(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120093942 A
(43)申请公布日 2025.06.06

(21)申请号 202510075563.5

(22)申请日 2022.01.25

(66)本国优先权数据
202110178136.1 2021.02.09 CN
202110340806.5 2021.03.30 CN
202110825906.7 2021.07.21 CN
202110825922.6 2021.07.21 CN
202110825932.X 2021.07.21 CN

(62)分案原申请数据
202280003045.7 2022.01.25

(71)申请人 苏州宜联生物医药有限公司
地址 215000 江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区星湖街218号生物医药产业园B3楼101单元

(72)发明人 蔡家强

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 杨春刚 黄革生

(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2017.01)
A61K 47/65(2017.01)
A61K 31/4745(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07D 491/22(2006.01)

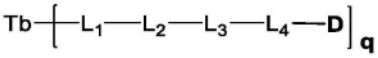
权利要求书9页 说明书413页
序列表（电子公布） 附图11页

(54)发明名称

生物活性物偶联物及其制备方法和用途

(57)摘要

本公开涉及生物活性物偶联物及其制备方法和用途,具体公开了式XV所示的配体药物偶联物、其制备方法,以及其在预防和/或治疗与细胞活动异常相关的疾病,包括但不限于在预防和/或治疗肿瘤疾病中的用途。



式XV

CN 120093942 A

1.一种抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐在制备治疗和/或预防食管鳞状细胞癌的药物中的用途,其中所述抗体-药物偶联物包含下式的抗B7-H3抗体药物缀合物:Ab-(L-D)n,

其中:

Ab是抗体或其抗原结合片段;

D是小分子毒素药物部分;

L是键或连接分子,其共价连接Ab和D;并且

n是1-16之间的整数,且表示共价连接至Ab的L-D的数目;

所述抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区CDR:

(1)VH和VL,其中按IMGT编号系统定义:

所述VH包含:序列包含或为SEQ ID NO:30的HCDR1,序列包含或为SEQ ID NO:31的HCDR2,序列包含或为SEQ ID NO:32的HCDR3;和,

所述VL包含:序列包含或为SEQ ID NO:40的LCDR1,序列为GAS的LCDR2,序列包含或为SEQ ID NO:42的LCDR3;或

(2)VH和VL,其中按chothia编号系统定义:

所述VH包含:序列包含或为SEQ ID NO:24的HCDR1,序列包含或为SEQ ID NO:25的HCDR2,序列包含或为SEQ ID NO:26的HCDR3;和,

所述VL包含:序列包含或为SEQ ID NO:34的LCDR1,序列包含或为SEQ ID NO:35的LCDR2,序列包含或为SEQ ID NO:36的LCDR3;或

(3)VH和/或VL,其中按kabat编号系统定义:

(a)所述VH包含:序列包含或为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列包含或为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列包含或为SEQ ID NO:29的HCDR3;和,

所述VL包含:序列包含或为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列包含或为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列包含或为SEQ ID NO:39的LCDR3;

其中,所述抗体或其抗原结合片段结合人B7-H3和/或猴B7-H3。

2.如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含VH和VL,

其中所述VH

(a)包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

(b)与(a)中的任一VH相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VH;或者

(c)与(a)中的任一VH相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;和/或

其中所述VL

(a)包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

(b)与(a)中的任一VL相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VL;或者

(c)与(a)中的任一VL相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;

优选地,所述抗体或其抗原结合片段包含:

包含SEQ ID NO:23所示序列的VH和/或包含SEQ ID NO:33所示序列的VL;

更优选地,所述抗体或其抗原结合片段包含:

SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL。

3.如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体;

可选地,所述抗体或其抗原结合片段选自scFv、Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、双抗体(diabody)和多特异性抗体;

可选地,所述scFv包含:

(i)SEQ ID NO:1或2所示的序列;

(ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

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

优选地,(ii)中所述的置换是保守置换。

4.如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段进一步包含:

(a)人免疫球蛋白的重链恒定区CH或其变体;和/或

(b)人免疫球蛋白的轻链恒定区CL或其变体,

其中,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;或者,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;优选地,所述的置换是保守置换;

优选地,所述重链恒定区是IgG重链恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区;和/或,所述轻链恒定区是κ或λ轻链恒定区;

更优选地,所述抗体或其抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区;和/或所述抗体或其抗原结合片段包含人κ轻链恒定区;

可选地,所述重链恒定区包括具有SEQ ID NO:43所示的序列的CH或所述CH的变体,所述变体与SEQ ID NO:43相比具有至多20个氨基酸的保守置换例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的保守置换;或者与SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少

90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性;和/或

所述轻链恒定区包括具有SEQ ID NO:44所示的序列的CL或其变体,所述变体与SEQ ID NO:44相比具有至多20个氨基酸的保守置换例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的保守置换,或者与SEQ ID NO:44相比具有至少70％、至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性;

优选地,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:43所示的重链恒定区CH和SEQ ID NO:44所示的轻链恒定区CL。

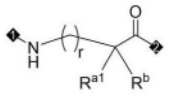
5.如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链,其中,

所述重链包括具有SEQ ID NO:23所示的序列或由所示序列组成的VH和具有SEQ ID NO:43所示的序列或由所示序列组成的CH,和,所述轻链包括具有SEQ ID NO:33所示的序列或由所示序列组成的VL和具有SEQ ID NO:44所示的序列或由所示序列组成的CL;

优选地,所述抗体或其抗原结合片段包括:

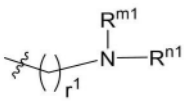
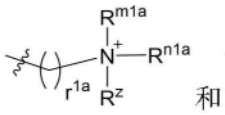
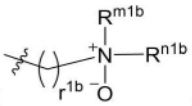
包括SEQ ID NO:47所示的序列或由所示的序列组成的重链和包括SEQ ID NO:48所示的序列或由所示的序列组成的轻链。

6.如权利要求1所述的用途,其特征在于,L包含氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽;所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、或选自AA_1所示氨基酸残基或其立体异构体;



AA^1

AA^1所示的氨基酸残基中:

R^{a1}和R^b各自独立地选自H、  、  和  ;

或者,R^{a1}与R^b和与它们共同相连的碳原子一起形成4-10元杂环,所述的4-10元杂环中,杂原子选自O、N和S中的1个、2个、3个或4个;所述的4-10元杂环任选地被一个或多个R^0所取代;

r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自独立地为0到20的任意整数;

R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b}和R^{n1b}各自独立地为H、C_{1-6}烷基、C_{3-6}环烷基或-$COOR^{x1}$,其中,R^{x1}为C_{1-6}烷基;

或者,R^{m1}和R^{n1}、R^{m1a}和R^{n1a}、以及R^{m1b}和R^{n1b}和与它们共同相连的氮原子一起,形成4-10元杂环,所述的4-10元杂环中,杂原子选自O、N和S中的1个、2个、3个或4个;所述的4-10元杂环任选地被一个或多个$R^{0'}$所取代;

R^z选自C_{1-6}烷基;

R^0、$R^{0'}$各自独立地选自C_{1-6}烷基、C_{3-6}环烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$、任选被C_{1-6}烷基取代的4-10元杂环

基;所述的4-10元杂环中,杂原子选自O、N和S中的1个、2个、3个或4个;

R^{m2}和R^{n2}各自独立地选自H和C_{1-6}烷基;

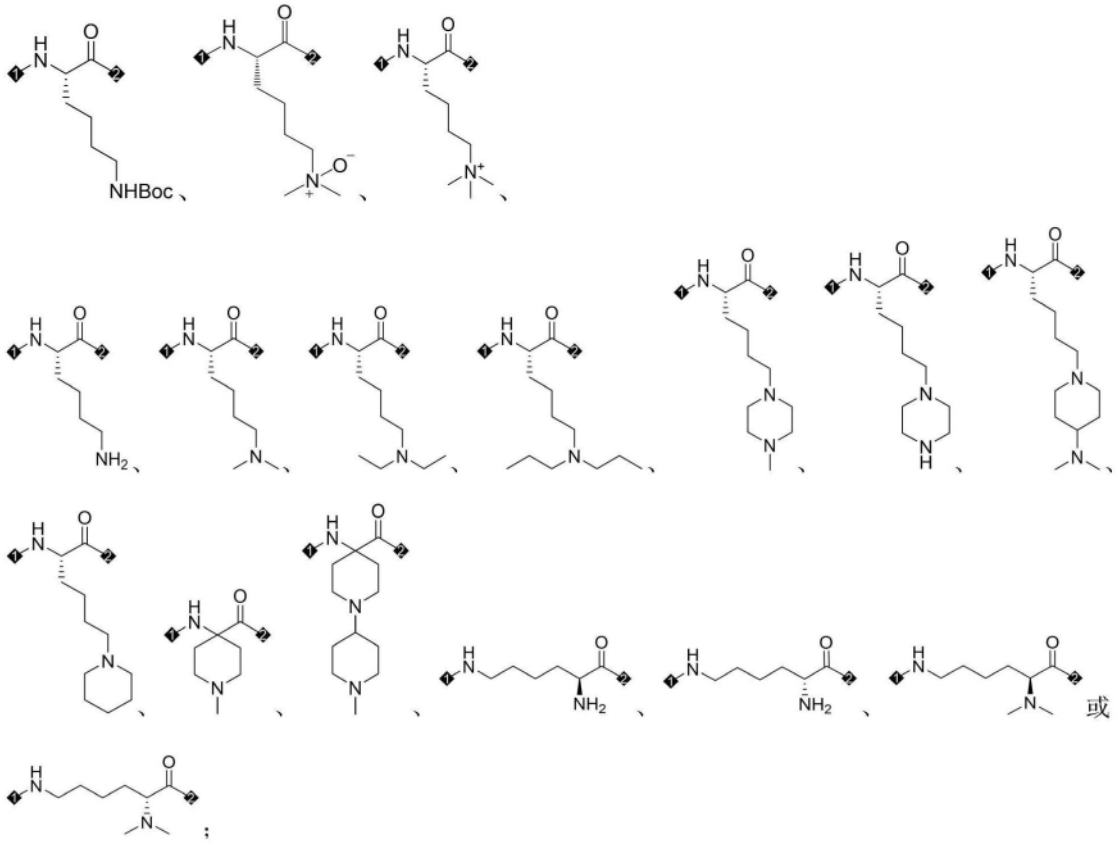
优选地,L包含选自Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1的氨基酸残基或由2-10个选自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1的氨基酸残基组成的短肽;

优选地,L包含Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys和Lys-Ala-Asn;

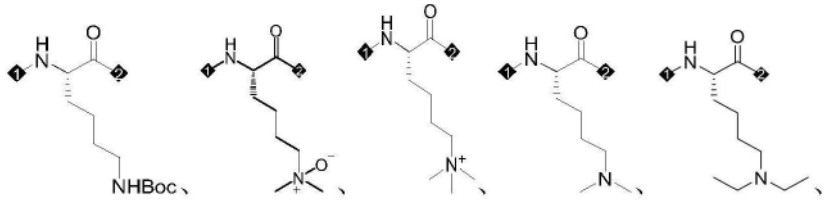
优选地,L包含AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn和Gly-Gly-Phe-Gly;

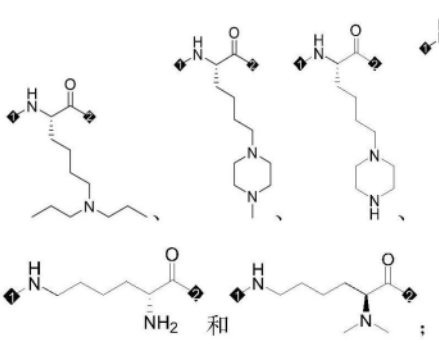
优选地,L包含Val-AA^1-Gly。

7.如权利要求6所述的用途,其特征在于,AA^1所示氨基酸残基为

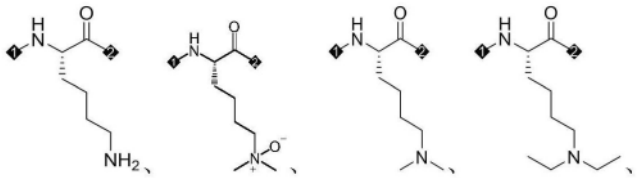


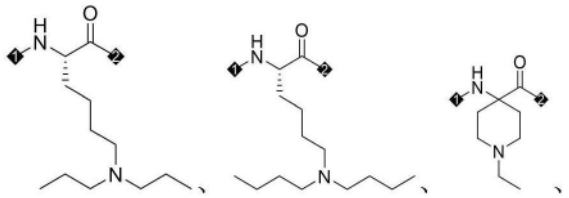
优选地,AA^1所示氨基酸残基选自



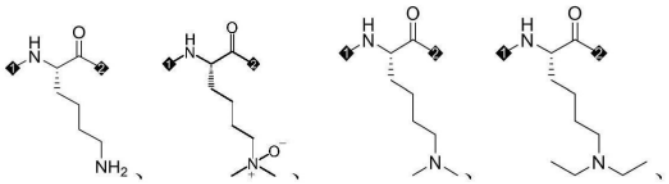


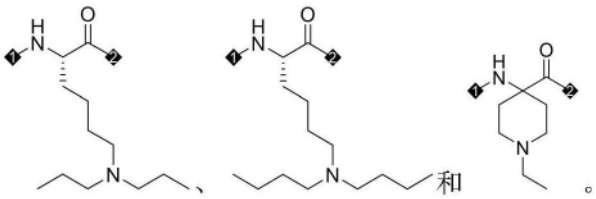
进一步优选地，AA^1所示氨基酸残基选自

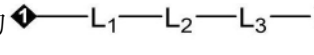




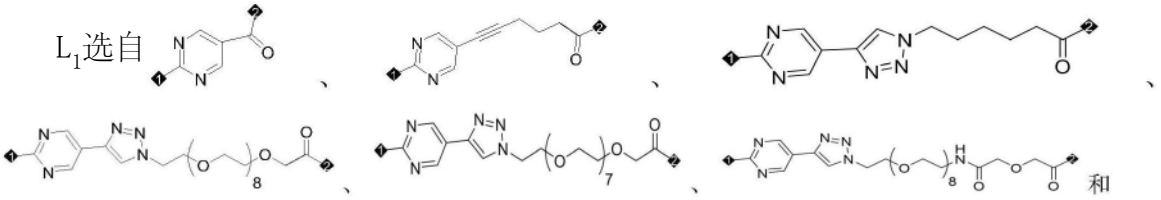
最优选地，AA^1所示氨基酸残基选自

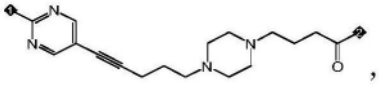




8.如权利要求1所述的用途，其特征在于，L为  ，1位与Ab相连，2位与D相连；

L_1选自

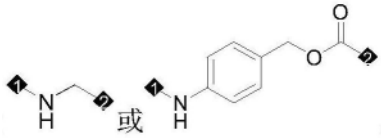


 ，1位通过S原子与Tb相连，2位与L_3相连；L_1优选

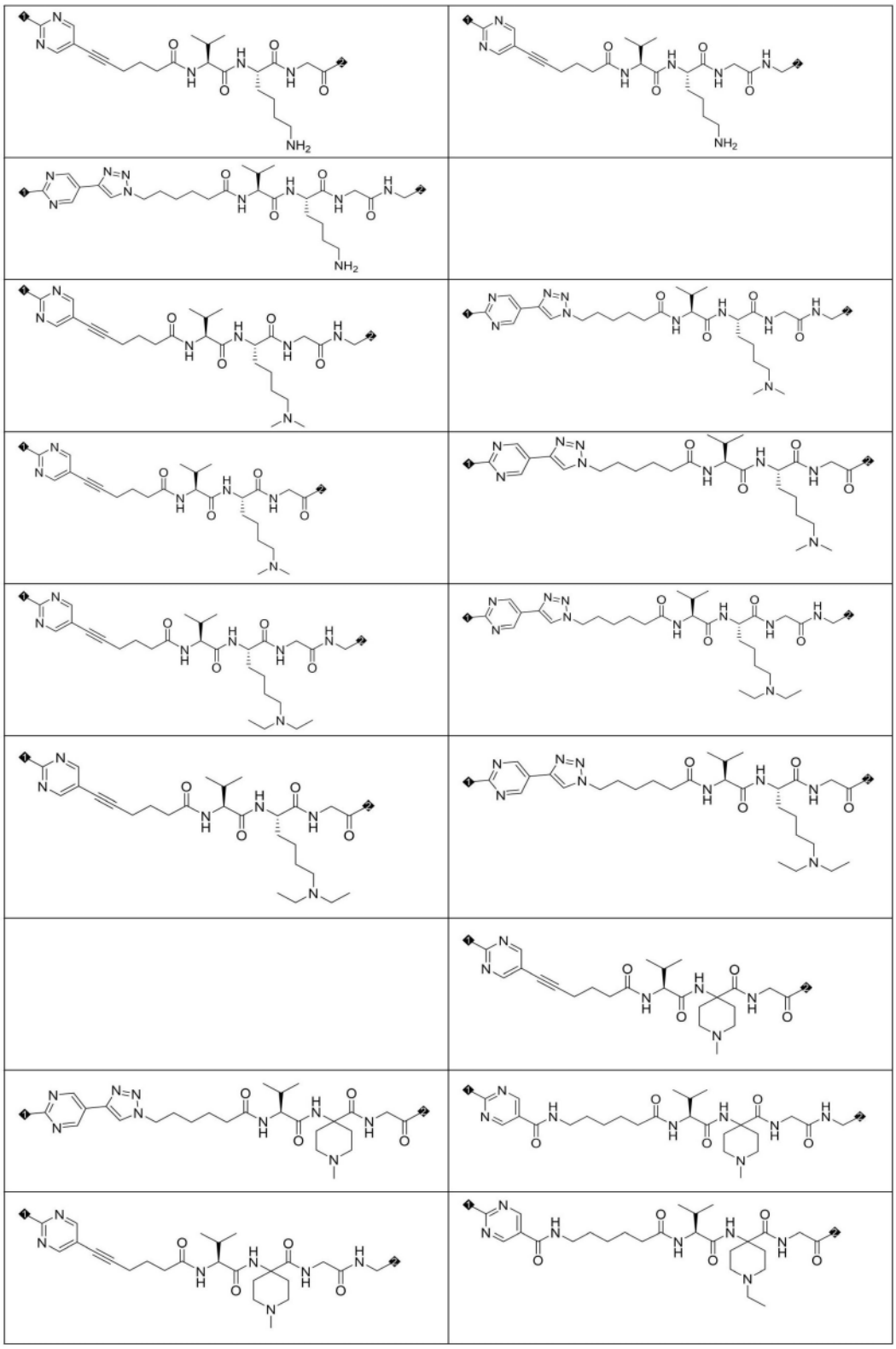
 ，1位与Ab相连，2位与L_2或L_3相连；

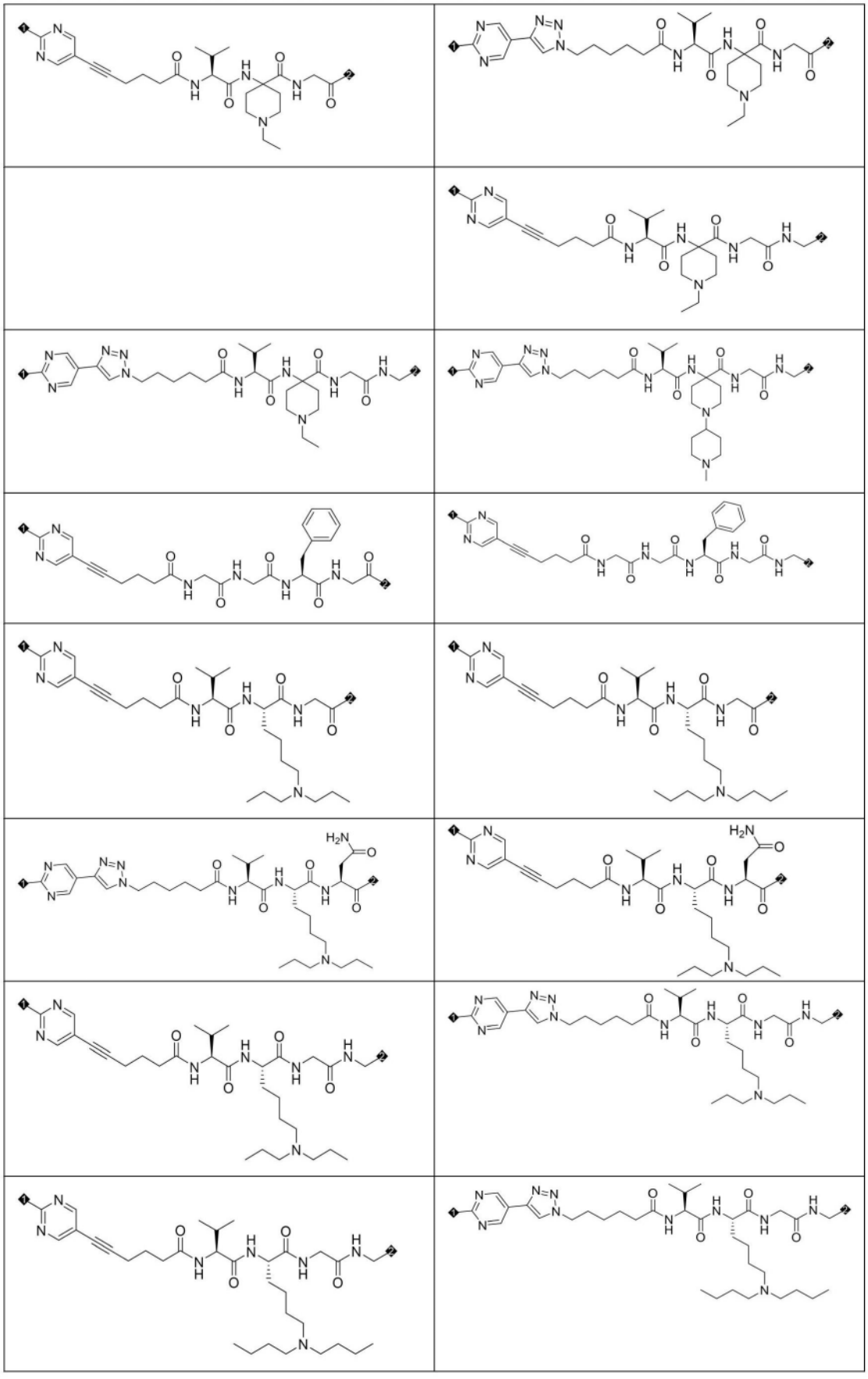
L_2不存在；

L_3选自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe-Gly；

L_4不存在或存在，L_4存在时，L_4为  1位与L_3相连，2位与D相连；

优选地❶—L_1—L_2—L_3—L_4—❷选自：





9.如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗体-药物偶联物的药物选自:微管阻断

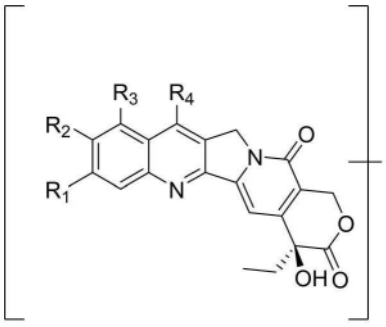
药物,DNA损伤药物,Bcl-xL抑制剂;

优选地,所述抗体-药物偶联物的药物选自:金盏花素Auristatins例如MMAF、MMAE,美登素衍生物例如DM1、DM4,微管溶素,隐粘菌素,抗有丝分裂抑制剂,吡咯苯并氮卓类和吲哚氯苯并氮卓类,杜卡霉素,喜树碱,卡奇霉素;

更优选地,所述抗体-药物偶联物的药物选自喜树碱(CPT)及其衍生物;

更进一步优选地,所述抗体-药物偶联物的药物选自:SN-38,DXd。

10.如权利要求1所述的用途,其特征在于,D为具有式II所示的药物单元:



II

其中,

R_1为H或F,

R_2为H或甲基;

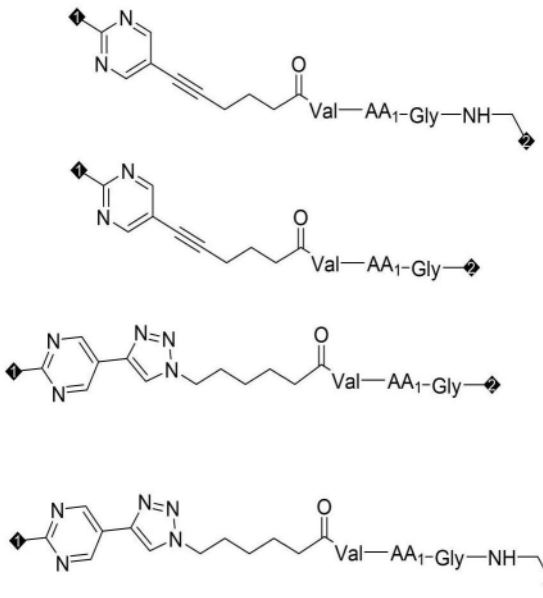
或者R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  ;

R_3为H;

R_4选自H、-(C1-C4烷基)-OH,-(C1-C4烯基)-OH,-(C1-C4烷基)-NH_2,或-(C1-C4烯基)-NH_2;

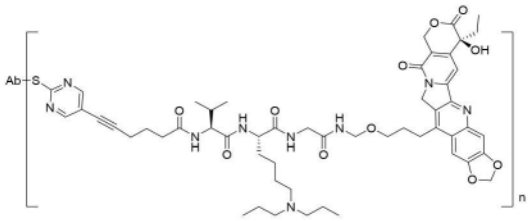
其中L通过D上存在的羟基或胺基链接。

11.如权利要求1所述的用途,其特征在于,L为具有下式所示的连接子:



其中,1位与Ab相连,2位与D相连;AA_1如权利要求10所定义。

12.如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述抗体-药物偶联物选自如下:



n选自2、4、6和8;

Ab包含:

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

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

优选地,所述Ab包含所SEQ ID NO:43所示的重链恒定区CH和SEQ ID NO:44所示的轻链恒定区CL;

更优选地,所述Ab包含:

(a)包括SEQ ID NO:47所示的序列或由所示的序列组成的重链和包括SEQ ID NO:48所示的序列或由所示的序列组成的轻链;或

(b)包括SEQ ID NO:45所示的序列或由所示的序列组成的重链和包括SEQ ID NO:46所示的序列或由所示的序列组成的轻链。

生物活性物偶联物及其制备方法和用途

[0001] 申请人于2022年1月25日提交发明名称为“生物活性物偶联物及其制备方法和用途”的PCT申请PCT/CN2022/073822,所述PCT申请于2022年9月7日进入中国国家阶段,申请号为202280003045.7。本申请为该中国申请的分案申请。

[0002] 本申请要求申请日为2021/2/9的中国专利申请2021101781361的优先权;要求申请日为2021/3/30的中国专利申请2021103408065的优先权;要求申请日为2021/7/21的中国专利申请202110825932X的优先权;要求申请日为2021/7/21的中国专利申请2021108259226的优先权,序列表txt的文件也于2021/7/21与中国专利申请2021108259226同时提交;要求申请日为2021/7/21的中国专利申请2021108259067的优先权,序列表txt的文件也于2021/7/21与中国专利申请2021108259067同时提交。本申请引用上述中国专利申请的全文。本申请包含的序列列表是说明书的一部分,并且本文通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开属于医药技术领域,涉及生物活性物偶联物(配体药物偶联物)、化合物、药物连接体偶联物及其制备方法,以及其在预防和/或治疗与细胞活动异常相关的疾病,包括但不限于在预防和/或治疗肿瘤疾病中的用途。

背景技术

[0004] 利用细胞毒的化疗一度是癌症的标准疗法,但高杀伤力的细胞毒素分子会杀伤正常细胞,引起严重的毒副作用。靶向抗肿瘤药物由于同时具有靶向性和抗肿瘤活性,已成为当今肿瘤研究领域的热点,但经常由于靶向药物的靶点选择性问题产生比较大的毒副作用,从而限制了靶向药物的治疗效果。生物大分子药物,如抗体或抗体片段,虽然靶向性强,但对实体瘤的治疗效果有限,或者根本不具有治疗效果。ADC是抗体和小分子药物的偶联体,融合了抗体的靶向作用和生物活性分子的活性,成为一种生物导弹,具有非常可期待的疗效和安全性优势。抗体引导ADC结合到靶细胞,随后被细胞内化,小分子药物在细胞内通过特定酶作用下发生的酶解释放,治疗疾病。

[0005] ADC药物近几年发展非常迅速,已经上市的ADC有14种:(1)Mylotarg(Gemtuzumab Ozogamicin,吉妥珠单抗(CD33)-卡齐霉素),CD33阳性急性髓性白血病(AML),2000年FDA批准上市,2010年撤市,2017年重新上市;(2)Adcetris(Brentuximab Vedotin,CD30单抗-MMAE),经典霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤,2011年FDA批准上市;(3)Kadcyla(Trastuzumab Emtansine,曲妥珠单抗(Her2)-美登素生物碱TM1),HER2阳性乳腺癌,2013年FDA批准上市;(4)Besponsa(Inotuzumab ozogamicin,CD22单抗-卡奇霉素),成人复发或难治性B细胞淋巴细胞白血病,2017年批准上市;(5)Lumoxiti(Moxetumomab pasudotox-tdfk,CD22-假单胞菌外毒素),复发性或难治性毛细胞白血病(HCL),2018年上市;(6)Polivy(Polatuzumab vedotin-piiq,CD79b-MMAE),复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(R/R DLBCL),2019年上市;(7)Padcev(Enfortumab vedotin-ejfv,Nectin4-MMAE),局部晚期或转移性尿路上皮癌(UC),2019年上市;(8)Enhertu(Famtrastuzumab deruxtecan-

nxki,Her2-拓扑异构酶I抑制剂),乳腺癌,2019年上市;(9)Trodelvy(Trop2-拓扑异构酶I抑制剂ADC),三阴乳腺癌,2020年4月FDA批准上市;(10)BCMA ADC Belantamab mafodotin (GSK2857916);(11)CD19 ADC Zynlonta(loncastuximab tesirine);(12)EGFR ADC Akalux;(13)Her2ADC维迪西妥单抗RC48;(14)Tissue Factor ADC Tivadak(tisotumab vedotin)。

[0006] ADC药物由抗体、生物活性分子(药物分子)及连接体(Linker)三部分组成。生物活性分子通过连接体共价偶联到抗体上。除了靶向性和生物活性,生物活性分子与抗体的偶联方式也是ADC药物的核心之一,其决定了药品的均一性和稳定性,极大地影响ADC的药代动力学性质和毒性等。生物活性分子与抗体连接部分的稳定性的提高,会增加ADC体循环稳定性,减少药物在非靶向组织的脱落,从而相对增加了带入靶细胞内和靶细胞附近周围的药物,增加生物活性分子在靶细胞内及附近的释放量,可以进一步的增效减毒。因此,增加生物活性分子与抗体连接稳定性是ADC药物研究中极为重要的技术领域之一。

[0007] 目前上市的10种ADC抗体和连接体的偶联方式主要有两种:(1)赖氨酸是抗体中最常见的连接位点,其ε-氨基可以与连接体的活化羧基反应,形成酰胺键。目前已有可以实现定点偶联的技术,即以活化基团活化链接子的羧基,再与抗体中特定的赖氨酸ε-氨基形成酰胺键,完成偶联。一方面,通过此类酰胺键实现定点定量偶联还不具有广谱实用性,只能在某些特定情况下使用;另一方面,在体内酶的作用下,易发生水解,导致生物活性分子与抗体在未达到靶细胞时即发生脱落,增加了毒性。(2)抗体半胱氨酸的巯基(SH),都是以二硫键的形式存在。打开抗体中的二硫键,可以提供多个自由的巯基作为偶联位点。与抗体巯基进行偶联,一种方法是抗体上自由的巯基与马来酰亚胺发生Michael加成反应,也可以是特定的底物与抗体上自由的巯基通过两次Michael加成反应,形成一个结构独特的硫桥键。但有较多文献报道,通过巯基Michael加成方法得到的ADC,会有30%或更多的ADC在体循环中发生逆Michael加成,产生毒素提前脱落而发生毒性反应。

[0008] 抗体偶联药物根据发展历程可以分为四代:

[0009] 第一代抗体偶联药物是基于鼠源抗体,这类抗体由于可以产生复杂的免疫原性,从而具有很强的毒副作用;

[0010] 第二代抗体偶联药物是在第一代的基础上使用人源化或全人源抗体,第二代抗体偶联药物的成药性质得到了巨大改善。第一代和第二代抗体偶联药物在抗体和药物的连接上是相对随意的,因而最终抗体偶联药物产品为一个多组份混合物,这类药物不但毒性大,其质量也难以控制;

[0011] 第三代抗体偶联药物在使用人源化或全人源抗体的基础上,同时实现毒素-连接子(linker)和抗体的定点-定量偶联,从而生成均一性的单分子抗体偶联药物,这类抗体偶联药物的毒性和质量控制比第二代抗体偶联药物有很大改进;

[0012] 第四代抗体偶联药物是在第三代的基础上,对毒素-连接子(linker)进行了革新。第四代抗体偶联药物一改过去以高毒性毒素为基础的抗体偶联药物策略,选用相对低毒性的喜树碱类分子作为生物活性成分,同时采用高毒素-抗体比(DAR),如DAR值8,这类ADC对肿瘤表面抗原低表达的肿瘤也能产生很好的治疗效果。第四代抗体偶联药物尽管起步晚,但由于其显著的疗效,异军突起,很快获得了临床认可,其代表性药物Enhertu和Trodelvy已被FDA批准上市。但目前第四代ADC依然存在稳定性差或溶解度低的问题,已有技术缺乏

普适性,仍然需要进一步开发新的毒素-linker来解决这些问题。

[0013] 已有的抗体偶联药物一般是通过ADC中的抗体和肿瘤细胞表面抗原结合,然后发生细胞内吞进入核内体(endosome),再从核内体向溶酶体转化,然后在溶酶体中水解酶的作用下将生物活性分子(毒素或payload)从ADC解离下来,解离下来的生物活性分子从溶酶体进入胞浆后杀伤肿瘤细胞,从杀伤肿瘤细胞后逃逸的生物活性分子可以进一步杀伤其周围抗原不表达或低表达的肿瘤细胞(即所谓的旁观者效应,by-stander effect)。在这整个过程中,任何一个环节的变化都可以使ADC产生耐药性而失去治疗效果,如治疗过程中抗原表达发生变化,内吞减弱甚至失去内吞,核内体或溶酶体功能发生变化等等。因此寻找一种能在体内血液循环体系中稳定的ADC、同时这种ADC又能在肿瘤微环境中不需要细胞内吞而产生胞外裂解将毒素解离脱落来杀伤肿瘤,这种ADC将能克服传统ADC存在的多种耐药机制,因而在临床治疗上将具有非常重大的意义。

[0014] 尽管有证据表明Immunomedics和Gilead的Trodelvy可以不需要内吞而在肿瘤细胞外裂解,但由于Trodelvy在血浆和水溶液中非常不稳定,其血浆半衰期小于24小时,因而这类ADC只能用于生物活性低的毒素组成的ADC去避免ADC毒素提前脱落产生的非靶向毒副作用。

[0015] 此外传统ADC的连接子的功能是完成细胞内的酶切或利用其调节水溶性等,如何能让连接子在满足酶切要求的同时,利用连接子实现ADC在肿瘤组织中的富集,对降低ADC在正常组织中的毒副作用也具有重要意义。

[0016] 另外,B7H3为B7家族的I型跨膜蛋白,在人体中具有两种同种型2Ig-B7H3和4Ig-B7H3。B7H3在正常组织中广泛的表达,仅组成型表达于非免疫静息期纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞和羊水干细胞,诱导性表达于活化的T、NK、DC和巨噬细胞上,未在淋巴器官检测到阳性表达(Chapoval,A.I.,et al.,B7H3:A costimulatory molecule for T cell activation and IFN production.Nature Immunology,2001.2(3):p.269-274)。研究表明,约76.5%的早期肝癌患者血清中的B7H3较正常人高3倍左右(60.79±19.45Vs 20.52±8.46ng/mL),但与疾病进程的相关性尚不清(Zhao,L.,et al.,Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatocirrhosis by Soluble B7H3.Journal of Gastrointestinal Surgery.21(5):p.807-812)。

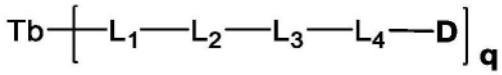
[0017] 目前,临床前研究中有针对B7H3靶点的治疗策略。例如,针对小鼠B7H3的抗体将增强肿瘤中浸润的CD8阳性T细胞并抑制肿瘤生长(Mod Pathol.2010Aug;23(8):1104-12.)。此外,WO2008/066691显示识别B7H3变体B7H3a的抗体在体内对腺癌具有抗肿瘤作用。在临床研究中,小鼠B7H3抗体和放射性碘131的结合药物可以显著抑制患者神经母细胞瘤的生长[Jneufoocol 97(3):409-18(2010)]。

发明内容

[0018] 为了改进抗体药物偶联物(ADC)或其它配体药物偶联物(PDC)的治疗效果,降低药物毒副作用,提高治疗窗口,本公开提供一种式(XV)所示的配体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其含有生物活性分子(药物分子)、连接体和靶向部分,所述靶向部分通过活性基团(例如巯基)与所述连接体连接形成配体药物偶联物。本公开还开发了包含结合B7H3分子的可变轻链结构域和/或可变重链(VH)结构域,所述可变轻链结构域和/或可变

重链(VH)结构域抗体已经来自人源抗体。

[0019] 为此,在本公开的第一方面,本公开提供了式XV所示的配体药物偶联物,

[0020] 

式XV

[0021] 或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,

[0022] 其中:

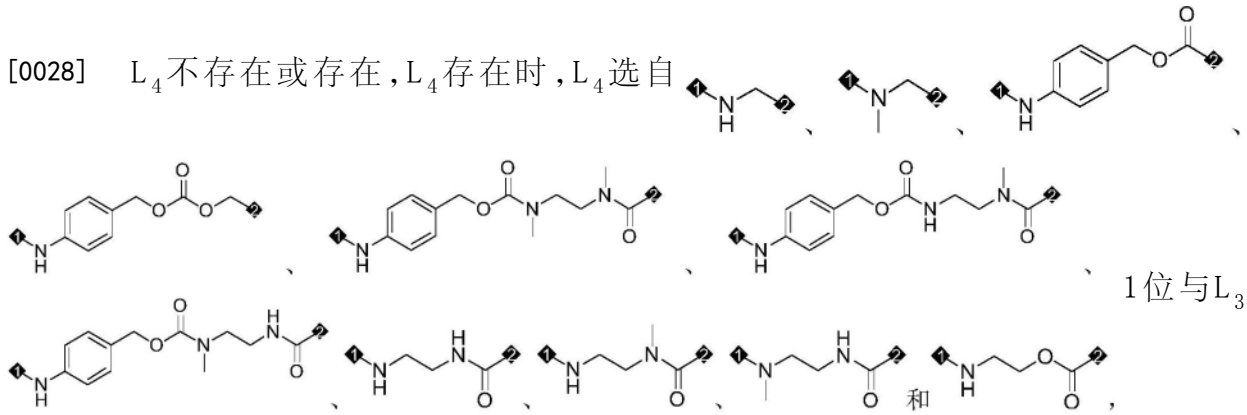
[0023] Tb为和靶点结合的配体或靶向部分;

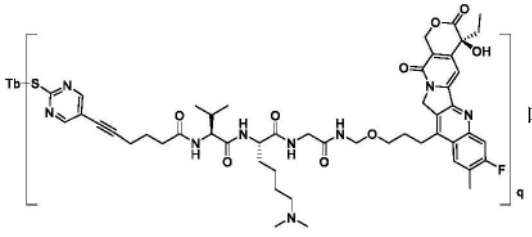
[0024] q为药物配体偶联比;

[0025] D为生物活性分子片段;

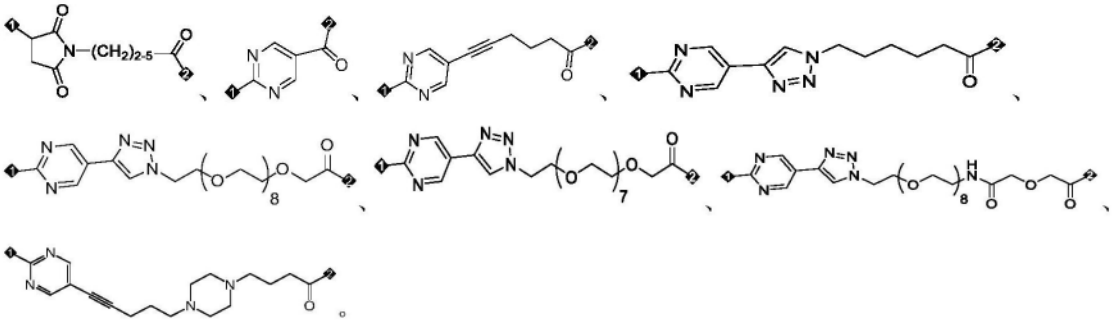
[0026] L_1为延伸单元;

[0027] L_2不存在或为连接单元;L_3选自氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽;

[0028] L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4选自  1位与L_3相连,2位与D相连。

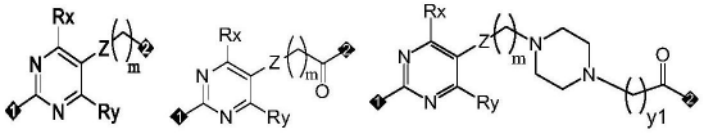
[0029] 另外,还需要说明的是,对于"L_1的1位通过S原子与Tb相连",本领域技术人员可以理解的是,L_1的1位是与打开二硫键(例如,通过还原剂TCEP还原二硫键可以打开二硫键,生成巯基-SH)后的Tb(如抗体)自身所含有巯基进行连接,也就是说,L_1与Tb之间的-S-并非另外再外接的硫原子。例如,  中,-S-并非另外外接的硫原子,而是打开双硫键后的Tb自身所含有巯基与L_1例如  的1位进行连接后形成的-S-。

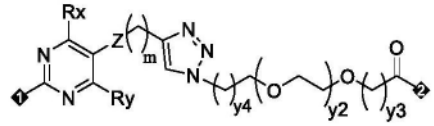
[0030] 延伸单元为配体药物偶联物或药物连接体偶联物或连接子的组分,其作用是将和靶点结合的配体或靶向部分与配体药物偶联物的其余部分或连接子的其余部分相连。延伸单元能够将Tb单元连接于L_2(如果存在)或L_3,具体实例包括但不限于(其中1位与靶点结合的配体或靶向部分相连、2位与L_2或L_3相连):

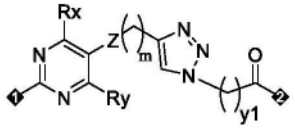


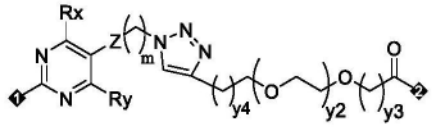
[0031] 在一些实施方案中,L_1选自:

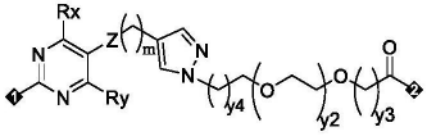
[0032]

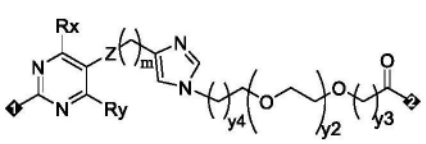


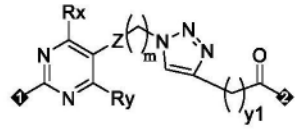


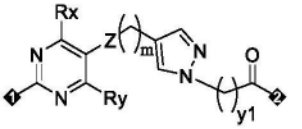


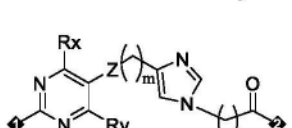




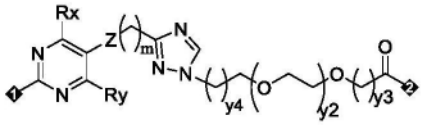


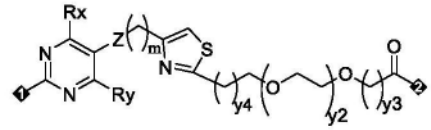


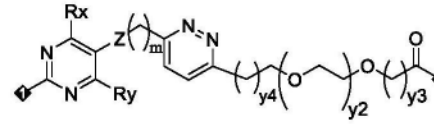


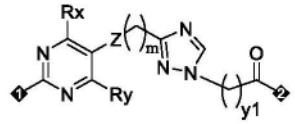


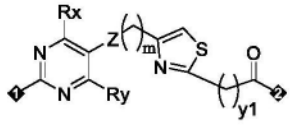
[0033]

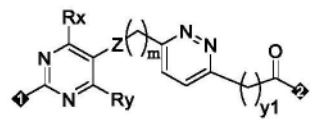




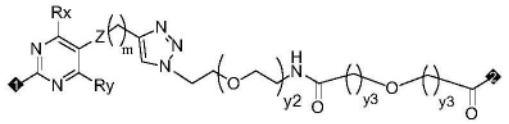
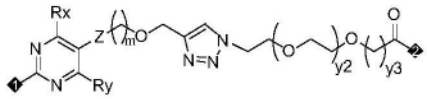
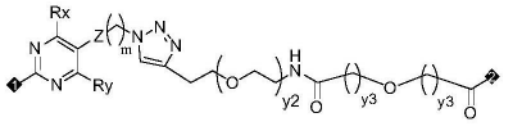
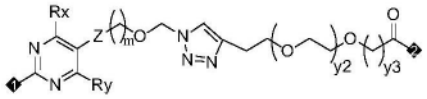
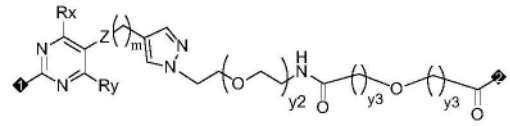
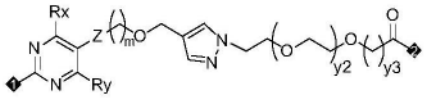
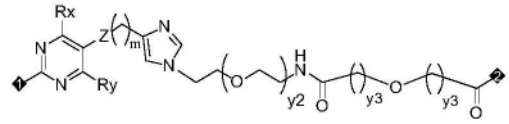
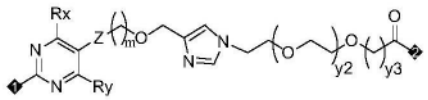
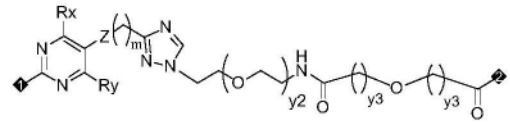
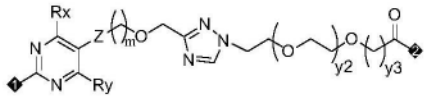
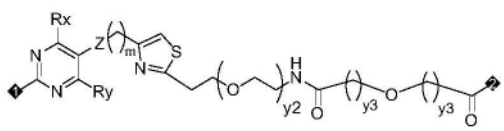
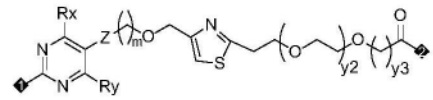
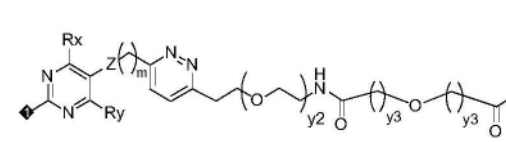
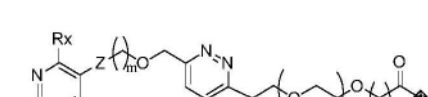


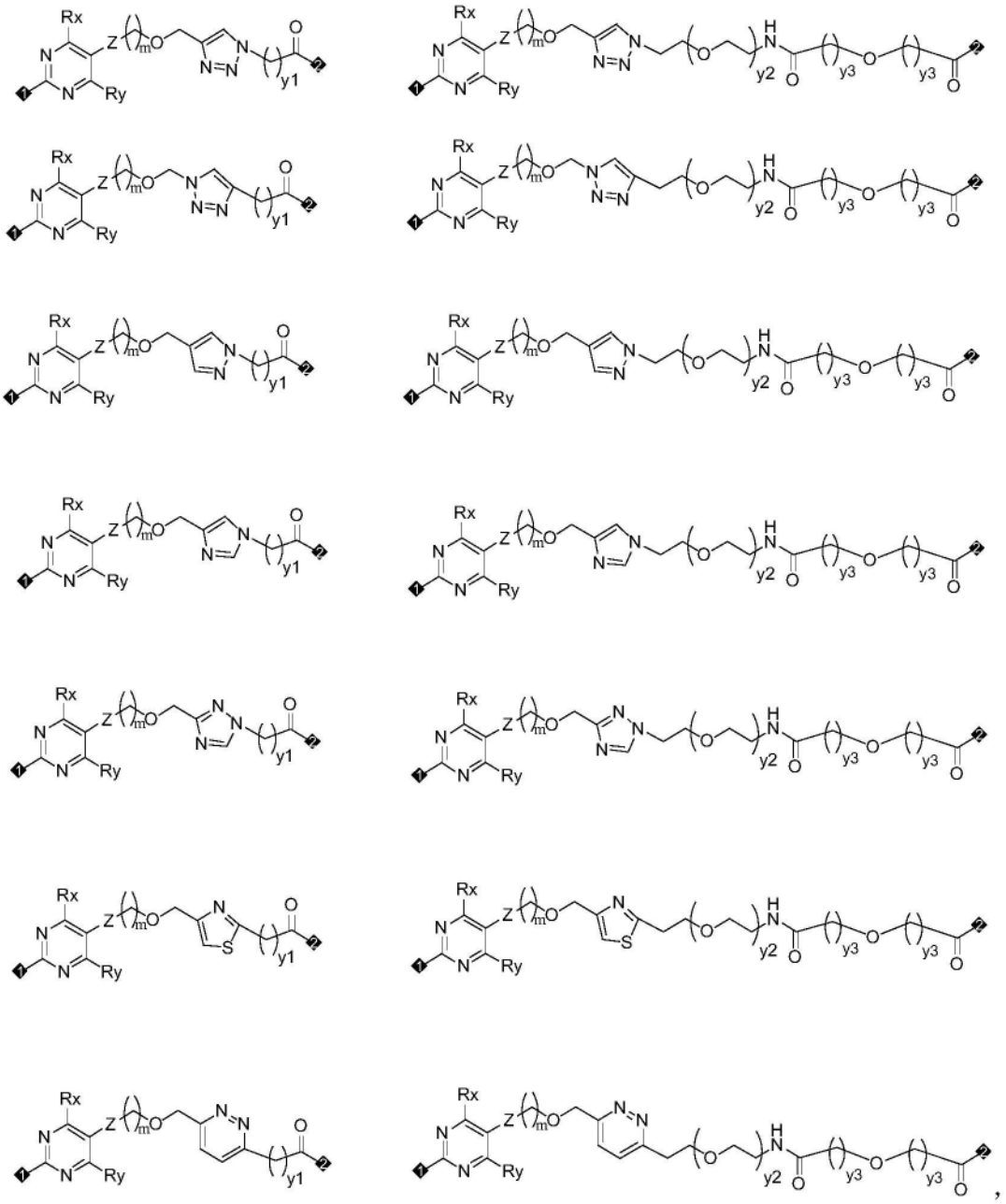






[0034]

[0035] 

[0036] 各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10芳基、5-10元杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、亚胺基和CF_2；

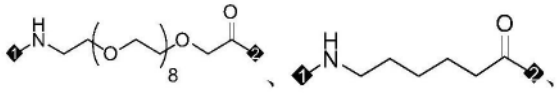
[0037] Rx和Ry独立地选自H和C1-4烷基；

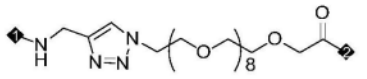
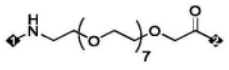
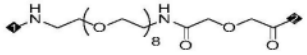
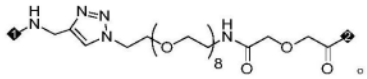
[0038] 各m独立地选自0、1、2、3、4、5和6；

[0039] y1、y2、y3和y4独立地选自0-20之间的任意整数；

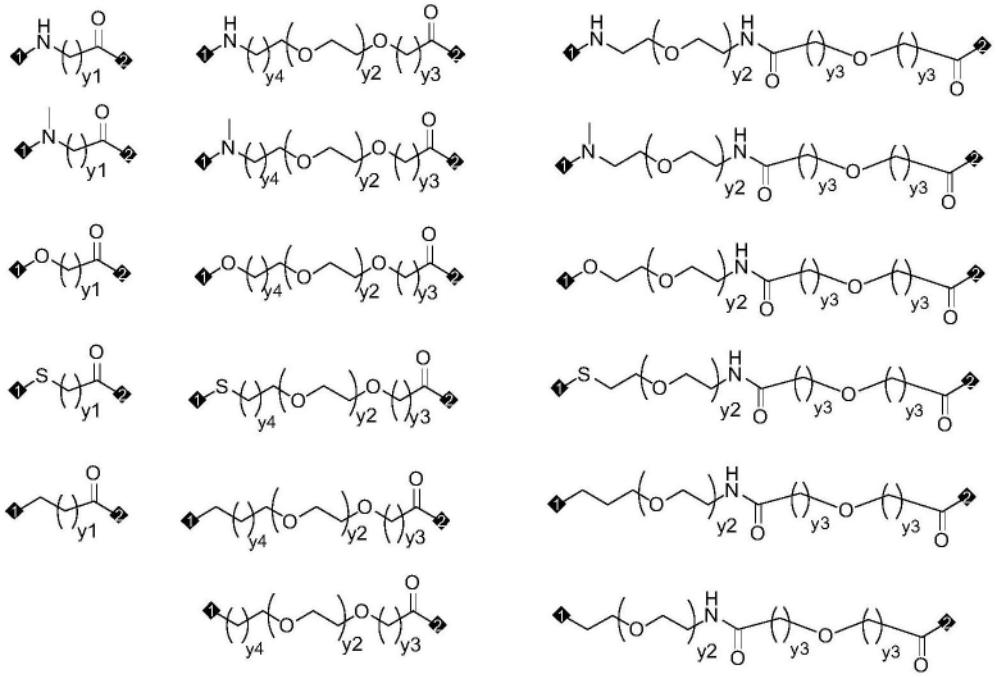
[0040] 1位通过S原子与Tb相连，2位与L_2或L_3相连。

[0041] 连接单元为配体药物偶联物或药物连接体偶联物或连接子的组分，其作用是用来结合延伸单元与氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽。连接单元存在时能够将L_1连接于L_3。具体实例包括但不限于（其中1位与延伸单元相连、2位与L_3相连）：

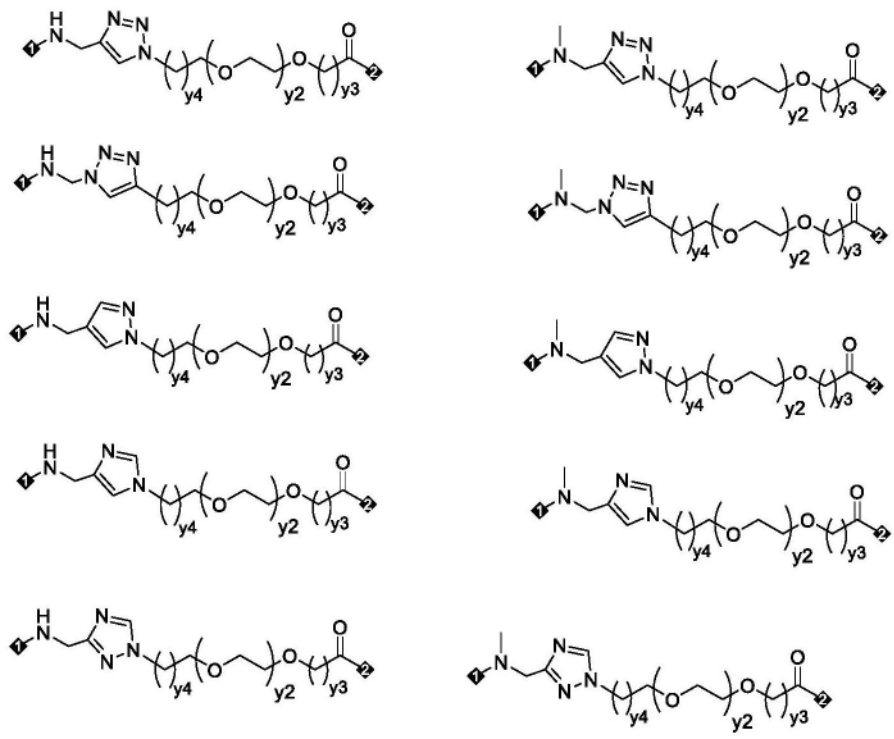



、

、

和

。

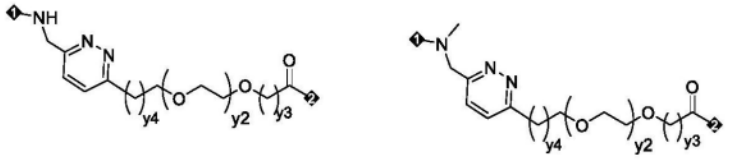
[0042] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自：



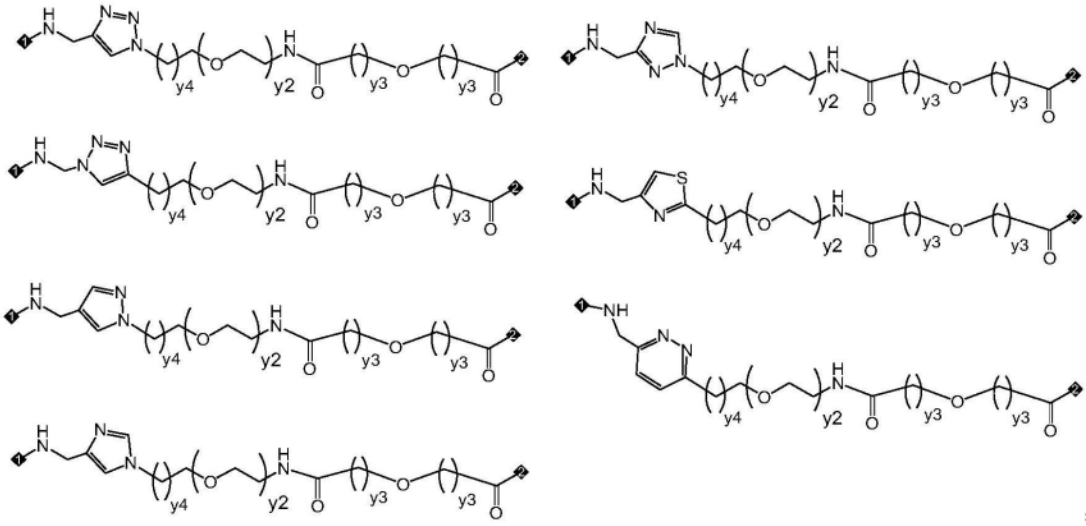
[0043]





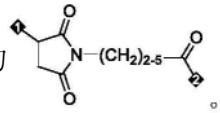


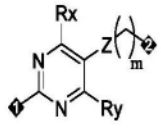
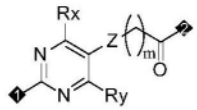
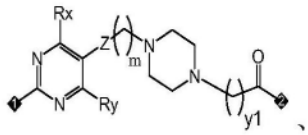
[0044]

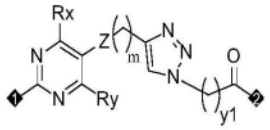
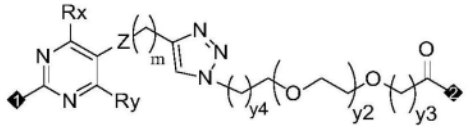


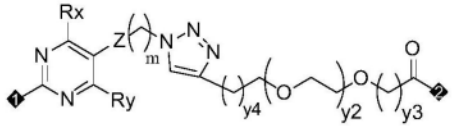
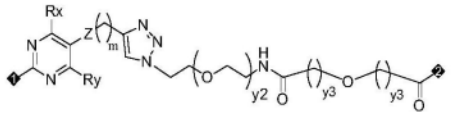
,

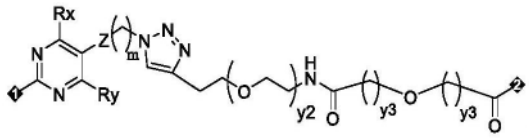
[0045] y1、y2、y3和y4独立地选自0-20之间的任意整数,1位与L_1相连,2位与L_3相连。

[0046] 在一些实施方案中,L_1为  。

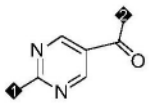
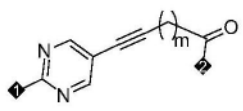
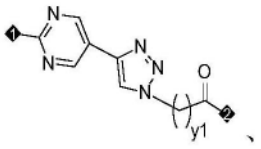
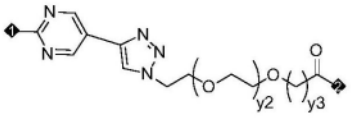
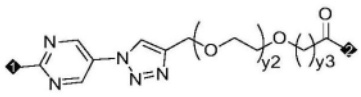
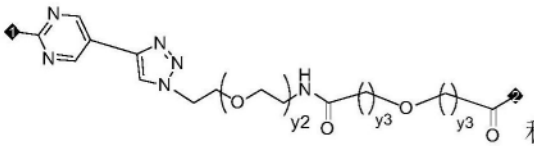
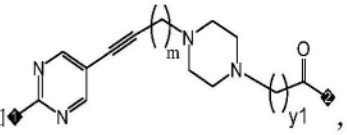
[0047] 在一些实施方案中,L_1选自  、  、  、

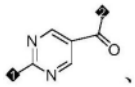
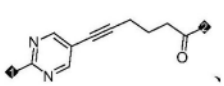
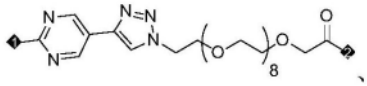
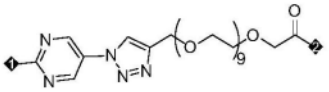
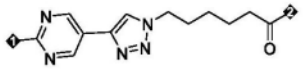
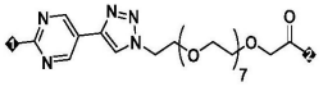
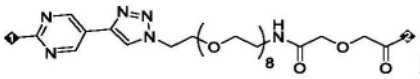
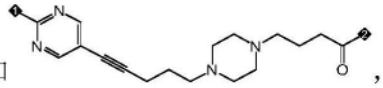
 、  、

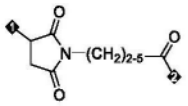
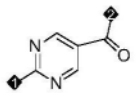
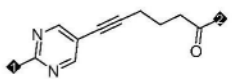
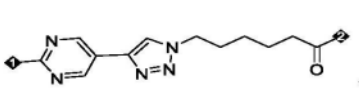
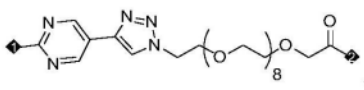
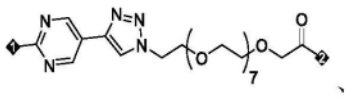
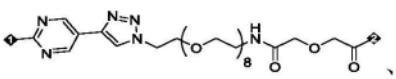
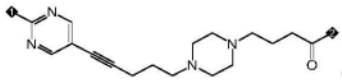
 、  和

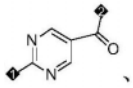
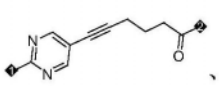
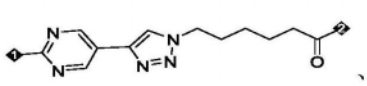
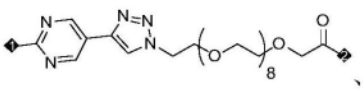
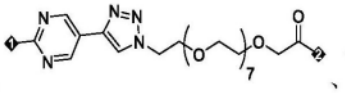
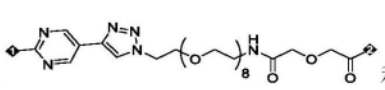
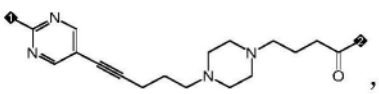
 ,

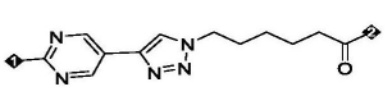
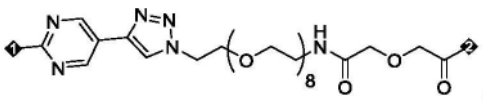
各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10芳基、5-10元杂芳基和酰胺基(优选选自直接键、碳碳三键、碳碳双键);Rx、Ry独立地选自H和C1-4烷基;各m独立地选自0、1、2、3、4、5和6;y1选自1-6之间任意整数(如4、5、6);各y2独立地选自0-15(如6-15)之间任意整数;各y3独立地选自1、2和3;各y4独立地选自0和1;1位通过S原子与Tb相连,2位与L_2或L_3相连。

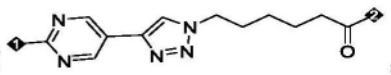
[0048] 在一些实施方案中，L_1选自  、  、  、  、  、  和  ，m选自2、3、4，y1选自1-6之间任意整数(如4、5、6)，各y2独立地选自0-10(如6-10)之间任意整数，各y3独立地选自1或2，1位通过S原子与Tb相连，2位与L_2或L_3相连。

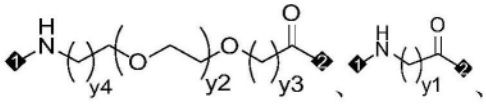
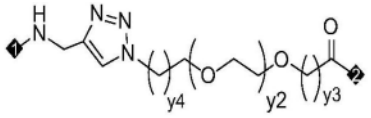
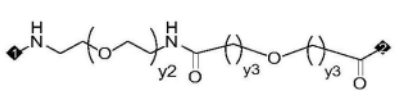
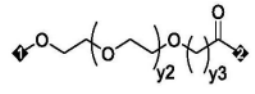
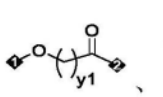
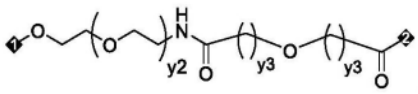
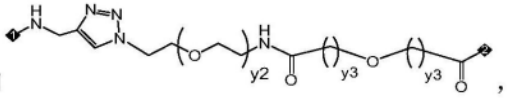
[0049] 在一些实施方案中，L_1选自  、  、  、  、  、  、  和  ，1位通过S原子与Tb相连，2位与L_2或L_3相连。

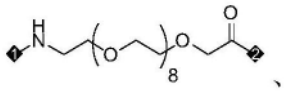
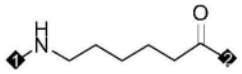
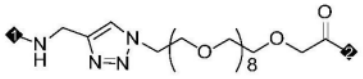
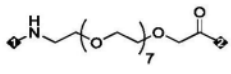
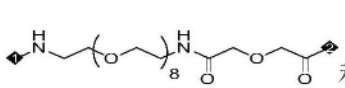
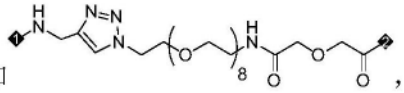
[0050] 在一些实施方案中，L_1选自  、  、  、  、  、  、  、  。

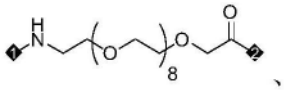
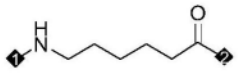
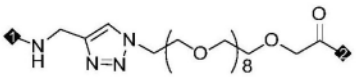
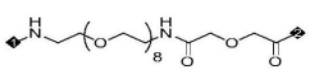
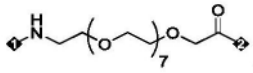
[0051] 在一些实施方案中，L_1选自  、  、  、  、  、  和  ，1位通过S原子与Tb相连，2位与L_2或L_3相连。

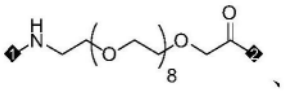
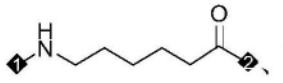
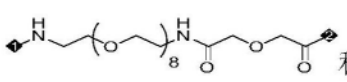
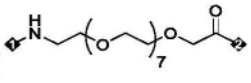
[0052] 在一些实施方案中，L_1选自  、  和  ，1位通过S原子与Tb相连，2位与L_2或L_3相连。

[0053] 在一些实施方案中，L_1选自  和  ，1位通过S原子与Tb相连，2位与L_2或L_3相连。

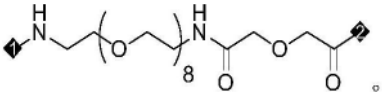
[0054] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、、  、  、  、  、  和  ，y1选自1-6之间任意整数(如4、5、6)，各y2独立地选自0-10(如6-10)之间任意整数，各y3独立地选自1或2，各y4独立地选自0或1，1位与L_1相连，2位与L_3相连。

[0055] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  、  、  、  和  ，1位与L_1相连，2位与L_3相连。

[0056] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  、  、  和  ，1位与L_1相连，2位与L_3相连。

[0057] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  、  和  ，1位与L_1相连，2位与L_3相连。

[0058] 在一些实施方案中，L_2不存在。

[0059] 在一些实施方案中，L_2选自  。

[0060] 在一些实施方案中，L_3选自氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽；所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、或选自AA_1所示氨基酸残基或其立体异构体。

[0061] 在一些实施方案中,L_3选自氨基酸残基Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1或由2-10个选自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1的氨基酸残基组成的短肽。

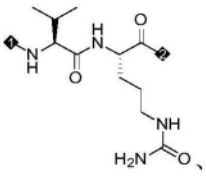
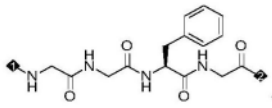
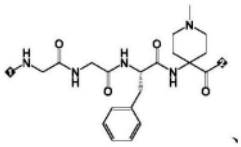
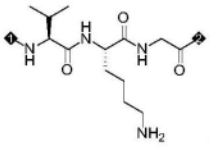
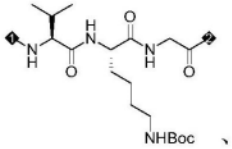
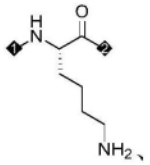
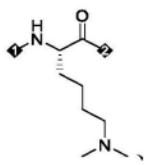
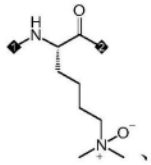
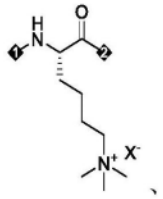
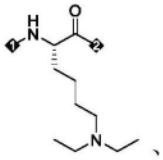
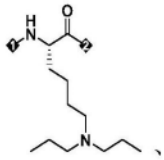
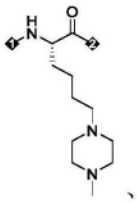
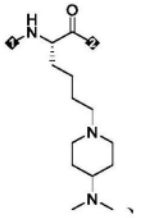
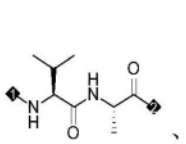
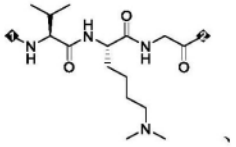
[0062] 在一些实施方案中,L_3选自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys和Lys-Ala-Asn。

[0063] 在一些实施方案中,L_3选自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn和Gly-Gly-Phe-Gly。

