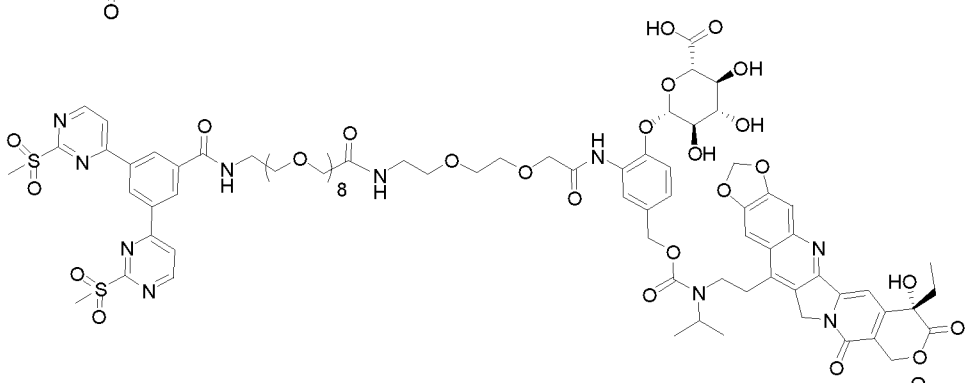


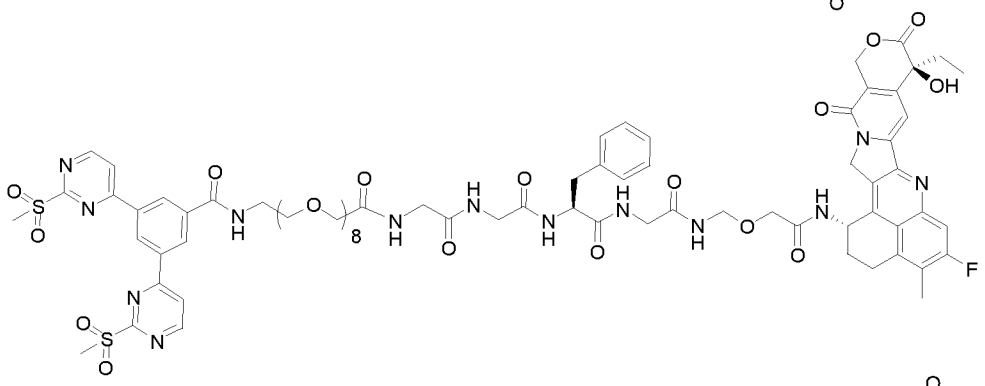
16

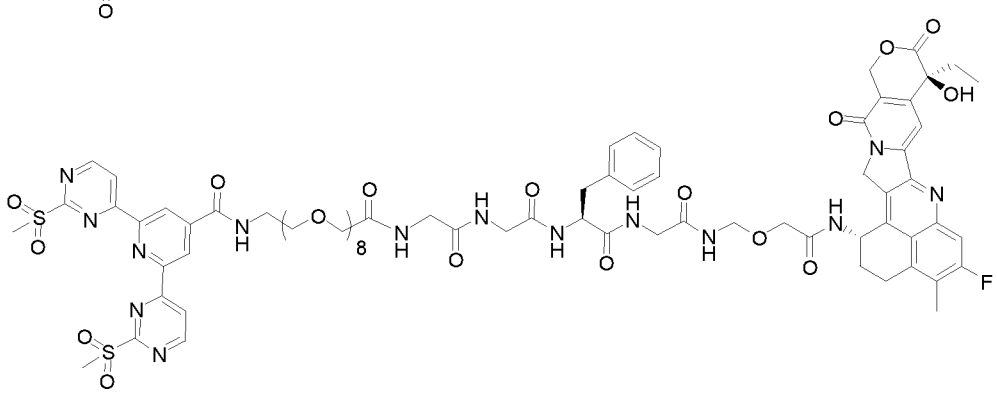


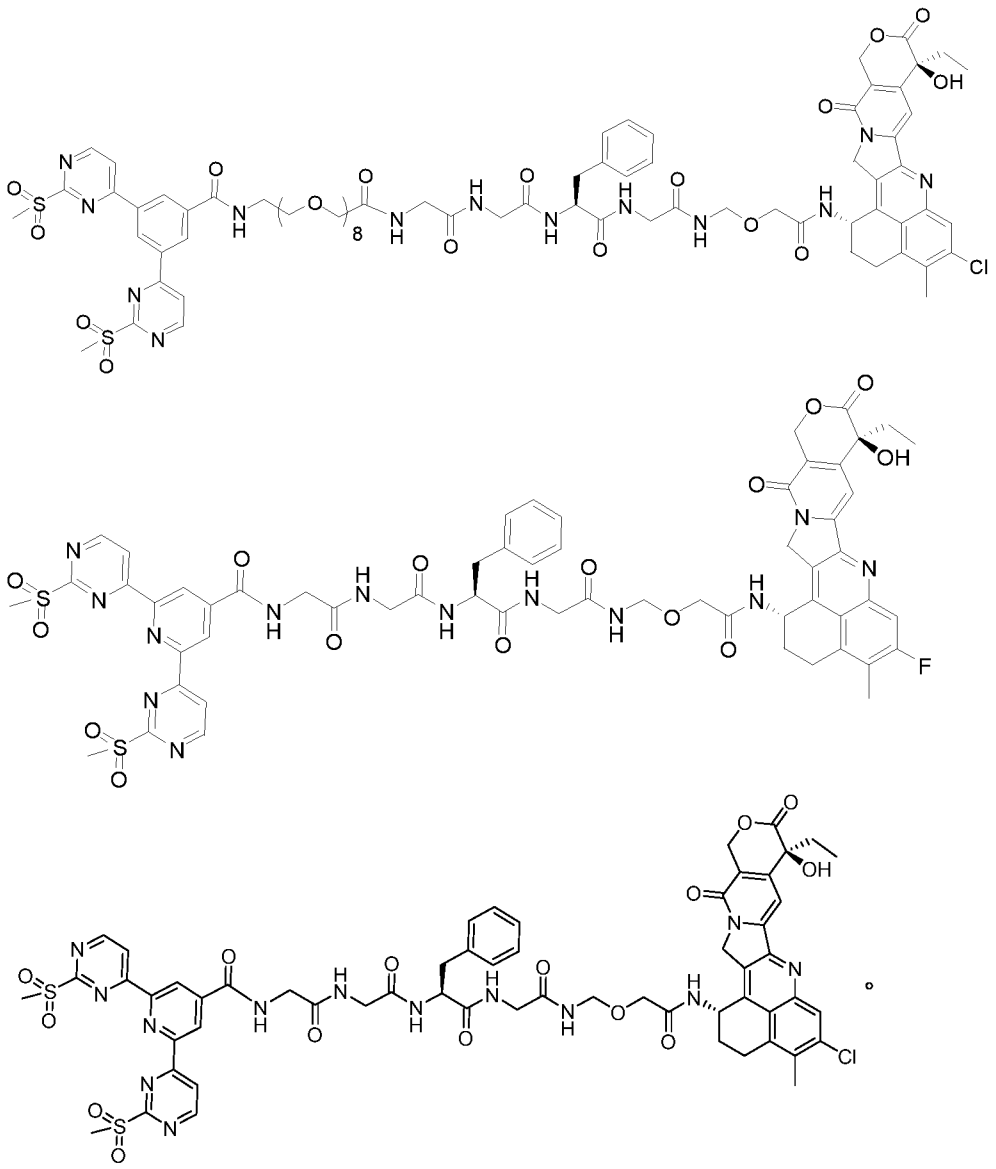




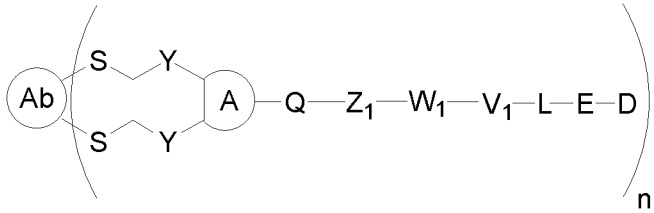








在第七个方面，本申请提供一种生物活性偶联物，其结构如式 VII 所示：



式 VII

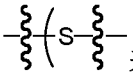
其中，Ab 为靶向部分（例如小分子配体、蛋白质（例如抗体）、多肽、非蛋白质试剂（例如糖、RNA 或 DNA））；n 选自 1-10 之间的整数或小数；

V_1 选自-C(O)-或-N(R_1)-，其中 R_1 为 H、C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烷氧烷基；

L 是连接 V_1 和 E 之间的连接子；

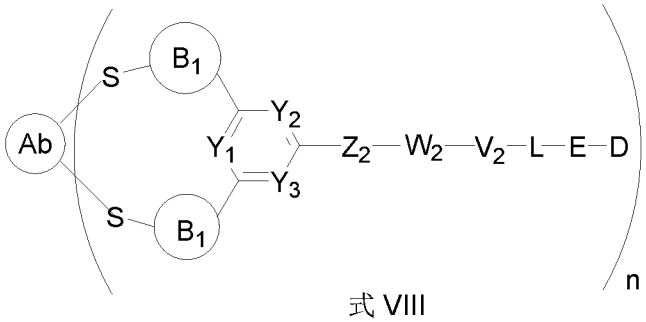
E 是连接 L 和 D 的结构片段；

D 是生物活性分子（例如细胞毒性药物）片段；

所述偶联物中的  表示靶向部分为抗体时，抗体中的巯基与偶联物其余部分的具体连接方式；

其余基团如前文任一方面任一项中所定义。

本发明的另一个方面提供一种生物活性偶联物，其结构如式 VIII 所示：



式 VIII

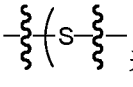
其中，Ab 为靶向部分（例如小分子配体、蛋白质（例如抗体）、多肽、非蛋白质试剂（例如糖、RNA 或 DNA））；n 选自 1-10 之间的整数或小数；

V_2选自-C(O)-或-N(R_2)-，其中 R_2为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；

L 是连接 V_2和 E 之间的连接子；

E 是连接 L 和 D 的结构片段；

D 是生物活性分子（例如细胞毒性药物）片段；

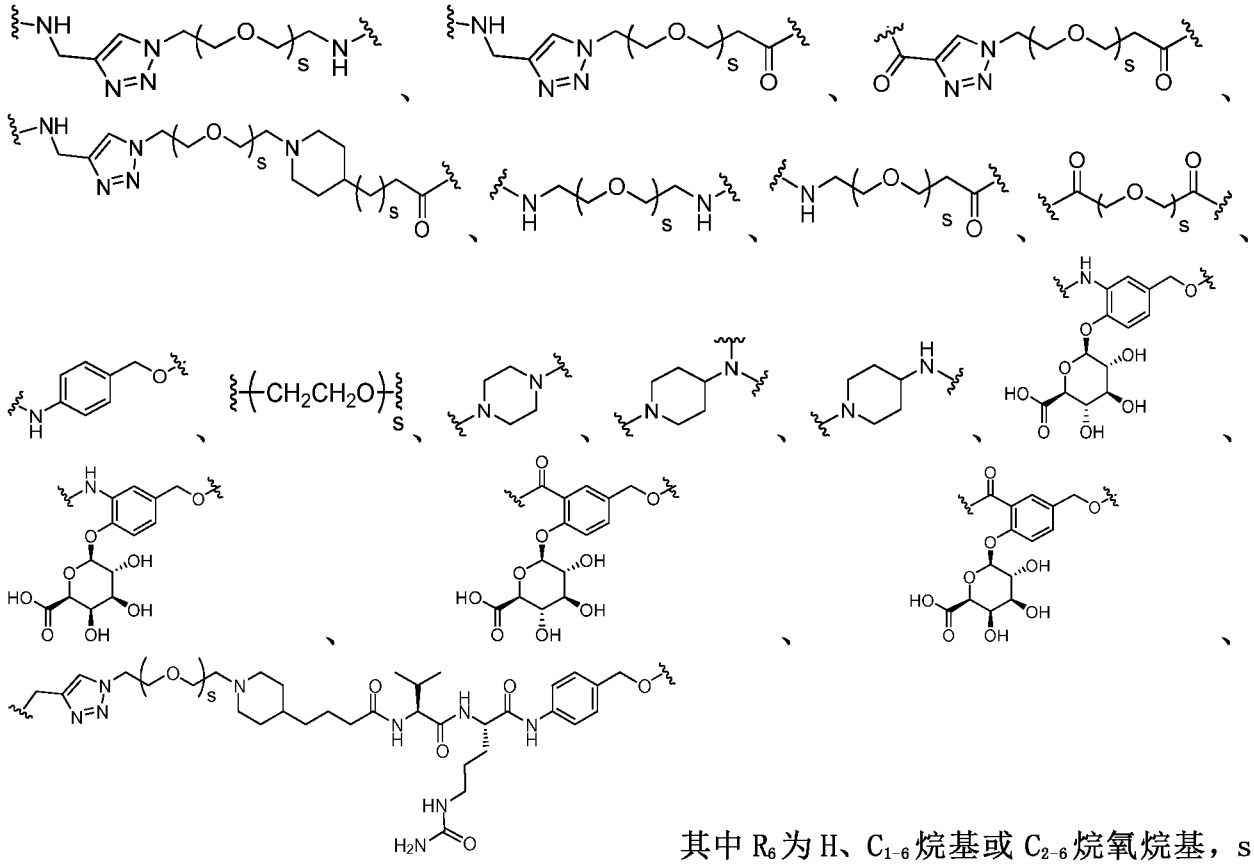
所述偶联物中的  表示靶向部分为抗体时，抗体中的巯基与偶联物其余部分的具体连接方式；

其余基团如前文任一方面任一项中所定义。在部分实施方案中，Ab 选自表皮生长因子、Trop-2、CD37、HER2、CD70、EGFRvIII、Mesothelin、Folate receoptor1、Mucin 1、CD138、CD20、CD19、CD30、SLTRK6、Nectin 4、Tissue factor、Mucin16、Endothelinreceoptor、STEAP1、SLC39A6、Guanylylcyclase C、PSMA、CCD79b、CD22、Sodium phosphate cotransporter 2B、GPNMB、Trophoblast glycoprotein、AGS-16、EGFR、CD33、CD66e、CD74、CD56、PD-L1、TACSTD2、DR5、E16、STEAP1、0772P、MPF、Napi3b、Sema 5b、PSCA hlg、ETBR、MSG783、STEAP2、TrpM4、CRIPTO、CD21、CD79b、FcRH2、NCA、MDP、IL20Rα、Brevican、EphB2R、ASLG659、PSCA、GEDA、BAFF-R、CD22、CD79a、CXCR5、HLA-DOB、P2X5、CD72、LY64、FcRH1、IRTA2、TENB2、整合素α5β6，α4β7、FGF2、FGFR2、Her3、CD70、CA6、DLL3、DLL4、P-cadherin、EpCAM、pCAD、CD223、LYPD3、LY6E、EFNA4、ROR1、SLITRK6、5T4、ENPP3、SLC39A6、Claudin18.2、BMPR1B、E16、STEAP1、Tyro7、0772P、MPF、Napi3b、Sema 5b、PSCA hlg、ETBR、MSG783、STEAP2、TrpM4、CRIPTO、CD21、CD79b、FcRH2、NCA、MDP、IL20Rα、Brevican、

EphB2R、ASLG659、PSCA、GEDA、CD22、CD79a、CXCR5、HLA-DOB、P2X5、CD72、LY64、FcRH1、IRTA2，c-Met，ApoE、CD11c、CD40、CD45(PTPRC)、CD49D(ITGA4)、CD80、CSF1R、 CTSD、GZMB、Ly86、MS4A7、PIK3AP1、PIK3CD、CCR5、IFNG、IL10RA1、IL-6、ACTA2、COL7A1、LOX、LRRC15、MCPT8、MMP10、NOG、SERPINE1、STAT1、TGFBR1、CTSS、PGF、VEGFA、C1QA、C1QB、ANGPTL4、EGLN、ANGPTL4、EGLN3、BNIP3、AIF1、CCL5、CXCL10、CXCL11、IFI6、PLOD2、KISS1R、STC2、DDIT4、PFKFB3、PGK1、PDK1、AKR1C1、AKR1C2、CADM1、CDH11、COL6A3、CTGF、HMOX1、KRT33A、LUM、WNT5A、IGFBP3、MMP14、CDCP1、PDGFRA、TCF4、TGF、TGFB1、TGFB2、CD1 1b、ADGRE1、EMR2、TNFRSF21、UPK1B、TNFSF9、MMP16、MFI2、IGF-1R、RNF43、NaPi2b、BCMA、B7H3 和 TENB2；

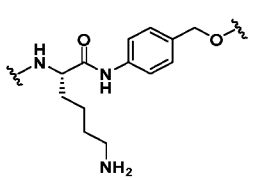
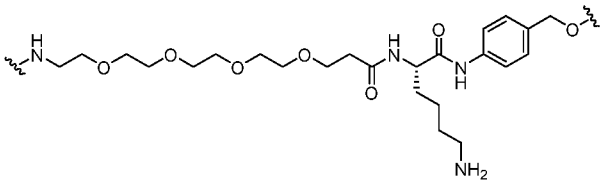
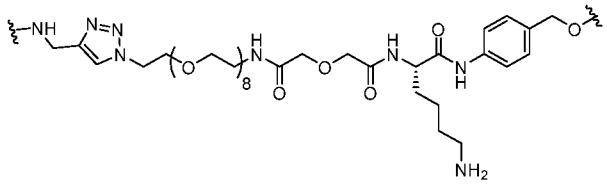
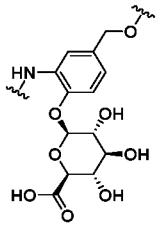
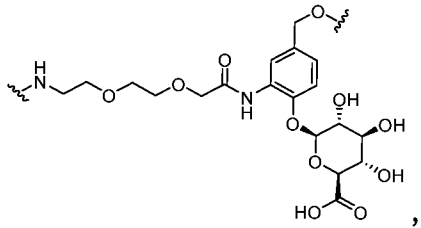
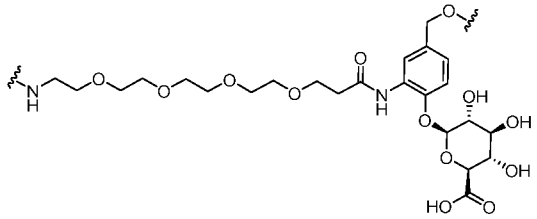
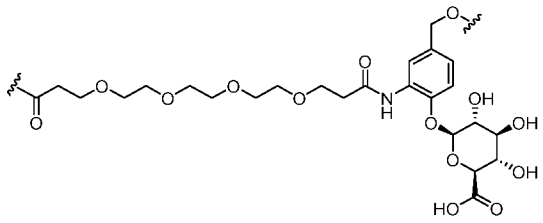
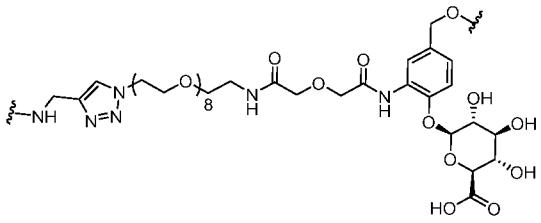
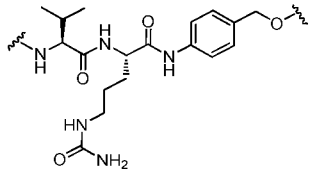
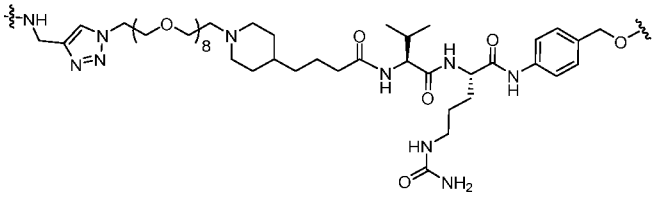
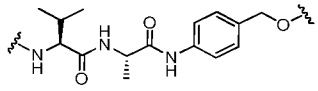
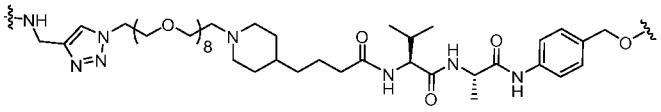
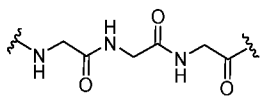
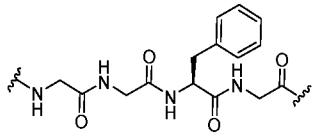
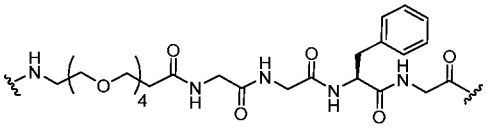
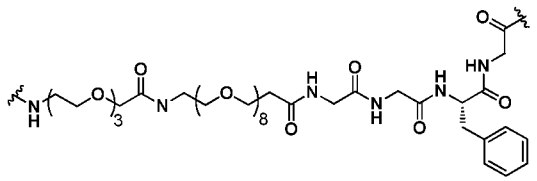
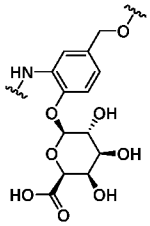
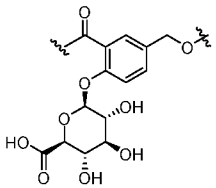
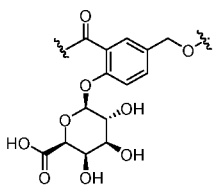
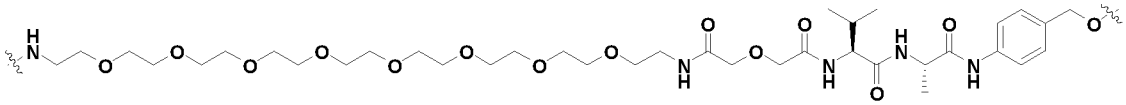
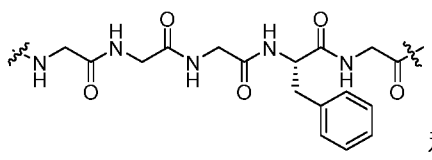
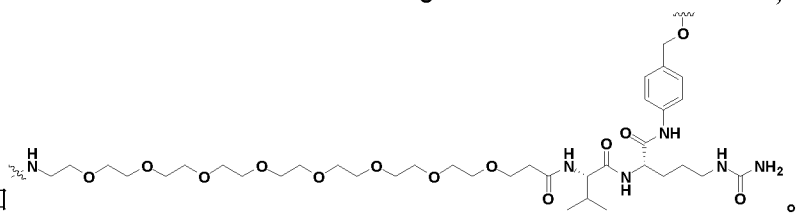
优选地，Ab 选自 anti-Her2 抗体 trastuzumab 或 anti-Trop2 抗体 sacituzumab 或 anti-ROR1 抗体 19F6_Hu35V1。

在部分实施方案中，L 选自以下基团中的一个或多个： C_{1-6} 亚烷基、-N(R_6)-、羰基、-O-、Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Phe、Ala、Asn、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly、

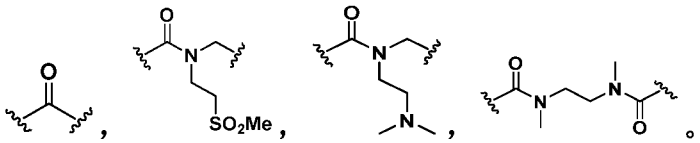


其中 R_6 为 H、C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烷氧烷基，s 为 1-10 的整数；

优选地，L 选自以下结构：


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

和

。

在部分实施方案中，所述的 E 为单键、-NH-CH_2-，或以下结构：



在部分实施方案中，所述的 E 为-NH-CH_2-。

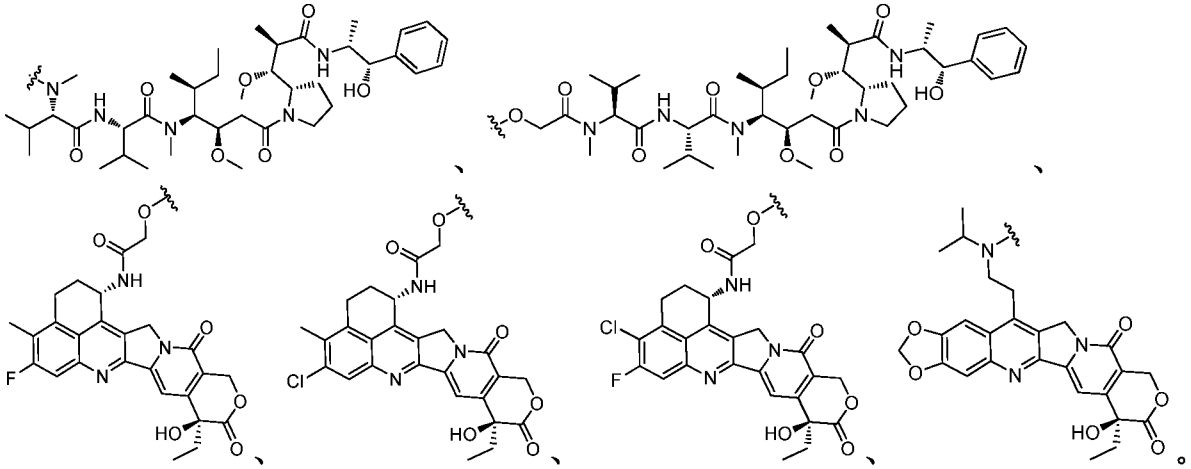
在部分实施方案中，所述生物活性分子选自下组：抗微管蛋白剂、DNA 嵌入剂、DNA 拓扑异构酶抑制剂和 RNA 聚合酶抑制剂。

在部分实施方案中，所述生物活性分子选自下组：微管蛋白抑制剂奥瑞他汀类化合物、美登素类化合物；DNA 嵌入剂 吡咯并苯二氮卓(PBD)；DNA 拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 I 抑制剂(诸如喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、卢比替康)或拓扑异构酶 II 抑制剂(诸如阿霉素、多柔比星、PNU-159682、多卡米星、柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素或依托泊苷)；RNA 聚合酶抑制剂 α-鹅膏草碱（α-amanitin）等；及其药学上可接受的盐、酯和类似物。

在部分实施方案中，所述生物活性分子选自：拓扑异构酶 I 抑制剂(诸如喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、卢比替康)、MMAE 以及 MMAE 衍生物。

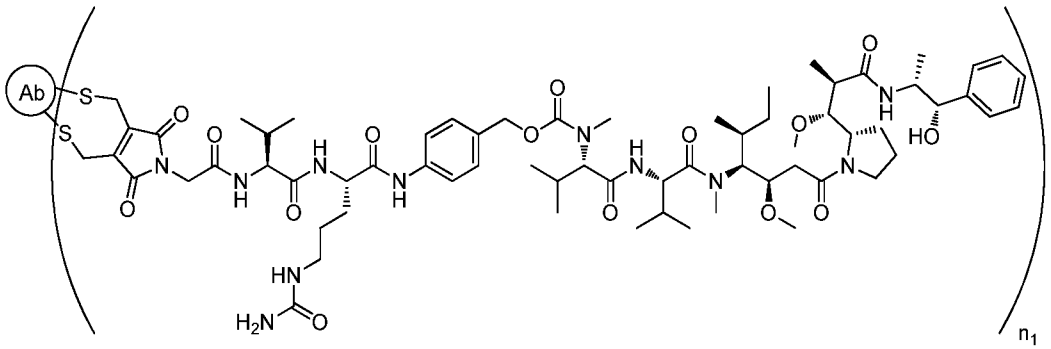
在部分实施方案中，所述生物活性分子选自：MMAE 以及 MMAE 衍生物。

在部分实施方案中，所述的 D 选自：

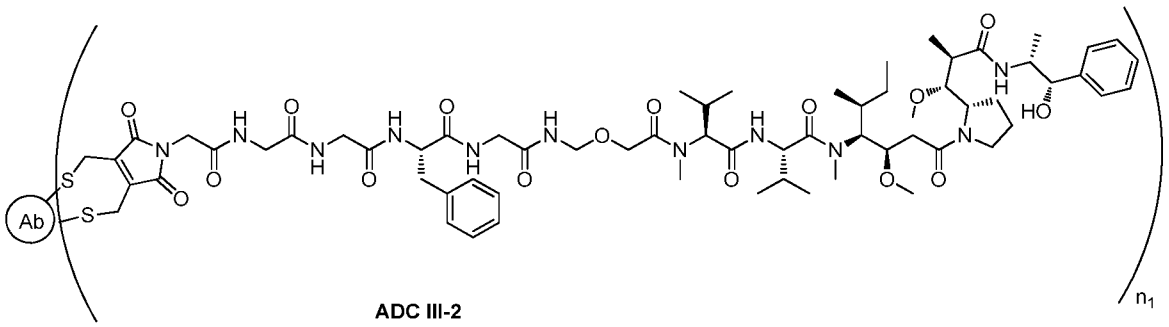


在部分实施方案中，n 为 1-8；进一步优选 n 为 3-5。

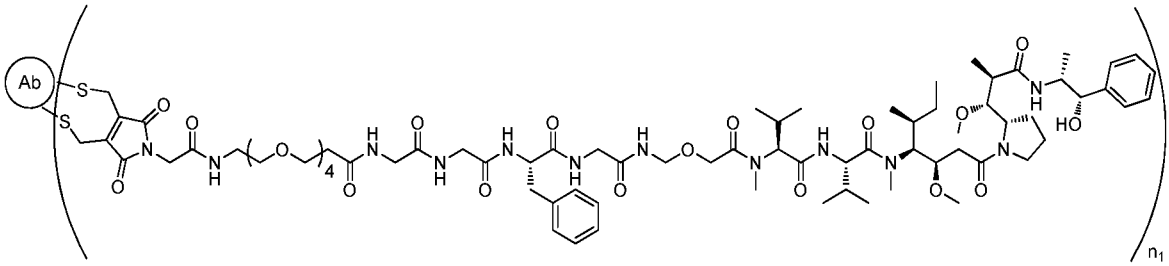
在部分实施方案中，所述生物活性偶联物结构如下，其中 Ab 选自 anti-Her2 抗体 trastuzumab 或 anti-Trop2 抗体 sacituzumab 或 anti-ROR1 抗体 19F6_Hu35V1，n_1为 1-8；进一步优选为 3-5：