[0064] 在一些实施方案中,L_3选自AA^1和Val-AA^1-Gly。

[0065] 在一些实施方案中,L_3选自Val-AA^1-Gly。

[0066] 在一些实施方案中,L_3选自


、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

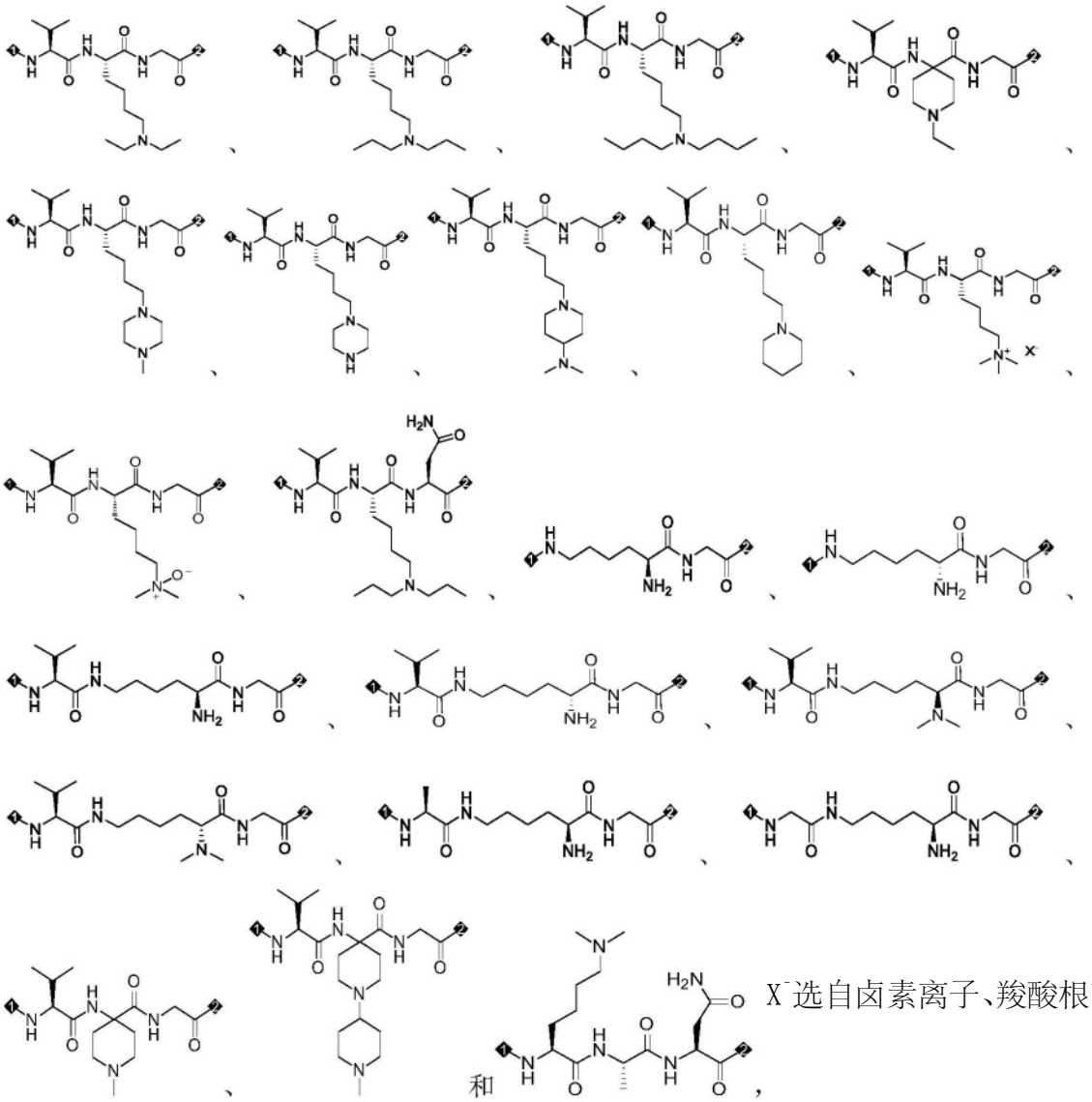
、

、

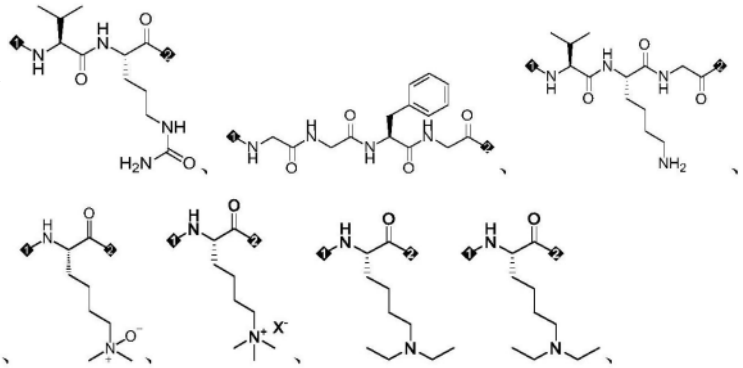
、

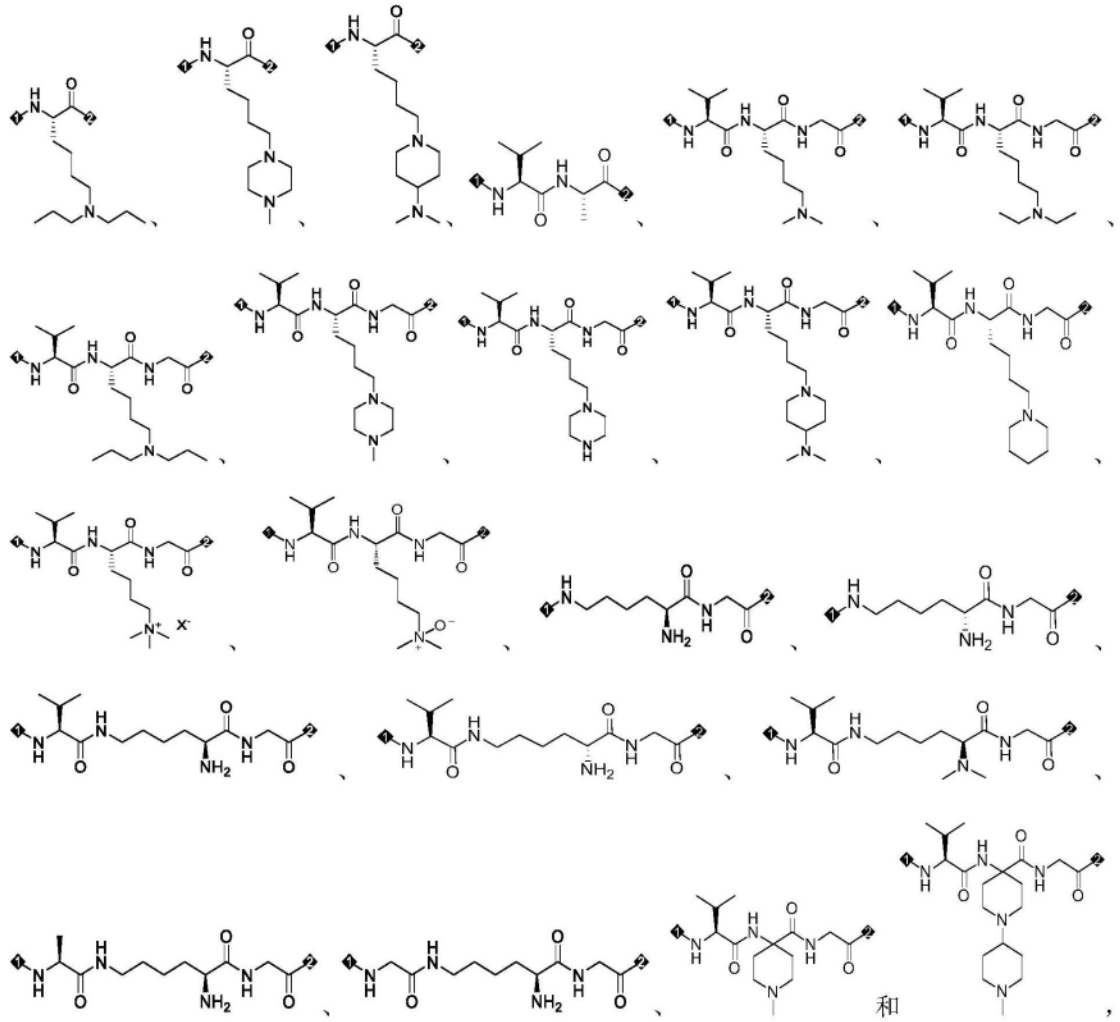
、

、



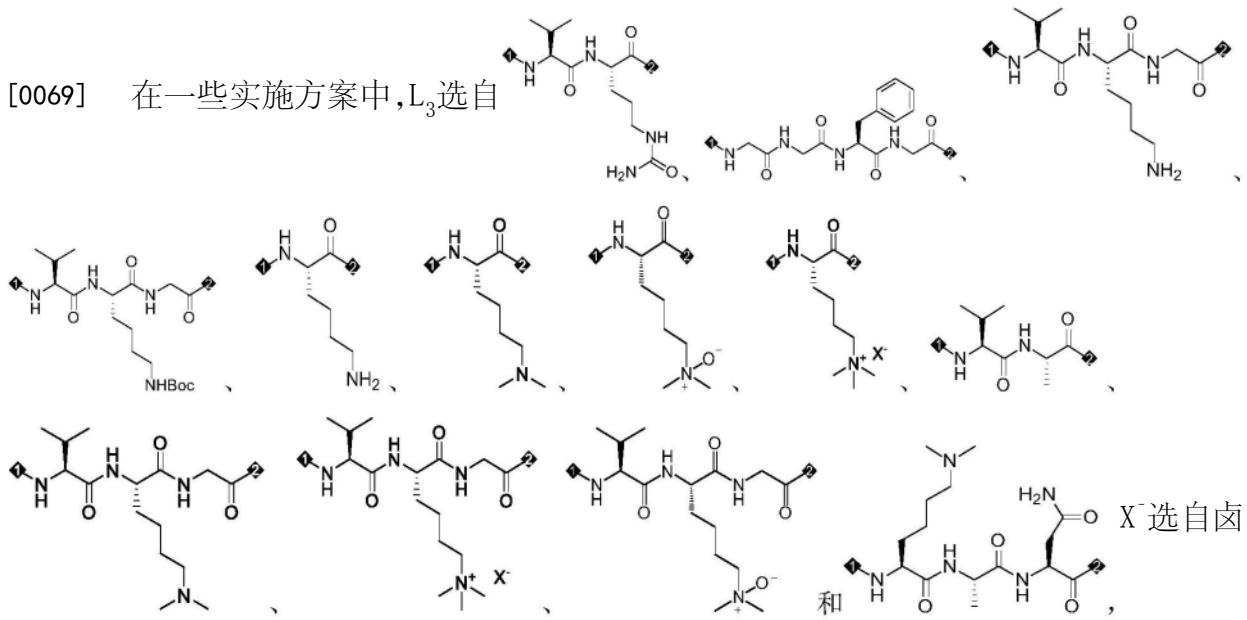
和 ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或D相连。

[0067] 在一些实施方案中，L_3选自 



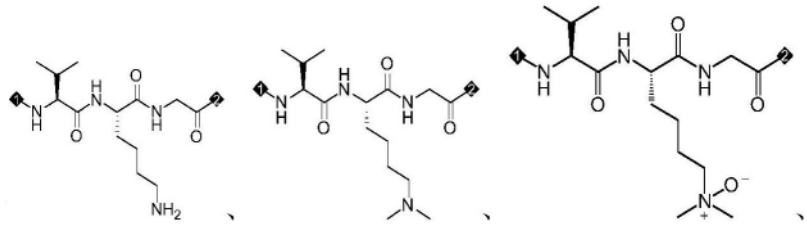
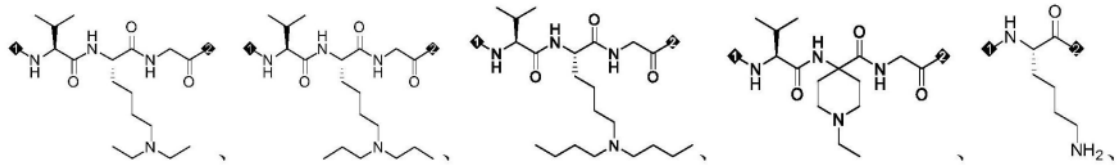
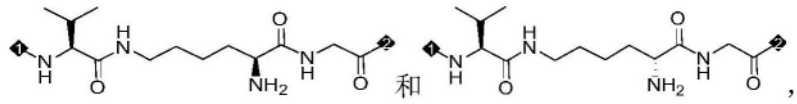
[0068] X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或D相连。

[0069] 在一些实施方案中，L_3选自

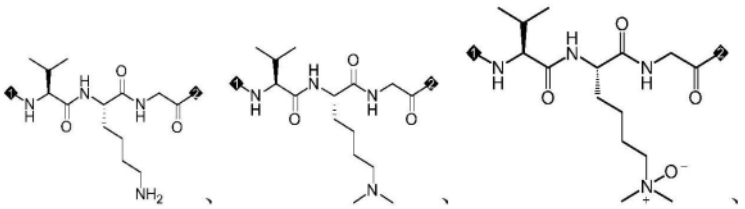
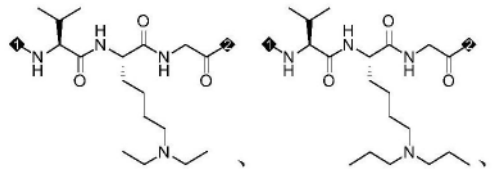


X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或D相连。

[0070] 在一些实施方案中，L_3选自

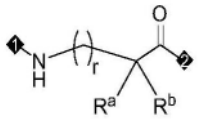




1位与L_1或L_2相连,2位与L_4或D相连。

[0071] 在一些实施方案中,L_3选自 


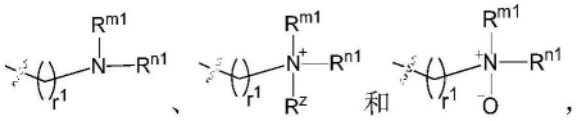
1位与L_1或L_2相连,2位与L_4或D相连。

[0072] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基的结构如下所示,

[0073] 

AA^1

[0074] 其中:

[0075] R^a、R^b各自独立地选自H、 
且R^a、R^b不同时为H;

[0076] 或者,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成4-10元杂环,所述4-10元杂环任选地被一个或多个R^0所取代;

[0077] r、r^1各自独立地选自0到20的任意整数;

[0078] R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基、C3-6环烷基和-$COOR^{x1}$;

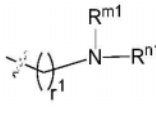
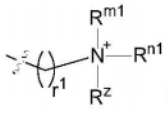
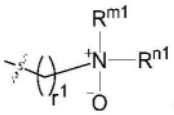
[0079] R^{x1}选自C1-6烷基;

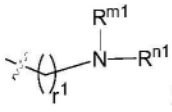
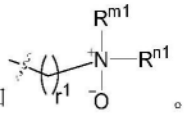
[0080] 或者,R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起,形成4-10元杂环,所述4-10元杂环任选地被一个或多个$R^{0'}$所取代;

[0081] R^z选自C1-6烷基;

[0082] R^0、$R^{0'}$各自独立地选自C1-6烷基、C3-6环烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$和任选被C1-6烷基取代的4-10元杂环基;

[0083] R^{m2}、R^{n2}各自独立地选自H和C1-6烷基。

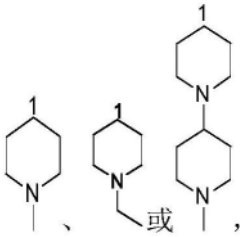
[0084] 在一些实施方案中,R^a、R^b中,任一个为H,另一个选自  、  和  。

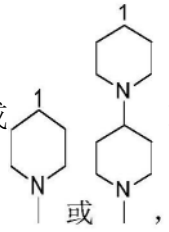
[0085] 在一些实施方案中,R^a、R^b中,任一个为H,另一个选自  和  。

[0086] 在一些实施方案中,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成被R^0取代的5-6元杂环。

[0087] 在一些实施方案中,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成被R^0取代的哌啶环或哌嗪环。

[0088] 在一些实施方案中,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成被R^0取代的哌啶环。

[0089] 在一些实施方案中,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成  1号碳原子为与R^a和R^b共同相连的碳原子。

[0090] 在一些实施方案中,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成  1号碳原子为与R^a和R^b共同相连的碳原子。

[0091] 在一些实施方案中,r、r^1各自独立地选自0、1、2、3、4和5。

[0092] 在一些实施方案中,r、r^1各自独立地选自0和4。

[0093] 在一些实施方案中,r、r^1中,任一个为0,另一个为4。

[0094] 在一些实施方案中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3和-COOCH2CH2CH2CH3。

[0095] 在一些实施方案中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基、C3-6环烷基和叔丁氧羰基。

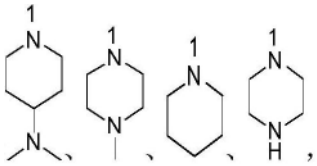
[0096] 在一些实施方案中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H和C1-6烷基。

[0097] 在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、甲基、乙基和正丙基。

[0098] 在一些实施方案中，r、r^1中，r为4，r^1为0时，R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基(如H、甲基)；r为0，r^1为4时，R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自C1-6烷基(如甲基、乙基、正丙基)，优选选自C2-6烷基(如乙基、正丙基)。

[0099] 在一些实施方案中，R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起，形成任选被$R^{0'}$取代的5-6元杂环。

[0100] 在一些实施方案中，R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起，形成任选被$R^{0'}$取代的哌啶环或哌嗪环。

[0101] 在一些实施方案中，R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起，形成  1号氮原子为与R^{m1}和R^{n1}共同相连的氮原子。

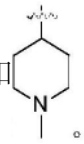
[0102] 在一些实施方案中，R^z为甲基。

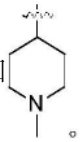
[0103] 在一些实施方案中，R^0、$R^{0'}$各自独立地选自C1-6烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$和任选被C1-6烷基取代的5-6元杂环基。

[0104] 在一些实施方案中，R^0选自C1-6烷基和被C1-6烷基取代的5-6元杂环基，所述5-6元杂环基选自哌啶基和哌嗪基。

[0105] 在一些实施方案中，R^0选自甲基、乙基和被甲基取代的5-6元杂环基，所述5-6元杂环基为哌啶基。

[0106] 在一些实施方案中，R^0选自甲基和被甲基取代的5-6元杂环基，所述5-6元杂环基为哌啶基。

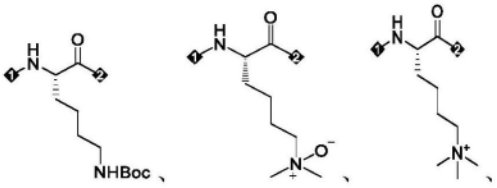
[0107] 在一些实施方案中，R^0选自甲基、乙基和  。

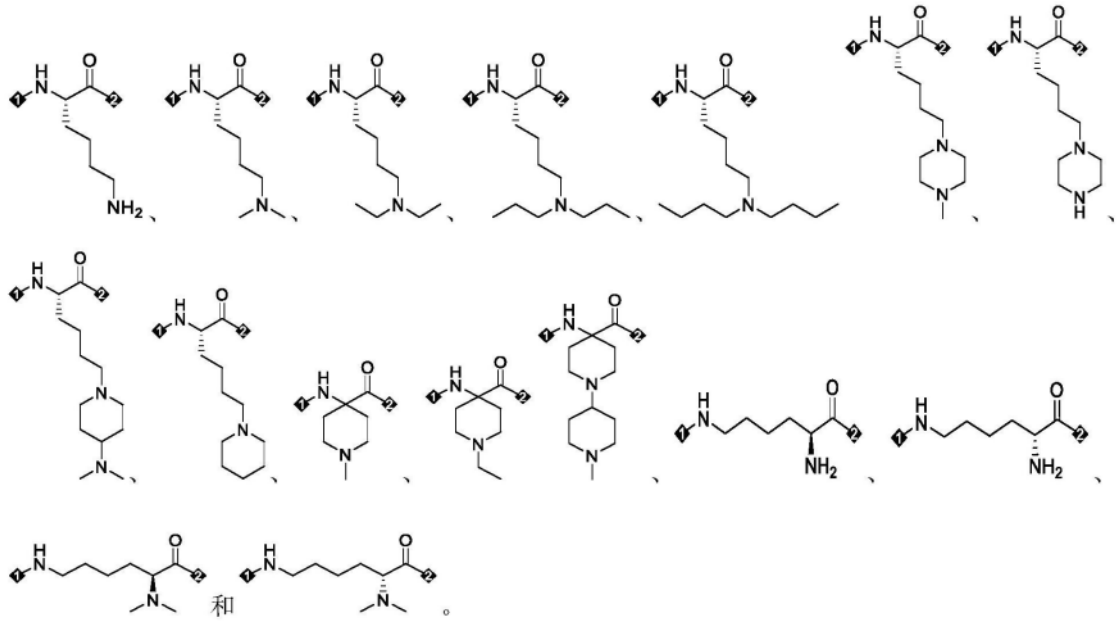
[0108] 在一些实施方案中，R^0选自甲基和  。

[0109] 在一些实施方案中，$R^{0'}$选自C1-6烷基和$-NR^{m2}R^{n2}$。

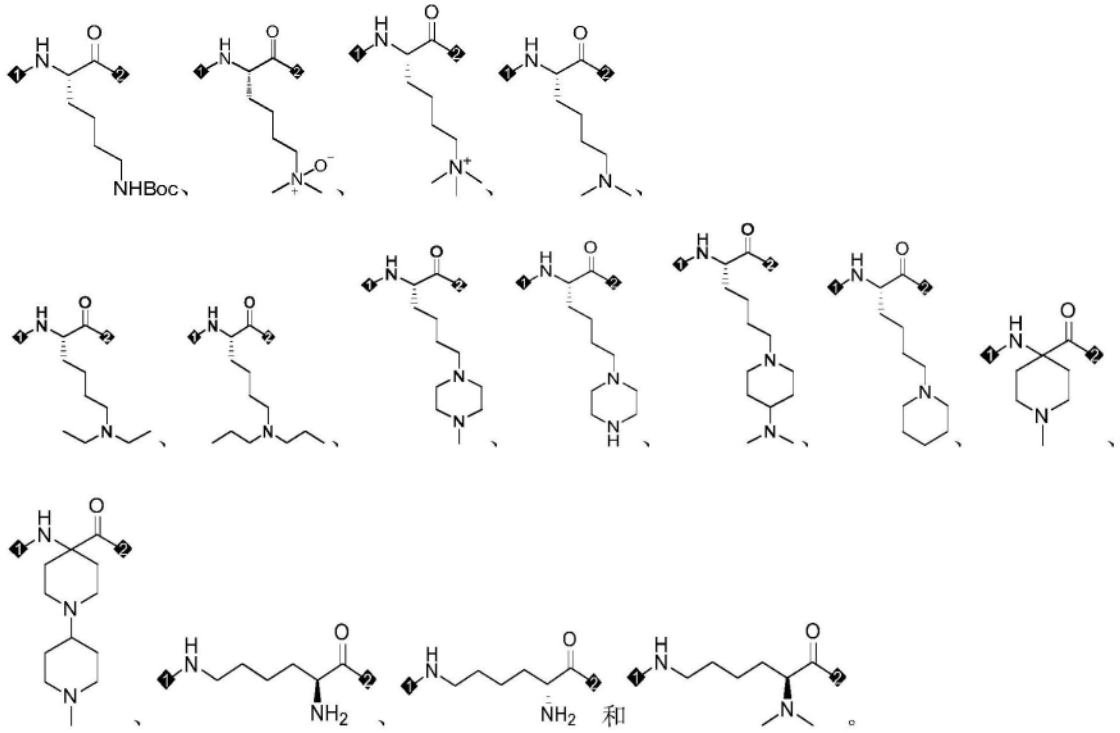
[0110] 在一些实施方案中，$R^{0'}$选自甲基和$-NR^{m2}R^{n2}$。

[0111] 在一些实施方案中，R^{m2}、R^{n2}为甲基。

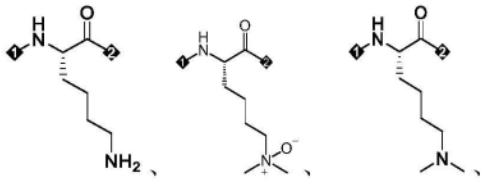
[0112] 在一些实施方案中，AA^1所示氨基酸残基选自 

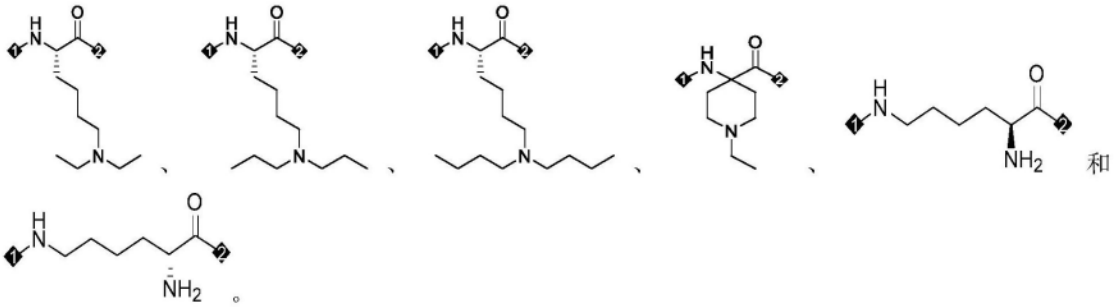


[0113] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基选自

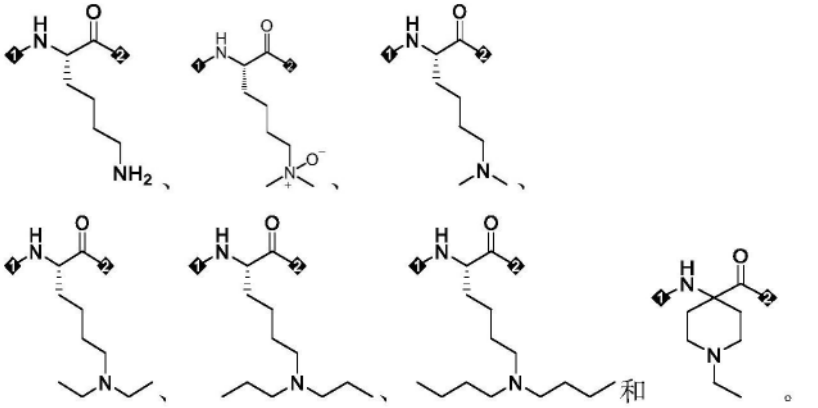


[0114] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基选自

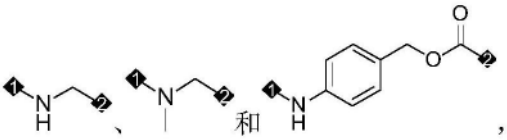




[0115] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基选自

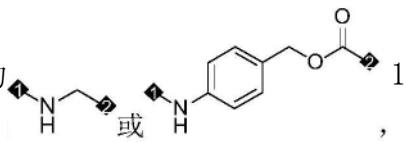


[0116] 在一些实施方案中,L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4选自



1位与L_3相连,2位与D相连。

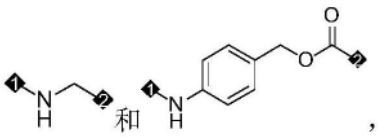
[0117] 在一些实施方案中,L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4为



1位与L_3相连,2位与D相连。

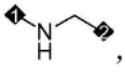
[0118] 在一些实施方案中,L_4不存在。

[0119] 在一些实施方案中,L_4选自

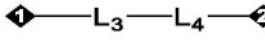


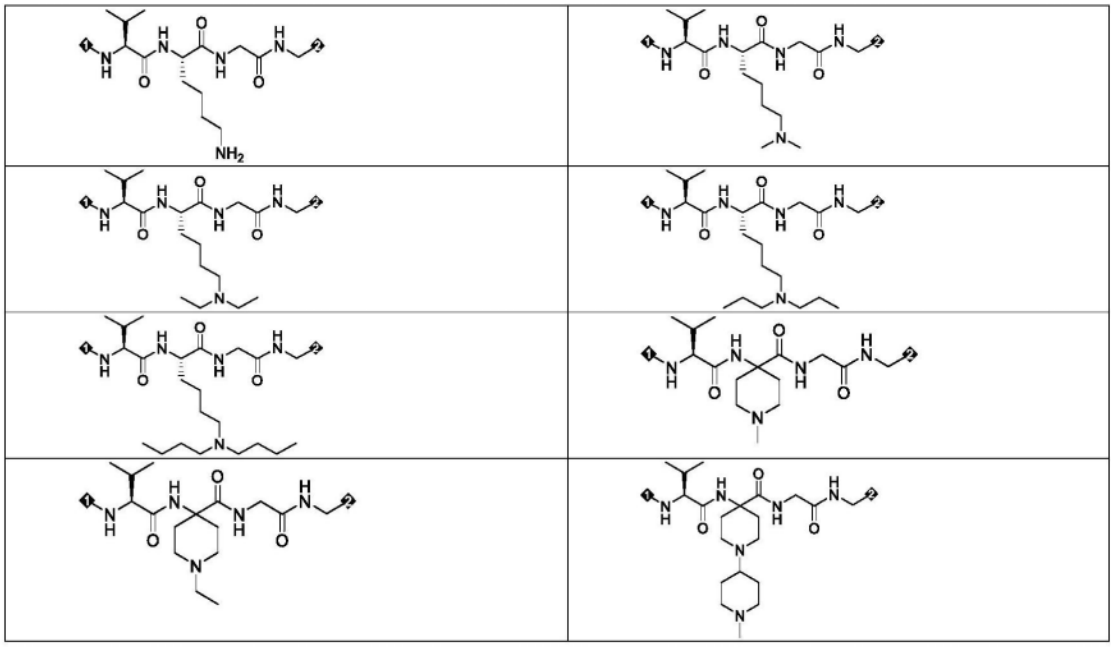
1位与L_3相连,2位与D相连。

[0120] 在一些实施方案中,L_4选自



1位与L_3相连,2位与D相连。

[0121] 在一些实施方案中,  的结构选自以下结构片段:

[0122] 

[0123] 在一些实施方案中,Tb为抗体或其抗原结合片段。

[0124] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段以及单克隆抗体或其抗原结合片段包括:Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv(例如,scFv)、dAb、互补决定区片段、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、全人抗体、前抗(Probody)、单克隆抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0125] 在一些实施方案中,Tb为具有内吞或不内吞活性的抗体或其抗原结合片段。

[0126] 在一些实施方案中,Tb为具有内吞活性的抗体或其抗原结合片段。

[0127] 在一些实施方案中,Tb为具有结合肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原肿瘤细胞表面抗原活性的抗体或其抗原结合片段。

[0128] 在一些实施方案中,Tb为具有被肿瘤细胞内吞的活性,且有肿瘤组织中游离抗原或者肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

[0129] 在一些实施方案中,Tb为具有被肿瘤细胞内吞的活性,且有肿瘤组织中游离抗原以及肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

[0130] 在一些实施方案中,Tb为具有被肿瘤细胞内吞的活性,且没有肿瘤组织中游离抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

[0131] 在一些实施方案中,Tb为具有被肿瘤细胞内吞的活性,且没有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

[0132] 在一些实施方案中,Tb为没有内吞活性的、或内吞活性弱的抗体或其抗原结合片段。

[0133] 在一些实施方案中,Tb为不具有结合肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原肿瘤细胞表面抗原活性的抗体或其抗原结合片段。

[0134] 在一些实施方案中,Tb为没有被肿瘤细胞内吞活性的、或内吞活性弱的,且有肿瘤组织中游离抗原或者肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

[0135] 在一些实施方案中,Tb为没有被肿瘤细胞内吞活性的、或内吞活性弱的,且有肿瘤组织中游离抗原以及肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

[0136] 在一些实施方案中,Tb为没有被肿瘤细胞内吞活性的、或内吞活性弱的,且没有肿

瘤细胞表面抗原结合活性的抗体其抗原结合片段。在一些实施方案中,Tb为没有被肿瘤细胞内吞活性的、或内吞活性弱的,且没有肿瘤组织中游离抗原结合活性的抗体其抗原结合片段。

[0137] 在一些实施方案中,Tb为没有被肿瘤细胞内吞活性的,且人体内没有对应抗原的抗体或其抗原结合片段。

[0138] 在一些实施方案中,Tb为没有肿瘤细胞相关抗原结合的抗体。

[0139] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段,选自IgG同型抗体。

[0140] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段,选自同型IgG1,同型IgG2,同型IgG3或同型IgG4。

[0141] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段,为抗鸡溶菌酶人IgG1同型抗体。

[0142] 在一些实施方案中,Tb为具有结合肿瘤细胞表面非内吞(例如ALCAM/CD166)抗原活性的抗体其抗原结合片段。

[0143] 在一些实施方案中,Tb为具有肿瘤细胞相关抗原结合的抗体。

[0144] 在一些实施方案中,Tb为具有肿瘤组织中游离抗原或者肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

[0145] 在一些实施方案中,Tb为具有肿瘤组织中游离抗原以及肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

[0146] 在一些实施方案中,Tb为具有B7H3-2Ig和/或B7H-4Ig的抗体或其抗原结合片段。

[0147] 在一些实施方案中,Tb为具有B7H3-4Ig结合活性高于B7H3-2Ig结合活性抗体或其抗原结合片段。

[0148] 在本公开的部分实施方案中,Tb为和靶点结合的配体或靶向部分。

[0149] 在一些实施方案中,所述Tb的靶点选自肿瘤细胞表达高于正常细胞的靶点。

[0150] 在一些实施方案中,所述Tb的靶点选自肿瘤细胞高表达,而正常细胞低表达的靶点。

[0151] 在一些实施方案中,所述Tb的靶点选自:B7H3、CD20、CD19、CD30、GPNMB、Her2、Trop-2、EGFR、Her3、GD-2,CD79b和BCMA等。

[0152] 在一些实施方案中,所述Tb为抗体或其抗原结合的片段。

[0153] 在一些实施方案中,Tb为非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、全人抗体。

[0154] 在一些实施方案中,Tb为单克隆抗体,双特异性抗体或多特异性抗体。

[0155] 在一些实施方案中,Tb为单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0156] 在一些实施方案中,Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段、抗Trop-2抗体或其抗原结合片段、抗Her 2抗体或其抗原结合片段、抗Her3抗体或其抗原结合片段或抗EGFR抗体或其抗原结合片段。

[0157] 在一些实施方案中,Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段,例如1D1、1D1-01、2E3,2E3-02抗体、enoblituzumab,mirzotamab,omburtamab或其抗原结合片段。

[0158] 所述1D1的序列如SEQ ID NO:1所示。所述1D1-01的VH序列如SEQ ID NO:3所示,VL序列如SEQ ID NO:13所示。所述1D1-01的重链序列如SEQ ID NO:45所示,轻链序列如SEQ ID NO:46所示。所述2E3的序列如SEQ ID NO:2所示。所述2E3-02的VH序列如SEQ ID NO:23所示,VL序列如SEQ ID NO:33所示。所述2E3-02的重链序列如SEQ ID NO:47所示,轻链序列

如SEQ ID NO:48所示。

[0159] 在一些实施方案中,Tb为抗B7H3单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0160] 在一些实施方案中,Tb为抗Trop-2抗体或其抗原结合片段,例如datopotamab,sacituzumab或其抗原结合片段。

[0161] 在一些实施方案中,Tb为抗Trop-2单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0162] 在一些实施方案中,Tb为抗Her 2抗体或其抗原结合片段,例如anbenitamab,coprelotamab,disitamab,gancotamab,margetuximab,pertuzumab,timigutuzumab,zanidatamab,Trastuzumab,Pertuzumab或其抗原结合片段。

[0163] 在一些实施方案中,Tb为抗Her 2单克隆抗体或其抗原结合片段,例如曲妥珠单抗、帕妥珠单抗或其抗原结合片段。

[0164] 在一些实施方案中,Tb为抗Her3抗体或其抗原结合片段,例如barecetamab,duligotuzumab,elgemtumab,istiratumab,lumretuzumab,patritumab,seribantumab,zenocutuzumab,202-2-1抗体或其抗原结合片段。

[0165] 在一些实施方案中,Tb为抗Her3单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0166] 在一些实施方案中,Tb为抗EGFR抗体或其抗原结合片段,例如demupitamab,depatuxizumab,futuximab,imgatuzumab,laprituximab,losatuxizumab,matuzumab,modotuximab,necitumumab,nimotuzumab,panitumumab,pimurutamab,serclutamab,tomuzotuximab,zalutumumab,Cetuximab或其抗原结合片段。

[0167] 在一些实施方案中,Tb为抗EGFR单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0168] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合抗原但不具有内吞活性的抗体。在一些实施方案中,所述抗体具有结合B7H3、CD20、CD19、CD30、GPNMB、Her2、Trop-2、EGFR、Her3、GD-2、CD79b和BCMA等抗原但不具有内吞活性的抗体。

[0169] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合B7H3抗原但不具有内吞活性的抗体。比如WO2021168379A1的INV721和I7-01。更具体的,Anti-B7H3的抗体具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:2的VH和SEQ ID NO:1的VL。

[0170] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合GD2抗原但不具有内吞活性的抗体。比如WO2021168379A1的INV721和GD2-5。更具体的,Anti-GD2的抗体具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:3的VL。

[0171] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合HER3抗原但不具有内吞活性的抗体,比如US10808032B2的SEQ ID NO:22所示的ANTI-HER3的21F06抗体。

[0172] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合CD20抗原但不具有内吞活性的抗体。尽管已显示所谓的“II型”CD20特异性抗体很难被CD20阳性靶细胞内化,但已发现其他所谓的“I型”CD20特异性抗体某种程度上被内化并降解,这取决于与其相互作用的靶细胞上激活和抑制Fc γR的表达水平。在一些实施方案中,所述抗体具有结合CD20抗原但不具有内吞活性的抗体为II型”CD20特异性抗体,例如obinutuzumab。

[0173] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合非内吞(例如ALCAM/CD166)抗原活性的抗体。在一些实施方案中,所述抗体为包含EP3911682A1中SEQ ID No:73的VH和SEQ ID No:74的VL,SEQ IDNo:75的VH和SEQ ID No:76的VL,SEQ ID No:77的VH和SEQ ID No:78的VL,或,SEQ ID No:79的VH和SEQ ID No:88的VL所示的抗体。

[0174] 在一些实施方案中,所述Tb为靶向部分,例如配体、蛋白质、多肽、非蛋白质试剂(例如糖、RNA或DNA),抗体类似物等。

[0175] 在一些实施方案中,q选自0.1-16.0之间的任意数值;在优选地实施方案中,q选自0.1-16.0之间的任意整数。

[0176] 在一些实施方案中,q选自0.1-8.0之间的任意数值,在优选地实施方案中,q选自0.1-8.0之间的任意整数。

[0177] 在一些实施方案中,q选自2-8之间的任意数值。

[0178] 在一些实施方案中,q选自3-8之间的任意数值。

[0179] 在一些实施方案中,q选自4-8之间的任意数值。

[0180] 在一些实施方案中,q选自6-8之间的任意数值。

[0181] 在一些实施方案中,q选自2-8之间的任意整数。

[0182] 在一些实施方案中,q选自3-8之间的任意整数。

[0183] 在一些实施方案中,q选自4-8之间的任意整数。

[0184] 在一些实施方案中,q选自6-8之间的任意整数。

[0185] 在一些实施方案中,q选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12。

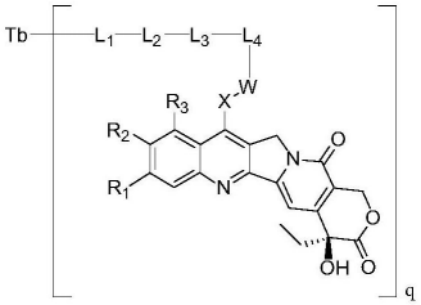
[0186] 在一些实施方案中,q选自2、4、6和8。

[0187] 本公开中,所述的生物活性分子片段是指本领域中均知的,抗体-药物偶联物(或称抗体偶联药物(antibody-drug conjugate,ADC))中,在肿瘤组织间或肿瘤细胞内连接子裂解/降解/酶切后,能够形成具有生物活性的药物(例如小分子细胞毒药物,所述药物包括其失去一个原子或原子团后的基团)或其衍生物(例如其前体)的部分(片段或基团)。为了避免歧义,“药物”并非仅指已获得医药监管部门审批的“药品”,还包括临床中,或者研发和学术研究中任何有潜在治疗生物活性的分子。

[0188] 在一些实施方案中,D为具有抗肿瘤生物活性分子片段。

[0189] 在一些实施方案中,D为具有抗肿瘤生物活性分子片段,其中所述的生物活性分子选自细胞毒性剂或其衍生物,例如DNA拓扑异构酶抑制剂(例如喜树碱类生物活性分子,例如喜树碱、DXD、取代基被修饰的喜树碱或取代基被修饰的DXD)或微管蛋白抑制剂(例如MMAF类微管蛋白抑制剂,MMAE类微管蛋白抑制剂)。

[0190] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I所式结构:

[0191] 

[0192] 其中,

[0193] R_1、R_2各自独立地选自H、卤素、-OH、任选取代的C1-6烷基和任选取代的C1-6烷氧基,或者,

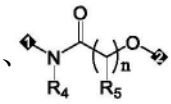
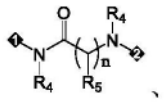
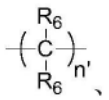
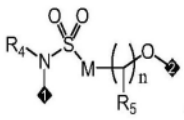
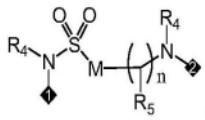
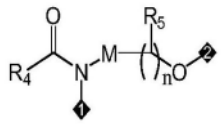
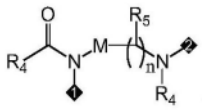
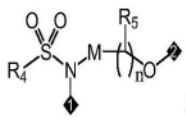
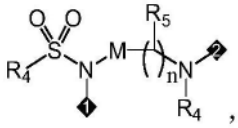
[0194] R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或

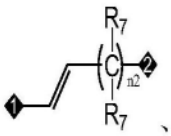
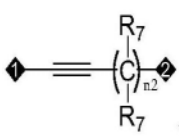
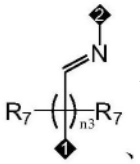
多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

[0195] R_3选自H、卤素、-OH、-NH_2、任选取代的C1-6烷基和任选取代的C1-6烷氧基,或者,

[0196] R_3和X和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合,或者,

[0197] R_3和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

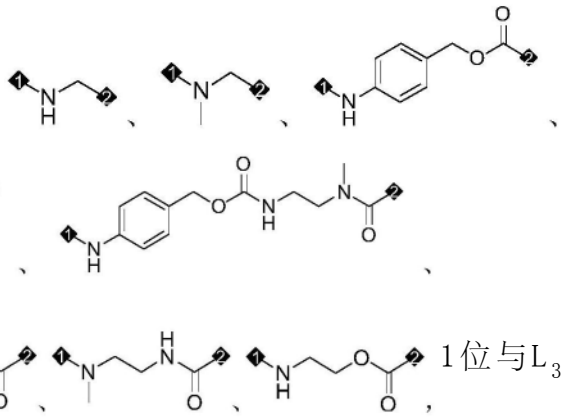
[0198] W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  、  和  ,1位与X相连,2位与L_4或L_3相连;

[0199] X选自直接键,任选取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-N(R_4)-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、  、  、  -$(CH_2)_{n1}$-、C3-6环烷基、C6-10芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基,1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基选自一个或多个C1-4烷基、C3-6环烷基,或者多个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基;

[0200] 各M独立地选自直接键和-$CR^{5a}R^{5b}$-;

[0201] R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R_7各自独立地选自H、任选取代的C1-4烷基、任选取代的C1-4烷氧基和任选取代的C3-6环烷基;

[0202] n、n’、n1、n2、n3各自独立地选自0到6之间的任意整数;

[0203] L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4选自  ,1位与L_3相连,2位与W或X相连。

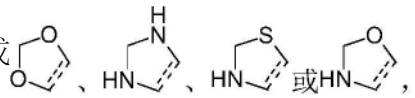
[0204] Tb、L_1、L_2、L_3和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

[0205] 在一些实施方案中,R_1、R_2各自独立地选自H、卤素和C1-4烷基。

[0206] 在一些实施方案中,R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-6元杂环,所述杂环含

有1个、2个或3个O,S或N或其任意组合。

[0207] 在一些实施方案中,R_1选自H和卤素,R_2选自H和C1-4烷基。

[0208] 在一些实施方案中,R_1和R_2和与其相连的碳原子形成  ,虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置。

[0209] 在一些实施方案中,R_1为H或F,R_2为H或甲基。

[0210] 在一些实施方案中,R_1为F,R_2为甲基或R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

[0211] 在一些实施方案中,R_1为F,R_2为甲基。

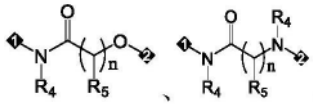
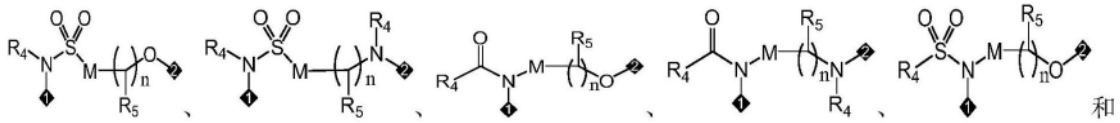
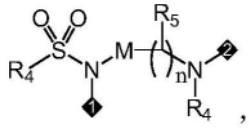
[0212] 在一些实施方案中,R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

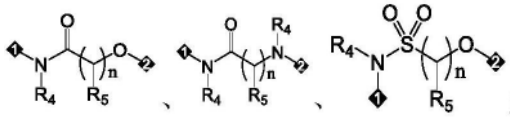
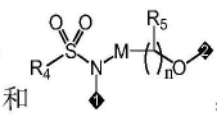
[0213] 在一些实施方案中,R_3选自H和C1-4烷基。

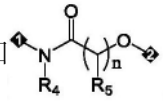
[0214] 在一些实施方案中,R_3和X和与其相连的碳原子一起形成5-6元碳环。

[0215] 在一些实施方案中,R_3为H或R_3和X和与其相连的碳原子一起形成  ,虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置。

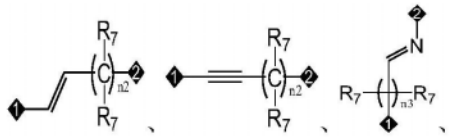
[0216] 在一些实施方案中,R_3为H。

[0217] 在一些实施方案中,W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  和  ,1位与X相连,2位与L_4或L_3相连。

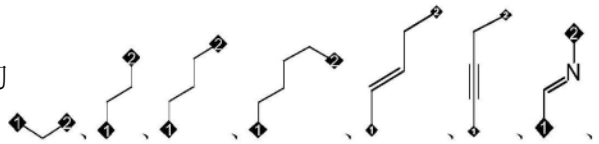
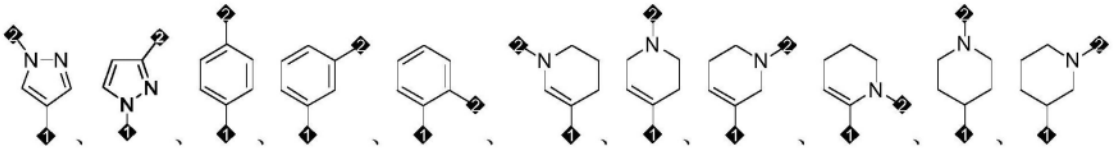
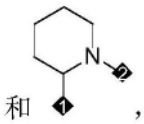
[0218] 在一些实施方案中,W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-S-、-NR_4-、  和  ,1位与X相连,2位与L_4或L_3相连。

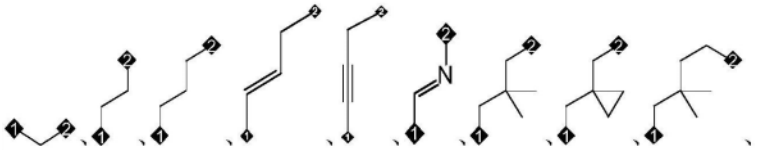
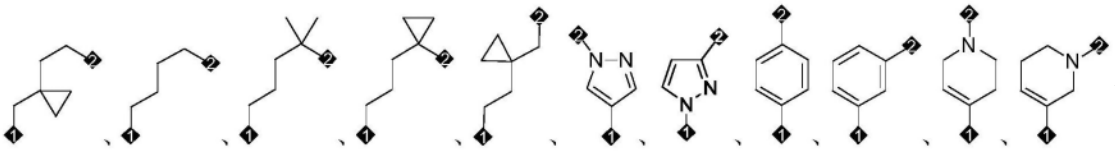
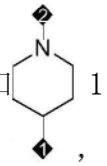
[0219] 在一些实施方案中,W选自-O-、-NR_4-和  ,1位X相连,2位与L_4或L_3相连。

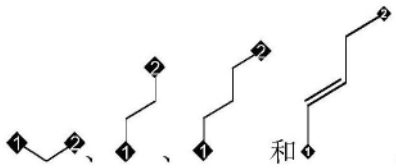
[0220] 在一些实施方案中,W选自-O-和-NR_4-,1位X相连,2位与L_4或L_3相连。

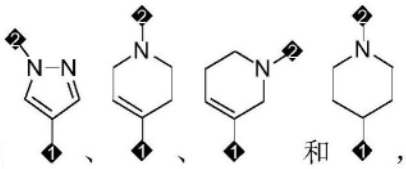
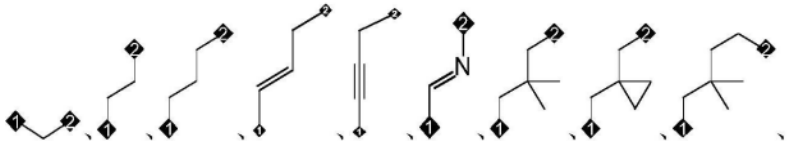
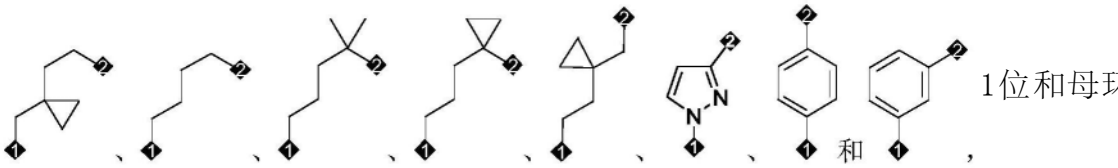
[0221] 在一些实施方案中,X选自任选取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、C6-10芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基,1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基

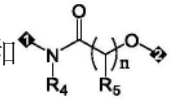
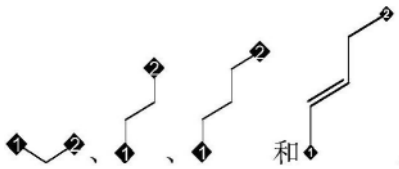
选自1个或2个C1-4烷基,或者2个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基。

[0222] 在一些实施方案中,X选自任选取代的  、  、  和,1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基选自1个或2个C1-4烷基(如甲基),或者2个C1-4烷基(如甲基)和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基(如环丙基)。

[0223] 在一些实施方案中,X选自  、  和  ,1位和母环相连,2位和W或L_4相连。

[0224] 在一些实施方案中,X选自  和,1位和母环相连,2位和W相连。

[0225] 在一些实施方案中,W不存在时,X选自  和,1位和母环相连,2位和L_4相连;W存在时,X选自  、  和,1位和母环相连,2位和W相连。

[0226] 在一些实施方案中,W选自-O-、-NR_4-和  ,1位X相连,2位与L_4或L_3相连;X选自  ,1位和母环相连,2位和W相连。

[0227] 在一些实施方案中,R_4、R_5各自独立地选自H、C1-4烷基和C3-6环烷基。

[0228] 在一些实施方案中,各R_4独立地选自H、C1-4烷基和C3-6环烷基,R_5为H。

[0229] 在一些实施方案中,各R_4独立地选自H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基和环丙基,R_5为H。

[0230] 在一些实施方案中,R^{5a}、R^{5b}各自独立地选自H和C1-4烷基。

[0231] 在一些实施方案中,R^{5a}、R^{5b}各自独立地选自H和甲基。

[0232] 在一些实施方案中,各R_7独立地选自H和C1-4烷基。

[0233] 在一些实施方案中,R_7为H。

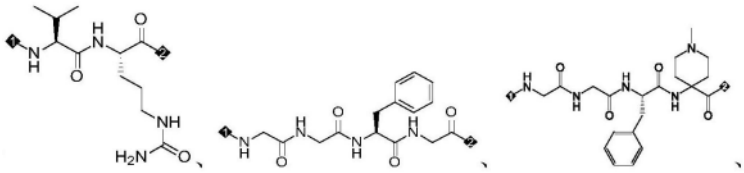
[0234] 在一些实施方案中,n选自1、2和3。

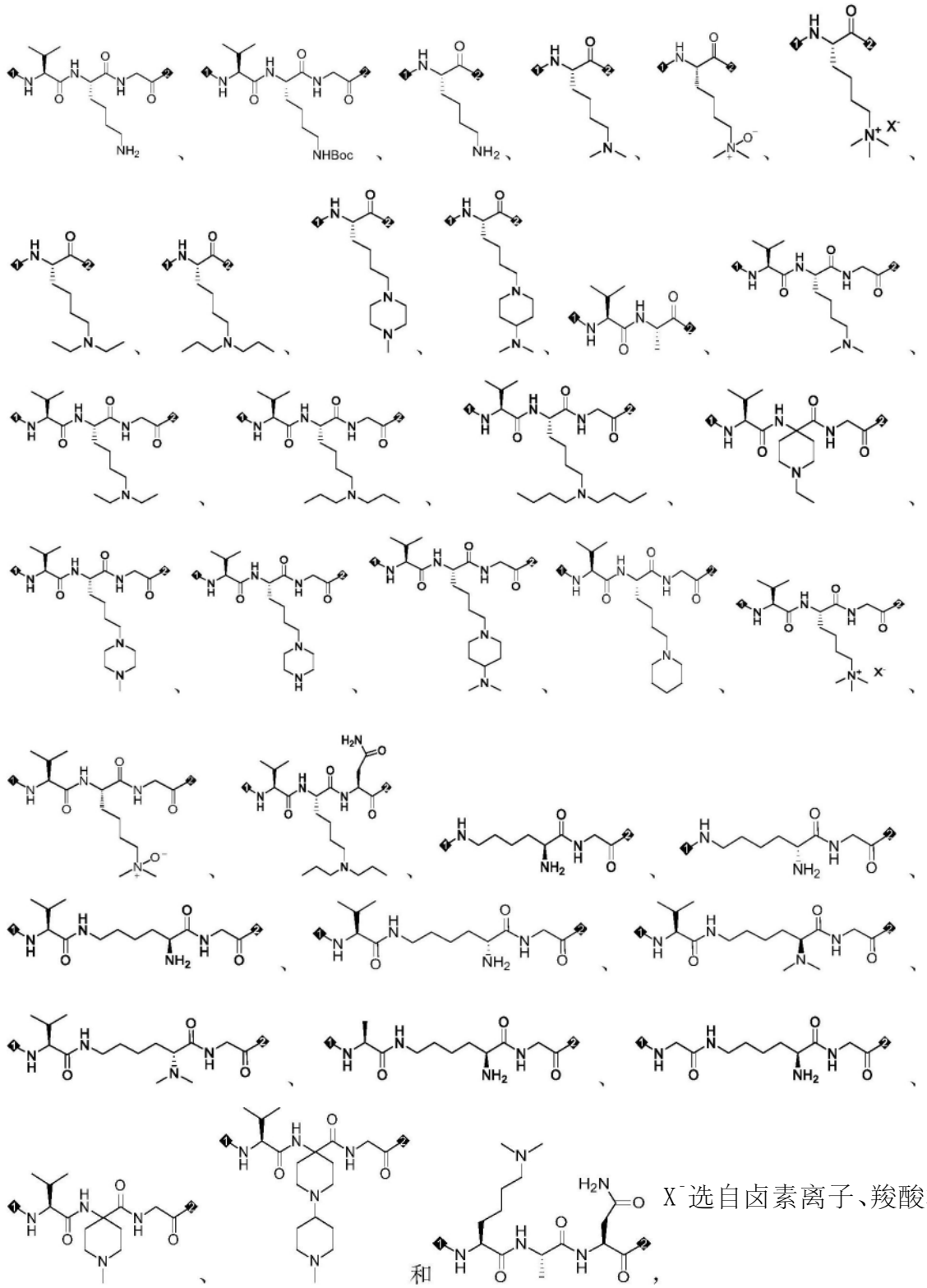
[0235] 在一些实施方案中,n为1。

[0236] 在一些实施方案中,n1选自1、2、3和4。

[0237] 在一些实施方案中,n2为1。

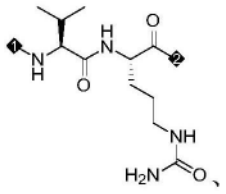
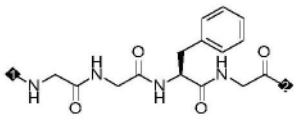
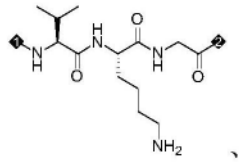
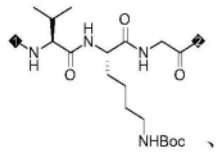
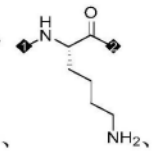
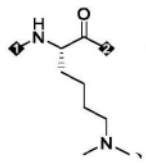
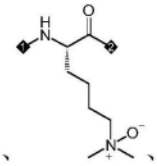
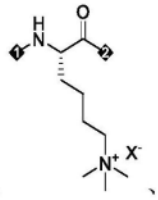
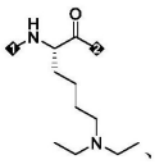
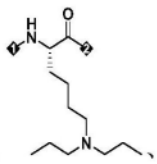
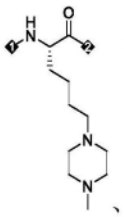
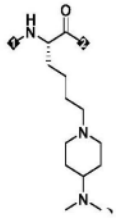
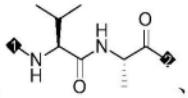
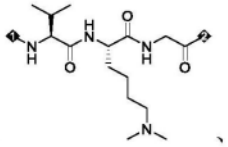
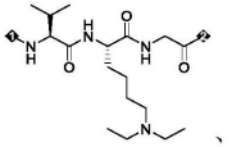
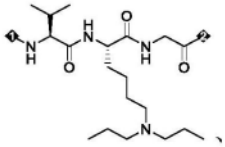
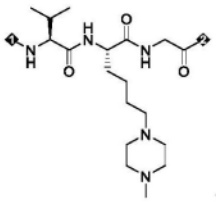
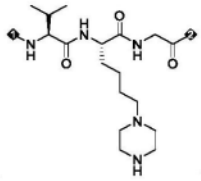
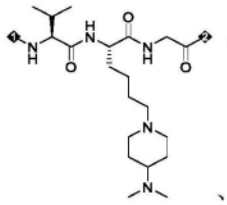
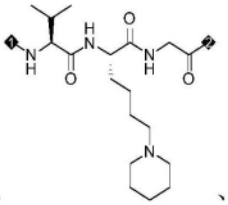
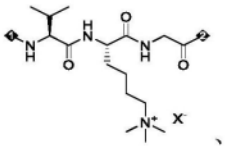
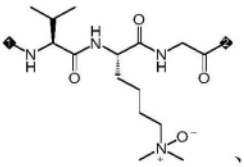
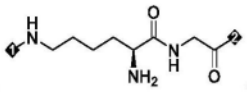
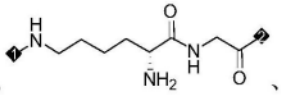
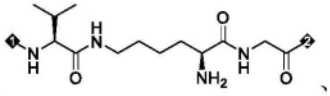
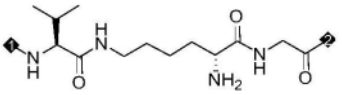
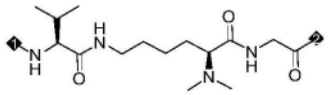
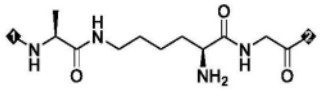
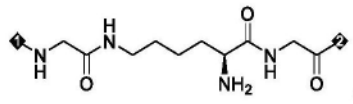
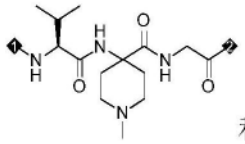
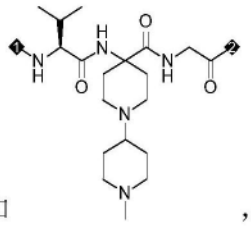
[0238] 在一些实施方案中,n3为0。

[0239] 在一些实施方案中,L_3选自 

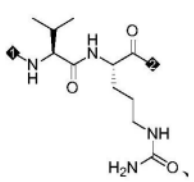
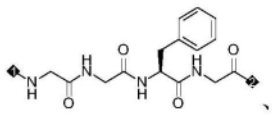
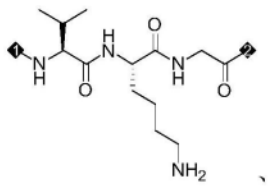


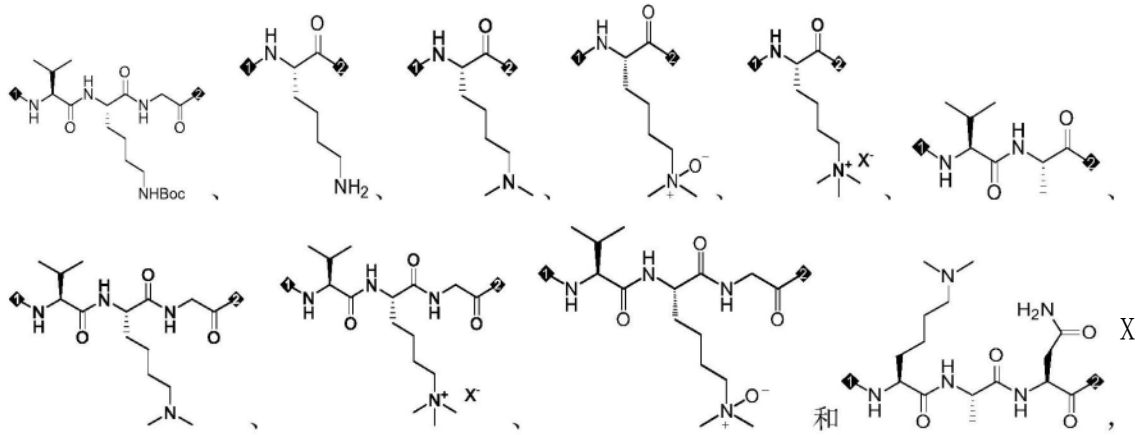
X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

[0240] 在一些实施方案中，L_3选自

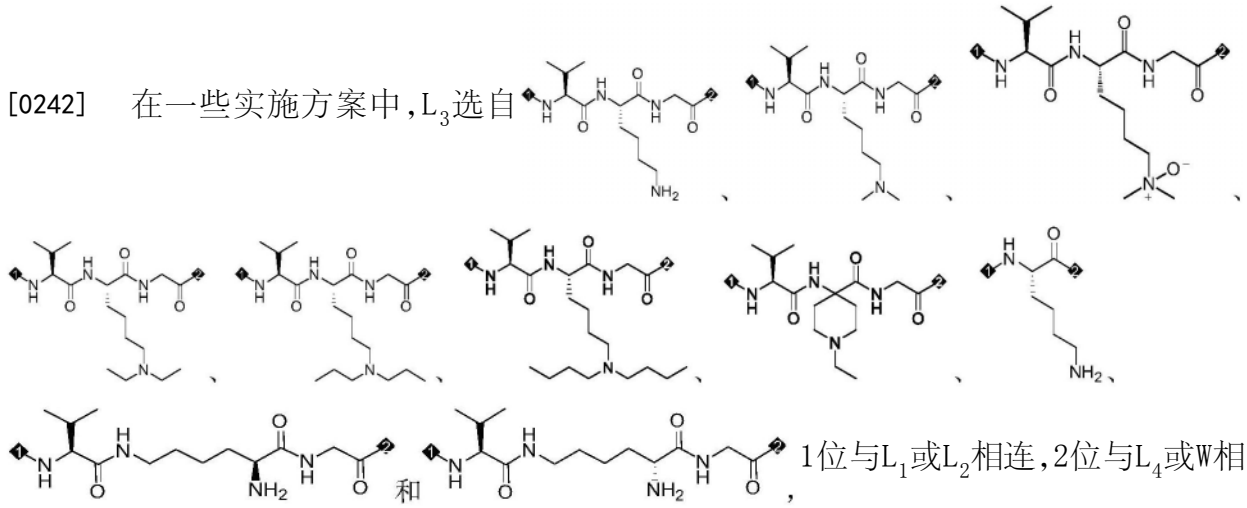
X⁻选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH⁻，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

[0241] 在一些实施方案中，L_3选自   



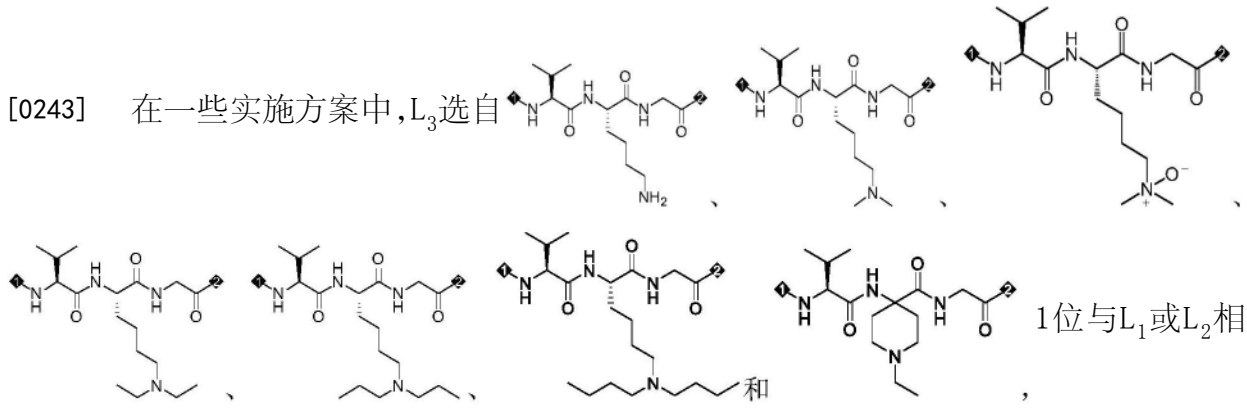
素离子、羧酸根离子、硫酸根离子和硫酸氢根离子、OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

[0242] 在一些实施方案中，L_3选自



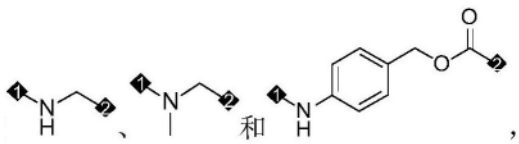
1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

[0243] 在一些实施方案中，L_3选自

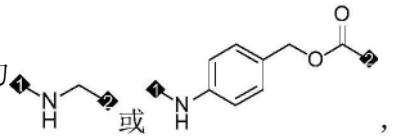


1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

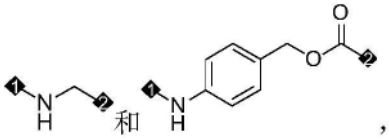
[0244] 在一些实施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在时，L_4选自

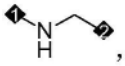


1位与L_3相连，2位与W或X相连。

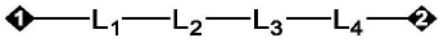
[0245] 在一些实施方案中，L_4不存在或存在，L_4存在时，L_4为  或，1位与L_3相连，2位与W或X相连。

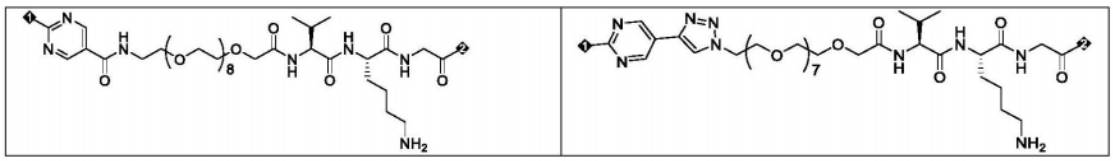
[0246] 在一些实施方案中，L_4不存在。

[0247] 在一些实施方案中，L_4选自  和，1位与L_3相连，2位与W或X相连。

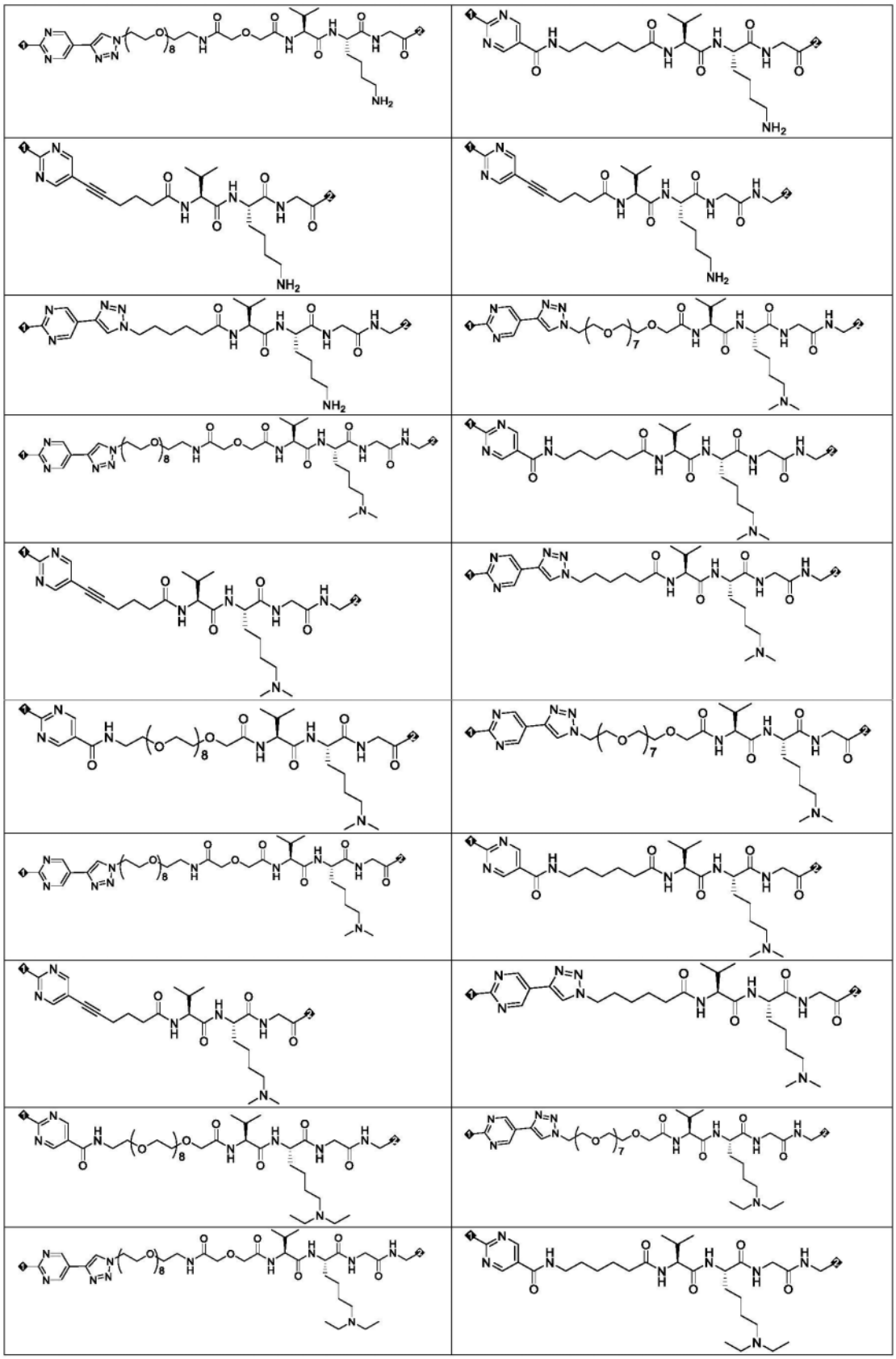
[0248] 在一些实施方案中，L_4选自  ，1位与L_3相连，2位与W或X相连。