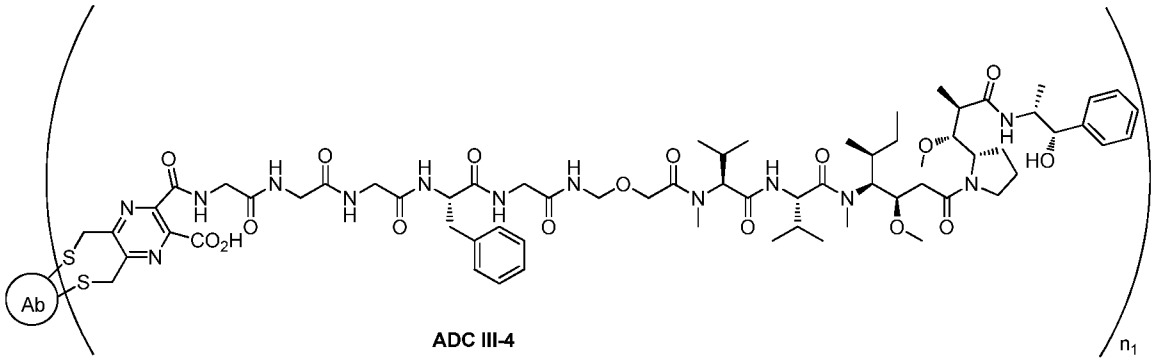
ADC III-1



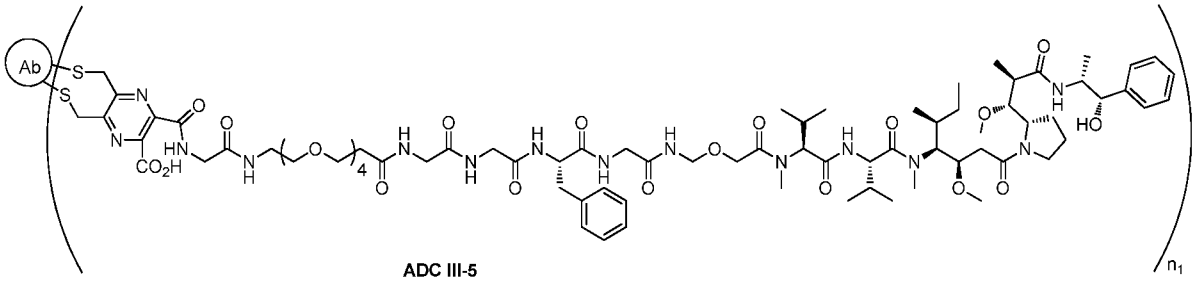
ADC III-2



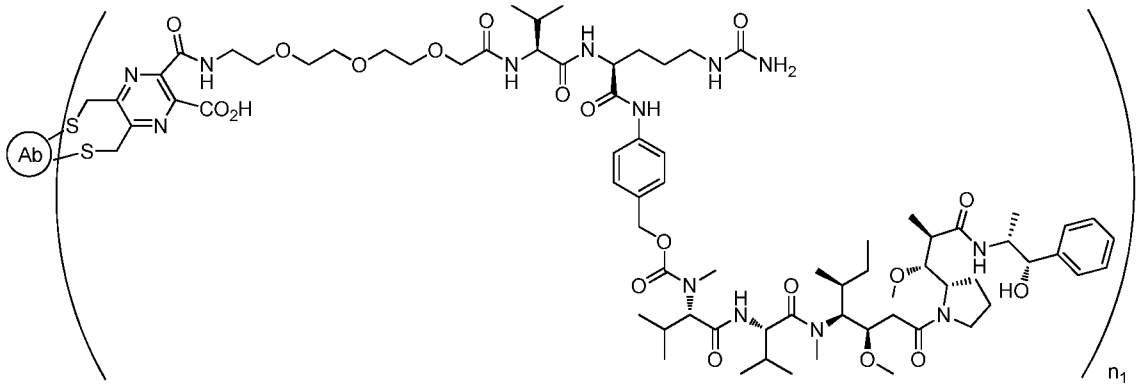
ADC III-3



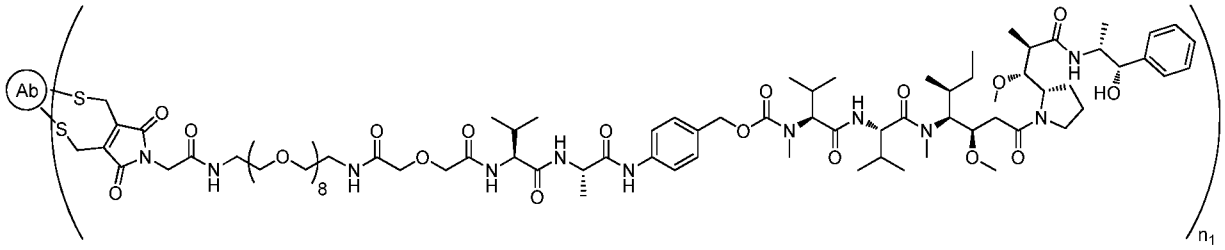
ADC III-4



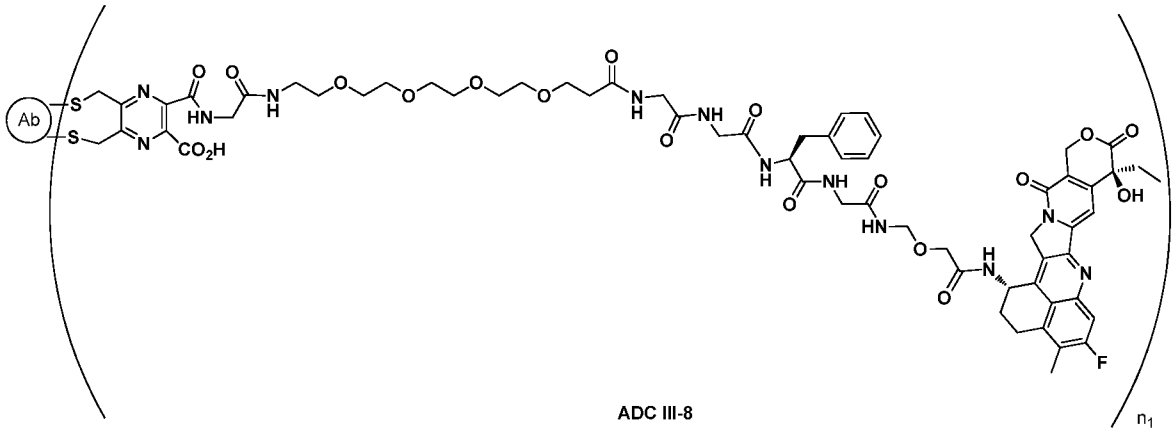
ADC III-5



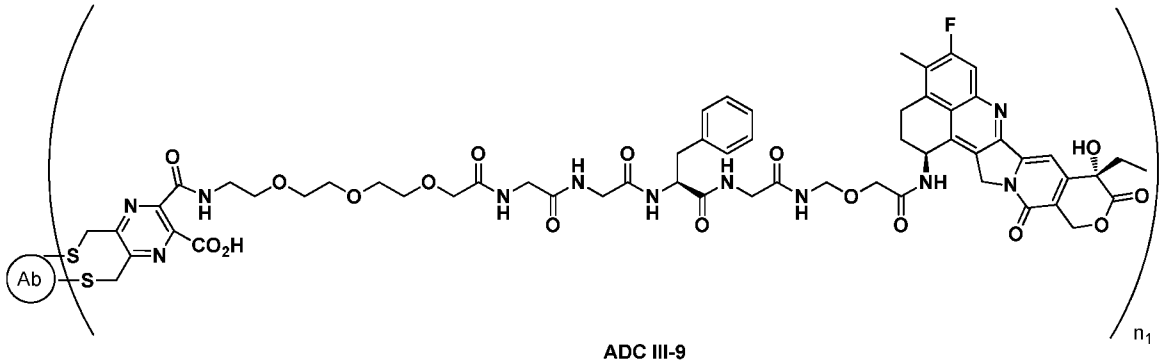
ADC III-6



ADC III-7



ADC III-8

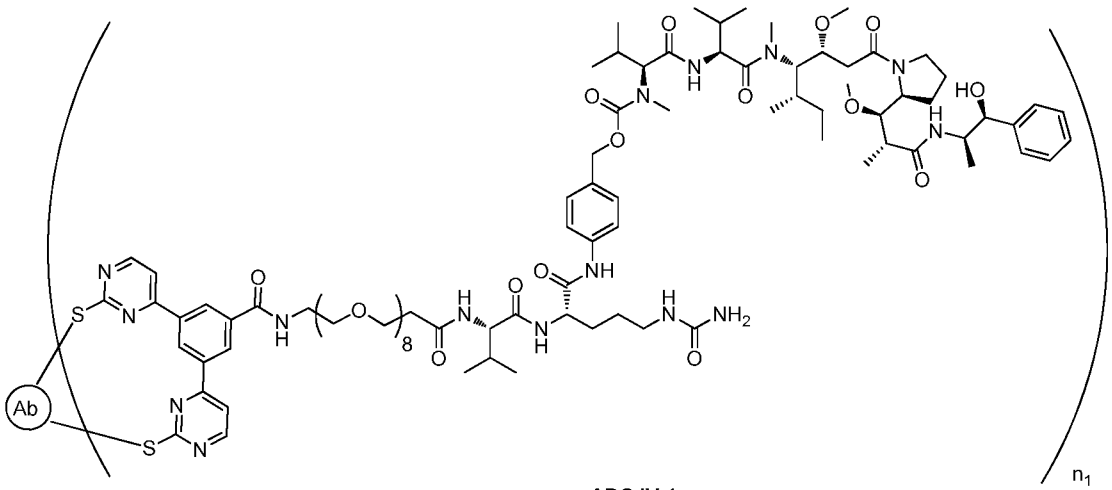


ADC III-9

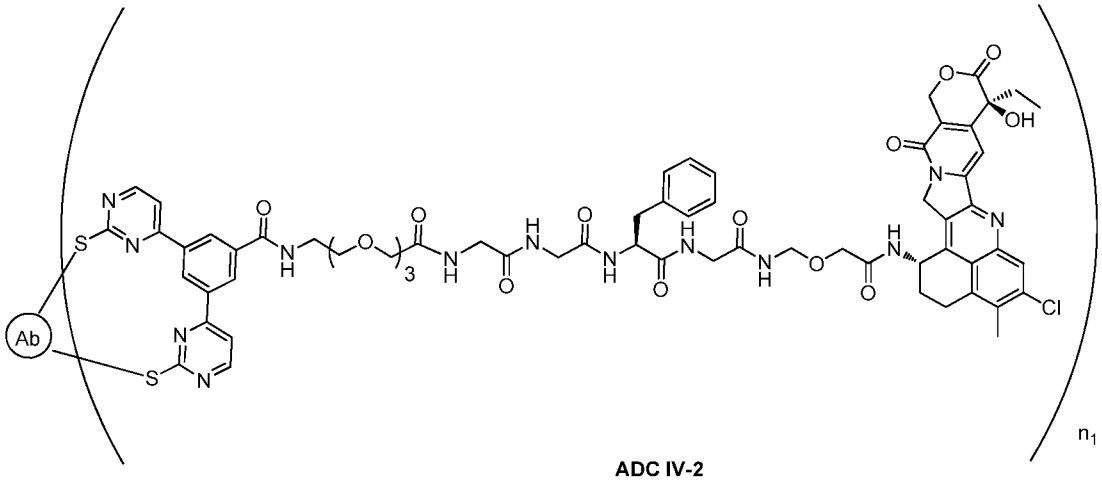
。

在部分实施方案中，所述生物活性偶联物结构如下，其中 Ab 选自 anti-Her2 抗体 trastuzumab 或 anti-Trop2 抗体 sacituzumab 或 anti-ROR1 抗体 19F6_Hu35V1，n_1为

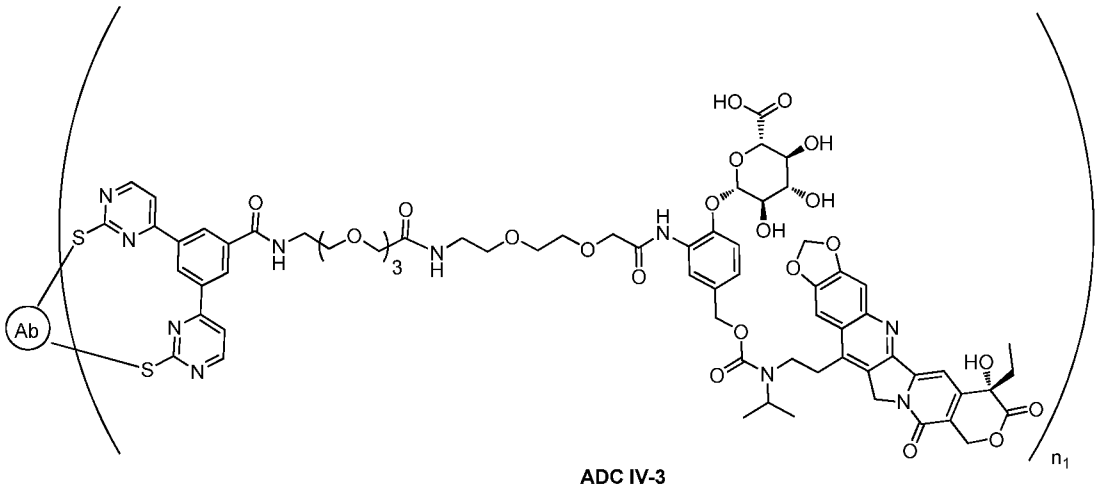
1-8；进一步优选为 3-5：



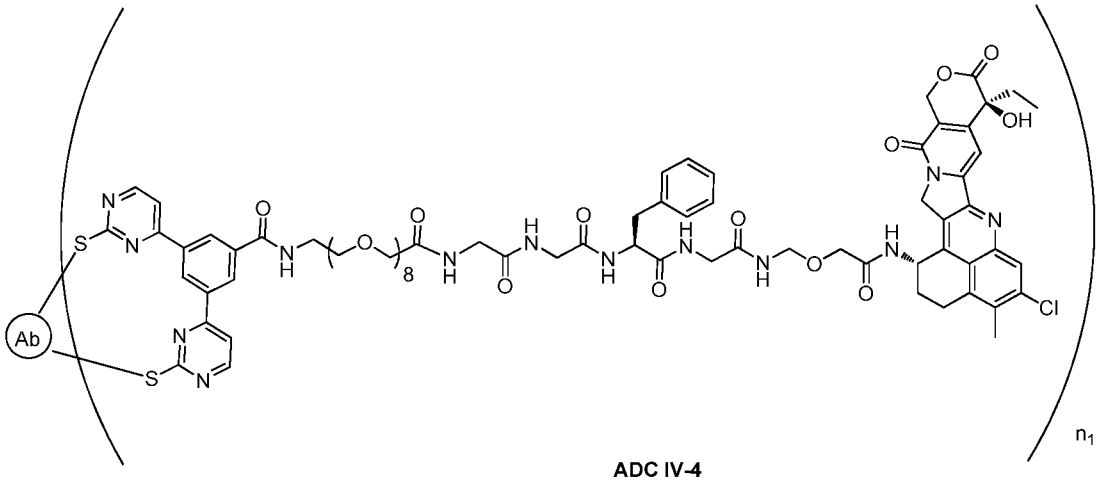
ADC IV-1



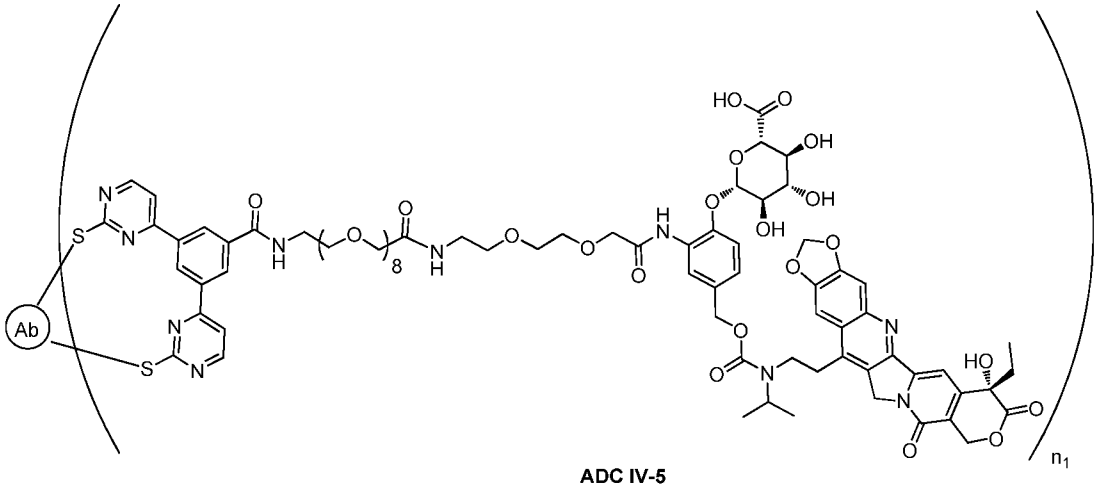
ADC IV-2



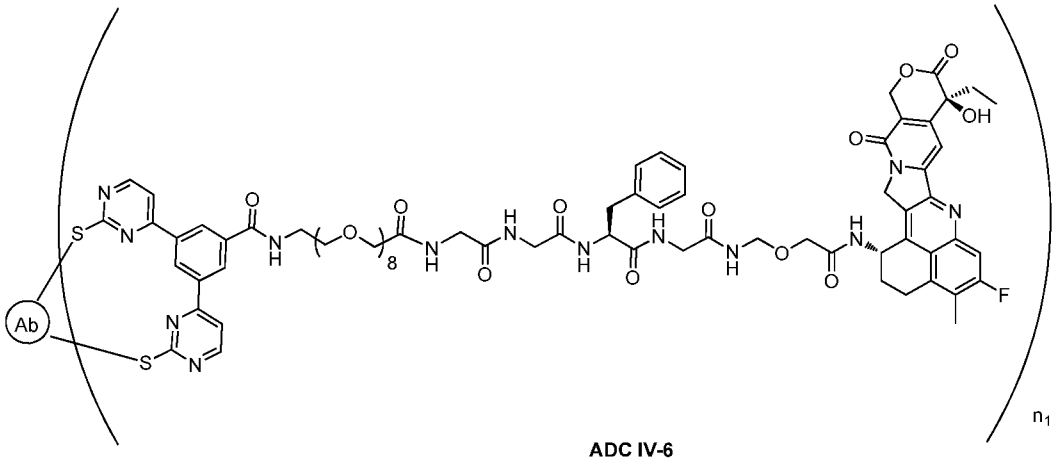
ADC IV-3



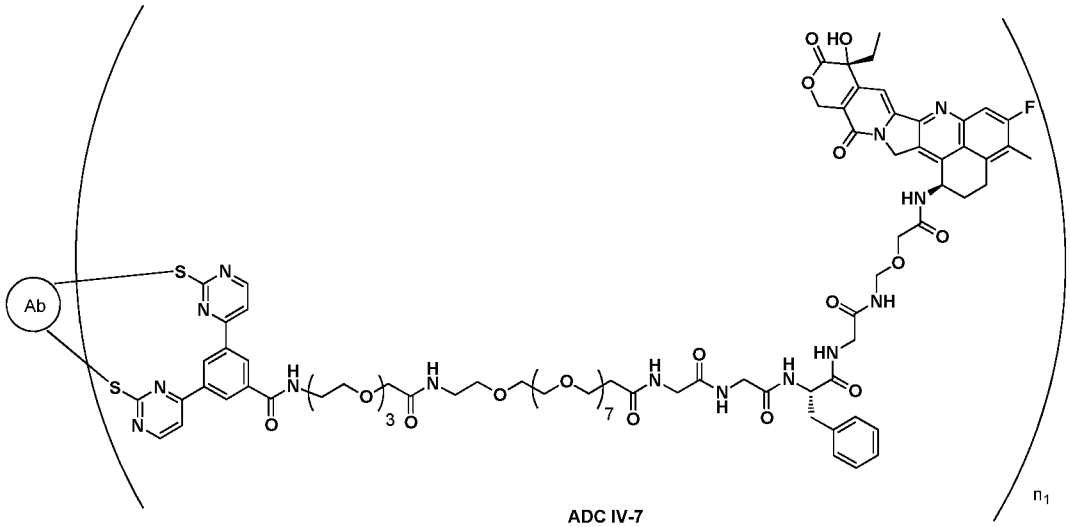
ADC IV-4



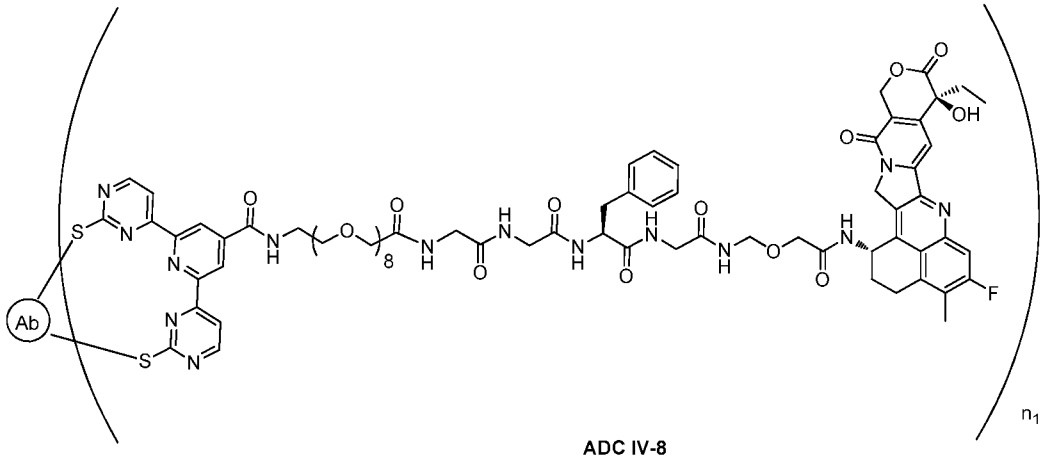
ADC IV-5



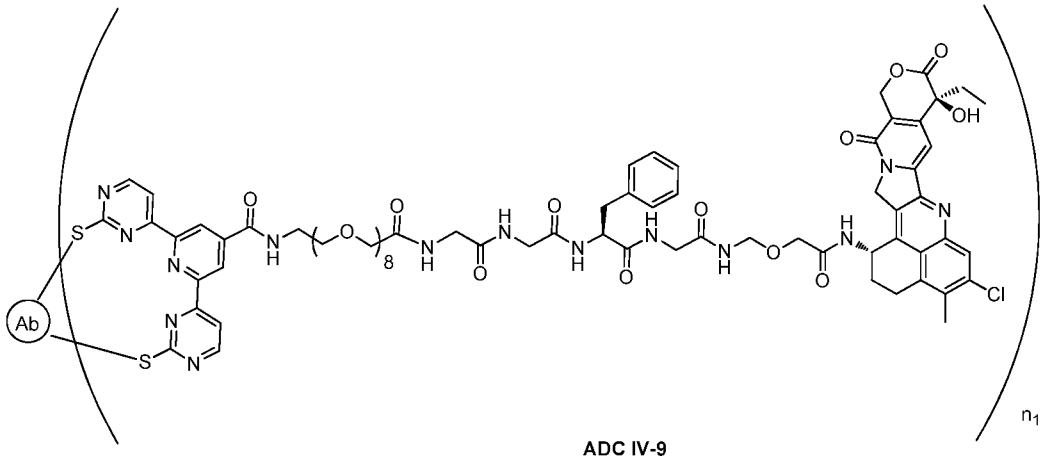
ADC IV-6



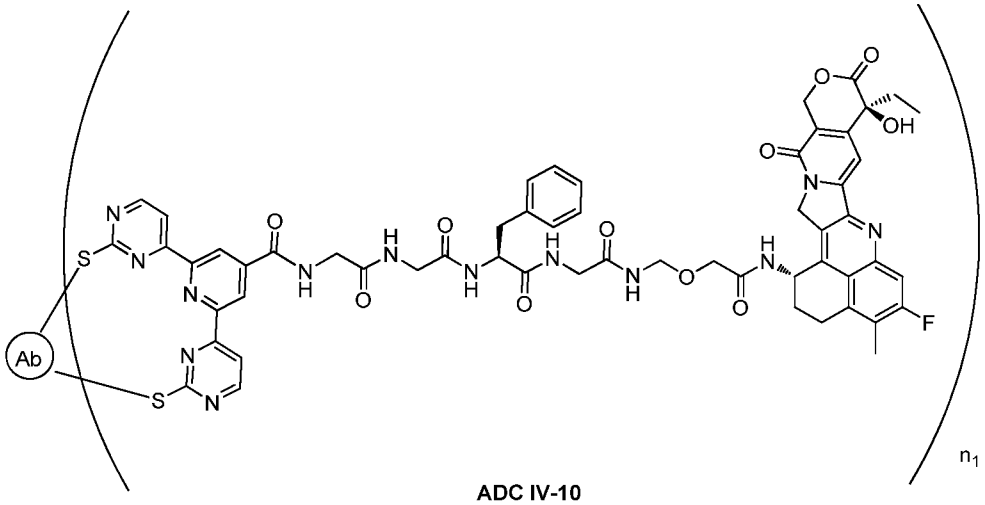
ADC IV-7



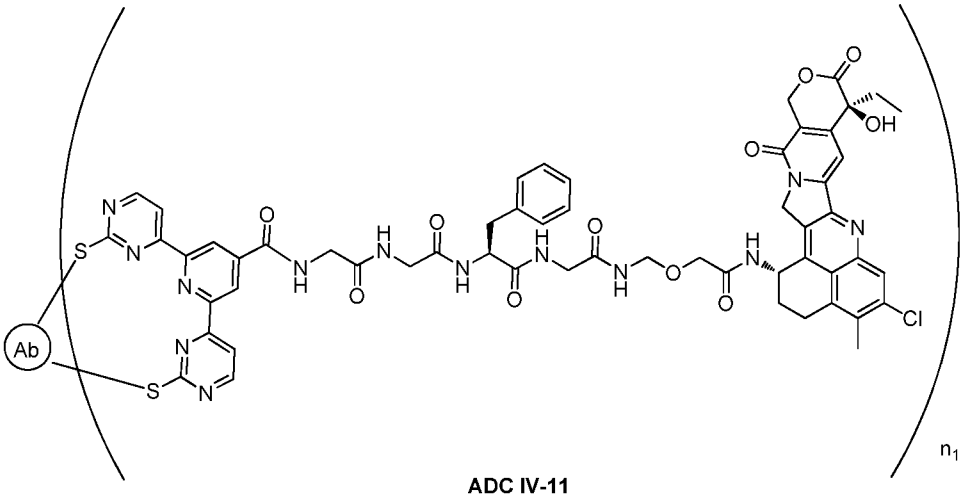
ADC IV-8



ADC IV-9



ADC IV-10



ADC IV-11

定义

除非在下文中另有定义，本文中所用的所有技术术语和科学术语的含义意图与本领域技术人员通常所理解的相同。提及本文中使用的技术意图指在本领域中通常所理解的技术，包括那些对本领域技术人员显而易见的技术的变化或等效技术的替换。虽然相信以下术语对于本领域技术人员很好理解，但仍然阐述以下定义以更好地解释本发明。

如本文中所使用，术语“亚烷基”表示饱和二价烃基，优选表示具有 1、2、3、4、5 或 6 个碳原子的饱和二价烃基，例如亚甲基、亚乙基、亚丙基或亚丁基。

如本文中所使用，术语“烷基”定义为线性或支化饱和脂肪族烃。在一些实施方案中，烷基具有 1 至 12 个，例如 1 至 6 个碳原子。例如，如本文中所使用，术语“C_{1-6}烷基”指 1 至 6 个碳原子的线性或支化的脂肪族烃基(例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基或正己基)，其任选地被 1 或多个(诸如 1 至 3 个)适合的取代基（如卤素）取代(此时该基团被称作“卤代烷基”）(例如 CH_2F、CHF_2、CF_3、CCl_3、C_2F_5、C_2Cl_5、CH_2CF_3、CH_2Cl 或$-CH_2CH_2CF_3$等)。术语“C_{1-4}烷基”指 1 至 4

个碳原子的线性或支化的脂肪族烃基(即甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基)。

如本文中所使用，术语“烷氧基”定义为-O-烷基，所述烷基根据上文所定义。例如，如本文中所使用，术语“C_{1-6}烷氧基”指-O- C_{1-6}烷基。

如本文中所使用，术语“烷氧烷基”定义为被烷氧基取代的烷基，所述烷基根据上文所定义。例如，如本文中所使用，术语“C_{2-6}烷氧烷基”指具有 2 至 6 个碳原子的被烷氧基取代的烷基基团。

如本文中所使用，术语“亚炔基”表示包括至少一个碳碳三键的二价烃基，优选具有1、2、3、4、5或6个碳原子，例如亚乙炔基、亚丙炔基或亚丁炔基。

如本文中所使用，术语“杂环基”、“杂环”是指其中至少一个环原子是选自N、O和S的杂原子且其余环原子是C的饱和或部分不饱和的(即在环内具有一个或多个双键和/或三键)环状基团。例如，“5-12元杂环(基)”是具有4-11个(如2、3、4、5、6、7、8或9个)环碳原子和一个或多个(例如1个、2个、3个或4个)独立地选自N、O和S的杂原子的饱和或部分不饱和杂环基。“5-12元含氮杂环(基)”是成环原子中至少一个为N的杂环(基)。杂环基的实例包括但不限于：环氧乙烷基、氮丙啶基、氮杂环丁基(azetidinyl)、氧杂环丁基(oxetanyl)、四氢呋喃基、二氧杂环戊烯基(dioxolinyl)、吡咯烷基、吡咯烷酮基、咪唑烷基、吡唑烷基、吡咯啉基、四氢吡喃基、哌啶基、吗啉基、二噻烷基(dithianyl)、硫吗啉基、哌嗪基或三噻烷基(trithianyl)。所述杂环基可任选地被一个或多个(例如1个、2个、3个或4个)适合的取代基取代，并且可以任选地和一个或多个芳环、杂芳环形成并环结构。

如本文中所使用，术语“芳环”或“芳基”指单环或多环芳族环系，其具有例如 5、6、8、9、10、11、12、13 或 14 个成环碳原子，特别是 1 或 2 或 3 或 4 或 5 或 6 或 9 或 10 个碳原子。

如本文中所使用，术语“芳杂环”或“杂芳基”指单环或多环芳族环系，其具有例如 5、6、8、9、10、11、12、13 或 14 个环原子，特别是 1 或 2 或 3 或 4 或 5 或 6 或 9 或 10 个碳原子，且其包含至少一个可以相同或不同的杂原子(所述杂原子是例如氧、氮或硫)，并且，另外在每一种情况下可为苯并稠合的。

如本文中所使用，术语“卤素”包括 F、Cl、Br 或 I。

如本文中所使用，术语“磺酰脲基”指-SO_2-NH-(C=O)-NH_2或-NH-(C=O)-NH-SO_2H。

术语“取代”指所指定的原子上的一个或多个(例如一个、两个、三个或四个)氢被从所指出的基团的选择代替，条件是未超过所指定的原子在当前情况下的正常原子价并且所述取代形成稳定的化合物。取代基和/或变量的组合仅仅当这种组合形成稳定的化合物时

才是允许的。

如果取代基被描述为“任选地被……取代”，则取代基可(1)未被取代或(2)被取代。如果取代基的碳被描述为任选地被取代基列表中的一个或多个取代，则碳上的一个或多个氢(至存在的任何氢的程度)可单独和/或一起被独立地选择的任选的取代基替代。如果取代基的氮被描述为任选地被取代基列表中的一个或多个取代，则氮上的一个或多个氢(至存在的任何氢的程度)可各自被独立地选择的任选的取代基替代。

如果取代基被描述为“独立地选自”一组基团，则各取代基独立于另一者被选择。因此，各取代基可与另一(其他)取代基相同或不同。

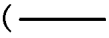
如本文中所使用，术语“一个或多个”意指在合理条件下的 1 个或超过 1 个，例如 2 个、3 个、4 个、5 个或 10 个。

除非指明，否则如本文中所使用，取代基的连接点可来自取代基的任意适宜位置。

当取代基的键显示为穿过环中连接两个原子的键时，则这样的取代基可键连至该可取代的环中的任一成环原子。

本发明还包括所有药学上可接受的同位素标记的化合物，其与本发明的化合物相同，除了一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数不同于在自然界中占优势的原子质量或质量数的原子替代。适合包含入本发明的化合物中的同位素的实例包括(但不限于)氢的同位素(例如氘(^{2}H)、氚(^{3}H))；碳的同位素(例如^{11}C、^{13}C及^{14}C)；氯的同位素(例如^{36}Cl)；氟的同位素(例如^{18}F)；碘的同位素(例如^{123}I及^{125}I)；氮的同位素(例如^{13}N及^{15}N)；氧的同位素(例如^{15}O、^{17}O及^{18}O)；磷的同位素(例如^{32}P)；及硫的同位素(例如^{35}S)。

术语“立体异构体”表示由于至少一个不对称中心形成的异构体。在具有一个或多个(例如一个、两个、三个或四个)不对称中心的化合物中，其可产生外消旋混合物、单一对映异构体、非对映异构体混合物和单独的非对映异构体。特定个别分子也可以几何异构体(顺式/反式)存在。类似地，本发明的化合物可以两种或更多种处于快速平衡的结构不同的形式的混合物(通常称作互变异构体)存在。互变异构体的代表性实例包括酮-烯醇互变异构体、苯酚-酮互变异构体、亚硝基-肟互变异构体、亚胺-烯胺互变异构体等。要理解，本申请的范围涵盖所有这样的以任意比例(例如 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)的异构体或其混合物。

本文中可使用实线(———)、实楔形()或虚楔形()描绘本发明的化合物的碳-碳键。使用实线以描绘键连至不对称碳原子的键欲表明，包括该碳原子处的所有可能的立体异构体(例如，特定的对映异构体、外消旋混合物等)。使用实或虚楔形以描绘键连至不对称碳原子的键欲表明，存在所示的立体异构体。当存在于外消旋混合物中时，使用实及虚楔形以定义相对立体化学，而非绝对立体化学。除非另外指明，否则本发明的

化合物意欲可以立体异构体(其包括顺式及反式异构体、光学异构体(例如 R 及 S 对映异构体)、非对映异构体、几何异构体、旋转异构体、构象异构体、阻转异构体及其混合物)的形式存在。本发明的化合物可表现一种以上类型的异构现象，且由其混合物(例如外消旋混合物及非对映异构体对)组成。

本发明涵盖本发明的化合物的所有可能的结晶形式或多晶型物，其可为单一多晶型物或多于一种多晶型物的任意比例的混合物。

还应当理解，本发明的某些化合物可以游离形式存在用于治疗，或适当时，以其药学上可接受的衍生物形式存在。在本发明中，药学上可接受的衍生物包括但不限于，药学上可接受的盐、酯、溶剂合物、N-氧化物、代谢物或前药，在将它们向需要其的患者给药后，能够直接或间接提供本发明的化合物或其代谢物或残余物。因此，当在本文中提及“本发明的化合物”时，也意在涵盖化合物的上述各种衍生物形式。

本发明的化合物的药学上可接受的盐包括其酸加成盐及碱加成盐。

适合的酸加成盐由形成药学可接受盐的酸来形成。实例包括天冬氨酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、棕榈酸盐及其它类似的盐。

适合的碱加成盐由形成药学可接受盐的碱来形成。实例包括铝盐、精氨酸盐、胆碱盐、镁盐及其它类似的盐。

适合的盐的综述参见 Stahl 及 Wermuth 的“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” (Wiley-VCH, 2002)。用于制备本发明的化合物的药学上可接受的盐的方法为本领域技术人员已知的。

如本文中所使用，术语“酯”意指衍生自本申请中各个通式化合物的酯，其包括生理上可水解的酯(可在生理条件下水解以释放游离酸或醇形式的本发明的化合物)。本发明的化合物本身也可以是酯。

本发明的化合物可以溶剂合物(优选水合物)的形式存在，其中本发明的化合物包含作为所述化合物晶格的结构要素的极性溶剂，特别是例如水、甲醇或乙醇。极性溶剂特别是水的量可以化学计量比或非化学计量比存在。

本领域技术人员会理解，由于氮需要可用的孤对电子来氧化成氧化物，因此并非所有的含氮杂环都能够形成 *N*-氧化物；本领域技术人员会识别能够形成 *N*-氧化物的含氮杂环。本领域技术人员还会认识到叔胺能够形成 *N*-氧化物。用于制备杂环和叔胺的 *N*-氧化物的合成方法是本领域技术人员熟知的，包括用过氧酸如过氧乙酸和间氯过氧苯甲酸(MCPBA)、过氧化氢、烷基过氧化氢如叔丁基过氧化氢、过硼酸钠和双环氧乙烷(dioxirane)如二甲基双环氧乙烷来氧化杂环和叔胺。这些用于制备 *N*-氧化物的方法已在文献中得到广泛描述

和综述，参见例如：T. L. Gilchrist, *Comprehensive Organic Synthesis*, vol. 7, pp 748-750；A. R. Katritzky 和 A. J. Boulton, Eds., Academic Press；以及 G. W. H. Cheeseman 和 E. S. G. Werstiuk，*Advances in Heterocyclic Chemistry*, vol. 22, pp 390-392, A. R. Katritzky 和 A. J. Boulton, Eds., Academic Press。

在本发明的范围内还包括本发明的化合物的代谢物，即在给药本发明的化合物时体内形成的物质。这样的产物可由例如被给药的化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、酶解等产生。因此，本发明包括本发明的化合物的代谢物，包括通过使本发明的化合物与哺乳动物接触足以产生其代谢产物的时间的方法制得的化合物。

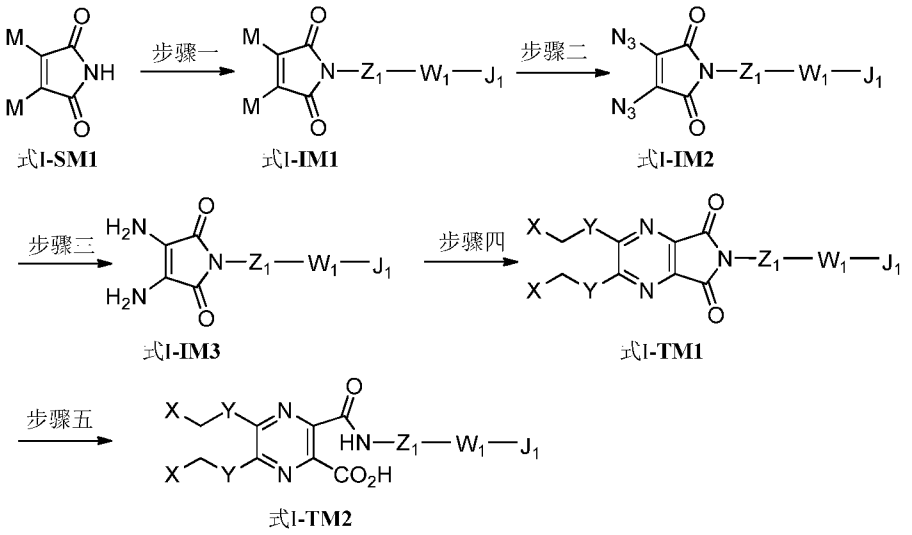
本发明在其范围内进一步包括本发明的化合物的前药，其为自身可具有较小药理学活性或无药理学活性的本发明的化合物的某些衍生物当被给药至身体中或其上时可通过例如水解裂解转化成具有期望活性的本发明的化合物。通常这样的前药会是所述化合物的官能团衍生物，其易于在体内转化成期望的治疗活性化合物。关于前药的使用的其他信息可参见“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”，第14卷，ACS Symposium Series (T. Higuchi及V. Stella)。本发明的前药可例如通过用本领域技术人员已知作为“前-部分(pro-moiety) (例如“Design of Prodrugs”，H. Bundgaard (Elsevier, 1985)中所述)”的某些部分替代本发明的化合物中存在的适当官能团来制备。