[0249] 需要说明的是，如前所述，W不存在或存在，由此，W不存在时，L_4的1位与L_3相连，2位与X相连；W存在时，L_4的1位与L_3相连，2位与W相连。以下关于L_4的连接关系可参照前述内容进行理解。

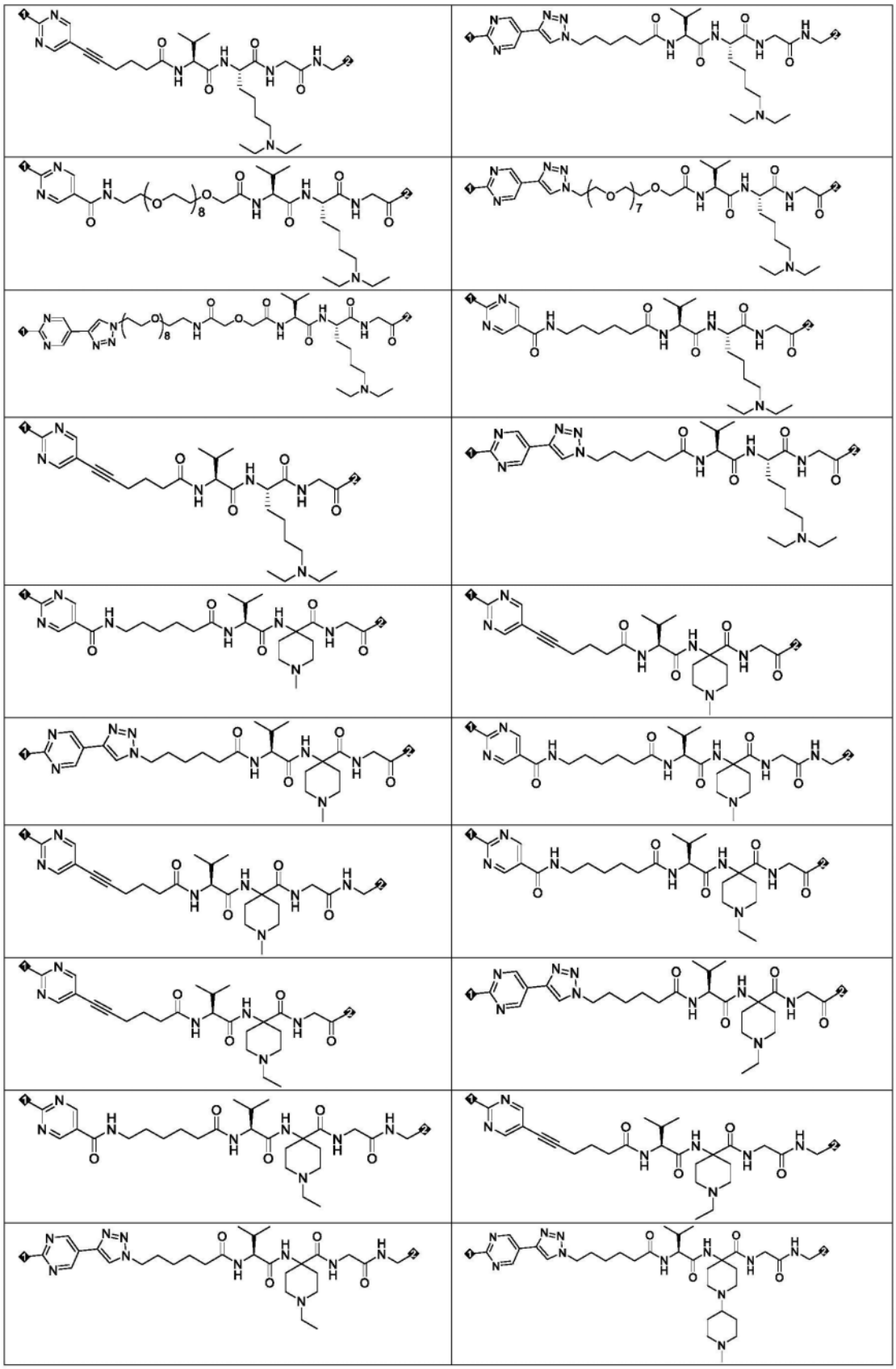
[0250] 在一些实施方案中，  的结构选自以下结构片段：

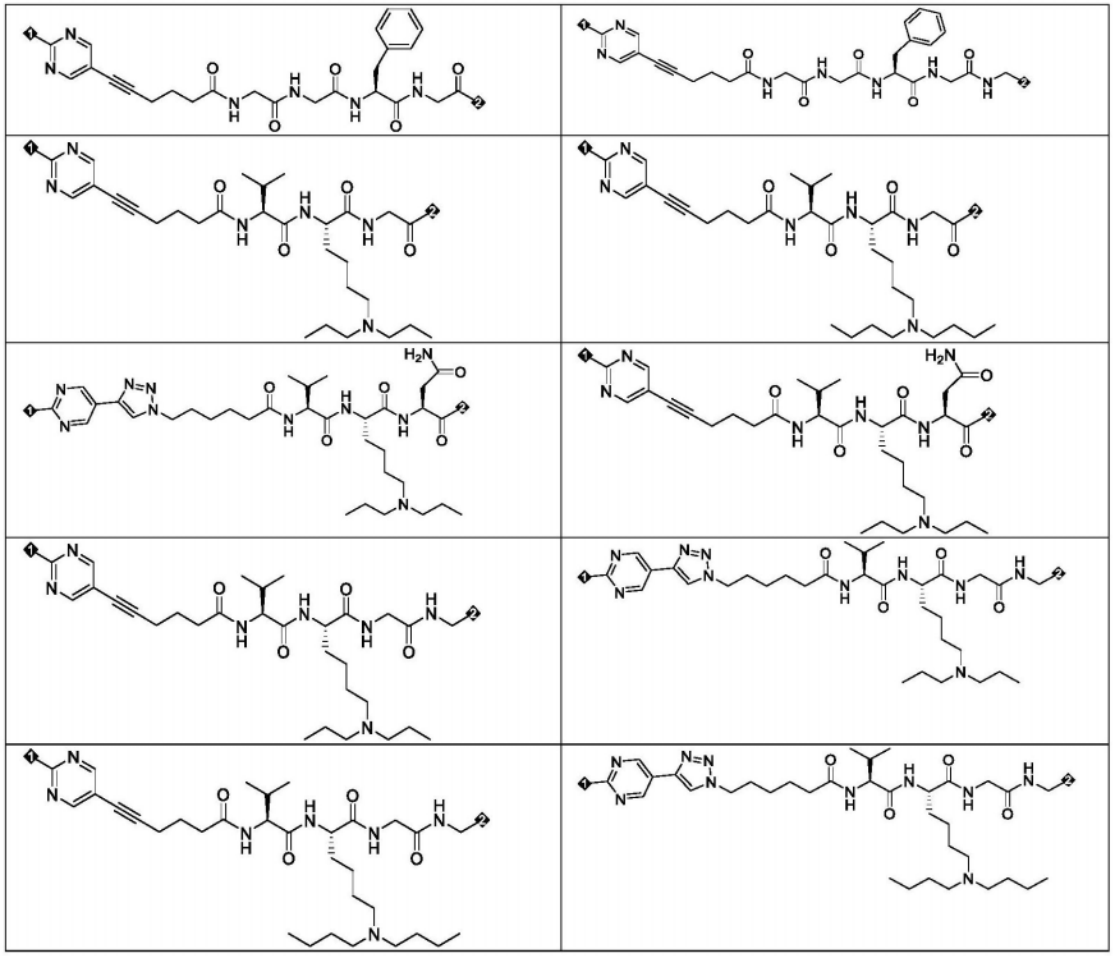
[0251] 

[0252]

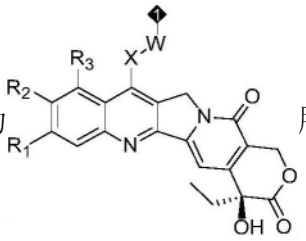
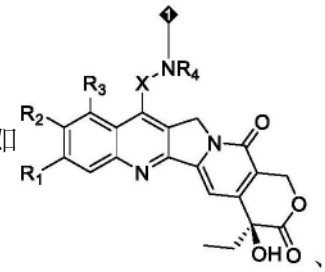
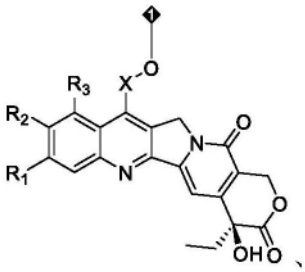
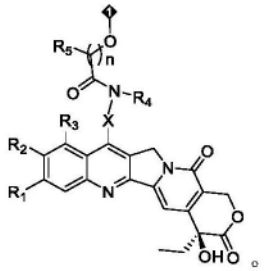


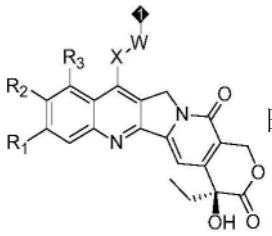
[0253]



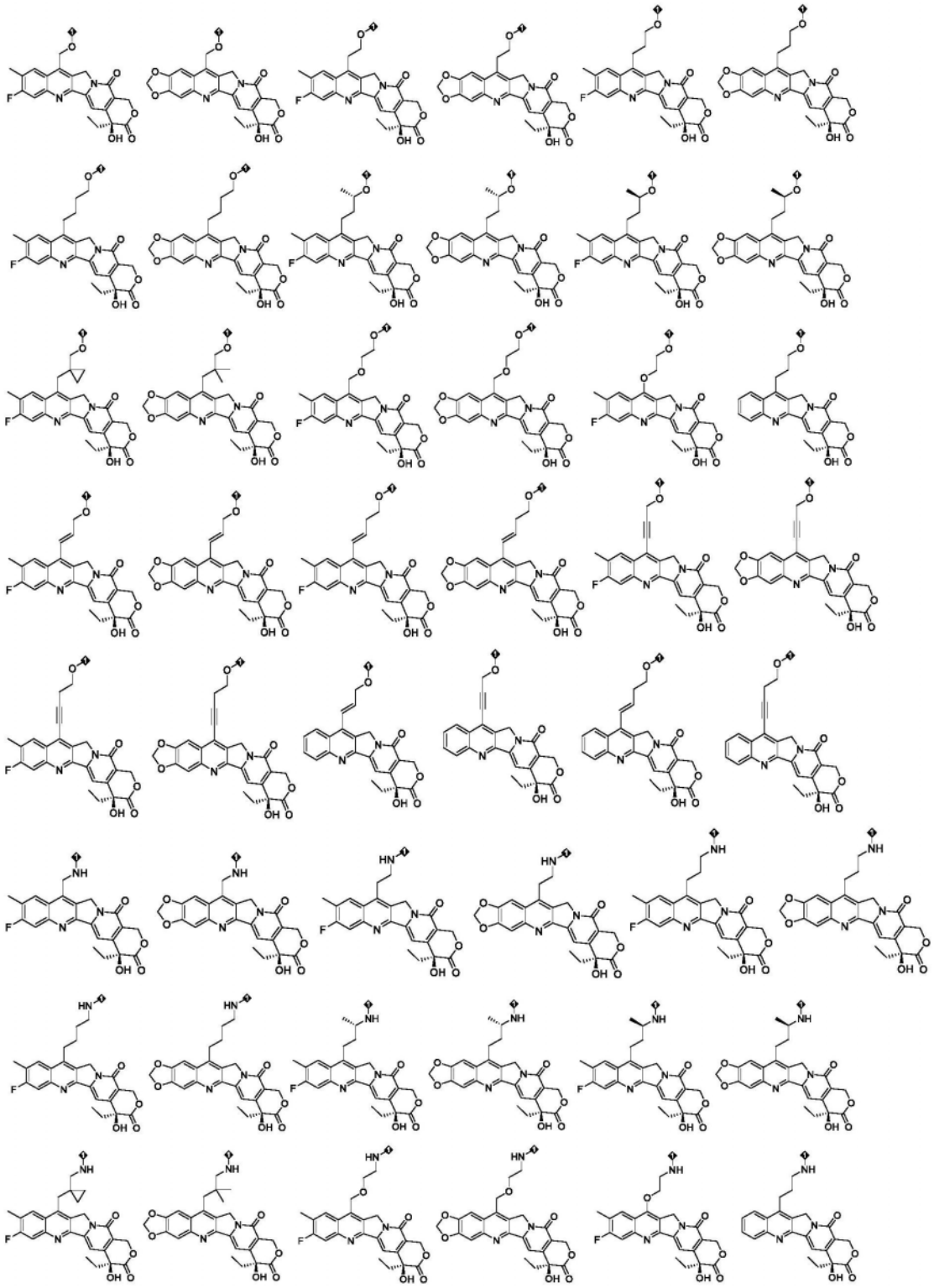
[0254] 

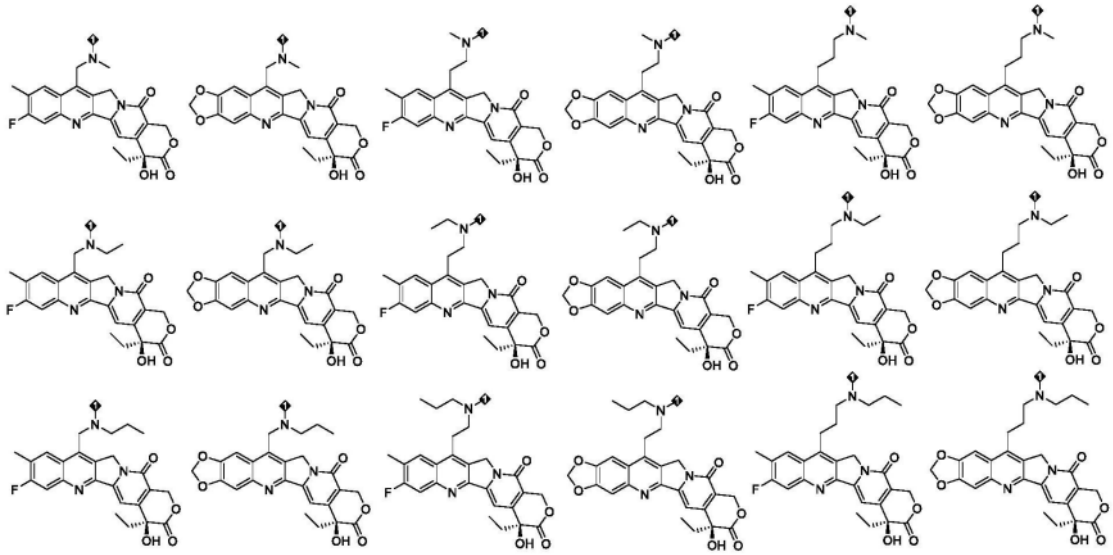
[0255] 其中,1位与Tb相连,2位与W相连。

[0256] 在一些实施方案中,D为  所示的结构片段;1位与L_3或L_4连接;例如  、  、  。

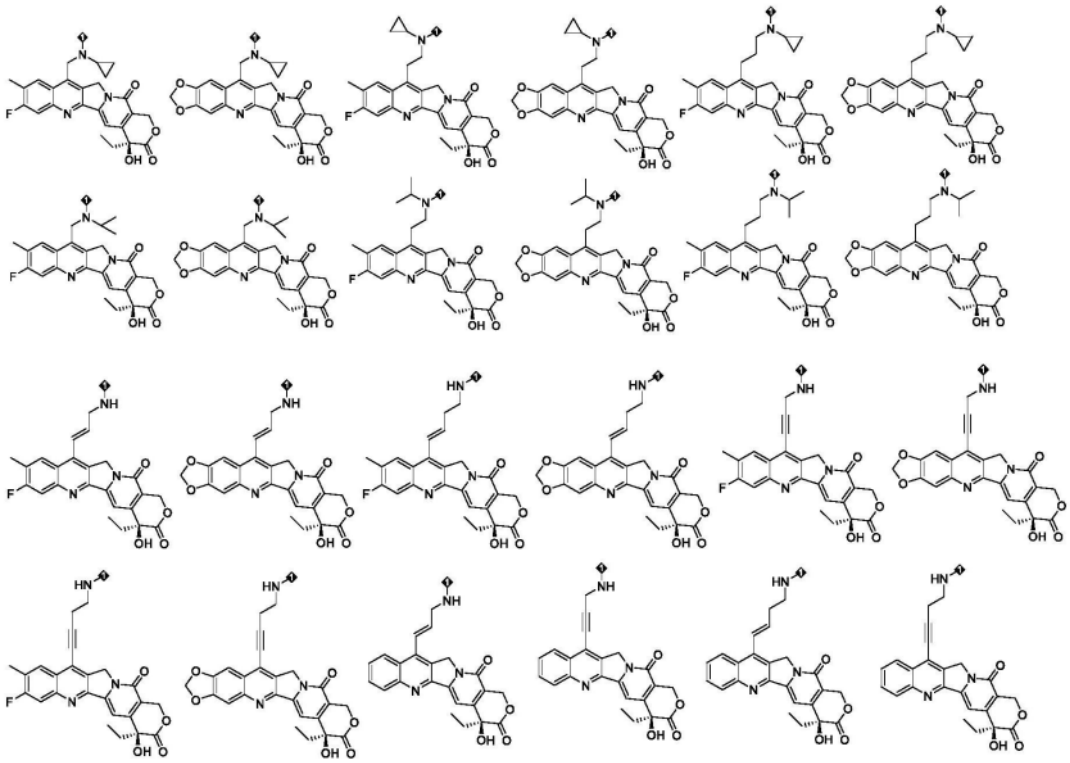
[0257] 在一些实施方案中,  的结构选自以下结构片段:

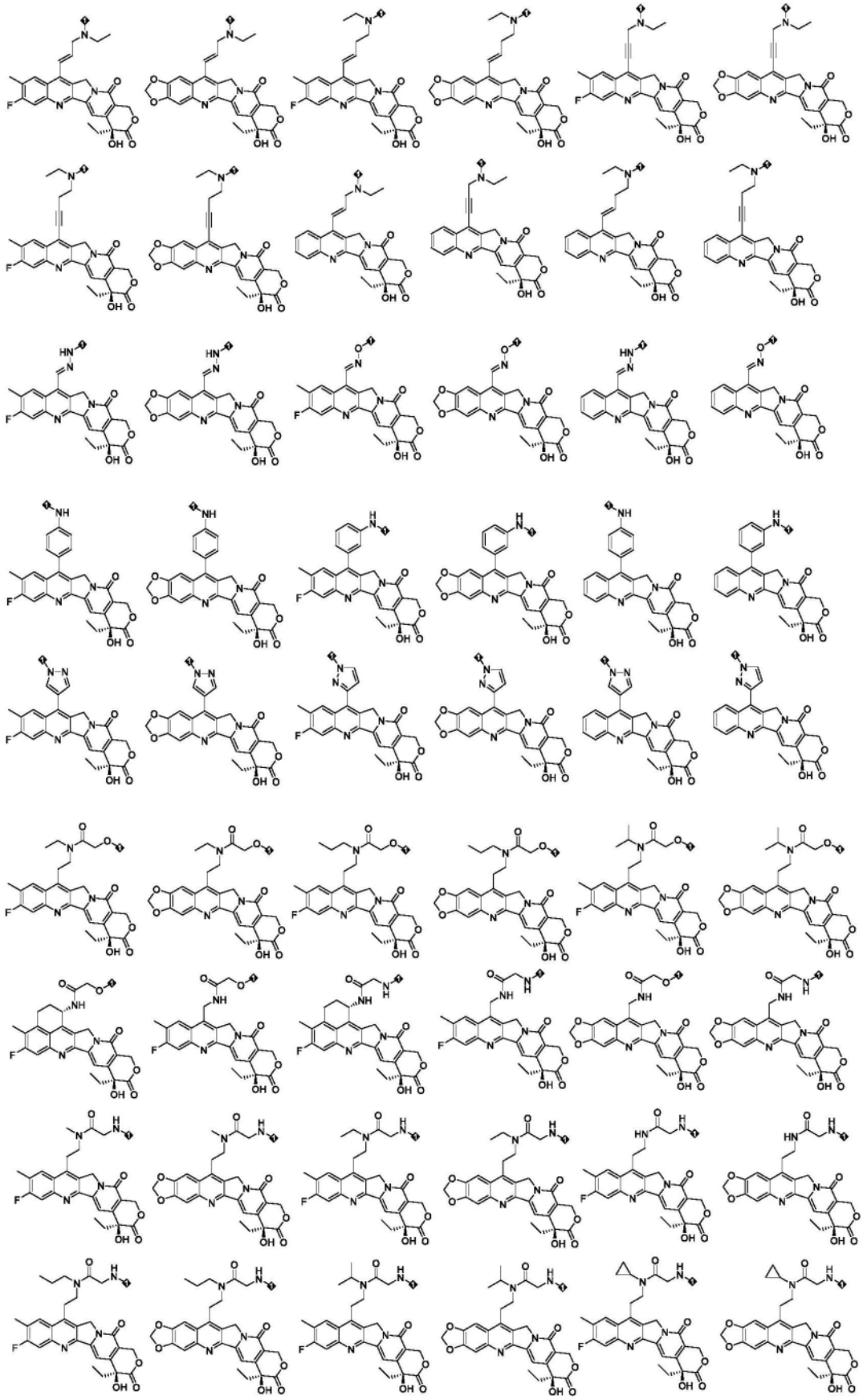
[0258]





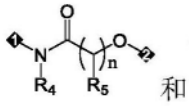
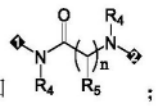
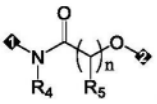
[0259]

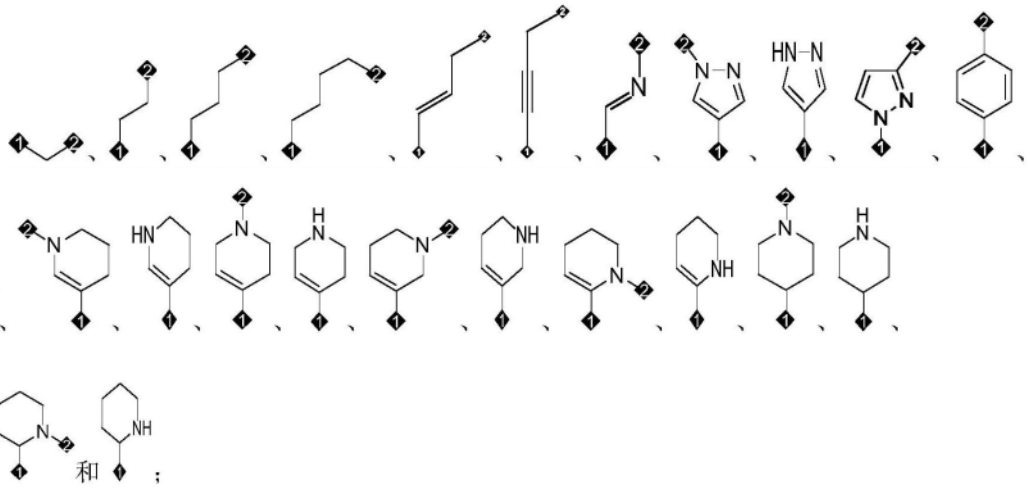


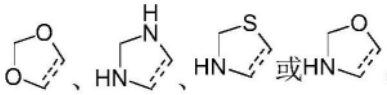
[0260] 

[0261] 其中,1位与L_4相连;当L_4不存在时,1位与L_3相连。

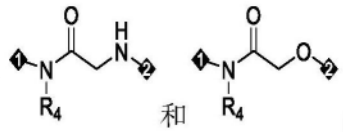
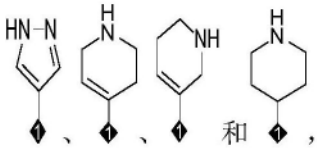
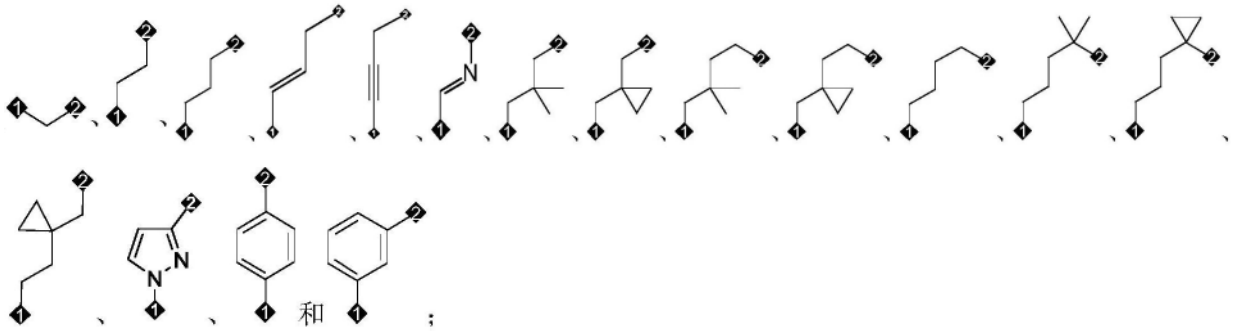
[0262] 在一些实施方案中,

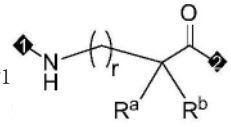
[0263] W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-S-、-NR_4-、  和  ;例如不存在、-O-、-NR_4-或  ;R_4和R_5各自独立地选自H和C1-4烷基;n独立地选自0、1、2、3和4;

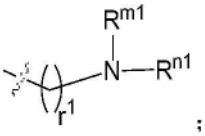
[0264] X选自  ;

[0265] R_1选自H、卤素,R_2选自H、C1-4烷基,或,R_1和R_2和与其相连的碳原子形成  ,虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置;

[0266] R_3选自H和C1-4烷基,或,R_3和X和与其相连的碳原子一起形成5-6元碳环;

[0267] 优选地,W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-NR_4-(例如-NH-、-N(CH_3)-、-N(C_2H_5)-)、  和;R_4独立地选自H、甲基、乙基、异丙基、正丙基、叔丁基和环丙基;W不存在时,X选自  1位和母环相连;W存在时,X选自  ;

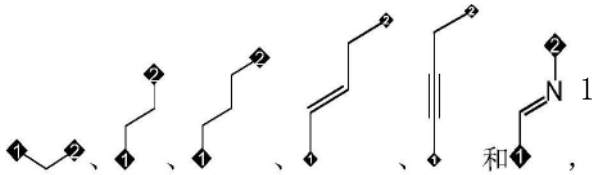
[0268] AA_1  中,r选自0、1、2、3、4和5;

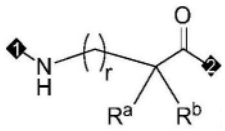
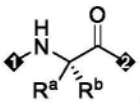
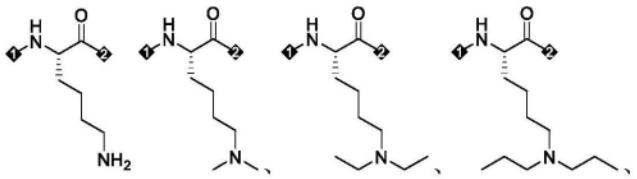
[0269] R^a、R^b中,任一个为H,另一个选自  ;或者,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成被R^0取代的5-6元杂环;

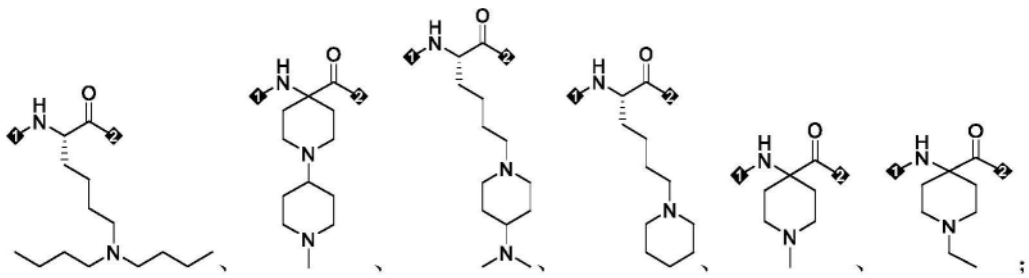
[0270] R_1选自H、卤素,R_2选自H、C1-4烷基,或,R_1和R_2和与其相连的碳原子形成  ;

[0271] R_3选自H和C1-4烷基,或,R_3和X和与其相连的碳原子一起形成R_3和X和与其相连的碳原子一起形成  ;

[0272] 更优选地,W选自-O-和-NR_4-,1位X相连,2位与L_4或L_3相连;

[0273] X选自  1位和母环相连,2位和W相连;

[0274]  为  ,例如 

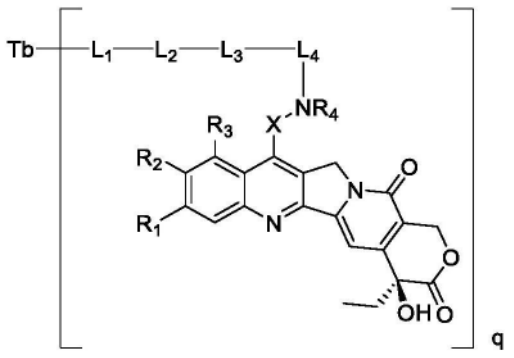
 ;

[0275] R_1为F,

[0276] R_2为甲基或R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  ;

[0277] R_3为H。

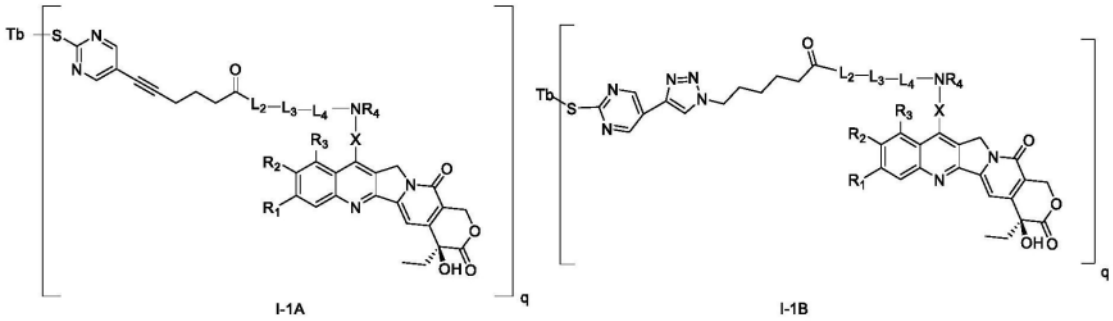
[0278] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I-1所式结构:

[0279] 

I-1 ,

[0280] 其中,Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

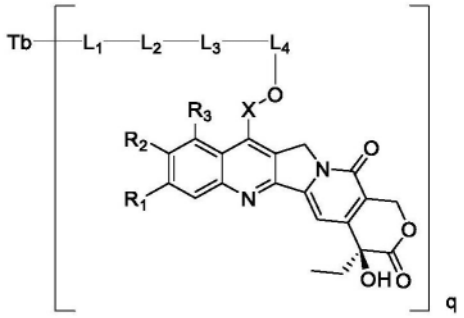
[0281] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I-1A或I-1B所式结构:

[0282] 

I-1A I-1B

[0283] 其中,Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

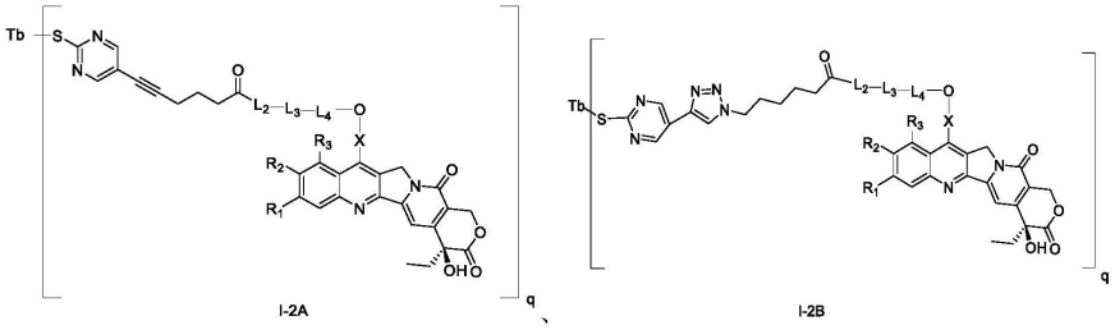
[0284] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I-2所式结构:

[0285] 

I-2

[0286] 其中,Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

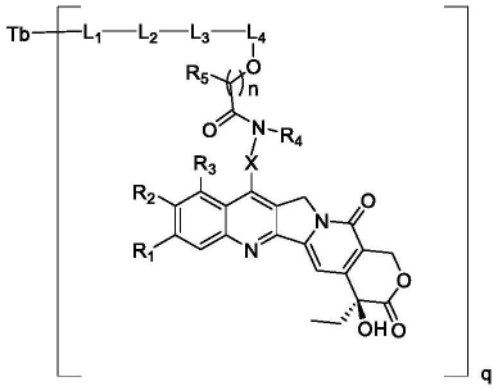
[0287] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I-2A或I-2B所式结构:

[0288] 

I-2A I-2B

[0289] 其中,Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

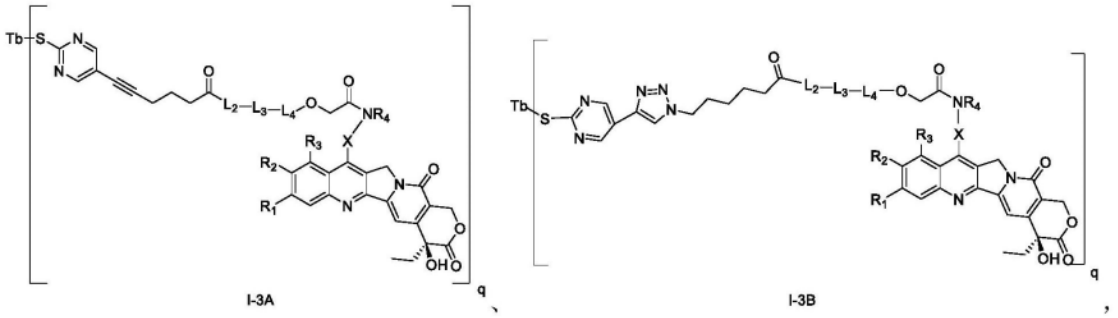
[0290] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I-3所式结构:

[0291] 

I-3

[0292] 其中,Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

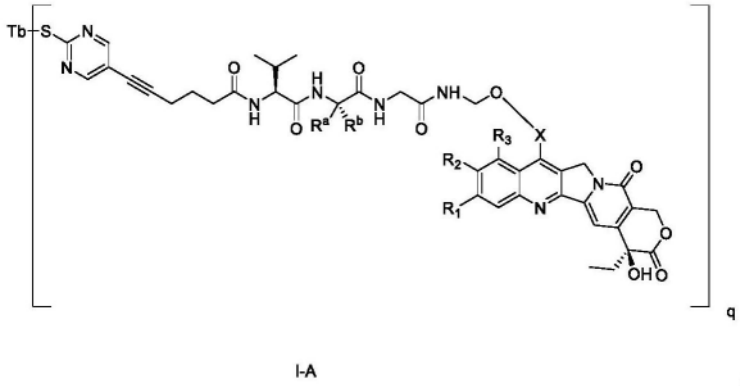
[0293] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I-3A或I-3B所式结构:

[0294] 

I-3A I-3B

[0295] 其中,Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

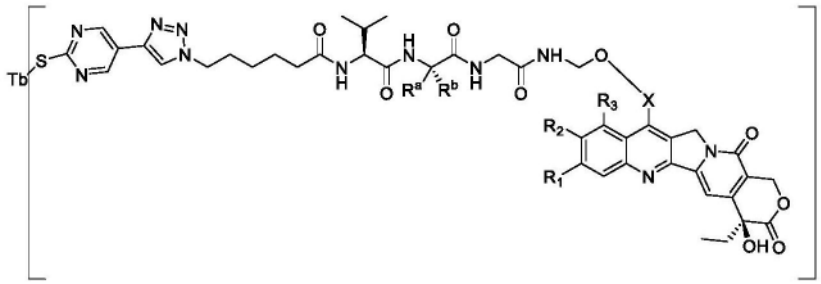
[0296] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I-A所式结构:

[0297] 

I-A

[0298] 其中,Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

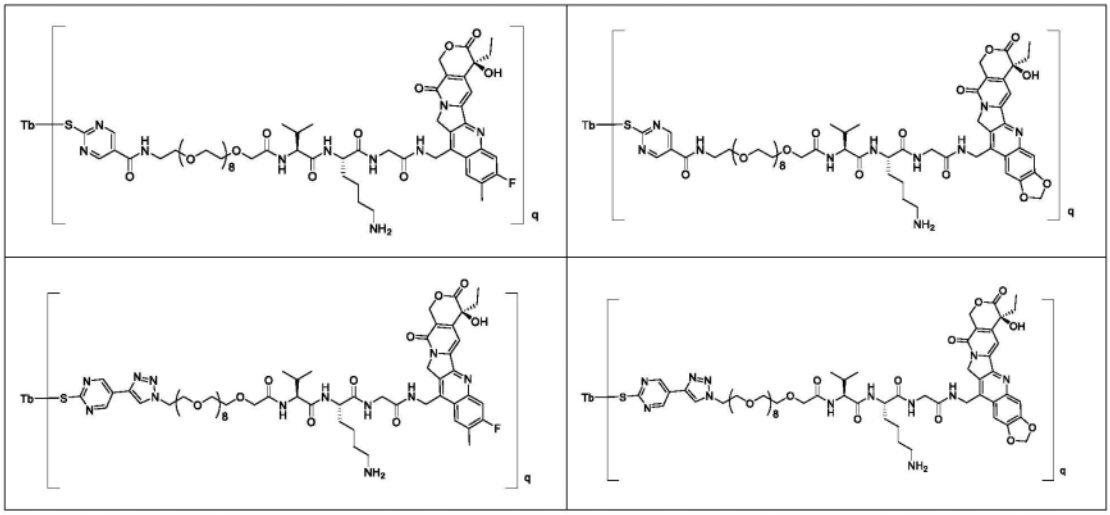
[0299] 在一些实施方案中,配体药物偶联物具有式I-B所式结构:

[0300] 

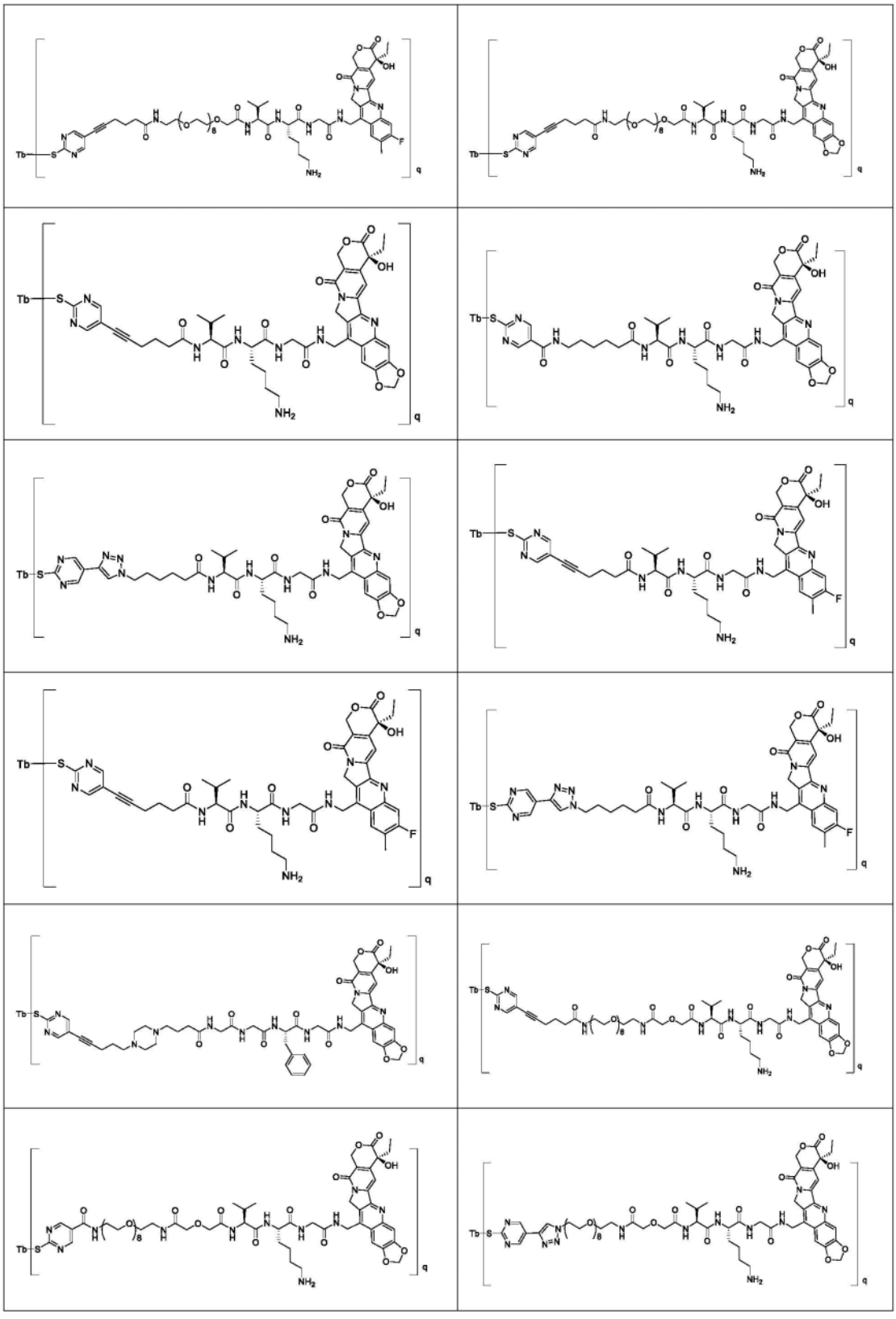
I-B ,

[0301] 其中,Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

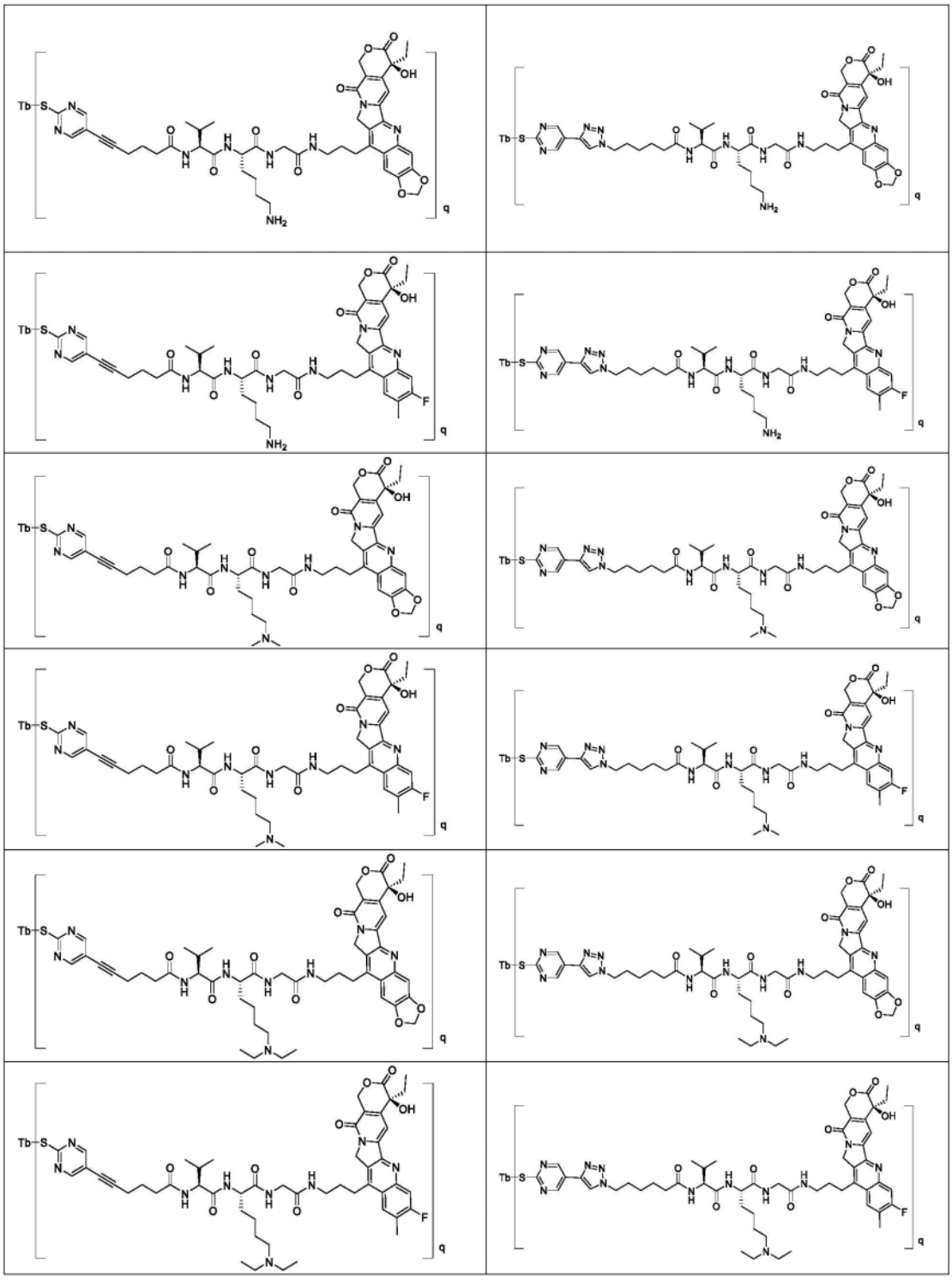
[0302] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自以下:

[0303] 

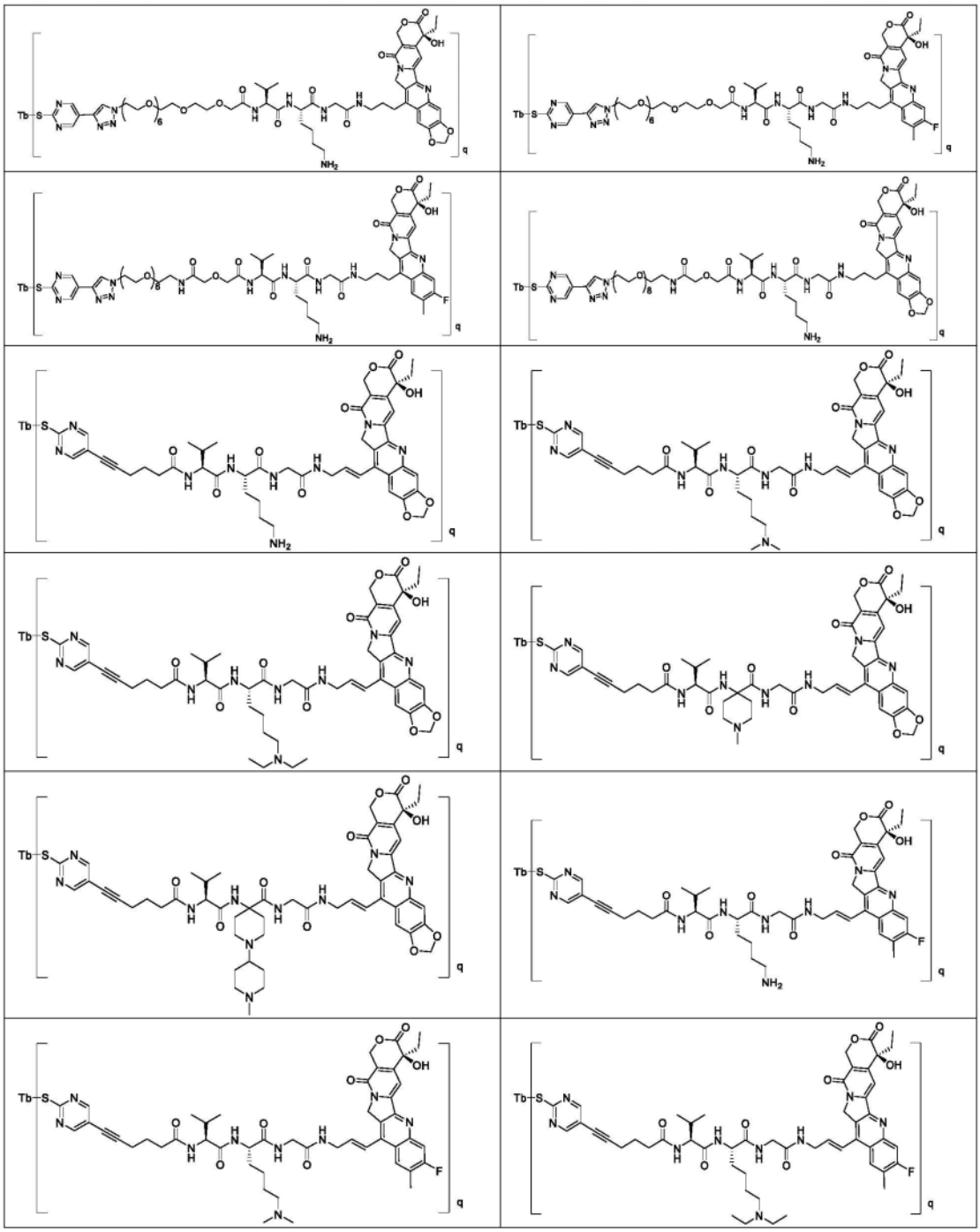
[0304]



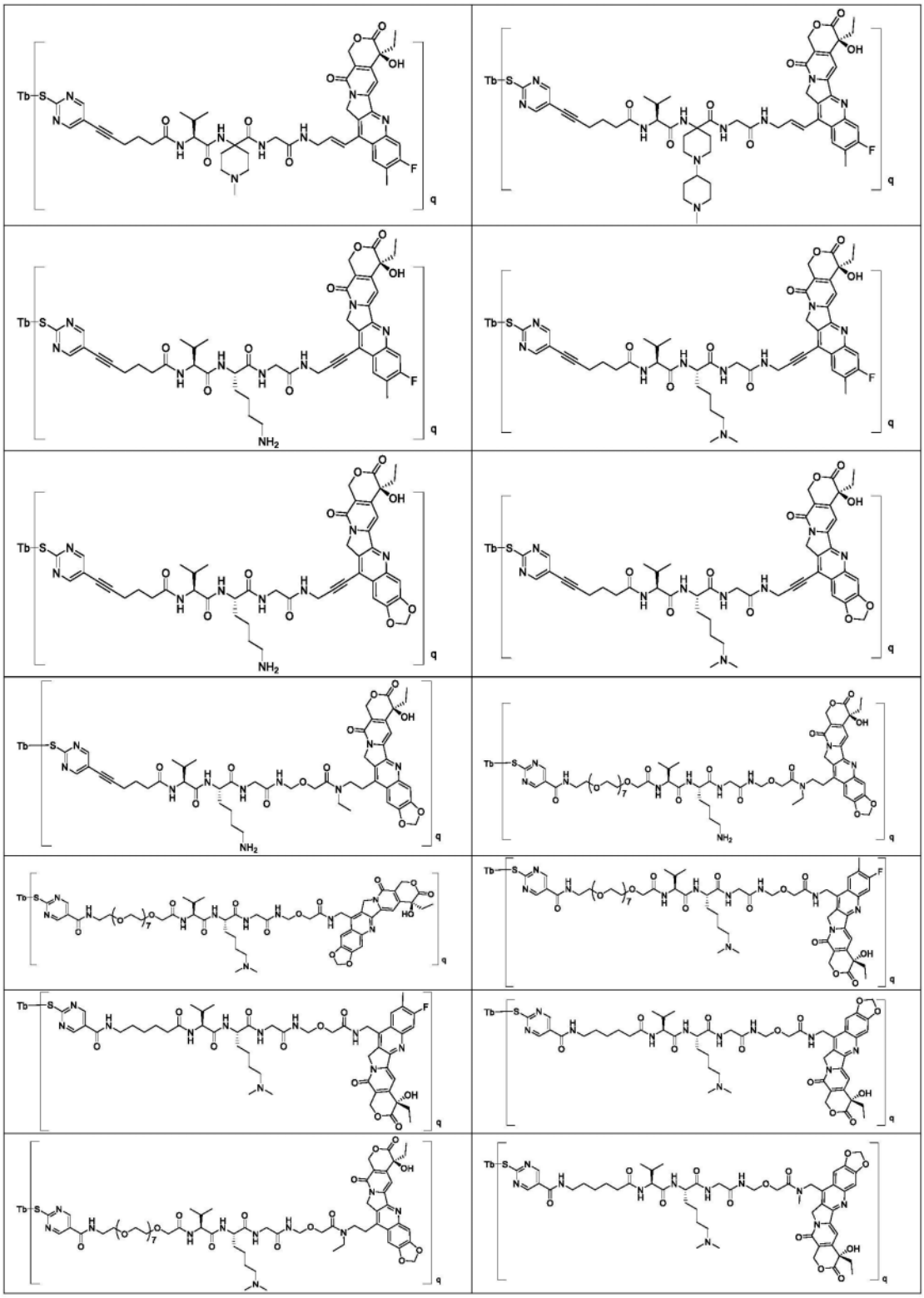
[0305]



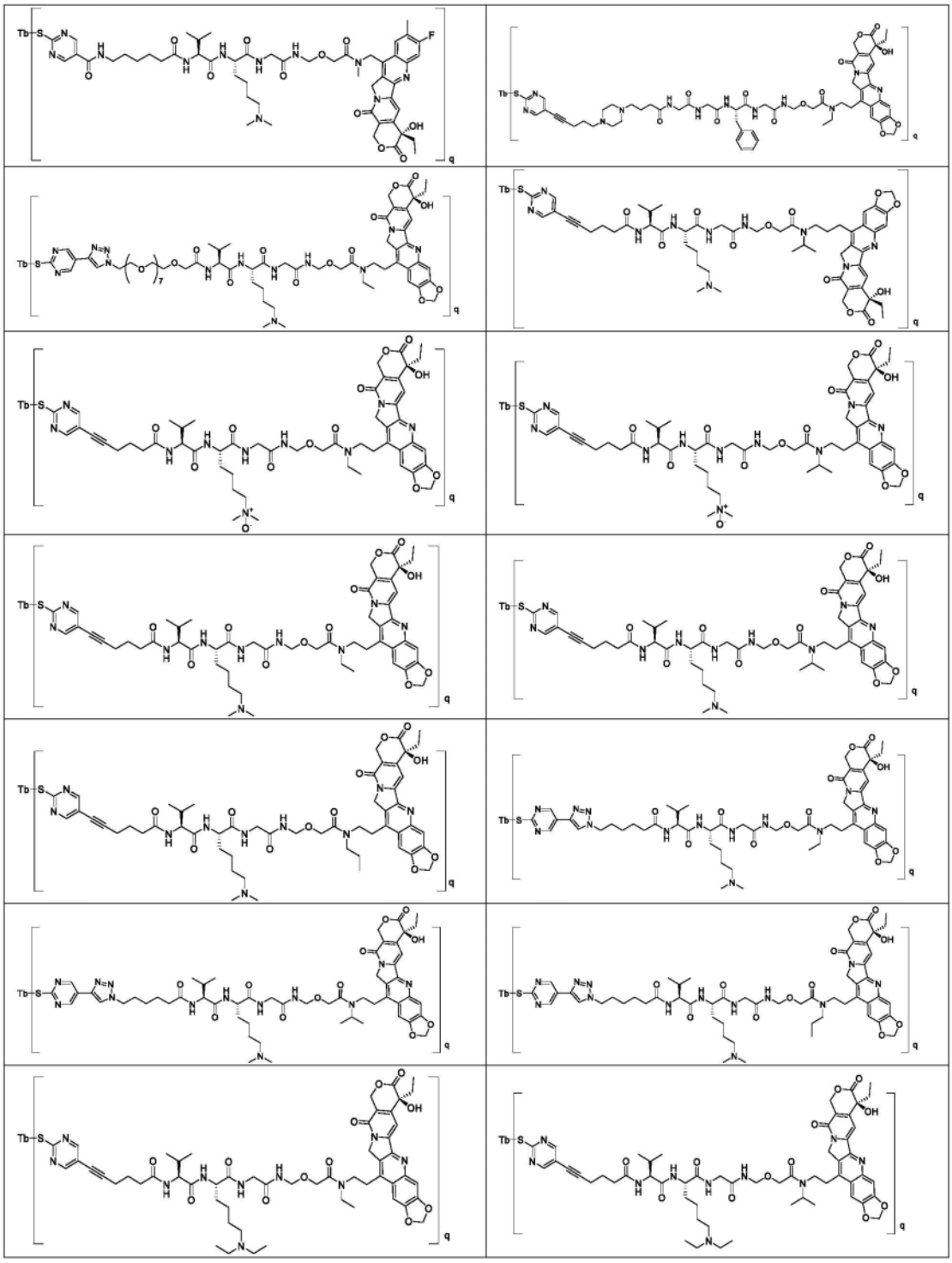
[0306]



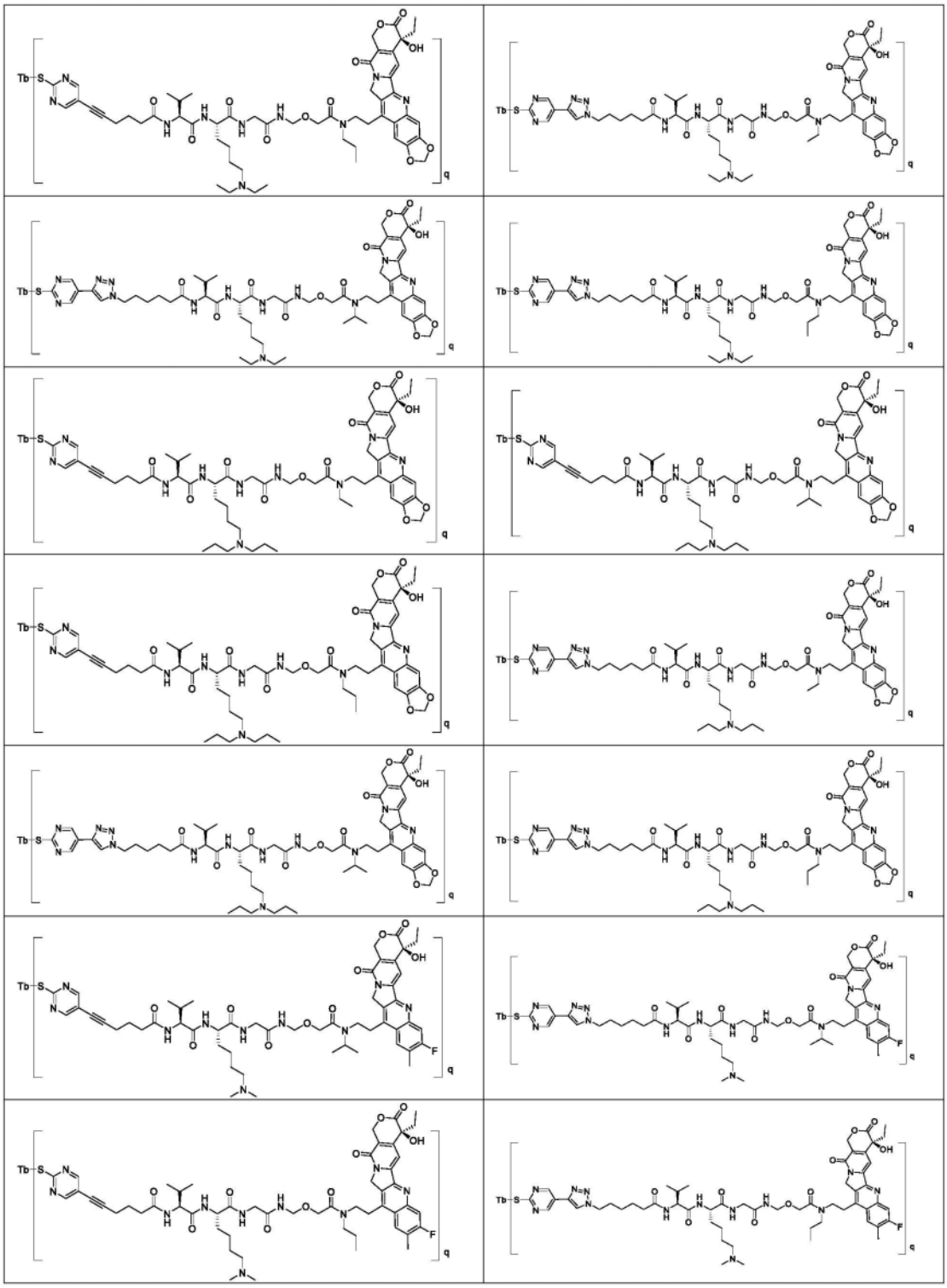
[0307]



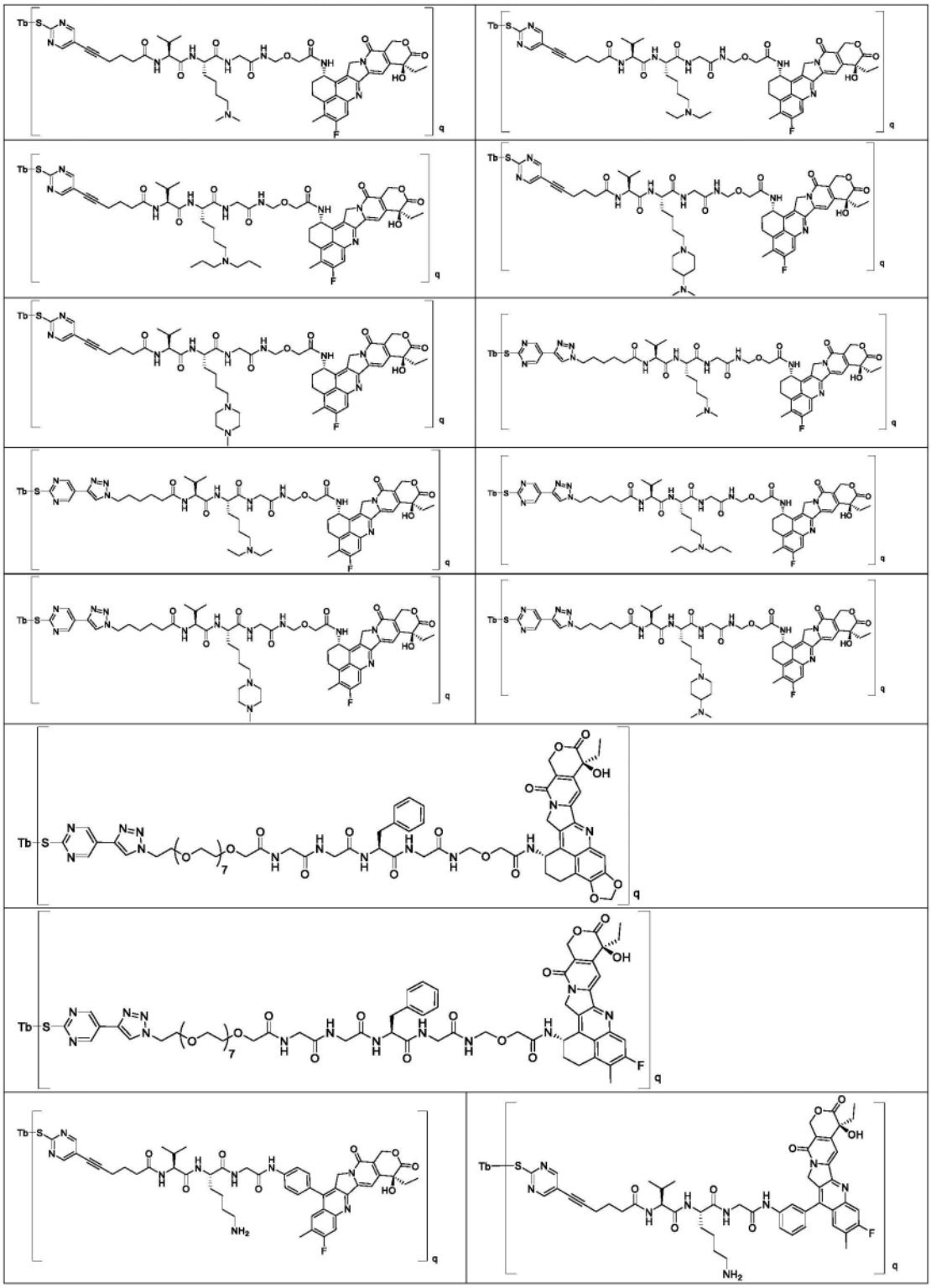
[0308]



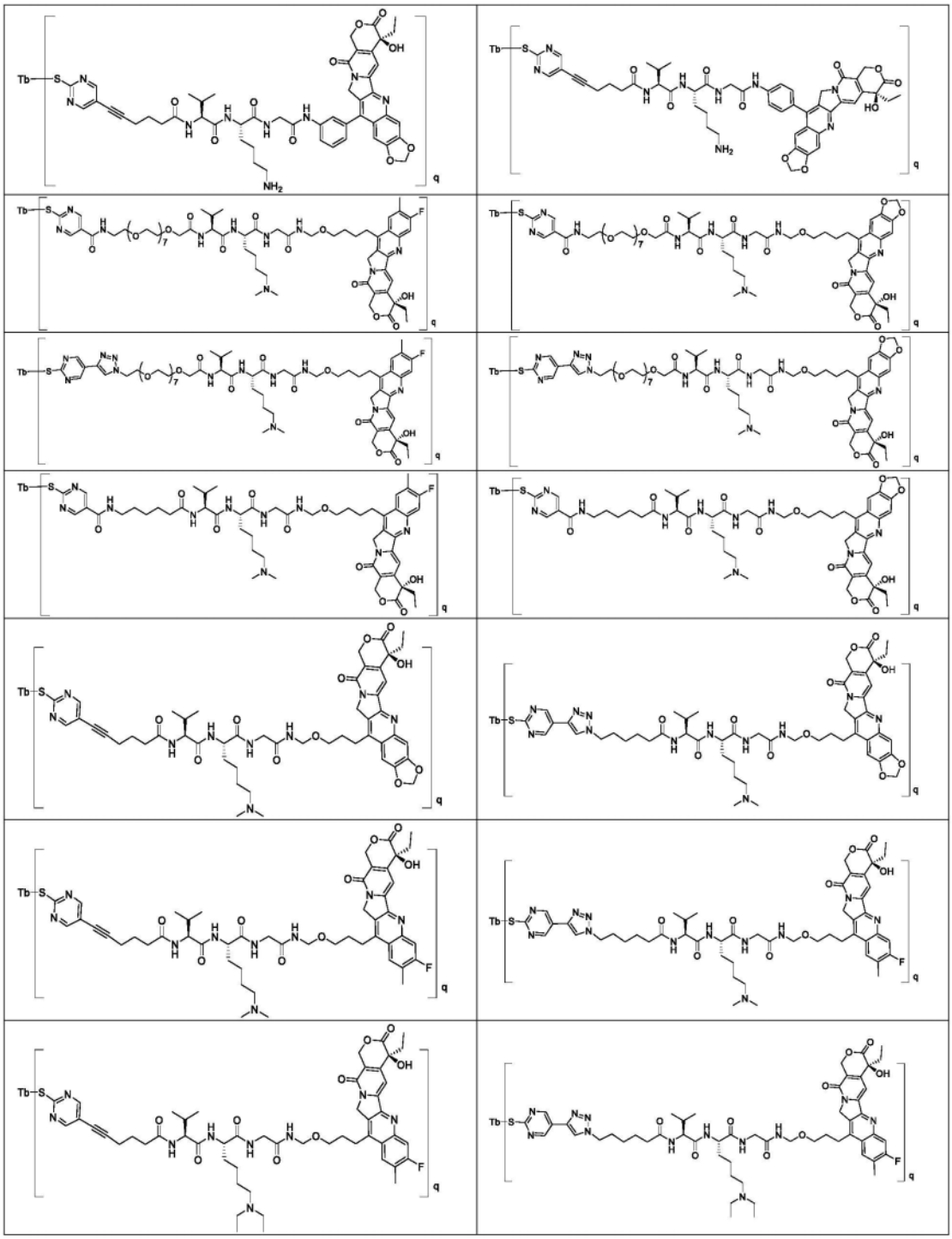
[0309]



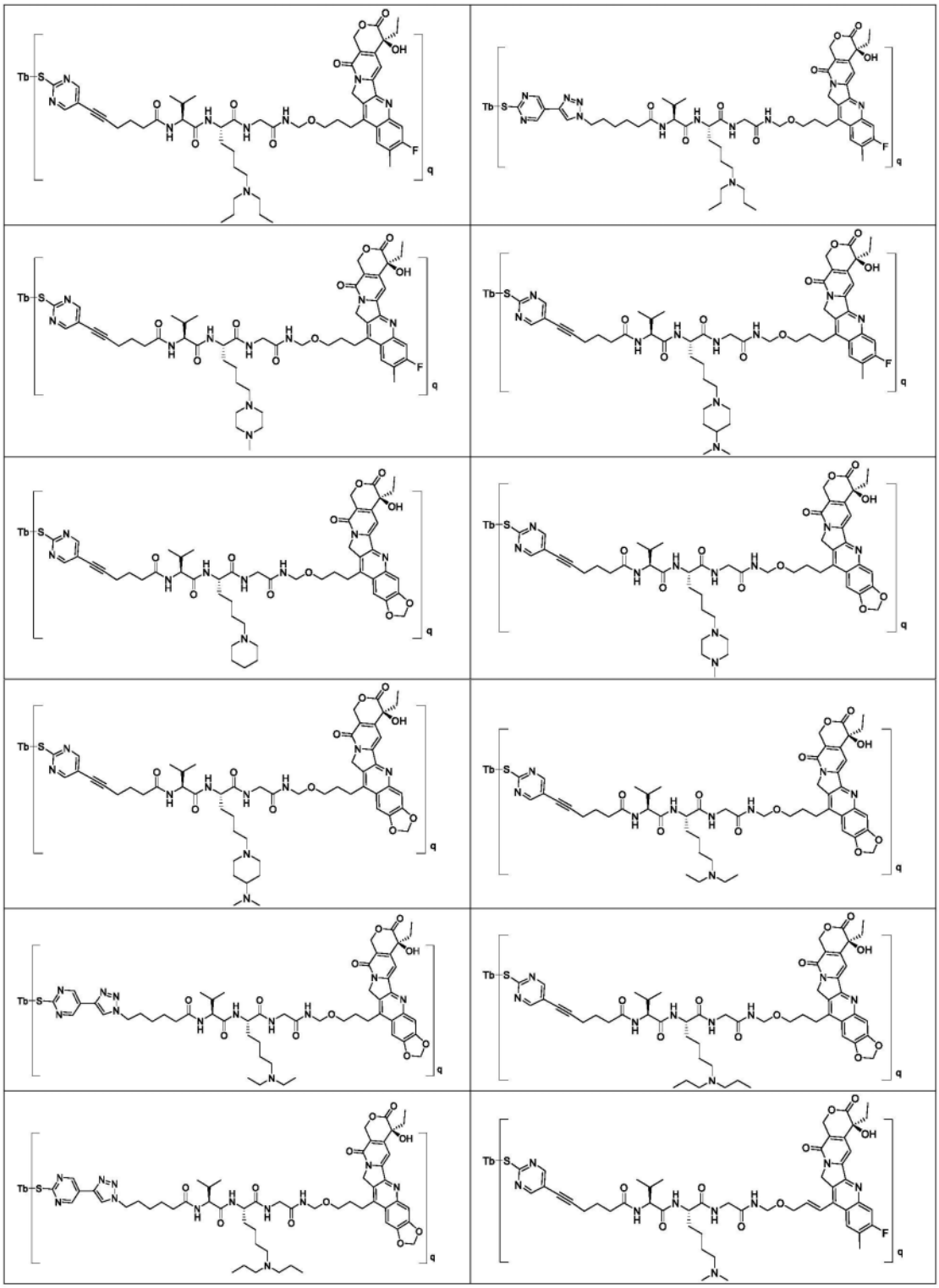
[0310]



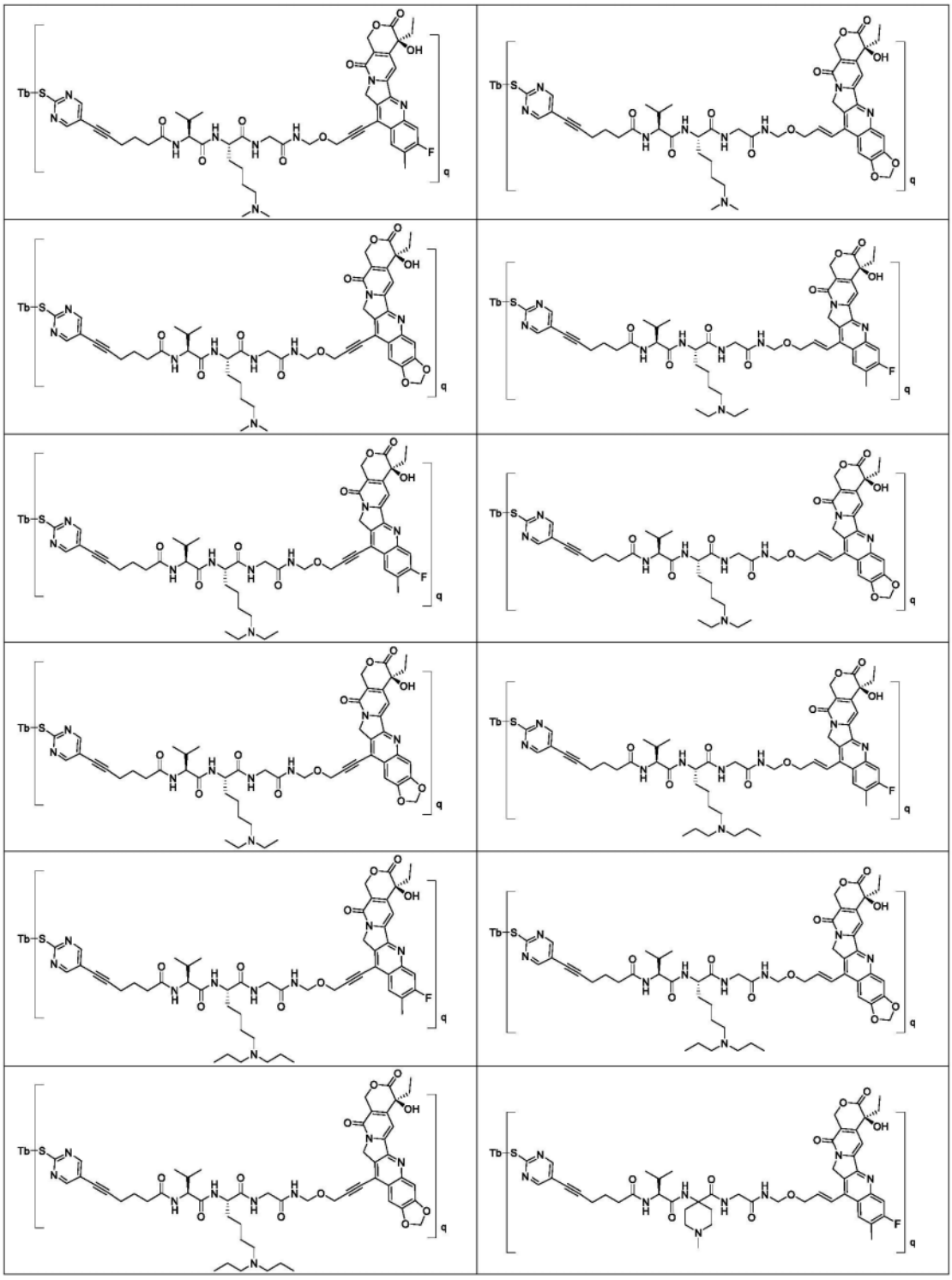
[0311]



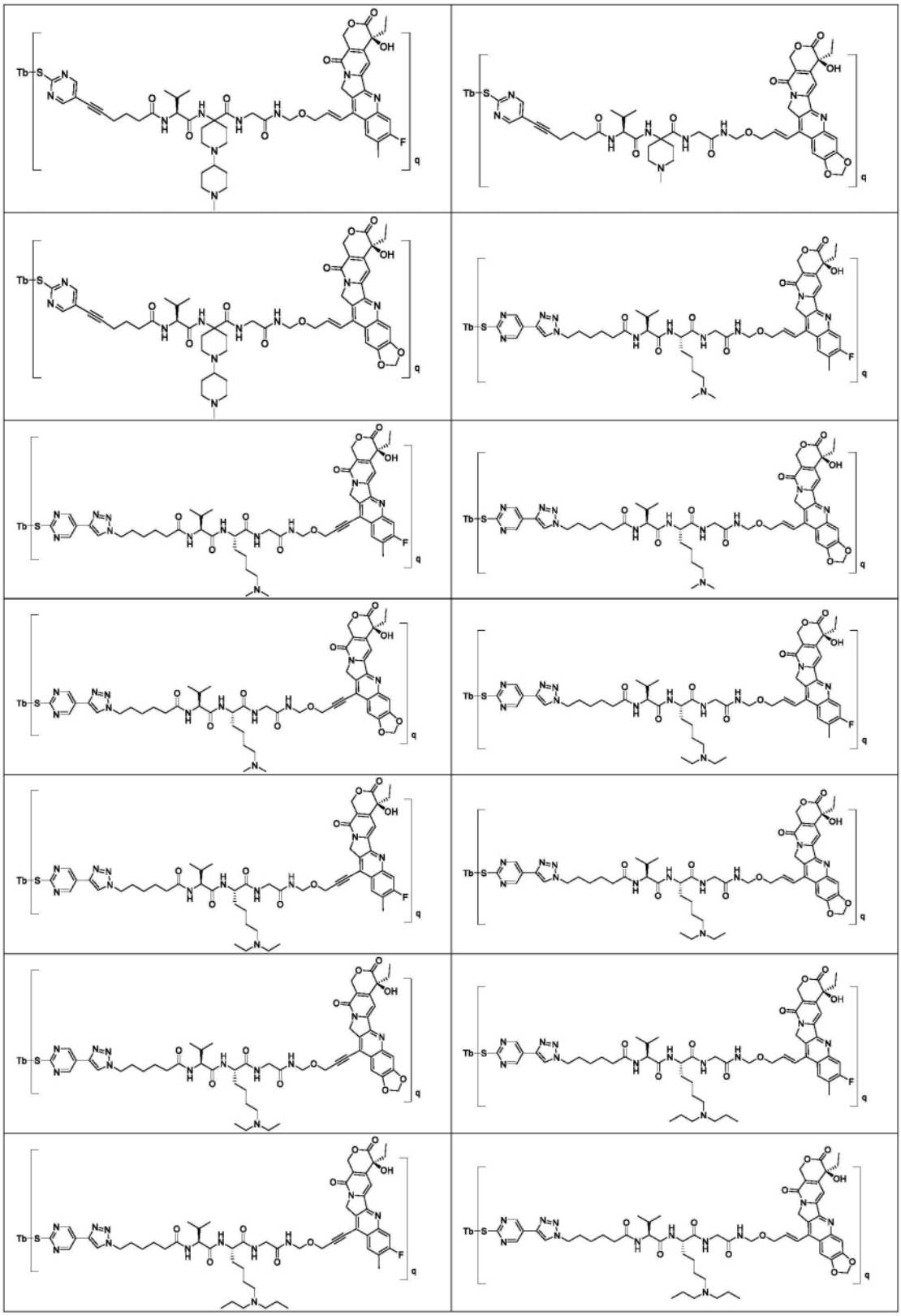
[0312]



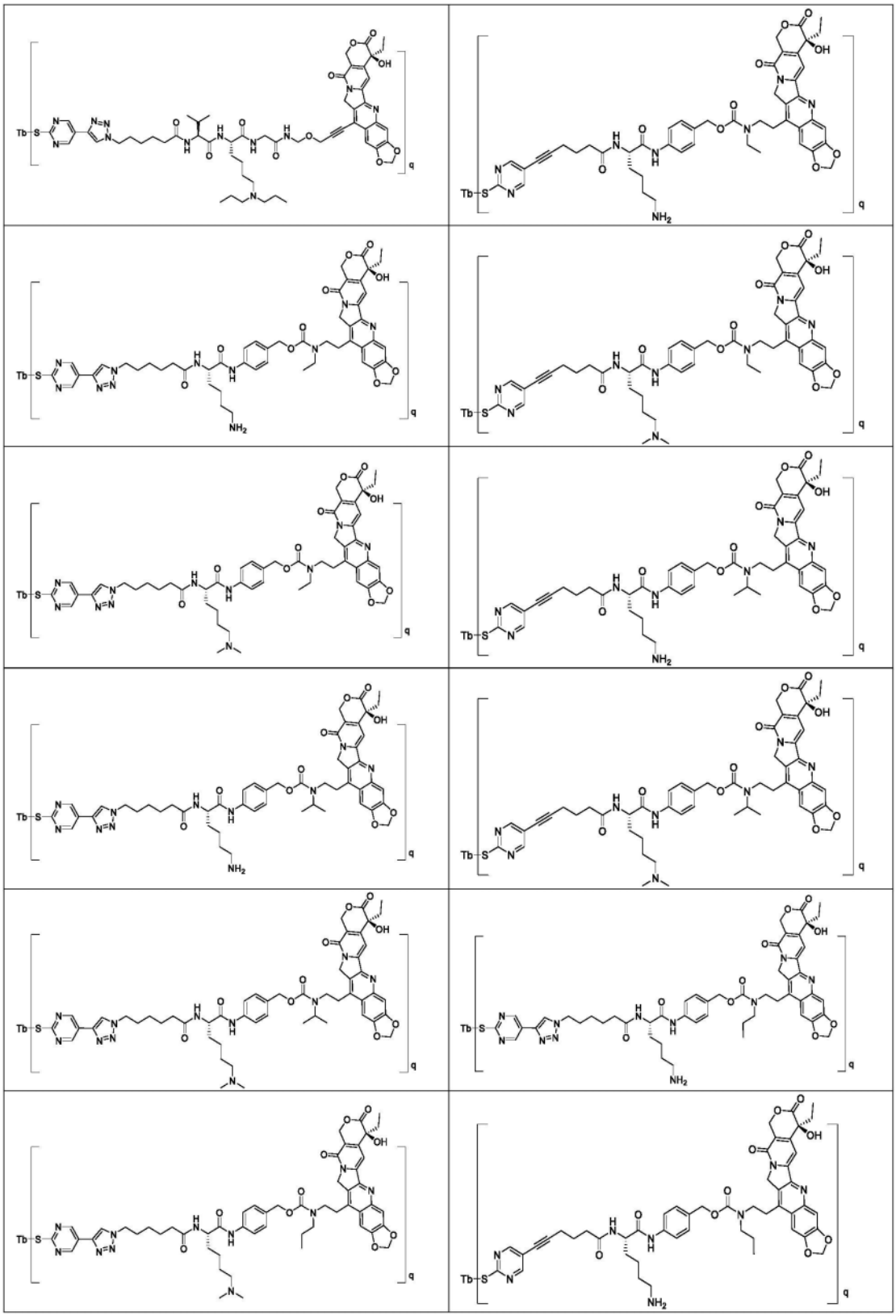
[0313]



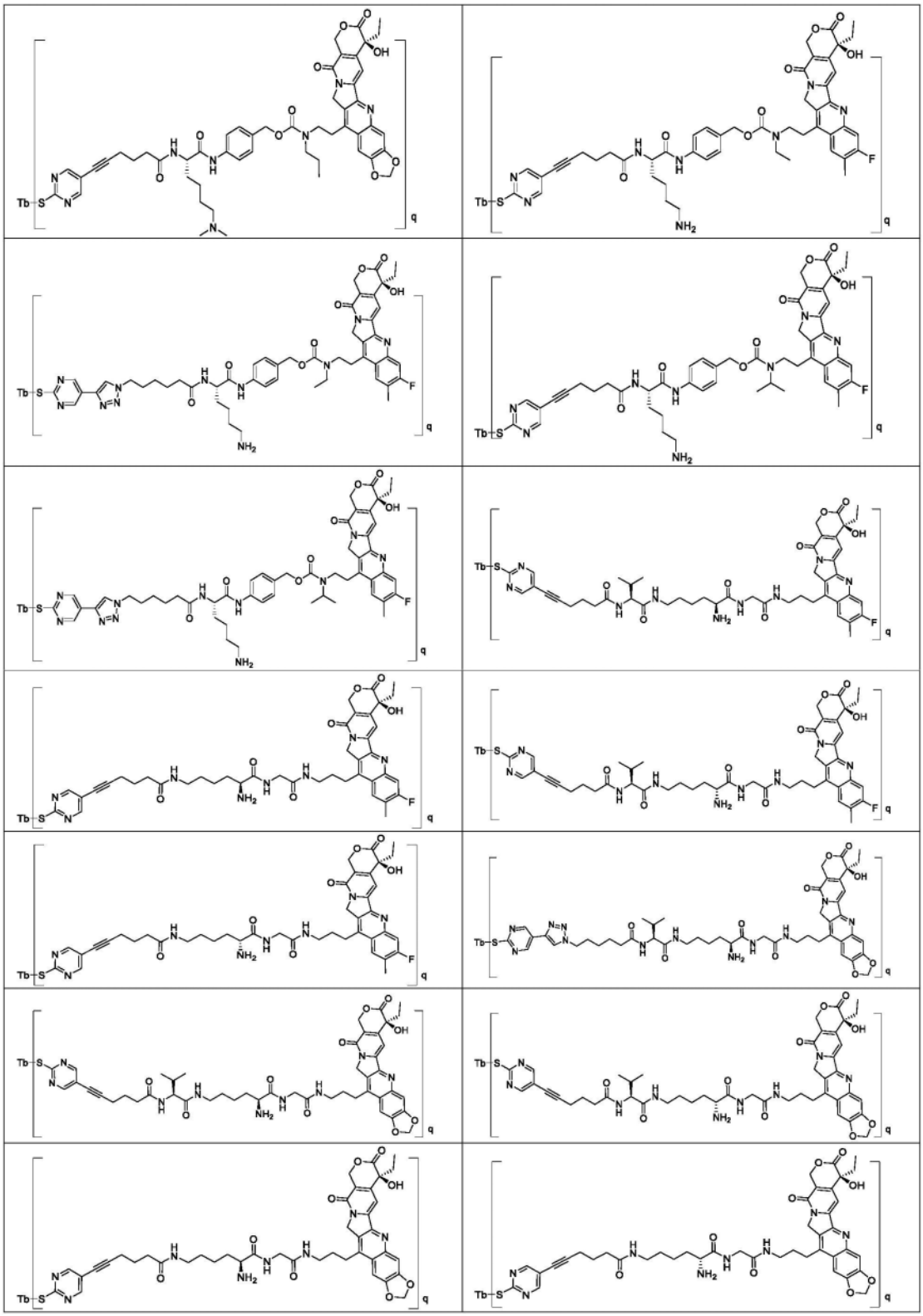
[0314]



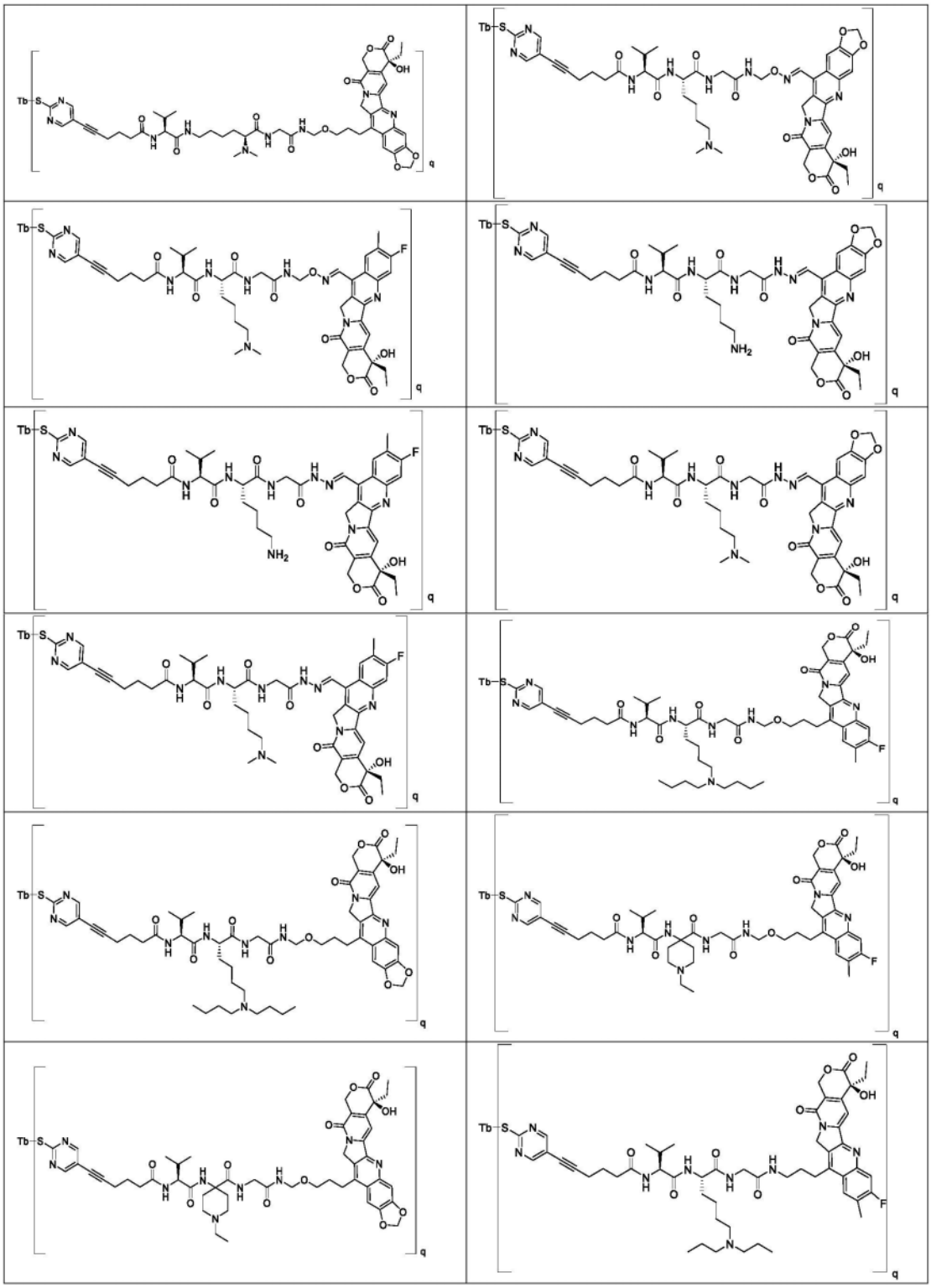
[0315]



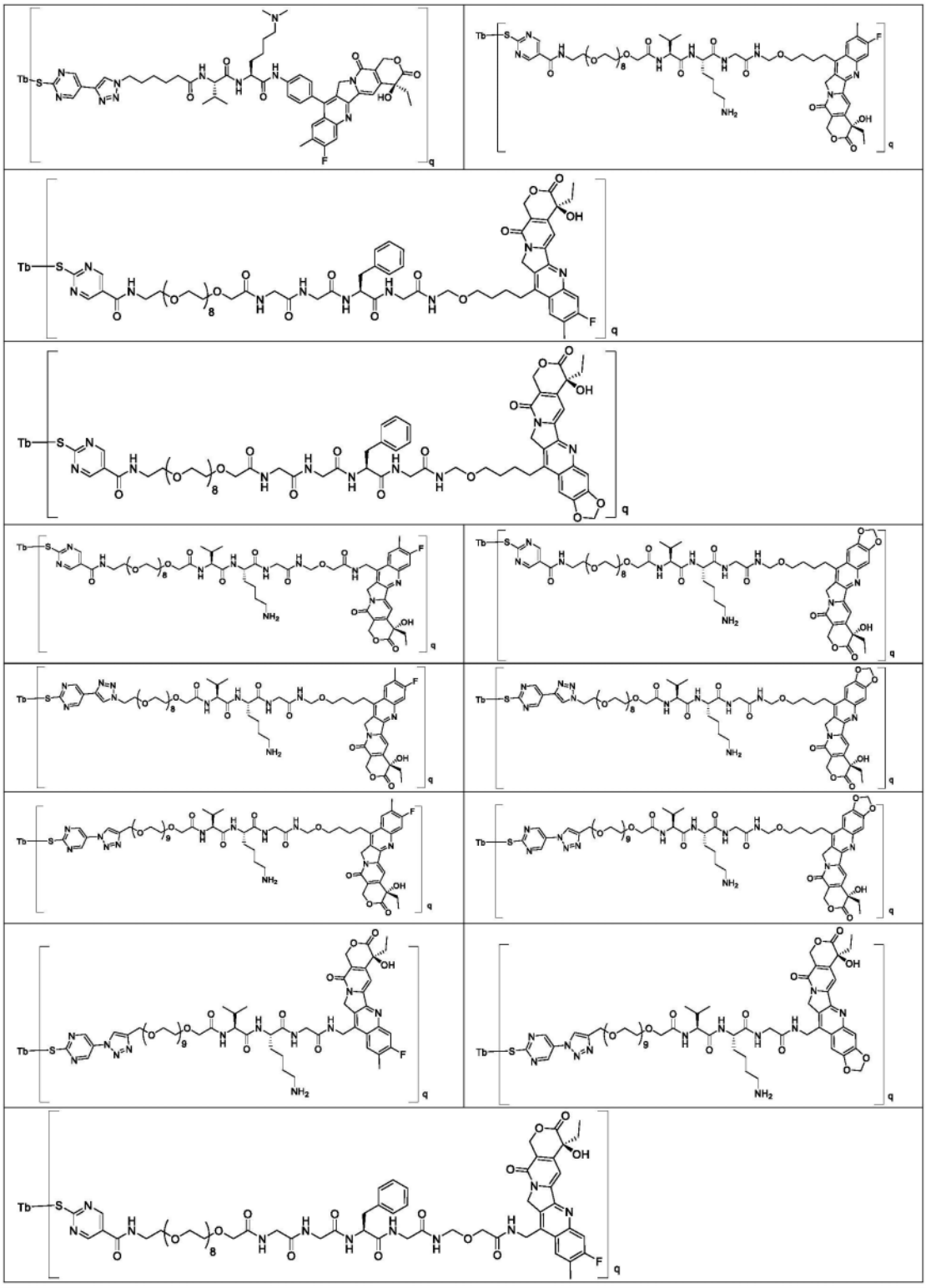
[0316]



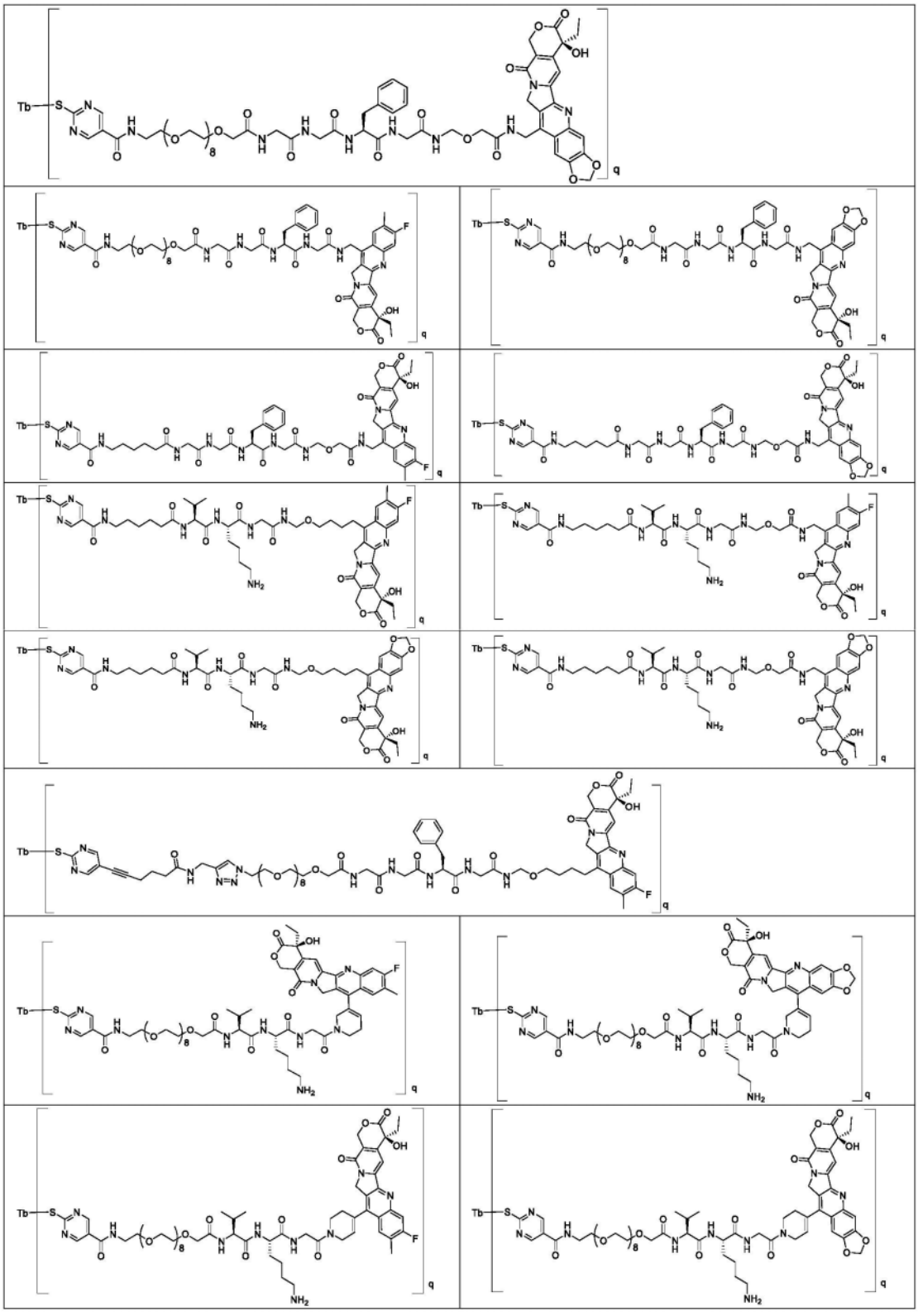
[0317]



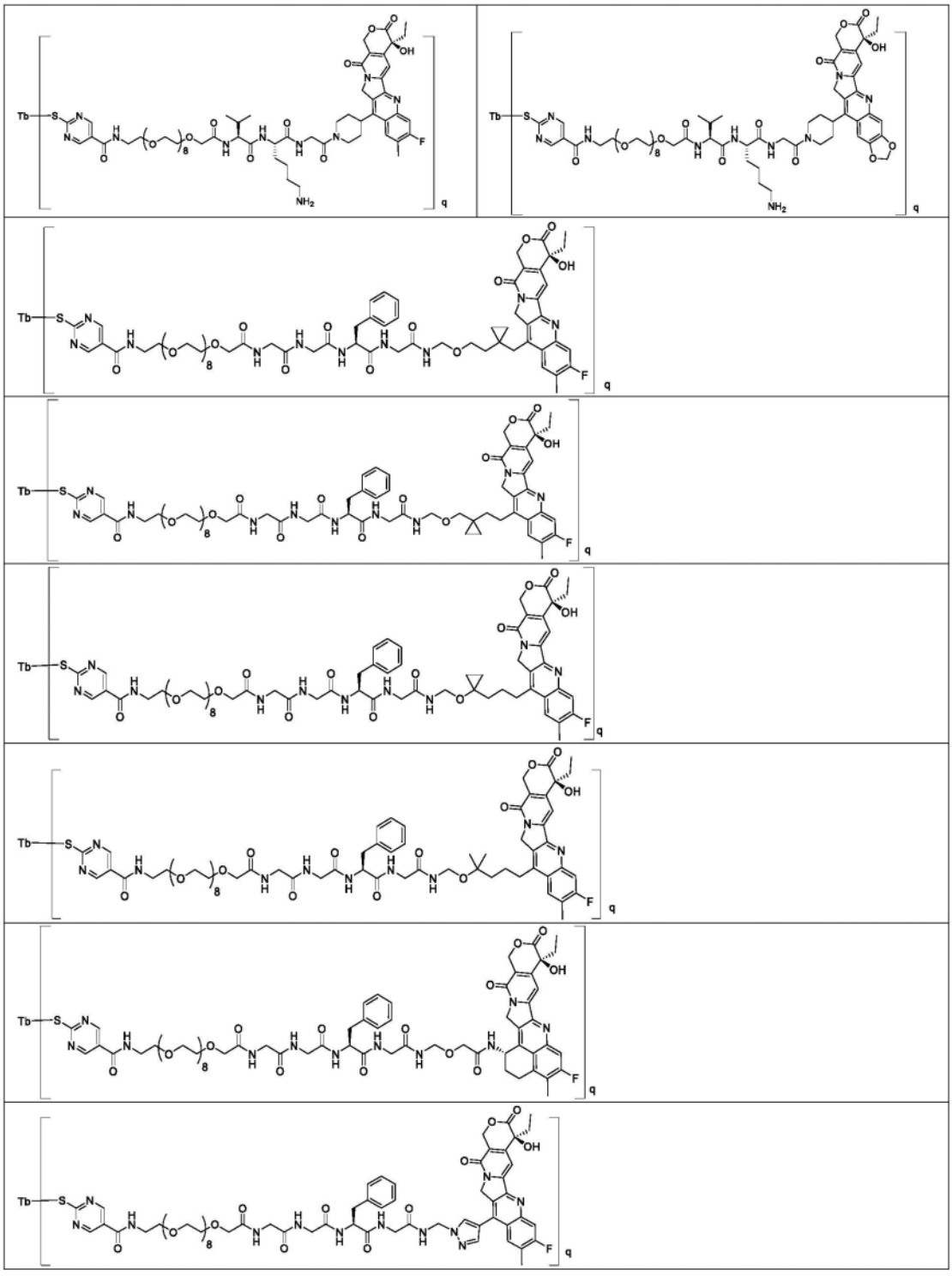
[0318]



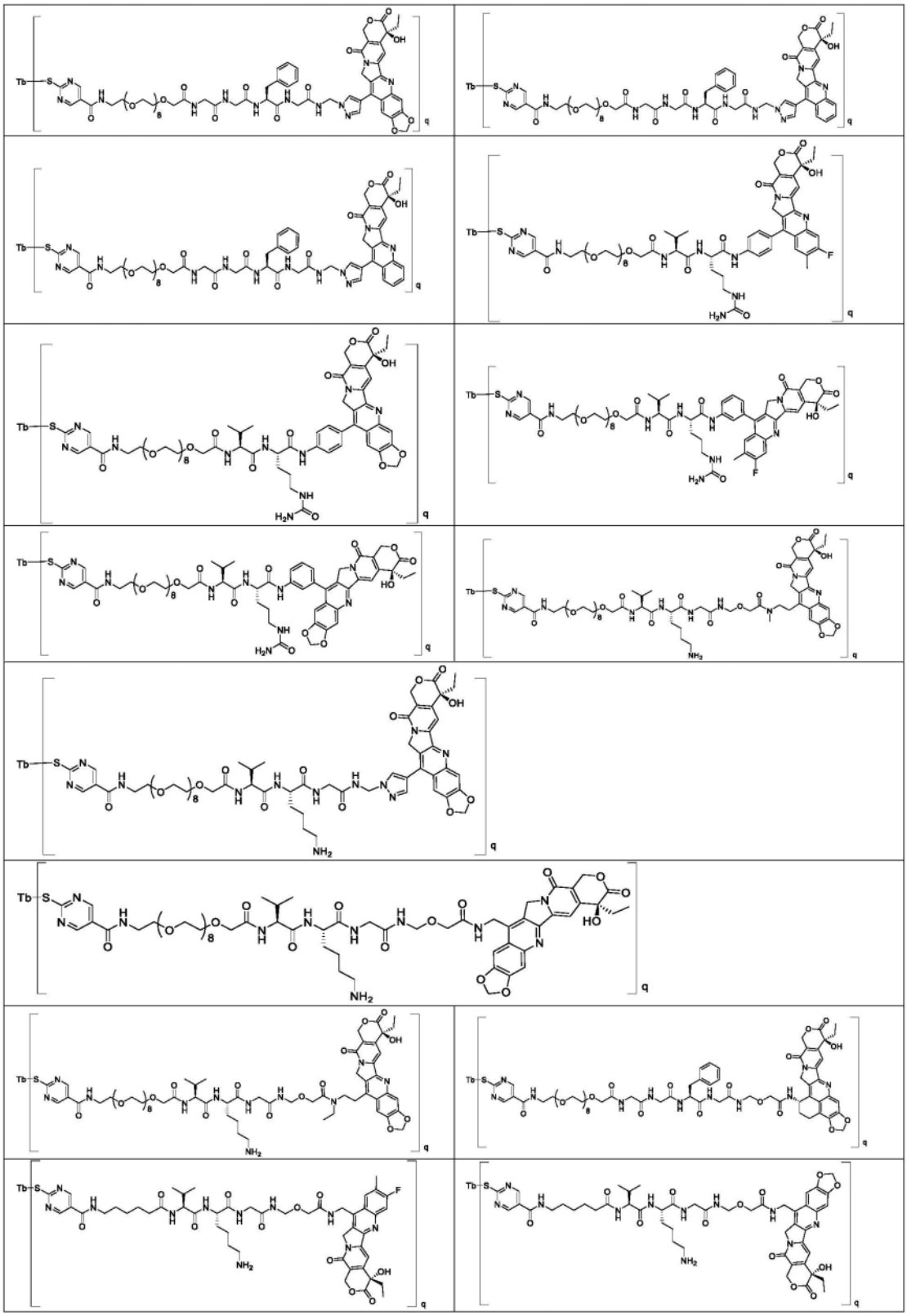
[0319]

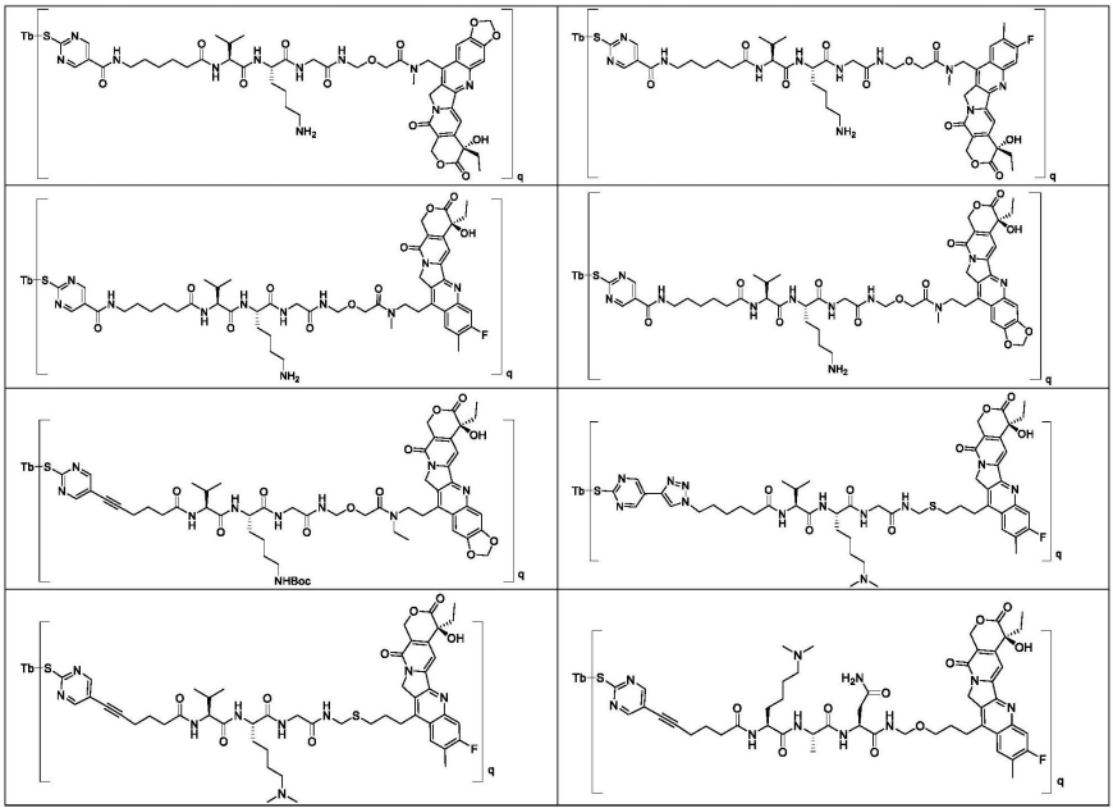


[0320]



[0321]



[0322] 

[0323] 所述Tb的抗体或其抗原结合的片段可以本领域已知的各种方法来制备,例如通过基因工程重组技术来获得。例如,通过化学合成或PCR扩增获得编码本公开抗体的重链和轻链基因的DNA分子。将所得DNA分子插入表达载体内,然后转染宿主细胞。然后,在特定条件下培养转染后的宿主细胞,并表达本公开的抗体。

[0324] 在本公开的部分实施方案中,靶向部分为抗B7H3抗体或其抗原结合的片段。在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体包括所有现有技术中的抗B7H3抗体,例如enoblituzumab,mirzotamab,omburtamab,以及参见CN112521512,WO2021027674,WO2021021543,WO2021006619,CN111662384,CN111454357,WO2020151384,WO2020140094,WO2020103100,WO2020102779,WO2020063673,WO2020047257,WO2020041626,CN110684790,CN110642948,WO2019225787,WO2019226017,US20190338030,CN110305213,WO2018209346,WO2018177393,US9150656,WO2016106004,WO2016044383,WO2016033225,WO2015181267,US20120294796,WO2011109400,CN101104639,WO2004093894,WO2002010187,WO2001018021中的抗B7H3抗体。在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段选自:CN 103687945 B中编号M30-H1-L4抗体和CN 109069633 A中编号mAb-C-DUBA的抗体。

[0325] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR)的抗体或其抗原结合片段,其中CDR按IMGT编号系统定义:

[0326] (a)序列为SEQ ID NO:10的HCDR1,序列为SEQ ID NO:11的HCDR2,序列为SEQ ID NO:12的HCDR3;和/或,

[0327] 序列为SEQ ID NO:20的LCDR1,序列为GTF的LCDR2,序列为SEQ ID NO:22的LCDR3;

[0328] (b)序列为SEQ ID NO:10的HCDR1,序列为SEQ ID NO:11的HCDR2,序列为SEQ ID NO:12的HCDR3;和/或,

[0329] 序列为SEQ ID NO:40的LCDR1,序列为GAS的LCDR2,序列为SEQ ID NO:42的LCDR3;

[0330] (c)序列为SEQ ID NO:30的HCDR1,序列为SEQ ID NO:31的HCDR2,序列为SEQ ID NO:32的HCDR3;和/或,

[0331] 序列为SEQ ID NO:40的LCDR1,序列为GAS的LCDR2,序列为SEQ ID NO:42的LCDR3;或

[0332] (d)序列为SEQ ID NO:30的HCDR1,序列为SEQ ID NO:31的HCDR2,序列为SEQ ID NO:32的HCDR3;和/或,

[0333] 序列为SEQ ID NO:20的LCDR1,序列为GTF的LCDR2,序列为SEQ ID NO:22的LCDR3。

在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段,按IMGT编号系统定义,包含:

[0334] 含有(a)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(a)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;

[0335] 含有(b)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(b)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;

[0336] 含有(c)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(c)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;或

[0337] 含有(d)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(d)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL。

[0338] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR),其中CDR按Chothia编号系统定义:

[0339] (a)序列为SEQ ID NO:4的HCDR1,序列为SEQ ID NO:5的HCDR2,序列为SEQ ID NO:6的HCDR3;和/或,

[0340] 序列为SEQ ID NO:14的LCDR1,序列为SEQ ID NO:15的LCDR2,序列为SEQ ID NO:16的LCDR3;

[0341] (b)序列为SEQ ID NO:24的HCDR1,序列为SEQ ID NO:25的HCDR2,序列为SEQ ID NO:26的HCDR3;和/或,

[0342] 序列为SEQ ID NO:34的LCDR1,序列为SEQ ID NO:35的LCDR2,序列为SEQ ID NO:36的LCDR3;

[0343] (c)序列为SEQ ID NO:4的HCDR1,序列为SEQ ID NO:5的HCDR2,序列为SEQ ID NO:6的HCDR3;和/或,

[0344] 序列为SEQ ID NO:34的LCDR1,序列为SEQ ID NO:35的LCDR2,序列为SEQ ID NO:36的LCDR3;

[0345] 或

[0346] (d)序列为SEQ ID NO:24的HCDR1,序列为SEQ ID NO:25的HCDR2,序列为SEQ ID NO:26的HCDR3;和/或,

[0347] 序列为SEQ ID NO:14的LCDR1,序列为SEQ ID NO:15的LCDR2,序列为SEQ ID NO:16的LCDR3。

[0348] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段,按Chothia编号系统定义,包含:

[0349] 含有(a)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(a)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;

[0350] 含有(b)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(b)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;

[0351] 含有(c)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(c)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;或

[0352] 含有(d)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(d)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL。

[0353] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR),其中CDR按kabat编号系统定义:

[0354] (a)序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[0355] 序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3;

[0356] (b)序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[0357] 序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[0358] (c)序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[0359] 序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[0360] 或

[0361] (d)序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[0362] 序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3。

[0363] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段,按kabat编号系统定义,包含:

[0364] 含有(a)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(a)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;

[0365] 含有(b)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(b)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;

[0366] 含有(c)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(c)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL;或

[0367] 含有(d)中重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有(d)轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL。

[0368] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含:

[0369] (a)重链可变区(VH),其包含选自下列的氨基酸序列:

[0370] (i)SEQ ID NO:3或23所示的序列;

[0371] (ii)与SEQ ID NO:3或23所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0372] (iii)与SEQ ID NO:3或23所示的序列相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;

[0373] 和/或

[0374] (b)轻链可变区(VL),其包含选自下列的氨基酸序列:

[0375] (iv)SEQ ID NO:13或33所示的序列;

[0376] (v)与SEQ ID NO:13或33所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或

添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0377] (vi)与SEQ ID NO:13或33所示的序列相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列。

[0378] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH,和/或,SEQ ID NO:13所示的VL。

[0379] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH,和/或,SEQ ID NO:33所示的VL。

[0380] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH,和/或,SEQ ID NO:33所示的VL。

[0381] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH,和/或,SEQ ID NO:13所示的VL。

[0382] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含:

[0383] (a)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[0384] (b)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[0385] (c)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[0386] (d)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[0387] (e)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)独立地与(a)至(d)任一组中所述的VH和VL相比分别具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;或

[0388] (f)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)与(a)至(d)任一组中所述的VH和VL分别相比,独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)。优选地,所述的置换是保守置换。

[0389] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区(CH)或其变体,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多50个氨基酸的保守置换(例如至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换)。在某些实施方案中,所述抗B7H3抗体轻链包含人免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)或其变体,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多50个氨基酸的保守置换(例如至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换)。

[0390] 在一些实施方案中,恒定区被改变,例如被突变,以修饰抗B7H3抗体分子的性质(例如改变下列中的一个或多个特性:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能)。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基,产生功能改变,例如,改变抗体对效应子配体(如FcR或补体C1q)的亲和力,从而改变效应子

功能(例如降低)。抗体的Fc区介导几种重要的效应子功能,例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

[0391] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段具有重链恒定区(CH),其选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重链恒定区;特别地选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重链恒定区,更特别地选自IgG1(例如是人IgG1)的重链恒定区。在一些实施方案中,人IgG1重链恒定区如SEQ ID NO:43所示。在一些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段具有轻链恒定区,其选自例如κ或λ轻链恒定区,优选κ轻链恒定区(例如人κ轻链恒定区)。在一些实施方案中,轻链恒定区具有如SEQ ID NO:44所示的序列。

[0392] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:43所示的CH或其变体,所述变体与SEQ ID NO:43相比具有至多20个氨基酸的保守置换(例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换),或者与SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0393] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含轻链恒定区或其变体。在一些实施方案中,所述轻链恒定区包含κ轻链恒定区。在一些实施方案中,所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:44所示的轻链恒定区(CL)或其变体,所述变体与SEQ ID NO:44相比具有至多20个氨基酸的保守置换(例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换),或者与SEQ ID NO:44相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0394] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:43所示的重链恒定区(CH)和SEQ ID NO:44所示的轻链恒定区(CL)。

[0395] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含:

[0396] (a)重链,其包含选自下列的氨基酸序列:

[0397] (i)包含SEQ ID NO:3所示的VH序列和SEQ ID NO:43所示的CH序列的序列;

[0398] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0399] (iii)与(i)所示的序列相比具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;以及

[0400] (b)轻链,其包含选自下列的氨基酸序列:

[0401] (iv)包含SEQ ID NO:13所示的VL序列和SEQ ID NO:44所示的CL序列的序列;

[0402] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0403] (vi)与(iv)所示的序列相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列。

[0404] 在一些实施方案中,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0405] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含:

[0406] (a)重链,其包含选自下列的氨基酸序列:

[0407] (i)包含SEQ ID NO:23所示的VH序列和SEQ ID NO:43所示的CH序列的序列;

[0408] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0409] (iii)与(i)所示的序列相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;以及

[0410] (b)轻链,其包含选自下列的氨基酸序列:

[0411] (iv)包含SEQ ID NO:33所示的VL序列和SEQ ID NO:44所示的CL序列的序列;

[0412] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0413] (vi)与(iv)所示的序列相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列。

[0414] 在一些实施方案中,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0415] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,

[0416] 所述重链包含:

[0417] (i)SEQ ID NO:45所示的序列;

[0418] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0419] (iii)与(i)所示的序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;和

[0420] 所述轻链包含:

[0421] (iv)SEQ ID NO:46所示的序列;

[0422] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4

个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0423] (vi)与(iv)所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;

[0424] 优选地,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0425] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,

[0426] 所述重链包含:

[0427] (i)SEQ ID NO:47所示的序列;

[0428] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0429] (iii)与(i)所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;和

[0430] 所述轻链包含:

[0431] (iv)SEQ ID NO:48所示的序列;

[0432] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0433] (vi)与(iv)所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;

[0434] 优选地,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0435] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体,人源化抗体或全人源抗体。

[0436] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段选自scFv、Fab、Fab'、(Fab')2、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、双抗体(diabody)。

[0437] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段是scFv。在某些实施方案中,本公开的scFv包含:

[0438] (a)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[0439] (b)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[0440] (c)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[0441] (d)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[0442] (e)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)独立地与(a)至(d)任一组中所述的VH和VL相比分别具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;或

[0443] (f)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)与(a)至(d)任一组中所述的VH和VL分别相比,独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)。优选地,所述的置换是保守置换。

[0444] 在一些实施方案中,本公开的抗体是scFv。在某些实施方案中,本公开的scFv包含:

[0445] (i)SEQ ID NO:1或2所示的序列;

[0446] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0447] (iii)与(i)所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;

[0448] 优选地,(ii)中所述的置换是保守置换。

[0449] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段是scFv。在某些实施方案中,本公开的scFv包含SEQ ID NO:1或2所示的序列。

[0450] 在一些实施方案中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段选自:1D1抗体、1D1-01抗体、2E3抗体和2E3-02抗体。

[0451] 在本公开的部分实施方案中,靶向部分为曲妥珠单抗或帕妥珠单抗(Pertuzumab)。曲妥珠单抗是抗Her 2的单克隆抗体,其氨基酸序列是本领域技术人员已知的,其示意性序列可参见,例如CN103319599,末位Lys是容易缺失的但不影响生物活性,参见Dick,L.W.等人,Biotechnol.Bioeng.,100:1132-1143。

[0452] 曲妥珠单抗的示例性的重链序列和轻链序列可参见例如IMGT/mAb-DB ID 97。帕妥珠单抗的示例性的重链序列和轻链序列可参见US7560111的SEQ ID No.16和SEQ ID No.15,也可参见IMGT/mAb-DB ID 80。

[0453] 在本公开的部分实施方案中,靶向部分为抗Her3抗体或其抗原结合的片段。在一些实施方案中,所述抗Her3抗体包括所有现有技术中的抗Her3抗体,例如,参见抗体barecetamab,duligotuzumab,elgemtumab,istiratumab,lumretuzumab,patritumab,seribantumab,zenocutuzumab,202-2-1抗体、抗体CN 103189392 B中重链SEQ ID NO:10和轻链SEQ ID NO:14所示的抗体和IMGT/mAb-DB SEQ ID NO:546所示的抗体。

[0454] 在一些实施方案中,靶向部分为抗Her3抗体,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR)的抗体或其抗原结合片段,其中CDR按IMGT编号系统定义:

[0455] 序列为SEQ ID NO:56的HCDR1,序列为SEQ ID NO:57的HCDR2,序列为SEQ ID NO:58的HCDR3;和/或,

[0456] 序列为SEQ ID NO:41的LCDR1,序列为AAS的LCDR2,序列为SEQ ID NO:21的LCDR3。

[0457] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段,按IMGT编号系统定义,包含:上述含有上述重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有上述轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL。

[0458] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区

(CDR)的抗体或其抗原结合片段,其中CDR按kabat编号系统定义:

[0459] 序列为SEQ ID NO:53的HCDR1,序列为SEQ ID NO:54的HCDR2,序列为SEQ ID NO:55的HCDR3;和/或,

[0460] 序列为SEQ ID NO:59的LCDR1,序列为SEQ ID NO:60的LCDR2,序列为SEQ ID NO:21的LCDR3。

[0461] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段,按kabat编号系统定义,包含:上述含有上述重链HCDR1,HCDR2,HCDR3的VH和含有上述轻链LCDR1,LCDR2,LCDR3的VL。

[0462] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含:

[0463] (a)重链可变区(VH),其包含选自下列的氨基酸序列:

[0464] (i)SEQ ID NO:49所示的序列;

[0465] (ii)与SEQ ID NO:49所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0466] (iii)与SEQ ID NO:49所示的序列相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;

[0467] 和/或

[0468] (b)轻链可变区(VL),其包含选自下列的氨基酸序列:

[0469] (iv)SEQ ID NO:50所示的序列;

[0470] (v)与SEQ ID NO:50所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0471] (vi)与SEQ ID NO:50所示的序列相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列。

[0472] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含:

[0473] (a)SEQ ID NO:49所示序列的VH和SEQ ID NO:50所示序列的VL;

[0474] (b)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)独立地与(a)组中所述的VH和VL相比分别具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;或

[0475] (c)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)与(a)组中所述的VH和VL分别相比,独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)。优选地,所述的置换是保守置换。

[0476] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区(CH)或其变体,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多50个氨基酸的保守置换(例如至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多

5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换)。在某些实施方案中,所述抗B7H3抗体轻链包含人免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)或其变体,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多50个氨基酸的保守置换(例如至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换)。

[0477] 在一些实施方案中,恒定区被改变,例如被突变,以修饰抗Her3抗体分子的性质(例如改变下列中的一个或多个特性:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能)。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基,产生功能改变,例如,改变抗体对效应子配体(如FcR或补体C1q)的亲和力,从而改变效应子功能(例如降低)。抗体的Fc区介导几种重要的效应子功能,例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

[0478] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段具有重链恒定区(CH),其选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重链恒定区;特别地选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重链恒定区,更特别地选自IgG1(例如是人IgG1)的重链恒定区。在一些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段具有轻链恒定区,其选自例如κ或λ轻链恒定区,优选κ轻链恒定区(例如人κ轻链恒定区)。

[0479] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:43所示的重链恒定区(CH)和SEQ ID NO:44所示的轻链恒定区(CL)。

[0480] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,

[0481] 所述重链包含:

[0482] (i)SEQ ID NO:51所示的序列;

[0483] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0484] (iii)与(i)所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;和

[0485] 所述轻链包含:

[0486] (iv)SEQ ID NO:52所示的序列;

[0487] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0488] (vi)与(iv)所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;

[0489] 优选地,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0490] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体,人源化抗体或全人源抗体。

[0491] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段选自scFv、Fab、Fab'、(Fab')2、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、双抗体(diabody)。

[0492] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段是scFv。在某些实施方案中,本公开的scFv包含:

[0493] (a)SEQ ID NO:49所示序列的VH和SEQ ID NO:50所示序列的VL;

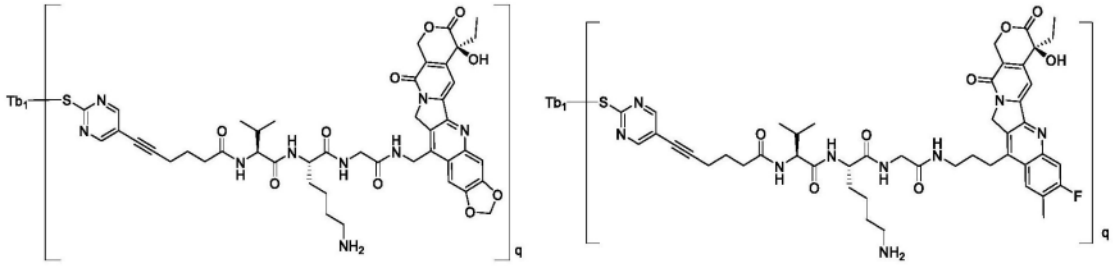
[0494] (b)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)独立地与(a)组中所述的VH和VL相比分别具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;或

[0495] (c)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)与(a)组中所述的VH和VL分别相比,独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)。优选地,所述的置换是保守置换。

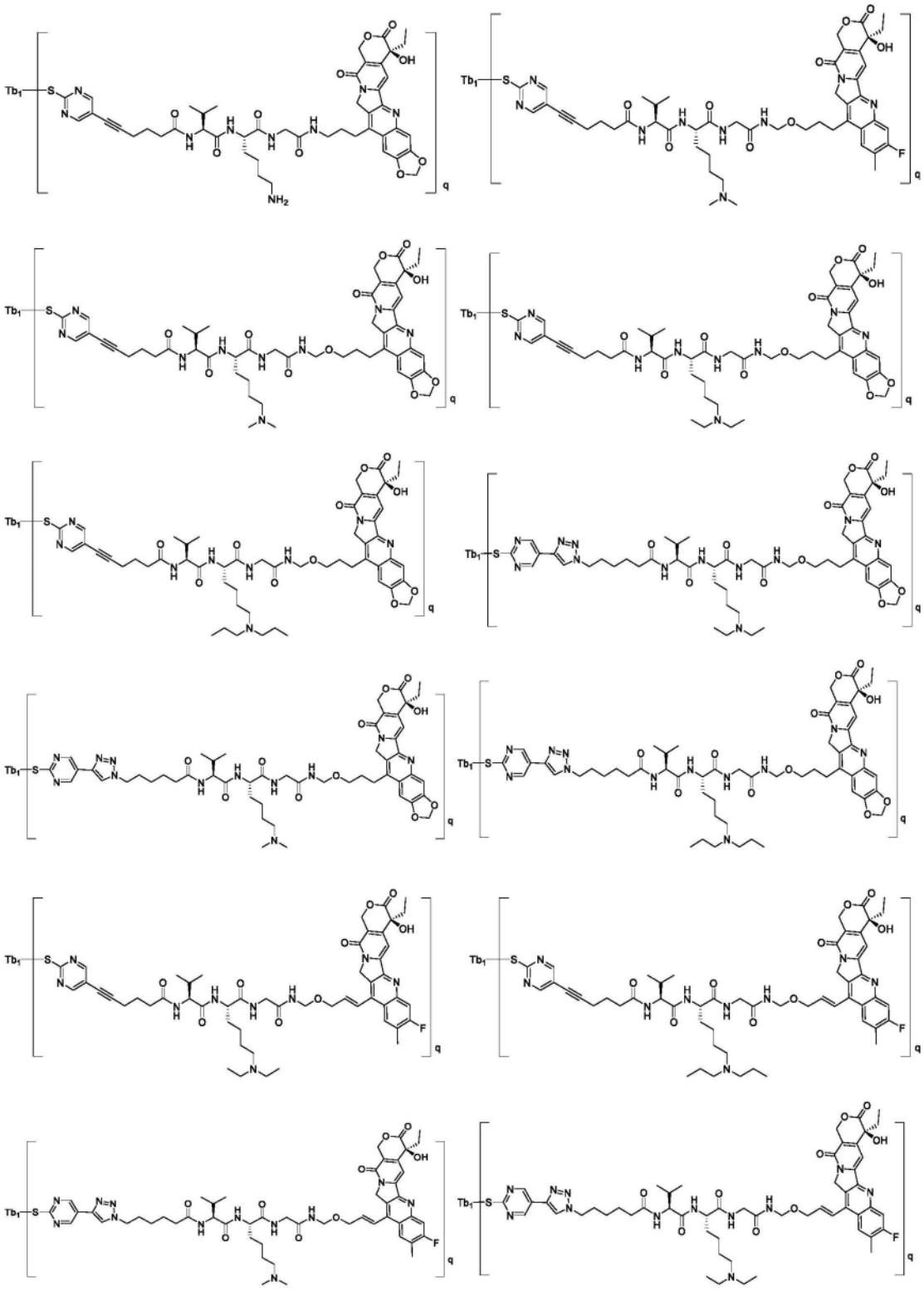
[0496] 在一些实施方案中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段选自:202-2-1抗体。

[0497] 在本公开的部分实施方案中,靶向部分为西妥昔单抗(Cetuximab)。西妥昔单抗是抗EGFR的单克隆抗体,其氨基酸序列是本领域技术人员已知的,其示意性序列可参见,IMGT/mAb-DB ID 151所示的抗体。

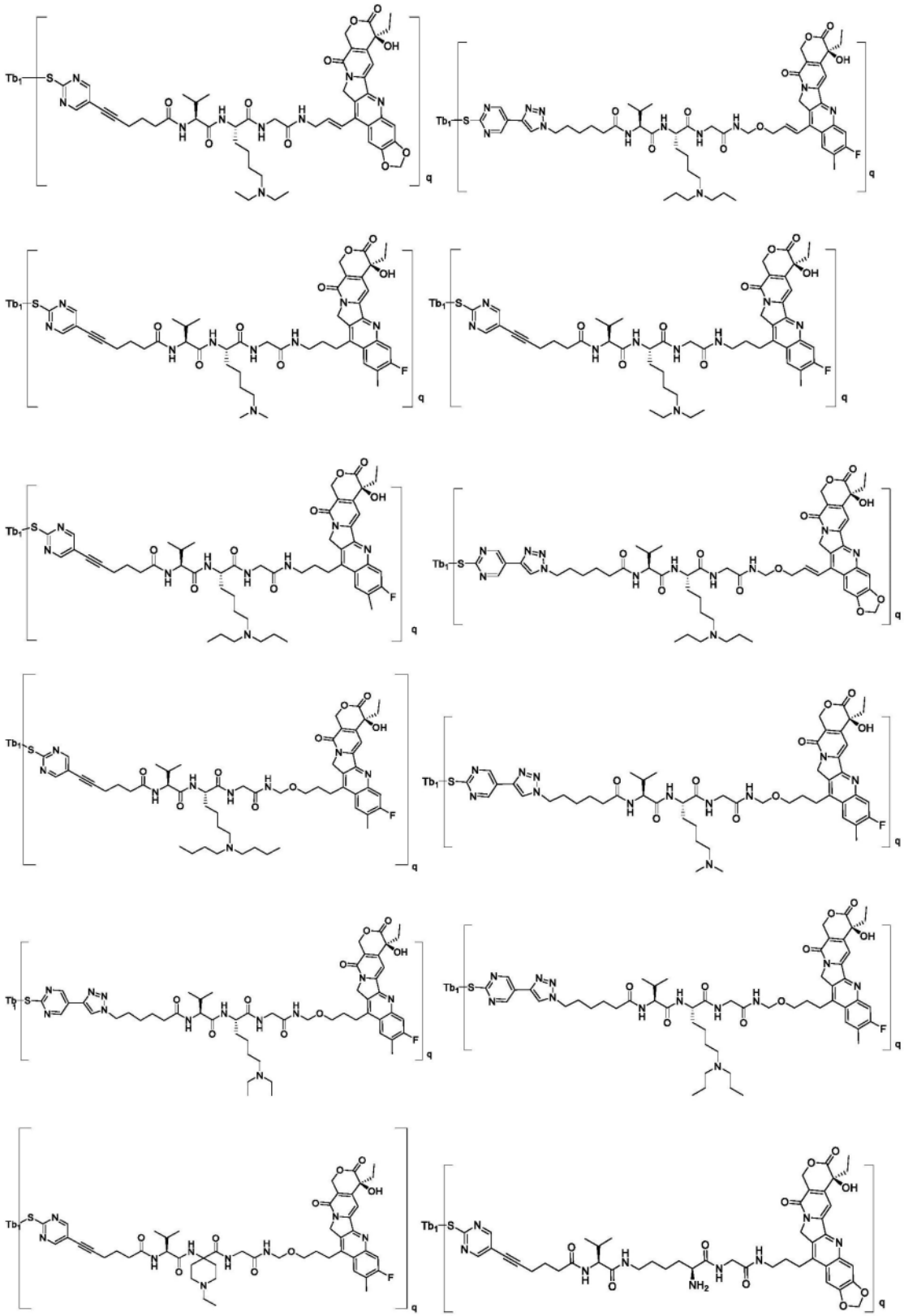
[0498] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自:

[0499] 

[0500]

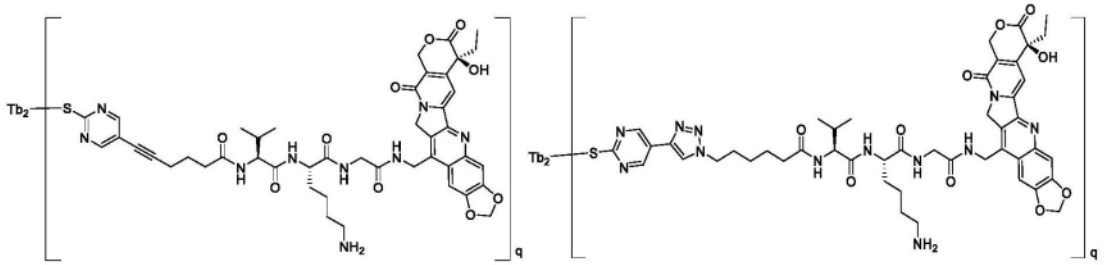


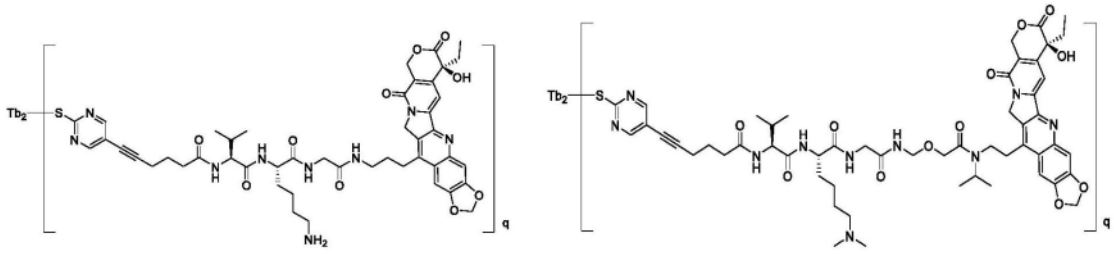
[0501]



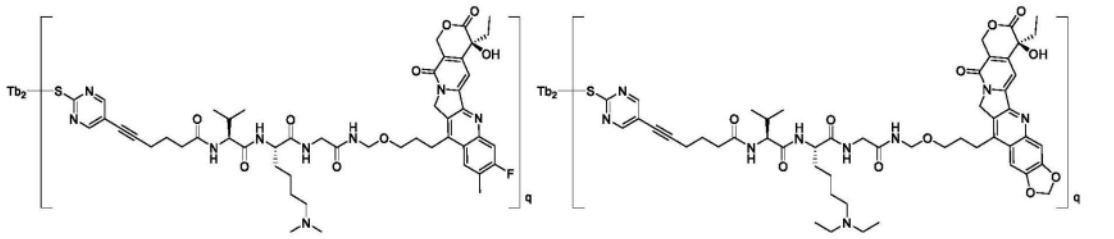
[0502] 其中,Tb_1为抗B7H3抗体或其抗原结合片段,例如enoblituzumab,mirzotamab,omburtamab,1D1-01,2E3-02抗体,优选1D1-01或2E3-02抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值。在一些实施方案中,q为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些优选地实施方案中,q为2、4、6或8。

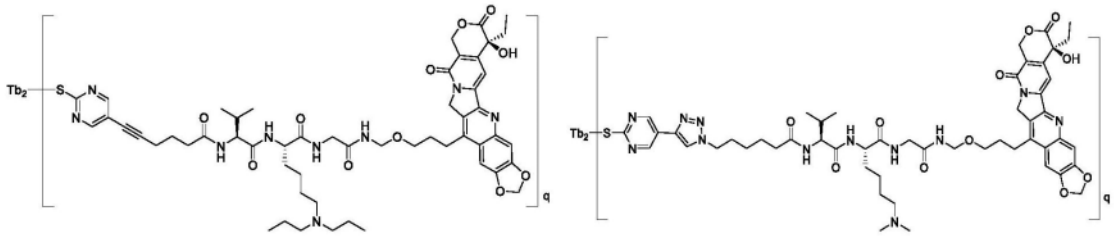
[0503] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自:

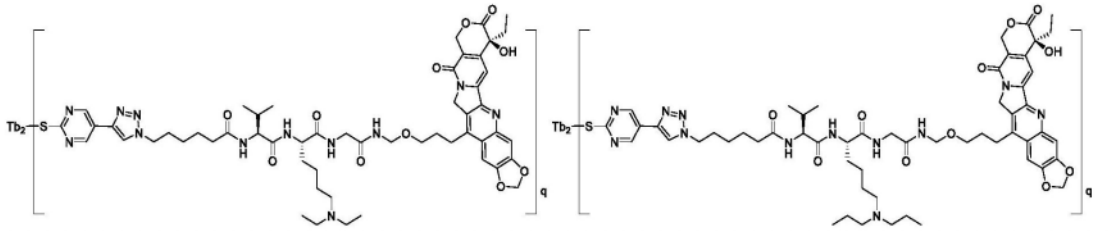




[0504]

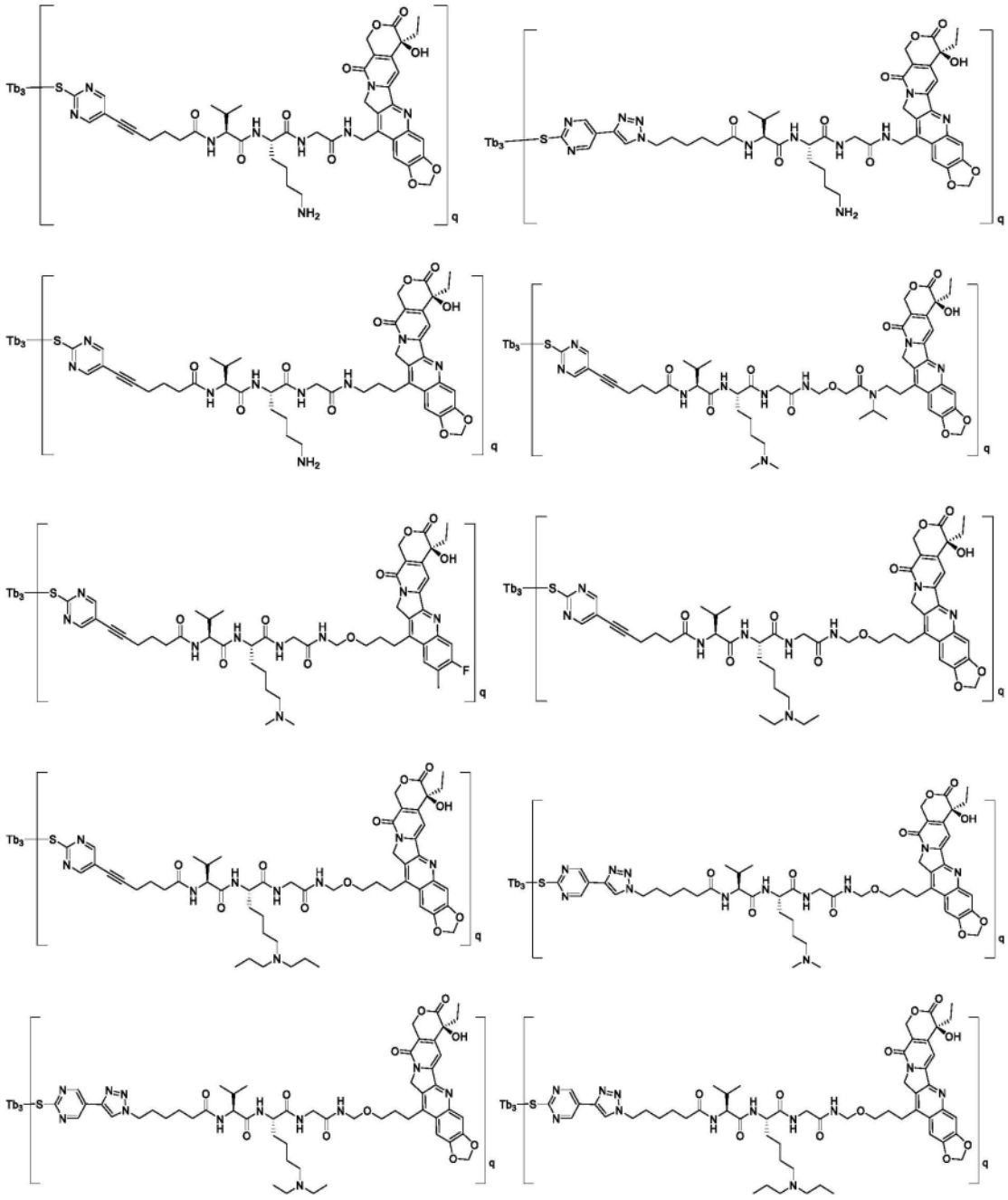






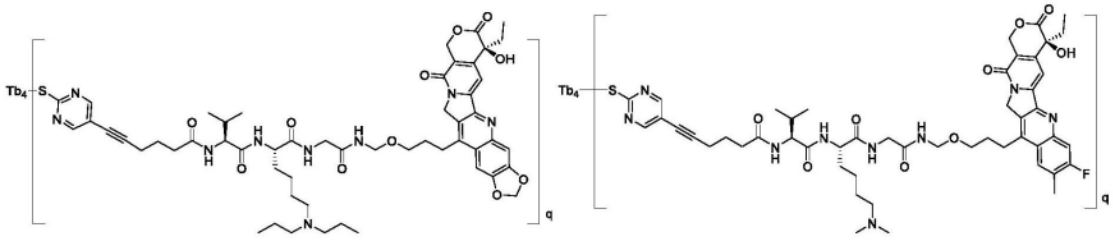
[0505] 其中,Tb_2为抗Trop-2抗体或其抗原结合片段,例如datopotamab,sacituzumab,优选sacituzumab;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值。在一些实施方案中,q为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些优选地实施方案中,q为2、4、6或8。

[0506] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自:

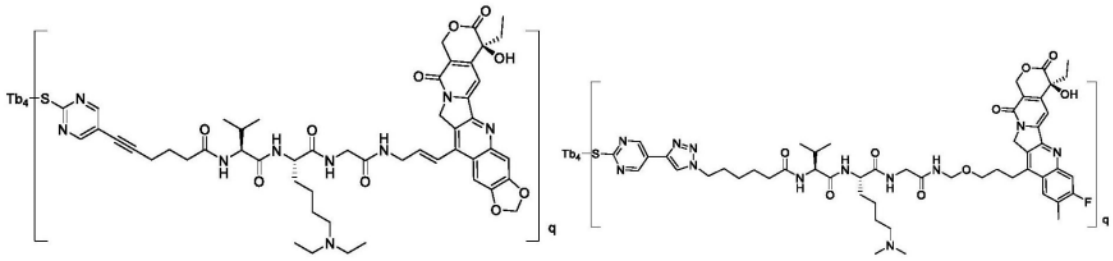
[0507] 

[0508] 其中,Tb_3为抗Her2抗体或其抗原结合片段,例如anbenitamab,coprelotamab,disitamab,gancotamab,margetuximab,pertuzumab,timigutuzumab,zanidatamab,Trastuzumab,Pertuzumab,优选Trastuzumab或Pertuzumab;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值。在一些实施方案中,q为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些优选地实施方案中,q为2、4、6或8。

[0509] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自:



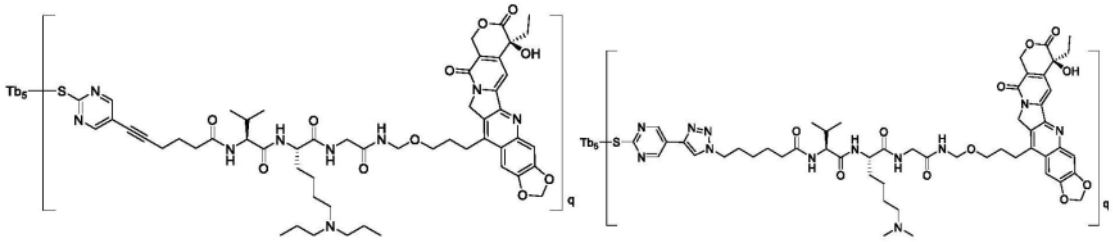
[0510]



[0511] 其中,Tb_4为抗Her3抗体或其抗原结合片段,例如,抗体barecetamab,duligotuzumab,elgemtumab,istiratumab,lumretuzumab,patritumab,seribantumab,zenocutuzumab,202-2-1抗体,CN 103189392 B中重链SEQ:10和轻链SEQ:14所示的抗体,IMGT/mAb-DB ID:564所示的抗体,202-2-1抗体;优选202-2-1抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值。在一些实施方案中,q为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些优选地实施方案中,q为2、4、6或8。

[0512] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自:

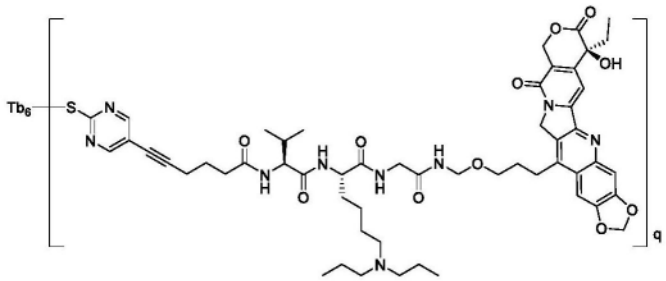
[0513]



[0514] 其中,Tb_5为抗EGFR抗体或其抗原结合片段,例如demupitamab,depatuxizumab,futuximab,imgatuzumab,laprituximab,losatuxizumab,matuzumab,modotuximab,necitumumab,nimotuzumab,panitumumab,pimurutamab,serclutamab,tomuzotuximab,zalutumumab,Cetuximab;优选Cetuximab;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值。在一些实施方案中,q为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些优选地实施方案中,q为2、4、6或8。

[0515] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自:

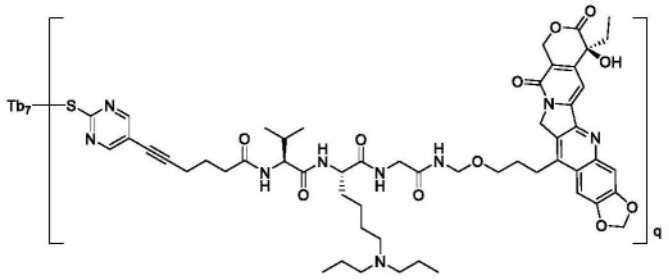
[0516]



[0517] 其中,Tb_6为无肿瘤细胞内吞活性的抗体或者结合非内吞(例如ALCAM/CD166)抗原活性的抗体,例如:人体内没有相应细胞表面抗原的IgG同型抗体,抗CD166的抗体,优选地,

为抗鸡溶菌酶人IgG1同型抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值。在一些实施方案中,q为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些优选地实施方案中,q为2、4、6或8。

[0518] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自:

[0519] 

[0520] 其中,Tb_7为肿瘤细胞内吞活性较弱或无,但有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值。在一些实施方案中,q为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些优选地实施方案中,q为2、4、6或8。

[0521] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合B7H3抗原但不具有内吞活性的抗体。比如WO2021168379A1的INV721和I7-01。更具体的,Anti-B7H3的抗体具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:2的VH和SEQ ID NO:1的VL。

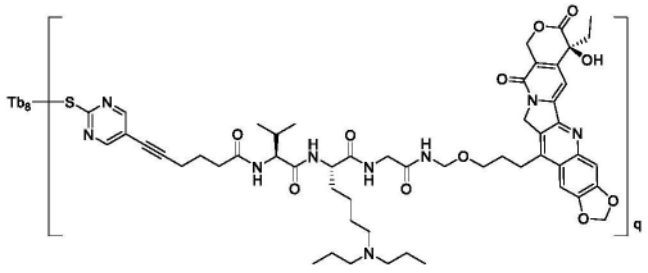
[0522] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合GD-2抗原但不具有内吞活性的抗体。比如WO2021168379A1的INV721和GD2-5。更具体的,Anti-GD-2的抗体具有WO2021168379A1所述的SEQ ID NO:4的VH和SEQ ID NO:3的VL。

[0523] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合HER3抗原但不具有内吞活性的抗体,比如US10808032B2的SEQ ID NO:22所示的ANTI-HER3的21F06抗体。

[0524] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合CD20抗原但不具有内吞活性的抗体。尽管已显示所谓的“II型”CD20特异性抗体很难被CD20阳性靶细胞内化,但已发现其他所谓的“I型”CD20特异性抗体某种程度上被内化并降解,这取决于与其相互作用的靶细胞上激活和抑制Fc γR的表达水平。在一些实施方案中,所述抗体具有结合CD20抗原但不具有内吞活性的抗体为II型”CD20特异性抗体,例如obinutuzumab。

[0525] 在一些实施方案中,所述抗体具有结合非内吞(例如ALCAM/CD166)抗原活性的抗体。在一些实施方案中,所述抗体为包含EP3911682A1中SEQ ID No:73的VH和SEQ ID No:74的VL,SEQ IDNo:75的VH和SEQ ID No:76的VL,SEQ ID No:77的VH和SEQ ID No:78的VL,或,SEQ ID No:79的VH和SEQ ID No:88的VL所示的抗体。

[0526] 在一些实施方案中,所述配体药物偶联物选自:

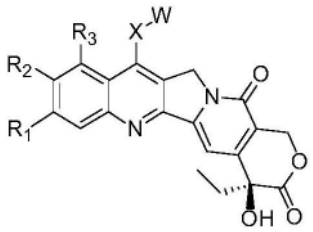
[0527] 

[0528] 其中,Tb_8为具有肿瘤细胞内吞活性的且有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体,例如1D1-01,2E3-02抗体,sacituzumab,pertuzumab,Trastuzumab或Cetuximab抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值。在一些实施方案中,q为1、2、3、4、5、6、

7、8、9或10。在一些优选地实施方案中,q为2、4、6或8。

[0529] 另外,还需要说明的是,本领域技术人员可以理解的是,L_1是与打开二硫键(例如,通过还原剂TCEP还原二硫键可以打开二硫键,生成巯基-SH)后Tb(如抗体)自身所含有巯基进行连接,也就是说,L_1与Tb之间的-S-并非另外再外接的硫原子。例如,其中,-S-并非另外外接的硫原子,而是打开双硫键后的Tb自身所含有巯基与L_1进行连接后形成的-S-。

[0530] 在本公开的第二方面,本公开提供了式II所示化合物:

[0531] 

式II

[0532] 或所述化合物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的溶剂合物或其配体药物偶联物,

[0533] 其中:

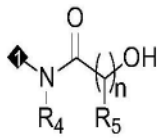
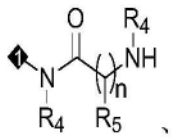
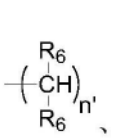
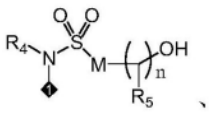
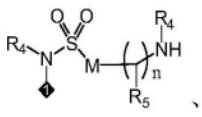
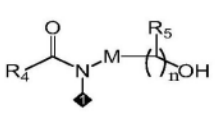
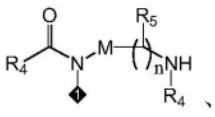
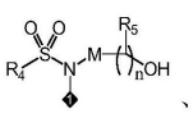
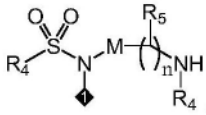
[0534] R_1、R_2各自独立地选自H、卤素、-OH、任选取代的C1-6烷基、任选取代的C1-6烷氧基,或者,

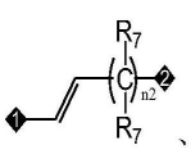
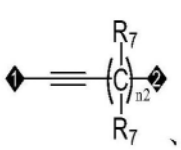
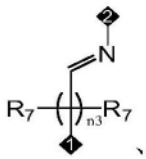
[0535] R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

[0536] R_3选自H、卤素、-OH、$-NH_2$、任选取代的C1-6烷基、任选取代的C1-6烷氧基,或者,

[0537] R_3和X和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

[0538] R_3和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

[0539] W不存在或存在,W存在时,W选自-OH、-SH、$-NHR_4$、  、  、  、  、  、  、  、  、  ,1位与X相连;

[0540] X选自直接键,任选取代的$-O-(CH_2)_{n3}-$、$-N(R_4)-(CH_2)_{n3}-$、$-S-(CH_2)_{n3}-$、羰基-$(CH_2)_{n3}$、$-SO_2-(CH_2)_{n3}-$、$-(CH_2)_{n1}-$、  、  、  C3-6环烷基、C6-10芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基,1位和母环相连,2位和W相连;所述取代基选自一个

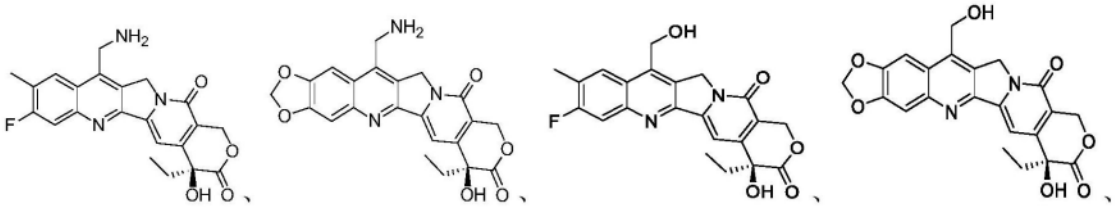
或多个C1-4烷基、C3-6环烷基,或者多个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基;

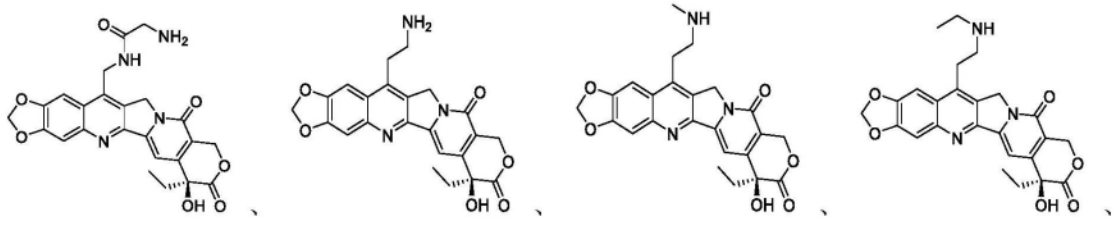
[0541] 各M独立地选自直接键、-$CR^{5a}R^{5b}$-;

[0542] R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R^7各自独立地选自H、任选取代的C1-4烷基、任选取代的C1-4烷氧基、任选取代的C3-6环烷基;

[0543] n、n'、n1、n2、n3各自独立地选自0到6之间的任意整数;

[0544] 其中,当R_1、R_2同时为H,且X为-$(CH_2)_{n1}$-时,n1为1、2、3、4时,W不为-OH或-NHR_4;且式II所示化合物不包含

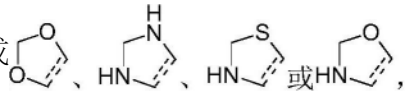
[0545] 

[0546] 

[0547] 在一些实施方案中,R_1和R_2各自独立地选自H、卤素或C1-4烷基。

[0548] 在一些实施方案中,R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-6元杂环,所述杂环含有1个、2个或3个O,S或N或其任意组合。

[0549] 在一些实施方案中,R_1选自H和卤素,R_2选自H和C1-4烷基。

[0550] 在一些实施方案中,R_1和R_2和与其相连的碳原子形成  ,虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置。

[0551] 在一些实施方案中,R_1为H或F,R_2为H或甲基。

[0552] 在一些实施方案中,R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

[0553] 在一些实施方案中,R_1为F,R_2为甲基;或R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成

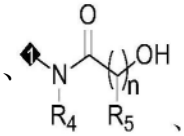
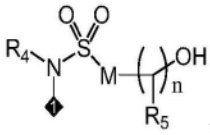
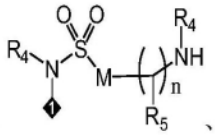
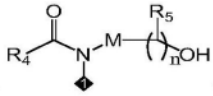
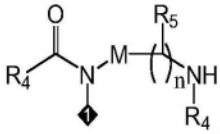
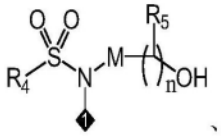
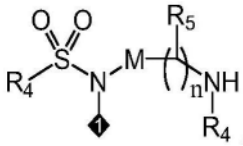
 。

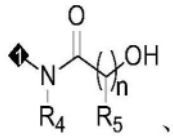
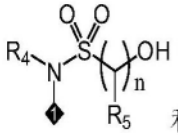
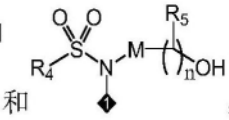
[0554] 在一些实施方案中,R_1为F,R_2为甲基。

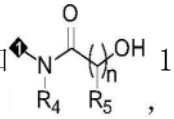
[0555] 在一些实施方案中,R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

[0556] 在一些实施方案中,R_3选自H和C1-4烷基。

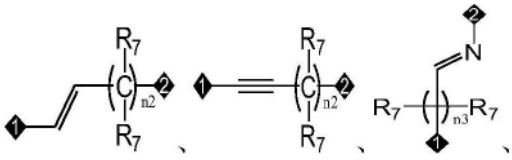
[0557] 在一些实施方案中,R_3为H。

[0558] 在一些实施方案中,W不存在或存在,W存在时,W选自-OH、-SH、-NHR_4、  、  、  、  、  、  、  1位与X相连。

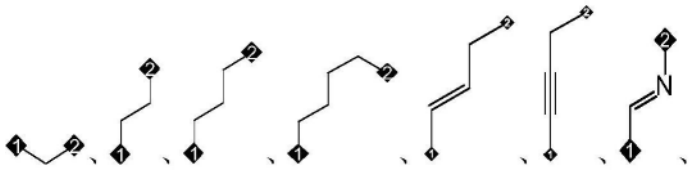
[0559] 在一些实施方案中,W不存在或存在,W存在时,W选自-OH、-SH、-NHR_4、  、  和  ,1位与X相连。

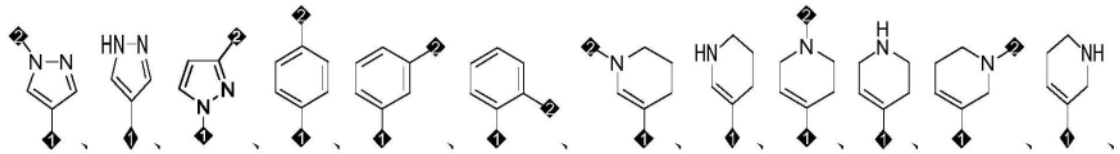
[0560] 在一些实施方案中,W选自-OH、-NHR_4和  1位与X相连。

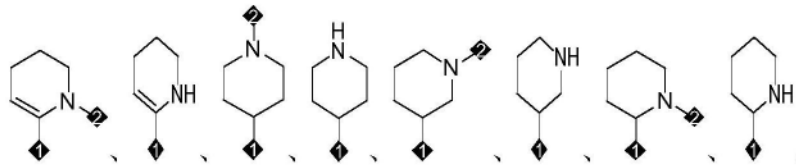
[0561] 在一些实施方案中,W选自-OH和-NHR_4,1位与X相连。

[0562] 在一些实施方案中,X选自任选取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  C6-10芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基,1位和母环相连,2位和W相连;所述取代基选自1个或2个C1-4烷基,或者2个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基。

[0563] 在一些实施方案中,X选自任选取代的

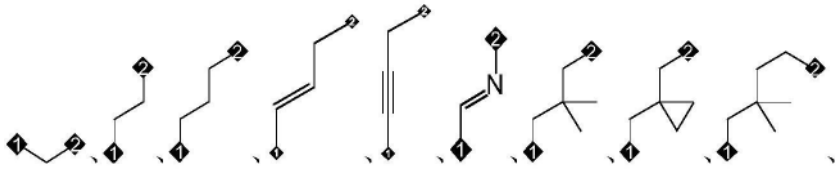


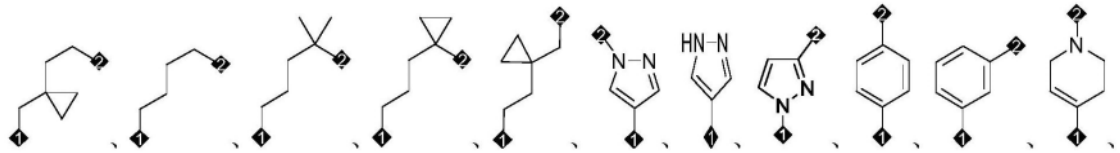


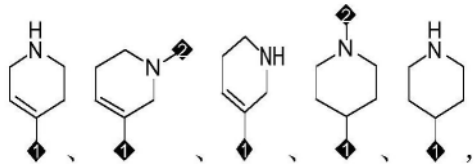


1位和母环相连,2位和W相连;所述取代基选自1个或2个C1-4烷基(如甲基),或者2个C1-4烷基(如甲基)和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基(如环丙基)。

[0564] 在一些实施方案中,X选自

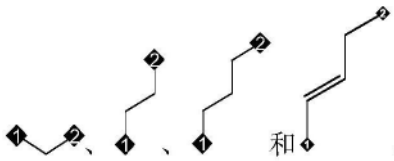






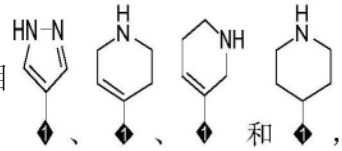
1位和母环相连,2位和W相连。

[0565] 在一些实施方案中,X选自

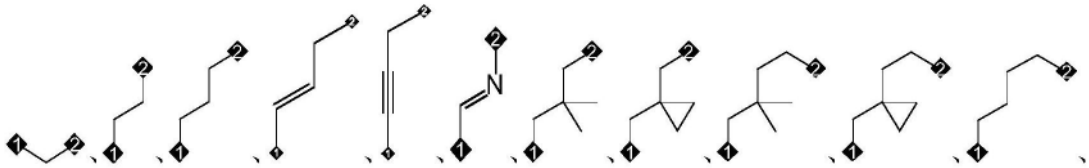


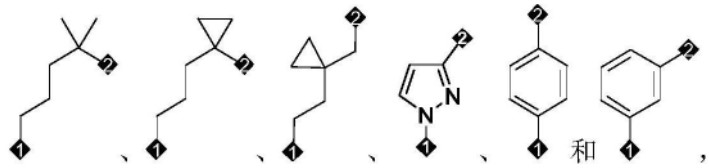
1位和母环相连,2位和W相连。

[0566] 在一些实施方案中,W不存在时,X选自

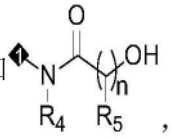
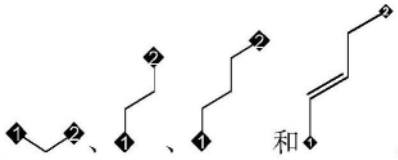


1位和母环相连;W存在时,X选自





1位和母环相连,2位和W相连。

[0567] 在一些实施方案中,W选自-OH、-NHR$_4$和  1位X相连,2位与L$_4$或L$_3$相连;X选自  1位和母环相连,2位和W相连。在一些实施方案中,R$_4$和R$_5$各自独立地选自H、C1-4烷基和C3-6环烷基。

[0568] 在一些实施方案中,各R$_4$独立地选自H、C1-4烷基和C3-6环烷基,R$_5$为H。

[0569] 在一些实施方案中,各R$_4$独立地选自H、甲基、乙基、异丙基、正丙基、叔丁基和环丙基,R$_5$为H。

[0570] 在一些实施方案中,R^{5a}和R^{5b}各自独立地选自H和C1-4烷基;

[0571] 在一些实施方案中,R^{5a}和R^{5b}各自独立地选自H和甲基;

[0572] 在一些实施方案中,各R^{7}独立地选自H和C1-4烷基;

[0573] 在一些实施方案中,R^{7}为H。

[0574] 在一些实施方案中,n为1、2或3。

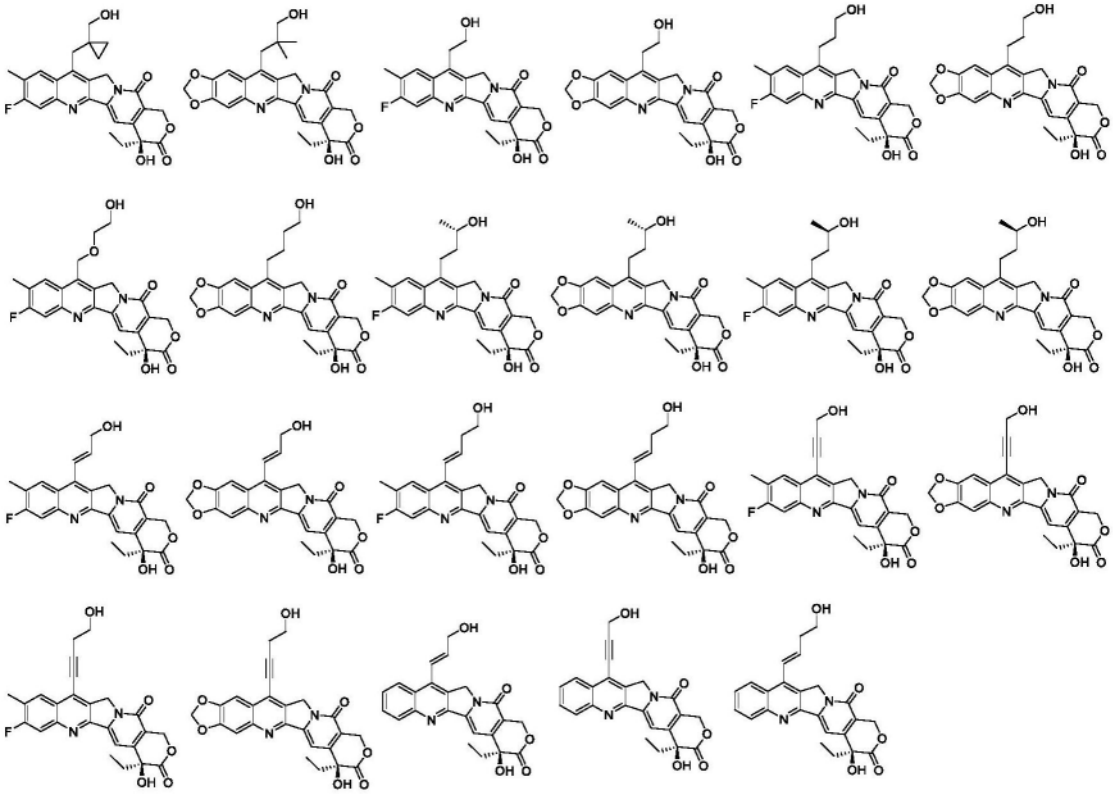
[0575] 在一些实施方案中,n为1。

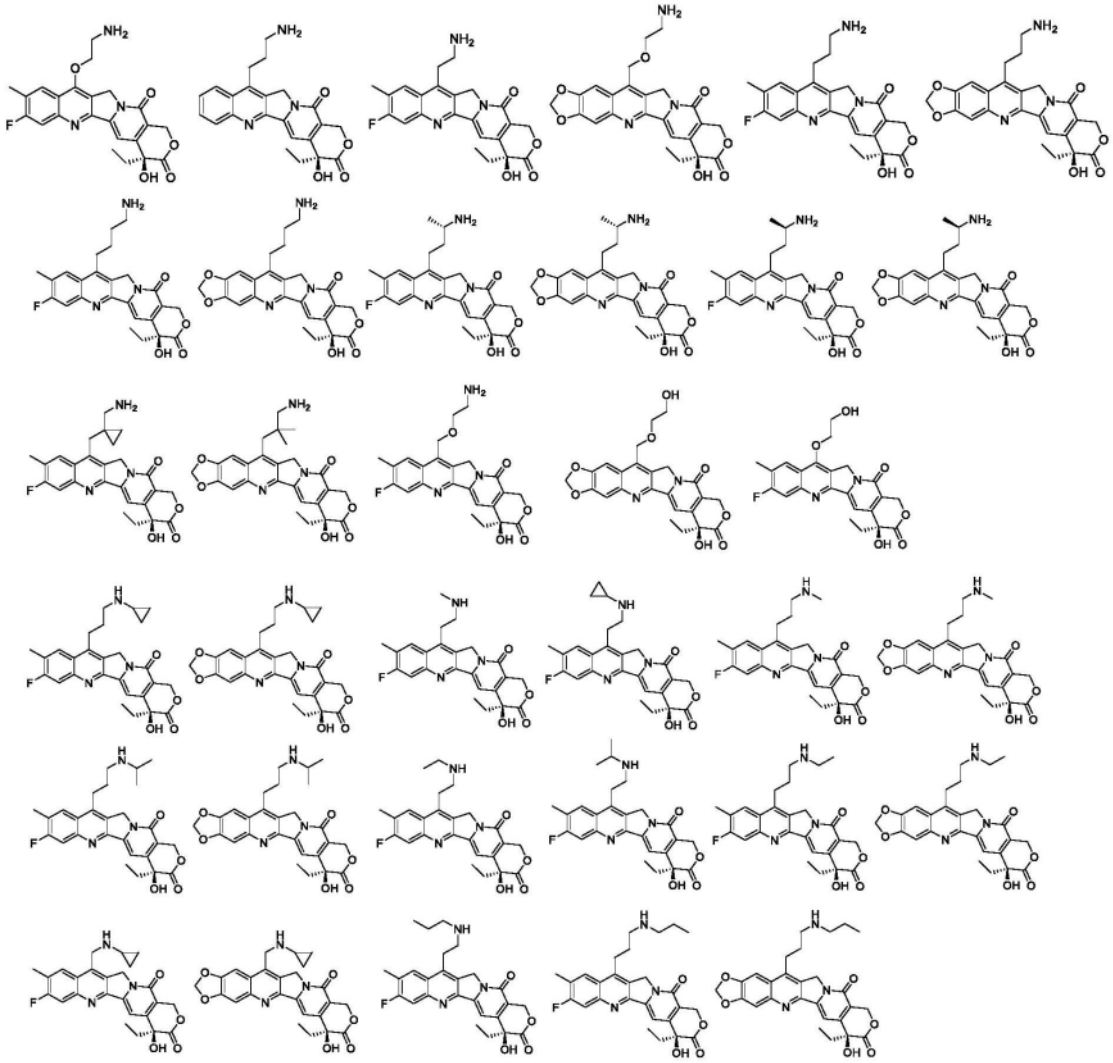
[0576] 在一些实施方案中,n1为1、2、3或4。

[0577] 在一些实施方案中,n2为1;

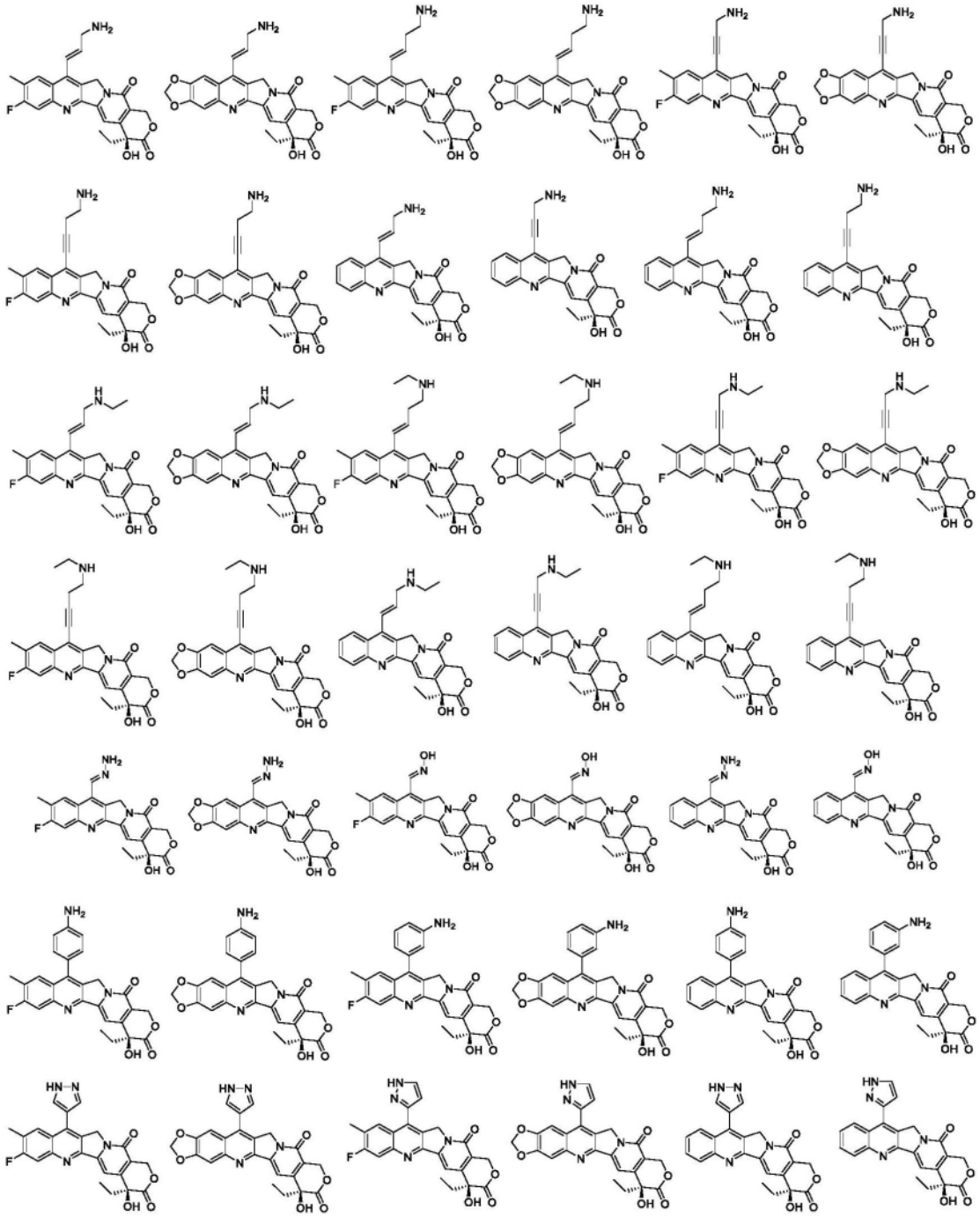
[0578] 在一些实施方案中,n3为0。

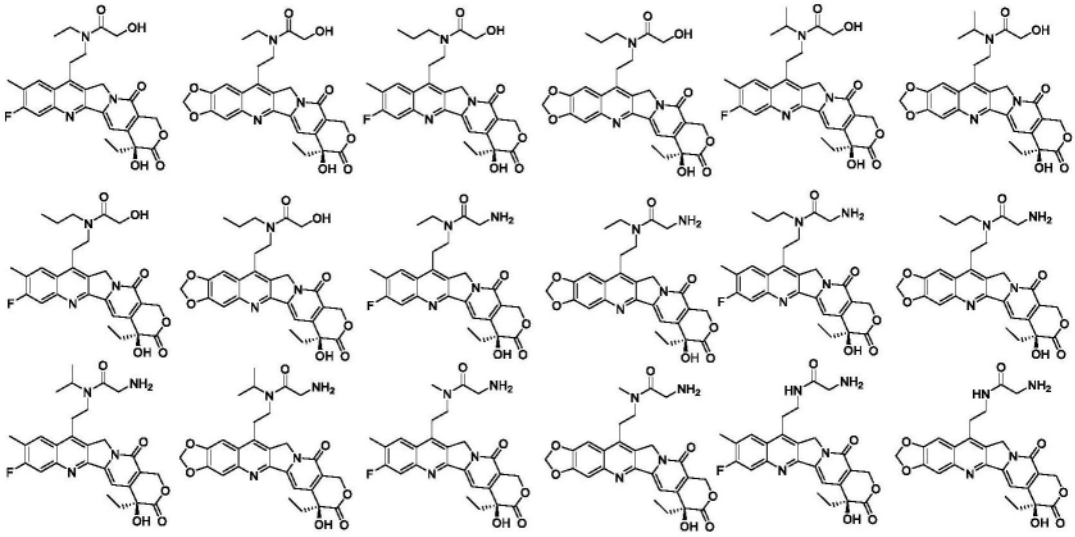
[0579] 在一些实施方案中,式II所示化合物选自以下任一化合物:

[0580] 

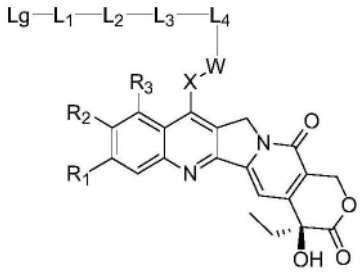
[0581] 

[0582]



[0583] 

[0584] 在本公开的第三方面,本公开提供了式III所示的药物连接体偶联物,

[0585] 

式 III

[0586] 或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,

[0587] 其中:

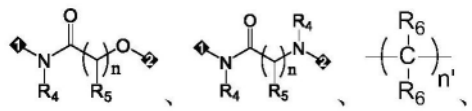
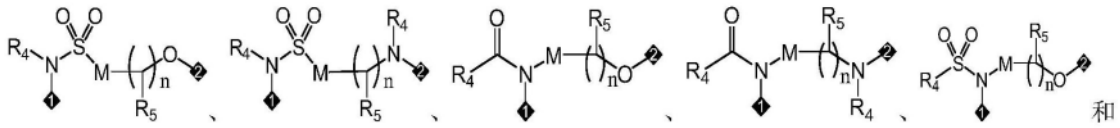
[0588] R_1和R_2各自独立地选自H、卤素、-OH、任选取代的C1-6烷基或任选取代的C1-6烷氧基,或者,

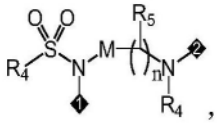
[0589] R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

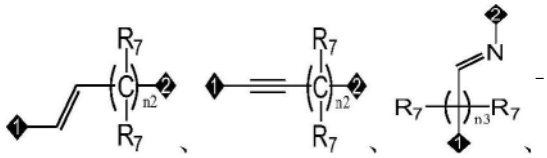
[0590] R_3选自H、卤素、-OH、$-NH_2$、任选取代的C1-6烷基和任选取代的C1-6烷氧基,或者,

[0591] R_3和X和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合,或者,

[0592] R_3和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

[0593] W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  和


1位与X相连,2位与L_4或L_3相连;

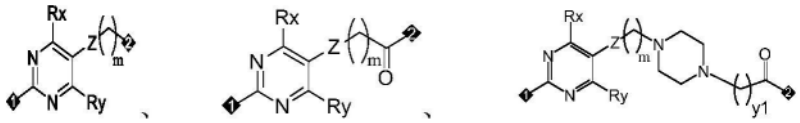
[0594] X选自直接键,任选取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-N(R_4)-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、  -$(CH_2)_{n1}$-、C3-6环烷基、C6-10芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基,1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基选自一个或多个C1-4烷基、C3-6环烷基,或者多个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基;

[0595] 各M独立地选自直接键、-$CR^{5a}R^{5b}$-;

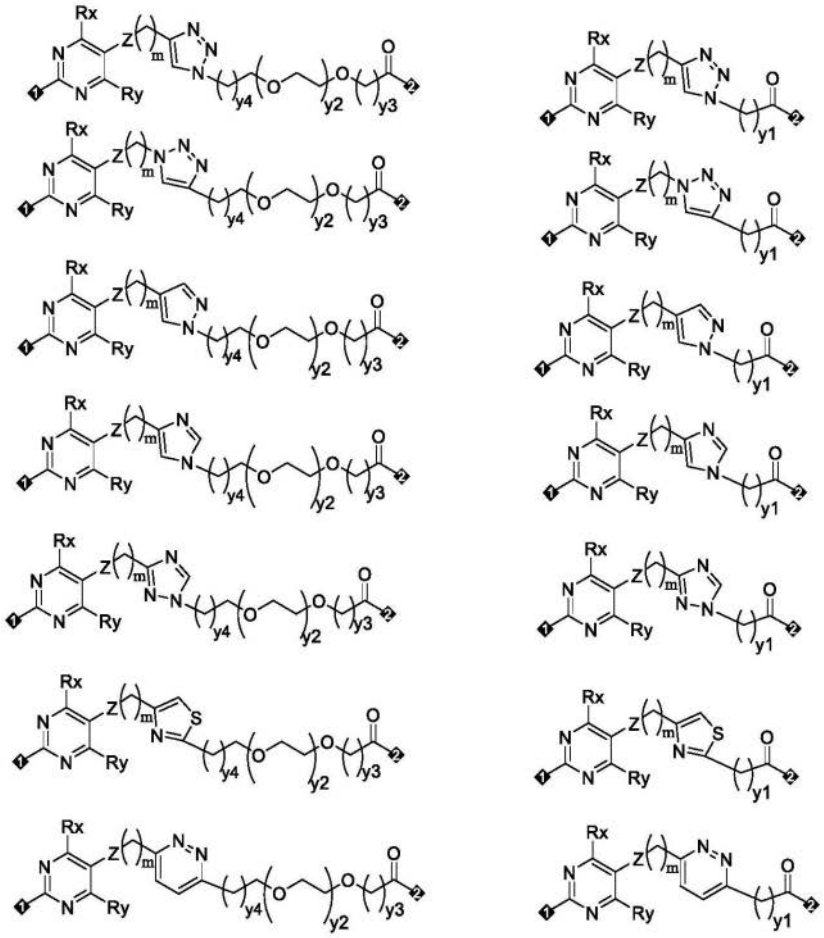
[0596] R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6和R_7各自独立地选自H、任选取代的C1-4烷基、任选取代的C1-4烷氧基和任选取代的C3-6环烷基;

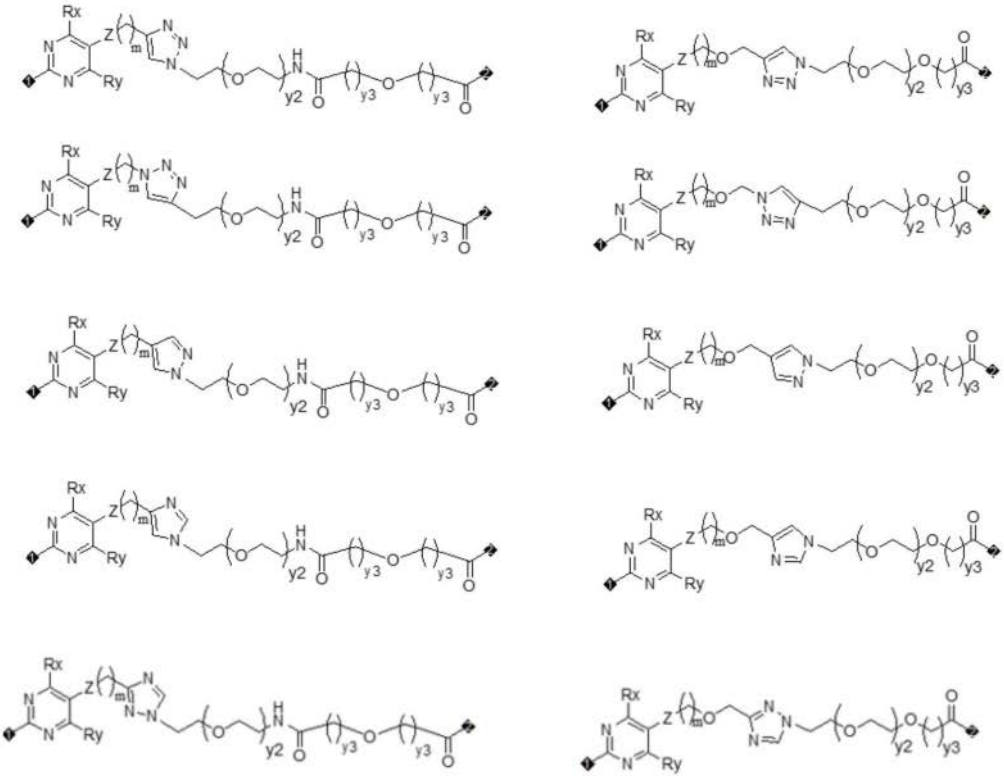
[0597] n、n'、n1、n2、n3各自独立地选自0到6之间的任意整数;

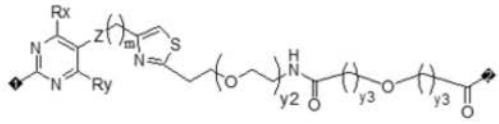
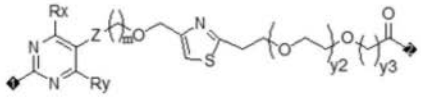
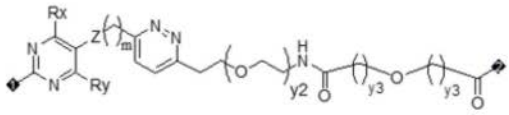
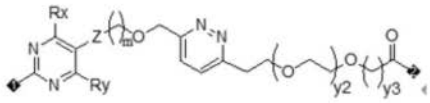
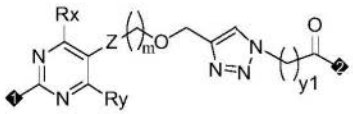
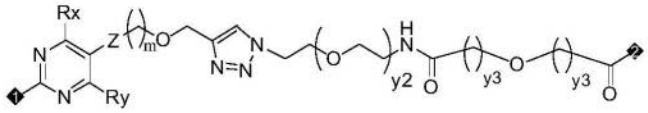
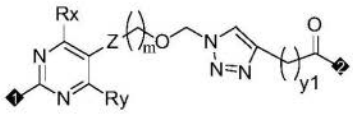
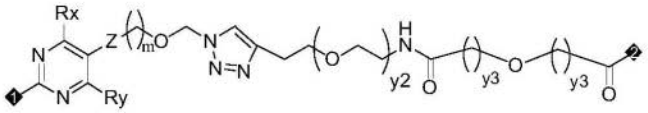
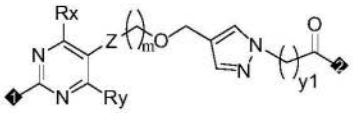
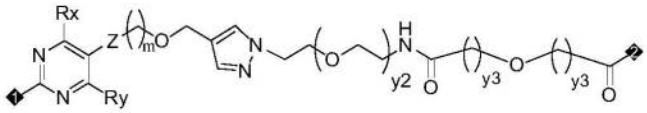
[0598] L_1选自:

[0599] 

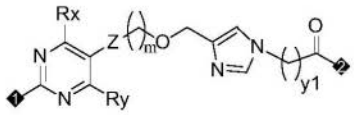
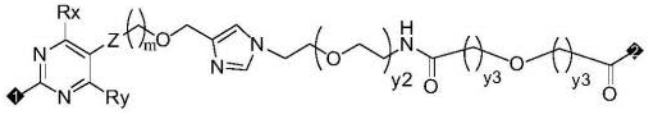
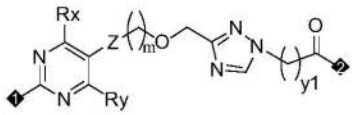
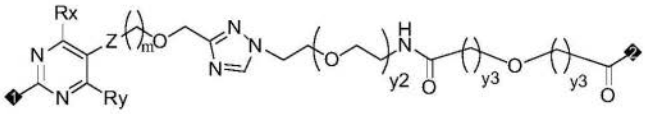
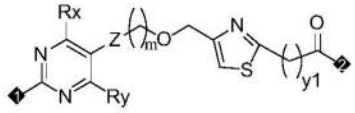
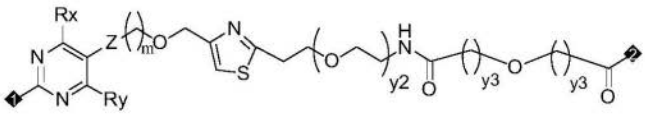
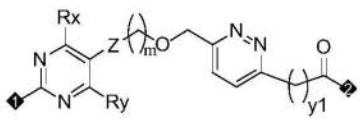
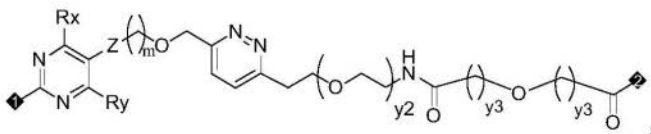
[0600]





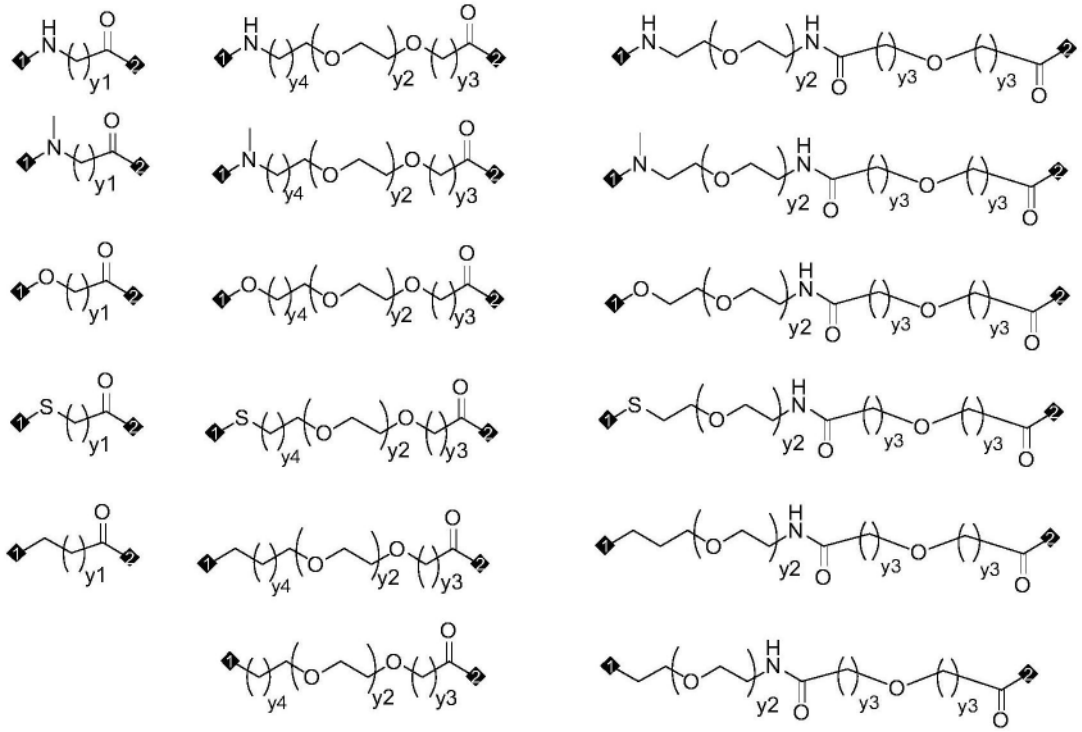











[0601]

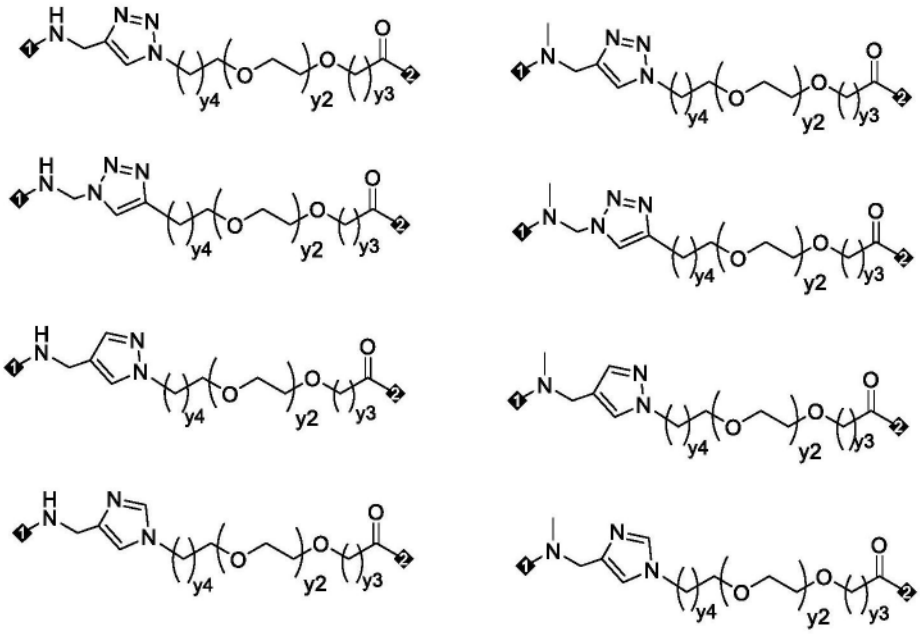









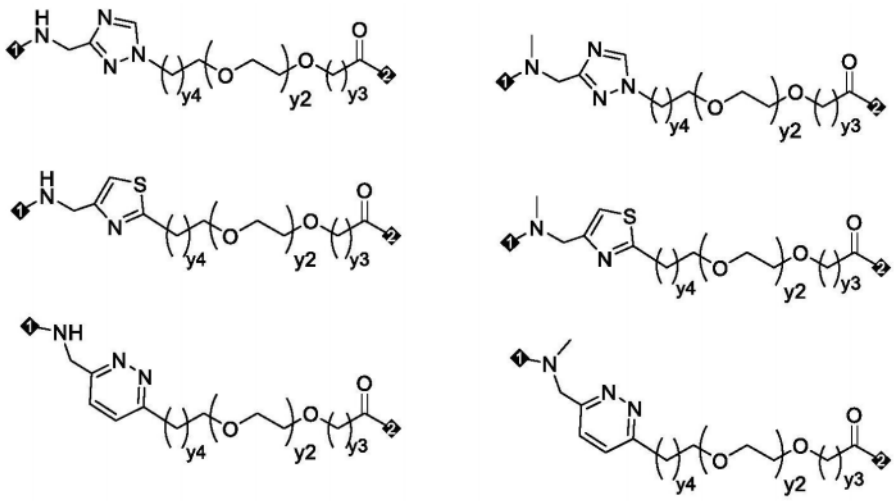
[0602] 各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10芳基、5-10元杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、亚胺基、CF_2,Rx、Ry各自独立地选自H、C1-4烷基,各m独立地选自0、1、2、3、4、5、6,y1、y2、y3、y4各自独立地选自0-20之间的任意整数,1位与Lg相连,2位与L_2或L_3相连;

[0603] L_2不存在或存在,L_2存在时,L_2选自:

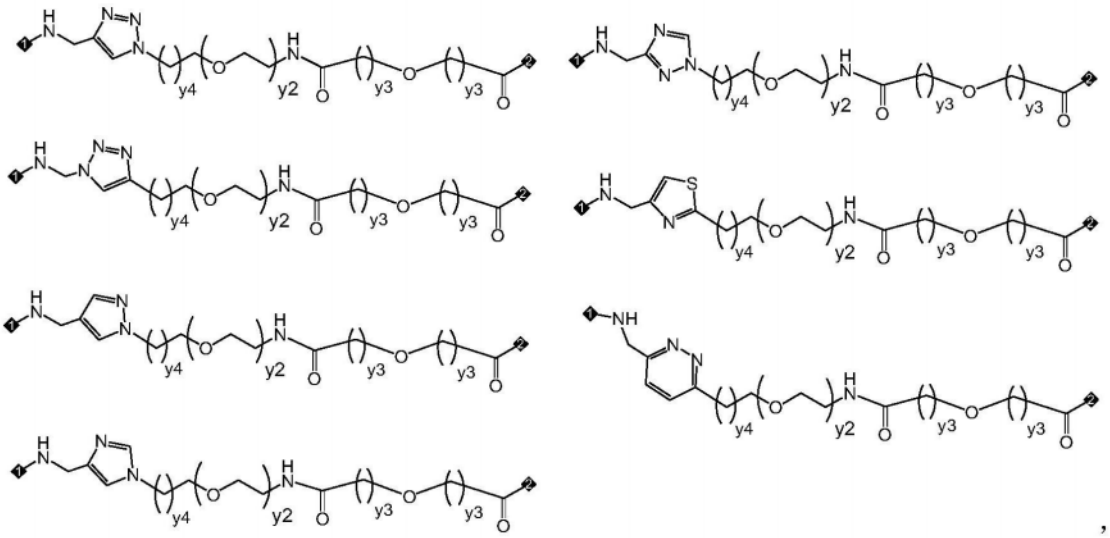


[0604]





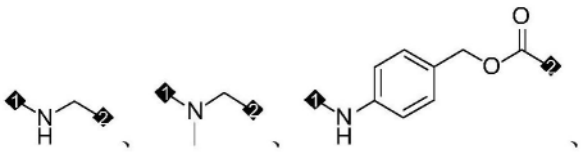
[0605]

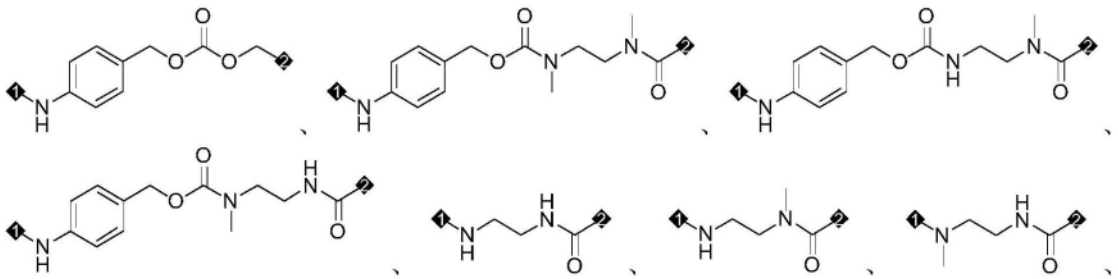


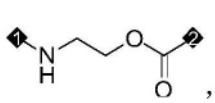
[0606] y1、y2、y3、y4各自独立地选自0-20之间的任意整数,1位与L_1相连,2位与L_3相连;

[0607] L_3选自氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽;

[0608] L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4选自







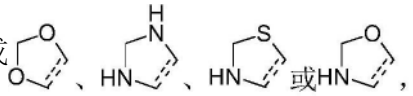
,1位与L_3相连,2位与W或X相连;

[0609] Lg为离去基团,Lg选自卤素、砜基、三级胺盐基(Me_3N^+、Et_3N^+)、重氮盐基、-OMs、$MeSO_2^-$、$CF_3SO_3^-$。

[0610] 在一些实施方案中,R_1、R_2各自独立地选自H、卤素、C1-4烷基。

[0611] 在一些实施方案中，R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-6元杂环，所述杂环含有1个、2个或3个O，S或N或其任意组合。

[0612] 在一些实施方案中，R_1选自H、卤素，R_2选自H、C1-4烷基。

[0613] 在一些实施方案中，R_1和R_2和与其相连的碳原子形成  ，虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置。

[0614] 在一些实施方案中，R_1为H或F，R_2为H或甲基。

[0615] 在一些实施方案中，R_1为F，R_2为甲基或R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

[0616] 在一些实施方案中，R_1为F，R_2为甲基。

[0617] 在一些实施方案中，R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

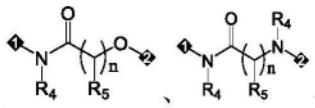
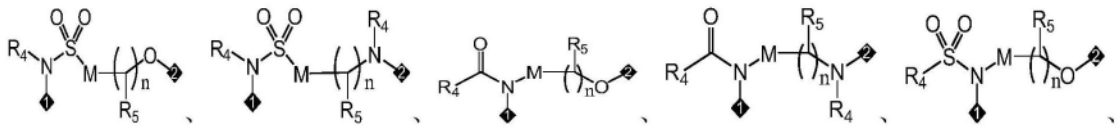
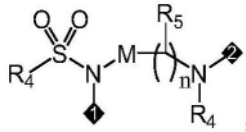
[0618] 在一些实施方案中，R_3选自H、C1-4烷基。

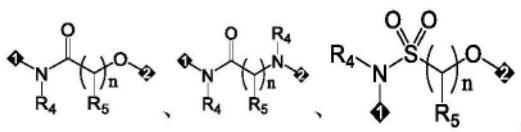
[0619] 在一些实施方案中，R_3和X和与其相连的碳原子一起形成5-6元碳环。

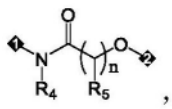
[0620] 在一些实施方案中，R_3为H或R_3和X和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置。

[0621] 在一些实施方案中，R_3为H。

[0622] 在一些实施方案中，R_3和X和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置。

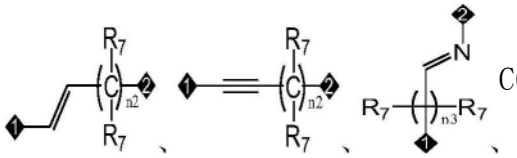
[0623] 在一些实施方案中，W不存在或存在，W存在时，W选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  1位与X相连，2位与L_4或L_3相连。

[0624] 在一些实施方案中，W不存在或存在，W存在时，W选自-O-、-S-、-NR_4-、  1位与X相连，2位与L_4或L_3相连。

[0625] 在一些实施方案中，W选自-O-、-NR_4-、  1位X相连，2位与L_4或L_3相连。

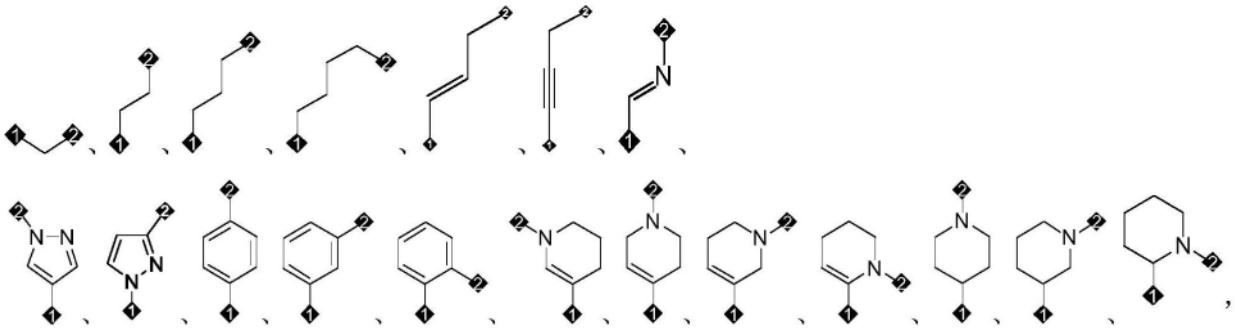
[0626] 在一些实施方案中，W选自-O-、-NR_4-，1位X相连，2位与L_4或L_3相连。

[0627] 在一些实施方案中,X选自任选取代的-$(CH_2)_{n1}$-、



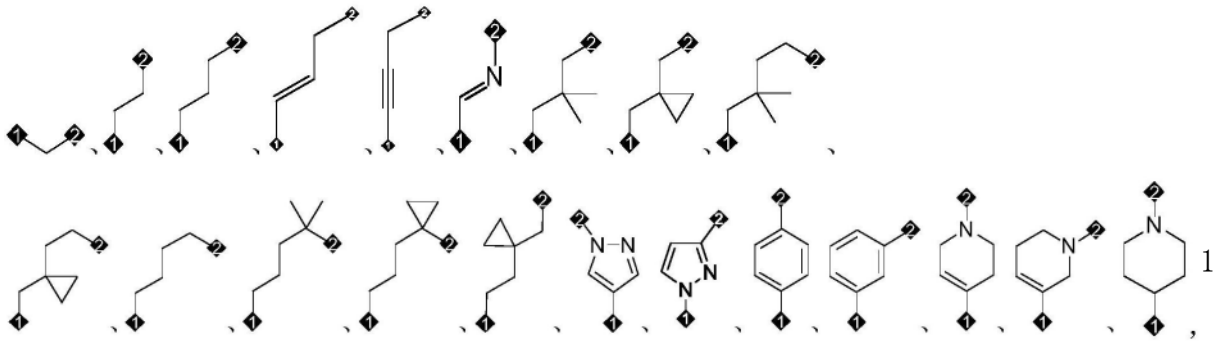
C6-10芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基,1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基选自1个或2个C1-4烷基,或者2个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基。

[0628] 在一些实施方案中,X选自任选取代的



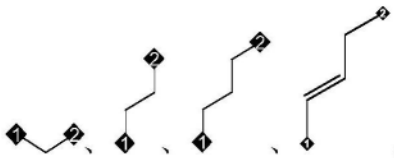
1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基选自1个或2个C1-4烷基(如甲基),或者2个C1-4烷基(如甲基)和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基(如环丙基)。

[0629] 在一些实施方案中,X选自



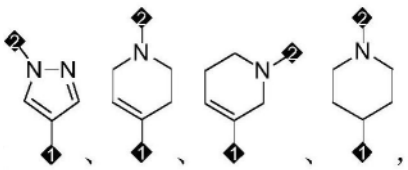
1位和母环相连,2位和W或L_4相连。

[0630] 在一些实施方案中,X选自

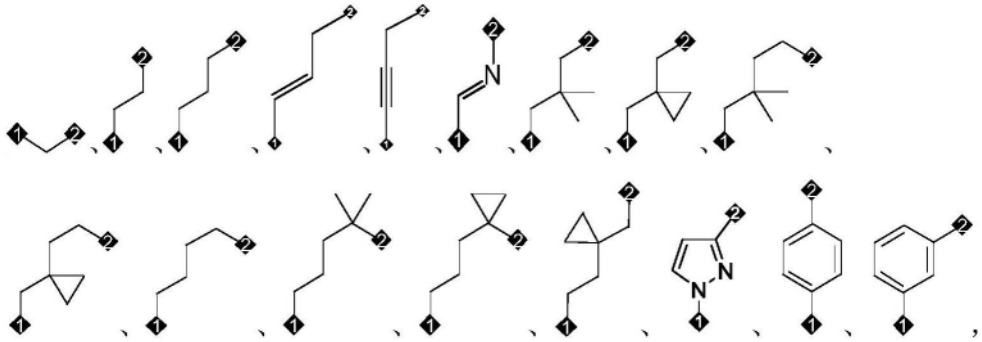


1位和母环相连,2位和W相连。

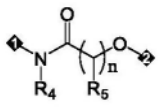
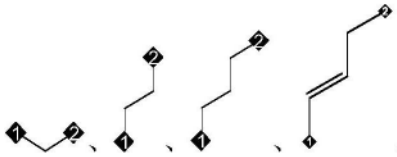
[0631] 在一些实施方案中,W不存在时,X选自



1位和母环相连,2位和L_4相连;W存在时,X选自



1位和母环相连，2位和W相连。

[0632] 在一些实施方案中，W选自-O-、-NR_4-、  ，1位X相连，2位与L_4或L_3相连；X选自  ，1位和母环相连，2位和W相连。

[0633] 在一些实施方案中，R_4、R_5各自独立地选自H、C1-4烷基、C3-6环烷基。

[0634] 在一些实施方案中，各R_4独立地选自H、C1-4烷基、C3-6环烷基，R_5为H。

[0635] 在一些实施方案中，各R_4独立地选自H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基、环丙基，R_5为H。

[0636] 在一些实施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自独立地选自H、C1-4烷基。

[0637] 在一些实施方案中，R^{5a}、R^{5b}各自独立地选自H、甲基。

[0638] 在一些实施方案中，各R^7独立地选自H、C1-4烷基。

[0639] 在一些实施方案中，R^7为H。

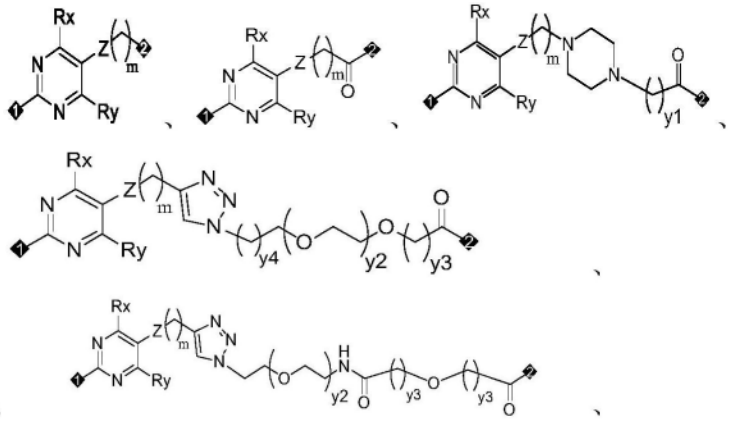
[0640] 在一些实施方案中，n选自1、2或3。

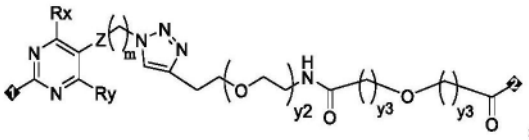
[0641] 在一些实施方案中，n为1。

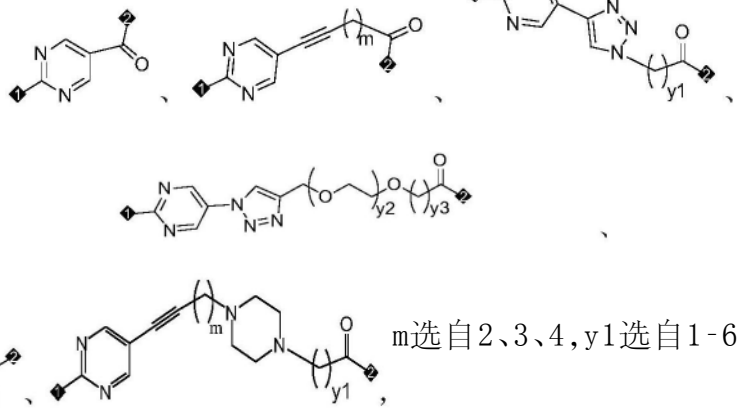
[0642] 在一些实施方案中，n1选自1、2、3或4。

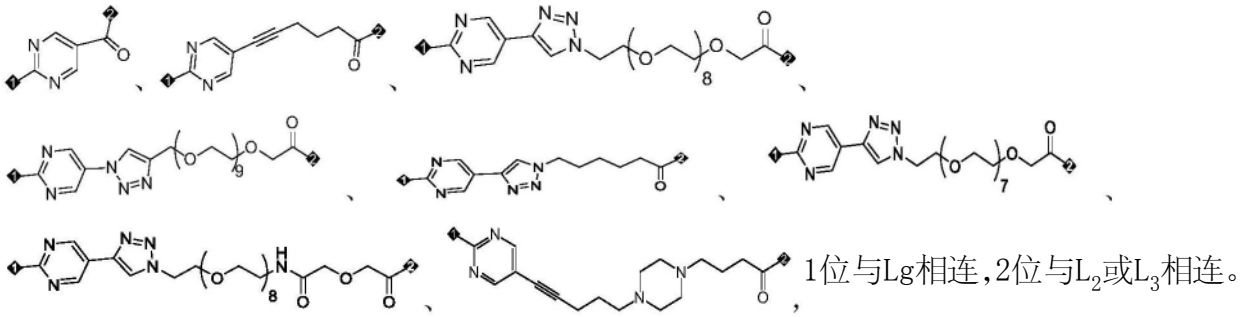
[0643] 在一些实施方案中，n2为1。

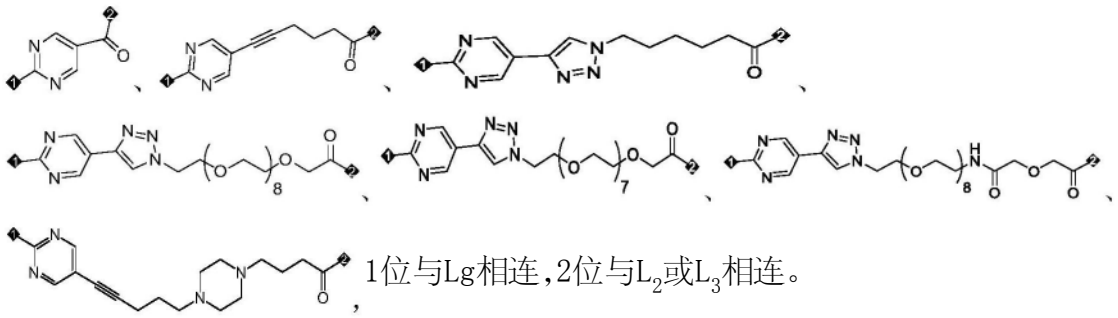
[0644] 在一些实施方案中，n3为0。

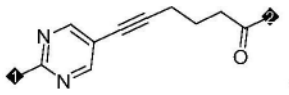
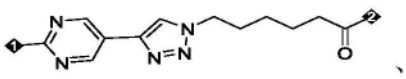
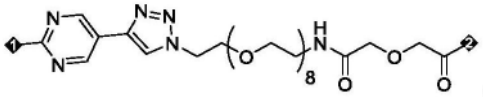
[0645] 在一些实施方案中，L_1选自 

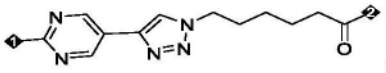

，各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10芳基、5-10元杂芳基、酰胺基(优选选自直接键、碳碳三键、碳碳双键)，Rx、Ry各自独立地选自H、C1-4烷基，各m独立地选自0、1、2、3、4、5、6，y1选自1-6之间任意整数(如4、5、6)，各y2独立地选自0-15(如6-15)之间任意整数，各y3独立地选自1、2或3，各y4独立地选自0或1，1位与lg相连，2位与L_2或L_3相连；例如各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键，Rx、Ry各自独立地选自H、C1-4烷基，各m独立地选自0、1、2、3、4、5、6，y1选自1-6之间任意整数(如4、5、6)，各y2独立地选自0-15(如6-15)之间任意整数，各y3独立地选自1、2或3，各y4独立地选自0或1，1位通过S原子与Lg相连，2位与L_2或L_3相连。