本发明还涵盖含有保护基的本发明的化合物。在制备本发明的化合物的任何过程中，保护在任何有关分子上的敏感基团或反应基团可能是必需的和/或期望的，由此形成本发明的化合物的化学保护的形式。这可以通过常规的保护基实现，例如，在 T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1991 中所述的那些保护基，这些参考文献通过援引加入本文。使用本领域已知的方法，在适当的后续阶段可以移除保护基。

制备方法

本发明的另一方面提供一种式 I 化合物的制备方法，所述方法包括如下步骤：

当 Y 不存在时，本发明中的式 I-TM1 和式 I-TM2 化合物可由下述合成路线进行合成制备。



其中：

X、Z_1、W_1、J_1如前文通式所定义；

M 为发生取代反应的离去基团，包括但不限于卤素、三氟甲烷磺酸酯、对甲苯磺酸酯，优选为卤素。

步骤一

由式 I-SM1 化合物与 M-Z_1-W_1-J_1化合物发生取代反应得到式 I-IM1 化合物；

在部分实施方案中，所述反应在碱性条件下进行；

在部分实施方案中，所述反应在合适的温度下进行，所述温度为 20℃、25℃、50℃、60℃、100℃，优选 20℃；

在部分实施方案中，所述反应在合适的溶剂下进行，所述溶剂包括但不限于丙酮、四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砜，优选为丙酮。

步骤二

由式 I-IM1 化合物与叠氮化钠发生取代反应得到式 I-IM2 化合物；

在部分实施方案中，所述反应在合适的温度下进行，所述温度为 20℃、25℃、50℃、60℃、100℃，优选 20℃；

在部分实施方案中，所述反应在合适的溶剂下进行，所述溶剂包括但不限于丙酮、四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砜，优选为丙酮。

步骤三

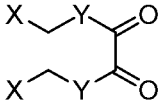
通过式 I-IM2 化合物发生还原反应得到式 I-IM3 化合物；

在部分实施方案中，该步骤在合适的还原剂存在下进行，所述还原剂可选自钯催化剂、铂催化剂、铑催化剂，优选为钯催化剂；

在部分实施方案中，该步骤在适合的温度下进行，所述温度为 20℃、25℃、50℃、60℃、100℃，优选为 20℃；

在部分实施方案中，该步骤在适合的有机溶剂中进行，所述有机溶剂可选自四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砜、正庚烷、正己烷、乙酸乙酯，优选为乙酸乙酯。

步骤四

通过式 I-IM3 化合物与  发生脱水关环反应得到式 I-TM1 化合物；

在部分实施方案中，该步骤在适合的温度下进行，所述温度为 20℃、25℃、50℃、60℃、100℃，优选为 20℃；

在部分实施方案中，该步骤在适合的有机溶剂中进行，所述有机溶剂可选自乙腈、乙醇、四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、正庚烷、正己烷、乙酸乙酯，优选为乙腈。

步骤五

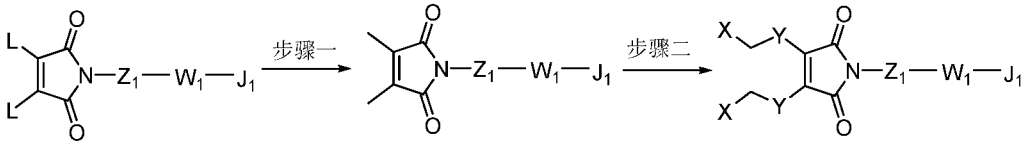
由式 I-TM1 化合物发生水解反应得到式 I-TM2 化合物；

在部分实施方案中，所述反应在碱性条件下进行，所述碱性条件包括但不限于 pH 为 7.0、7.4 或 8.0 的 PB 缓冲液；

在部分实施方案中，所述反应在合适的温度下进行，所述温度为 20℃、25℃、50℃、60℃、100℃，优选为 20℃；

在部分实施方案中，所述反应在合适的溶剂下进行，所述溶剂包括但不限于乙腈、四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜，优选为乙腈。

当 Y 不存在时，本发明中的式 I-TM3 化合物可由下述合成路线进行合成制备。



式I-IM1　　式I-IM4　　式I-TM3

其中：

X、Z_1、W_1、J_1如前文通式中所定义；

L 为发生取代反应的离去基团，包括但不限于卤素、三氟甲烷磺酸酯、对甲苯磺酸酯，优选为卤素、OTf。

步骤一

由式 I-IM1 化合物通过偶联反应得到式 I-IM4 化合物；

在部分实施方案中，所述偶联反应试剂包括但不限于甲基硼酸、三甲基环三硼氧烷，优选为三甲基环三硼氧烷；

在部分实施方案中，所述偶联反应在碱性条件中进行，所述碱包括但不限于三乙胺、DIPEA、NMM、叔丁醇钠、醋酸钾、醋酸钠、氟化铯、氟化钾、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸铯、磷酸钾、磷酸二氢钾，优选为氟化铯。

在部分实施方案中，所述偶联反应在催化剂存在下进行，所述催化剂包括但不限于四三苯基膦钯、醋酸钯、$Pd_2(dba)_3$、$Pd(PPh_3)_2Cl_2$、$Pd(PPh_3)_2Cl_2$二氯甲烷络合物、$Pd(dppf)Cl_2$、$Pd(Amphos)Cl_2$，优选为四三苯基膦钯。

在部分实施方案中，所述偶联反应在温度为 0-200° C 的条件下进行，优选在温度为 50-150° C 的条件下进行。

在部分实施方案中，所述反应在合适的溶剂下进行，所述溶剂包括但不限于 1,4-二氧六环、水、甲苯、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砜及其任意组合，优选为 1,4-二氧六环。

步骤二

由式 I-IM4 化合物经卤代反应得到式 I-TM3 化合物；

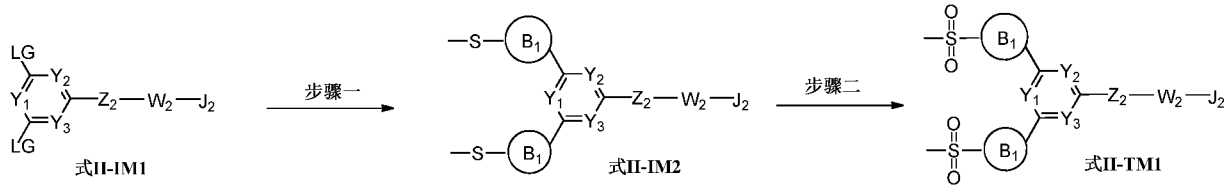
在部分实施方案中，所述卤代试剂包括但不限于溴素、N-碘代丁二酰亚胺、N-溴代丁二酰亚胺、N-氯代丁二酰亚胺，优选为 N-溴代丁二酰亚胺；

在部分实施方案中，所述偶联反应在催化剂存在下进行，所述催化剂为过氧苯甲酰。

在部分实施方案中，所述偶联反应在温度为 0-200° C 的条件下进行，优选在温度为 50-150° C 的条件下进行。

在部分实施方案中，所述反应在合适的溶剂下进行，所述溶剂包括但不限于卤代烃类（例如四氯化碳、二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷等）、甲醇、乙醇、DMF、乙腈、醚类（例如乙二醇二甲醚、四氢呋喃、二氧六环）、芳烃类（例如甲苯、苯、二甲苯）、水及其任意组合，优选为四氯化碳。

当 Z_2、W_2不存在时，本发明中的式 II-TM1 化合物可由下述合成路线进行合成制备。



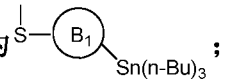
其中：

Y_1、Y_2、Y_3、B_1、J_2如前文通式中所定义；

LG 为发生偶联反应的离去基团，包括但不限于卤素、三氟甲烷磺酸酯，优选为卤素。

步骤一

由式 II-IM1 化合物通过偶联反应得到式 II-IM2 化合物；

在部分实施方案中，所述偶联反应试剂为；

在部分实施方案中，所述偶联反应在催化剂存在下进行，所述催化剂包括但不限于四三苯基膦钯、醋酸钯、$Pd_2(dba)_3$、$Pd(PPh_3)_2Cl_2$、$Pd(PPh_3)_2Cl_2$二氯甲烷络合物、$Pd(dppf)Cl_2$、$Pd(Amphos)Cl_2$，优选为四三苯基膦钯。

在部分实施方案中，所述偶联反应在温度为 0-200° C 的条件下进行，优选在温度为 50-150° C 的条件下进行。

在部分实施方案中，所述反应在合适的溶剂下进行，所述溶剂包括但不限于 1,4-二氧六环、水、甲苯、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砜及其任意组合，优选为 1,4-二氧六环。

步骤二

由式 II-IM2 化合物经氧化反应得到式 II-TM1 化合物；

在部分实施方案中，所述偶联反应在氧化剂存在下进行，所述催化剂为间氯过氧苯甲酸。

在部分实施方案中，所述偶联反应在温度为 0-120° C 的条件下进行，优选在温度为 50-80° C 的条件下进行。

在部分实施方案中，所述反应在合适的溶剂下进行，所述溶剂包括但不限于卤代烃类（例如四氯化碳、二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷等）、甲醇、乙醇、DMF、乙腈、醚类（例如乙二醇二甲醚、四氢呋喃、二氧六环）、芳烃类（例如甲苯、苯、二甲苯）、水及其任意组合，优选为甲醇。

另外，本发明的化合物还可以由有机合成领域的技术人员已知的多种方式制备。本发明的化合物可使用下文描述的方法以及合成有机化学领域中已知的合成方法或本领域技术人员所了解的其变化形式来合成。优选方法包括(但不限于)上文所述那些。反应可在适于所使用的试剂和材料且适合于实现转化的溶剂或溶剂混合物中进行。有机合成领域的技术人员应了解，分子上存在的官能团应与所提出的转化一致。这有时将需要以下判断：修改合成步骤的顺序或相对于一种方法路线选择另一特定方法路线以获得本发明的所需化合物。

还应认识到，本领域中设计任何合成途径的另一主要考虑因素是正确选择用于保护本发明中所述化合物中存在的反应性官能团的保护基团。向受过训练的相关人士描述许多替代方案的权威说明为 Greene 等人(Protective Groups in Organic Synthesis，第 4 版，Wiley-Interscience (2006))。

除非另外说明，上述路线中化合物的取代基如本发明所定义。本领域技术人员会明白，

根据期望获得的产物结构，可省略以上路线中的一个或多个步骤。本领域技术人员也可根据需要适当地调整反应步骤的顺序。

药物组合物

本发明还提供一种药物组合物，其含有本发明所述的生物活性偶联物，以及一种或多种药用上可接受的载体。

本文中所述药用辅料是指生产药品和调配处方时，使用的的赋形剂和附加剂，是指除活性成分外，在安全性方面已进行了合理的评估，并且包含在药物制剂中的物质。

所述药物组合物可以以任意形式施用，只要其实现预防、减轻、防止或者治愈人类或动物患者的症状。例如，可根据给药途径制成各种适宜的剂型。

本申请还提供一种药盒产品，其含有本发明所述的生物活性偶联物，或者所述药物组合物，以及任选的药品说明书。

治疗方法和用途

本申请的另一方面提供所述生物活性偶联物在制备用于预防或治疗肿瘤疾病的药物中的用途。

本申请的另一方面提供所述生物活性偶联物，其用于预防或治疗肿瘤疾病。

本申请的另一方面提供一种预防或治疗肿瘤疾病的方法，其包括向有此需要的受试者施用有效量的所述化生物活性偶联物、或包含所述生物活性偶联物的药物组合物。

在本发明的一个实施方案，所述肿瘤疾病为实体瘤或血液系统恶性肿瘤；例如选自结肠癌，胃癌，乳腺癌，肺癌（例如，非小细胞肺癌，具体如肺腺癌），淋巴癌。

如本文中所使用的术语“有效量”指被给药后会在一定程度上缓解所治疗病症的一或多种症状的偶联物的量。

除非另外说明，否则如本文中所使用，术语“治疗”意指逆转、减轻所应用的病症或病况或者这样的病症或病况的一或多种症状的进展。

如本文所使用的“个体”或“受试者”包括人或非人动物。示例性人个体包括患有疾病(例如本文所述的疾病)的人个体(称为患者)或正常个体。本发明中“非人动物”包括所有脊椎动物，例如非哺乳动物(例如鸟类、两栖动物、爬行动物)和哺乳动物，例如非人灵长类、家畜和/或驯化动物(例如绵羊、犬、猫、奶牛、猪等)。

具体实施方式

以下列举实施例和试验例，进而详细地说明本发明，但它们不限制本发明的范围，另

外在不脱离本发明的范围下可进行变化。

1．本发明涉及的 anti-ROR1 抗体 19F6_Hu35V1 的制备。

前期通过免疫 Balb/c,C57Bl/6,NZB 和 A/J 小鼠，通过杂交瘤筛选获得鼠源抗体 19F6，分别经人源化后获得人源化抗体序列 19F6_Hu35v1(重链可变区，SEQ ID NO:1；轻链可变区，SEQ ID NO:2)，上述人源化抗体的重链恒定区均为人 IgG1 重链恒定区（SEQ ID NO:18），轻链恒定区均为人 kappa 轻链恒定区（SEQ ID NO: 19)。合成上述人源化抗体的编码 DNA 序列并进行密码子优化后，克隆到 pcDNA3.4 质粒中，将每一人源化抗体重链和轻链对应的 pcDNA3.4 质粒同时转染到 Expi293F 细胞中，采用蛋白 A 对上清中的表达抗体进行纯化，从而获得相应抗体。

19F6_Hu35v1 的序列信息表：

抗体	编号系统	SEQ ID NO:									
		CDR H1	CDR H2	CDR H3	CDR L1	CDR L2	CDR L3	VH	VL	CH	CL
19F6_Hu35V1	Chothia	3	4	5	6	7	8	1	2	18	19
	AbM	9	10	5	6	7	8				
	Kabat	11	12	5	6	7	8				
	IMGT	13	14	15	16	17	8				

2．本发明涉及的药物-连接体合成实施例。

如本文中所使用的缩写具有以下含义：

NBS	溴代丁二酰亚胺	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
HOBt	1-羟基苯并三唑	DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
DIC	N,N-二异丙基碳二亚胺	HATU	O-(7-偶氮苯并三氮唑-1-氧)-N,N,N’,N’-四甲基脲六氟磷酸酯
EEDQ	2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉	DIAD	偶氮二甲酸二异丙酯

以下的实施例中记载的化合物的结构通过核磁共振(^{1}H NMR)或质谱(MS)来确定。

核磁共振(^{1}H NMR)的测定仪器使用Bruker 400 MHz核磁共振仪；氘代氯仿($CDCl_3$)；内标物质为四甲基硅烷(TMS)。

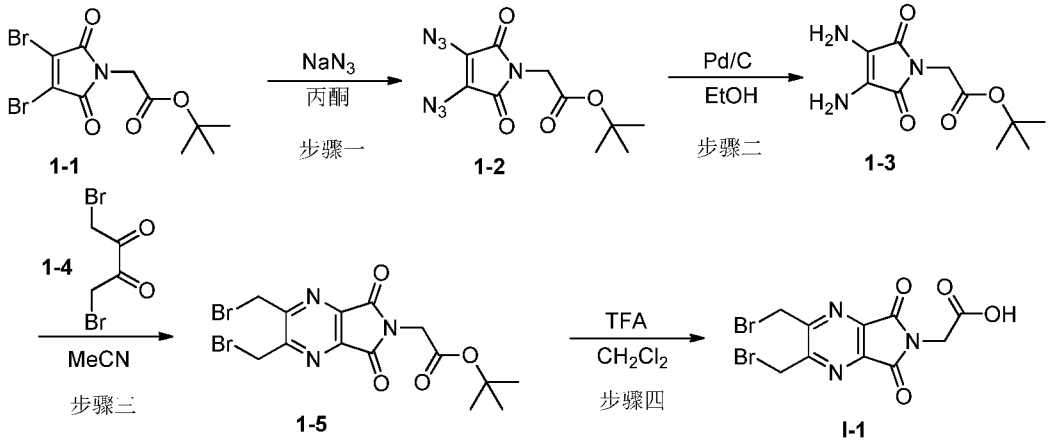
实施例中使用的核磁共振(NMR)图谱中的缩写示于以下。

s：单峰(singlet)、d：二重峰(doublet)、t：三重峰(triplet)、q：四重峰(quartet)、m：多重峰(multiplet)、br：宽峰(broad)、J：偶合常数、Hz：赫兹、$CDCl_3$：氘代氯仿。δ值用ppm值表示。

质谱(MS)的测定仪器使用Agilent (ESI)质谱仪，型号为Agilent 6120B。

化学合成实施例

实施例一 2-(2,3-双(溴甲基)-5,7-二氧基-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-6-基)乙酸 (I-1)



步骤一：2-(3,4-二叠氮基-2,5-二氧基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸叔丁酯的合成(1-2)

将化合物 1-1（0.40 g，1.08 mmol，合成方法参考专利WO2019057964）和叠氮化钠（141.00 mg，2.17 mmol）溶于丙酮（10 mL）中，25℃反应 8 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。向反应液中加水并用乙酸乙酯萃取，合并有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液经减压浓缩，得标题化合物粗品 0.28 g，未经纯化直接用于下一步反应。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):311.0[M+18]$^+$.

步骤二：2-(3,4-二氨基-2,5-二氧基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸叔丁酯的合成(1-3)

将化合物 1-2（0.15 g，0.51 mmol）和 10%钯碳（15.00 mg）溶于乙醇（20 mL）中，氢气置换三次，氢气环境下 25℃反应 3 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。将反应液用硅藻土过滤，滤液经减压浓缩，得标题化合物粗品 101.00 mg，未经纯化直接用于下一步反应。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):185.9[M-56]$^+$.

步骤三：2-(2,3-双(溴甲基)-5,7-二氧基-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-6-基)乙酸叔丁酯的合成 (1-5)

将化合物 1-3（50.00 mg，0.21 mmol）和化合物 1-4（54.00 mg，0.21 mmol）溶于乙腈（5 mL）中，25℃反应 3 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液直接用快速硅胶柱纯化（石油醚:乙酸乙酯=5:1），得标题化合物 40.00 mg。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):466.8[M+18]$^+$.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.88 (s, 4H), 4.47 (s, 2H), 1.48 (s, 9H).

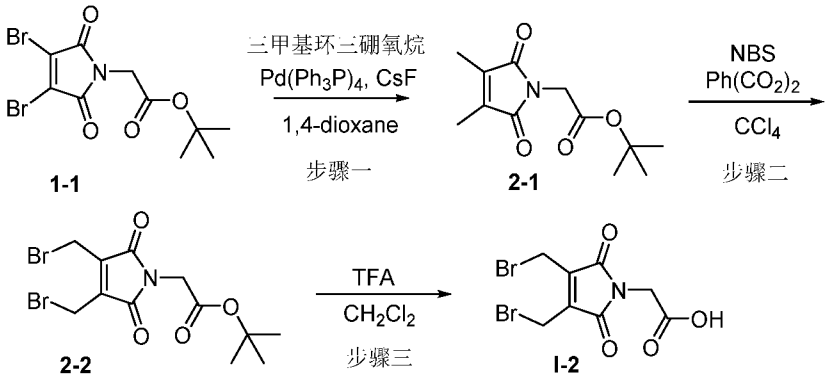
步骤四：2-(2,3-双(溴甲基)-5,7-二氧基-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-6-基)乙酸的合成 (I-1)

将化合物 1-5（20.00 mg, 0.05 mmol）溶于二氯甲烷（5 mL）和三氟乙酸（1 mL）中，25℃反应 5 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液直接经减压浓缩，得标题化合物粗品 15.00 mg，未经纯化直接用于下一步反应。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):410.8[M+18]$^+$.

实施例二 2-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸 (I-2)



步骤一：2-(3,4-二甲基-2,5-二氧基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸叔丁酯的合成 (2-1)

氮气保护下，将化合物 1-1（0.20 g, 0.54 mmol）、三甲基环三硼氧烷（0.34 g, 2.71 mmol）、氟化铯（0.41 g, 2.71 mmol）和四三苯基膦钯（63.00 mg, 0.05 mmol）溶于 1,4-二氧六环（20 mL）中，110℃反应 3 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液直接用快速硅胶柱纯化（石油醚:乙酸乙酯=5:1），得标题化合物 80.00 mg。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):184.0[M+H-56]$^+$.

步骤二：2-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸叔丁酯的合成 (2-2)

氮气保护下，将化合物 2-1（72.00 mg, 0.30 mmol）、NBS（118.00 mg, 0.66 mmol）和过氧化二苯甲酰（7.00 mg, 0.03 mmol）溶于四氯化碳（8 mL）中，85℃反应 12 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液直接用快速硅胶柱纯化（石油醚:乙酸乙酯=10:1），得标题化合物 65.00 mg。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):414.8[M+18]$^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.28 (s, 4H), 4.20 (s, 2H), 1.45 (s, 9H).

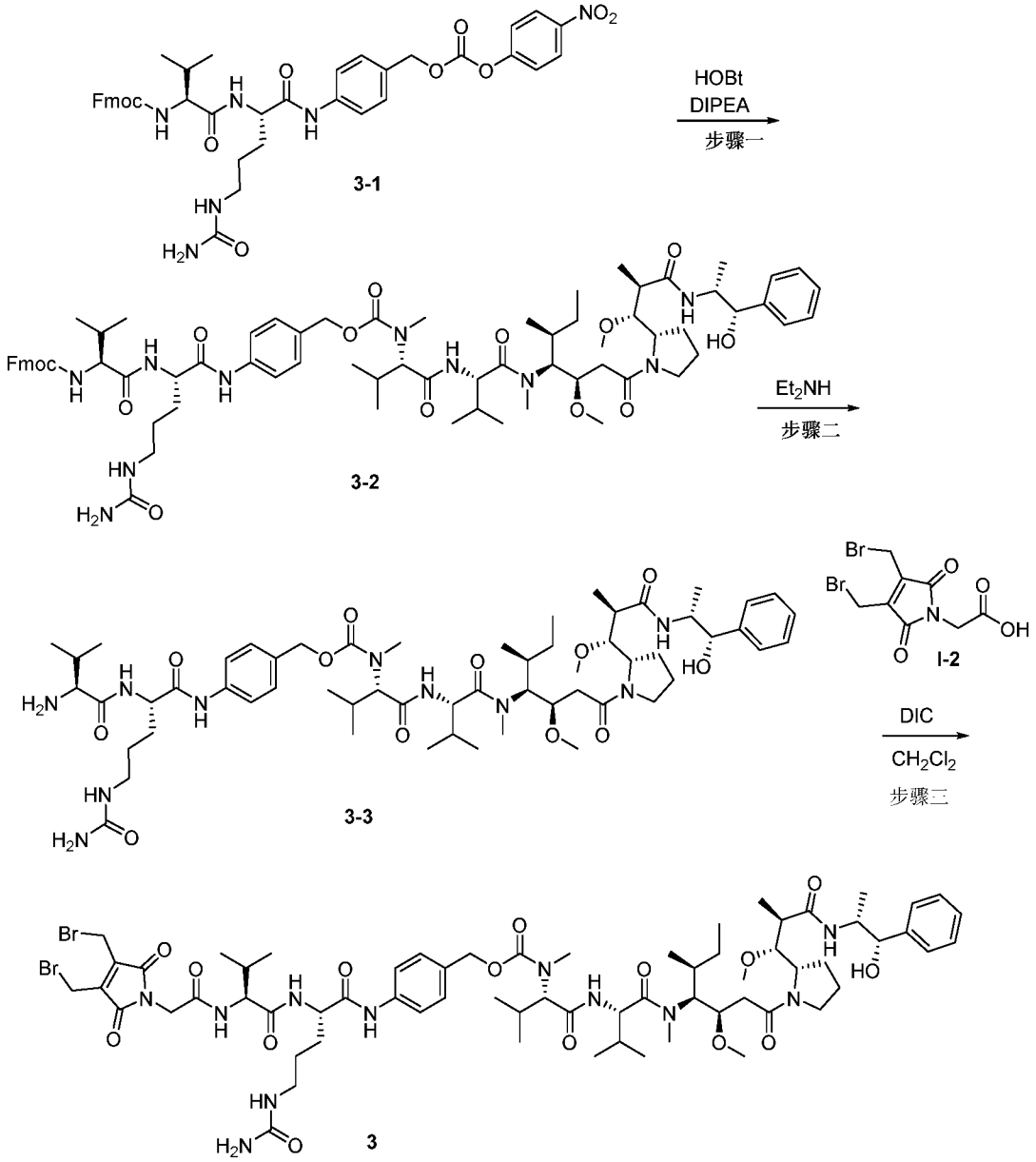
步骤三：2-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸的合成(I-2)

将化合物 2-2（60.00 mg, 0.15 mmol）溶于二氯甲烷（10 mL）和三氟乙酸（2 mL）中，25℃反应 5 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液直接经减压浓缩，得标题化合物粗品 50.00 mg，未经纯化直接用于下一步反应。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):358.9[M+18]$^+$.

实施例三 4-((S)-2-((S)-2-(2-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺基)-3-甲基丁胺基)-5-脲基五酰胺基)苄基((S)-1-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S),2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)氨基甲酸酯（药物-连接体 3）



步骤一：4-((S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基((S)-1-((S)-1-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)氨基甲酸酯的合成（3-2）

25℃下，将(S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧庚-4-基)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲胺基)丁酰胺（30.00 mg，0.04 mmol）和化合物3-1（38.50 mg，0.05 mmol）溶于DMF（3 mL）中，加入HOBt（8.46 mg，0.06 mmol）和DIPEA（10.80 mg，0.08 mmol），保持25℃反应2 h，用高效液相质谱联用色谱检测反应。反应液不经处理直接用于下一步反应。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z): 1345.2 $[M+H]^+$.

步骤二：4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基((S)-1-((S)-1-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧庚-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基(甲基)氨基甲酸酯的合成（3-3）

25℃下，将二乙胺（0.30 mL）加入化合物 3-2 的反应液中，保持 25℃反应 2 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物的甲酸盐 36.30 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z): 1123.2 $[M+H]^+$.

步骤三：4-((S)-2-((S)-2-(2-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺基)-3-甲基丁胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基((S)-1-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S),2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)氨基甲酸酯的合成 (3)

将化合物 I-2（12.75 mg, 0.04 mmol）溶于二氯甲烷（3 mL）中，加入 DIC（2.36 mg, 0.02 mmol）和化合物 3-3（21.00 mg, 0.02 mmol），25℃反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 14.30 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

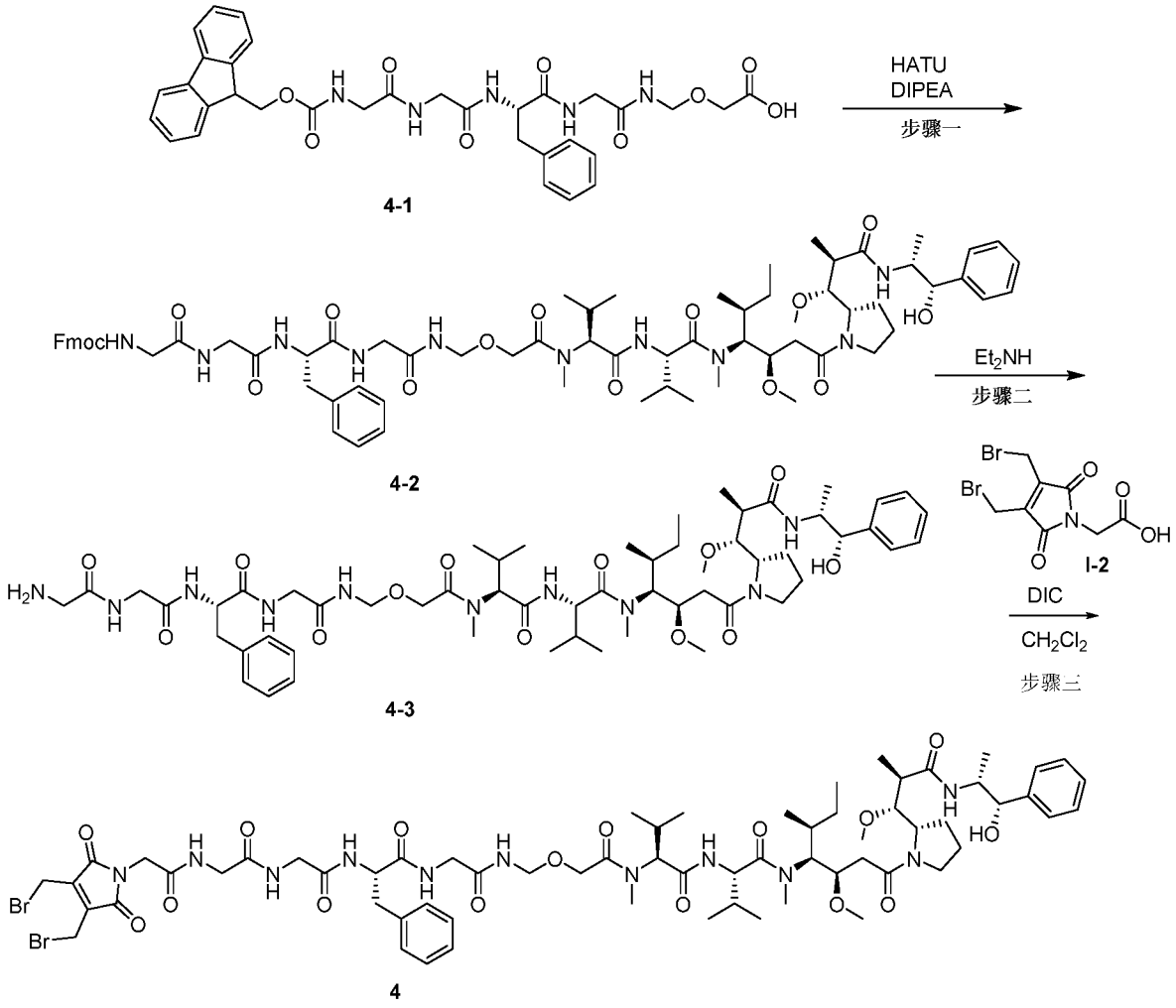
流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
17.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1445.9[M+H]$^+$.

实施例四 (S)-2-((2S,13S)-13-苄基-22-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-异丙基-3-甲基-4,9,12,15,18,21-六氧代-6-氧杂-3,8,11,14,17,20-六氮杂二十二烷酰胺基)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙烷)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)-N,3-二甲基丁酰胺（药物-连接体 4）



步骤一：(9H-芴-9-基)甲基((3R,4S,7S,10S,21S)-21-苄基-4-((S)-仲丁基)-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-2-氧乙基)-7,10-二异丙基-5,11-二甲基-6,9,12,17,20,23,26-七氧代-2,14-二氧杂-5,8,11,16,19,22,25-庚基庚二酰胺-27-基)氨基甲酸酯的合成（4-2）

称取化合物 4-1 (50.00 mg, 0.08 mmol) 和(S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙烷)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧庚烷-4-

基)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰氨基)丁酰胺（55.60 mg，0.08 mmol）溶于 DMF（1 mL）中，然后加入 HATU（32.37 mg，85.18 μmol）和 DIPEA（20.02 mg，154.88 μmol），加毕，室温反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液直接用制备高效液相色谱纯化得标题化合物 35.00 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	40	60	28
2.00	40	60	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1345.1[M+H]$^+$.

步骤二：(S)-2-((2S,13S)-19-氨基-13-苄基-2-异丙基-3-甲基-4,9,12,15,18-五氧代-6-氧杂-3,8,11,14,17-庚烷氮酮)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)-N,3-二甲基丁酰胺的合成（4-3）

将化合物 4-2（20.00 mg，0.02 mmol）溶于二氯甲烷（2 mL）中，然后加入二乙胺（1 mL），加毕，室温反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物的甲酸盐 15.00 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0μm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	10	90	28
2.00	10	90	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1123.1[M+H]$^+$.

步骤三：(S)-2-((2S,13S)-13-苄基-22-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-异丙基-3-甲基-4,9,12,15,18,21-六氧代-6-氧杂-3,8,11,14,17,20-六氮杂二十二烷酰胺

基)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙烷)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)-N,3-二甲基丁酰胺的合成（4）

将化合物 I-2（4.00 mg, 12.0 μmol）溶于二氯甲烷（3 mL）中，加入 DIC（1.12 mg, 8.00 μmol）和化合物 4-3（6.58 mg, 6.00 μmol），25℃反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 4.77 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

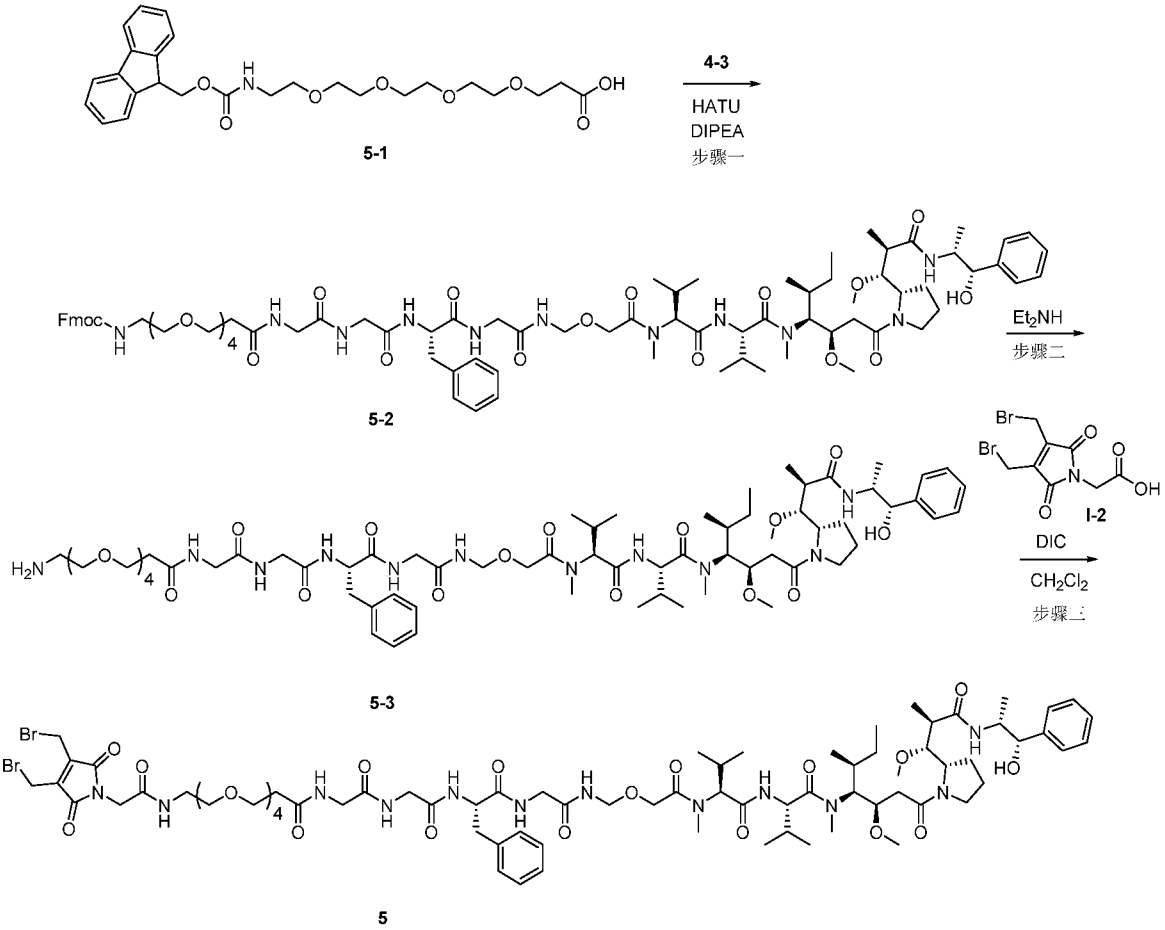
流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	35	65	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1445.9$[M+H]^+$.

实施例五 N-(((3R,4S,7S,10S,21S)-21-苄基-4-((S)-仲丁基)-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((((1S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-2-氧乙基)-7,10-二异丙基-5,11-二甲基-6,9,12,17,20,23,26-七氧代-2,14-二氧杂-5,8,11,16,19,22,25-七氮杂二十七烷-27-基)-1-(2-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧杂-2-，5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-3,6,9,12-四氧十五烷十五酰胺（药物-连接体 5）



步骤一：(9H-芴-9-基)甲基((3R,4S,7S,10S,21S)-21-苄基-4-((S)-仲丁基)-3-(2-((S)-2-(((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-2-氧代乙基)-7,10-二异丙基-5,11-二甲基-6,9,12,17,20,23,26,29-八氧代-2,14,32,35,38,41-六氧杂-5,8,11,16,19,22,25,28-八氮杂二十五烷-43-基)氨基甲酸酯的合成（5-2）

称取化合物 5-1（5.21 mg，11.00 μmol）和 4-3（10.00 mg，9.00 μmol）溶于DMF（1 mL）中，然后加入 HATU（4.06 mg，11.00 μmol）和 DIPEA（2.30 mg，18.00 μmol），加毕，室温反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液直接用制备高效液相色谱纯化得标题化合物 9.00 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	20	80	28
16.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1592.8$[M+H]^+$.

步骤二：1-氨基-N-(((3R,4S,7S,10S,21S)-21-苄基-4-((S)-仲丁

基)-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((((((S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷基-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-2-氧乙基)-7,10-二异丙基-5,11-二甲基-6,9,12,17,20,23,26-七氧代-2,14-二氧杂-5,8,11,16,19,22,25-七氮杂二十七烷-27-基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺的合成 (5-3)

将化合物 5-2 (10.00 mg, 6.00 μmol) 溶于二氯甲烷 (2 mL) 中，然后加入二乙胺 (1 mL)，加毕，室温反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物的甲酸盐 7.00 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水 (0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	10	90	28
20.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1370.9[M+H]$^+$.

步骤三：N-(((3R,4S,7S,10S,21S)-21-苄基-4-((S)-仲丁基)-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((((1S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-2-氧乙基)-7,10-二异丙基-5,11-二甲基-6,9,12,17,20,23,26-七氧代-2,14-二氧杂-5,8,11,16,19,22,25-七氮杂二十七烷-27-基)-1-(2-(3,4-双(溴甲基)-2,5-二氧杂-2-，5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-3,6,9,12-四氧十五烷十五酰胺的合成 (5)

将化合物 I-2 (4.00 mg, 12.00 μmol) 溶于二氯甲烷 (2 mL) 中，加入 DIC (1.12 mg, 8.00 μmol) 和化合物 5-3 (8.04 mg, 6.00 μmol)，25℃反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 4.68 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

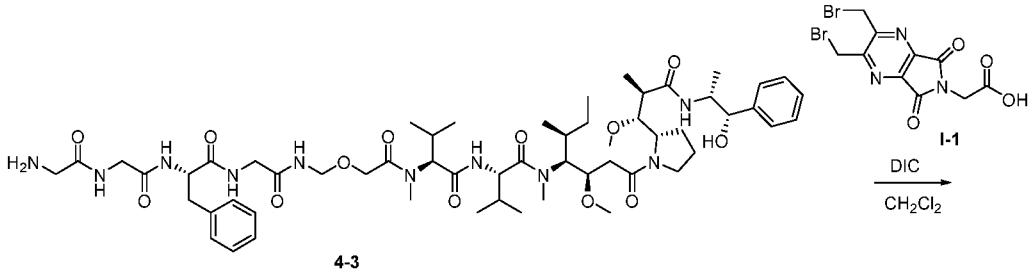
流动相 A：乙腈；流动相 B：水 (0.05%甲酸)

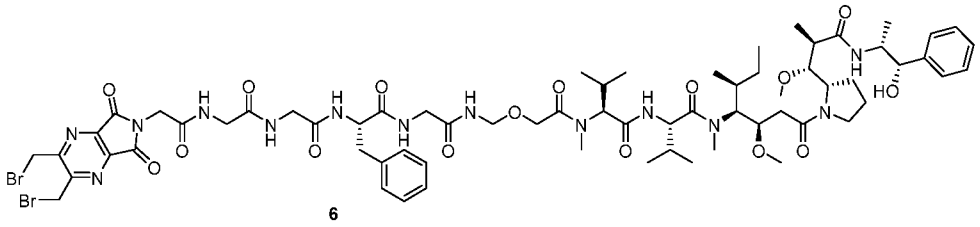
时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	35	65	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1693.7[M+H]$^+$.

实施例六 (S)-2-((2S,13S)-13-苄基-22-(2,3-双(溴甲基)-5,7-二氧代-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-6-基)-2-异丙基-3-甲基-4,9,12,15,18,21-六氧代-6-氧杂-3,8,11,14,17,20-六氮杂二十二烷酰胺)-N-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基))-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧庚基-4-基)-N,3-二甲基丁酰胺（药物-连接体 6）





将化合物 I-1（6.03 mg, 15.00 μmol）溶于二氯甲烷（2 mL）中，加入 DIC（1.45 mg, 12.00 μmol）和化合物 4-3（8.62 mg, 8.00 μmol），25℃反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 4.21 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

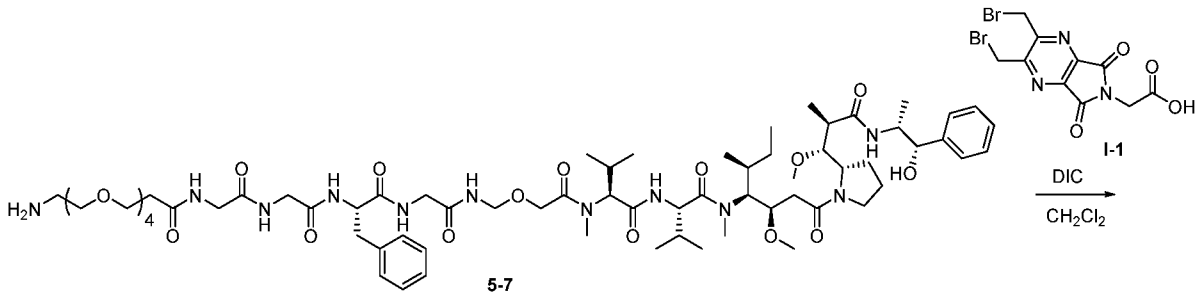
流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
18.00	90	10	28

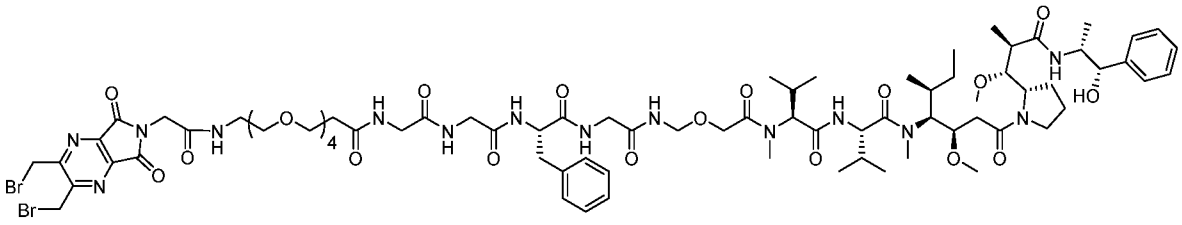
结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1498.5$[M+H]^+$.

实施例七 N-(((3R,4S,7S,10S,21S)-21-苄基-4-((S)-仲丁基)-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((((1S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-2-氧代乙基)-7,10-二异丙基-5,11-二甲基-6,9,12,17,20,23,26-七氧代-2,14-二氧杂-5,8,11,16,19,22,25-七氮杂二十七烷-27-基)-1-(2-(2,3-双(溴甲基)-5,7-二氧代-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-6-基)乙酰氨基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺（药物-连接体 7）



5-7



7

将化合物 I-1（12.06 mg，0.03 mmol）溶于二氯甲烷（4 mL）中，加入 DIC（3.00 mg，0.02 mmol）和化合物 5-3（20.00 mg，15.00 μmol），25℃反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 12.00 mg。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

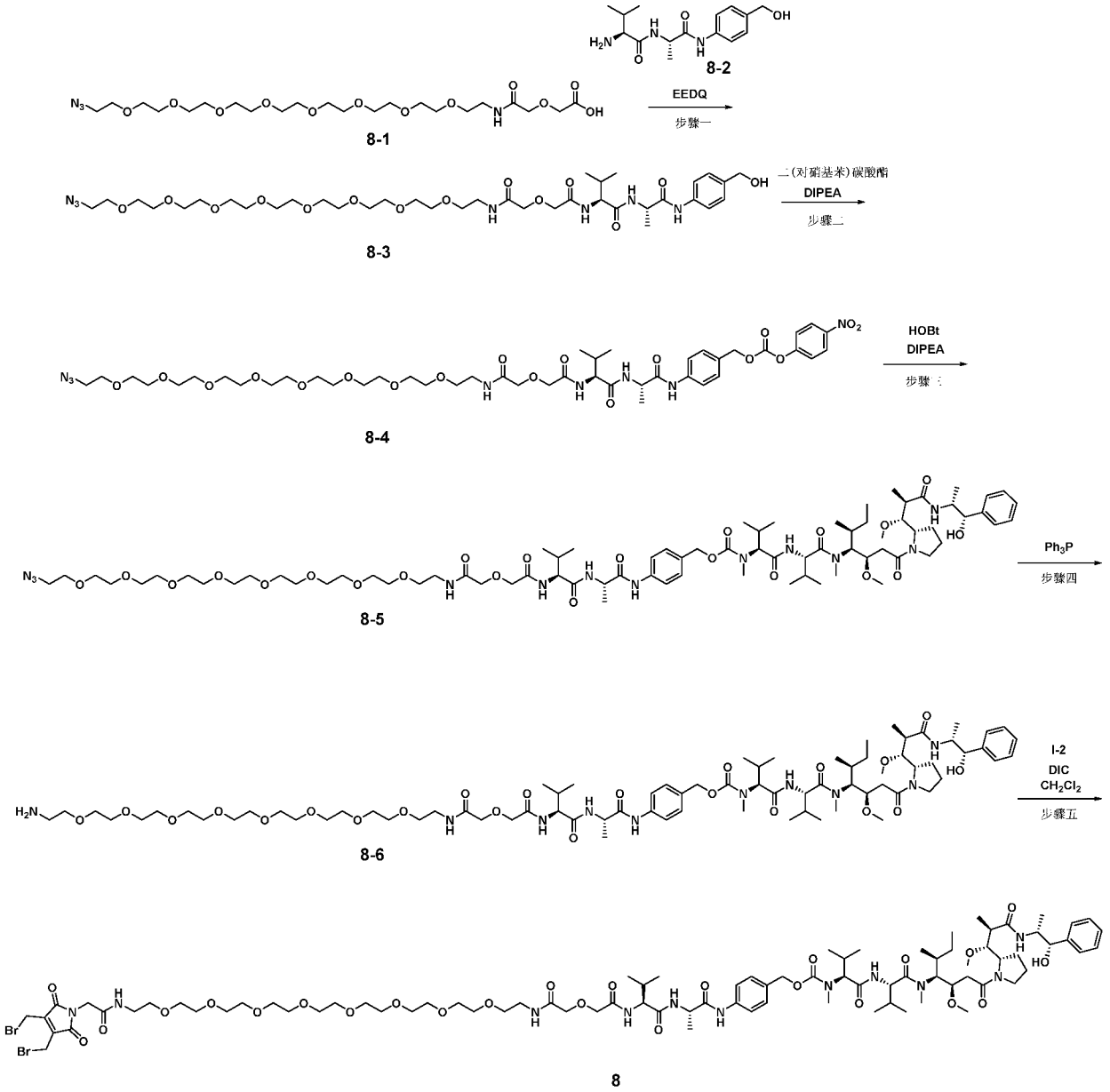
流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
2.00	30	70	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1745.8$[M+H]^+$.

实施例八 4-((2S,5S)-41-(3,4-二(溴甲基)-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-2-甲基-4,7,11,40-四氧代-9,15,18,21,24,27,30,33,36-九氧杂-3,6,12,39-四氮杂十五酰胺基)苯基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲-3-氧代丙烷)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3 甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)碳酸酯（药物-连接体 8）



步骤一：(S)-2-(32-叠氮-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十四酰胺)-N-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)-3-甲基丁胺的合成（8-3）

将化合物 8-2 (3.60 g, 12.27 mmol) 溶于二氯甲烷(30 mL) 中，加入化合物 8-1 (7.49 g, 13.50 mmol) 和 EEDQ (6.07 g, 24.54 mmol) ，25° C 反应 4 小时。将反应液减压浓缩，浓缩物经反相 C18 柱分离（70%乙腈/0.1%甲酸水溶液），得标题化合物 8-3 （7.80 g）。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):830.4[M+H]$^+$.

步骤二：4-((2S,5S)-38-叠氮-5-异丙基-2-甲基-4,7,11-三氧代-9,15,18,21,24,27,30,33,36-九氧杂-3,6,12-三氮杂三十八烷酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯的合成（8-4）

将化合物 8-3 (2.50 g, 3.01 mmol) 溶于二氯甲烷 (20 mL) 中，加入二(对硝基苯)碳酸酯 (3.66 g, 12.05 mmol) 和 DIPEA (1.56 g, 12.05 mmol) ，25° C 反应 4 小时。将反应液直接经硅胶柱（乙酸乙酯-二氯甲烷:甲醇=84:16）纯化，得标题化合物 8-4（2.07 g）。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):995.4[M+H]$^+$.

步骤三：4-((2S,5S)-38-叠氮基-5-异丙基-2-甲基-4,7,11-三氧代-9,15,18,21,24,27,30,33,36-九氧杂-3,6,12-三氮杂三十八烷酰胺基）苄基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3)-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)碳酸酯的合成（8-5）

将(S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧庚-4-基)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲胺基)丁酰胺(100 mg, 139.28 μmol) 、化合物 8-4 (180.17 mg, 181.06 μmol) 和 HOBt (56.46 mg, 417.84 μmol) 用 DMF (3 mL) 溶解，加入 DIPEA (54.00 mg, 417.84 μmol) ，25° C 反应 6 小时 。将反应液减压浓缩，浓缩物经反相 C18 柱分离（55%乙腈/0.1%甲酸水溶液），得标题化合物 8-5 (60.00 mg) 。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1573.9[M+H]$^+$.

步骤四：4-((2S,5S)-38-氨基-5-异丙基-2-甲基-4,7,11-三氧代-9,15,18,21,24,27,30,33,36-九氧杂-3,6,12-三氮杂三十八烷酰胺基）苄基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3)-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)碳酸酯的合成（8-6）

将化合物8-5 (0.60 g, 381.22 μmol) 溶于 THF (10 mL) 中,加入三苯基磷 (232.02 mg, 762.44 μmol) ，再加入水 (10 mL) ，50° C 反应 6 小时。加水并用二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液经减压浓缩。经硅胶柱（二氯甲烷:甲醇=84:16）纯化，得标题化合物 8-6 (50.00 mg)。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1548.9[M+H]$^+$.

步骤五：4-((2S,5S)-41-(3,4-二(溴甲基)-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-2-甲基-4,7,11,40-四氧代-9,15,18,21,24,27,30,33,36-九氧杂-3,6,12,39-四氮杂十五酰胺基)苯基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲-3-氧代丙烷)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3 甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)碳酸酯的合成（8）

将化合物 I-2（10.00 mg, 0.03 mmol）溶于二氯甲烷（4 mL）中，加入 DIC（3.70 mg, 0.03 mmol）和化合物 8-6（23.37 mg, 15.00 μmol），25℃反应 1 h，用高效液相质谱联用色谱监测反应。反应液经减压浓缩，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 8（12.88 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

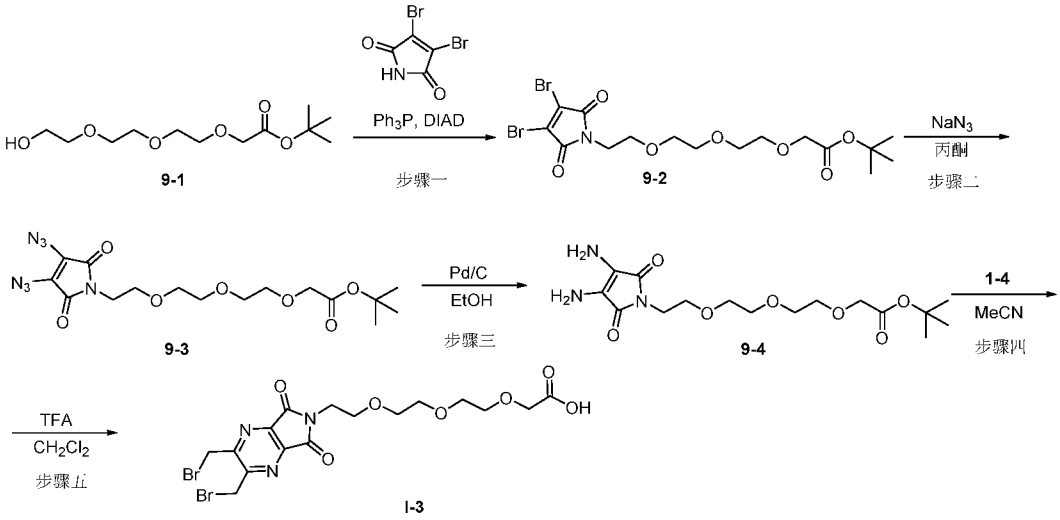
流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	35	65	28
2.00	35	65	28
18.00	95	5	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1871.8[M+H]$^+$.

实施例九 2-(2-(2-(2-(2,3-双(溴甲基)-5,7-二氧代-5,7-二氢-6H-吡咯[3,4-b]吡嗪-6-基)乙氧基)乙氧基)乙酸（I-3）



步骤一：2-(2-(2-(2-(3,4-二溴-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧

基)乙酸叔丁酯的合成（9-2）

0° C 下，将化合物 9-1 (523.00 mg, 1.98 mmol) 和三苯基膦 (518.97 mg, 1.98 mmol) 用四氢呋喃 (8 mL) 溶解，加入 DIAD (400.11 mg, 1.98 mmol, 389.59 μL) 后搅拌 5 分钟，加入 3,4-二溴吡咯-2,5-二酮 (504.30 mg, 1.98 mmol) ，0° C 反应 3 小时 。加入饱和氯化铵水溶液并用乙酸乙酯萃取，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液经减压浓缩。浓缩物经硅胶柱层析分离（石油醚:乙酸乙酯=1:1），得标题化合物 9-2 (0.90 g)。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):519.0[M+18]$^+$.

步骤二：2-(2-(2-(2-(3,4-二叠氮基-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧基）乙酸叔丁酯的合成（9-3）

将化合物 9-2 (0.20 g, 399.07 μmol) 用丙酮 (8 mL) 溶解，加入叠氮化钠 (51.89 mg, 798.14 μmol)，25° C 反应 8 小时。加水并用乙酸乙酯萃取，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液经减压浓缩，得标题化合物 9-3 的粗品 (160.00 mg)。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):443.1[M+18]$^+$.

步骤三：2-(2-(2-(2-(3,4-二氨基-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧基)乙酸叔丁酯的合成（9-4）

将化合物 9-3 (170.00 mg, 399.63 μmol) 和 10%钯碳(85.00 mg)用乙醇 (34 mL) 溶解，25° C 下氢气氛围反应 8 小时。将反应液过滤，减压抽干滤液，得标题化合物 9-4 的粗品 (140.00 mg)。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):391.3[M+18]$^+$.

步骤四：2-(2-(2-(2-(2,3-双(溴甲基)-5,7-二氧代-5,7-二氢-6H-吡咯[3,4-b]吡嗪-6-基)乙氧基)乙氧基)乙酸的合成（I-3）

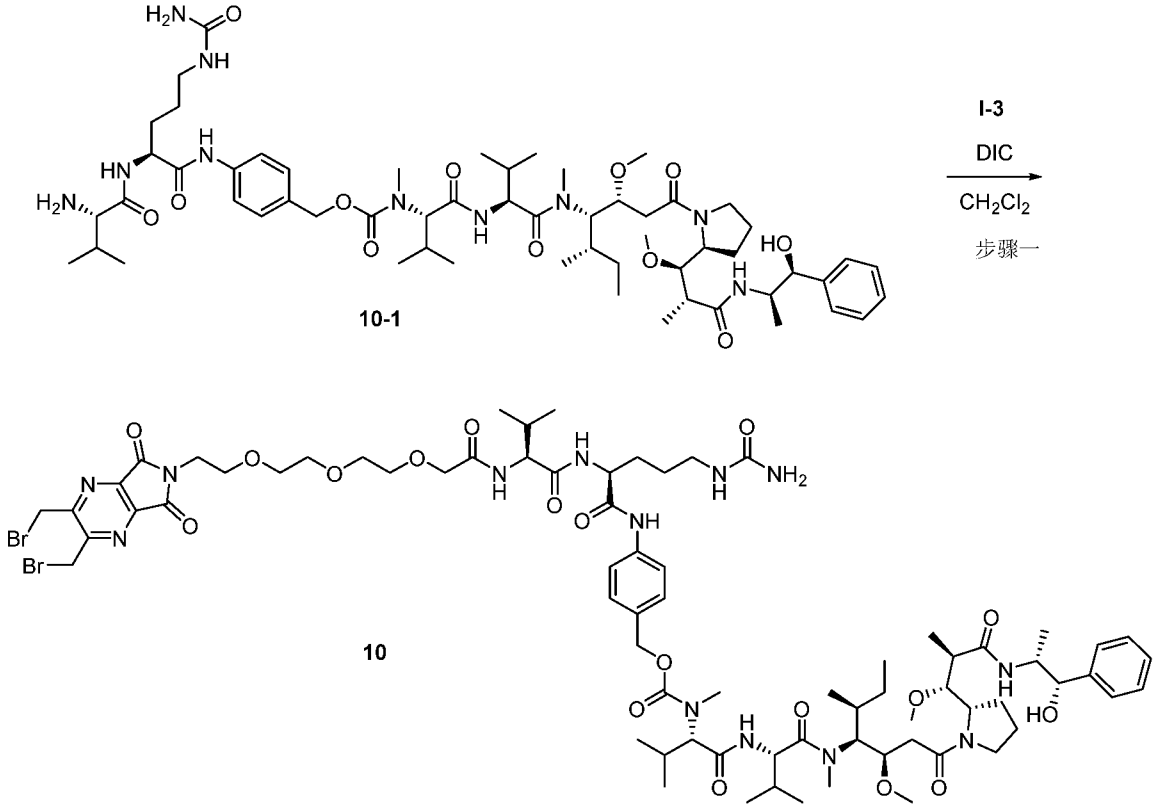
将化合物 9-4 (70.00 mg, 187.47 μmol) 和化合物 1-4 (45.72 mg, 187.47 μmol) 用乙腈 (5 mL) 溶解，25° C 反应 2 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物经硅胶柱层析分离（石油醚:乙酸乙酯=1:1），得标题化合物 I-3 (26.00 mg)。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):391.3[M+18]$^+$.

实施例十 4-((2S,5S)-17-(2,3-二(溴甲基)-5,7-二氧代-5,7-二氢-6H-吡咯[3,4-b]吡嗪-6-基)-5-异丙基-4,7-二氧代-2-(3-脲基丙基)-9,12,15-三氧杂-3,6-二氮杂十七烷酰胺基）苄基

((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2- 基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)碳酸酯（药物-连接体 10）



将化合物 I-3 (13.47 mg, 25.65 μmol) 用二氯甲烷(4 mL) 溶解，加入 DIC (2.43 mg, 19.24 μmol, 2.98 μL) ，搅拌 20 min 后加入化合物 10-1 的甲酸盐 (15.00 mg, 12.83 μmol) ，20° C 反应 2 小时。减压抽干溶剂，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 10（9.00 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

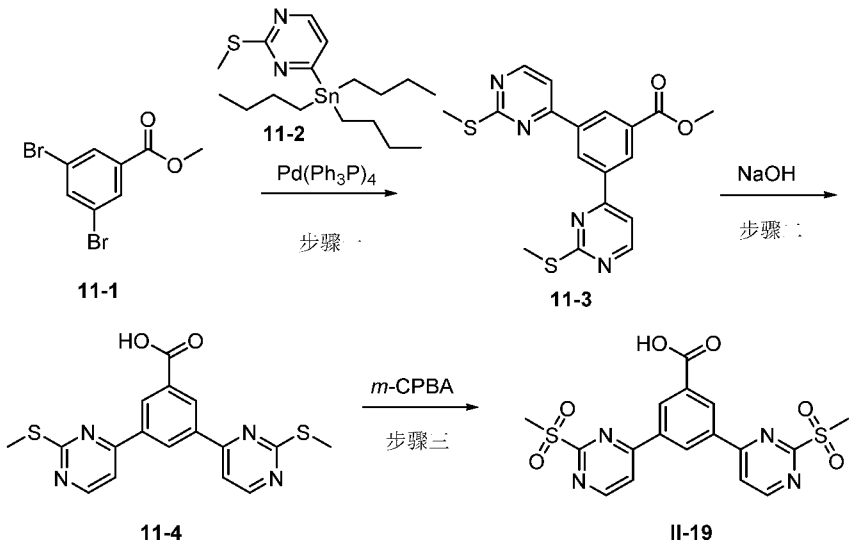
流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	35	65	28
2.00	35	65	28
16.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1630.4[M+H]$^+$.

实施例十一 3,5-二(2-(甲磺酰)嘧啶-4-基)苯甲酸（II-19）



步骤一：3,5-二(2-(甲硫基)嘧啶-4-基)苯甲酸甲酯的合成（11-3）

将 3,5-二溴苯甲酸甲酯（1.00 g，3.40 mmol），4-三丁基甲锡烷基-2-硫代甲基嘧啶（3.11 g，7.48 mmol）和四(三苯基膦)钯（393.00 mg，0.034 mmol）溶于 1,4-二氧六环（10 mL），氮气置换后微波 110℃反应 6 小时。将反应液减压浓缩，浓缩物经硅胶柱纯化（石油醚:乙酸乙酯=5:1），得化合物 11-3（398.00 mg）。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):385.0[M+H]$^+$.

步骤二：3,5-二(2-(甲硫基)嘧啶-4-基)苯甲酸的合成（11-4）

将化合物 11-3（398.00 mg，1.04 mmol）溶于甲醇（5 mL）、四氢呋喃（5 mL）和水（1 mL）中，加入氢氧化钠（166.00 mg，4.14 mmol），搅拌反应 1 小时。滴入 3 N 盐酸水溶液中和反应，减压浓缩后加水搅拌，过滤，固体水洗后真空干燥得标题化合物 11-4（0.38 g）。

步骤三：3,5-二(2-(甲磺酰)嘧啶-4-基)苯甲酸的合成（II-19）

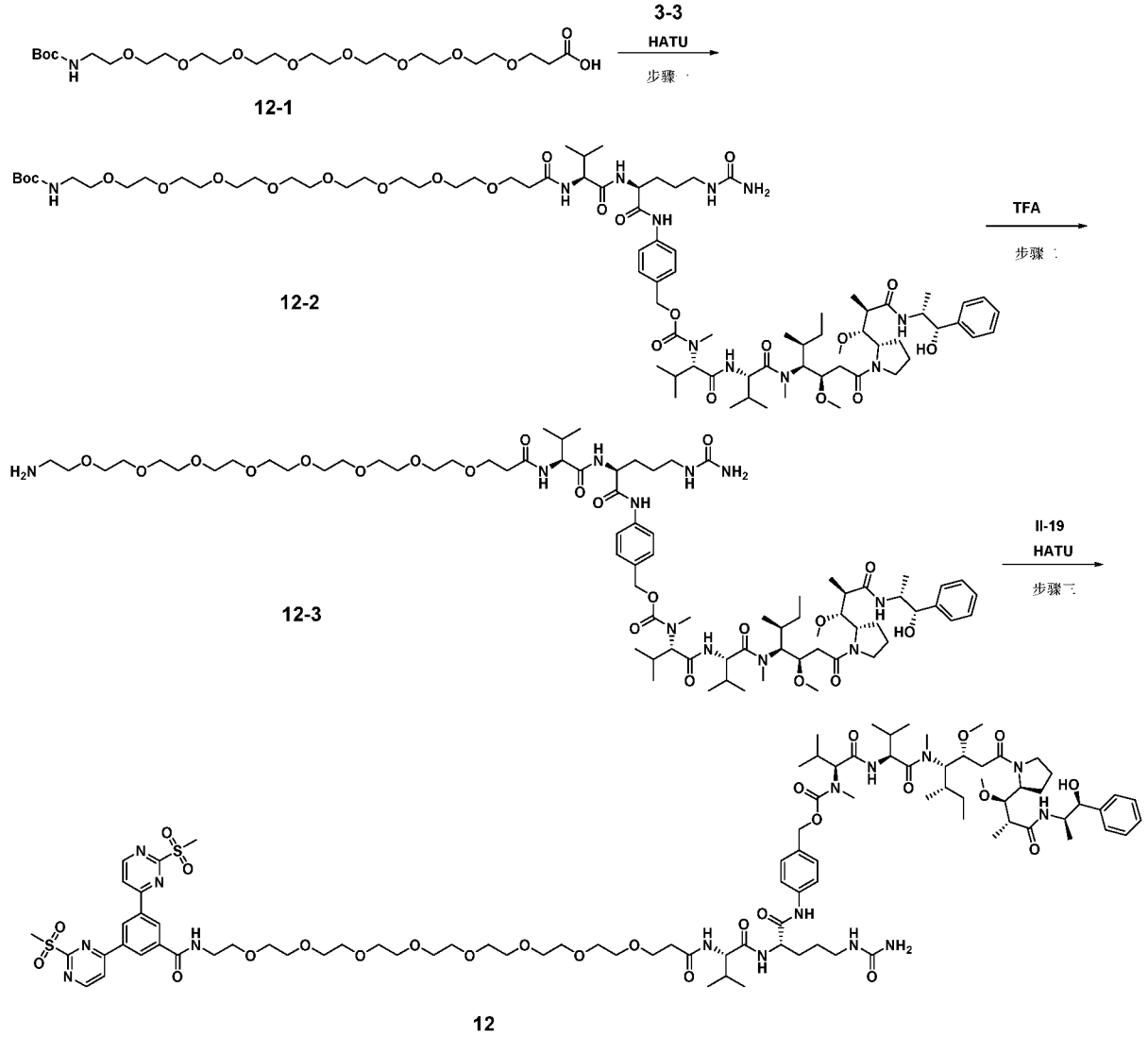
将化合物 11-4（0.38 g，1.03 mmol）溶于甲醇（20 mL），搅拌下加入间氯过氧苯甲酸（1.25 g，80%，6.15 mmol），升至 60℃反应 4 小时。氮气吹干溶剂，固体溶于二氯甲烷后直接经硅胶柱纯化（二氯甲烷:甲醇=10:1），得标题化合物 II-19（0.25 g）。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):452.0[M+18]$^+$.

实施例十二　4-((31S,34S)-1-(3,5-双(2-(甲磺酰基)嘧啶-4-基)苯基)-31-异丙基-1,29,32-三氧代-34-(3-脲基丙基))-5,8,11,14,17,20,23,26-八氧杂-2,30,33-三氮杂五十四烷-35-酰胺基)苄基((S)-1-(((S)-1-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷

-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2- 基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)碳酸酯（药物-连接体 12）



步骤一：4-((34S,37S)-34-异丙基-2,2-二甲基-4,32,35-三氧代-37-(3-脲基丙基)-3,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-5,33,36-三氮杂十八烷-38-酰胺基)苄基((S)-1-(((S)-1-((((3R,4S,5S)-1-((S)-)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1- 基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)氨基甲酸酯的合成（12-2）

将化合物 3-3 的甲酸盐(200.00 mg, 171.02 μmol)、HATU (91.04 mg, 239.43 μmol) 和化合物 12-1 (120.42 mg, 222.33 μmol)溶于 DMF (6 mL)中，然后加入 DIPEA (66.31 mg, 513.06 μmol)，加毕室温反应 0.5 小时。减压抽干溶剂，浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 12-2（210.00 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
2.00	30	70	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):824.0[(M+H)/2]$^+$.

步骤二：4-((29S,32S)-1-氨基-29-异丙基-27,30-二氧代-32-(3-脲基丙基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-28,31-二氮杂三十四烷-33-酰胺基)苄基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R) -3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5 -甲基-1-氧代丁烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)碳酸酯的合成（12-3）

将化合物 12-2 (140.00 mg, 85.00 μmol) 用三氟乙酸 (0.5 mL) 和二氯甲烷 (5 mL) 溶解,0 ° C 反应 2 小时 。减压抽干溶剂,得标题化合物 12-3 的甲酸盐粗品 73.00 mg。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):774.1[(M+H)/2]$^+$.