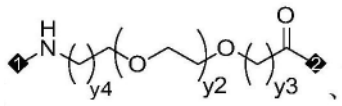
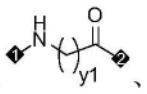
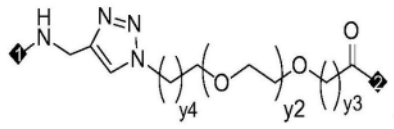
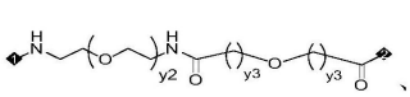
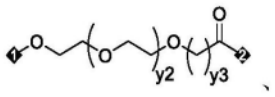
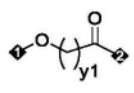
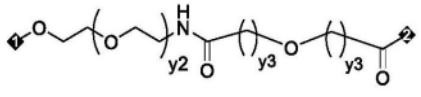
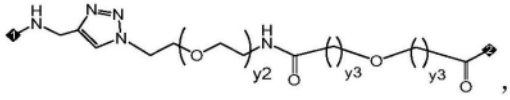
[0646] 在一些实施方案中，L_1选自 
m选自2、3、4，y1选自1-6之间任意整数(如4、5、6)，各y2独立地选自0-10(如6-10)之间任意整数，各y3独立地选自1或2，1位与Lg相连，2位与L_2或L_3相连。

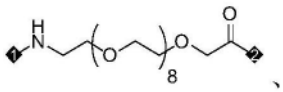
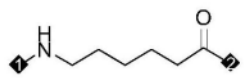
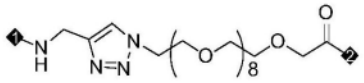
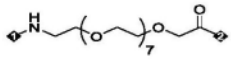
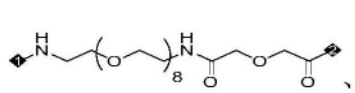
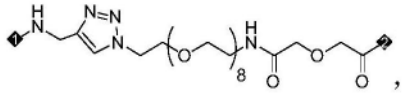
[0647] 在一些实施方案中，L_1选自 
1位与Lg相连，2位与L_2或L_3相连。

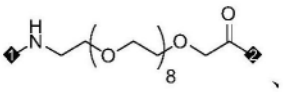
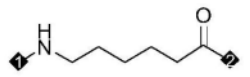
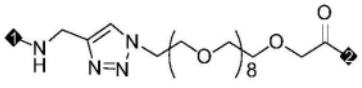
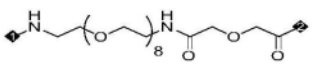
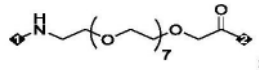
[0648] 在一些实施方案中，L_1选自 
1位与Lg相连，2位与L_2或L_3相连。

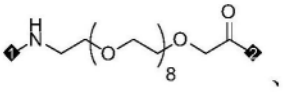
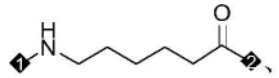
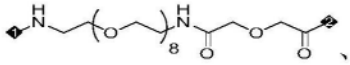
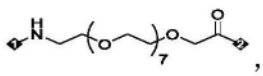
[0649] 在一些实施方案中，L_1选自  、  、  ，1位与Lg相连，2位与L_2或L_3相连。

[0650] 在一些实施方案中，L_1选自  、  ，1位与Lg相连，2位与L_2或L_3相连。

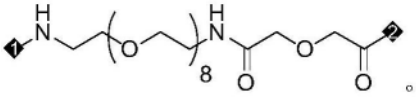
[0651] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  、  、  、  、  、  、  ，y1选自1-6之间任意整数(如4、5、6)，各y2独立地选自0-10(如6-10)之间任意整数，各y3独立地选自1或2，各y4独立地选自0或1，1位与L_1相连，2位与L_3相连。

[0652] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  、  、  、  、  ，1位与L_1相连，2位与L_3相连。

[0653] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  、  、  、  ，1位与L_1相连，2位与L_3相连。

[0654] 在一些实施方案中，L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  、  、  ，1位与L_1相连，2位与L_3相连。

[0655] 在一些实施方案中，L_2不存在。

[0656] 在一些实施方案中,L_2选自  。

[0657] 在一些实施方案中,L_3选自氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽;所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、AA^1所示氨基酸残基或其立体异构体。

[0658] 在一些实施方案中,L_3选自氨基酸残基Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1或由2-10个选自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1的氨基酸残基组成的短肽。

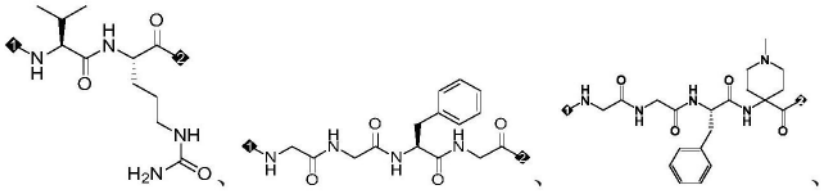
[0659] 在一些实施方案中,L_3选自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys、Lys-Ala-Asn。

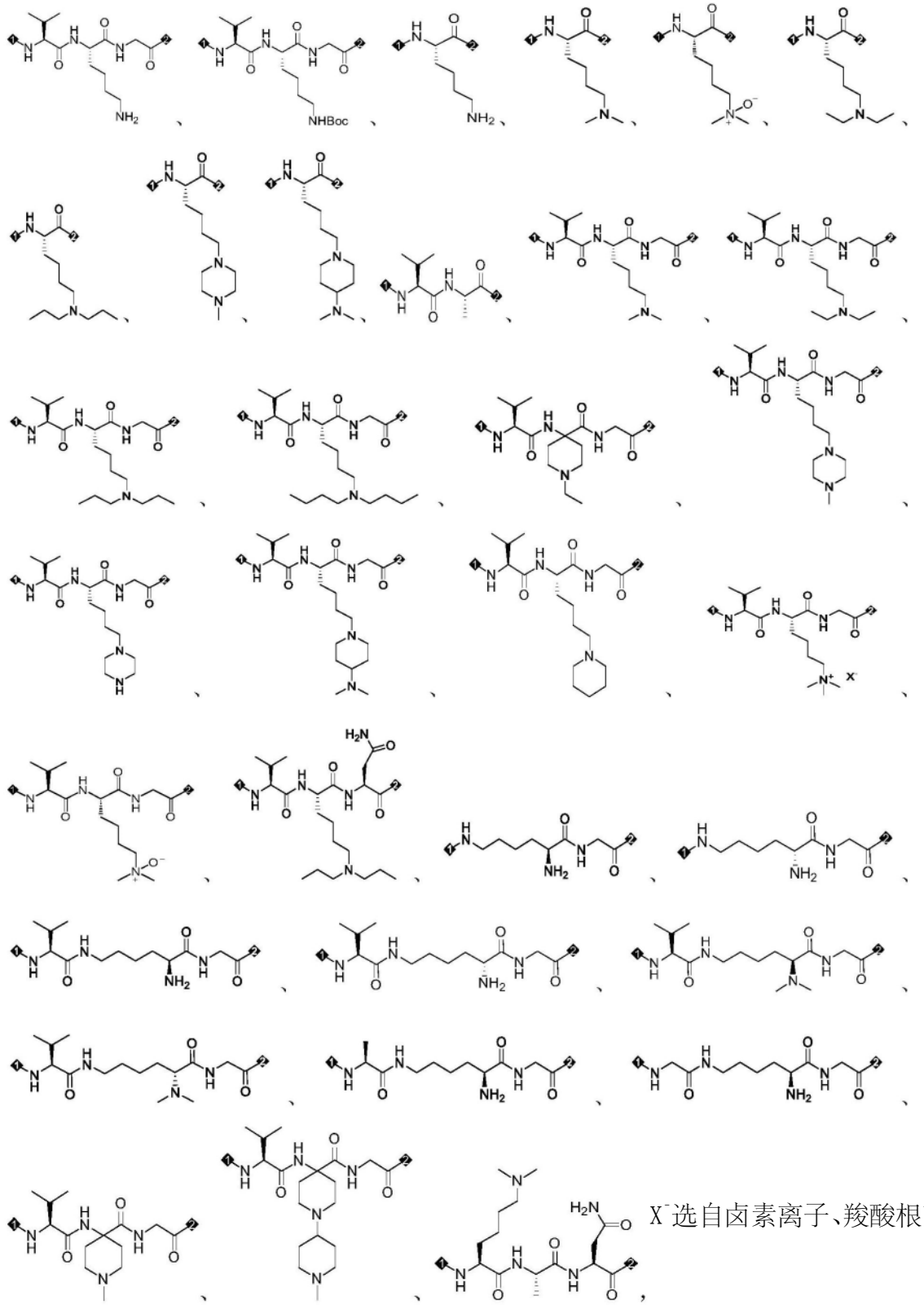
[0660] 在一些实施方案中,L_3选自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe-Gly。

[0661] 在一些实施方案中,L_3选自AA^1、Val-AA^1-Gly。

[0662] 在一些实施方案中,L_3选自Val-AA^1-Gly。

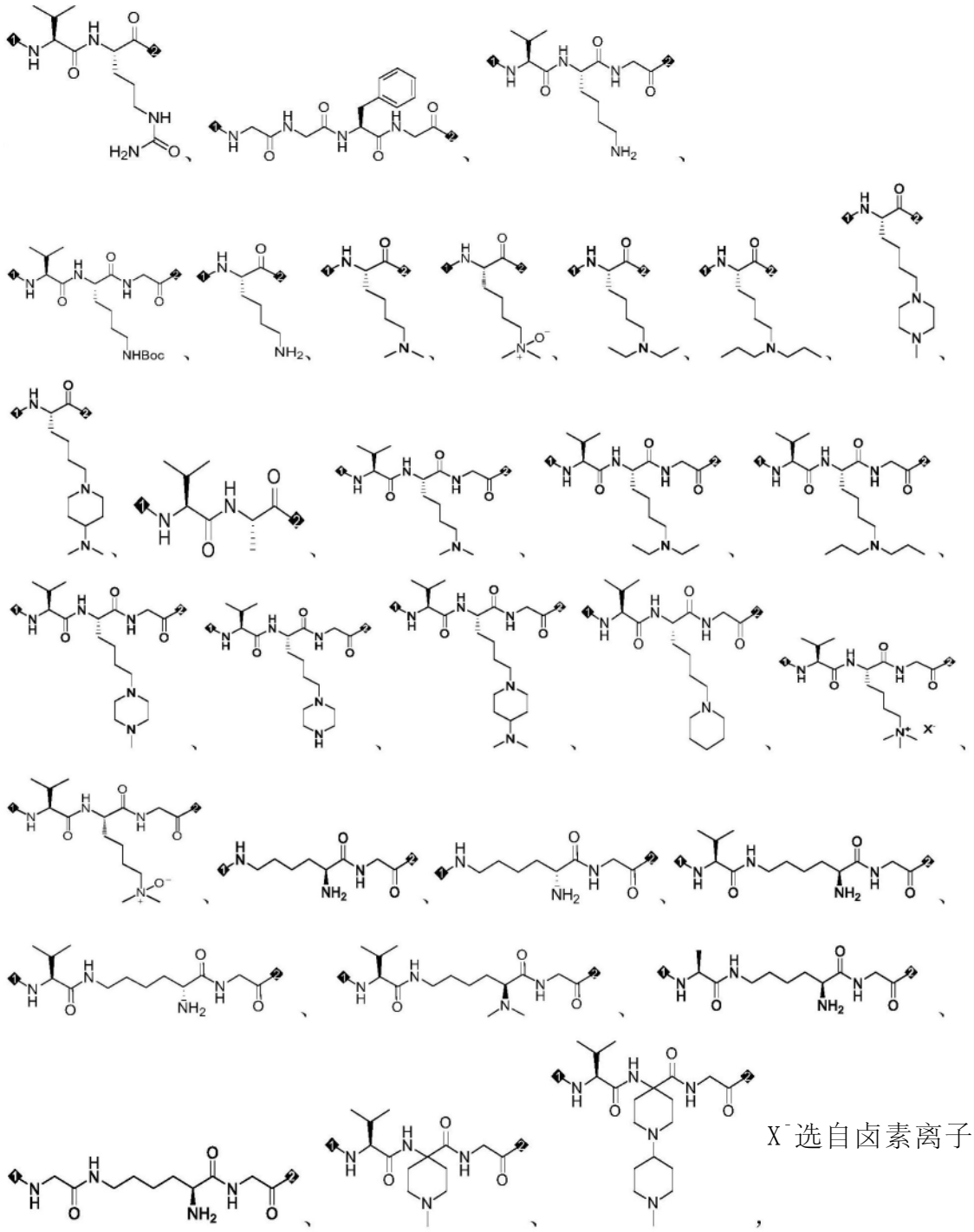
[0663] 在一些实施方案中,L_3选自





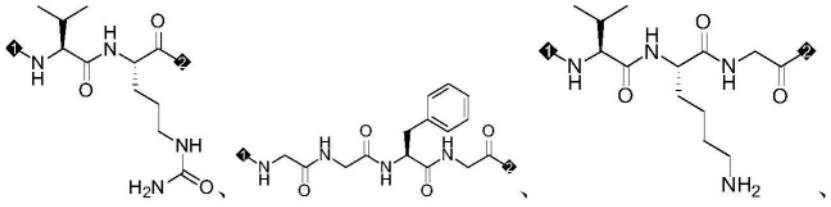
X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子、OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

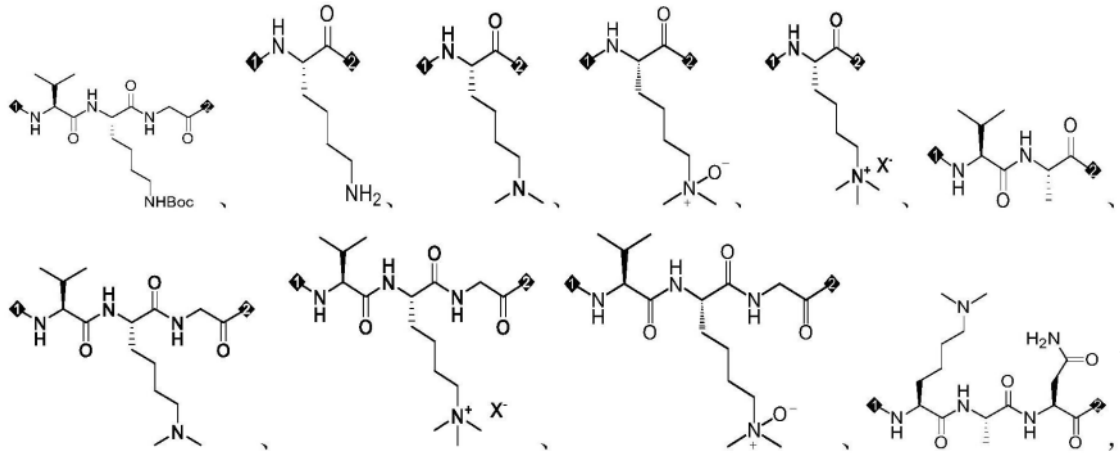
[0664] 在一些实施方案中，L_3选自



X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子、OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

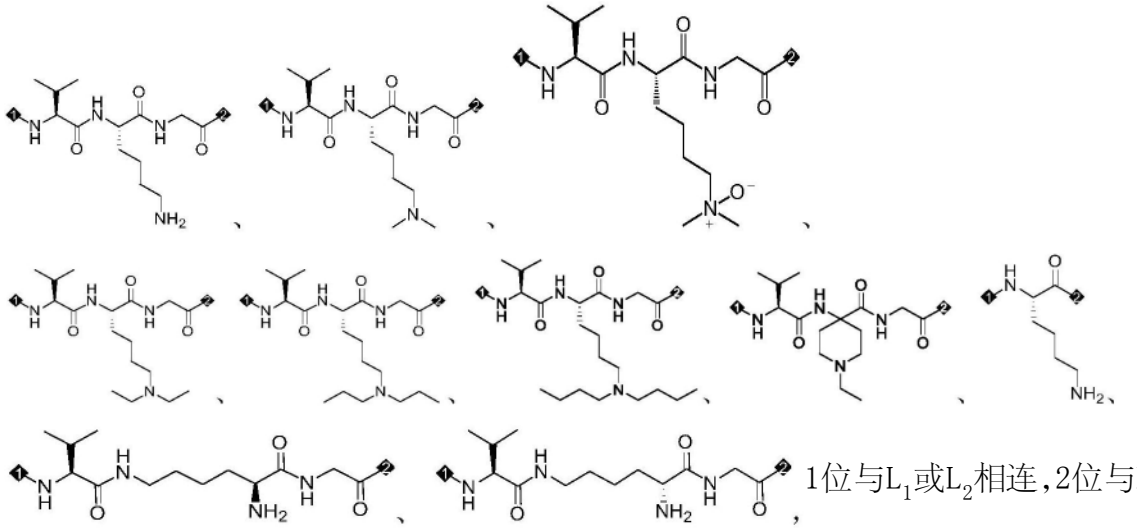
[0665] 在一些实施方案中，L_3选自





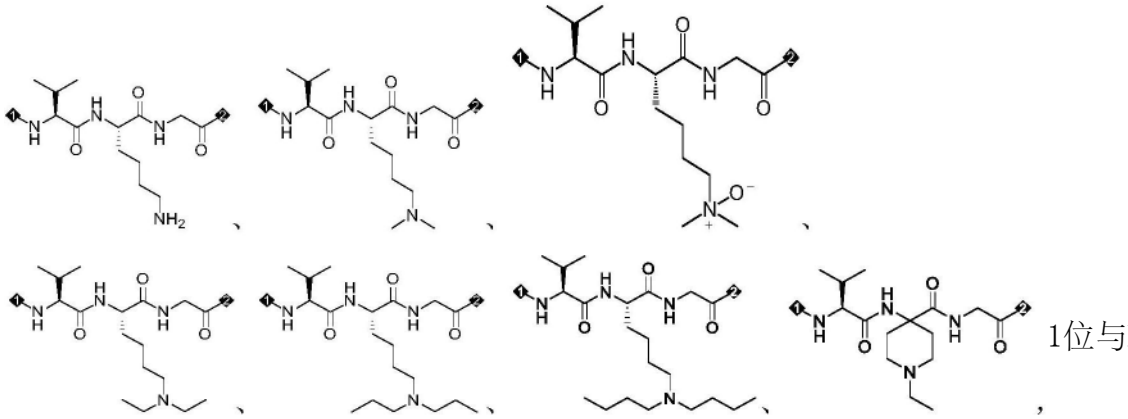
X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子、OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

[0666] 在一些实施方案中，L_3选自



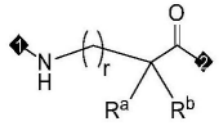
1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

[0667] 在一些实施方案中，L_3选自



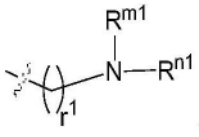
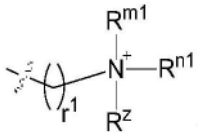
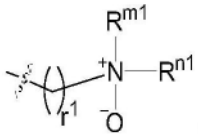
1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或W相连。

[0668] 在一些实施方案中，AA^1所示氨基酸残基的结构如下所示，

[0669] 

AA^1

[0670] 其中：

[0671] R^a、R^b各自独立地选自H、  、  、  ，且R^a、R^b不同时为H；

[0672] 或者，R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起，形成4-10元杂环，所述4-10元杂环任选地被一个或多个R^0所取代；

[0673] r、r^1各自独立地选自0到20的任意整数；

[0674] R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基、C3-6环烷基、-$COOR^{x1}$；

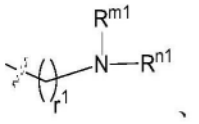
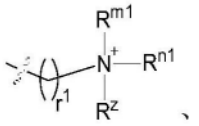
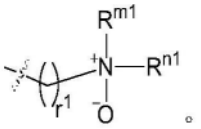
[0675] R^{x1}选自C1-6烷基；

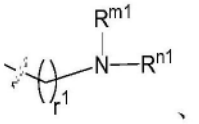
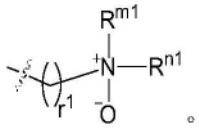
[0676] 或者，R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起，形成4-10元杂环，所述4-10元杂环任选地被一个或多个$R^{0'}$所取代；

[0677] R^z选自C1-6烷基；

[0678] R^0、$R^{0'}$各自独立地选自C1-6烷基、C3-6环烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$、任选被C1-6烷基取代的4-10元杂环基；

[0679] R^{m2}、R^{n2}各自独立地选自H、C1-6烷基。

[0680] 在一些实施方案中，R^a、R^b中，任一个为H，另一个选自  、  、  。

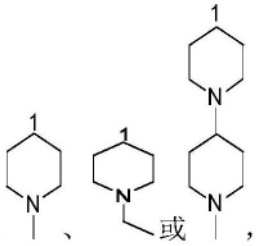
[0681] 在一些实施方案中，R^a、R^b中，任一个为H，另一个选自  、  。

[0682] 在一些实施方案中，R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元杂环。

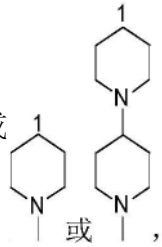
[0683] 在一些实施方案中，R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶环或哌嗪环。

[0684] 在一些实施方案中，R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起，形成被R^0取代的哌啶环。

[0685] 在一些实施方案中，R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起，形成



1号碳原子为与R^a和R^b共同相连的碳原子。

[0686] 在一些实施方案中,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成 

1号碳原子为与R^a和R^b共同相连的碳原子。

[0687] 在一些实施方案中,r、r^1各自独立地选自0、1、2、3、4、5。

[0688] 在一些实施方案中,r、r^1各自独立地选自0、4。

[0689] 在一些实施方案中,r、r^1中,任一个为0,另一个为4。

[0690] 在一些实施方案中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3、-COOCH2CH2CH2CH3。

[0691] 在一些实施方案中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基、C3-6环烷基、叔丁氧羰基。

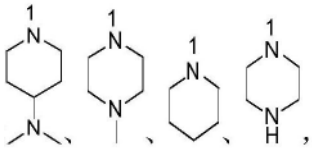
[0692] 在一些实施方案中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基。

[0693] 在一些实施方案中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、甲基、乙基、正丙基。

[0694] 在一些实施方案中,r、r^1中,r为4,r^1为0时,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基(如H、甲基);r为0,r^1为4时,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自C1-6烷基(如甲基、乙基、正丙基),优选选自C2-6烷基(如乙基、正丙基)。

[0695] 在一些实施方案中,R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起,形成任选被$R^{0'}$取代的5-6元杂环。

[0696] 在一些实施方案中,R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起,形成任选被$R^{0'}$取代的哌啶环或哌嗪环。

[0697] 在一些实施方案中,R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起,形成 

1号氮原子为与R^{m1}和R^{n1}共同相连的氮原子。

[0698] 在一些实施方案中,R^z为甲基。

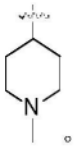
[0699] 在一些实施方案中,R^0、$R^{0'}$各自独立地选自C1-6烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$、任选被C1-6烷基取代的5-6元杂环基。

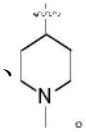
[0700] 在一些实施方案中,R^0选自C1-6烷基、被C1-6烷基取代的5-6元杂环基,所述5-6元杂环基选自哌啶基、哌嗪基。

[0701] 在一些实施方案中,R^0选自甲基、乙基、被甲基取代的5-6元杂环基,所述5-6元杂

环基为哌啶基。

[0702] 在一些实施方案中,R^0选自甲基、被甲基取代的5-6元杂环基,所述5-6元杂环基为哌啶基。

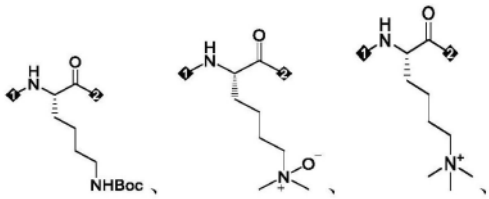
[0703] 在一些实施方案中,R^0选自甲基、乙基、  。

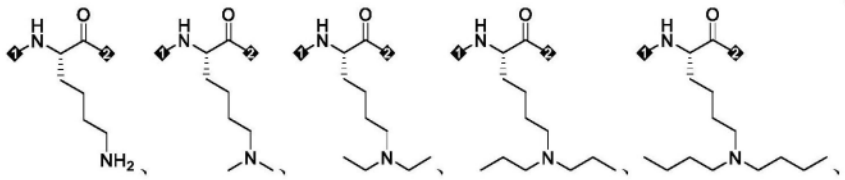
[0704] 在一些实施方案中,R^0选自甲基、  。

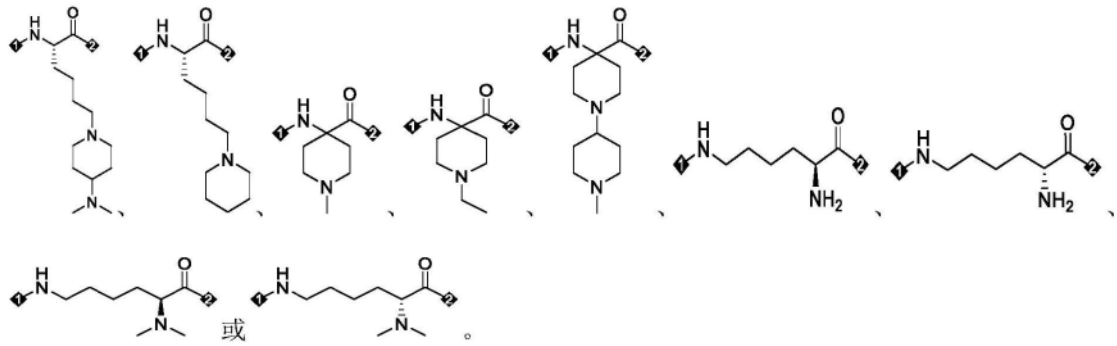
[0705] 在一些实施方案中,$R^{0'}$选自C1-6烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$。

[0706] 在一些实施方案中,$R^{0'}$选自甲基、-$NR^{m2}R^{n2}$。

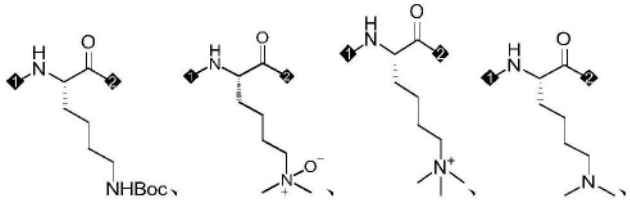
[0707] 在一些实施方案中,R^{m2}、R^{n2}为甲基。

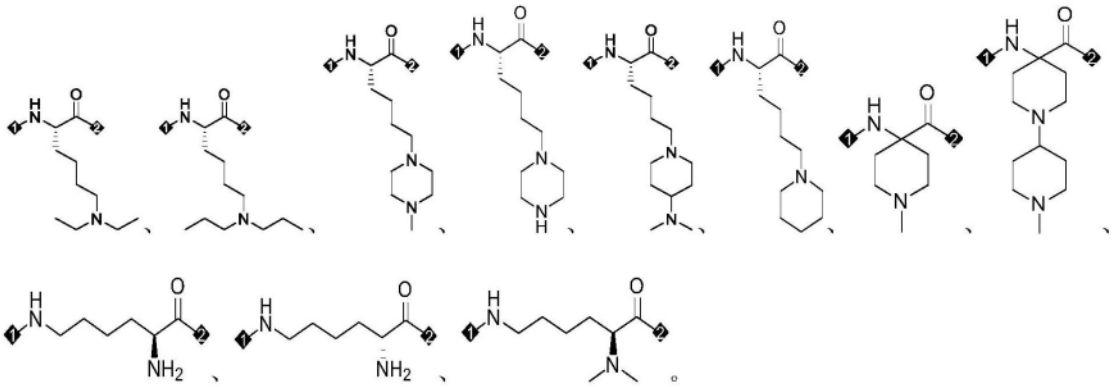
[0708] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基选自 



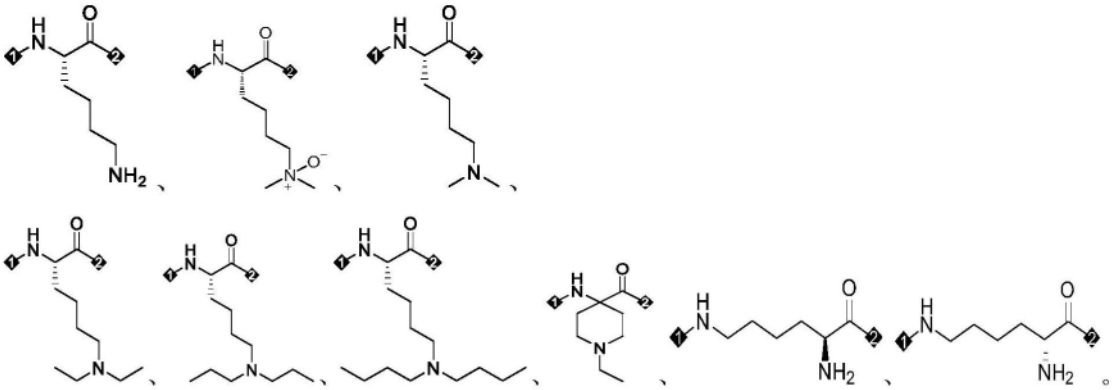
[0709] 

[0710] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基选自

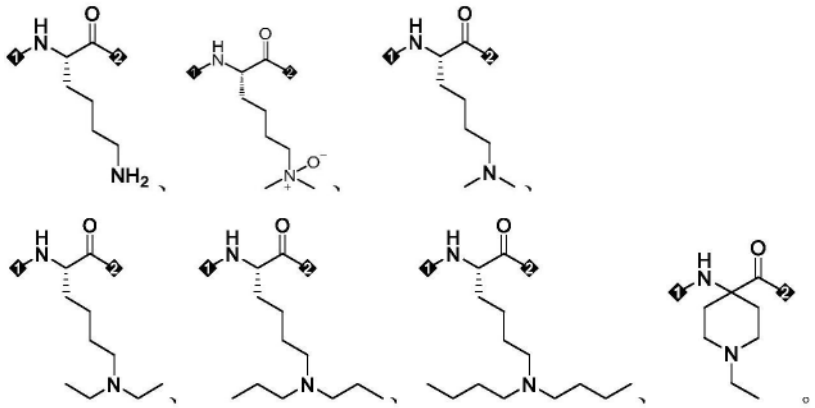




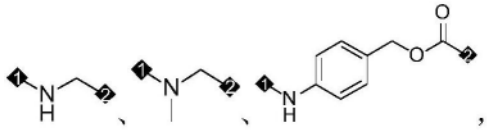
[0711] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基选自



[0712] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基选自

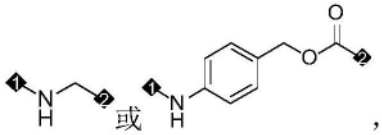


[0713] 在一些实施方案中,L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4选自



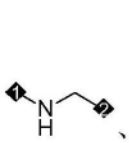
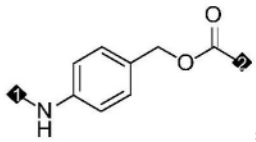
1位与L_3相连,2位与W或X相连。

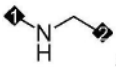
[0714] 在一些实施方案中,L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4为



1位与L_3相连,2位与W或X相连。

[0715] 在一些实施方案中,L_4不存在。

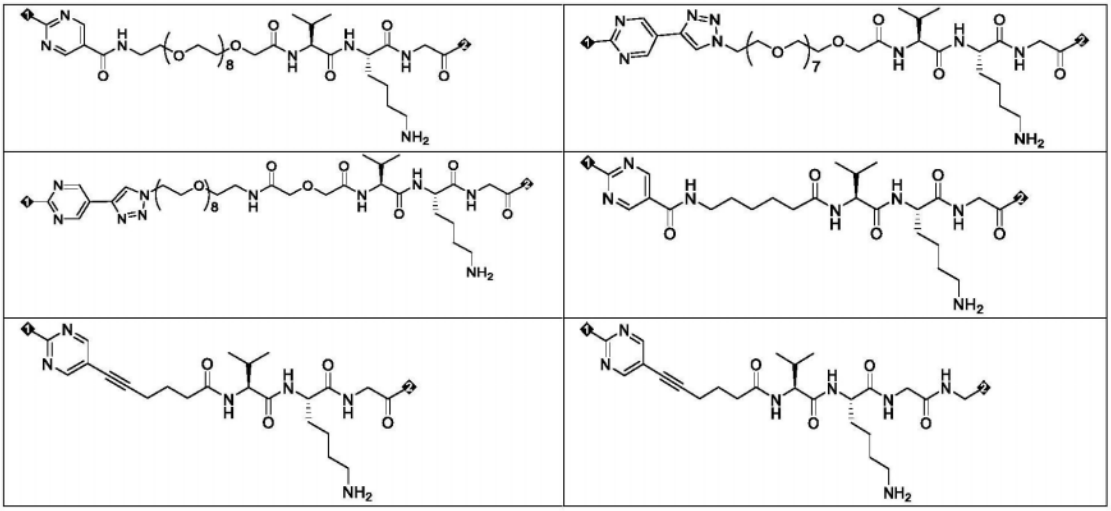
[0716] 在一些实施方案中，L_4选自  、  ，1位与L_3相连，2位与W或X相连。

[0717] 在一些实施方案中，L_4选自  ，1位与L_3相连，2位与W或X相连。

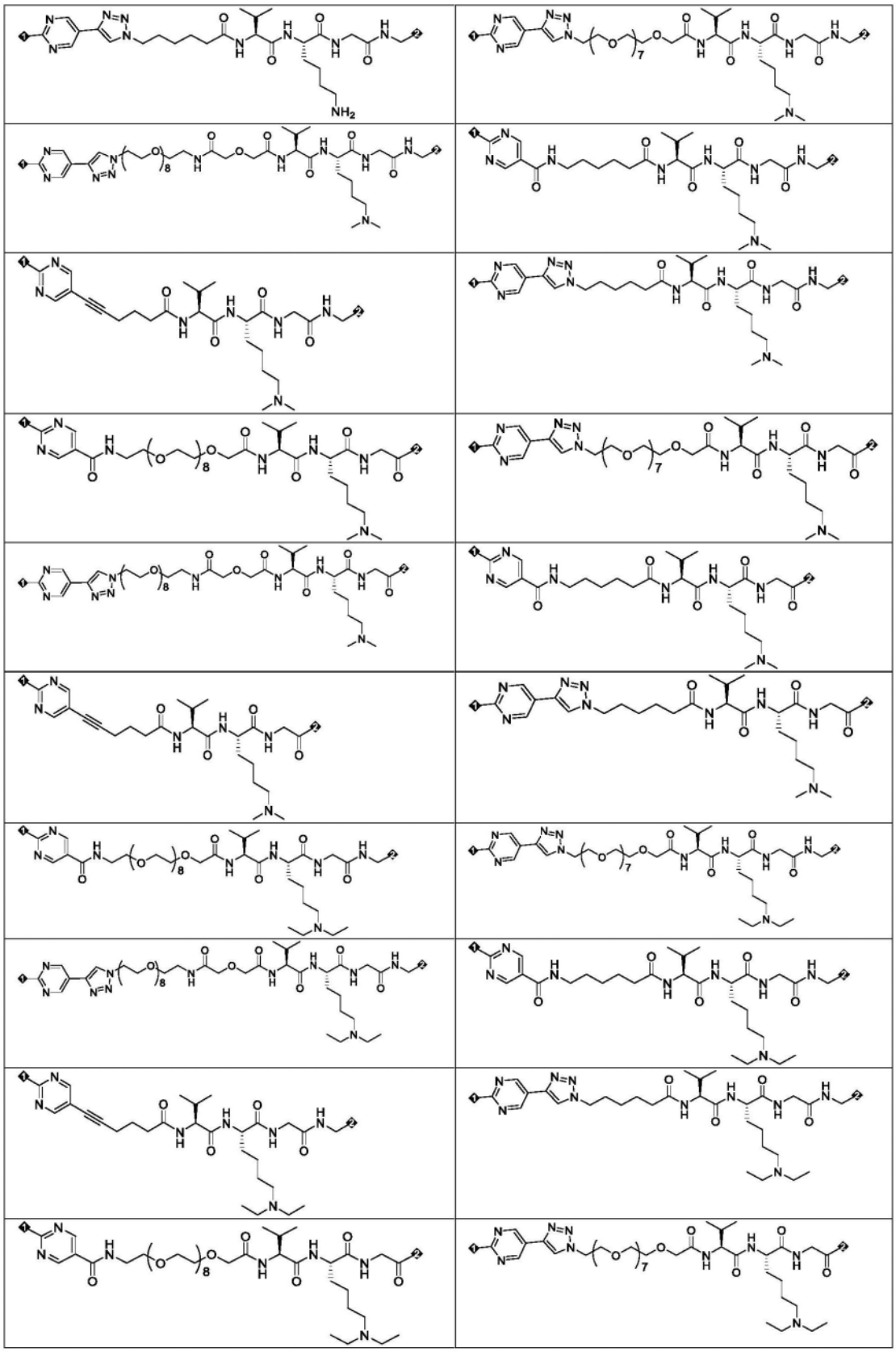
[0718] 在一些实施方案中，Lg选自F、Cl、$MeSO_2^-$。

[0719] 在一些实施方案中，Lg选自F、$MeSO_2^-$。

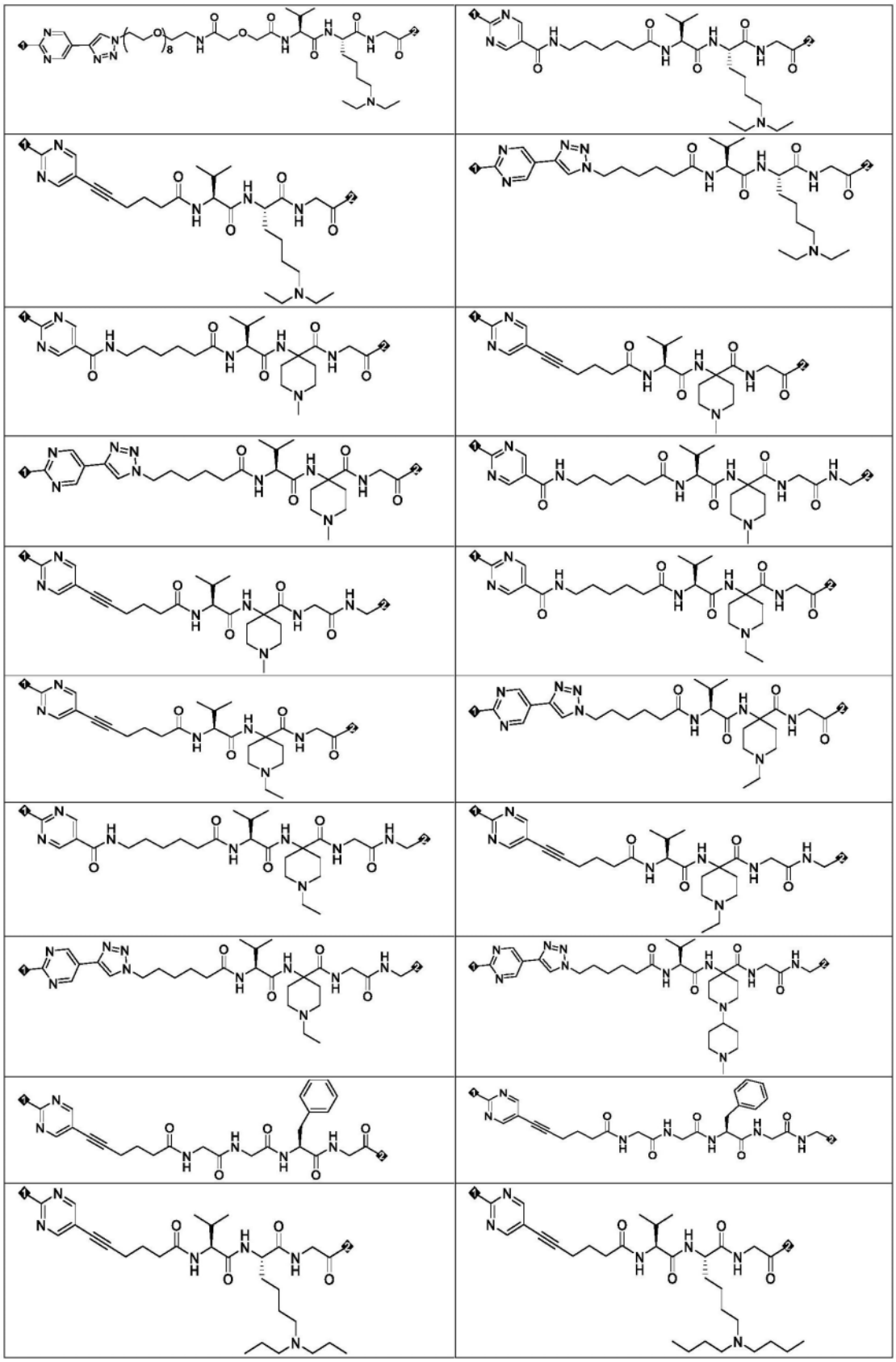
[0720] 在一些实施方案中，❶—L_1—L_2—L_3—L_4—❷的结构选自以下：

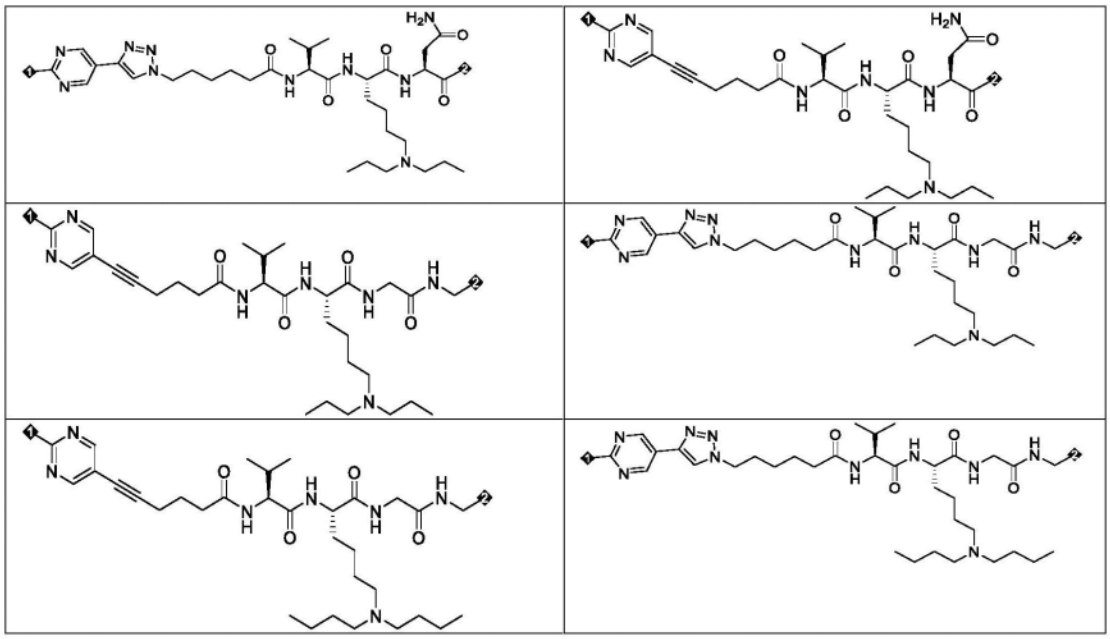
[0721] 

[0722]

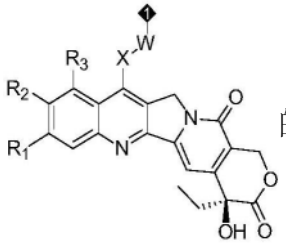


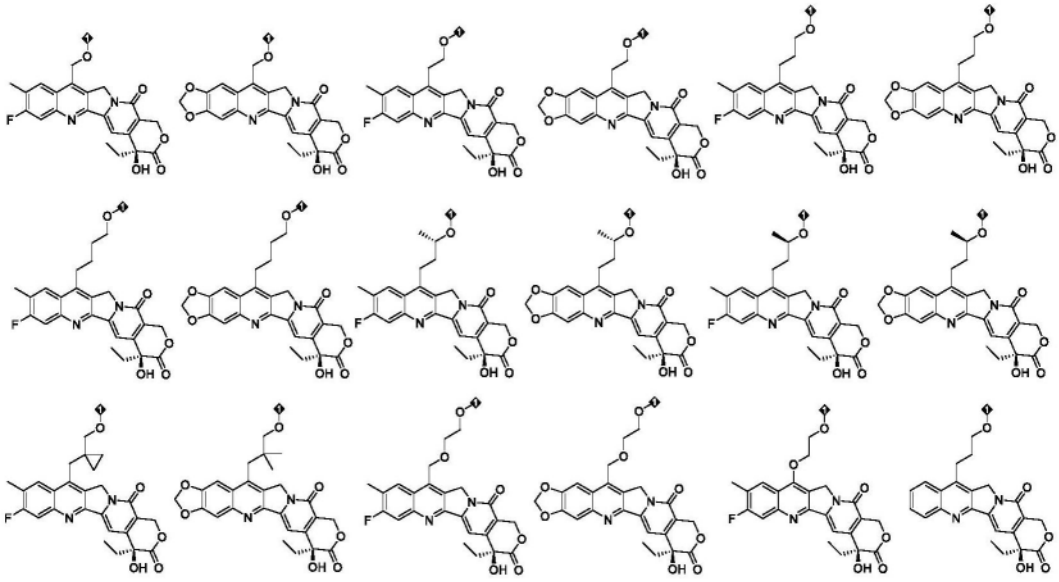
[0723]



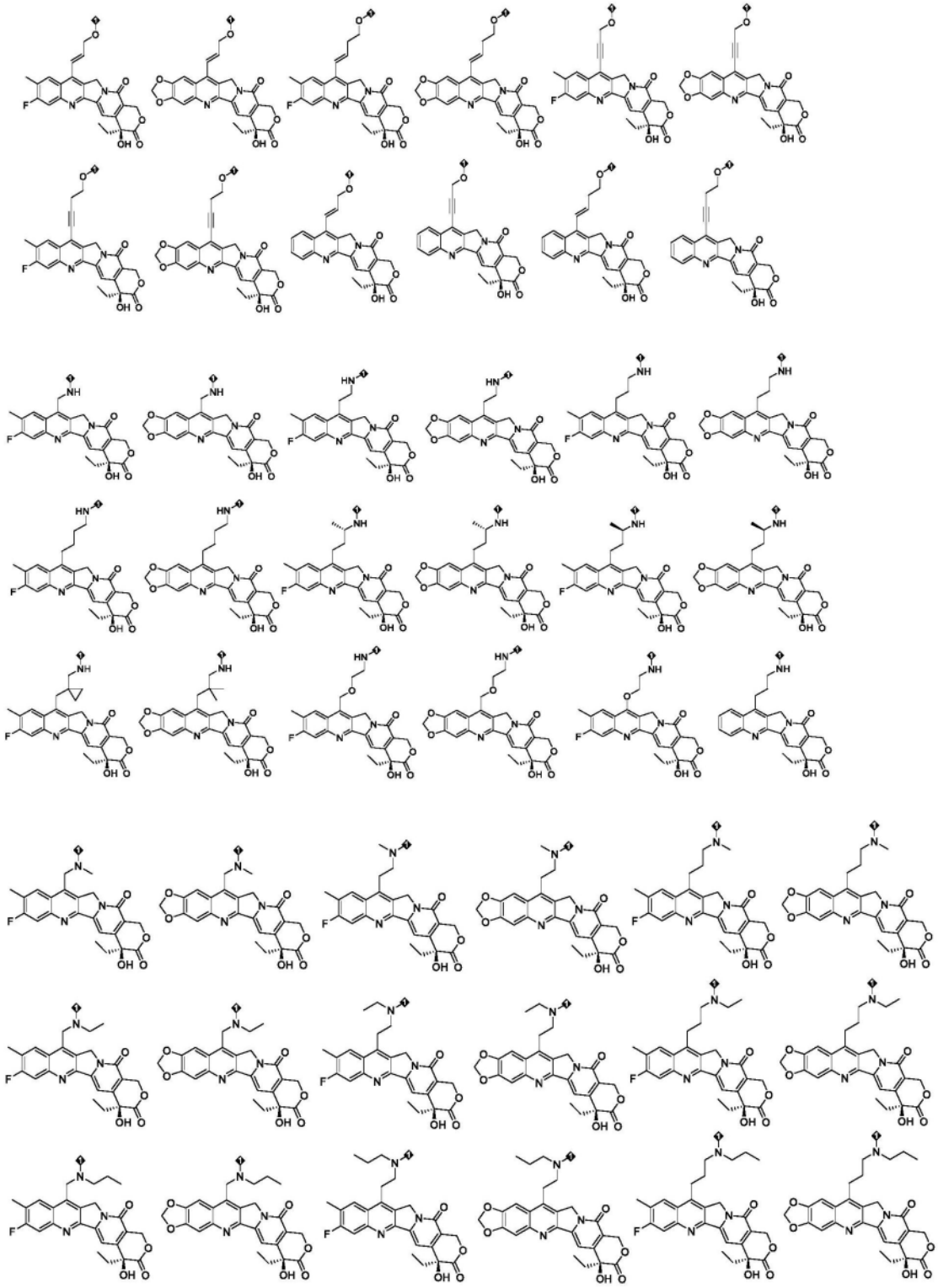
[0724] 

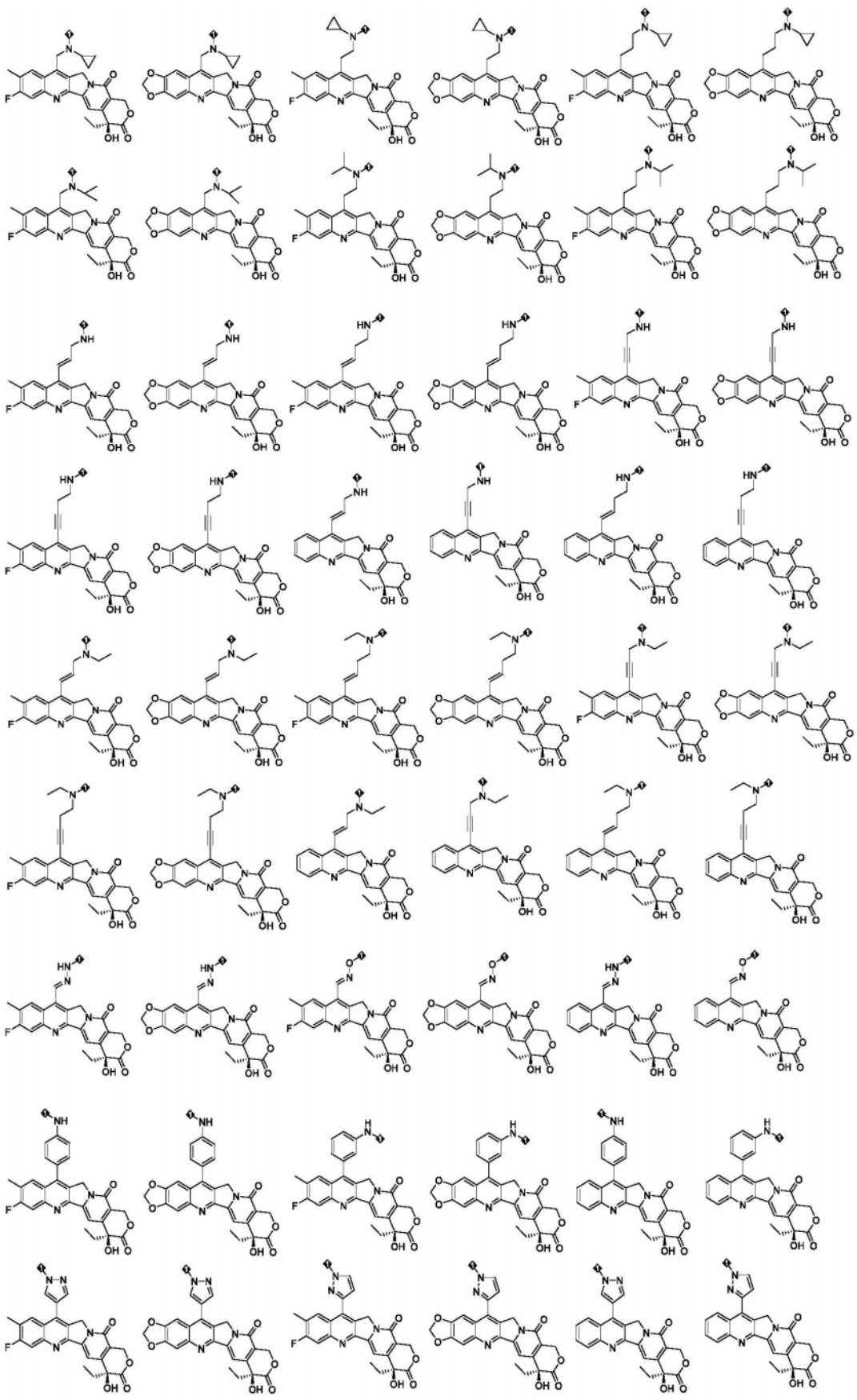
[0725] 其中,1位与Lg相连,2位与W相连。

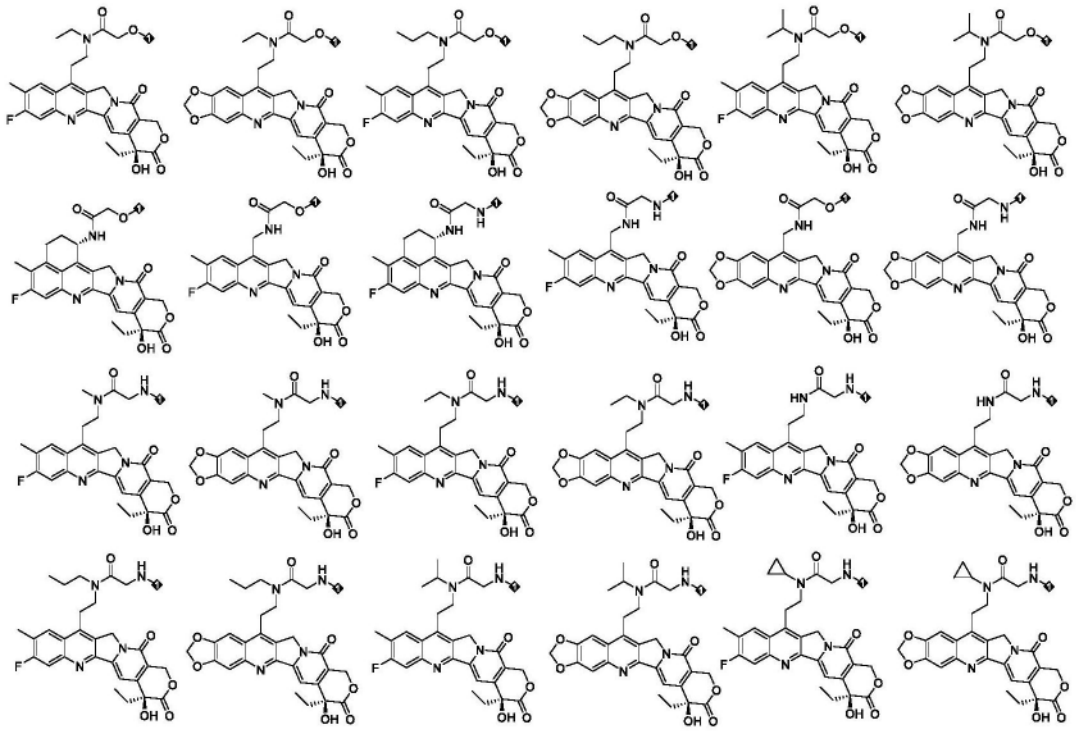
[0726] 在一些实施方案中,  的结构选自以下:

[0727] 

[0728]

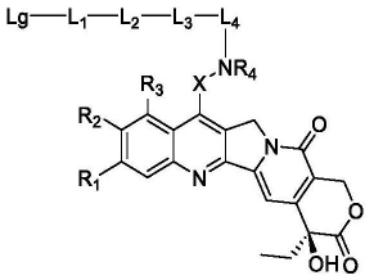


[0729] 

[0730] 

[0731] 其中,1位与L_4相连;当L_4不存在时,1位与L_3相连。

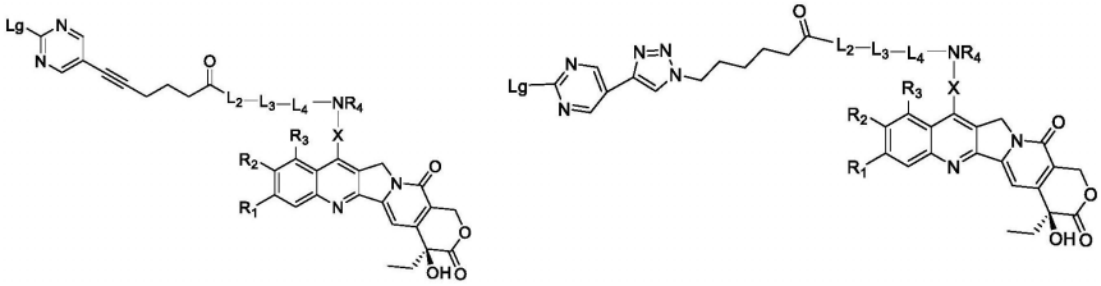
[0732] 在一些实施方案中,药物连接体偶联物具有式III-(1)所式结构:

[0733] 

III-(1) ,

[0734] 其中,L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

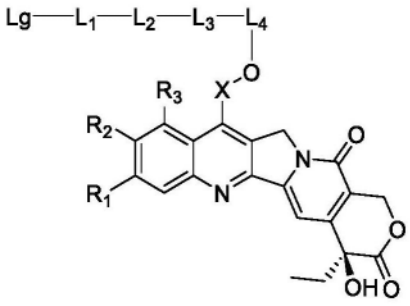
[0735] 在一些实施方案中,药物连接体偶联物具有式III-(1A)或III-(1B)所式结构:

[0736] 

III-(1A) 、 III-(1B) ,

[0737] 其中,L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

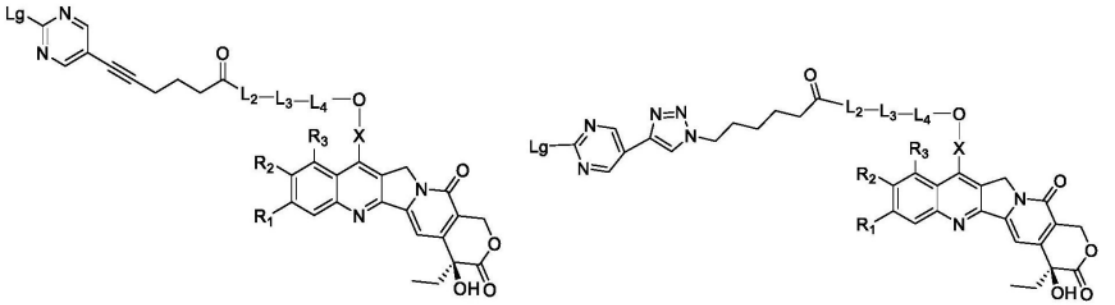
[0738] 在一些实施方案中,药物连接体偶联物具有式III-(2)所式结构:

[0739] 

III-(2) ,

[0740] 其中,L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

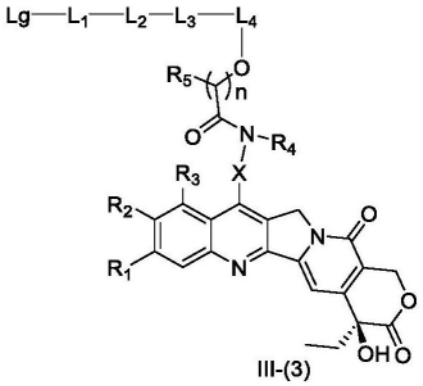
[0741] 在一些实施方案中,药物连接体偶联物具有式III-(2A)或III-(2B)所式结构:

[0742] 

III-(2A) 、 III-(2B) ,

[0743] 其中,L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

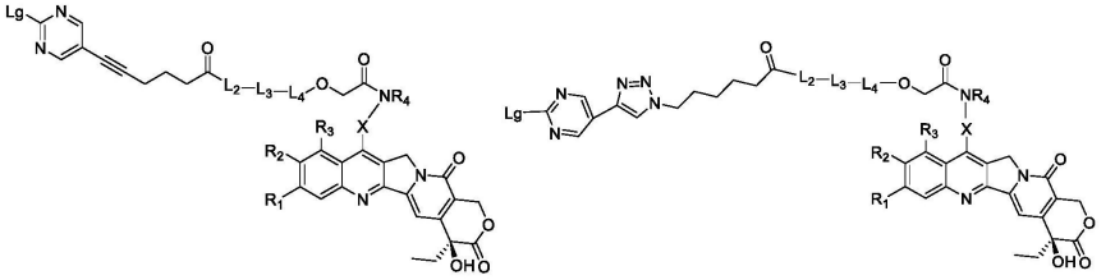
[0744] 在一些实施方案中,药物连接体偶联物具有式III-(3)所式结构:

[0745] 

III-(3) ,

[0746] 其中,L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和Lg具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

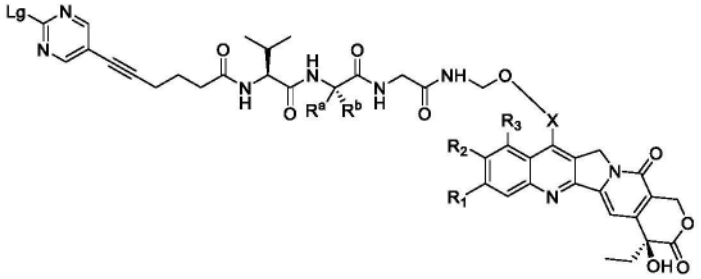
[0747] 在一些实施方案中,药物连接体偶联物具有式III-(3A)或III-(3B)所式结构:

[0748] 

III-(3A) III-(3B) ,

[0749] 其中,Lg、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

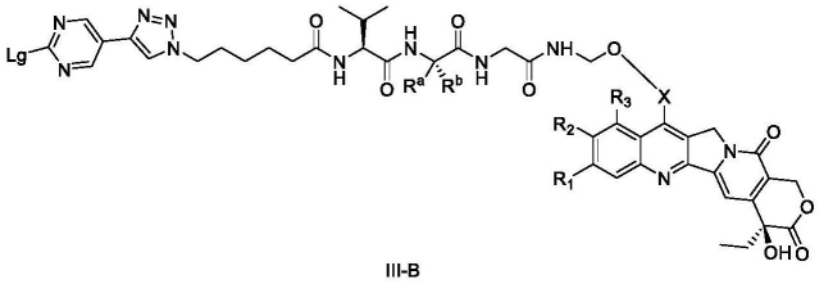
[0750] 在一些实施方案中,药物连接体偶联物具有式III-A所式结构:

[0751] 

III-A ,

[0752] 其中,Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a和R^b具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

[0753] 在一些实施方案中,药物连接体偶联物具有式III-B所式结构:

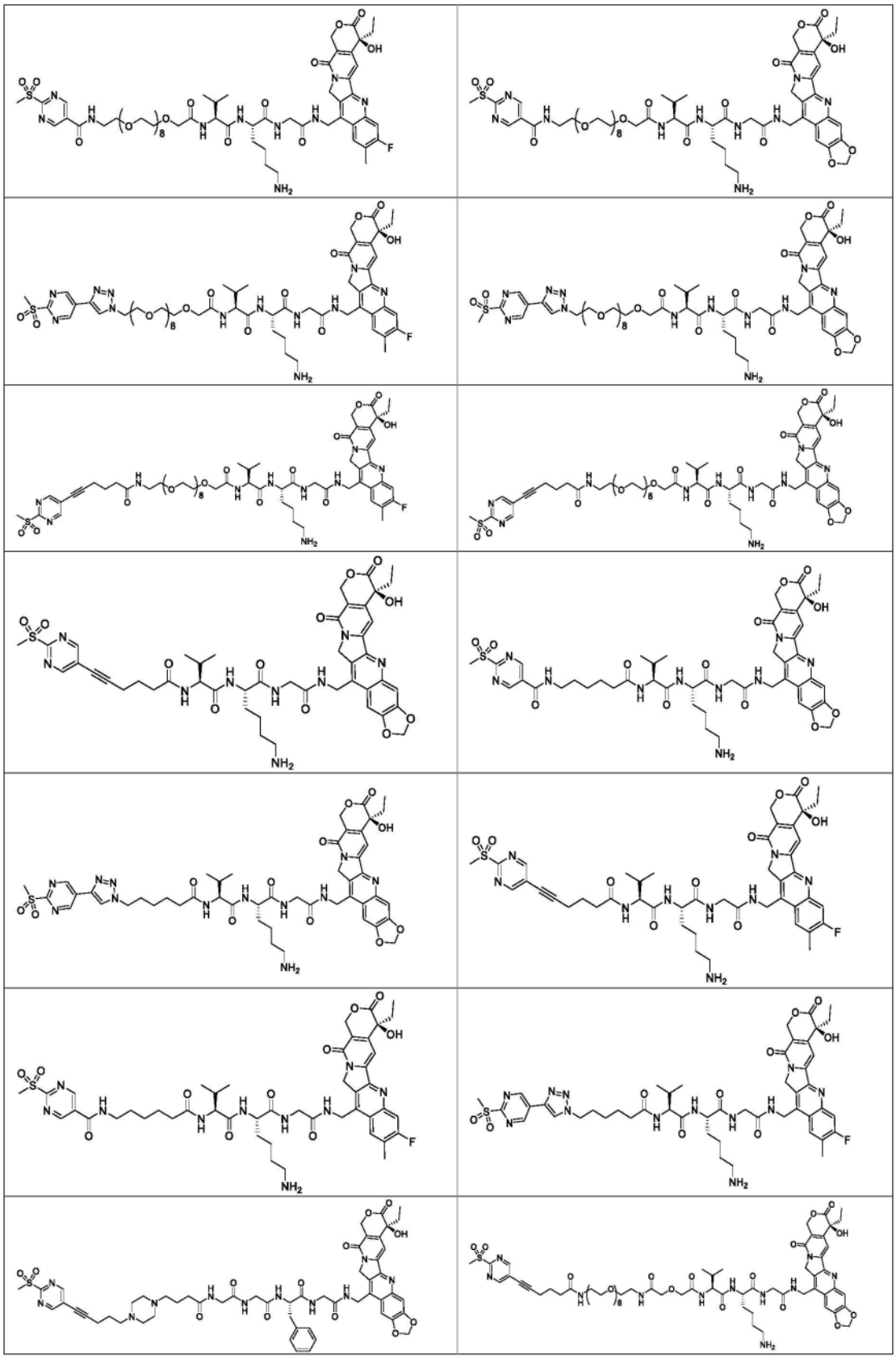
[0754] 

III-B ,

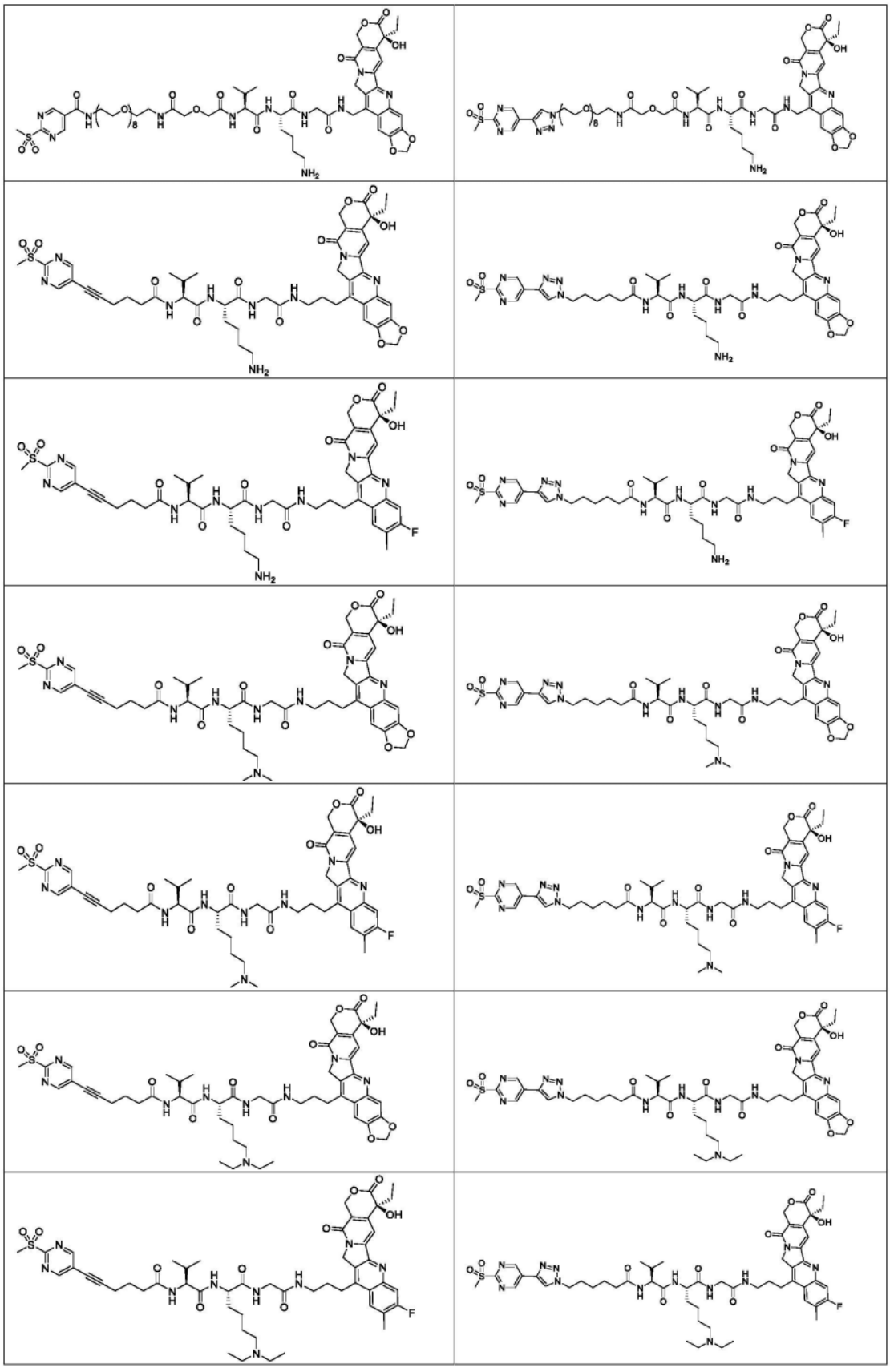
[0755] 其中,Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a和R^b具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

[0756] 在一些实施方案中,式III所示的药物连接体偶联物选自以下结构:

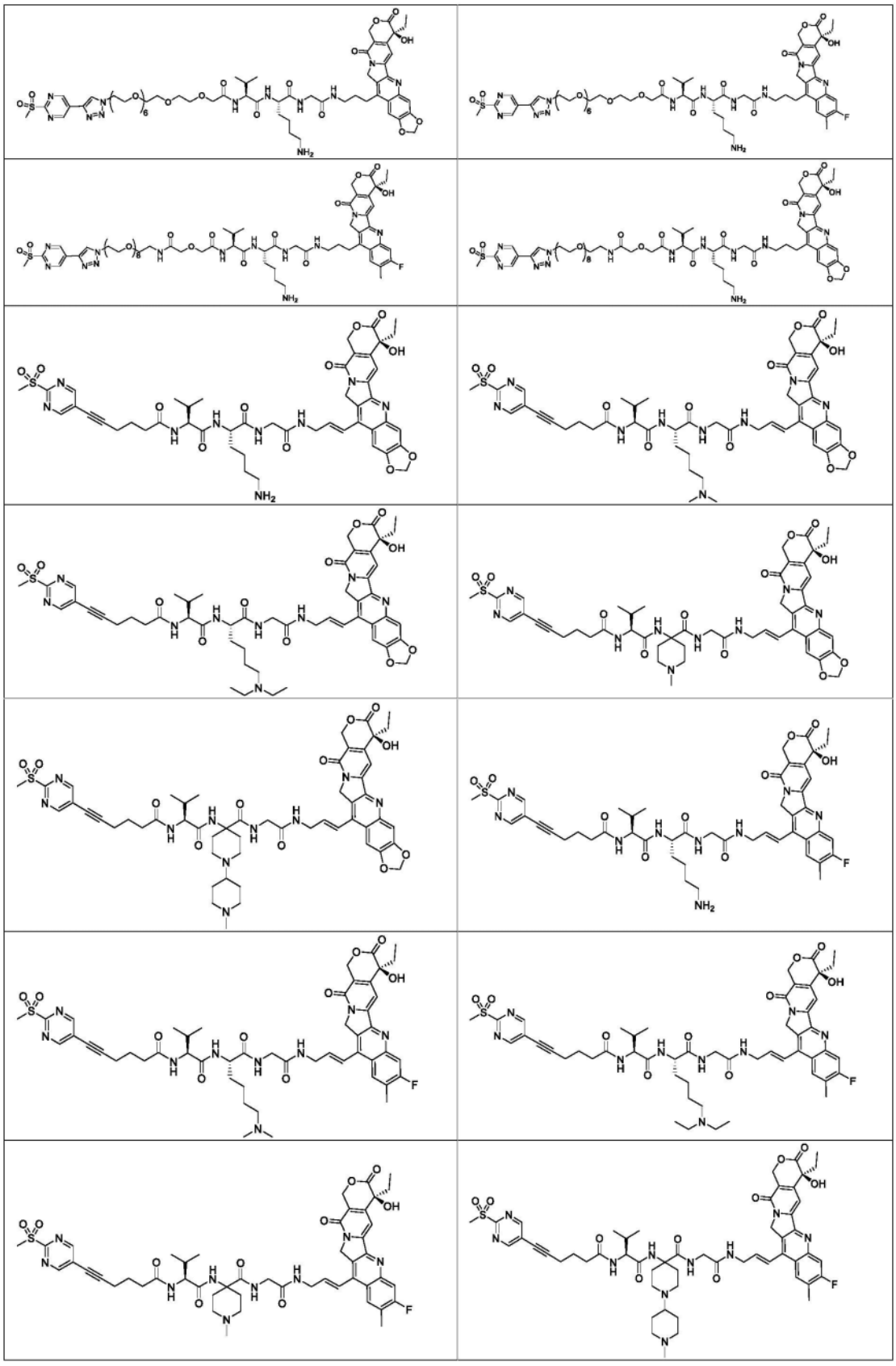
[0757]



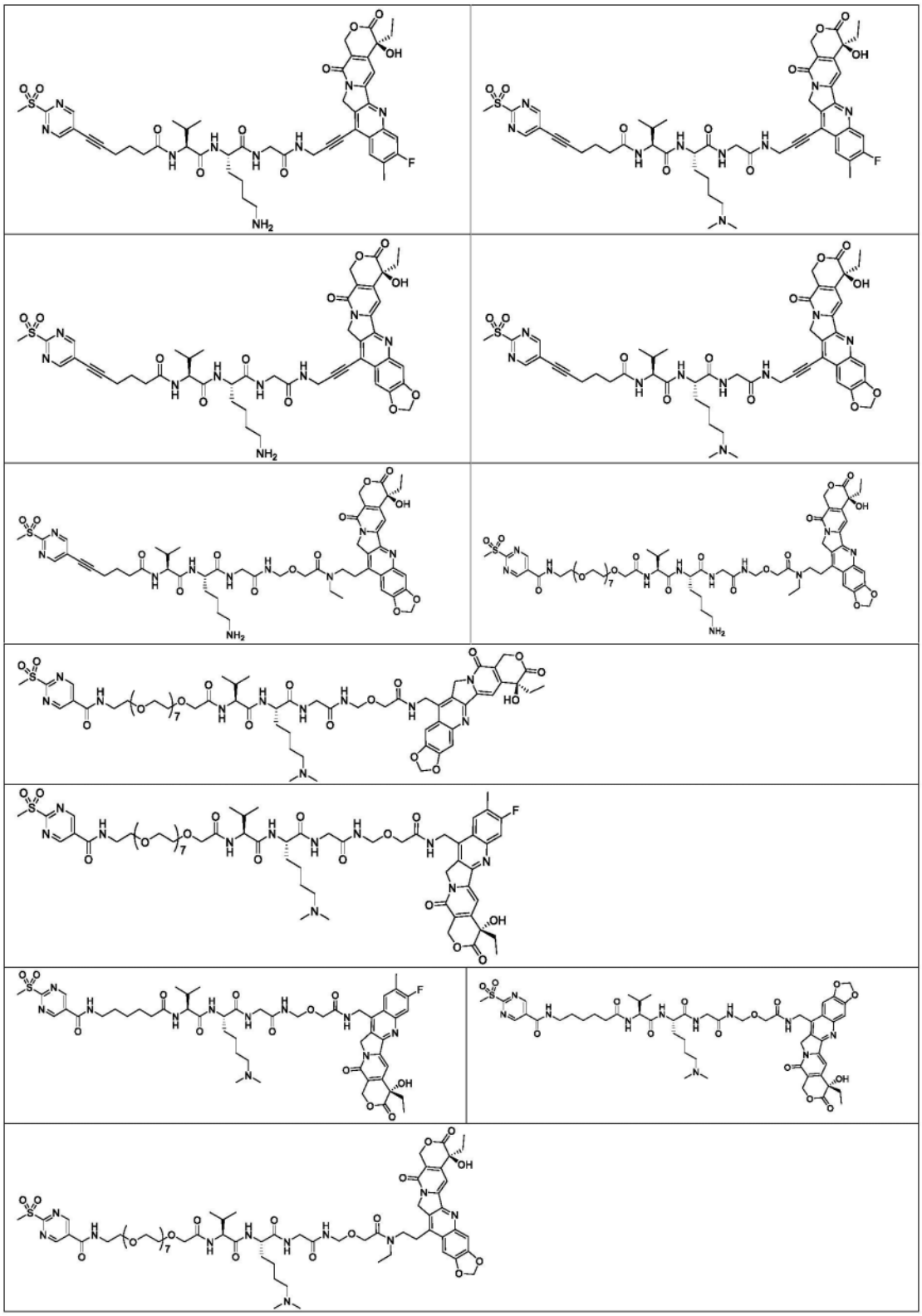
[0758]



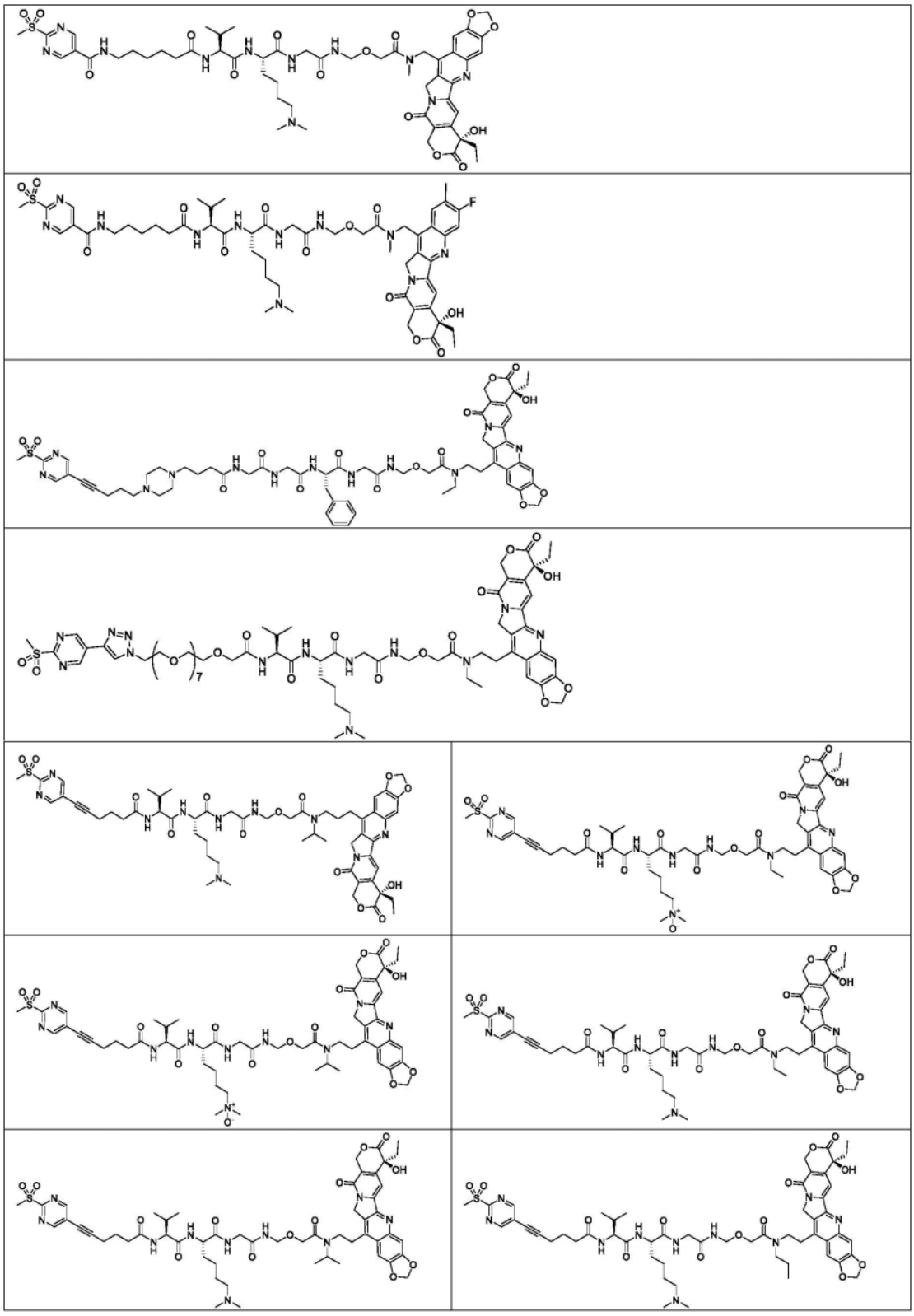
[0759]



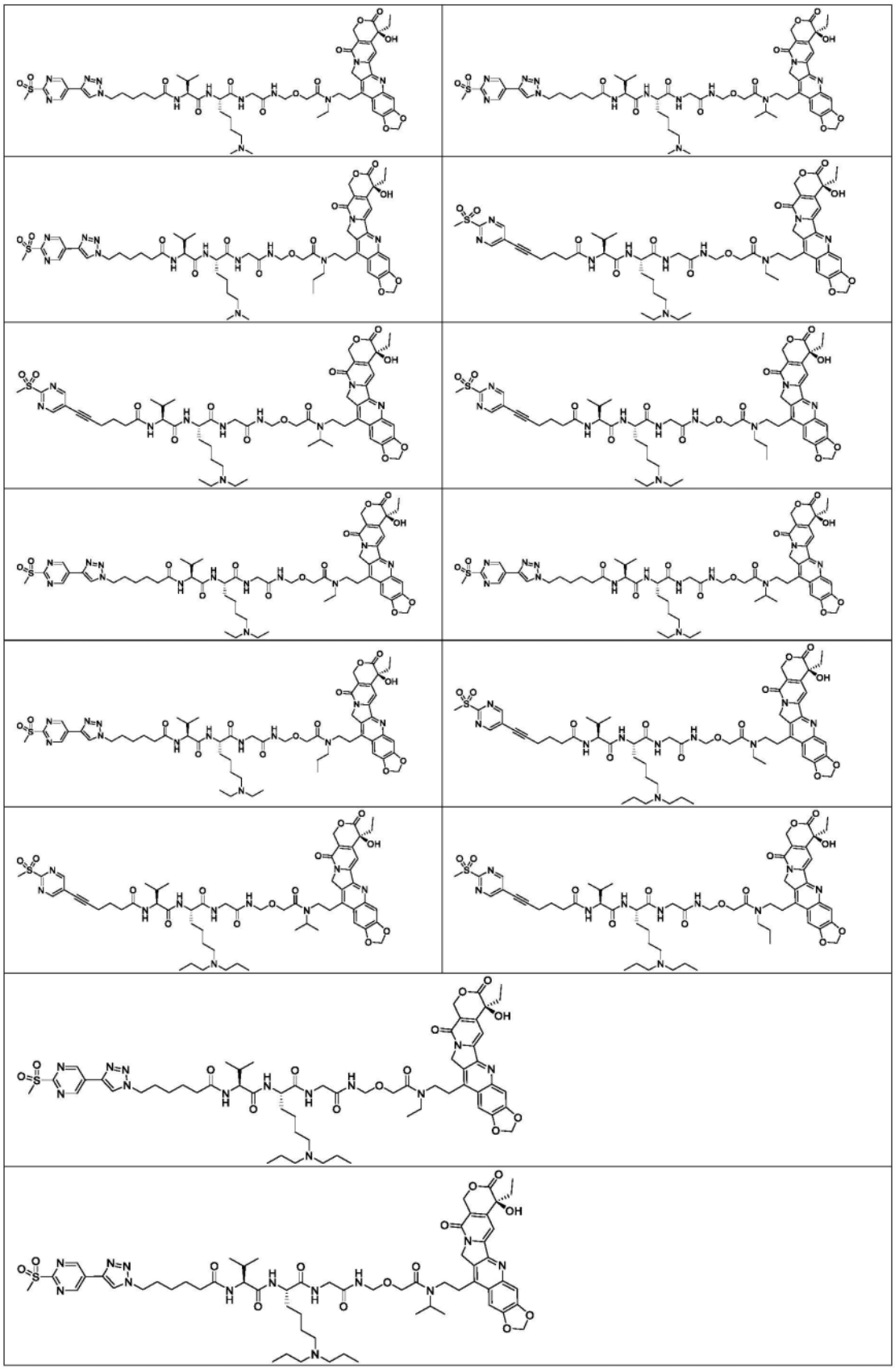
[0760]



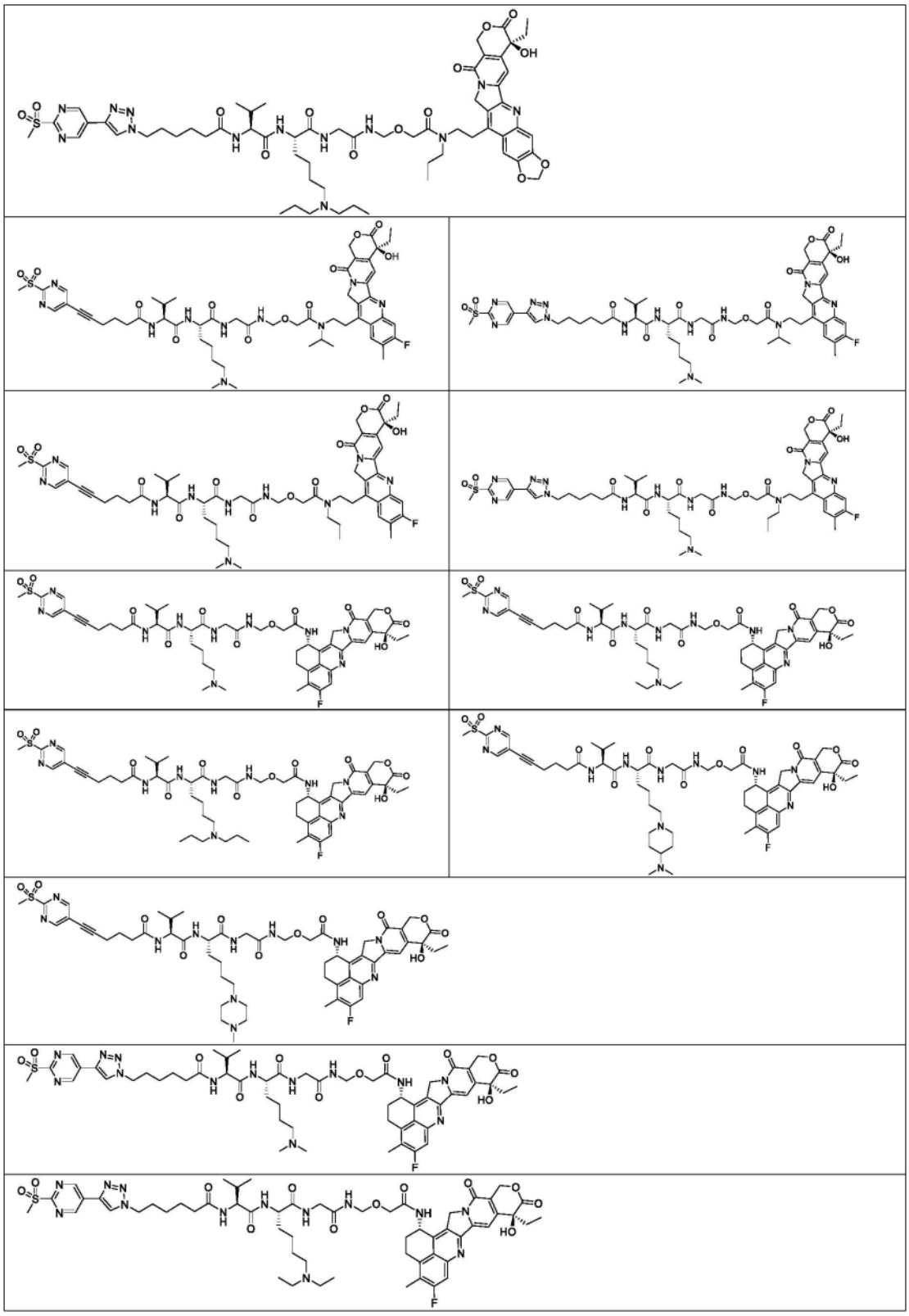
[0761]



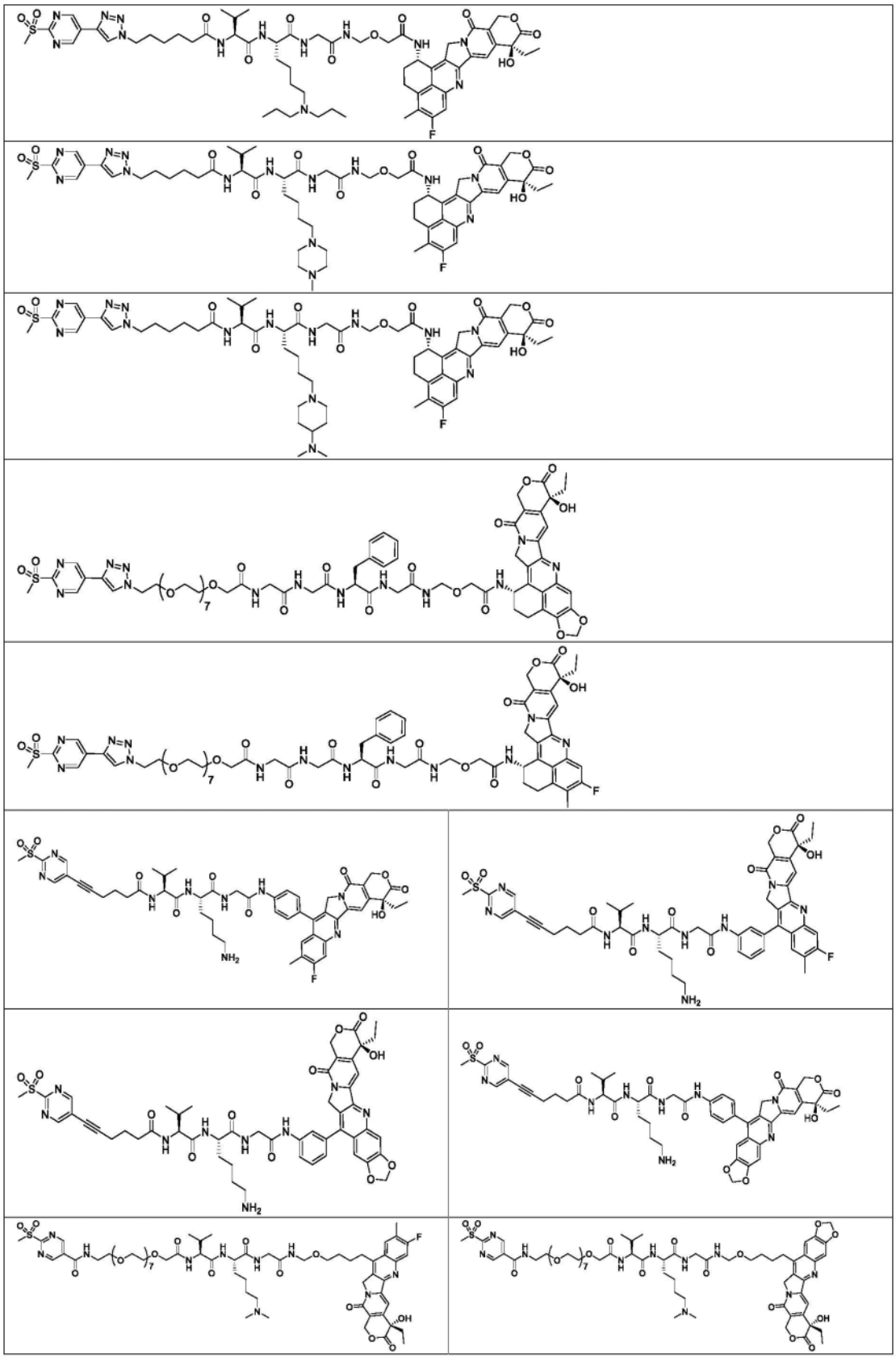
[0762]



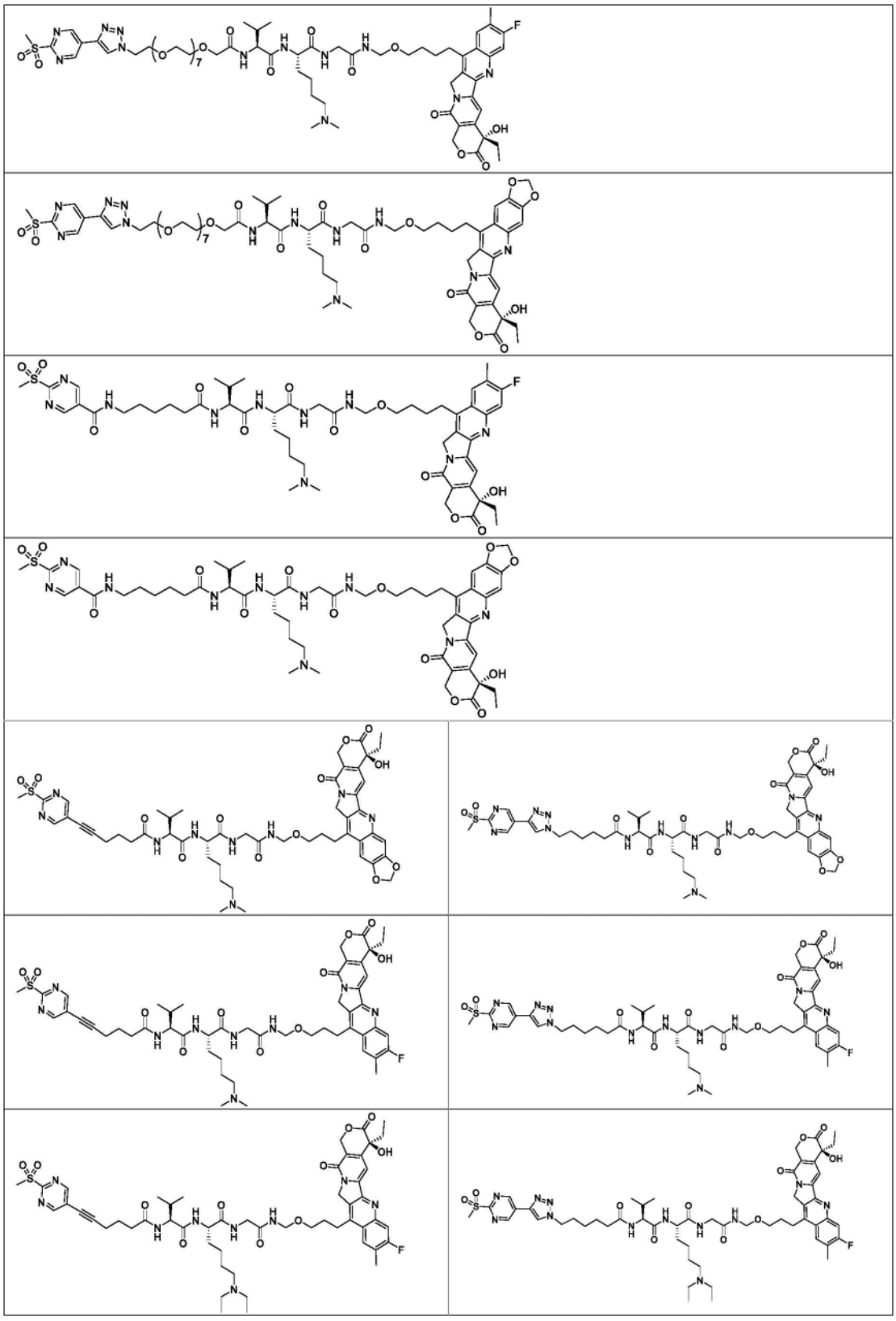
[0763]



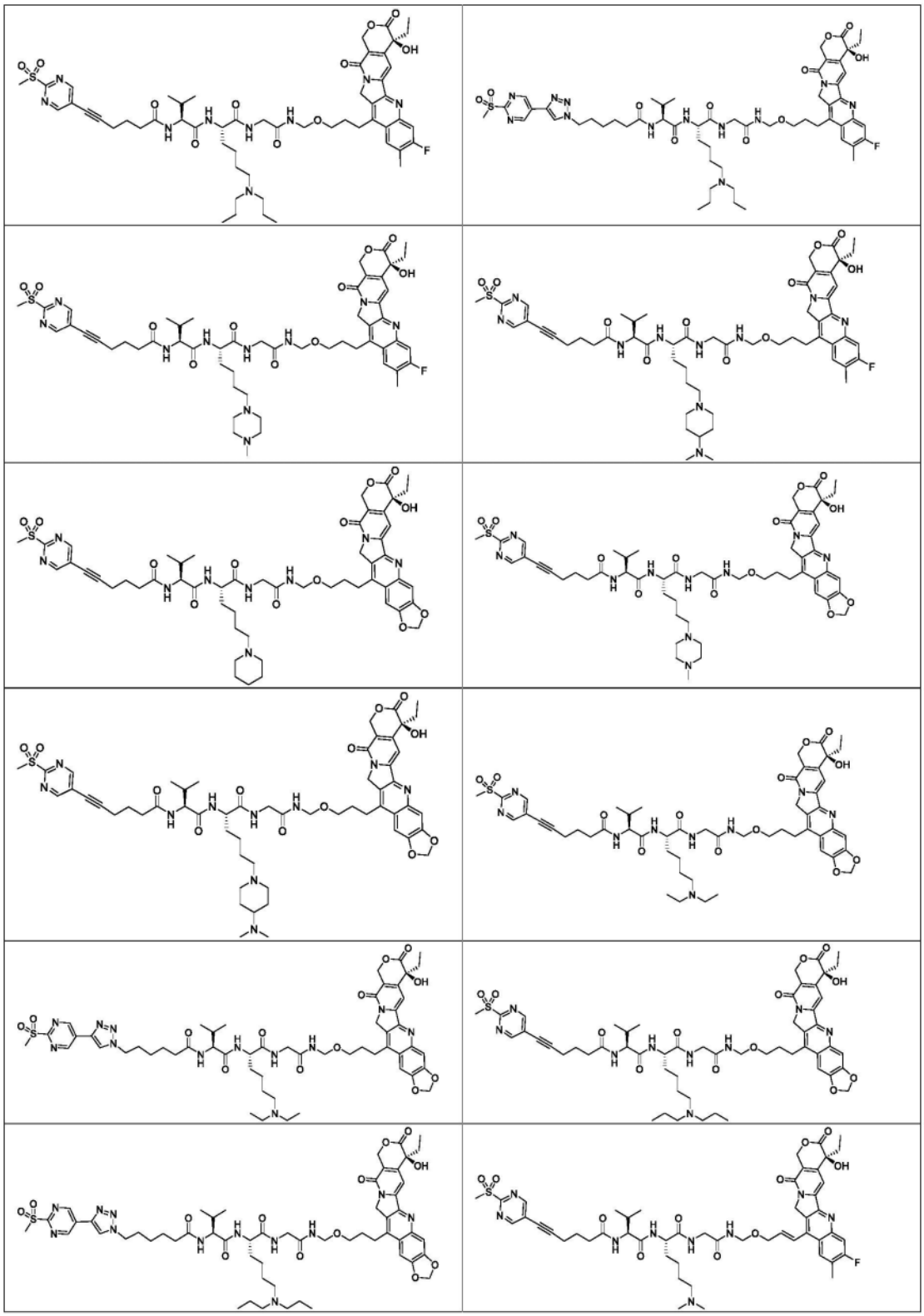
[0764]



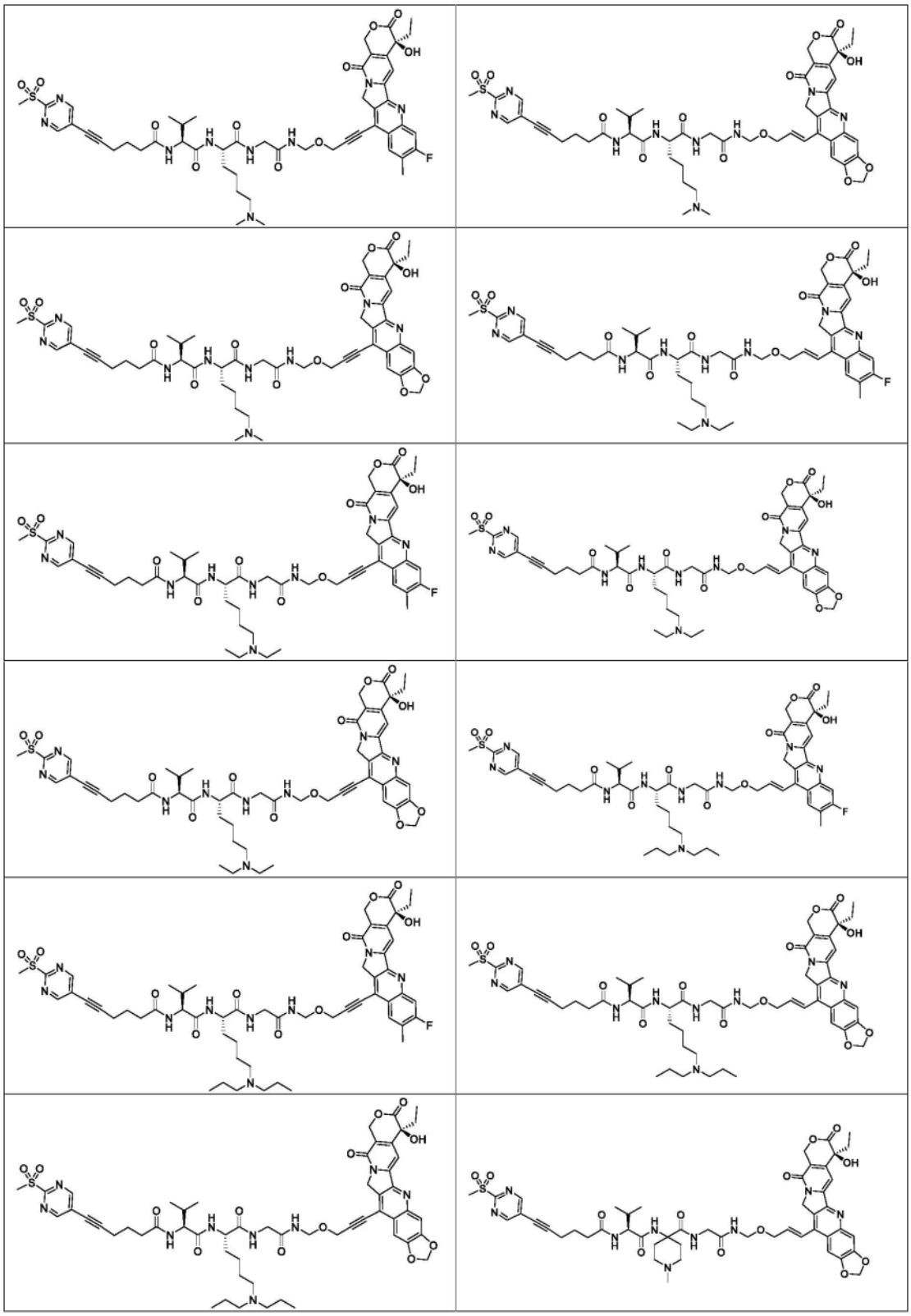
[0765]



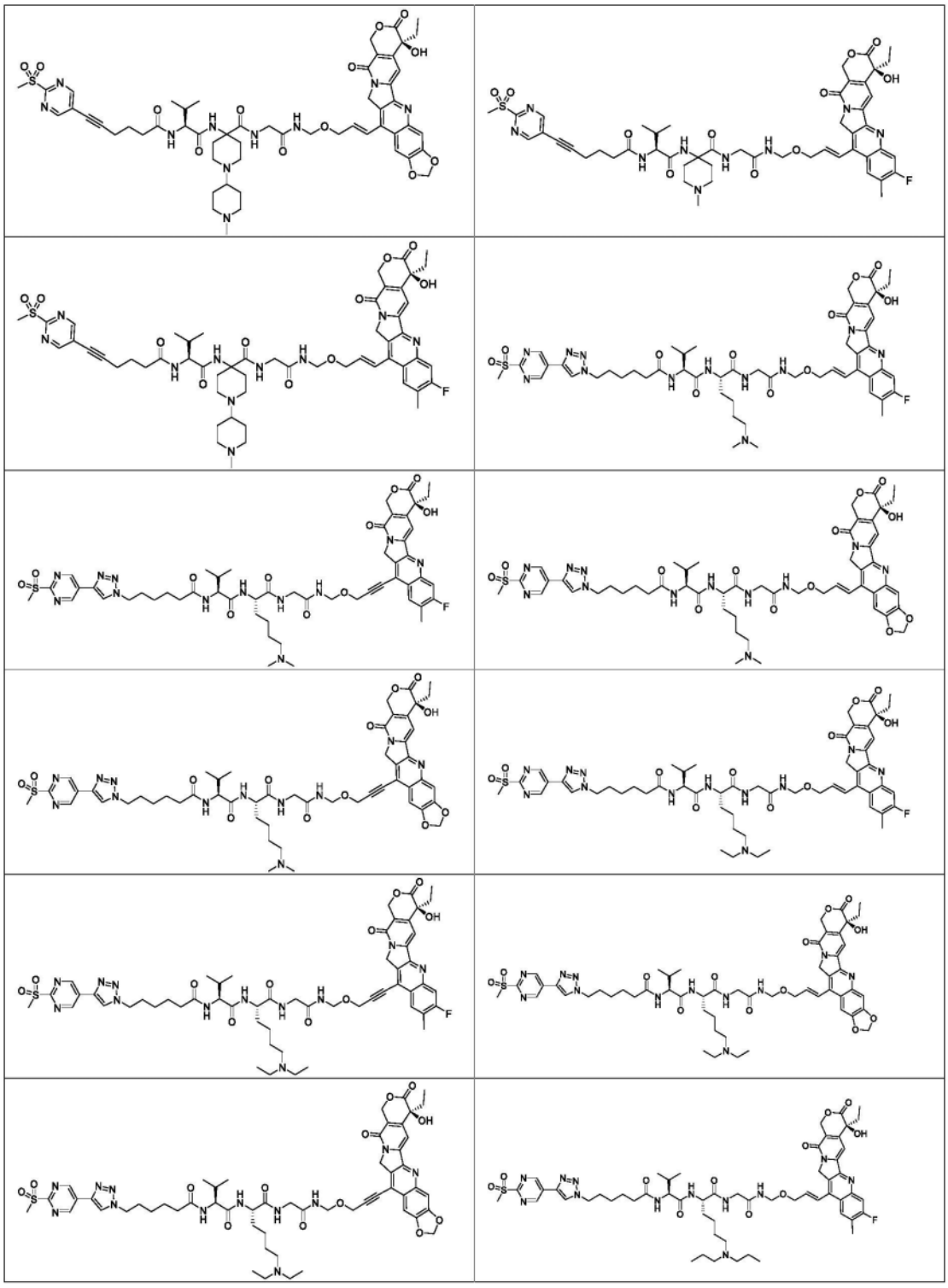
[0766]



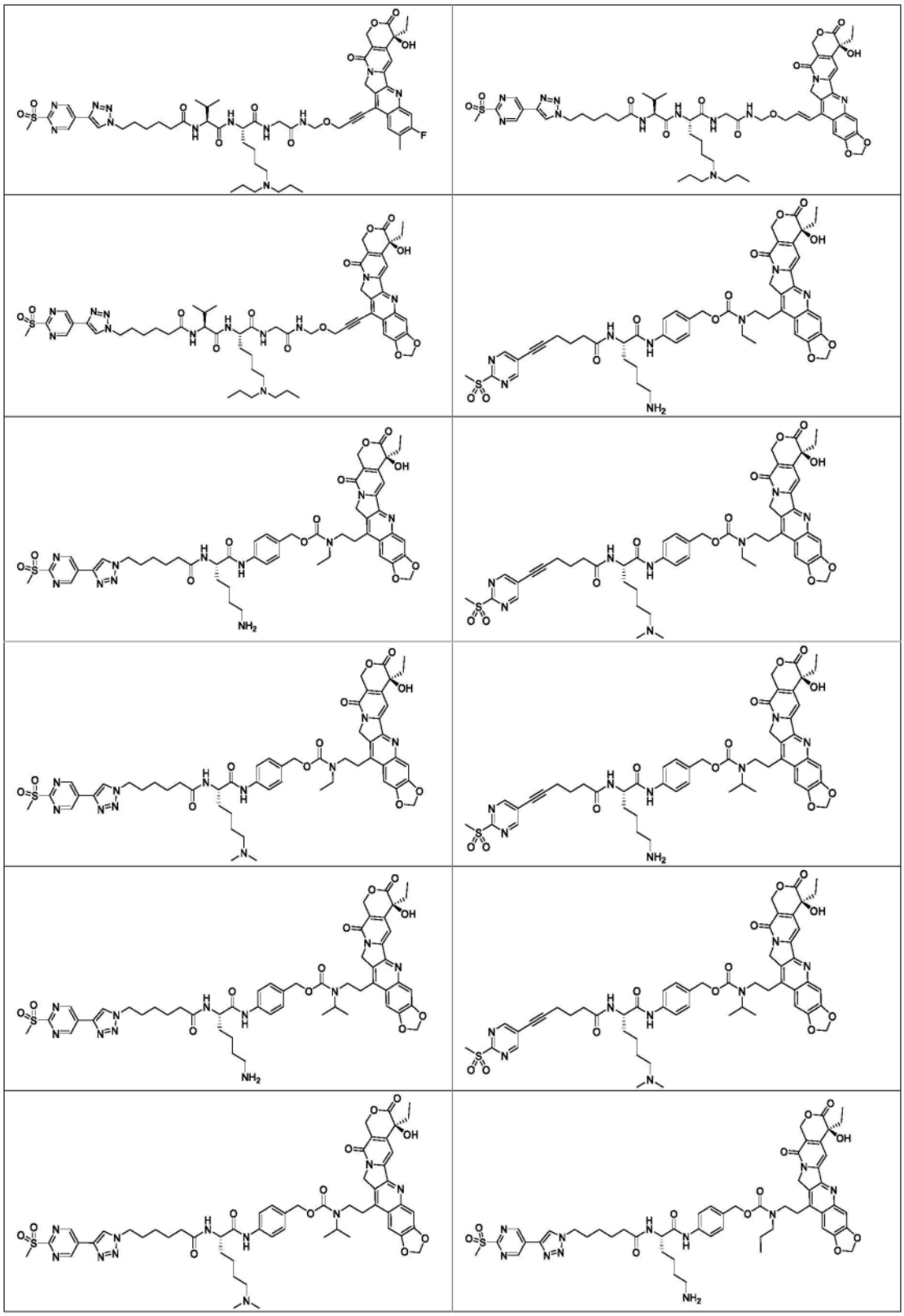
[0767]



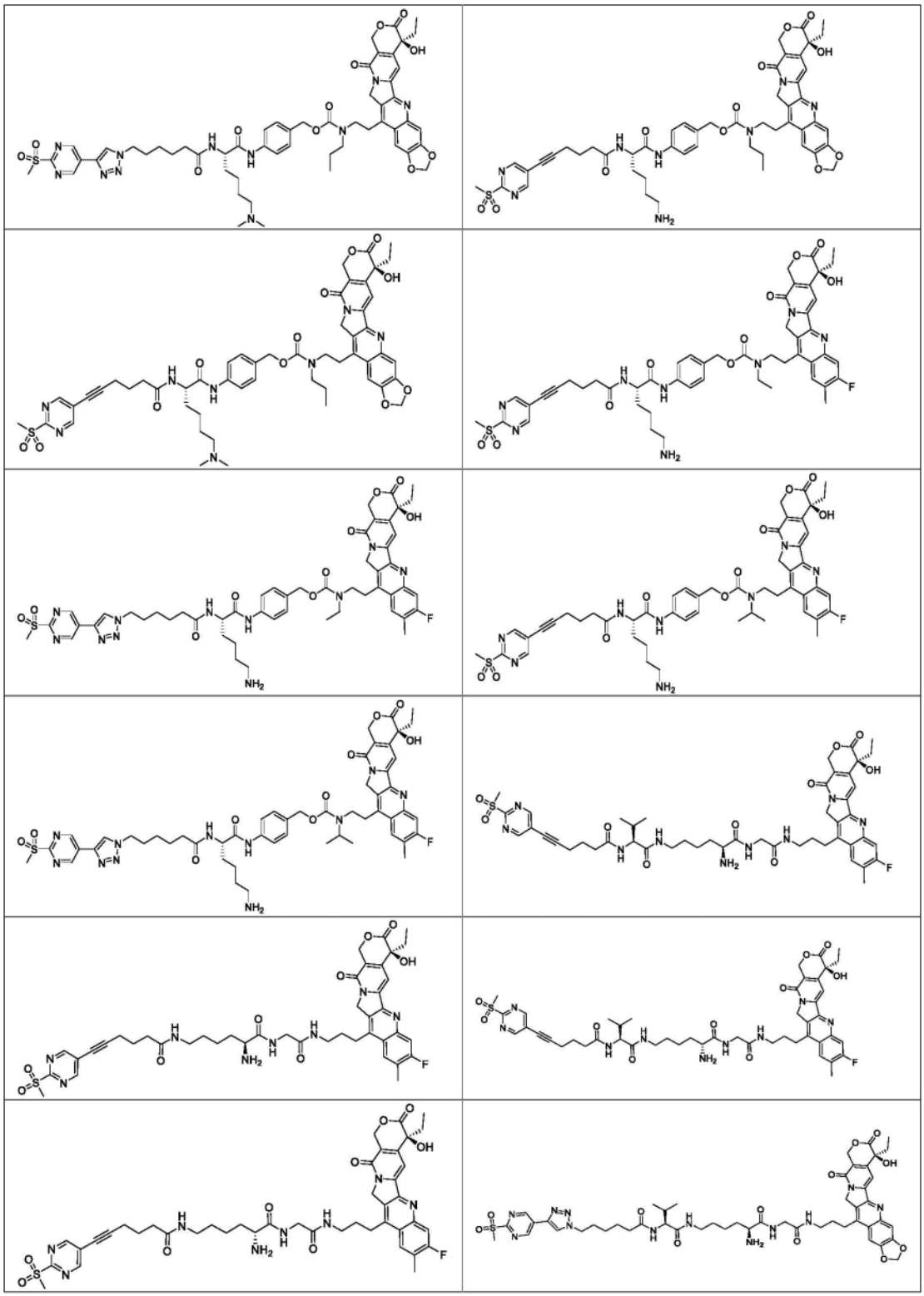
[0768]



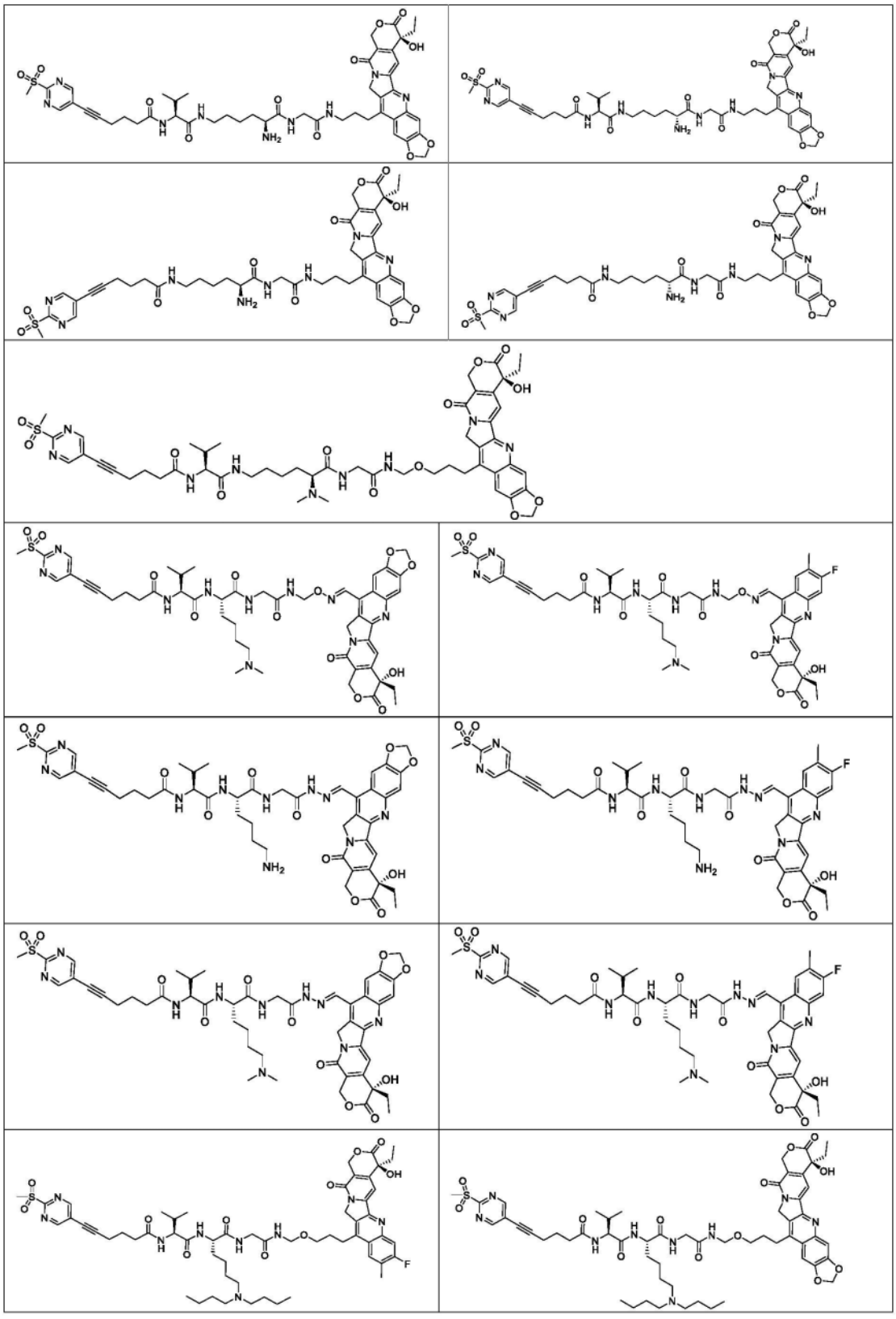
[0769]



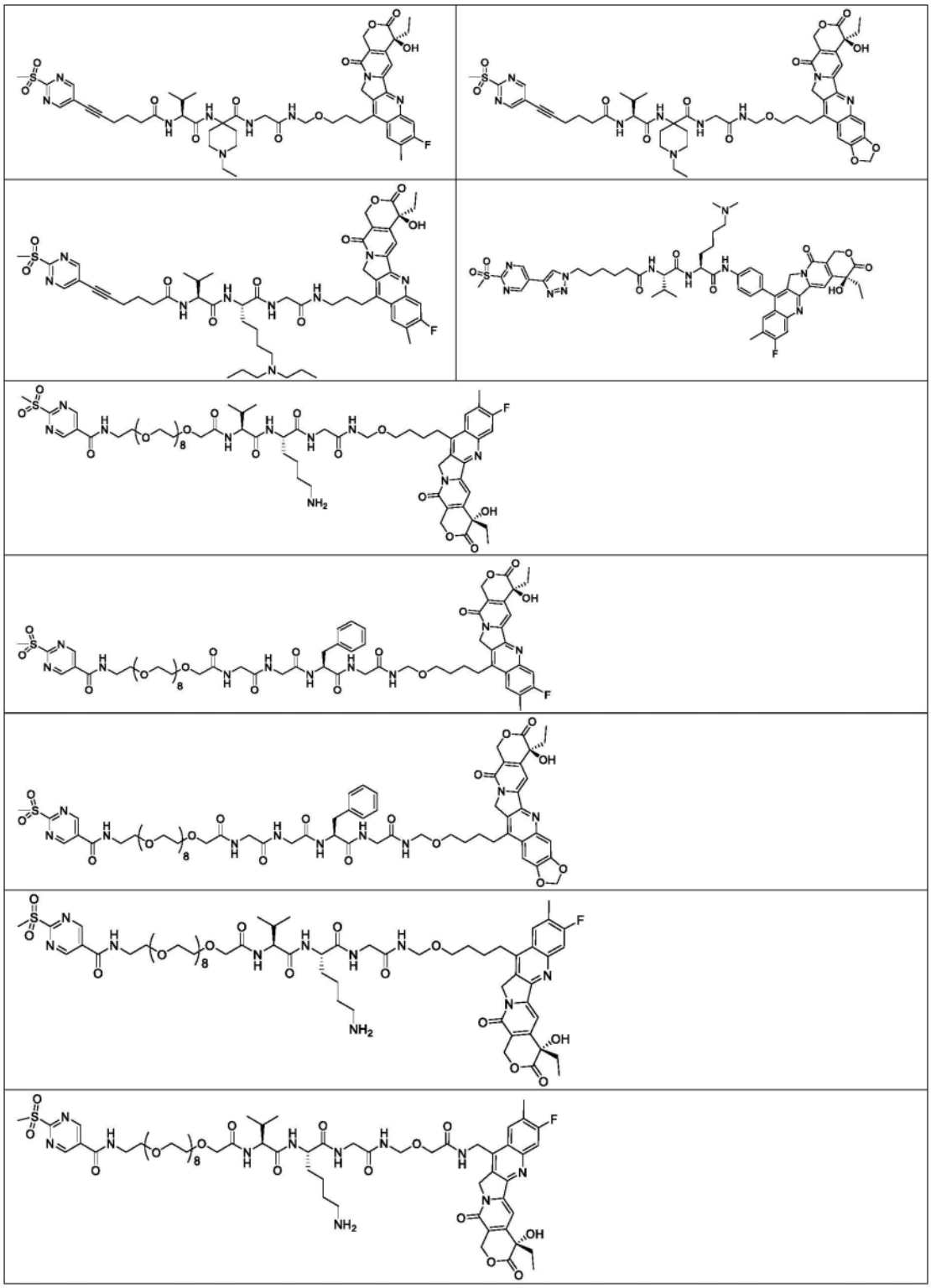
[0770]



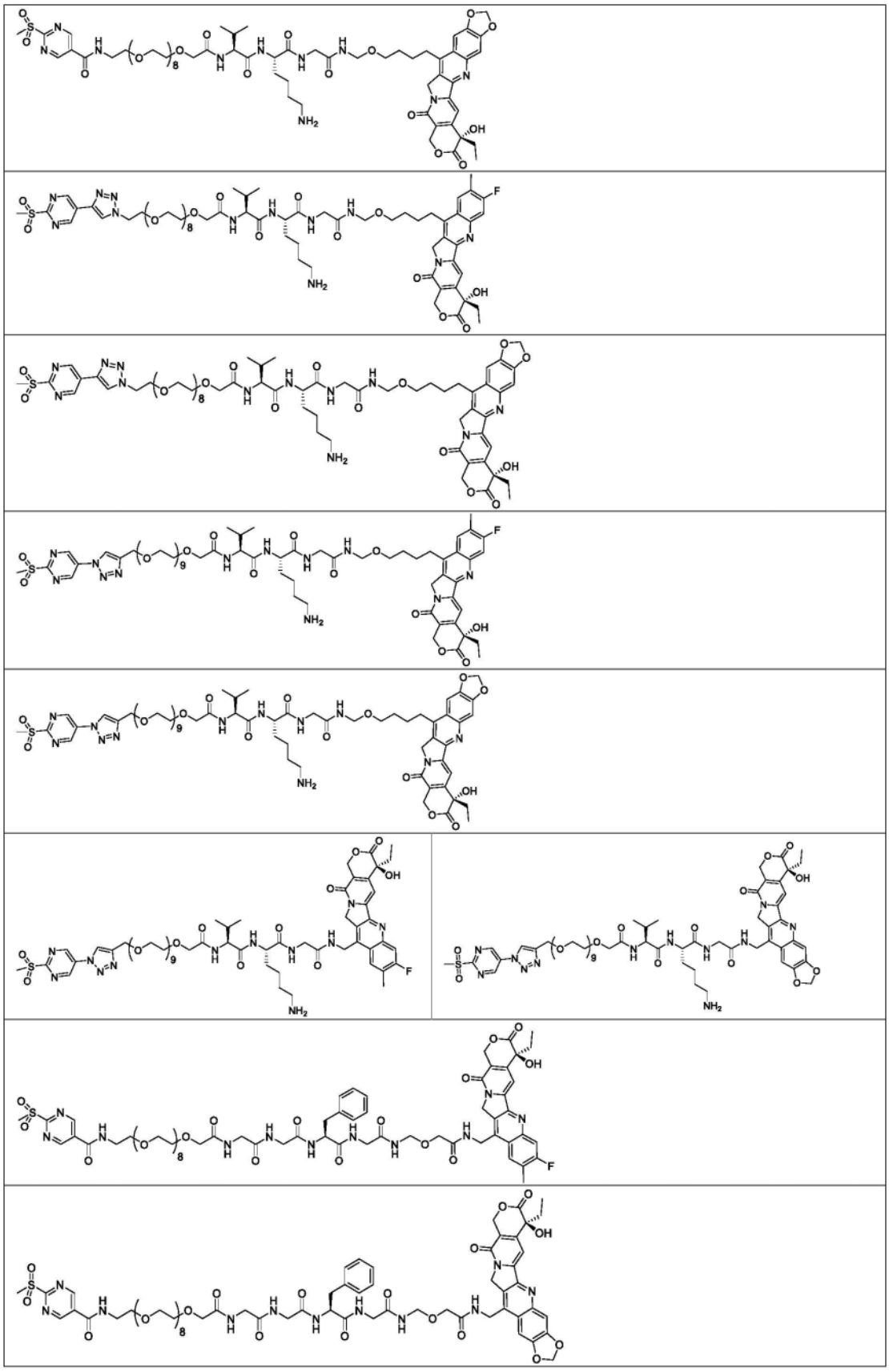
[0771]



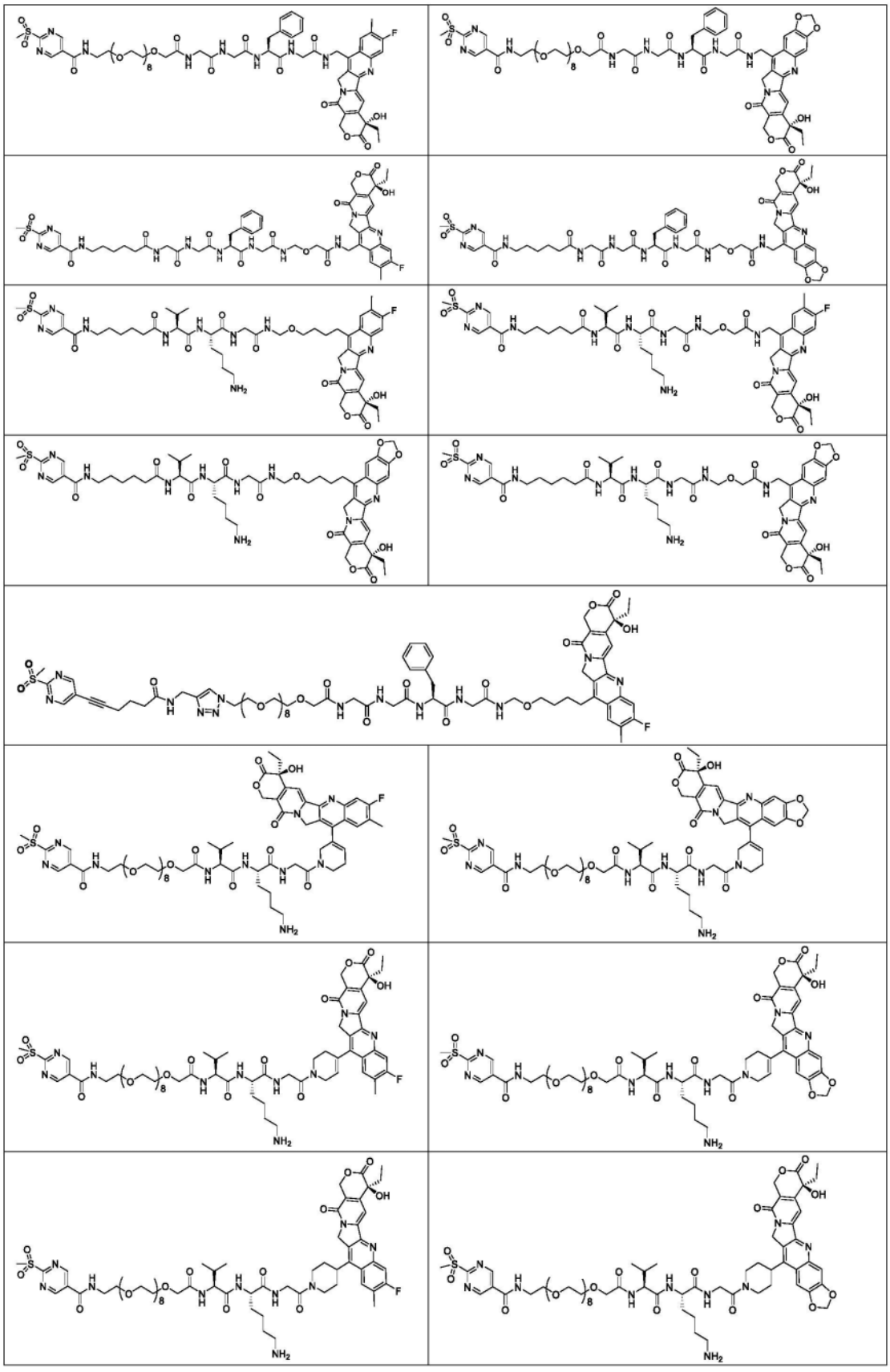
[0772]



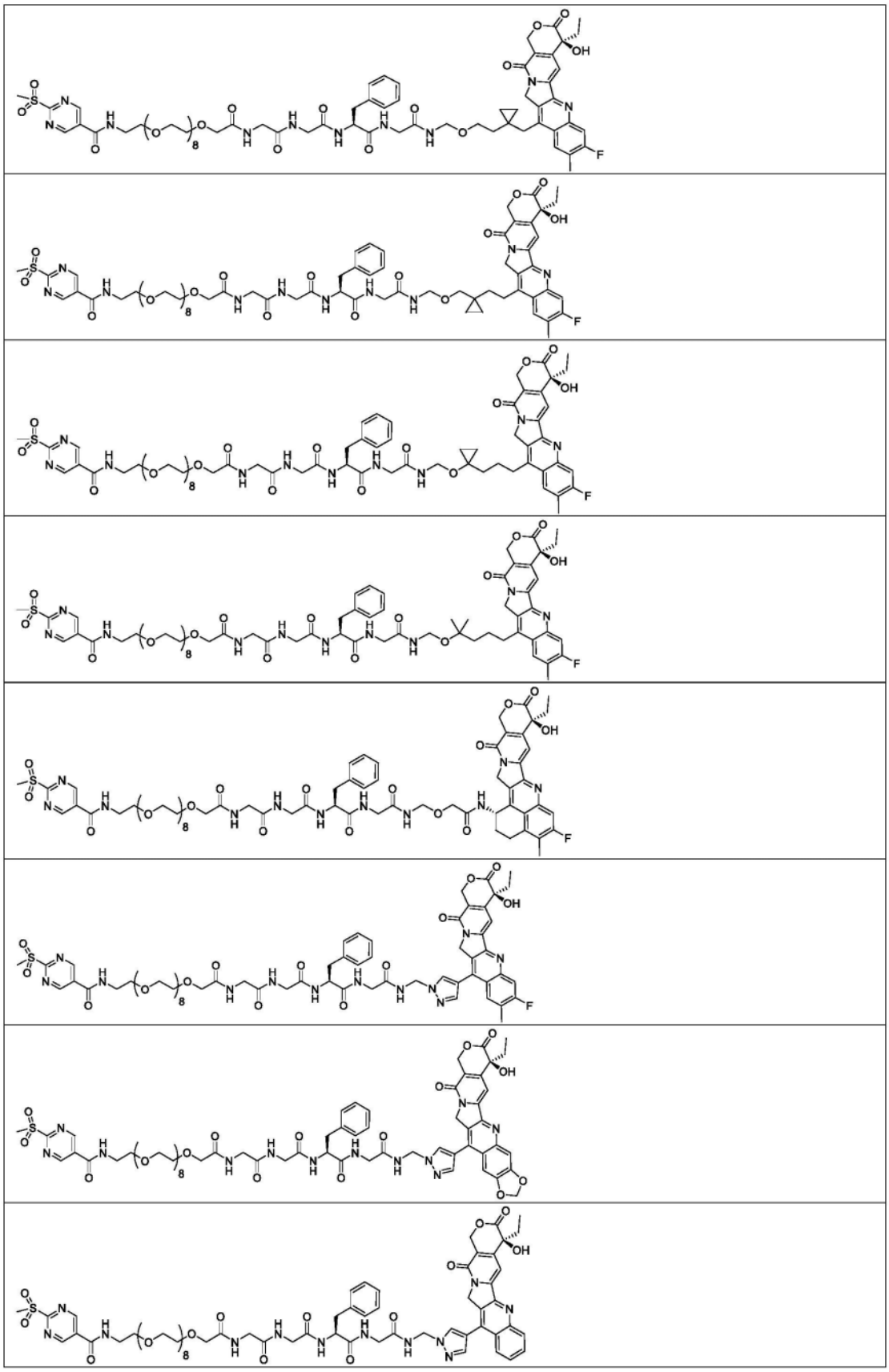
[0773]



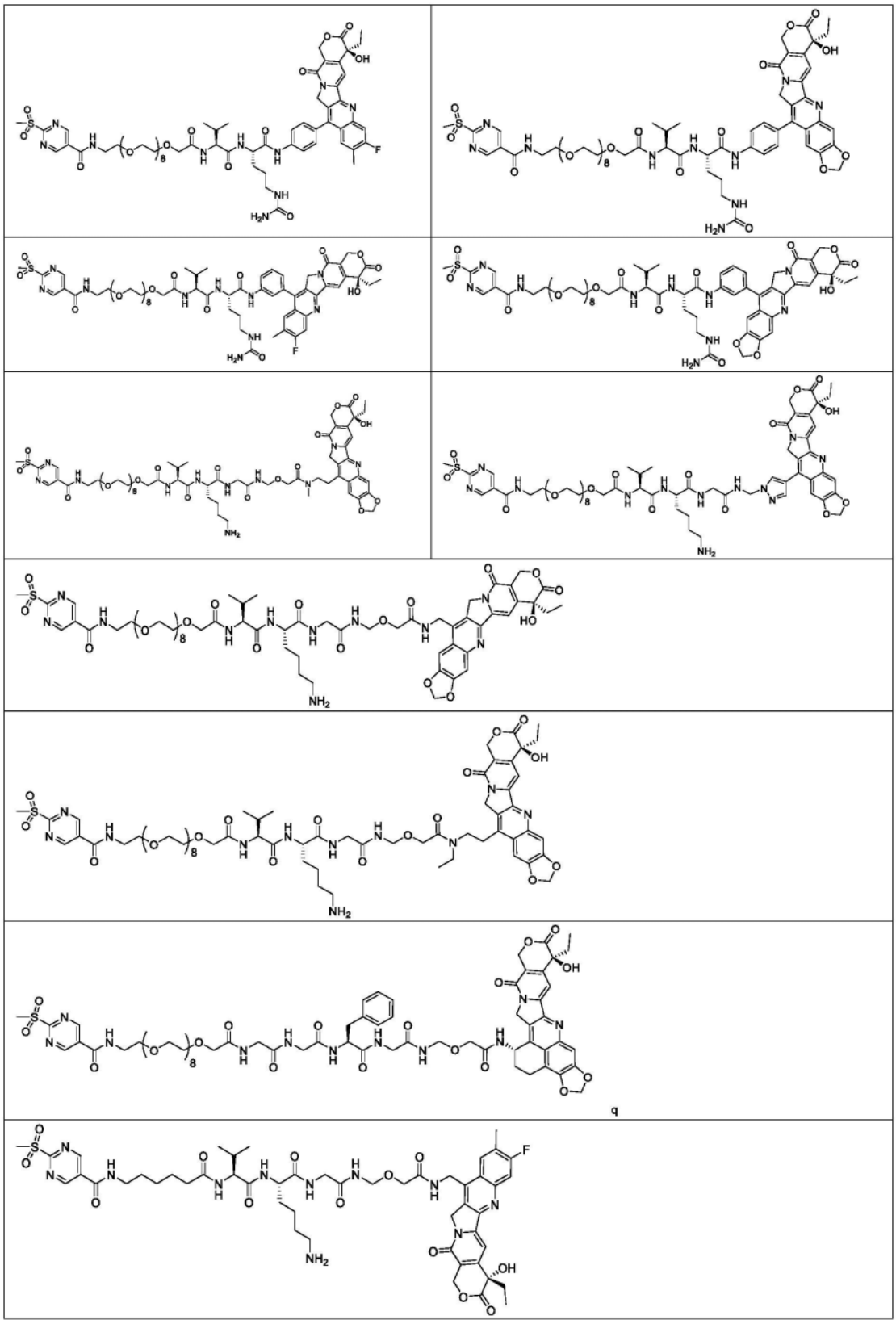
[0774]



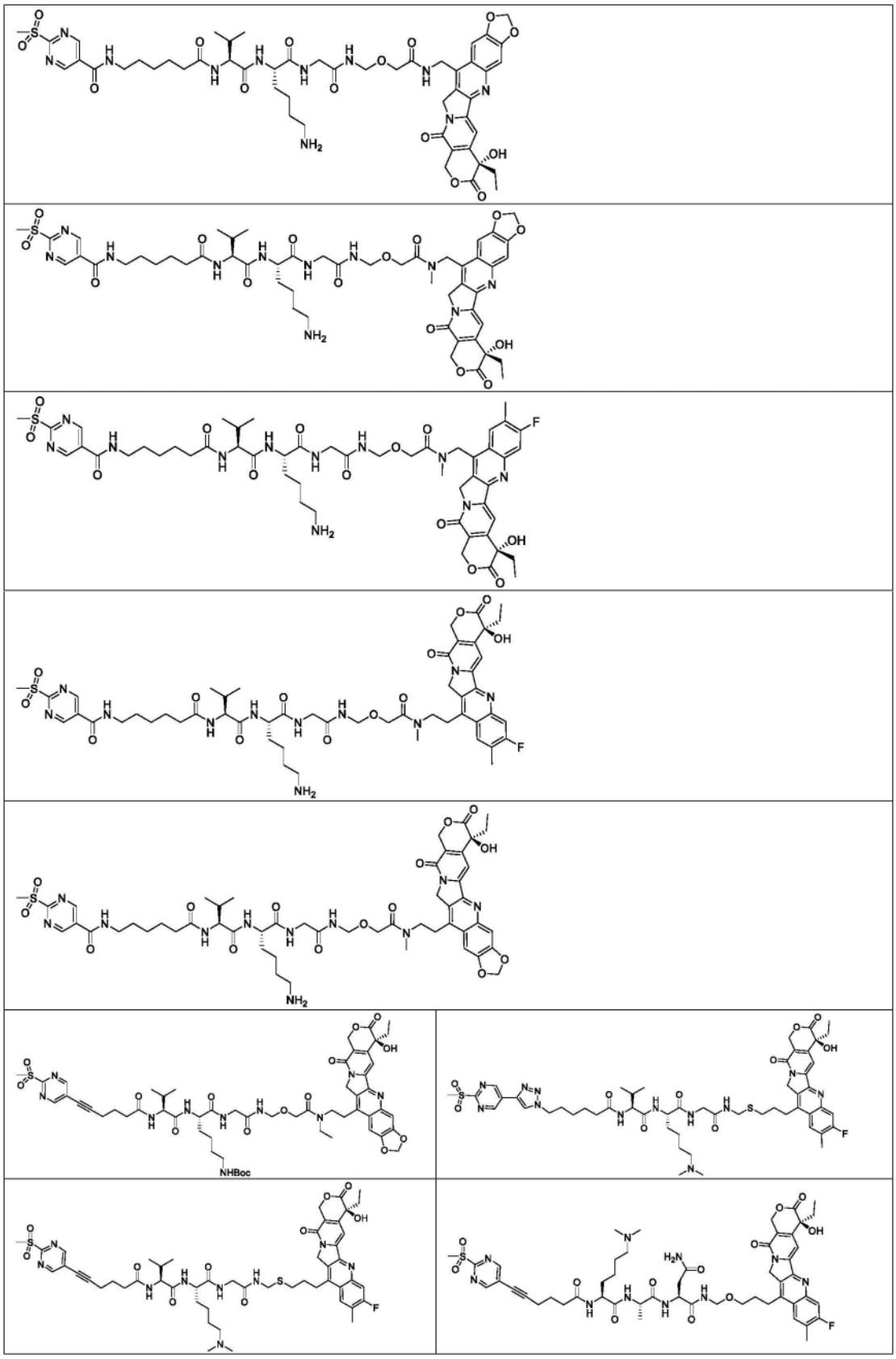
[0775]



[0776]



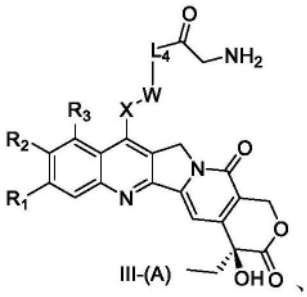
[0777]



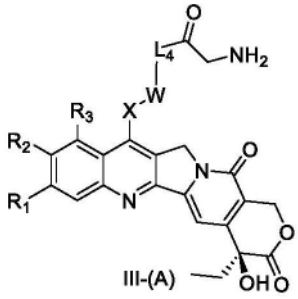
[0778]