步骤三：4-((31S,34S)-1-(3,5-双(2-(甲磺酰基)嘧啶-4-基)苯基)-31-异丙基-1,29,32-三氧代-34-(3-脲基丙基))-5,8,11,14,17,20,23,26-八氧杂-2,30,33-三氮杂五十四烷-35-酰胺基)苄基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2- 基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)碳酸酯的合成（12）

将化合物 II-19 (5.45 mg, 12.56 μmol)、HATU (14.32 mg, 37.67 μmol) 和化合物 12-3 的甲酸盐(20.00 mg, 12.56 μmol)溶于 DMF (2 mL)中，然后加入 DIPEA (8.11 mg, 62.78 μmol, 11.18 μL)，加毕室温反应 2 小时。减压抽干溶剂。浓缩物直接用制备高效液相色谱纯化，制备液冷冻干燥得标题化合物 12（6.50 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

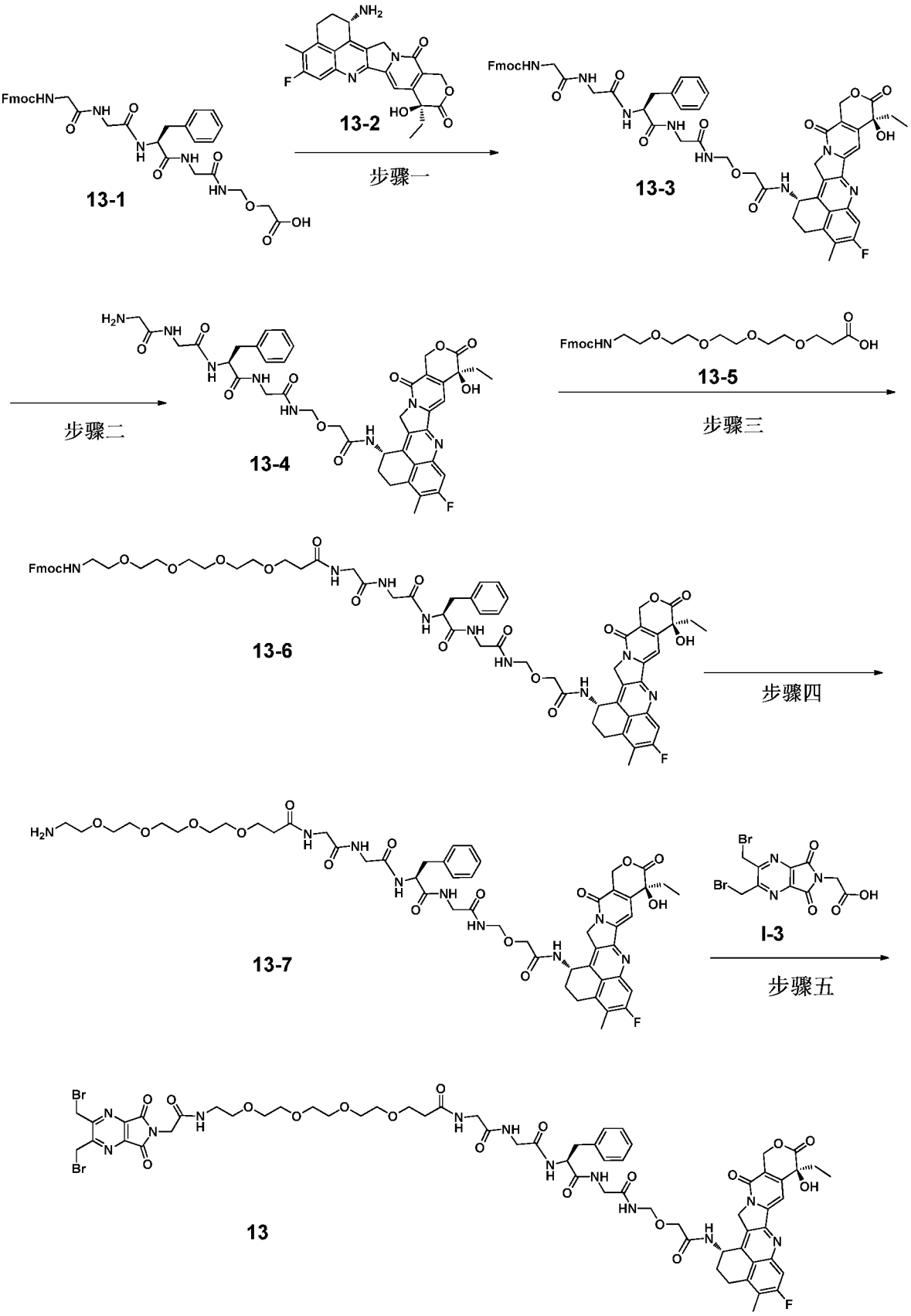
时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]

0.00	40	60	28
2.00	40	60	28
18.00	80	20	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):982.5[(M+H)/2]$^{+}$.

实施例十三 N-((S)-10-苄基-1-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧基-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)-1-(2-(2,3-二(溴甲基)-5,7-二氧代-5H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-6(7H)-基)乙酰胺)-3,6,9,12-四氧杂十五烷酰胺（药物-连接体 13）



步骤一：(9H-氟-9-基)甲基((S)-10-苄基-1-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基))氨基甲酸酯的合成（13-3）

将化合物 13-1 (1.00 g, 1.55 mmol) 溶于 DMF (5 mL) 中，依次加入 HATU (647.40 mg, 1.70 mmol)、化合物依喜替康 13-2 的甲磺酸盐 (1.00 g, 1.55 mmol)和 DIPEA (400.34 mg, 3.10 mmol) ，25° C 反应 2 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 13-3 (1.05 g)。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水 (0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1063.4[M+H]$^+$.

步骤二：(S)-2-(2-氨基乙酰胺基)乙酰胺基)-N-(2-((2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代码-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)-2-氧代-3-苯丙酰胺的合成 (13-4)

将化合物 13-3 (1.05 g, 987.69 μmol) 溶于二氯甲烷 (100 mL) 中，加入二乙胺 (20 mL) ，25° C 反应 1 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 13-4 的甲酸盐 (285.00 mg)。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水 (0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):841.2[M+H]$^+$.

步骤三：(9H-芴-9-基)甲基((S)-10-苄基-1-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧基-1,2,3,9,10,12,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,9,15,18-六氧代-3,21,24,27,30-五氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂三甲酸酯的合成 (13-6)

将化合物 13-4 的甲酸盐(83.00 mg, 98.71 μmol)和 HATU (45.04 mg, 118.45 μmol) 、化合物13-5 (57.75 mg, 118.45 μmol)溶于DMF (2 mL)中，然后加入DIPEA (25.51 mg, 197.42 μmol, 35.14 μL)，加毕室温反应 0.5 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直

接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 13-6（30.00 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
16.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1310.5[M+H]$^+$.

步骤四：1-氨基-N-((S)-10-苄基-1-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)-3,6,9,12-四氧杂-15-癸烷酰胺的合成（13-7）

将化合物 13-6 (30.00 mg, 22.89 μmol)溶于二乙胺 (1 mL)和 DMF (2 mL) 中，室温反应 1 小时。反应液溶剂经减压抽干，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 13-7 的甲酸盐（16.00 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	5	95	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1088.4[M+H]$^+$.

步骤五：N-((S)-10-苄基-1-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧基-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基）-1-(2-(2,3-二(溴甲基)-5,7-二氧代-5H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-6(7H)-基)乙酰胺)-3,6,9,12-四氧杂十五烷酰胺的合成（13）

将化合物 13-7 的甲酸盐 (16.00 mg, 14.70 μmol) 、化合物 I-3 (11.56 mg, 29.41 μmol) 和 DIC (2.60 mg, 20.59 μmol, 3.19 μL) 用二氯甲烷 (4 mL) 溶解，20° C 反应 1 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 13 (5.33 mg)。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

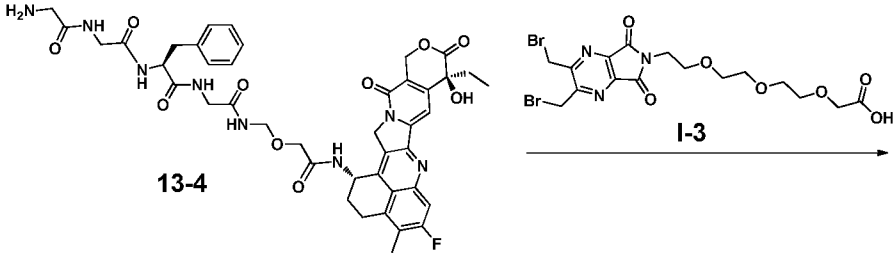
流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

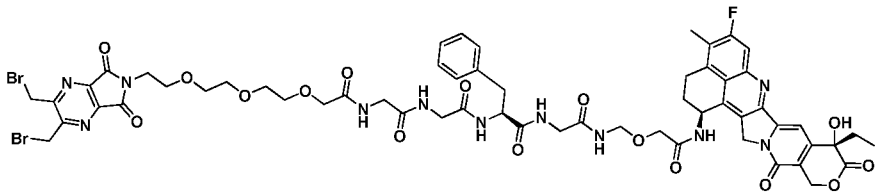
时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
3.00	30	70	28
18.00	95	5	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1463.3[M+H]$^+$.

实施例十四 (S)-2-(17-(2,3-二(溴甲基)-5,7-二氧代-5H-吡咯并[3,4-b]吡嗪-6(7H)-基)-4,7-二氧代-9,12,15-三氧杂-3,6-二氮七烷酰胺)-N-(2-((2-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代)-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧乙氧基(甲基)氨基)-2-氧乙基)-3-苯丙酰胺（药物-连接体 14）





14

将化合物 I-3 (40.26 mg, 76.67 μmol)用二氯甲烷 (5 mL) 溶解，加入 DIC (9.68 mg, 76.67 μmol)，搅拌 20 分钟后加入化合物 13-4 的甲酸盐 (34.00 mg, 38.34 μmol)，20° C 反应 2 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 14（5.33 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

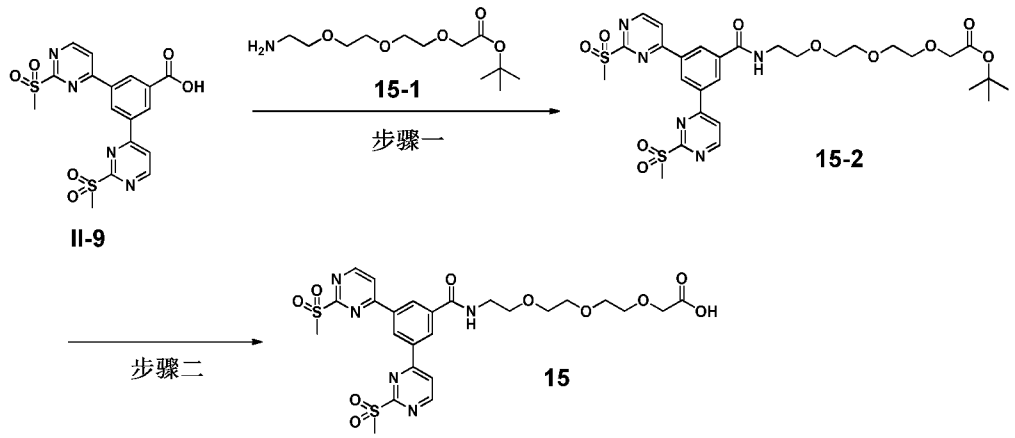
流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
2.00	30	70	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1348.3[M+H]$^+$.

实施例十五 1-(3,5-二(2-(甲磺酰基)嘧啶-4-基)苯基)-1-氧代-5,8,11-三氧杂-2-氮杂十三烷-13-油酸（15）



步骤一：1-(3,5-二(2-(甲磺酰基)嘧啶-4-基)苯基)-1-氧代-5,8,11-三氧杂-2-氮杂十三烷-13-油酸叔丁酯的合成（15-2）

将化合物 II-9 (50.00 mg, 115.09 μmol) 用 DMF (2 mL) 溶解，加入 HATU (65.60 mg, 172.53 μmol)，搅拌后加入化合物 15-1 (36.37 mg, 138.11 μmol) 和 DIPEA (44.62 mg, 345.27 μmol, 61.46 μL)，25° C 反应 2 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 15-2（25.00 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	30	70	28
2.00	30	70	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):697.2[M+18]$^+$.

步骤二：1-(3,5-二(2-(甲磺酰基)嘧啶-4-基)苯基)-1-氧代-5,8,11-三氧杂-2-氮杂十三烷-13-油酸的合成（15）

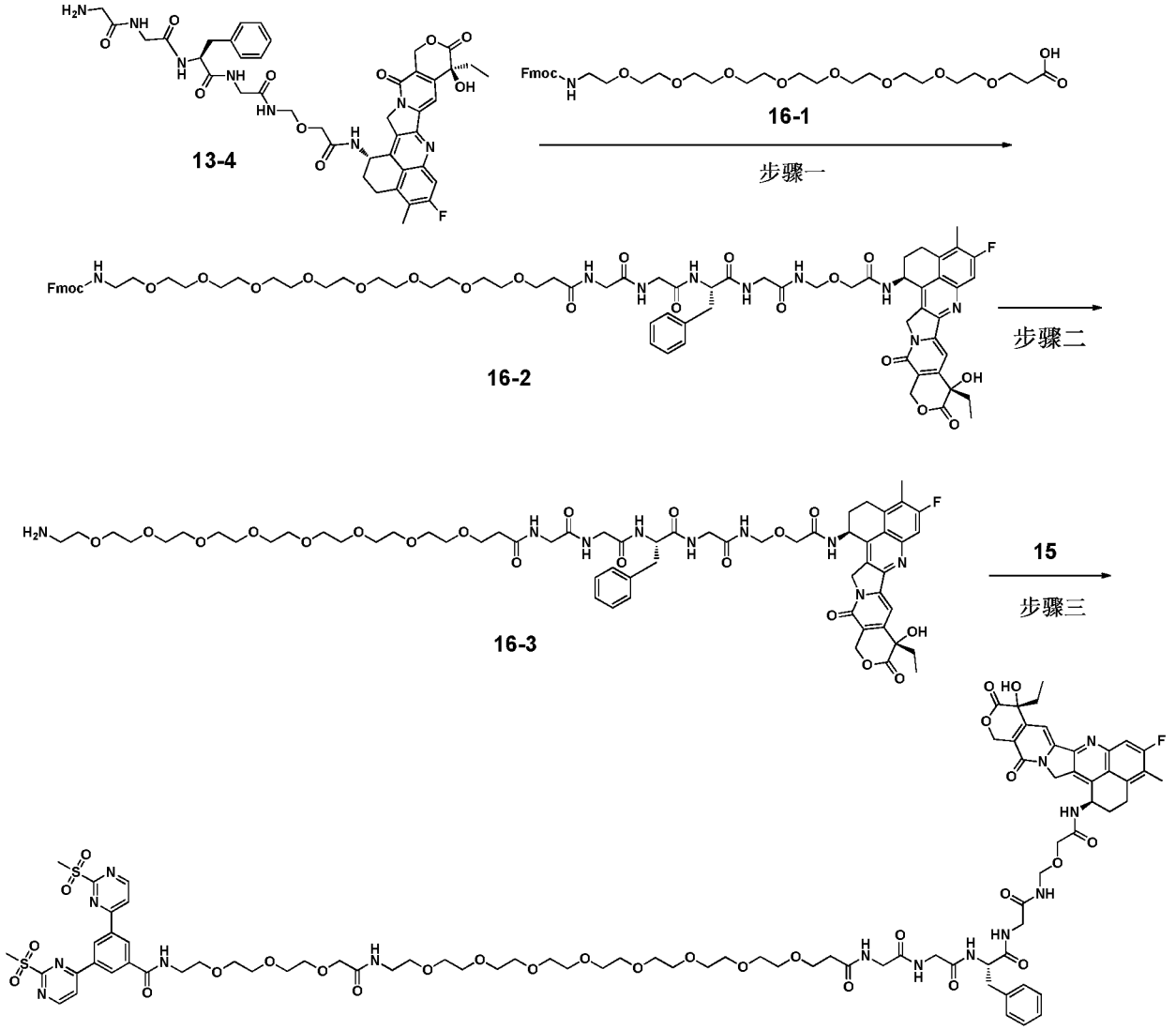
将化合物 15-2 (20.00 mg, 29.42 μmol) 用三氟乙酸 (1 mL) 和二氯甲烷 (5 mL) 溶解，25° C 反应 2 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物得标题化合物 15 的粗品（15.00 mg），未经纯化直接进行下一步。

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):641.1[M+18]$^+$.

实施例十六 N-((S)-10-苄基-1-((1R,9R)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧

代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15,18,46-七氧代- 3,21,24,27,30,33,36,39,42,48,51,54-十二烷氧杂- 5,8,11,14,17,45 -六氮杂六戊烷-56-基)-3,5-双(2-(甲磺酰)嘧啶-4-基)苯甲酰胺（药物-连接体 16）



步骤一：(9H-氟-9-基)甲基((S)-10-苄基-1-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15,18-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-壬氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂十四烷-44-基)氨基甲酸酯的合成（16-2）

将化合物 13-4 的甲磺酸盐（132.00 mg，148.84 μmol）用 DMF（5 mL）溶解，加入 HATU（90.55 mg，238.14 μmol）、化合物 16-1（148.19 mg，223.26 μmol）和 DIPEA（96.18 mg，744.19 μmol，132.48 μL），25 ° C 反应 2 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 16-2（110.00 mg）。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	20	80	28
3.00	20	80	28
17.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1486.5[M+1]$^+$.

步骤二：1-氨基-N-((S)-10-苄基-1-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基）氨基-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮十六烷-16-基)-3,6,9,12,15,18,21,2 -八氧杂庚烷-27-酰胺的合成（16-3）

将化合物 16-2 (110.00 mg, 74.00 μmol, FR) 用二乙胺 (1 mL) 和二氯甲烷 (5 mL) 溶解，25° C 反应 2 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 16-3 的甲酸盐（40.00 mg)。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	10	90	28
2.00	10	90	28
18.00	90	10	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1264.6[M+1]$^+$.

步骤三：N-((S)-10-苄基-1-((1R,9R)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15,18,46-七氧代- 3,21,24,27,30,33,36,39,42,48,51,54-十二烷氧杂-5,8,11,14,17,45 -六氮杂六戊烷-56-基)-3,5-双(2-(甲磺酰)嘧啶-4-基)苯甲酰胺的合成（16）

将化合物 15 (7.00 mg, 11.22 μmol) 用 DMF (3 mL) 溶解，加入 HATU (7.76 mg, 20.41 μmol) 、化合物 16-3 的甲酸盐 (13.37 mg, 10.20 μmol 和 DIPEA (3.96 mg, 30.61 μmol, 5.45 μL) ，25 ° C 反应 2 小时。减压抽干反应溶剂，浓缩物直接经高效液相制备，冷冻干燥得标题化合物 16（7.00 mg)。

色谱柱：SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%甲酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	15	85	28
2.00	15	85	28
18.00	80	20	28

结构表征数据如下：

ESI-MS (m/z):1869.7[M+1]$^+$.

3. 生物活性偶联物的制备

偶联方法 A:

取 0.5 mL 抗体（anti-ROR1 抗体 19F6_Hu35V1，3-20mg/mL，表 1 中简称为 19F6），用 0.1 M 依地酸二钠的溶液（pH 7.60）稀释，然后用 1 M Na_2HPO_4溶液调 pH 至 7.60，加入 10 mM TCEP（三(2-羧乙基)膦）溶液（pH 7.60）混匀，室温放置 2 h。向上述溶液体系加入抗体的 5-10 倍物质的量的溶解在 DMSO 的药物-连接体（10 mM），混匀，室温静置 20 h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱（Cytiva）将缓冲液置换为 pH 6.0 的 10 mM 组氨酸缓冲溶液，得到的 ADC 产物，见表 1。

偶联方法 B:

取 0.5 mL 抗体（anti-ROR1 抗体 19F6_Hu35V1，3-20mg/mL，表 1 中简称为 19F6），用 0.1 M 依地酸二钠的溶液（pH 7.60）稀释，然后用 1 M Na_2HPO_4溶液调 pH 至 7.60，加入 10 mM TCEP（三(2-羧乙基)膦）溶液（pH 7.60）混匀，室温放置 2 h。用 NAP-5 凝胶柱（Cytiva）除去 TCEP，并向所得溶液体系加入抗体的 5-10 倍物质的量的溶解在 DMSO 的药物-连接体（10 mM），混匀，室温静置 20 h，完毕后采用 NAP-5 凝胶柱（Cytiva）将缓冲液置换为 pH 6.0 的 10 mM 组氨酸缓冲溶液，得到的 ADC 产物，见表 1。

表 1 ADC 制备方法、编号和 DAR

偶联反应底物	偶联方法	ADC 名称	药物-连接体/抗体摩尔比	平均 DAR（n_1）	DAR4 占比
19F6+药物-连接体 7	方法 B	19F6-ADC III-5-A	6.0	3.87	56.7%
19F6+药物-连接体 10	方法 B	19F6-ADC III-6-A	7.0	4.42	53.2%
19F6+药物-连接体 12	方法 A	19F6-ADC IV-1-A	6.5	3.74	79.1%
19F6+药物-连接体 12	方法 A	19F6-ADC	8.0	3.75	80.0%

		IV-1-B			
19F6+药物-连接体 12	方法 B	19F6-ADC IV-1-C	6.5	3.82	88.5%
19F6+药物-连接体 12	方法 B	19F6-ADC IV-1-D	8.0	3.87	91.4%
19F6+药物-连接体 16	方法 A	19F6-ADC IV-7-A	10.0	3.98	57.6%

生物活性偶联物的药物/抗体比值（DAR）的测定

SEC-MS 测定 ADC 样品分子量，计算药物/抗体比（DAR）。

色谱测定条件：

色谱柱:ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column ，BTQR-18-016;

样品室温度：8℃；柱温：不控柱温；UV：280 nm;

流动相：20mM 醋酸铵，流速：0.1ml/min, 20 min，样品进样量：50 ug;

质谱测定条件：

质谱型号：AB Sciex Triple TOF 5600+;

GS1 55; GS2 55; CUR 30; TEM 450; ISVF 5500; DP 75; CE 5;

m/z 900-7000; Time bins to sum 100。

(1).SEC-MS 测定 19F6-ADC III-5-A 分子量，计算药物/抗体比值

对偶联后的 19F6-ADC III-5-A 进行 SEC-MS 分子量分析见表 2，DAR 为 3.87。

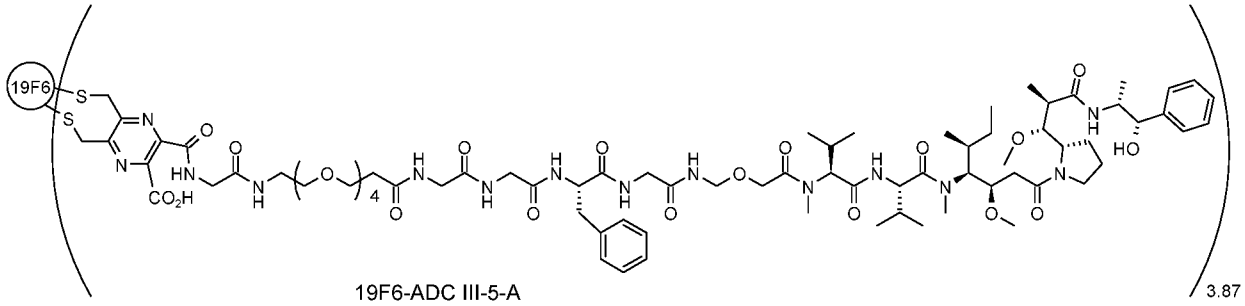


表 2：19F6-ADC III-5-A 实测分子量和 DAR 计算

载荷	$MW_{Exp.}$	最大信号强度	比率	DAR
裸抗	145050.00	0.00	0.000	3.87
DAR2	N/A	0.00	0.000	
DAR3	149863.68	18.50	0.282	
DAR4	151472.75	37.25	0.567	
DAR5	153078.63	9.92	0.151	

(2). SEC-MS 测定 19F6-ADC III-6-A 分子量，计算药物/抗体比值

对偶联后的 19F6-ADC III-6-A 进行 SEC-MS 分子量分析见表 3，DAR 为 4.42。

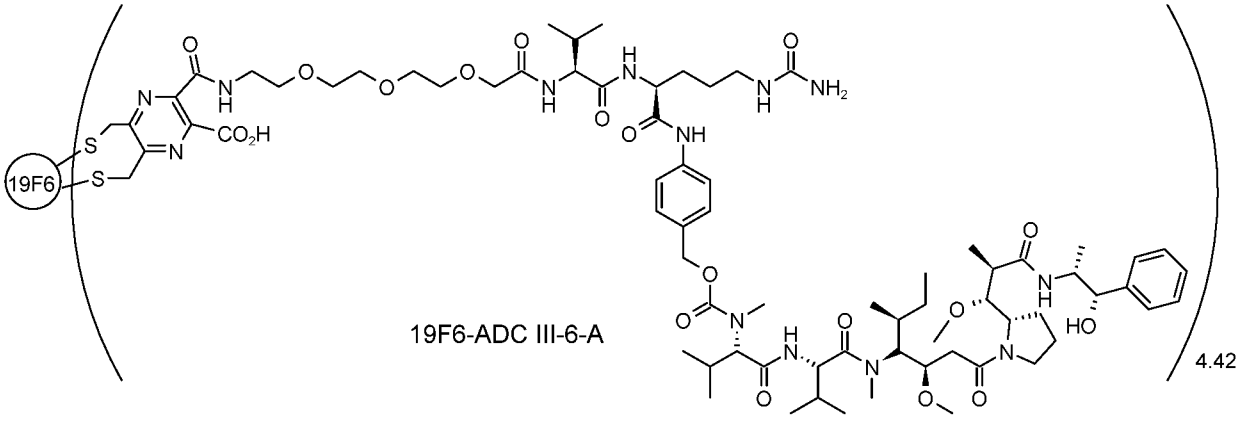


表 3：19F6-ADC III-6-A 实测分子量和 DAR 计算

载荷	$MW_{Exp.}$	最大信号强度	比率	DAR
裸抗	145050.00	0.00	0.000	4.42
DAR2	N/A	0.00	0.000	
DAR3	149510.90	4.85	0.052	
DAR4	151001.13	49.64	0.532	
DAR5	152483.55	33.24	0.356	
DAR6	153972.11	5.54	0.059	

(3). SEC-MS 测定 19F6-ADC IV-1-A 分子量，计算药物/抗体比值

对偶联后的 19F6-ADC IV-1-A 进行 SEC-MS 分子量分析见表 4，DAR 为 3.74。

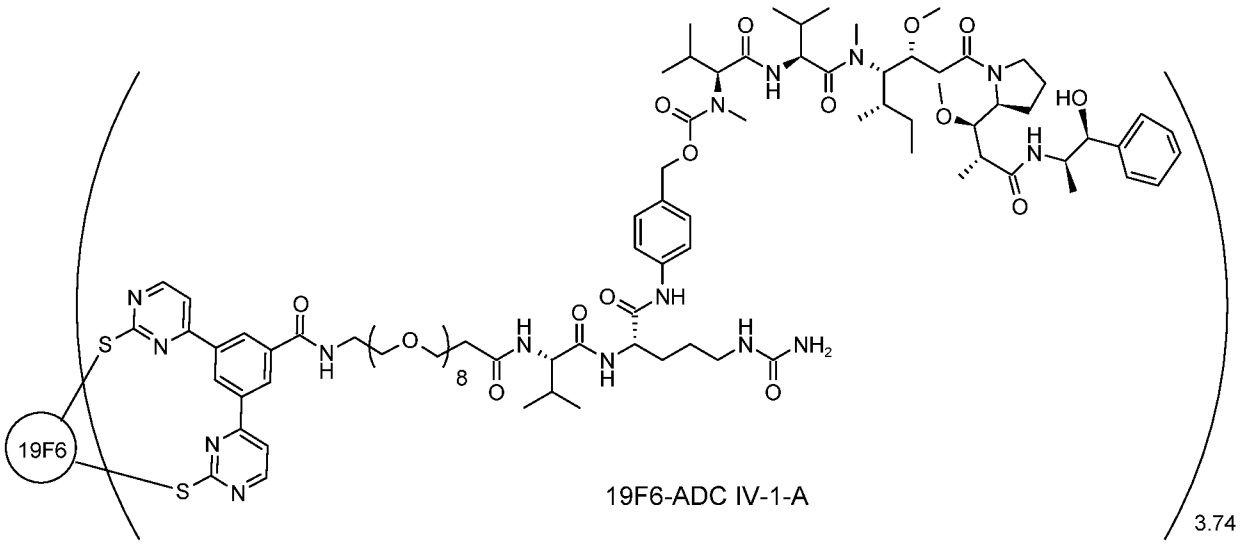


表 4：19F6-ADC IV-1-A 实测分子量和 DAR 计算

载荷	$MW_{Exp.}$	最大信号强度	比率	DAR
裸抗	145054.77	0.00	0.000	3.74
DAR1	146863.97	2.09	0.017	

DAR2	148669.83	1.75	0.014	
DAR3	150468.31	21.98	0.178	
DAR4	152274.07	97.91	0.791	

(4). SEC-MS 测定 19F6-ADC IV-1-B 分子量，计算药物/抗体比值

对偶联后的 19F6-ADC IV-1-B 进行 SEC-MS 分子量分析见表 5，DAR 为 3.75。

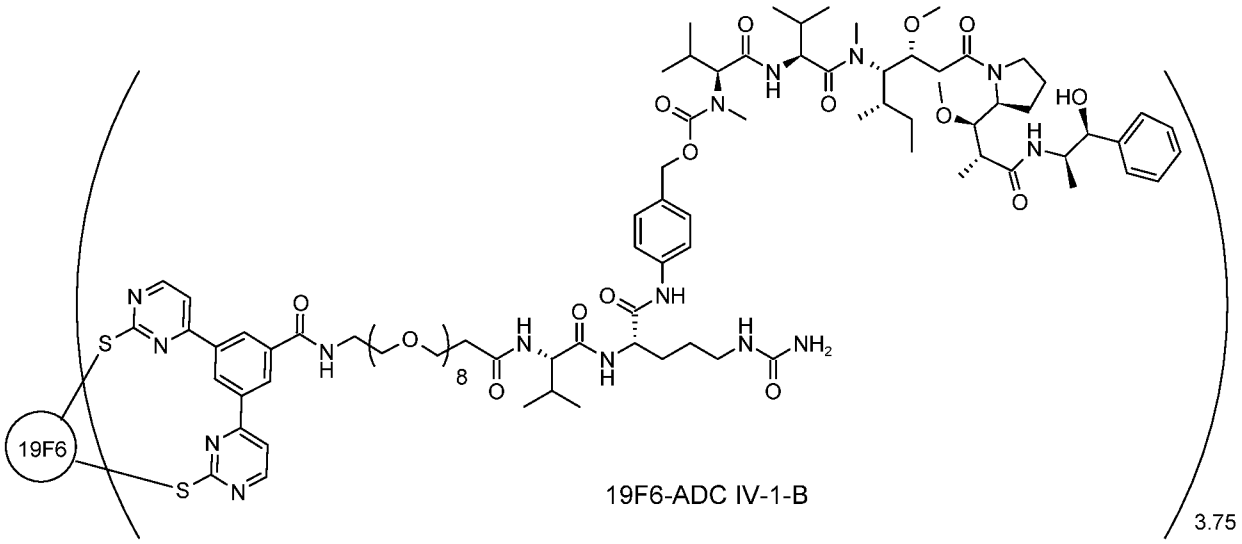


表 5：19F6-ADC IV-1-B 实测分子量和 DAR 计算

载荷	$MW_{Exp.}$	最大信号强度	比率	DAR
裸抗	145054.77	0.00	0.000	3.75
DAR1	146861.63	1.96	0.015	
DAR2	148662.46	2.54	0.020	
DAR3	150467.51	21.19	0.165	
DAR4	152273.42	102.47	0.800	

(5). SEC-MS 测定 19F6-ADC IV-1-C 分子量，计算药物/抗体比值

对偶联后的 19F6-ADC IV-1-C 进行 SEC-MS 分子量分析见表 6，DAR 为 3.82。

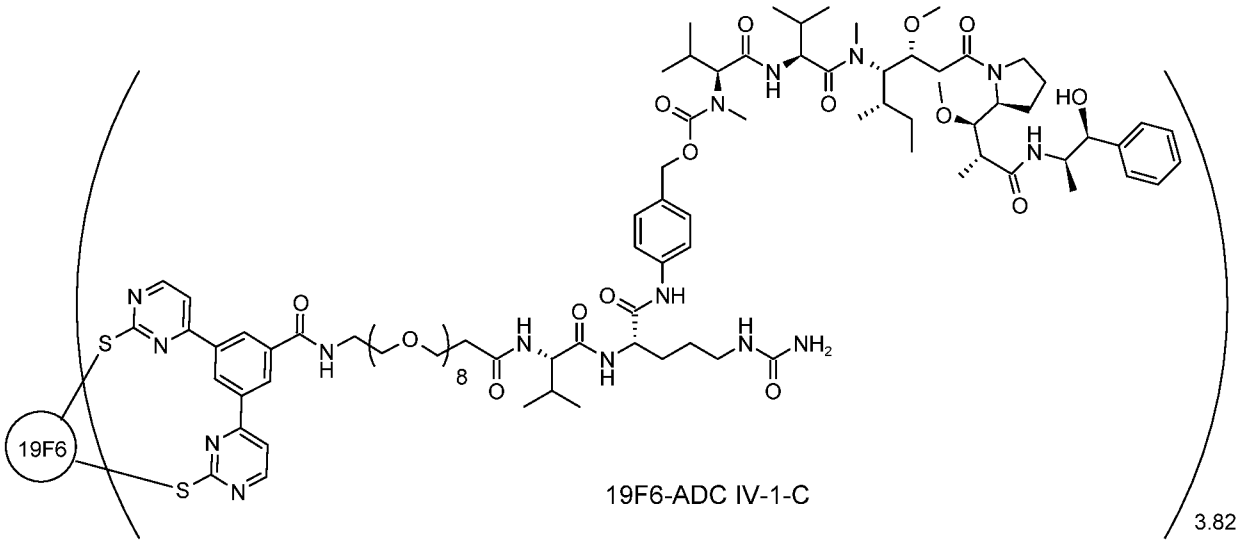


表 6：19F6-ADC IV-1-C 实测分子量和 DAR 计算

载荷	$MW_{Exp.}$	最大信号强度	比率	DAR
裸抗	145054.77	0.00	0.000	3.82
DAR1	146862.39	1.68	0.025	
DAR2	148667.57	0.96	0.014	
DAR3	150470.67	5.12	0.076	
DAR4	152273.43	60.04	0.885	

(6). SEC-MS 测定 19F6-ADC IV-1-D 分子量，计算药物/抗体比值

对偶联后的 19F6-ADC IV-1-D 进行 SEC-MS 分子量分析见表 7，DAR 为 3.87。

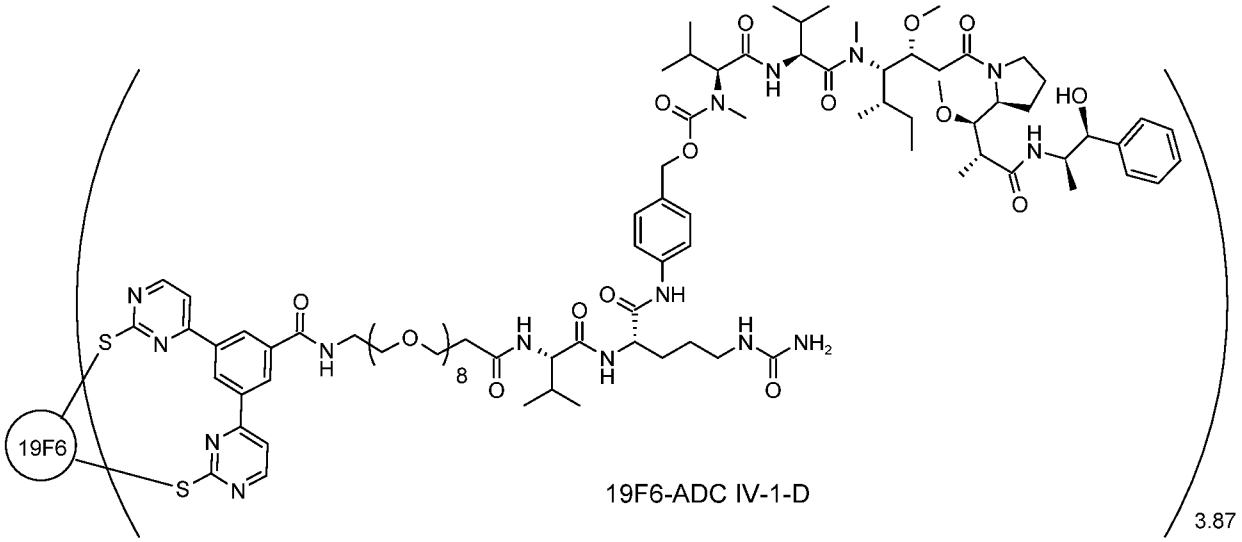


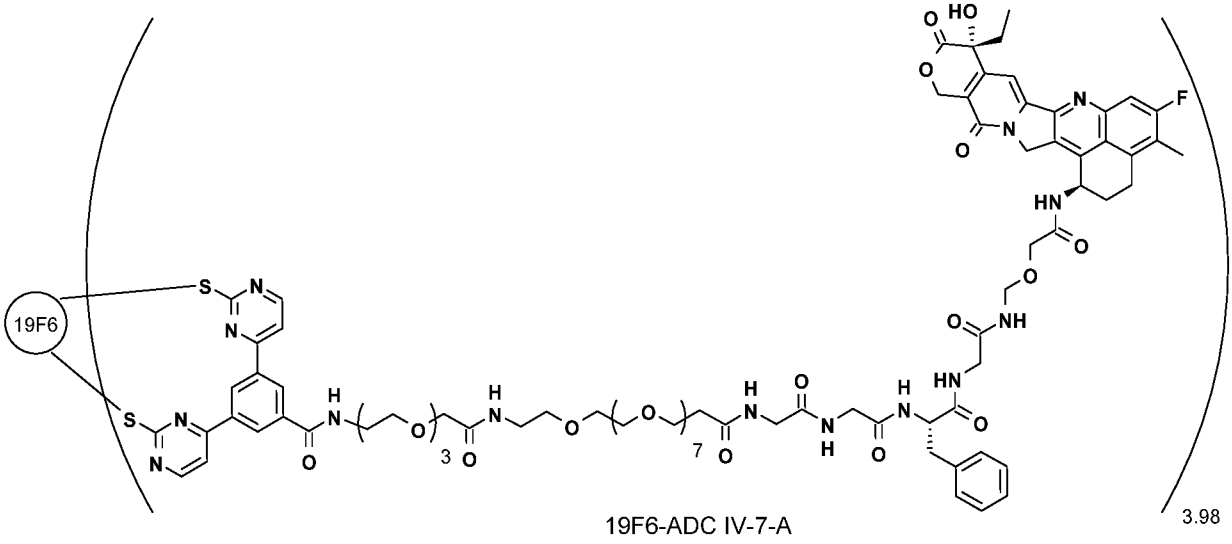
表 7：19F6-ADC IV-1-D 实测分子量和 DAR 计算

载荷	$MW_{Exp.}$	最大信号强度	比率	DAR
裸抗	145054.77	0.00	0.000	3.87
DAR1	146855.00	1.79	0.017	

DAR2	148660.10	1.00	0.009	
DAR3	150470.36	6.44	0.060	
DAR4	152273.33	98.45	0.914	

(7). SEC-MS 测定 19F6-ADC IV-7-A 分子量，计算药物/抗体比值

对偶联后的 19F6-ADC IV-7-A 进行 SEC-MS 分子量分析见表 8，DAR 为 3.98。



19F6-ADC IV-7-A

表 8：19F6-ADC IV-7-A 实测分子量和 DAR 计算

载荷	$MW_{Exp.}$	最大信号强度	比率	DAR
裸抗	145054.69	1.75	0.013	3.98
DAR1	146760.24	2.02	0.016	
DAR2	148460.32	5.75	0.044	
DAR3	150178.32	11.66	0.090	
DAR4	151894.99	74.75	0.576	
DAR5	153762.19	33.88	0.261	

4.检测生物活性偶联物对体外细胞活性的抑制作用

ADC 化合物的细胞增殖抑制作用

（1）细胞铺板：首先采用相应的培养基培养肿瘤细胞 N87，用胰酶消化细胞，离心后重悬细胞计数，调整细胞至合适的浓度进行铺板。肿瘤细胞来源见表 9。

表 9：肿瘤细胞来源

细胞名称	肿瘤类型	来源
NCI-N87	人胃癌细胞	ATCC

本发明化合物和肿瘤细胞共孵育：细胞待细胞贴壁后，移除细胞中培养基，将稀释好的生物活性分子（本发明化合物）加入到上述板孔中，孵育 96 小时。

体外细胞活性检测：孵育结束后，每孔加入 Cell Counting-Lite™ 2.0 试剂

（Vazyme/诺唯赞）50μL，避光振荡混匀，反应 10min 后即可进行检测，酶标仪（厂家：BMG, 型号：PHERAStar-FS）读数。利用不含细胞的培养基的 Cell Counting-Lite™ 获得背景 RLU,含有细胞的培养基的 Cell Counting-Lite™获得溶媒 RLU。细胞抑制率=1-（样品 RLU-背景 RLU）/（溶媒 RLU-背景 RLU）×100%，按照四参数模型拟合曲线，计算化合物的半数抑制浓度（IC_{50}）。

（2）数据结果：检测结果如表 10 所示。

表 10：ADC 偶联物对 NCI-N87 细胞系杀伤结果

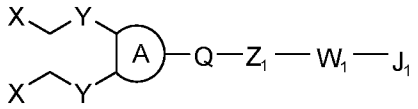
ADC 编号	IC_{50}(μg/mL) 细胞名称 NCI-N87(96 小时)
19F6-ADC III-6-A	8.48
19F6-ADC IV-1-D	2.57

说明利用新的偶联方法形成的 ADC，可对肿瘤细胞产生杀伤作用，新的偶联方法应用于 ADC 分子中是行之有效的。

除本文中描述的那些外，根据前述描述，本发明的各种修改对本领域技术人员而言会是显而易见的。这样的修改也意图落入所附权利要求书的范围内。本申请中所引用的各参考文献(包括所有专利、专利申请、期刊文章、书籍及任何其它公开)均以其整体援引加入本文。

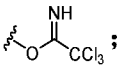
权 利 要 求

1. 化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 I 的结构：



式I

其中：

X 选自离去基团，例如 Cl 、Br、I、OMs、OTs、OTf 或；

Y 不存在或选自羰基；

A 环选自取代或非取代的 C_{6-10} 芳环、5-12 元芳杂环或 5-12 元杂环；

Q 不存在或为-C(O)-NH-；

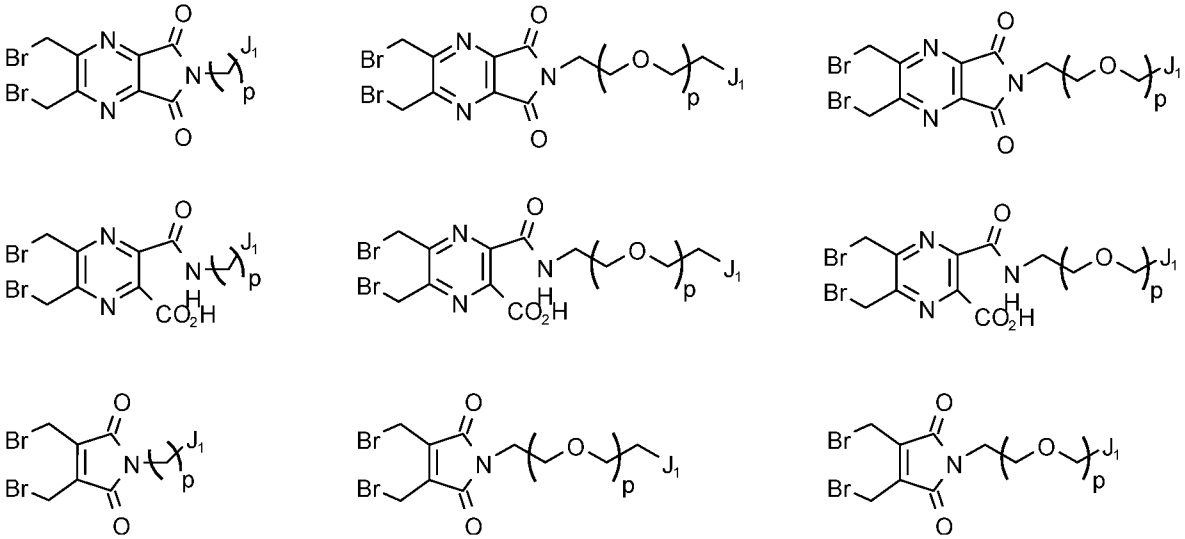
Z_1 不存在或者选自-CH_2-或 C_{2-6} 亚炔基；

W_1 不存在或选自 C_{1-10} 亚烷基、-(CH_2CH_2O)p-、以及-(OCH_2CH_2)p-中的一种或多种；

J_1 选自-COOH、-NH_2、3-10 元含氮杂环基、磺酰脲基或羟基；

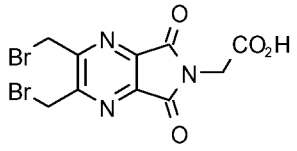
p 为 1-10 的整数。

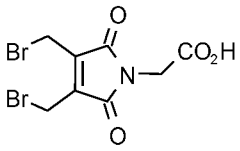
2. 根据权利要求 1 所述的式 I 化合物，其具有如下结构：

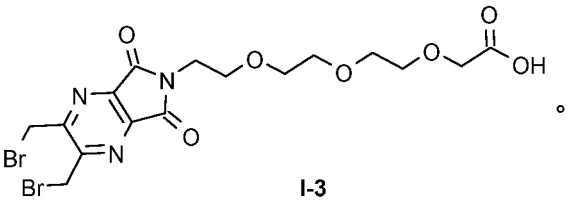


其中 p 为 1-10 的整数，J_1 为-COOH 或-NH_2；

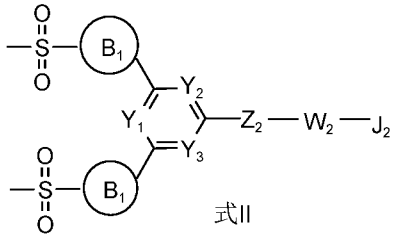
优选地，式 I 化合物结构选自：


I-1


I-2


I-3。

3. 化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 II 的结构：


式II

其中，B_1在每次出现时，各自独立地选自单键或 5-12 元含氮芳杂环；

Y_1，Y_2及 Y_3在每次出现时，各自独立的选自 CH 和 N；

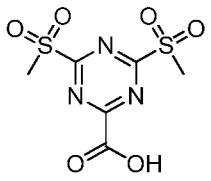
Z_2不存在或者选自-NH-、$-CH_2-$、羰基、-C(=O)NH-、-NHC(=O)-或 C_{2-6}亚炔基；

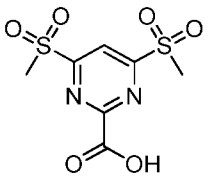
W_2不存在或选自 C_{1-10}亚烷基、$-(CH_2CH_2O)_p-$或$-(OCH_2CH_2)_p-$中的一个或多个；

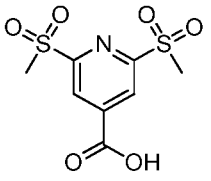
J_2选自-COOH、$-NH_2$、3-10 元含氮杂环基、磺酰脲基或羟基；

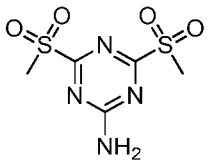
p 为 1-10 的整数。

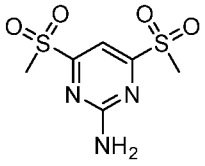
4. 根据权利要求 3 所述的式 II 化合物，其具有如下结构：

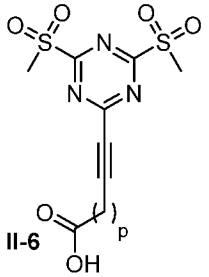

II-1

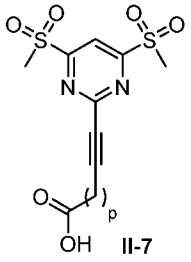

II-2

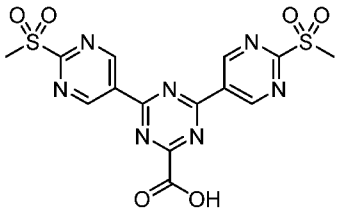

II-3

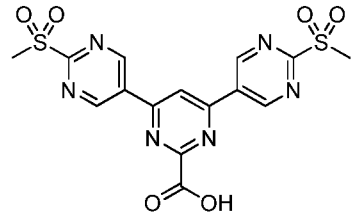

II-4


II-5

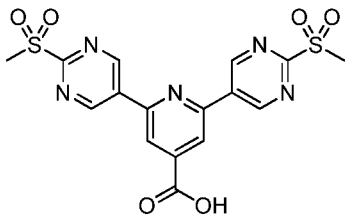

II-6


II-7

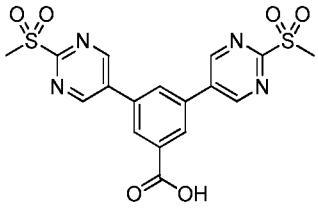

II-8



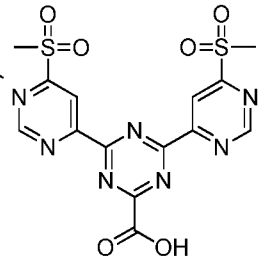
II-9



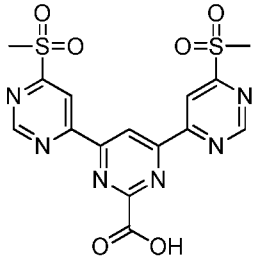
II-10



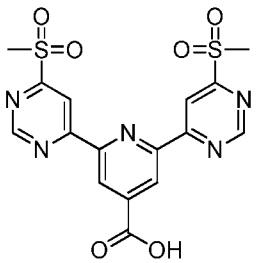
II-11



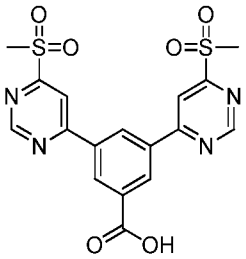
II-12



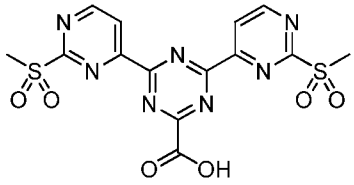
II-13



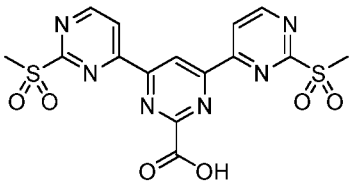
II-14



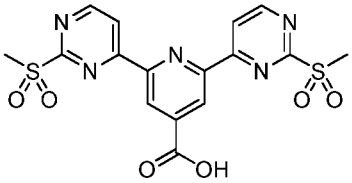
II-15



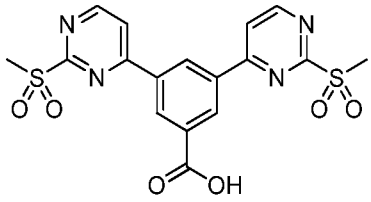
II-16



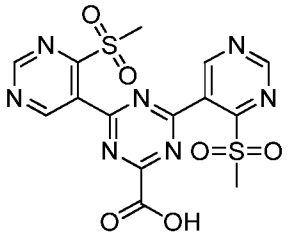
II-17



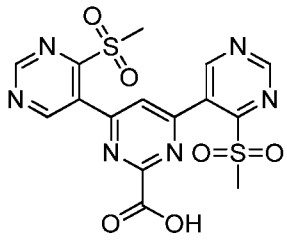
II-18



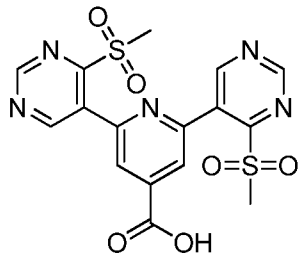
II-19



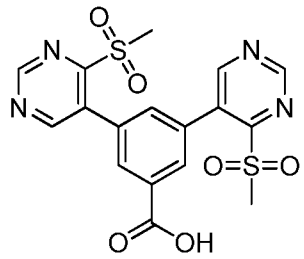
II-20



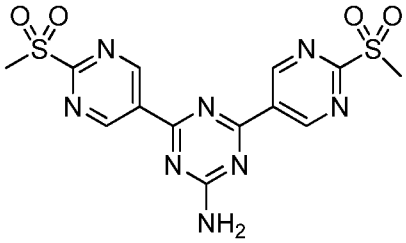
II-21



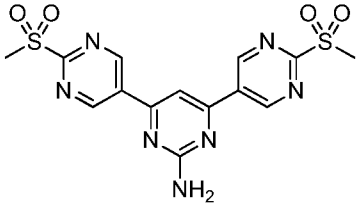
II-22



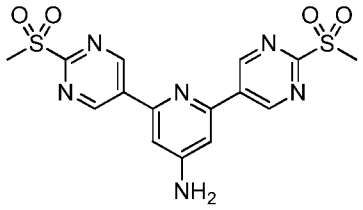
II-23



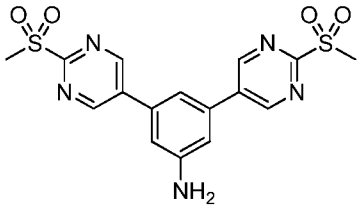
II-24



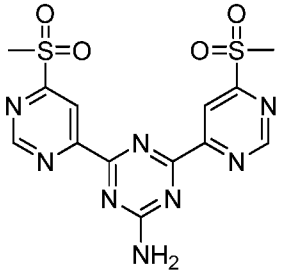
II-25



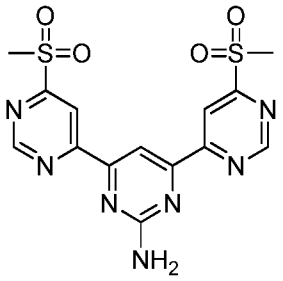
II-26



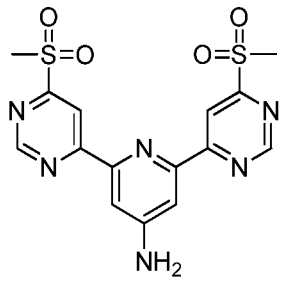
II-27



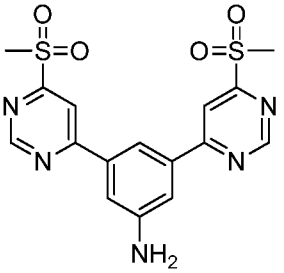
II-28



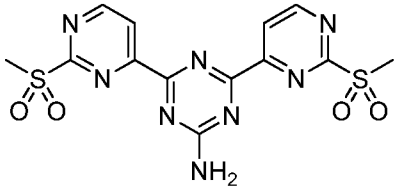
II-29



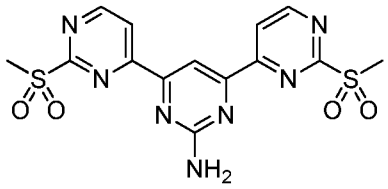
II-30



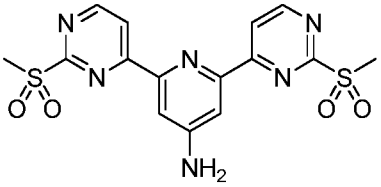
II-31



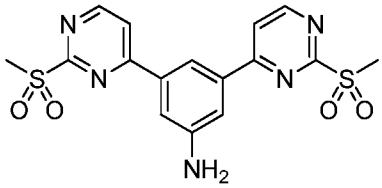
II-32



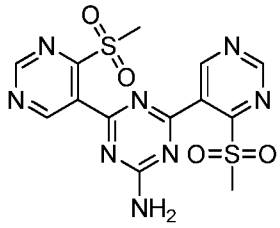
II-33



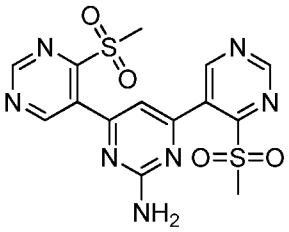
II-34



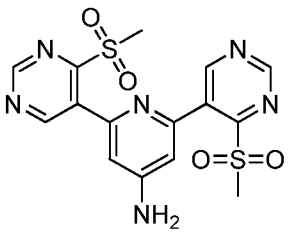
II-35



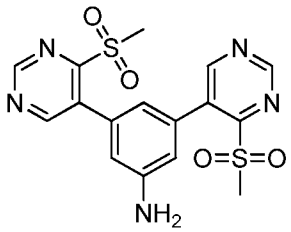
II-36



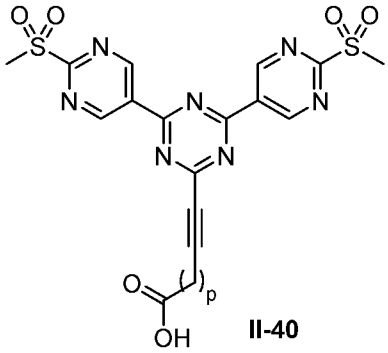
II-37



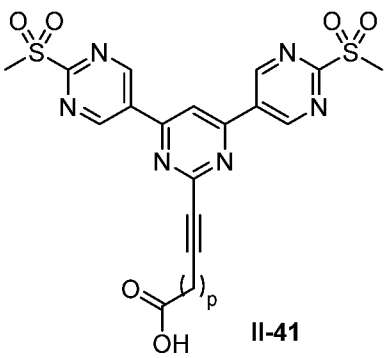
II-38



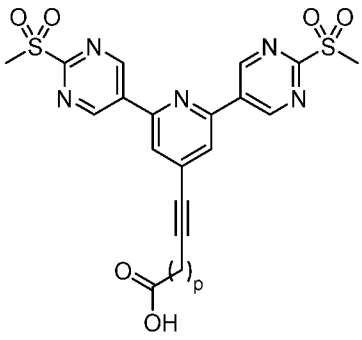
II-39



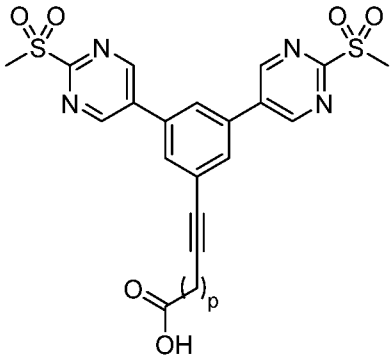
II-40



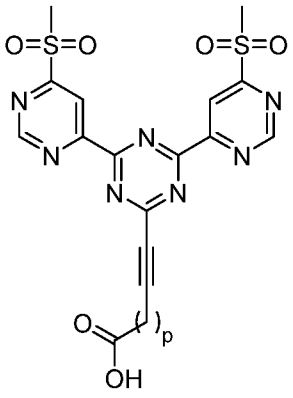
II-41



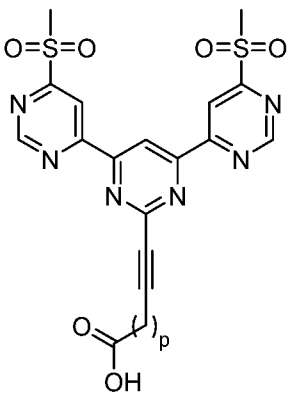
II-42



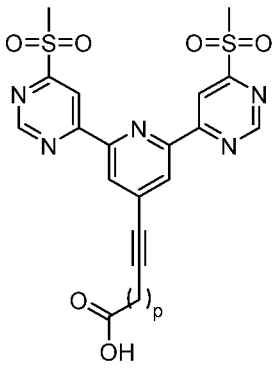
II-43



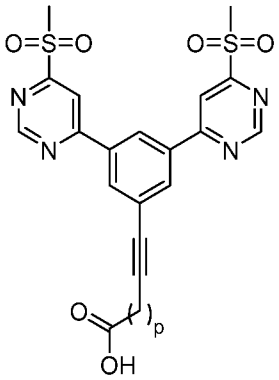
II-44



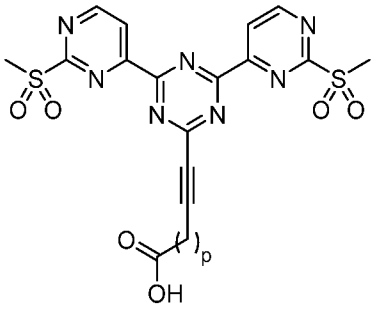
II-45



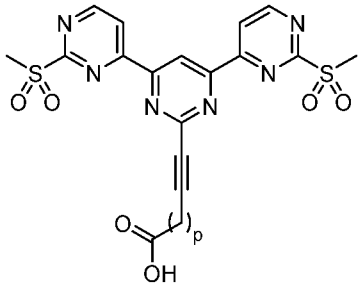
II-46



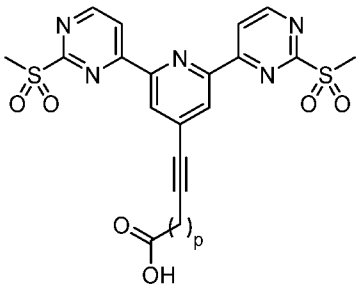
II-47



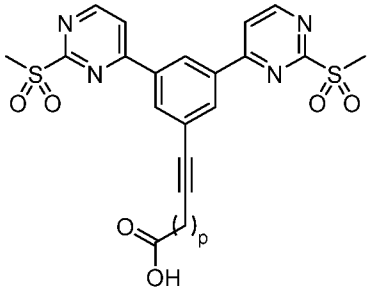
II-48



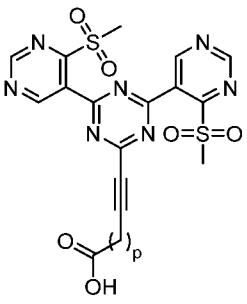
II-49



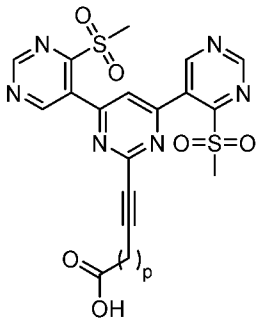
II-50



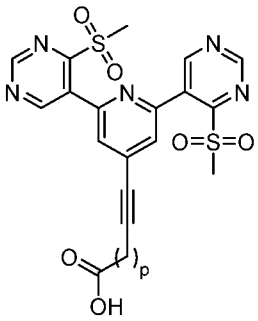
II-51



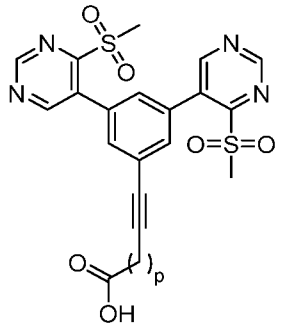
II-52



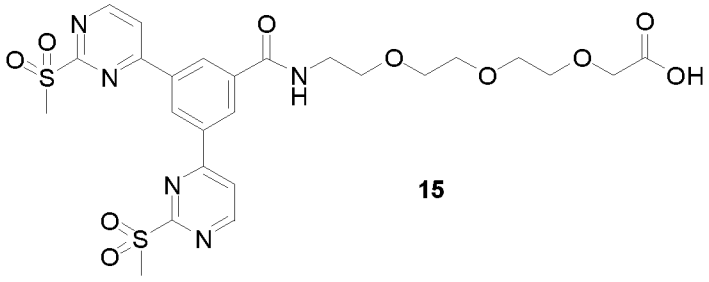
II-53



II-54



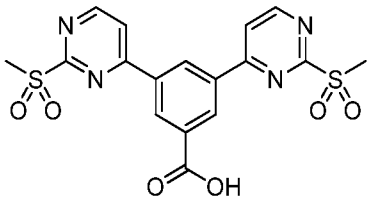
II-55



15

p 为 1-10 的整数；

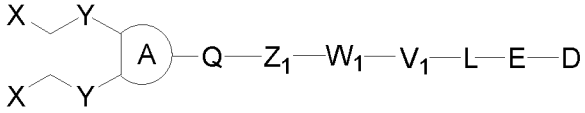
优选地，式 II 化合物具有如下结构：



。

II-19

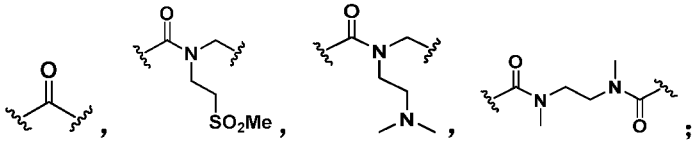
5. 化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 V 的结构：



式 V

其中：

E 选自单键、-NH-CH_2-，或以下结构：



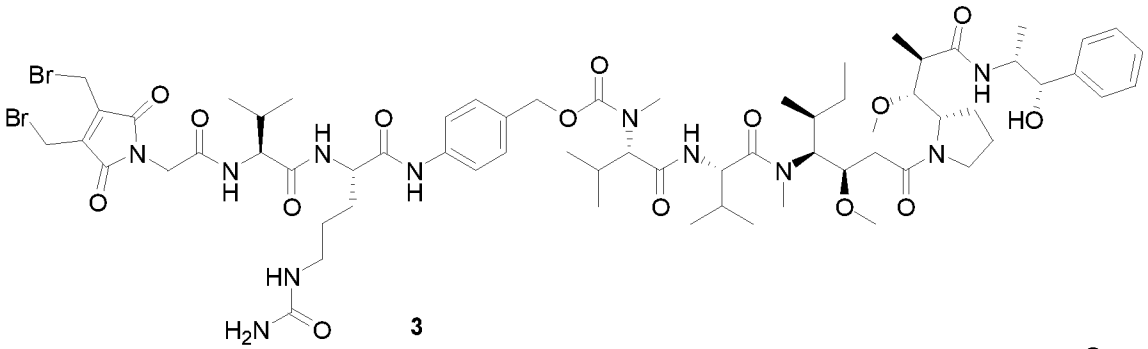
D 是生物活性分子（例如细胞毒性药物）片段；

X 、Y、A、Q、Z_1、W_1如权利要求 1 或 2 中所定义；

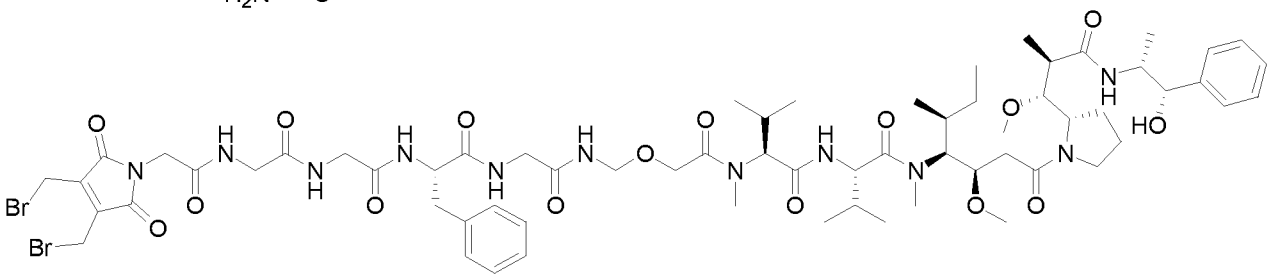
V_1为权利要求 1 或 2 所述的式 I 化合物中 J_1与 L 连接时形成的基团；优选地，V_1选自-CO-、-N(R_1)-、-O-、3-10 元含氮杂环基或磺酰脲基，其中 R_1为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；进一步优选地，V_1选自-C(O)-和-N(R_1)-，其中 R_1为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；

L 是连接 V_1和 E 之间的连接子。

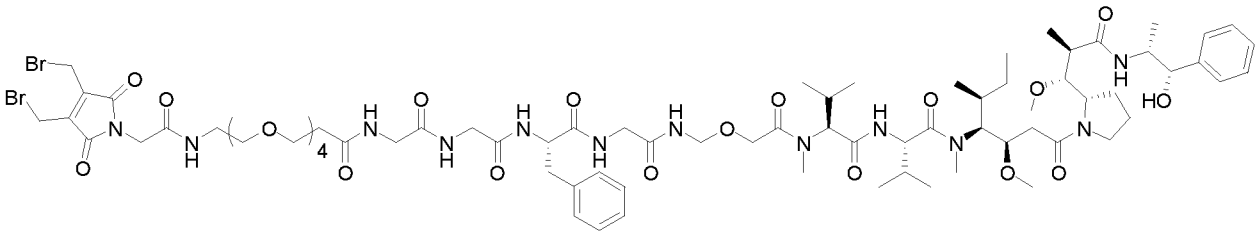
6. 根据权利要求 5 所述的式 V 化合物，其具有如下结构：



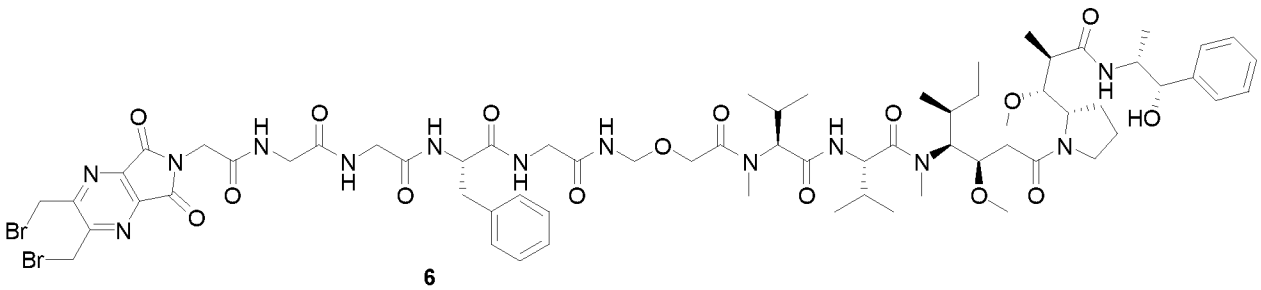
3



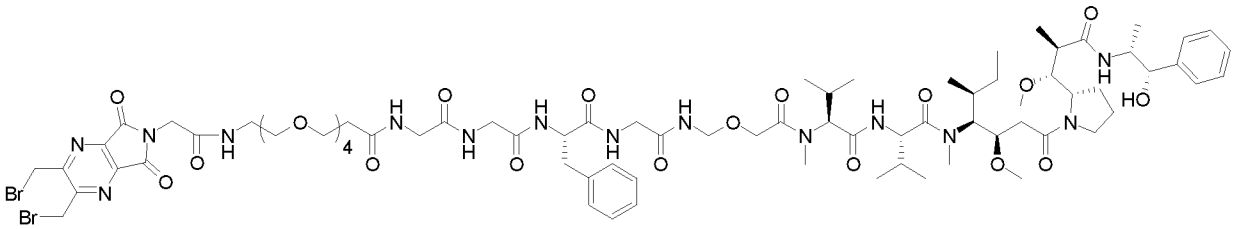
4



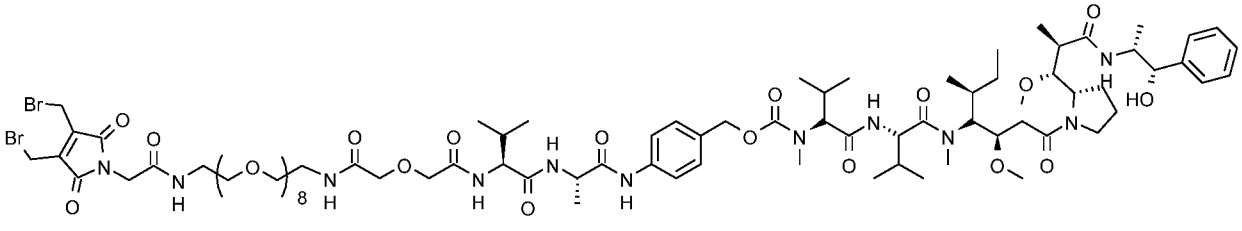
5



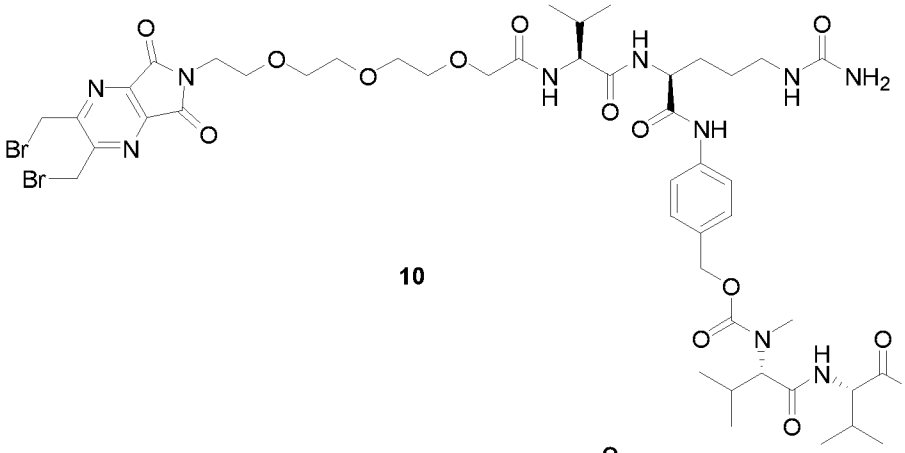
6



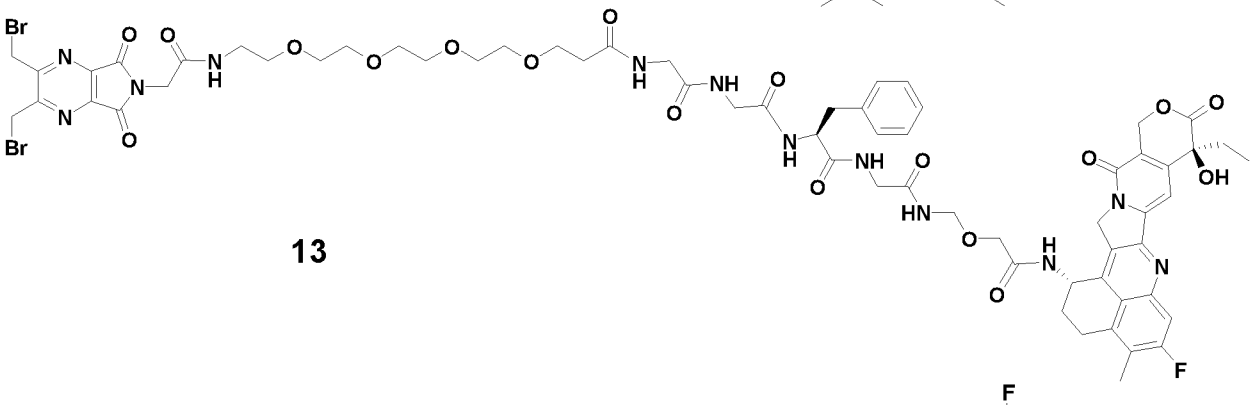
7



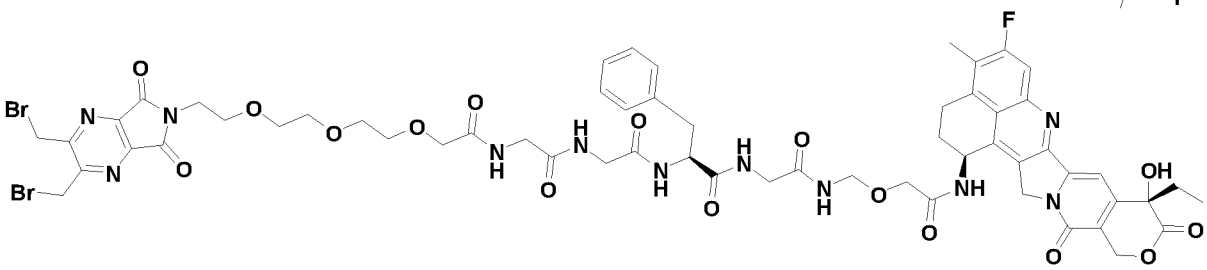
8



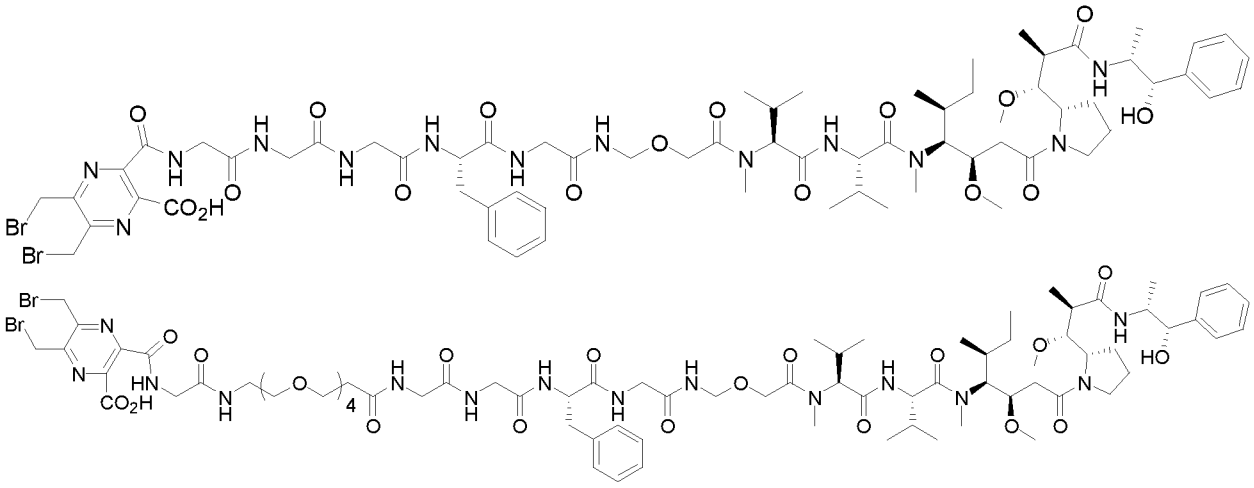
10

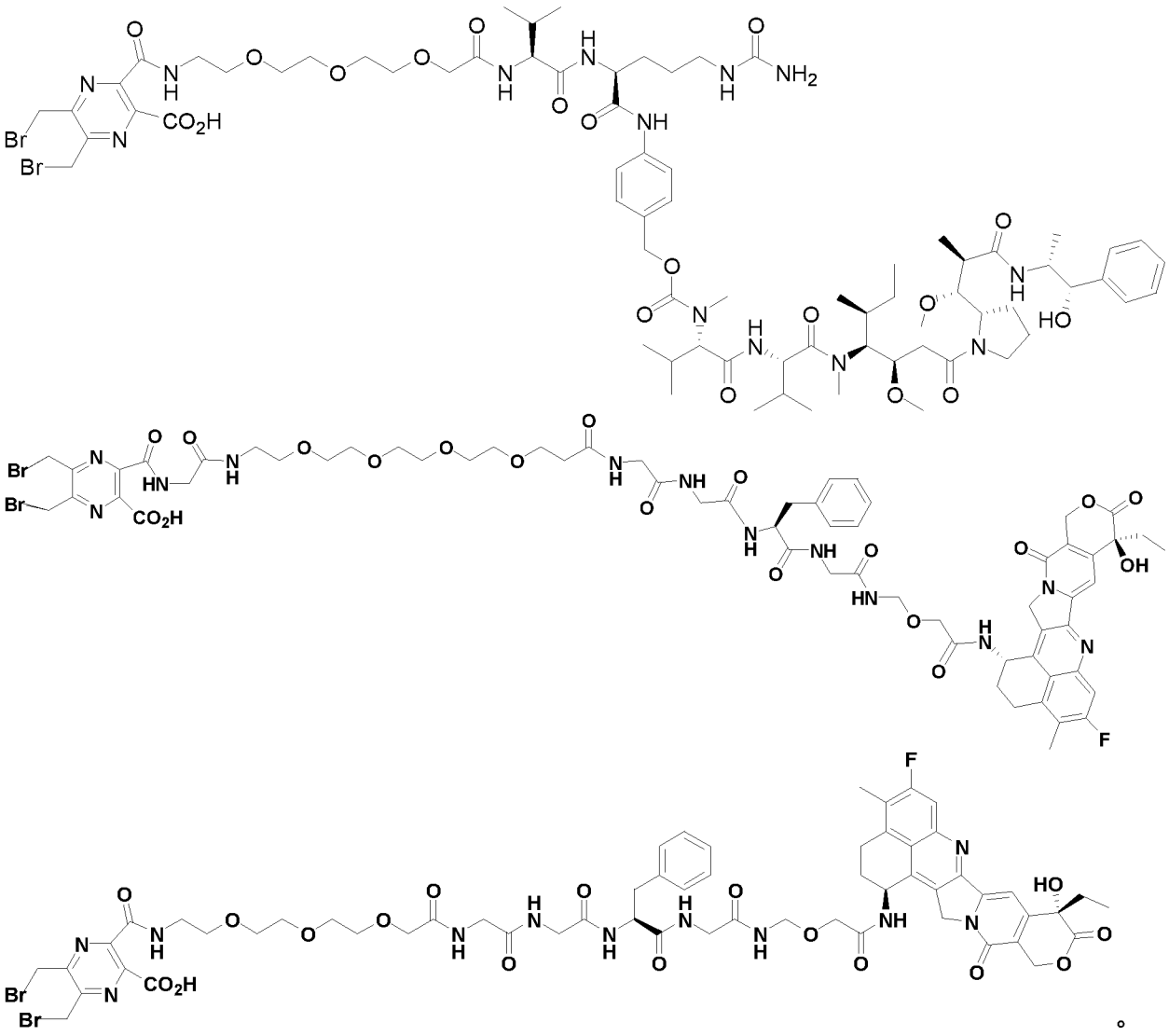


13

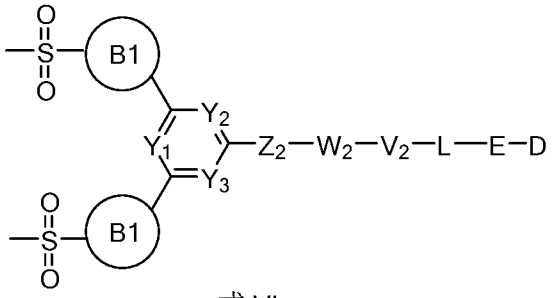


14





7. 化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物，其中所述化合物具有式 VI 的结构：



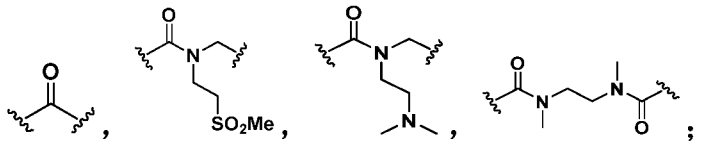
式 VI

B_1、Y_1、Y_2、Y_3、Z_2和 W_2如权利要求 3 或 4 中所定义；

L 是连接 V_2和 E 之间的连接子；

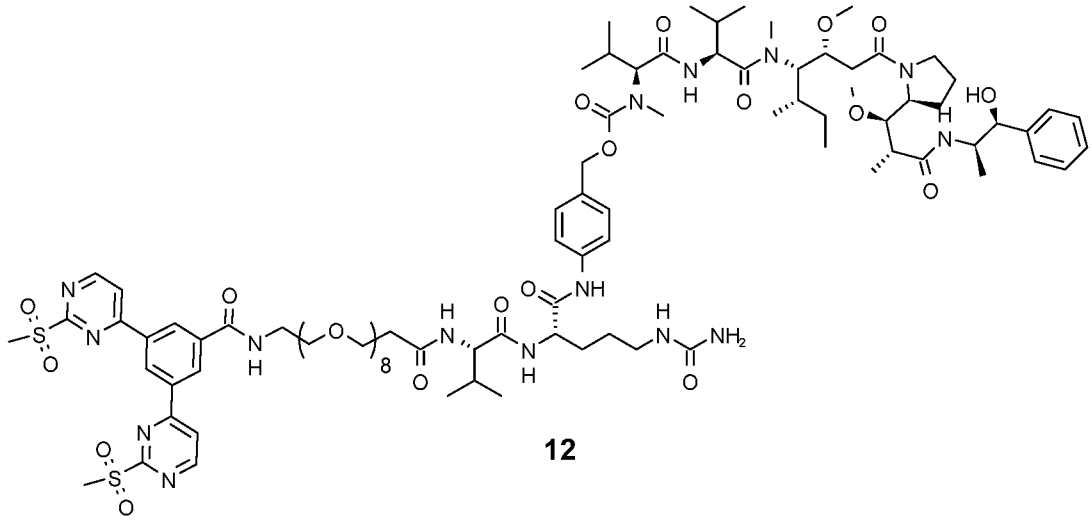
V_2为权利要求 3 或 4 中的 J_2与 L 连接时形成的基团；优选地，V_2选自-CO-、-N(R_2)-、-O-、3-10 元含氮杂环基或磺酰脲基，其 中 R_2为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；进一步优选地，V_2选自-C(O)-和-N(R_2)-，其中 R_2为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；

E 选自单键、-NH-CH_2-，或以下结构：

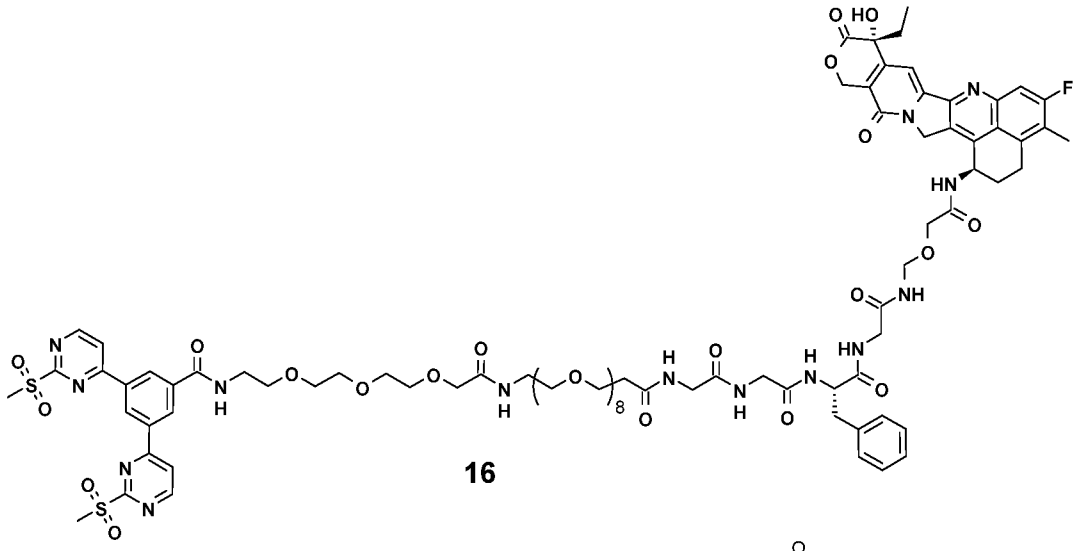


D 是生物活性分子（例如细胞毒性药物）片段。

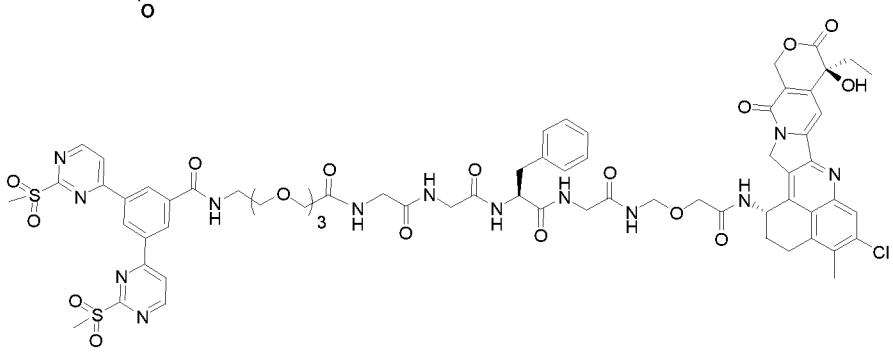
8. 根据权利要求 7 所述的化合物，其结构选自：

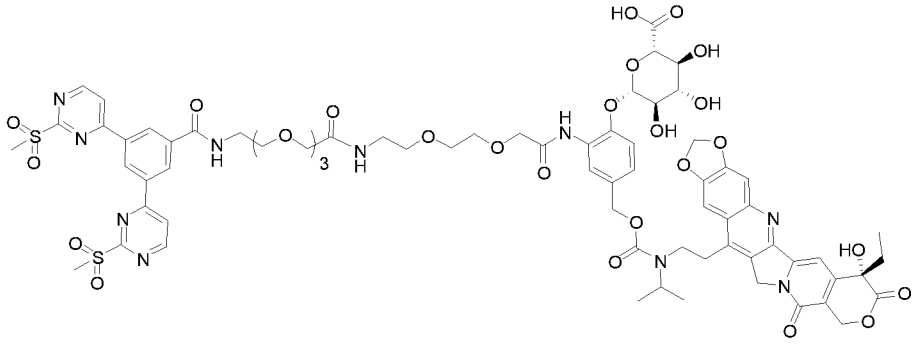


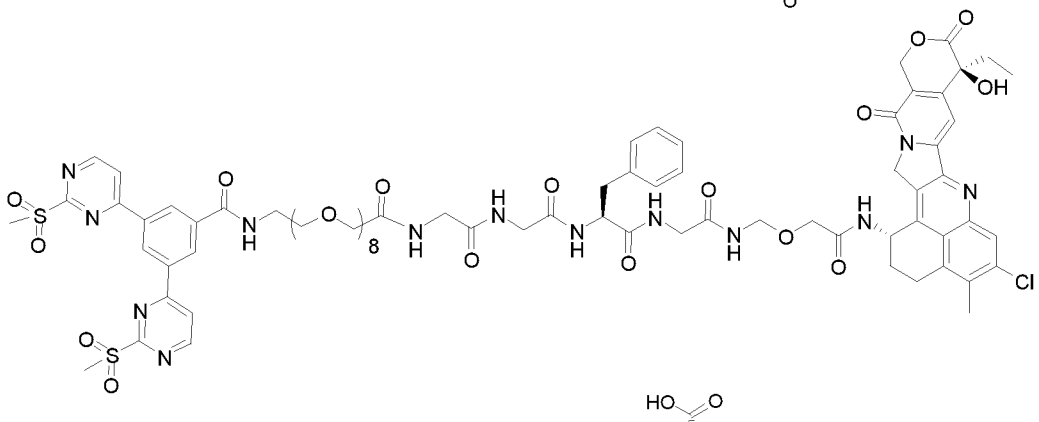
12

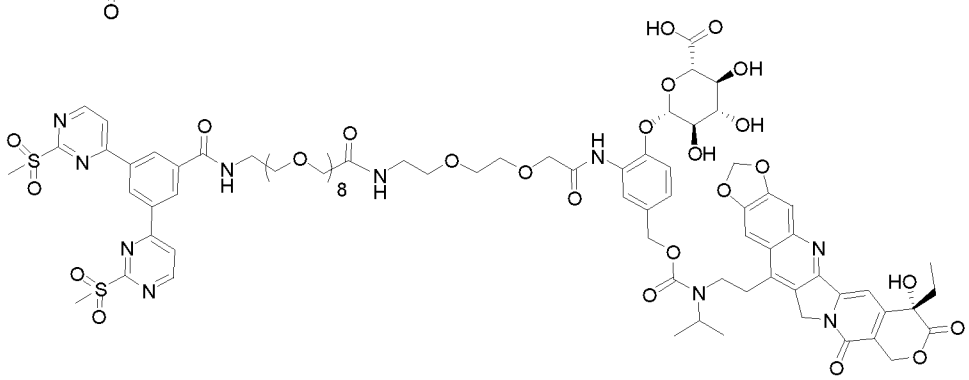


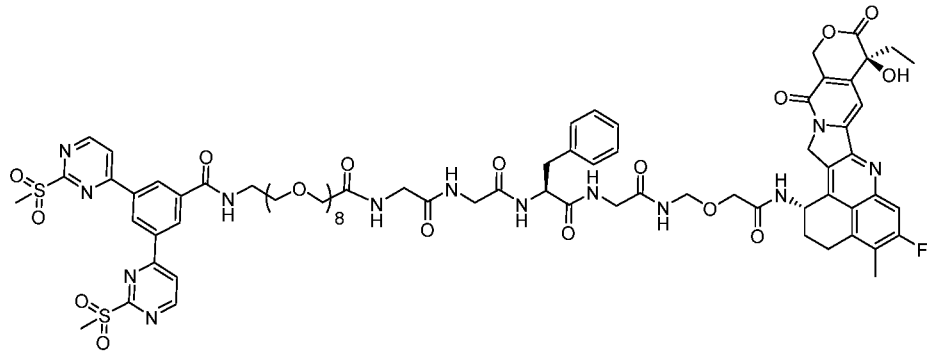
16

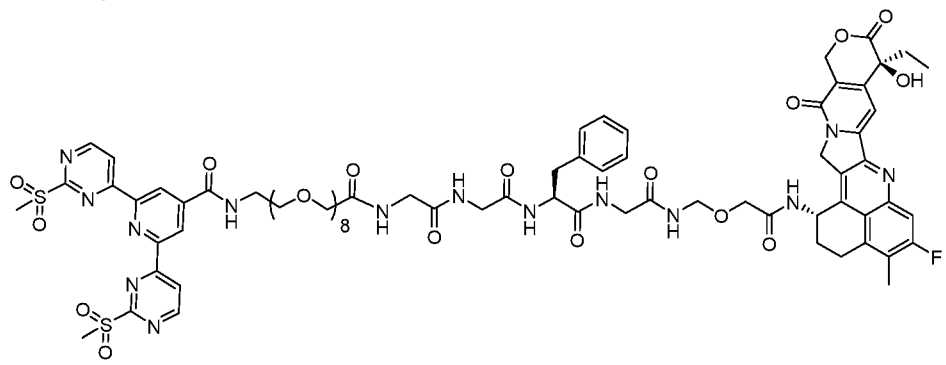


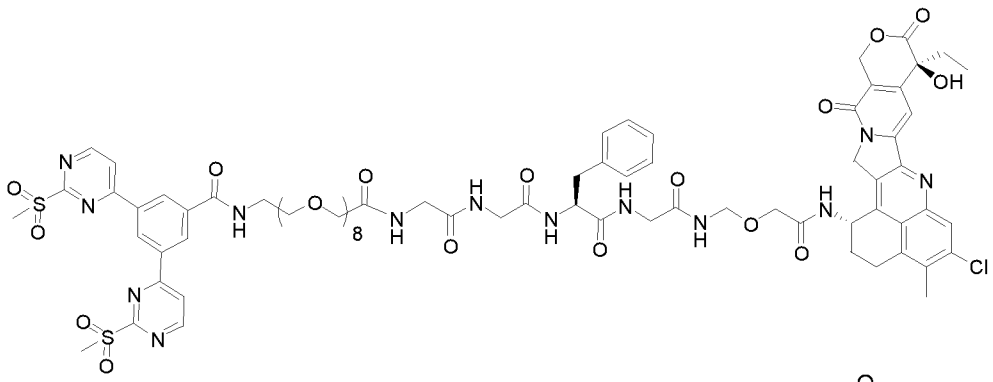


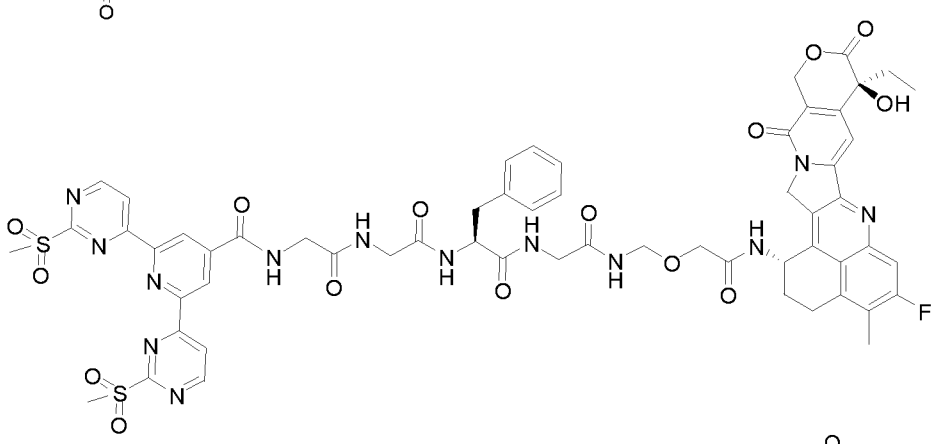


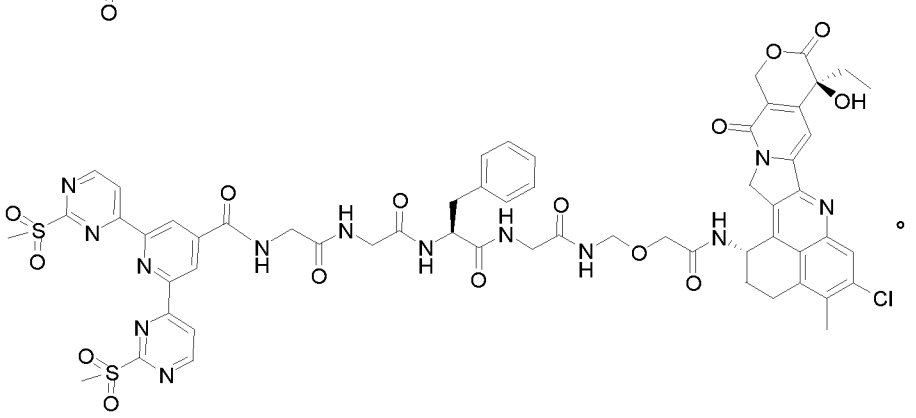




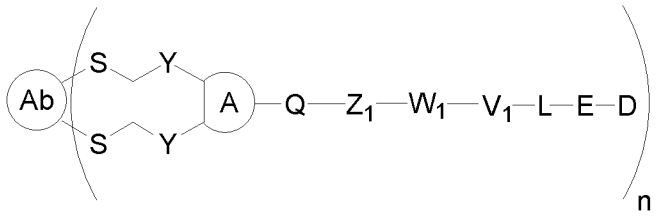








9. 一种生物活性偶联物，其结构如式 VII 所示：



式 VII

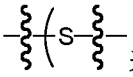
其中，Ab 为靶向部分（例如小分子配体、蛋白质（例如抗体）、多肽、非蛋白质试剂（例如糖、RNA 或 DNA））；n 选自 1-10 之间的整数或小数；

V_1 选自-C(O)-或-N(R_1)-，其中 R_1 为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；

L 是连接 V_1 和 E 之间的连接子；

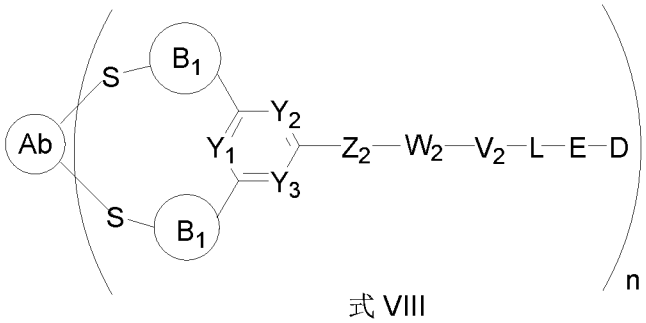
E 是连接 L 和 D 的结构片段；

D 是生物活性分子（例如细胞毒性药物）片段；

所述偶联物中的  表示靶向部分为抗体时，抗体中的巯基与偶联物其余部分的具体连接方式；

其余基团如权利要求 1-2 任意一项所定义。

10. 一种生物活性偶联物，其结构如式 VIII 所示：



式 VIII

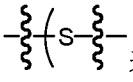
其中，Ab 为靶向部分（例如小分子配体、蛋白质（例如抗体）、多肽、非蛋白质试剂（例如糖、RNA 或 DNA））；n 选自 1-10 之间的整数或小数；

V_2选自-C(O)-或-N(R_2)-，其中 R_2为 H、C_{1-6}烷基或 C_{2-6}烷氧烷基；

L 是连接 V_2和 E 之间的连接子；

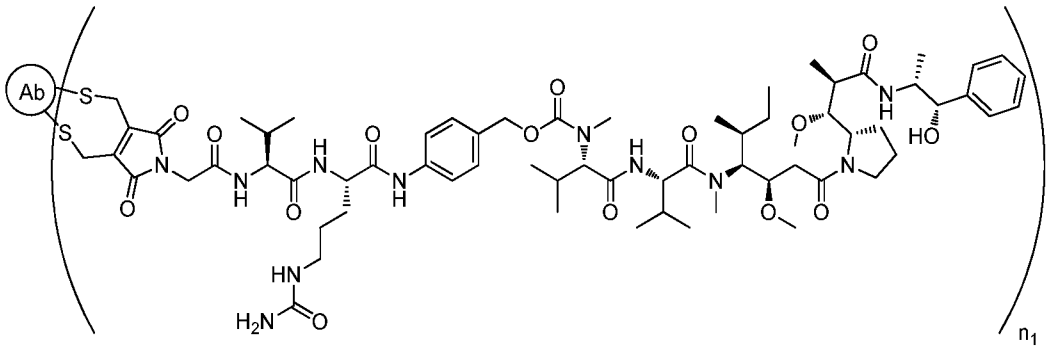
E 是连接 L 和 D 的结构片段；

D 是生物活性分子（例如细胞毒性药物）片段；

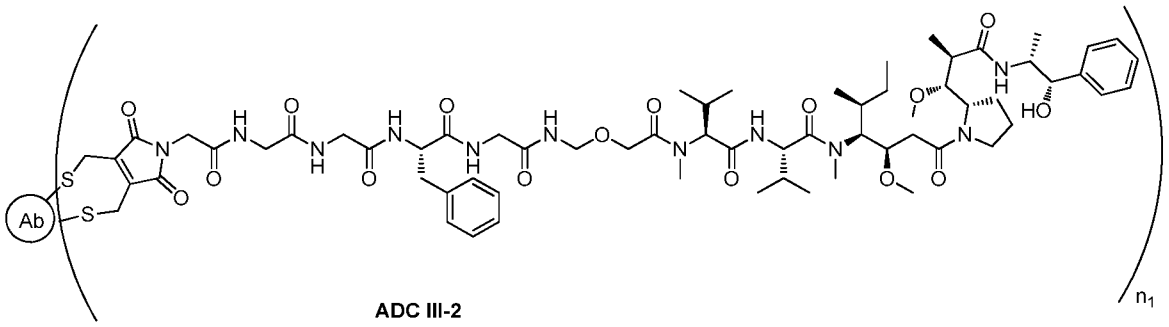
所述偶联物中的  表示靶向部分为抗体时，抗体中的巯基与偶联物其余部分的具体连接方式；

其余基团如权利要求 3-4 任意一项所定义。

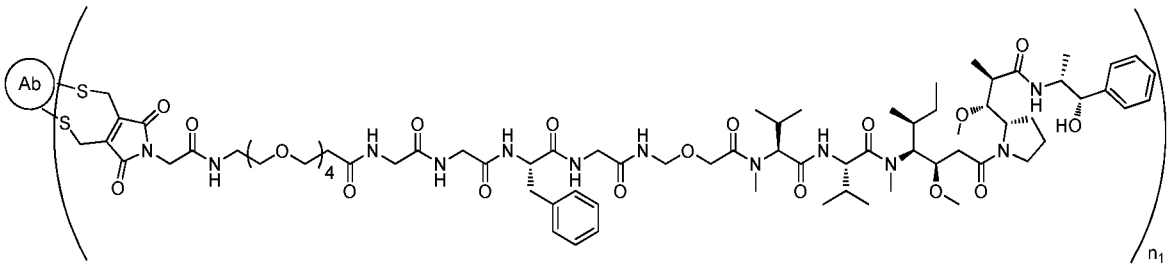
11. 根据权利要求 9 所述生物活性偶联物，其结构如下，其中 Ab 选自 anti-Her2 抗体 trastuzumab 或 anti-Trop2 抗体 sacituzumab 或 anti-ROR1 抗体 19F6_Hu35V1（简称 19F6），n_1为 1-8,优选为 3-5：



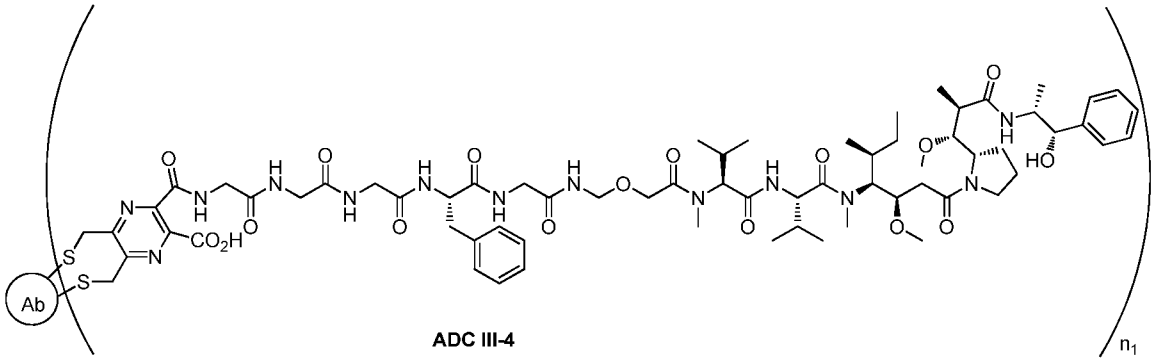
ADC III-1



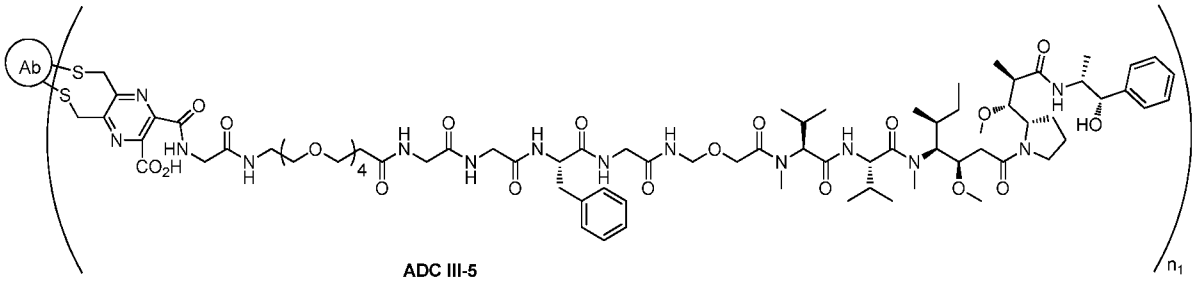
ADC III-2



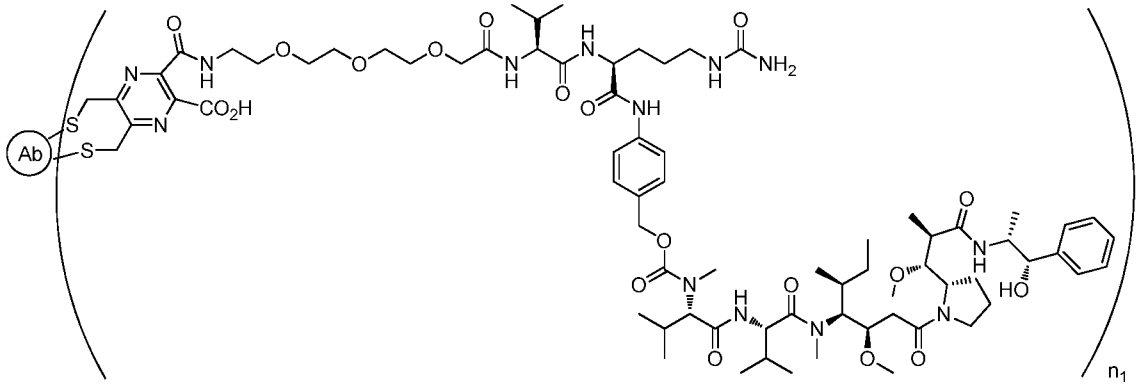
ADC III-3



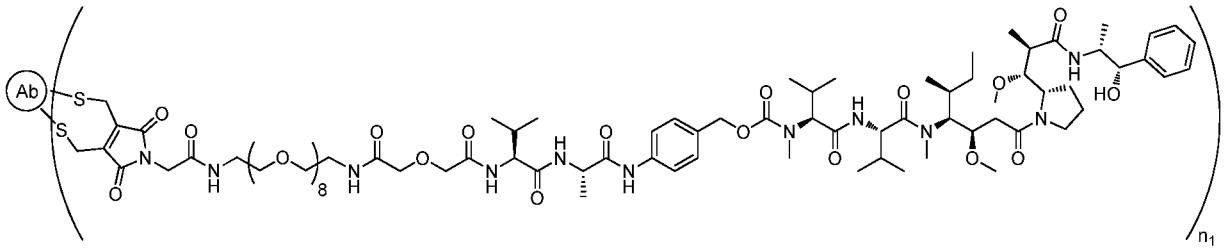
ADC III-4



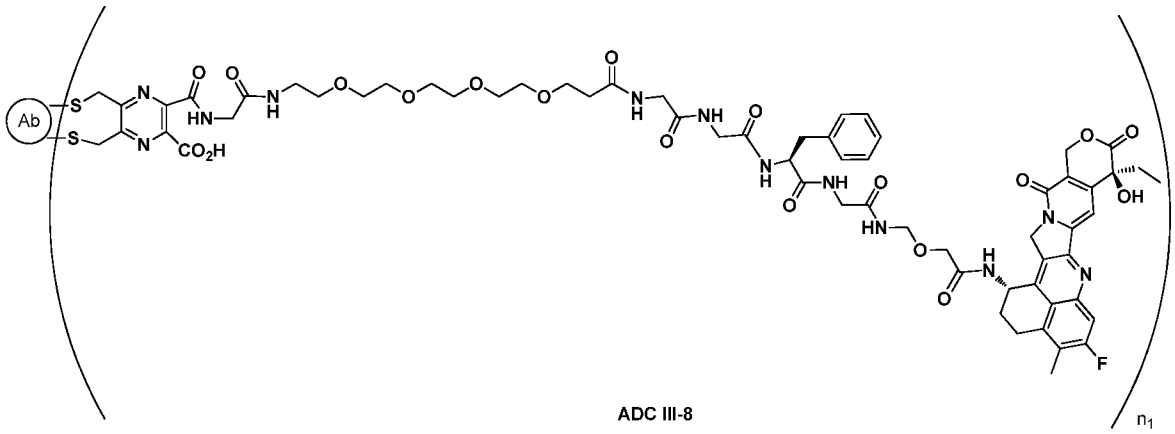
ADC III-5



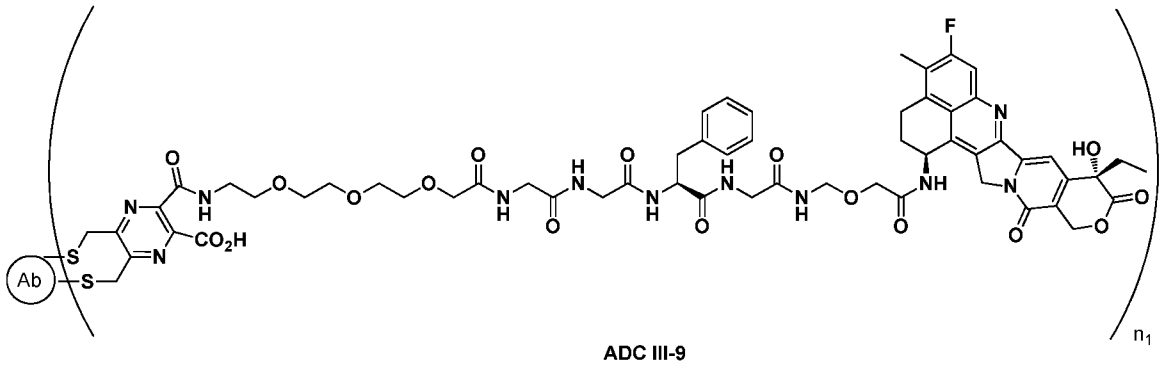
ADC III-6



ADC III-7

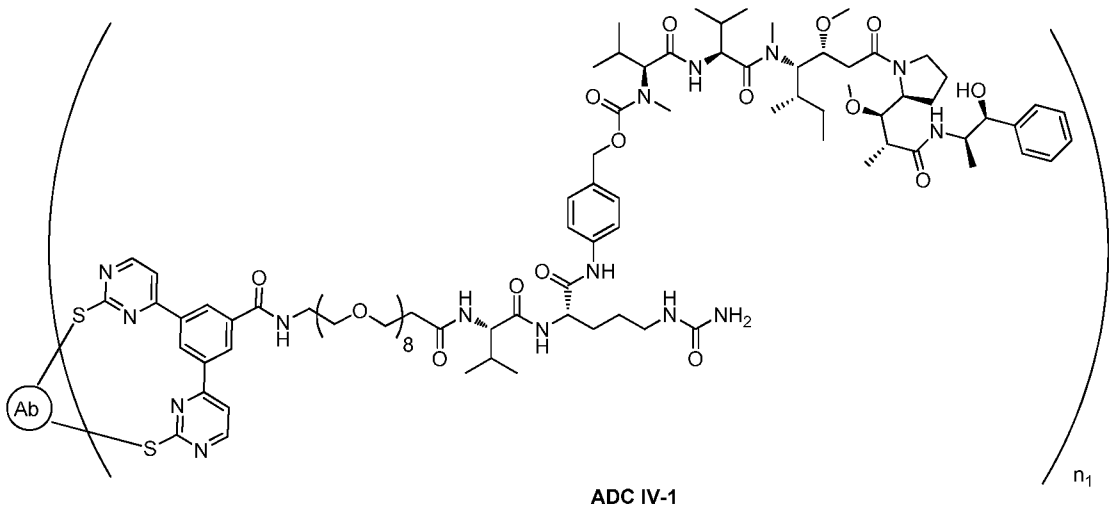


ADC III-8

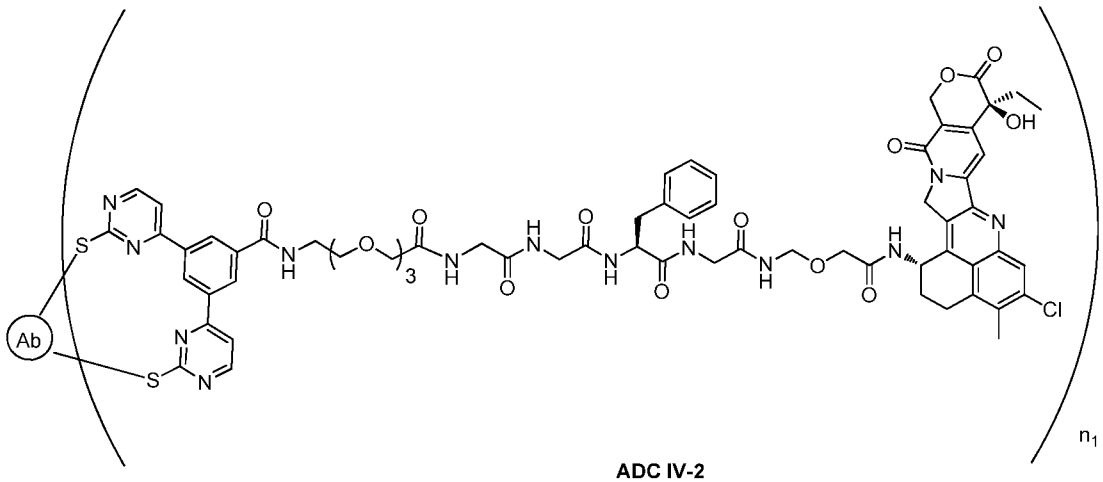


ADC III-9

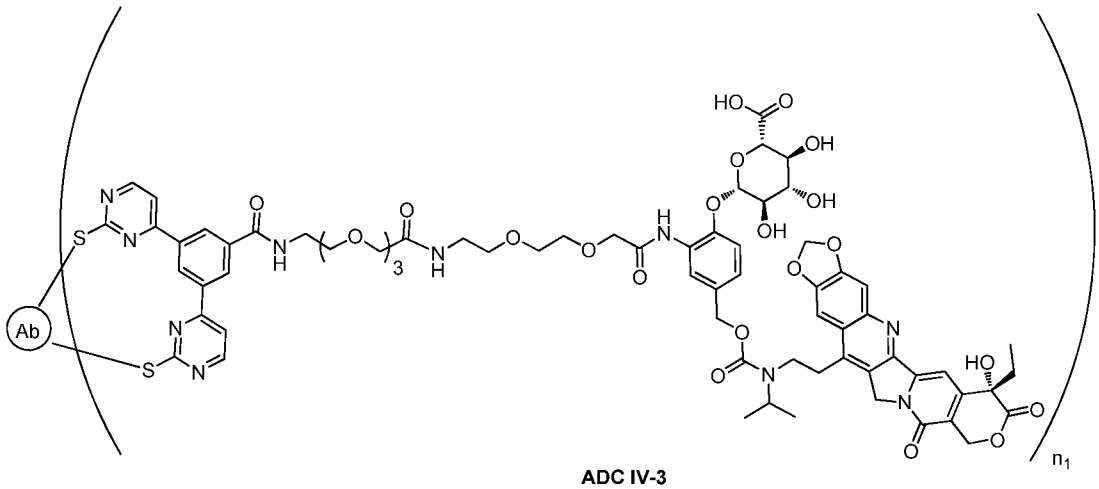
12. 根据权利要求 10 所述生物活性偶联物，其结构如下，其中 Ab 选自 anti-Her2 抗体 trastuzumab 或 anti-Trop2 抗体 sacituzumab 或 anti-ROR1 抗体 19F6_Hu35V1（简称 19F6），n_1为 1-8,优选为 3-5：



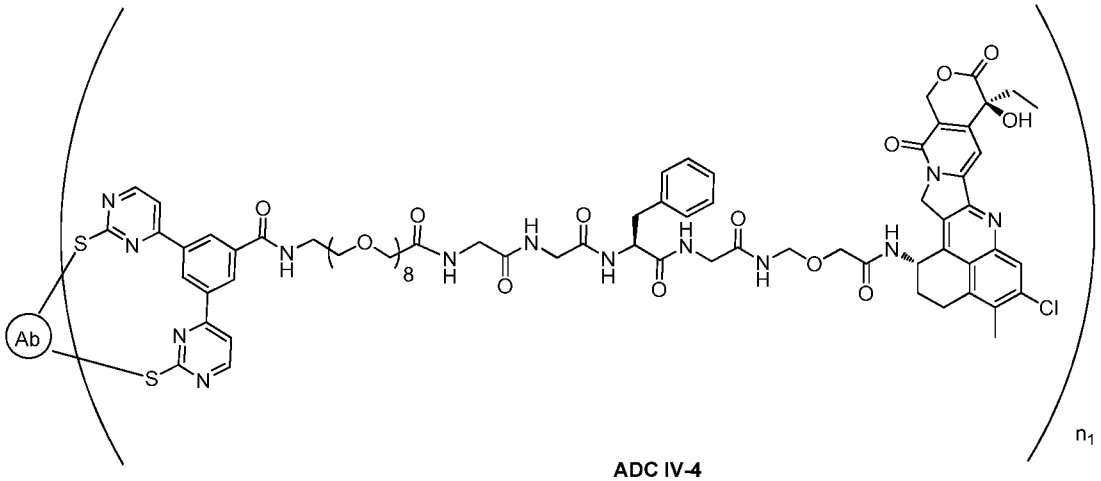
ADC IV-1



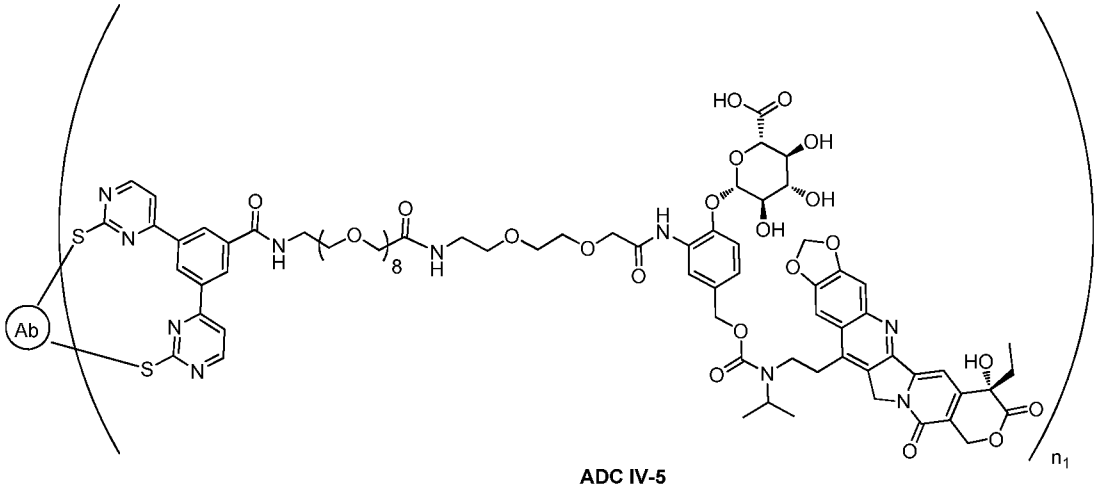
ADC IV-2



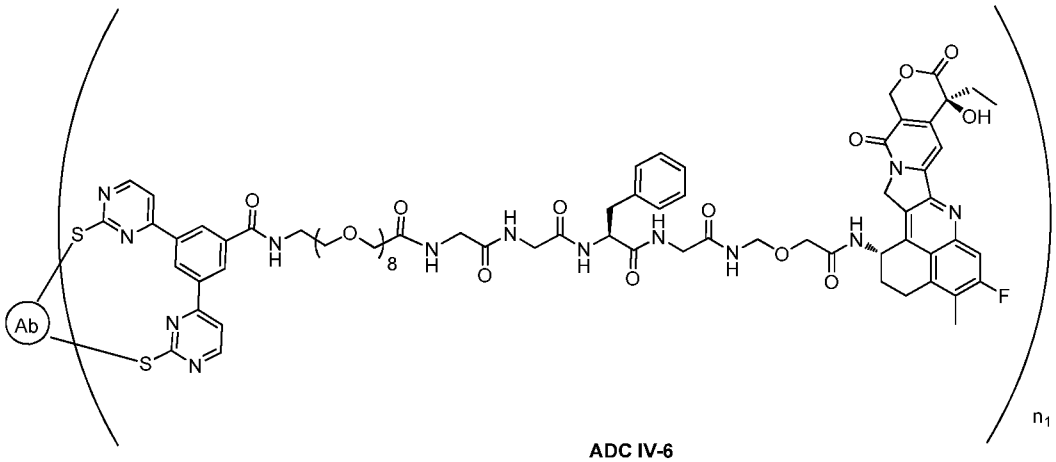
ADC IV-3



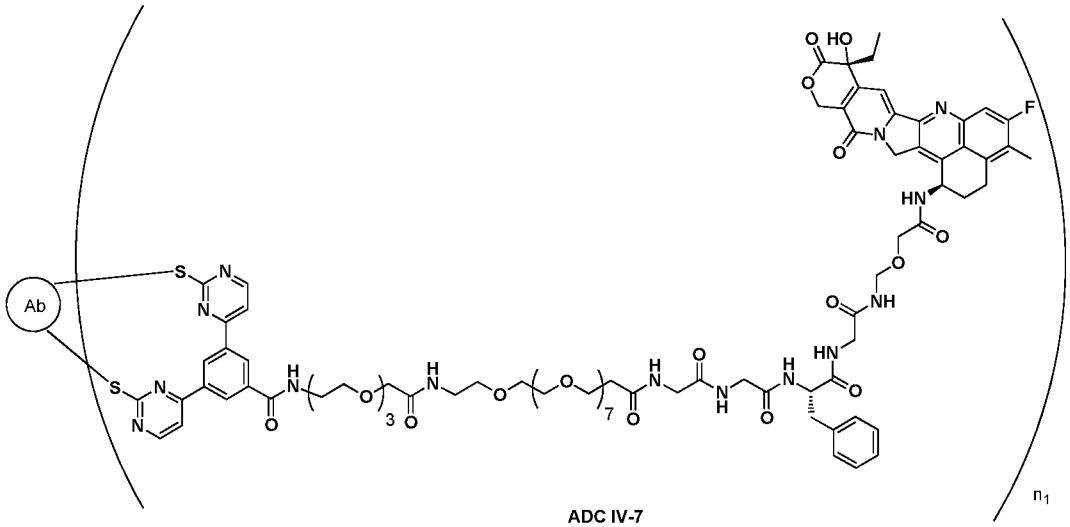
ADC IV-4



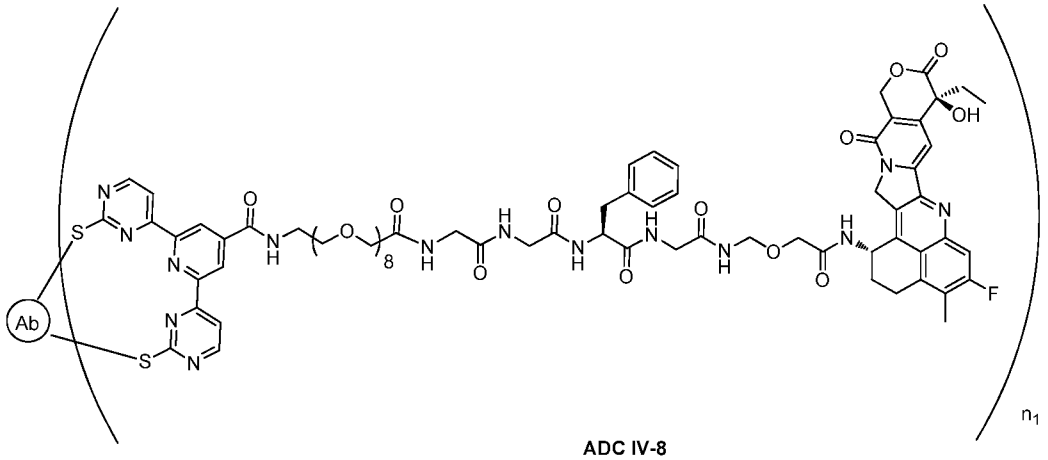
ADC IV-5



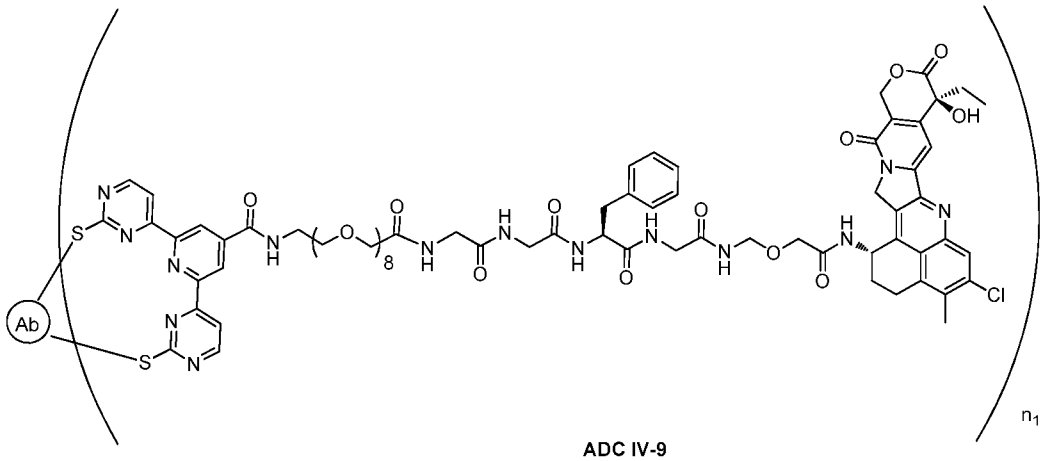
ADC IV-6



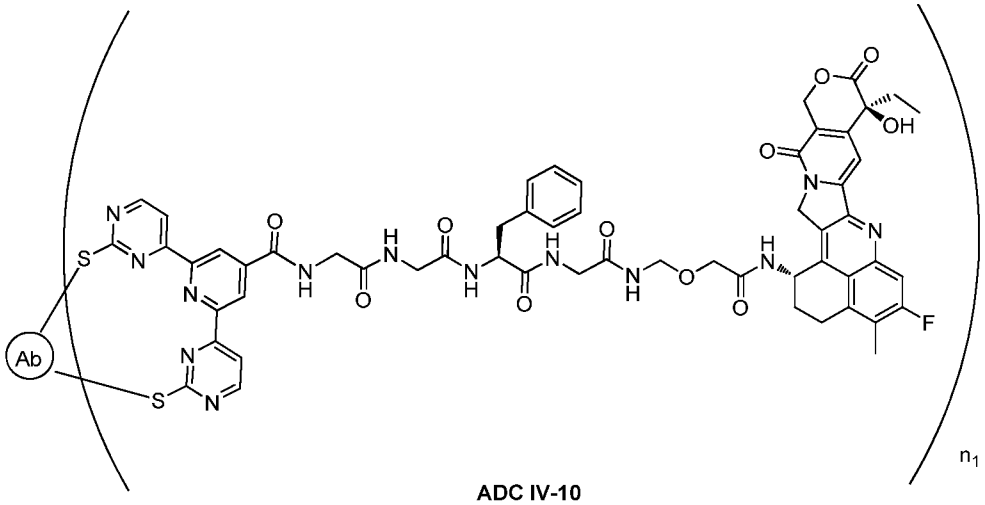
ADC IV-7



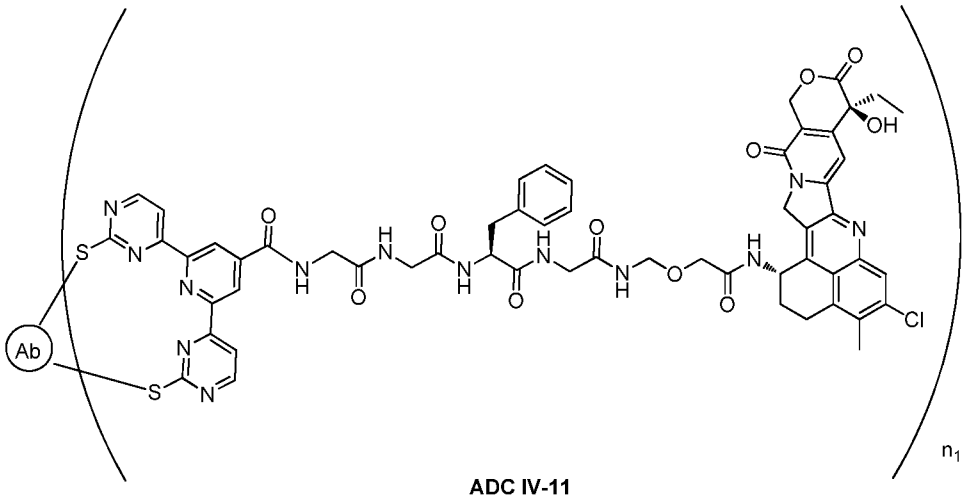
ADC IV-8



ADC IV-9



ADC IV-10



ADC IV-11

。

13. 一种药物组合物，其含有权利要求 5-8 任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物、或权利要求 9-12 任意一项所述的生物活性偶联物，以及一种或多种药用上可接受的载体。

14. 一种药盒产品，其含有权利要求 5-8 任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物、或权利要求 9-12 任意一项所述的生物活性偶联物，或者权利要求 13 所述的药物组合物，以及任选的药品说明书。

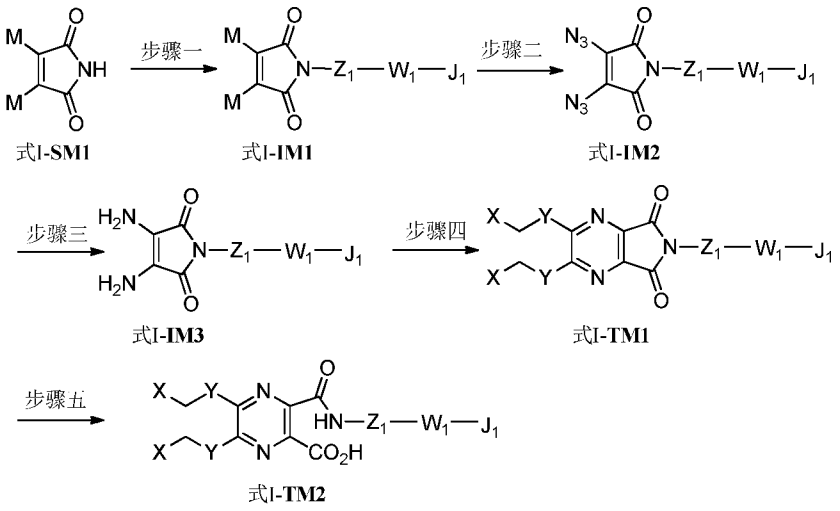
15. 权利要求 5-8 任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物、或权利要求 9-12 任意一项所述的生物活性偶联物在制备用于预防或治疗肿瘤疾病的药物中的用途。

16. 权利要求 5-8 任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、

互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物、或权利要求 9-12 任意一项所述的生物活性偶联物，其用于预防或治疗肿瘤疾病。

17. 一种预防或治疗肿瘤疾病的方法，其包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求 5-8 任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、N-氧化物或同位素标记的化合物、或权利要求 9-12 任意一项所述的生物活性偶联物。

18. 化合物的合成方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

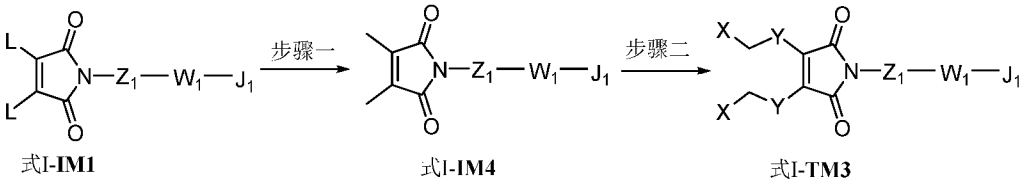


其中：

X、Z_1、W_1、J_1如权利要求 1 所定义；Y 不存在；

M 为发生取代反应的离去基团，包括但不限于卤素、三氟甲烷磺酸酯、对甲苯磺酸酯，优选为卤素；

或者，包括以下步骤：

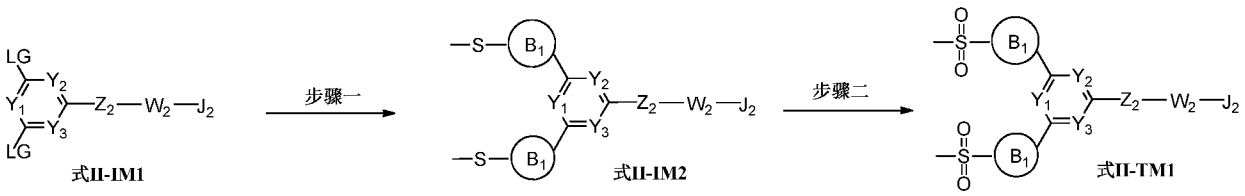


其中：

X、Z_1、W_1、J_1如通式所定义；

L 为发生取代反应的离去基团，包括但不限于卤素、三氟甲烷磺酸酯、对甲苯磺酸酯，优选为卤素、OTf；

或者，包括以下步骤：



式II-IM1 式II-IM2 式II-TM1

其中：

Y_1、Y_2、Y_3、B_1、J_2如通式所定义；

LG 为发生偶联反应的离去基团，包括但不限于卤素、三氟甲烷磺酸酯，优选为卤素。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/094540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 403/14(2006.01)i; C07D 271/107(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 403/-, C07D 271/-, A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNTXT, ENTXT, DWPI, REGISTRY, CAPLUS, MARPAT: 抗体, 偶联, 连接, 吡咯, 吡嗪, 嘧啶, pyrolo, pyrazine, pyrimidine, MMAE, antibody, drug, conjugate, ADC, 根据式II以及按照权利要求2对式I环A进行限定后进行的结构式检索, structural formula search performed according to formula II and after defining a ring A of formula I according to claim 2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109232464 A (SHANGHAI NEWBIO THERAPEUTICS, INC.) 18 January 2019 (2019-01-18) claims 9 and 36-38, embodiment 7, and description, pp. 10, 49, and 50	3, 7, 10, 13-18
PX	US 2022024904 A1 (RESEARCH FOUNDATION OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK et al.) 27 January 2022 (2022-01-27) figures 11, 3, and 19	3
X	US 2993901 A (AMERICAN CYANAMID CO.) 25 July 1961 (1961-07-25) embodiment 5	3
A	CN 103274989 A (NANJING LYNSCI CHEMICAL CO., LTD.) 04 September 2013 (2013-09-04) entire document	1-18
X	SARBISHEH, E. K. et al. "DiPODS: A Reagent for Site-Specific Bioconjugation via the Irreversible Rebridging of Disulfide Linkages" *Bioconjugate Chemistry,* Vol. 31, No. 12, 19 December 2020 (2020-12-19), 2789-2806	3

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 August 2022	**26 October 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"RN 771573-23-0" *REGISTRY*, 29 October 2004 (2004-10-29),	3
X	"RN 849924-85-2" *REGISTRY*, 06 May 2005 (2005-05-06),	3
X	"RN 1040682-15-2" *REGISTRY*, 13 August 2008 (2008-08-13),	3
X	"RN 1171787-85-1" *REGISTRY*, 02 August 2009 (2009-08-02),	3
X	"RN 51859-12-2" *REGISTRY*, 16 November 1984 (1984-11-16),	3
X	"RN 127726-67-4" *REGISTRY*, 22 June 1990 (1990-06-22),	3, 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/094540

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/094540

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 17 relates to a treatment method implemented on a human or animal body by therapy (PCT Rule 39.1(iv)). Nevertheless, a search was still conducted on the basis of the technical subject matter of a use of the compound in the preparation of a drug for preventing and treating a tumor.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/094540

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109232464	A	18 January 2019	US	2021154320	A1	27 May 2021
				WO	2019011078	A1	17 January 2019
US	2022024904	A1	27 January 2022		None		
US	2993901	A	25 July 1961		None		
CN	103274989	A	04 September 2013		None		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/094540

A. 主题的分类

C07D 403/14(2006.01)i; C07D 271/107(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07D 403/-, C07D 271/-, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNKI, CNTXT, ENTXT, DWPI, REGISTRY, CAPLUS, MARPAT, 抗体，偶联，连接，吡咯，吡嗪，嘧啶，pyrolo, pyrazine, pyrimidine, MMAE, antibody, drug, conjugate, ADC, 根据式II以及按照权利要求2对式I环A进行限定后进行的结构式检索。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 109232464 A (上海新理念生物医药科技有限公司) 2019年1月18日 (2019-01-18) 权利要求9，36-38，实施例7，说明书第10，49，50页	3，7，10，13-18
PX	US 2022024904 A1 (UNIV CITY NEW YORK RES FOUND等) 2022年1月27日 (2022-01-27) FIG11，FIG3，FIG19	3
X	US 2993901 A (AMERICAN CYANAMID CO) 1961年7月25日 (1961-07-25) 实施例5	3
A	CN 103274989 A (南京正荣医药化学有限公司) 2013年9月4日 (2013-09-04) 全文	1-18
X	Khozeimeh Sarbisheh, Elaheh; et al. "DiPODS: A Reagent for Site-Specific Bioconjugation via the Irreversible Rebridging of Disulfide Linkages" Bioconjugate Chemistry, 第31卷，第12期，2020年12月19日 (2020-12-19), 2789-2806	3
X	"RN 771573-23-0" REGISTRY, 2004年10月29日 (2004-10-29),	3

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年8月19日	2022年10月26日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 解佳烨 电话号码 62089649

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	"RN 849924-85-2" REGISTRY, 2005年5月6日 (2005 - 05 - 06),	3
X	"RN 1040682-15-2" REGISTRY, 2008年8月13日 (2008 - 08 - 13),	3
X	"RN 1171787-85-1" REGISTRY, 2009年8月2日 (2009 - 08 - 02),	3
X	"RN 51859-12-2" REGISTRY, 1984年11月16日 (1984 - 11 - 16),	3
X	"RN 127726-67-4" REGISTRY, 1990年6月22日 (1990 - 06 - 22),	3，4

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/094540

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109232464	A	2019年1月18日	US	2021154320	A1	2021年5月27日
				WO	2019011078	A1	2019年1月17日
US	2022024904	A1	2022年1月27日		无		
US	2993901	A	1961年7月25日		无		
CN	103274989	A	2013年9月4日		无		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/094540

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/094540

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求17涉及对人体或动物体实施的治疗方法进行处置的方法（细则39.1(iv) PCT）。尽管如此，仍基于所述化合物在制备预防和治疗肿瘤药物中的用途的技术主题进行了检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。