[0779] 在一些实施方案中提供了化合物,其中式III所示的药物连接体偶联物中的L1-L2-L3单元已被部分裂解,从而留下与之键合的氨基酸残基的药物部分。

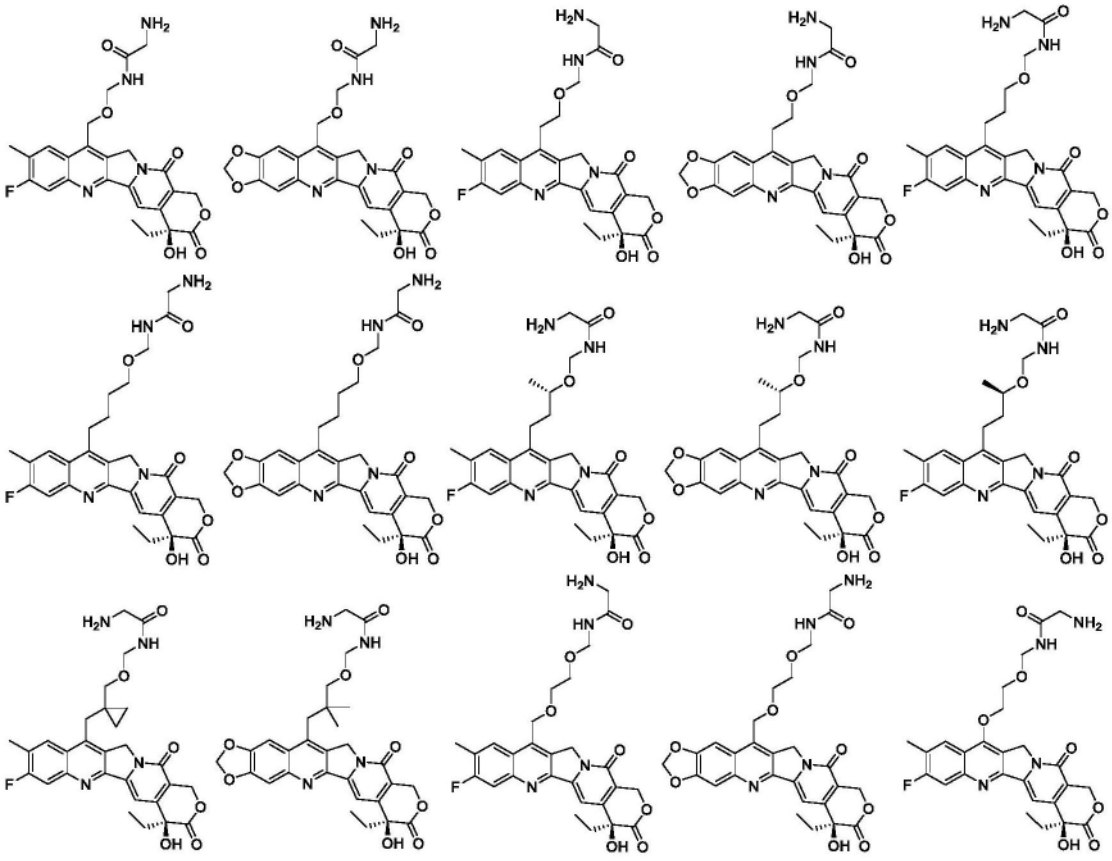
[0780] 在一些实施方案中,部分释放的游离药物为式III-(A)的化合物:

[0781] 

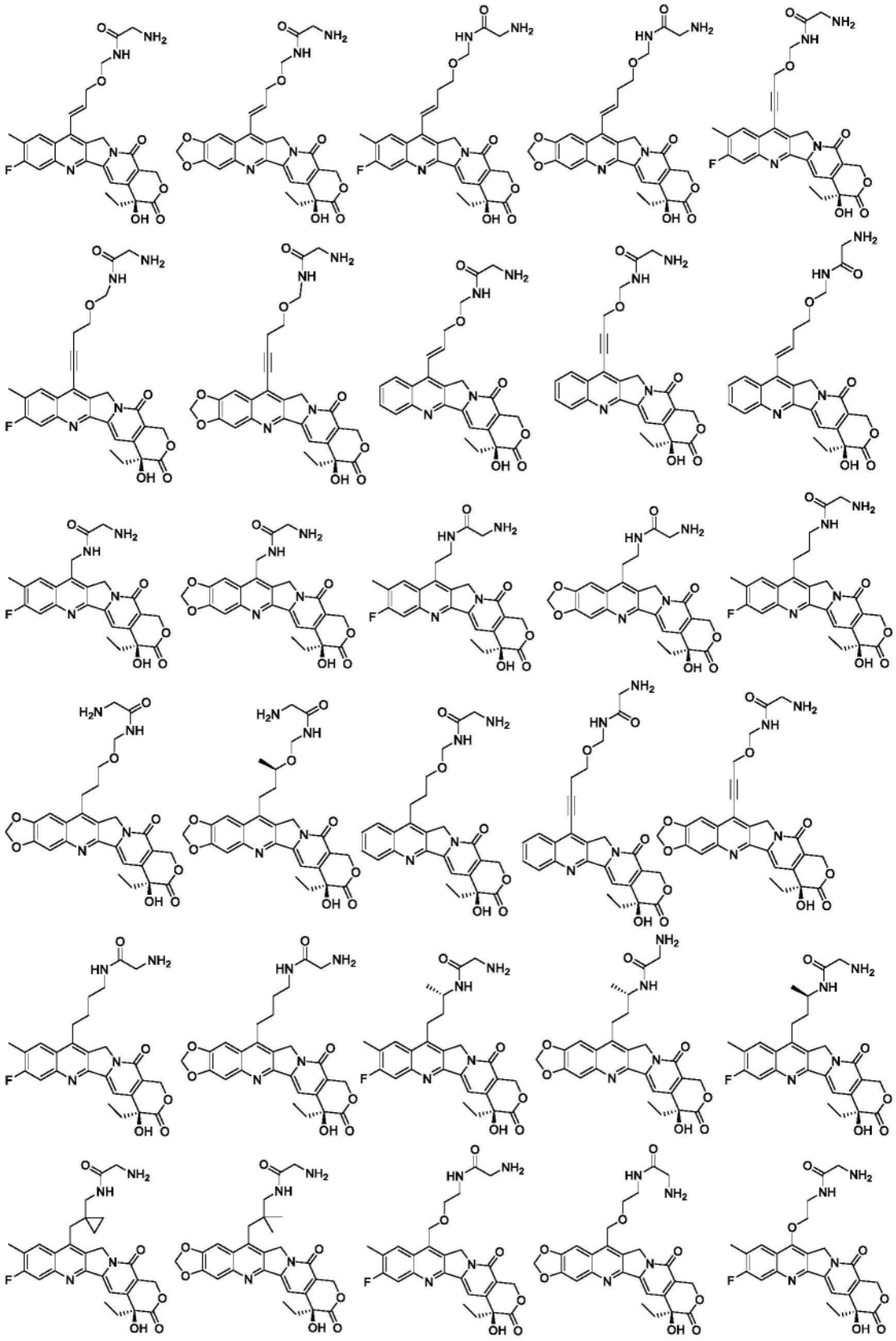
[0782] 或其立体异构体或立体异构体的混合物,或其药学上可接受的盐,其中L_4、X、W、R_1、R_2和R_3具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

[0783] 在一些实施方案中, 

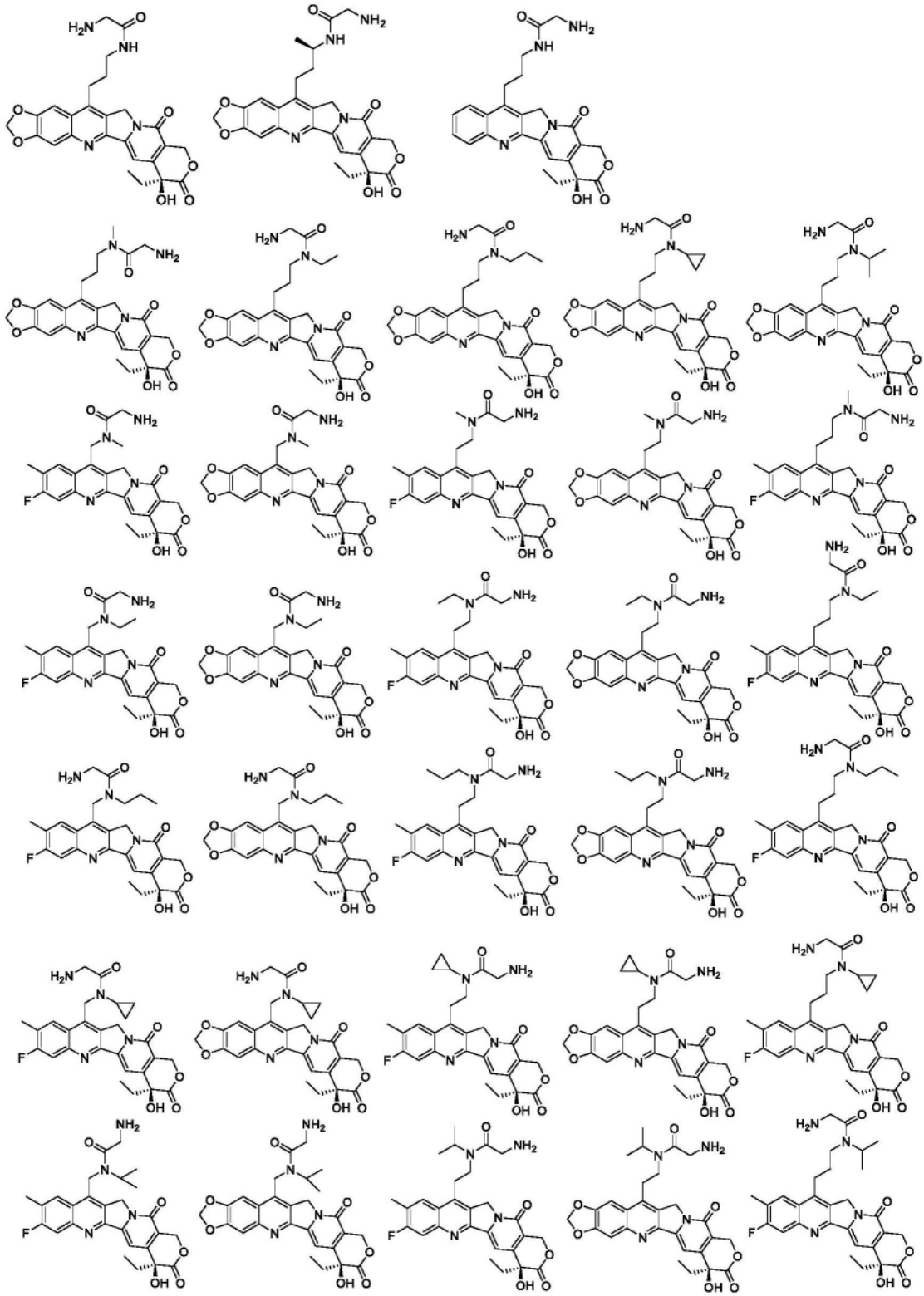
III-(A)的结构选自以下:

[0784] 

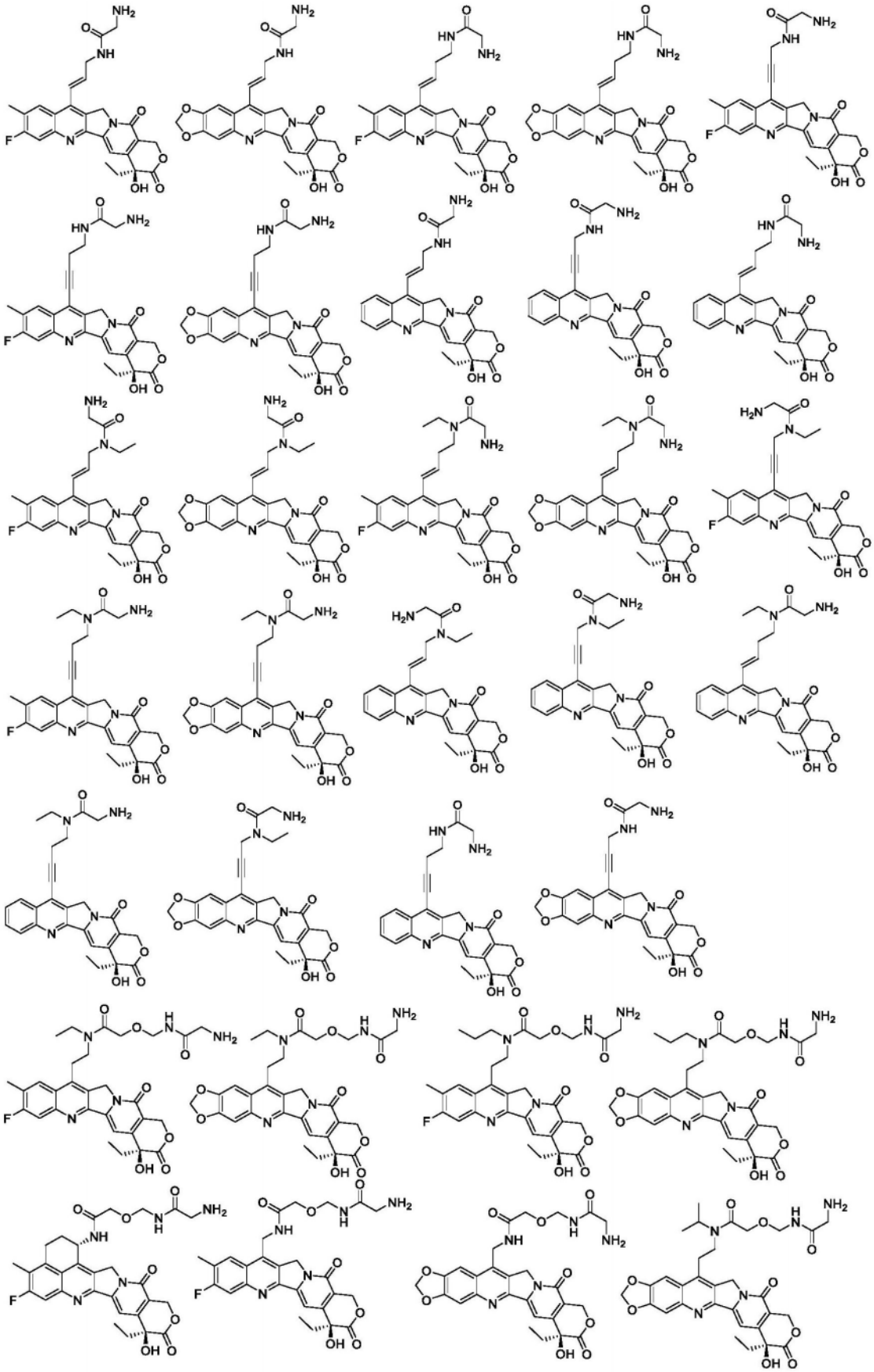
[0785]

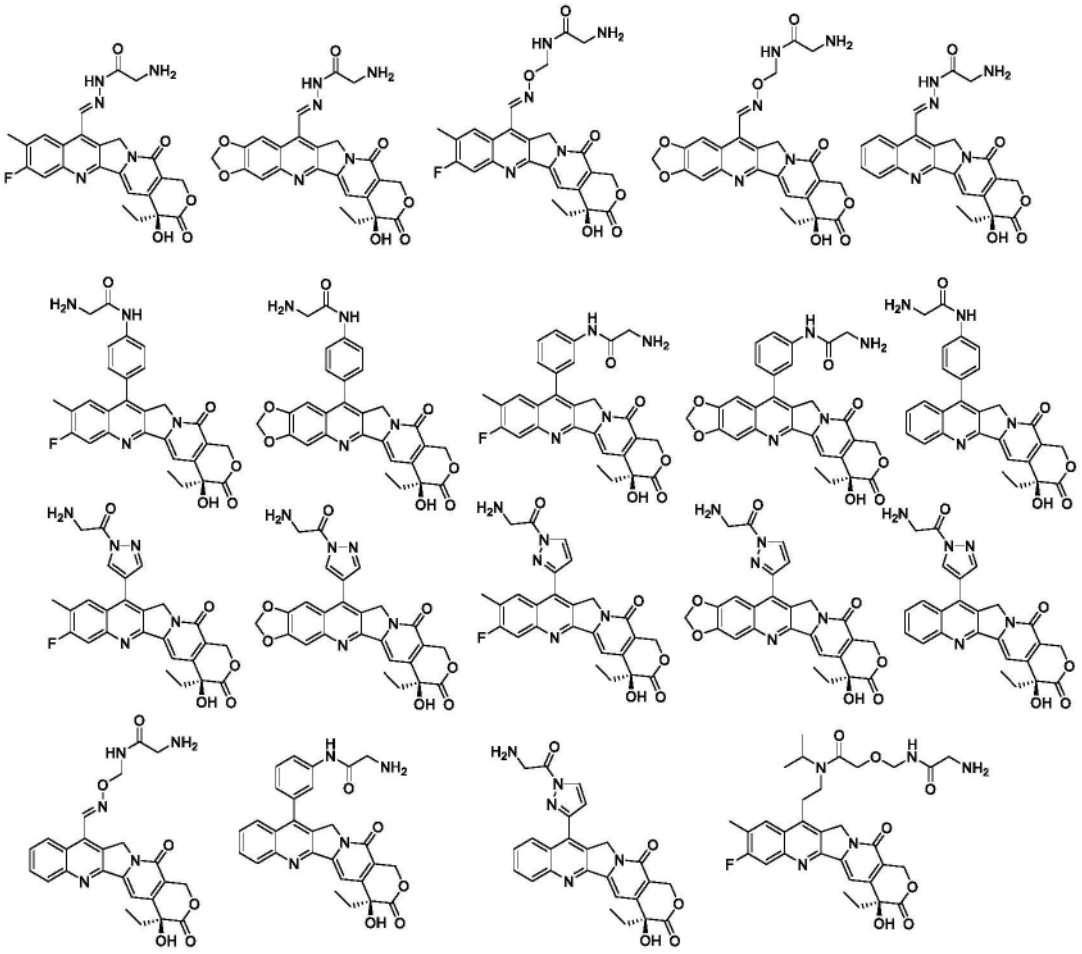


[0786]

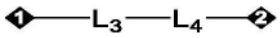


[0787]



[0788] 

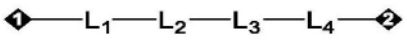
[0789] 本公开还提供了一种配体药物偶联物中的连接体,其结构含如下所示片段:

[0790] 

[0791] 其中,2位与生物活性分子片段相连;(1位与配体端相连,例如,当其与连接单元(例如L_2)相连,再通过延伸单元(例如L_1)与配体或靶向部分(Tb)相连;或者,当连接单元不存在时,直接与延伸单元相连,再进一步与配体相连);

[0792] L_3、L_4的定义如本公开中任一方案所述。

[0793] 在一些实施方案中,所述的配体药物偶联物中的连接体,其结构如下所示:



[0794] 其中,1位与和靶点结合的配体或靶向部分相连,2位与生物活性分子片段相连;

[0795] L_1、L_2、L_3、L_4的定义如本公开中任一方案所述;

[0796] 较佳地,所述的靶点结合的配体或靶向部分和所述的生物活性分子片段的定义分别如本公开中任一方案中的Tb和D所述。

[0797] 在一些实施方案中,所述连接体1位与和抗体或其抗原结合片段相连,2位与生物活性分子片段相连。

[0798] 在一些实施方案中,所述连接体1位与和抗体或其抗原结合片段上的半胱氨酸或赖氨酸相连,2位与生物活性分子片段相连;

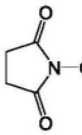
[0799] 较佳地,所述的抗体或其抗原结合片段如本公开中任一方案所述。

[0800] 在本公开的第四方面,本公开还提供了式III-1所示的连接体:

[0801] Lg—L_1-L_2-L_3-L_4-Lg1

[0802] III-1

[0803] Lg、L_1、L_2、L_3和L_4具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义；Lg1为和药物分子反应时的离去基团。

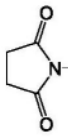
[0804] 在一些实施方案中,Lg1优选为-OH、  或卤素。

[0805] 在本公开的第五方面,本公开还提供了式III-2所示的连接体：

[0806] Lg—L_1-L_2-L_3-Lg2

[0807] III-2

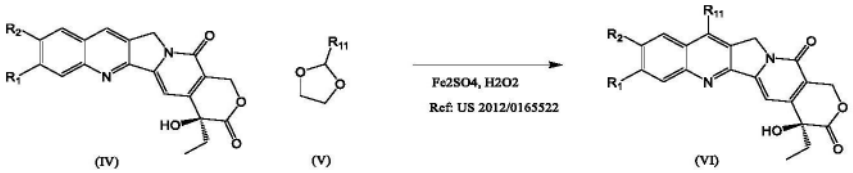
[0808] Lg、L_1、L_2和L_3具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义；Lg2为和L4或含有药物分子的片段反应时的离去基团。

[0809] 在一些实施方案中,Lg2优选为-OH、  或卤素。

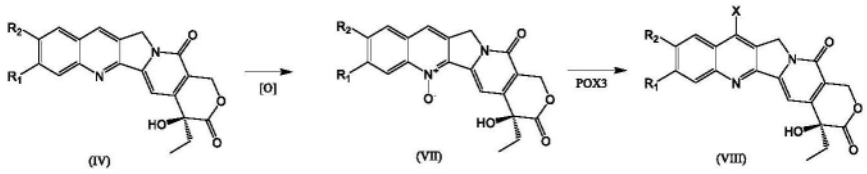
[0810] 在本公开的第六方面,本公开提供了式II所示化合物(药物分子、生物活性分子)、式III所示药物连接体偶联物的制备方法。

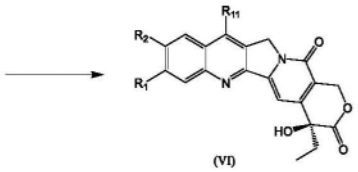
[0811] 一方面,本公开提供了式II所示化合物(药物分子、生物活性分子)的制备方法。具体地：

[0812] 通式所示化合物(IV)通过和化合物(V)在铁化合物催化下的烷基化反应或其它相关的Minisci反应可以获得化合物(VI)。

[0813] 

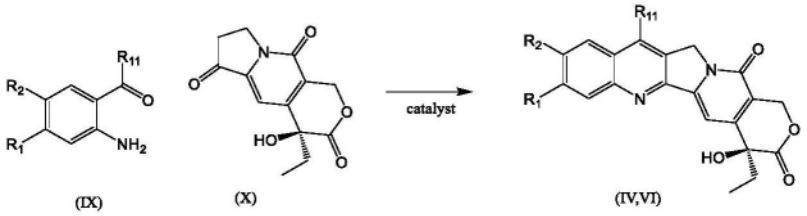
[0814] 或者,化合物(IV)通过氮氧化反应生成化合物(VII),化合物(VII)通过三卤氧磷处理后生成化合物(IV)的卤代产物化合物(VIII)。化合物(VIII)可以通过多种形式的反应,如Heck反应,Suzuki反应,Buchwald反应,Nigishi反应,Stille反应等获得化合物(VI)。



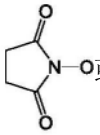
[0815] 

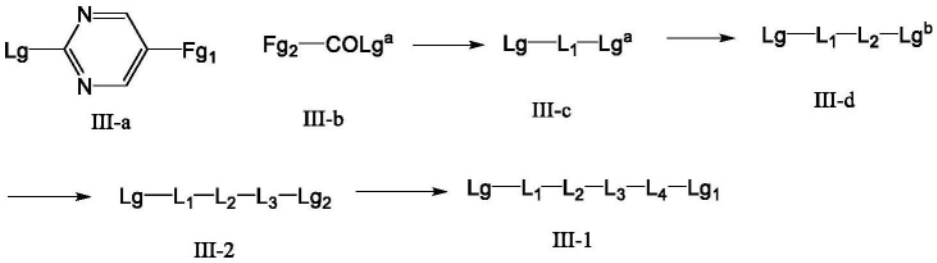
[0816] 化合物(VI)中R_{11}可以通过多种化学转化,如氧化,还原,取代等多种教科书中常见的方法合成不同的或更加复杂的分子。

[0817] 或者,化合物(VI)和化合物(IV)也可以通过如下所示的化合物(IX)和化合物(X)通过关环反应获得。

[0818] 

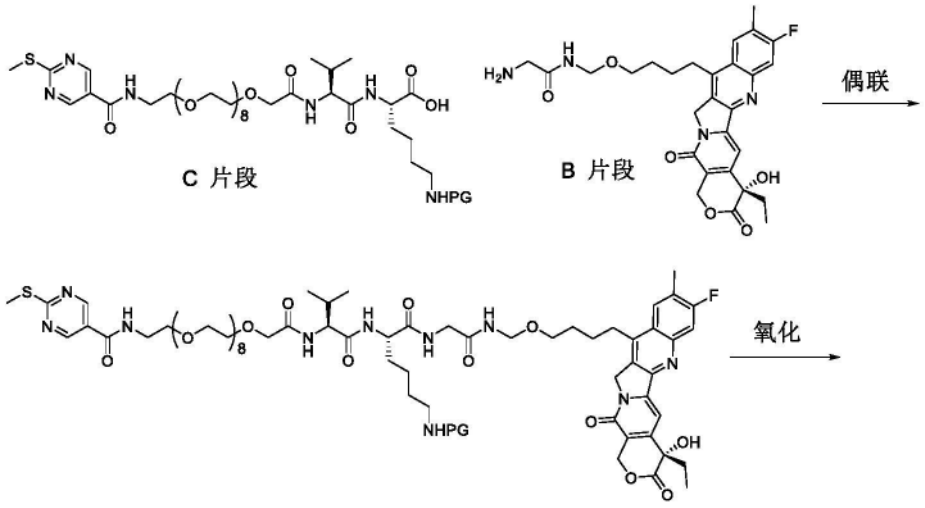
[0819] 另一方面,本公开提供了式III-1和式III-2所示片段的制备方法。具体地:

[0820] 化合物III-a通过其功能机团Fg_1和化合物III-b的功能机团Fg_2反应可以得到化合物III-c,化合物III-c通过其功能机团Fg^a可以获得化合物III-d,类似转化可以获得通式化合物III-2和III-1。Lg^a,Lg^b,Lg_1,Lg_2为可反应的离去机团,如-OH、  或卤素等。

[0821] 

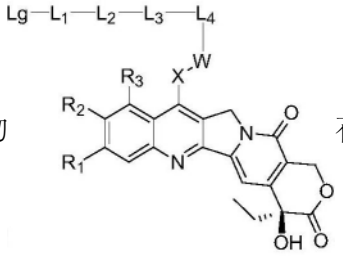
[0822] 再另一方面,本公开提供了式III所示药物连接体偶联物的制备方法。具体地:

[0823] 目标产物可以通过如下反应式所示的B片段和C片段的偶联得到,偶联产物经过一些常用的化学修饰,如氧化,脱保护等,即可得到通式III所示的药物连接体偶联物。



[0824]

[0825] 在本公开的第七方面,本公开提供了制备前述配体药物偶联物的方法,其包括:

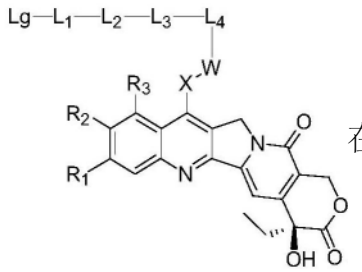
[0826] 将Tb与式III所示的药物连接体偶联物  在合适的溶剂和条件下进行偶联反应;

[0827] 其中:

[0828] Tb具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义;

[0829] R_1、R_2、R_3、X、W、L_1、L_2、L_3、L_4、Lg具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

[0830] 在一些实施方案中,所述方法包括将Tb与式III所示的药物连接体偶联物



在合适的溶剂和条件下进行偶联反应形成C-S键的步骤。

[0831] 在一些实施方案中,所述Tb与所述药物连接体偶联物的物质的量的比为1:(1-20),如1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:14、1:16、1:18、1:(10-20)、1:(12-20)、1:(14-20)、1:(16-20)或1:(18-20)。

[0832] 在一些实施方案中,所述偶联反应在水和/或有机溶剂中进行。

[0833] 在一些实施方案中,所述有机溶剂选自N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、N-甲基吡咯烷酮、腈类(例如乙腈)、醇类(例如甲醇、乙醇)或其任意组合。

[0834] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将偶联产物进行纯化的步骤。

[0835] 在一些实施方案中,通过层析方法对所述偶联产物进行纯化。

[0836] 在一些实施方案中,所述层析方法包括离子交换层析、疏水层析、反相层析或亲和层析中的一种或多种。

[0837] 在本公开的第八方面,本公开提供了一种结合B7H3的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR):

[0838] SEQ ID NO:3或23所示的重链可变区(VH)中含有的HCDR1或其序列的变体、HCDR2或其序列的变体以及HCDR3或其序列的变体;和/或

[0839] SEQ ID NO:13或33所示的轻链可变区(VL)中含有的LCDR1或其序列的变体、LCDR2或其序列的变体以及LCDR3或其序列的变体。

[0840] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH中含有的HCDR1或其序列的变体、HCDR2或其序列的变体以及HCDR3或其序列的变体;和/或SEQ ID NO:13所示的VL中含有的LCDR1或其序列的变体、LCDR2或其序列的变体以及LCDR3或其序列的变体。

[0841] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH中含有的HCDR1或其序列的变体、HCDR2或其序列的变体以及HCDR3或其序列的变体;和/或SEQ ID NO:33所示的VL中含有的LCDR1或其序列的变体、LCDR2或其序列的变体以及LCDR3或其序列的变体。

[0842] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH中含有的HCDR1或其序列的变体、HCDR2或其序列的变体以及HCDR3或其序列的变体;和/或SEQ ID NO:33所示的VL中含有的LCDR1或其序列的变体、LCDR2或其序列的变体以及LCDR3或其序列的变体。

[0843] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH中含有的HCDR1或其序列的变体、HCDR2或其序列的变体以及HCDR3或其序列的变体;和/或SEQ ID NO:13所示的VL中含有的LCDR1或其序列的变体、LCDR2或其序列的变体以及LCDR3或其序列的变体。

[0844] 在某些优选实施方案中,所述序列的变体为与其来源CDR相比具有一个或几个氨

基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的CDR。

[0845] 在某些优选实施方案中,所述的置换为保守置换。

[0846] 优选地,所述CDR根据AbM、Chothia、Kabat或IMGT编号系统定义。

[0847] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段的VH和/或VL中包括来自人的免疫球蛋白的构架区(FR)。

[0848] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合人B7H3和/或猴B7H3。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合人2Ig B7H3。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合人4Ig B7H3。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合猴4Ig B7H3。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合人2Ig B7H3和人4Ig B7H3,并且更优先结合人4Ig B7H3。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合人4Ig B7H3,而不结合人2Ig B7H3。

[0849] 在一个方面,本公开提供了一种能够结合B7H3的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)。

[0850] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),其中CDR按IMGT编号系统定义:

[0851] (a)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:10或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:11或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:12或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0852] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:20或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为GTF或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:22或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;

[0853] (b)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:30或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:31或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:32或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0854] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:40或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为GAS或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:42或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;

[0855] (c)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:10或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:11或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:12或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0856] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:40或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为GAS或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:42或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;

[0857] 或

[0858] (d)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:30或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:31或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:32或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0859] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:20或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为GTF的LCDR2或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列,序列为SEQ ID NO:22或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3。

[0860] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),其中CDR按IMGT编号系统定义:

[0861] (a)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:10的HCDR1,序列为SEQ ID NO:11的HCDR2,序列为SEQ ID NO:12的HCDR3;和/或,

[0862] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:20的LCDR1,序列为GTF的LCDR2,序列为SEQ ID NO:22的LCDR3;

[0863] (b)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:10的HCDR1,序列为SEQ ID NO:11的HCDR2,序列为SEQ ID NO:12的HCDR3;和/或,

[0864] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:40的LCDR1,序列为GAS的LCDR2,序列为SEQ ID NO:42的LCDR3;

[0865] (c)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:30的HCDR1,序列为SEQ ID NO:31的HCDR2,序列为SEQ ID NO:32的HCDR3;和/或,

[0866] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:40的LCDR1,序列为GAS的LCDR2,序列为SEQ ID NO:42的LCDR3;

[0867] 或

[0868] (d)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:30的HCDR1,序列为SEQ ID NO:31的HCDR2,序列为SEQ ID NO:32的HCDR3;和/或,

[0869] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:20的LCDR1,序列为GTF的LCDR2,序列为SEQ ID NO:22的LCDR3。

[0870] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),其中CDR按Chothia编号系统定义:

[0871] (a)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:4或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:5或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:6或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0872] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:14或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为SEQ ID NO:15或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:16或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;

[0873] (b)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:4或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:5或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:6或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0874] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:34或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为SEQ ID NO:35或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:36或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;

[0875] (c)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:24或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:25或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:26或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0876] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:34或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的

LCDR1,序列为SEQ ID NO:35或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:36或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;或

[0877] (d)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:24或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:25或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:26或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0878] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:14或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为SEQ ID NO:15的LCDR2或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列,序列为SEQ ID NO:16或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3。

[0879] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),其中CDR按chothia编号系统定义:

[0880] (a)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:4的HCDR1,序列为SEQ ID NO:5的HCDR2,序列为SEQ ID NO:6的HCDR3;和/或,

[0881] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:14的LCDR1,序列为SEQ ID NO:15的LCDR2,序列为SEQ ID NO:16的LCDR3;

[0882] (b)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:24的HCDR1,序列为SEQ ID NO:25的HCDR2,序列为SEQ ID NO:26的HCDR3;和/或,

[0883] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:34的LCDR1,序列为SEQ ID NO:35的LCDR2,序列为SEQ ID NO:36的LCDR3;

[0884] (c)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:4的HCDR1,序列为SEQ ID NO:5的HCDR2,序列为SEQ ID NO:6的HCDR3;和/或,

[0885] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:34的LCDR1,序列为SEQ ID NO:35的LCDR2,序列为SEQ ID NO:36的LCDR3;

[0886] 或

[0887] (d)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:24的HCDR1,序列为SEQ ID NO:25的HCDR2,序列为SEQ ID NO:26的HCDR3;和/或,

[0888] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:14的LCDR1,序列为SEQ ID NO:15的LCDR2,序列为SEQ ID NO:16的LCDR3。

[0889] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),其中CDR按kabat编号系统定义:

[0890] (a)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:7或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列

的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0891] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:17或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;

[0892] (b)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:27或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0893] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:37或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;

[0894] (c)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:7或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0895] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:37或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3;或

[0896] (d)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:27或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失

或添加)的序列的HCDR3;和/或,

[0897] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:17或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列,序列为SEQ ID NO:19或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列的LCDR3。

[0898] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),其中CDR按kabat编号系统定义:

[0899] (a)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[0900] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3;

[0901] (b)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[0902] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[0903] (c)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[0904] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[0905] 或

[0906] (d)包含如下3个CDR的重链可变区(VH):序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[0907] 包含如下3个CDR的轻链可变区(VL):序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3。

[0908] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL),其中,与前述IMGT、chothia或kabat定义的CDR相比,所述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)中至少一个CDR含有突变,所述突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)。

[0909] 优选地,本公开所述的置换为保守置换。

[0910] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段的VH包含来源于人免疫球蛋白的重链可变区(VH)的构架区(FR),和/或所述抗体或其抗原结合片段的VL包含来源于人免疫球蛋白的轻链可变区(VL)的构架区(FR)。因此,在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段是人源化的。在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段是全人源的。

[0911] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段的VH包含来源于人免疫球蛋白的重链可变区(VH)的构架区(FR),和/或所述抗体或其抗原结合片段的VL包含来源于人

免疫球蛋白的轻链可变区(VL)的构架区(FR)。因此,在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段是人源化的。在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段是全人源的。

[0912] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含:

[0913] (a)人免疫球蛋白的重链构架区或其变体,所述变体与其所源自的胚系抗体基因编码的氨基酸序列相比具有至多20个氨基酸的保守置换(例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换);和/或

[0914] (b)人免疫球蛋白的轻链构架区或其变体,所述变体与其所源自的胚系抗体基因编码的氨基酸序列相比具有至多20个氨基酸的保守置换(例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换)。

[0915] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段的人源化程度为至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

[0916] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含:

[0917] (a)重链可变区(VH),其包含选自下列的氨基酸序列:

[0918] (i)SEQ ID NO:3或23所示的序列;

[0919] (ii)与SEQ ID NO:3或23所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0920] (iii)与SEQ ID NO:3或23所示的序列相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;

[0921] 和/或

[0922] (b)轻链可变区(VL),其包含选自下列的氨基酸序列:

[0923] (iv)SEQ ID NO:13或33所示的序列;

[0924] (v)与SEQ ID NO:13或33所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0925] (vi)与SEQ ID NO:13或33所示的序列相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列。

[0926] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH,和/或,SEQ ID NO:13所示的VL。

[0927] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH,和/或,SEQ ID NO:33所示的VL。

[0928] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3所示的VH,和/或,SEQ ID NO:33所示的VL。

[0929] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23所示的VH,和/或,SEQ ID NO:13所示的VL。

[0930] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含:

[0931] (a)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[0932] (b)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[0933] (c)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[0934] (d)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL.

[0935] (e)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)独立地与(a)至(d)任一组中所述的VH和VL相比分别具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;或

[0936] (f)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)与(a)至(d)任一组中所述的VH和VL分别相比,独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)。优选地,所述的置换是保守置换。

[0937] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区(CH)或其变体,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多50个氨基酸的保守置换(例如至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换)。在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段的轻链包含人免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)或其变体,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多50个氨基酸的保守置换(例如至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换)。

[0938] 在一些实施方案中,恒定区被改变,例如被突变,以修饰抗B7H3抗体分子的性质(例如改变下列中的一个或多个特性:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能)。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基,产生功能改变,例如,改变抗体对效应子配体(如FcR或补体C1q)的亲和力,从而改变效应子功能(例如降低)。抗体的Fc区介导几种重要的效应子功能,例如ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC等。

[0939] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段具有重链恒定区(CH),其选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重链恒定区;特别地选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重链恒定区,更特别地选自IgG1(例如是人IgG1)的重链恒定区。在一些实施方案中,人IgG1重链恒定区如SEQ ID NO:43所示。在一些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段具有轻链恒定区,其选自例如κ或λ轻链恒定区,优选κ轻链恒定区(例如人κ轻链恒定区)。在一些实施方案中,轻链恒定区具有如SEQ ID NO:44所示的序列。

[0940] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:43所示的CH或其变体,所述变体与SEQ ID NO:43相比具有至多20个氨基酸的保守置换(例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9

个或10个氨基酸的保守置换),或者与SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0941] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链恒定区或其变体。在一些实施方案中,所述轻链恒定区包含κ轻链恒定区。在一些实施方案中,所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:44所示的轻链恒定区(CL)或其变体,所述变体与SEQ ID NO:44相比具有至多20个氨基酸的保守置换(例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的保守置换),或者与SEQ ID NO:16相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;

[0942] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:43所示的重链恒定区(CH)和SEQ ID NO:44所示的轻链恒定区(CL)。

[0943] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含:

[0944] (a)重链,其包含选自下列的氨基酸序列:

[0945] (i)包含SEQ ID NO:3所示的VH序列和SEQ ID NO:43所示的CH序列的序列;

[0946] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0947] (iii)与(i)所示的序列相比具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列;以及

[0948] (b)轻链,其包含选自下列的氨基酸序列:

[0949] (iv)包含SEQ ID NO:13所示的VL序列和SEQ ID NO:44所示的CL序列的序列;

[0950] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0951] (vi)与(iv)所示的序列相比具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列。

[0952] 在某些实施方案中,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0953] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含:

[0954] (a)重链,其包含选自下列的氨基酸序列:

[0955] (i)包含SEQ ID NO:23所示的VH序列和SEQ ID NO:43所示的CH序列的序列;

[0956] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0957] (iii)与(i)所示的序列相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;以及

[0958] (b)轻链,其包含选自下列的氨基酸序列:

[0959] (iv)包含SEQ ID NO:33所示的VL序列和SEQ ID NO:44所示的CL序列的序列;

[0960] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0961] (vi)与(iv)所示的序列相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列。

[0962] 在某些实施方案中,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0963] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,所述重链包含:

[0964] (i)SEQ ID NO:45所示的序列;

[0965] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0966] (iii)与(i)所示的序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;和所述轻链包含:

[0967] (iv)SEQ ID NO:46所示的序列;

[0968] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0969] (vi)与(iv)所示的序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;

[0970] 优选地,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0971] 在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,所述重链包含:

[0972] (i)SEQ ID NO:47所示的序列;

[0973] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0974] (iii)与(i)所示的序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;和所述轻链包含:

[0975] (iv)SEQ ID NO:48所示的序列;

[0976] (v)与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0977] (vi)与(iv)所示的序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;

[0978] 优选地,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

[0979] 在某些实施方案中,本公开的抗体是嵌合抗体,人源化抗体或全人源抗体。在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段选自scFv、Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、双抗体(diabody).

[0980] 在某些实施方案中,本公开的抗体是scFv。在某些实施方案中,本公开的scFv包含:

[0981] (a)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[0982] (b)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[0983] (c)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[0984] (d)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL.

[0985] (e)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)独立地与(a)至(d)任一组中所述的VH和VL相比分别具有至少70％、至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性;或

[0986] (f)重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)与(a)至(d)任一组中所述的VH和VL分别相比,独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)。优选地,所述的置换是保守置换。

[0987] 在某些实施方案中,本公开的抗体是scFv。在某些实施方案中,本公开的scFv包含:

[0988] (i)SEQ ID NO:1或2所示的序列;

[0989] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[0990] (iii)与(i)所示的序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;

[0991] 优选地,(ii)中所述的置换是保守置换。

[0992] 在某些实施方案中,本公开的抗体是scFv。

[0993] 在某些实施方案中,本公开的scFv包含SEQ ID NO:1或2所示的序列。

[0994] 抗体衍生物

[0995] 本公开的抗体或其抗原结合片段可进行衍生化,例如被连接至另一个分子(例如另一个多肽或蛋白)。通常,抗体或其抗原结合片段的衍生化(例如,标记)不会对其与B7H3(特别是人B7H3)的结合产生不利影响。因此,本公开的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。例如,可以将本公开的抗体或其抗原结合片段连接(通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其它方式)于一个或多个其它分子基团,例如另一个抗体(例如,形成双特异性抗体),检测试剂,药用试剂,和/或能够介导抗体或其抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽(例如,抗生物素蛋白或多组氨酸标签)。

[0996] 一种类型的衍生化抗体(例如,双特异性抗体)是通过交叉连接2个或更多个抗体(属于同一类型或不同类型)而产生的。获得双特异性抗体的方法是本领域公知的,其实例包括但不限于,化学交联法、细胞工程法(杂交瘤法)或基因工程法。

[0997] 另一种类型的衍生化抗体是标记的抗体。例如,可以将本公开的抗体或其抗原结合片段连接至可检测的标记。本公开所述的可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的,其实例包括但不限于,酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶,等)、放射性核素(例如,3H、125I、35S、14C或32P)、荧光染料(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明(TRITC)、藻红蛋白(PE)、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物(例如Cy7、Alexa750))、吖啶酯类化合物、磁珠(例如,Dynabeads®)、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如,聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶,等)珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲和素(例如,链霉亲和素)的生物素。教导该标记物的使用的专利包括,但不限于,美国专利3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149;及4,366,241(全部通过引用并入本文)。如上所述的可检测的标记可通过本领域已知的方法检测。例如,放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计算器检测,荧光标记物可使用光检测器检测,以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测,及测热标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中,此类标记能够适用于免疫学检测(例如,酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等)。在某些实施方案中,可通过不同长度的接头(linker)将如上所述的可检测的标记连接至本公开的抗体或其抗原结合片段,以降低潜在的位阻。

[0998] 此外,本公开的抗体或其抗原结合片段还可以用化学基团进行衍生,例如聚乙二醇(PEG),甲基或乙基,或者糖基。这些基团可用于改善抗体的生物学特性,例如增加血清半衰期。

[0999] 本公开的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得(参见Morimoto et al.,J.Biochem.Biophys.Methods 24:107-117(1992)and Brennan et al.,Science 229:81(1985))。另外,这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生(reviewed in Hudson,Curr.Opin.Immunol.11:548-557(1999);Little et al.,Immunol.Today,21:364-370(2000))。比如,Fab'片段可以直接从宿主细胞中获得;可以将Fab'片段化学偶联形成F

$(ab')_2$片段(Carter et al.,Bio/Technology,10:163-167(1992))。另外,Fv、Fab或$F(ab')_2$片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

[1000] 本公开的IgG同型对照抗体是本领域的普通技术人员完全知晓并可以购买或制备获得的。例如人抗鸡蛋溶酶体抗体(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG,anti-HEL,如human IgG1,简称hIgG1),其序列来自于Acierno等人发表的Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies研究中Fab F10.6.6序列的可变区序列(Acierno等人.J Mol Biol.2007;374(1):130-46.)。制备方法如下:委托南京金斯瑞生物对human IgG抗体的重轻链(全序列或可变区)基因进行氨基酸的密码子优化和基因合成,参照《分子克隆实验指南(第三版)》介绍的标准技术,采用PCR、酶切、DNA胶回收、连接转化、菌落PCR或酶切鉴定等标准的分子克隆技术将重轻链基因分别亚克隆到哺乳动物表达系统的抗体重链表达载体和抗体轻链表达载体,并进一步对重组表达载体的重轻链基因进行测序分析。测序验证正确后,大量制备去内毒素级别的表达质粒并将重轻链表达质粒瞬时共转染HEK293细胞进行重组抗体的表达。培养7天后收集细胞培养液,进行rProtein A柱(GE)亲和纯化,收获的抗体样品用SDS-PAGE和SEC-HPLC标准分析技术对其进行质量鉴定。

[1001] 在第九方面,本公开提供了一种多特异性抗体,其包含本公开第八方面任一项所述的抗体或其抗原结合片段,和另外的抗体或其片段或抗体类似物。

[1002] 在某些实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体或四特异性抗体。

[1003] 因此,在第十方面,本公开提供了一种分离的核酸分子,包含编码本公开的抗体或其抗原结合片段、或其重链可变区和/或轻链可变区、或其一个或多个CDR的核苷酸序列。根据本领域已知的密码子简并性,在某些实施方案中,所述核苷酸序列是可以根据密码子简并性进行替换的。在某些实施方案中,所述核苷酸序列是密码子最优化的。

[1004] 在某些实施方案中,本公开所述分离的核酸分子包含:(i)分别编码本公开的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区的第一核酸和第二核酸,或(ii)分别编码本公开的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和重链恒定区的第一核酸,和轻链可变区和轻链恒定区的第二核酸,或(iii)分别编码本公开的抗体或其抗原结合片段的重链和轻链的第一核酸和第二核酸。在某些实施方案中,所述第一核酸和第二核酸包含与上述(i)-(iii)中任一第一核酸和第二核酸的简并序列或基本上相同序列的核酸。在某些实施方案中,所述简并序列或基本上相同序列指与(i)-(iii)中所述核酸分子相比具有至少大约85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列或具有一个或更多个核苷酸取代的序列,或相差不超过3、6、15、30或45个核苷酸的序列。

[1005] 在第十一方面,提供了一种载体(例如克隆载体或表达载体),其包含本公开的分离的核酸分子。在某些实施方案中,本公开的载体是例如质粒,粘粒,噬菌体,慢病毒等。在某些实施方案中,所述载体能够在受试者(例如哺乳动物,例如人)体内表达本公开的抗体或其抗原结合片段。

[1006] 第十二方面,提供了一种宿主细胞,其包含本公开的分离的核酸分子或本公开的载体。宿主细胞可以是真核细胞(例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞)或原核细胞(例

如大肠杆菌)。合适的真核细胞包括但不限于NSO细胞、Vero细胞、Hela细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞、和MDCKII细胞。适宜的昆虫细胞包括但不限于Sf9细胞。在某些实施方案中,本公开的宿主细胞是哺乳动物细胞,例如CHO(例如CHO-K1、CHO-S、CHO DXB11、CHO DG44)。

[1007] 第十三方面,提供了制备本公开的抗体或其抗原结合片段、或多特异性抗体的方法,其包括,在允许所述抗体或其抗原结合片段、或多特异性抗体表达的条件下,培养本公开的宿主细胞,和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

[1008] 第十四方面,提供一种抗体-药物偶联物,其中抗体为上述抗B7H3的抗体,其通过接头与偶联部分连接。所述偶联部分选自:可检测的标记、放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质、酶、聚乙二醇(PEG)、核素、核酸、小分子毒素、具有结合活性多肽、蛋白、受体、配体,以及其它抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡或坏死的活性物质。

[1009] 在一些实施例中,抗体-药物偶联物包含下式的抗B7H3抗体药物缀合物(B7H3-ADC):

[1010] Ab-(L-D)n,

[1011] 其中:

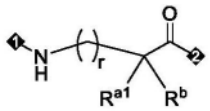
[1012] Ab是在第八方面抗体或其抗原结合片段,并且;

[1013] D是小分子毒素药物部分;

[1014] L是键或连接分子,其共价连接Ab和D;

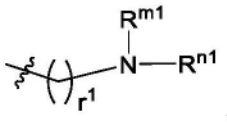
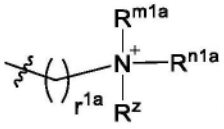
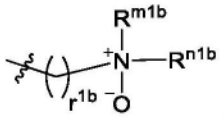
[1015] n是1-16之间的整数,且表示共价连接至Ab的L-D的数目。

[1016] 在一些实施例中,抗体-药物偶联物的L包含选自氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽;所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、AA^1所示氨基酸残基或其立体异构体;

[1017] 

AA^1

[1018] AA^1所示的氨基酸残基中:

[1019] R^{a1}和R^b各自独立地选自H、  、  和  ;

[1020] 或者,R^{a1}与R^b和与它们共同相连的碳原子一起形成4-10元杂环,所述的4-10元杂环中,杂原子选自O、N和S中的1个、2个、3个或4个;所述的4-10元杂环任选地被一个或多个R^0所取代;r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自独立地为0到20的任意整数;

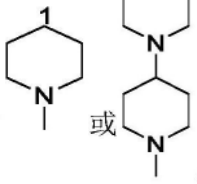
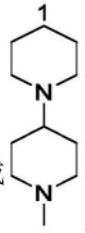
[1021] R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b}和R^{n1b}各自独立地为H、C_{1-6}烷基、C_{3-6}环烷基或-$COOR^{x1}$,其中,R^{x1}为C_{1-6}烷基;

[1022] 或者,R^{m1}和R^{n1}、R^{m1a}和R^{n1a}、以及R^{m1b}和R^{n1b}和与它们共同相连的氮原子一起,形成4-10元杂环,所述的4-10元杂环中,杂原子选自O、N和S中的1个、2个、3个或4个;所述的4-10元杂环任选地被一个或多个$R^{0'}$所取代;

[1023] R^z选自C_{1-6}烷基;

[1024] R^0、$R^{0'}$各自独立地选自C_{1-6}烷基、C_{3-6}环烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$和任选被C_{1-6}烷基取代的4-10元杂环基;所述的4-10元杂环中,杂原子选自O、N和S中的1个、2个、3个或4个;

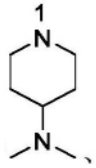
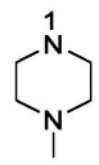
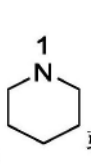
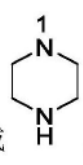
[1025] R^{m2}和R^{n2}各自独立地选自H和C_{1-6}烷基。

[1026] 在一些实施方案中,AA^1所示氨基酸残基中,R^{a1}与R^b和与它们共同相连的碳原子一起形成5-6元杂环,所述的5-6元杂环中,杂原子为N,杂原子数为1个或2个;所述的5-6元杂环任选地被一个或多个R^0所取代。所述的5-6元杂环优选为哌啶环或哌嗪环,进一步优选为哌啶环,例如  或  ,1号碳原子为与R^{a1}和R^b共同相连的碳原子。

[1027] 在一些实施方案中,r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自独立地为0、1、2、3、4或5;优选为地,r、r^1、r^{1a}和r^{1b}各自独立地为0或4;进一步优选为地,r为0,r^1、r^{1a}和r^{1b}为4;或者r为4,r^1、r^{1a}和r^{1b}为0。

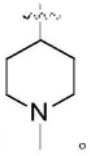
[1028] 在一些实施方案中,r、r^1、r^{1a}和r^{1b}不同时为0。

[1029] 在一些实施方案中,R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b}和R^{n1b}各自独立地为H、C_{1-6}烷基或-$COOR^{x1}$,其中,R^{x1}为C_{1-6}烷基;优选为各自独立地为H、甲基、乙基、正丙基、-$COOCH_3$、-$COOCH_2CH_3$、-$COOCH_2CH_2CH_3$、-$COOCH(CH_3)_2$、-$COOC(CH_3)_3$或-$COOCH_2CH_2CH_2CH_3$。

[1030] 在一些实施方案中,R^{m1}和R^{n1}、R^{m1a}和R^{n1a}、以及R^{m1b}和R^{n1b}和与它们共同相连的氮原子一起形成5-6元杂环,所述的5-6元杂环中,杂原子选自1个或2个N原子;所述的5-6元杂环任选地被一个或多个$R^{0'}$所取代;所述的5-6元杂环优选为哌啶环或哌嗪环;进一步优选为  、  、  或  ,1号氮原子为与R^{m1}和R^{n1}共同相连的氮原子。

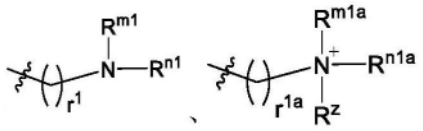
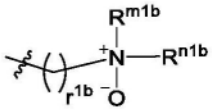
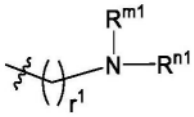
[1031] 在一些实施方案中,R^z优选为C_{1-6}烷基;更优选为甲基。

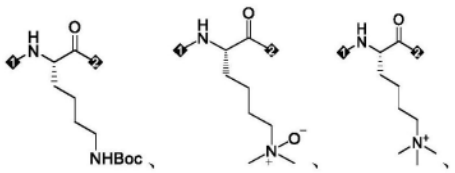
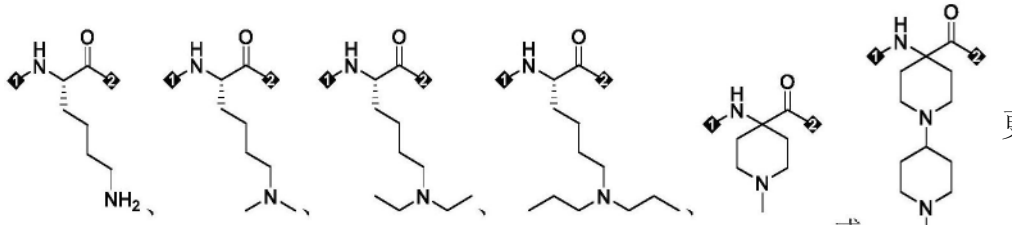
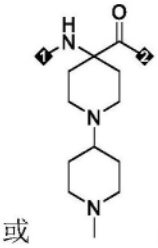
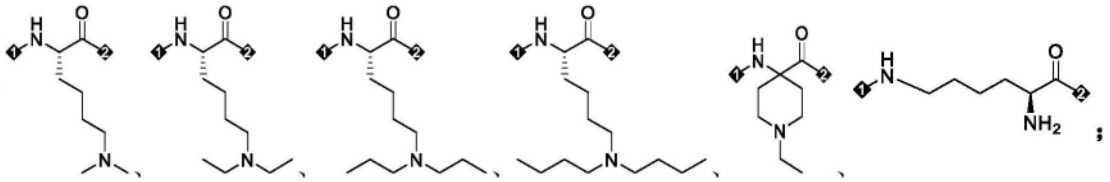
[1032] 在一些实施方案中,R^0和$R^{0'}$各自独立地为C_{1-6}烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$或任选被C_{1-6}烷基取代的5-6元杂环基;所述的5-6元杂环中,杂原子选自1个或2个N原子。

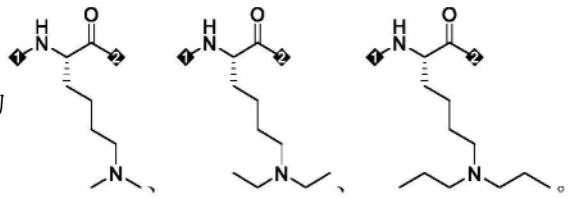
[1033] 在一些实施方案中,R^0优选为C_{1-6}烷基或被C_{1-6}烷基取代的5-6元杂环基,所述的5-6元杂环基为哌啶基或哌嗪基;进一步优选为甲基或被甲基取代的哌啶基;例如甲基或  。

[1034] 在一些实施方案中,$R^{01'}$各自独立地优选为C_{1-6}烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$或任选被C_{1-6}烷基取代的5-6元杂环基;所述的5-6元杂环中,杂原子为1个或2个N;进一步优选为C_{1-6}烷基或-$NR^{m2}R^{n2}$;更优选为甲基或-$NR^{m2}R^{n2}$,其中,R^{m2}和R^{n2}各自独立地优选为H或C_{1-6}烷基,更优选为甲基。

[1035] 在一些实施方案中,$R^{0'}$优选为C_{1-6}烷基或-$NR^{m2}R^{n2}$;R^{m2}和R^{n2}各自独立地优选为H或C_{1-6}烷基(例如甲基)。

[1036] 在一些实施方案中，AA^1所示氨基酸残基中，R^{a1}和R^b中任一个为H，另一个为  和  ；优选为地，R^{a1}和R^b中的任一个为H，另一个选自  。

[1037] 在一些实施方案中，AA^1所示氨基酸残基优选为  进一步优选为  或  ；更优选为  ；

[1038] 最优选为  。

[1039] 在一些实施方案中，抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成，其中所述药物选自：微管阻断药物，DNA损伤药物，Bcl-xL抑制剂等。

[1040] 在一些实施方案中，抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成，其中所述药物选自：金盏花素Auristatins(例如MMAF，MMAE)，美登素衍生物(例如DM1，DM4)，微管溶素，隐粘

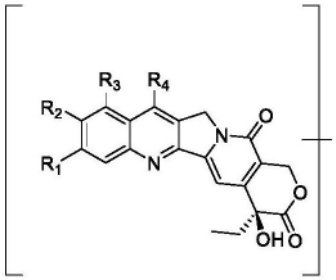
菌素,抗有丝分裂抑制剂,吡咯苯并氮卓类和吲哚氯苯并氮卓类,杜卡霉素,喜树碱,卡奇霉素等。

[1041] 在一些实施方案中,抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成,其中所述药物选自喜树碱(CPT)及其衍生物。

[1042] 在一些实施方案中,抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成,其中所述药物选自拓扑异构酶I抑制剂。

[1043] 在一些实施方案中,抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成,其中所述药物选自:SN-38,DXd。

[1044] 在一些实施方案中,所述抗体-药物偶联物的,D为具有式II所示的药物单元:

[1045] 

II

[1046] 其中,

[1047] R_1为H或F,

[1048] R_2为H或甲基;

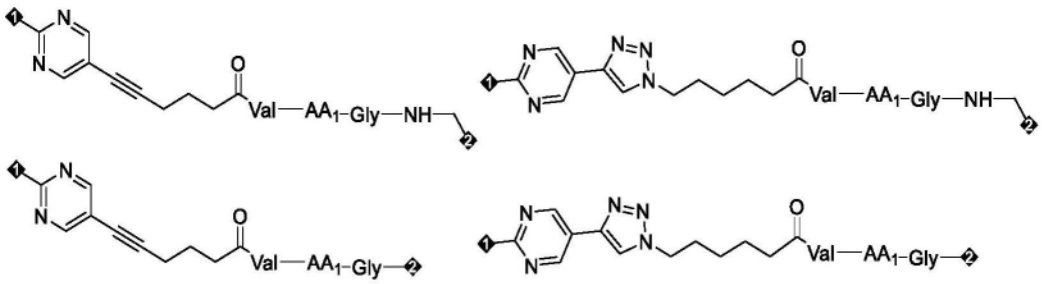
[1049] 或者R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  ;

[1050] R_3为H;

[1051] R_4选自H、-(C1-C4烷基)-OH,-(C1-C4烯基)-OH,-(C1-C4烷基)-NH_2,或-(C1-C4烯基)-NH_2;

[1052] 其中L通过D上存在的羟基或胺基链接。

[1053] 在一些实施方案中,所述抗体-药物偶联物的L选自;

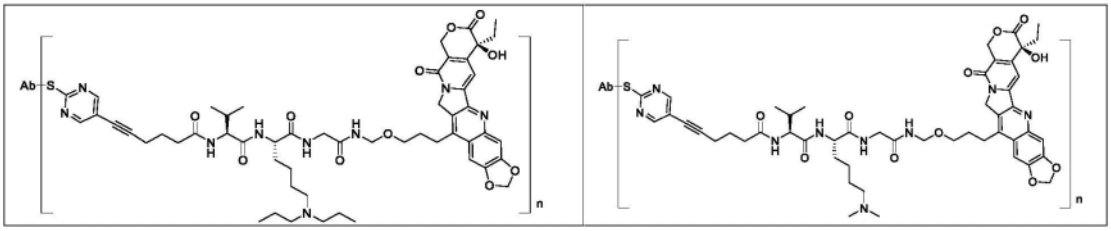
[1054] 

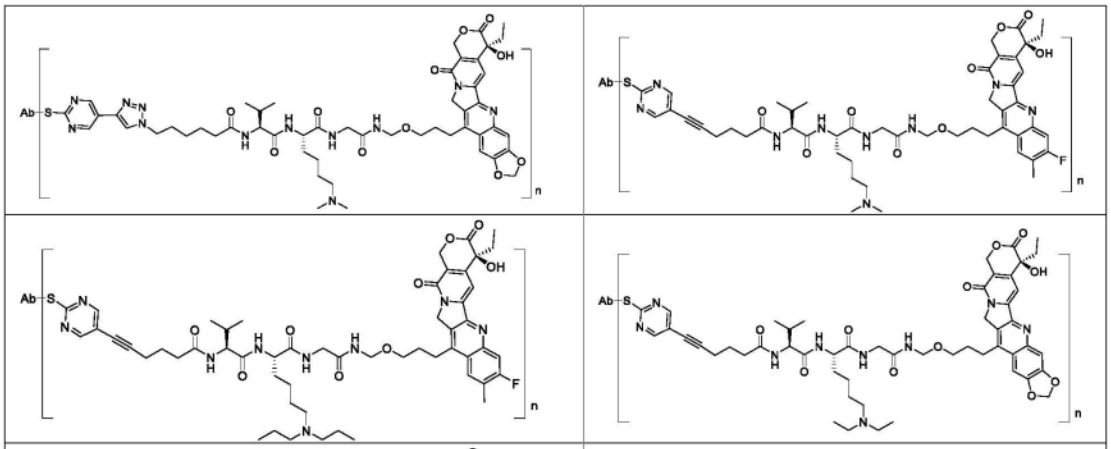
[1055] 其中,1位与Ab相连,2位与D相连;AA1如上文所定义。

[1056] 另外,还需要说明的是,本领域技术人员可以理解的是,L是与打开二硫键(例如,通过还原剂TCEP还原二硫键可以打开二硫键,生成巯基-SH)后Ab(如抗体)自身所含有巯基进行连接,也就是说,L与Ab之间的-S-并非另外再外接的硫原子。例如,中,-S-并非另外外接的硫原子,而是打开双硫键后的Tb自身所含有巯基与L进行连接后形成的-S-。

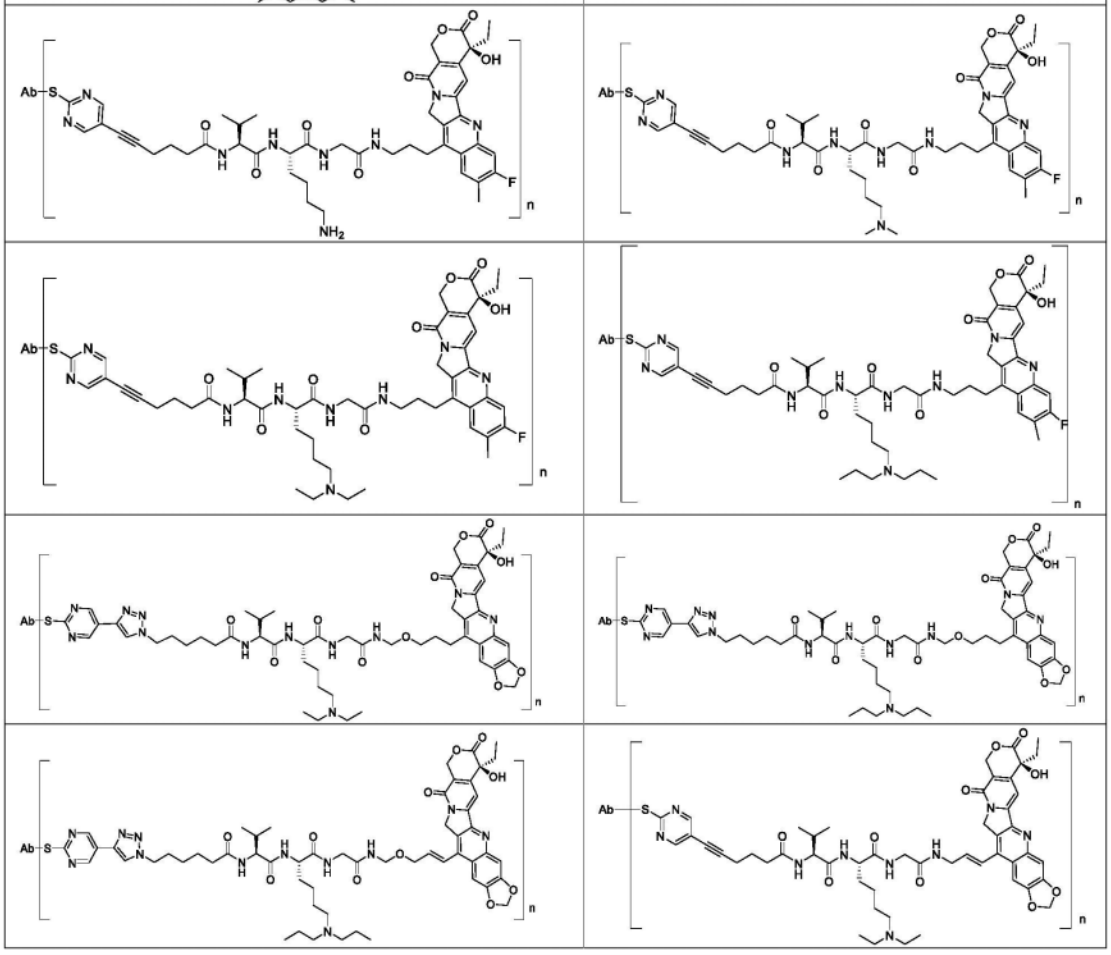
[1057] 在一些优选的实施方案中,所述抗体-药物偶联物,选自:

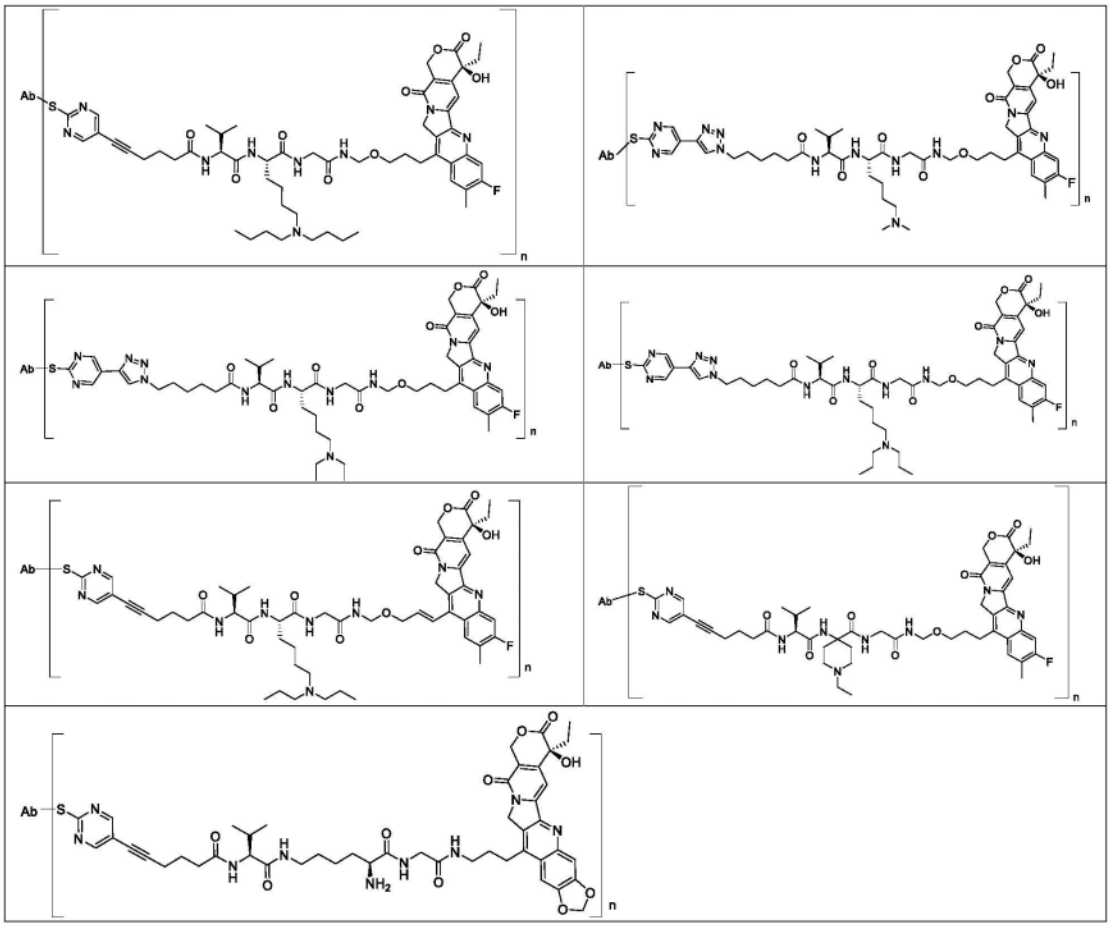
[1058]





[1059]



[1060] 

[1061] 其中Ab为B7H3抗体1D1-01或2E3-02,n为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16,q优选1、2、3、4、5、6、7、8。

[1062] 在本公开的第十五方面,本公开提供了一种配体药物偶联物,其包含本公开上前述的配体药物偶联物或前述的抗体-药物偶联物,所述的配体药物偶联物具有两种或多种q值,所述的抗体-药物偶联物具有两种或多种n值。所述配体药物偶联物是指包含异质DAR分布的配体药物偶联物或抗体-药物偶联物(ADC)。

[1063] 在一些实施方案中,当所述的配体药物偶联物中的一种q值或n值的配体药物偶联物占大部分时,q值或n值和DAR接近。

[1064] 在一些实施方案中,所述的配体药物偶联物中的药物与抗体的比例(DAR)选自1-10中的整数或小数。

[1065] 在一些实施方案中,所述的配体药物偶联物中的药物与抗体的比例(DAR)选自2、2.5、3、3.5、4、4.5,5、5.5、6、6.5、7、7.2、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.7、8.9和9。

[1066] 在一些实施方案中,所述的配体药物偶联物ADC含有具有1至8的DAR的分布的ADC,例如,1.5、2、4、6、和8(即,1.5、2、4、6、和8的载药种类)。值得注意的是,可以产生降解产物,使得所述的配体药物偶联物中也可以包含1、3、5和7的DAR。此外,所述的配体药物偶联物中的ADC也可具有大于8的DAR。所述的配体药物偶联物由链间二硫化物还原然后偶联产生。在一些实施方案中,所述的配体药物偶联物包含如下两者:DAR为4或更低(即,载药种类为4或更低)的所述的配体药物偶联物以及DAR为6或更高(即,载药种类为6或更高)的所述的配体

药物偶联物。

[1067] 在另一个方面,提供了本公开的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测B7H3在样品中的存在或其水平。在另一个方面,本公开提供了诊断性或治疗性试剂盒,其包括一个或多个以下物质:本公开所述的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体、缀合物或者药物组合物。可选地,所述诊断性或治疗性试剂盒还包括使用说明书。

[1068] 在本公开的第十六方面,本公开提供了药物组合物,其包含物质A,以及任选的一种或多种药用辅料;所述的物质A为前述的配体药物偶联物、或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物、或前述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、多特异性抗体、和/或配体药物偶联物、缀合物,或前述的抗体-药物偶联物,或者前述的化合物、或所述化合物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物。所述的物质A可为治疗有效量的。

[1069] 在某些实施方案中,本公开的药物组合物包含本公开的抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[1070] 在某些实施方案中,本公开的药物组合物包含本公开的宿主细胞,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂,其中所述宿主细胞包含如前所述的分离的核酸分子或载体。

[1071] 在某些实施方案中,本公开的药物组合物包含本公开的多特异性抗体,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[1072] 在某些实施方案中,本公开的药物组合物包含本公开的缀合物以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[1073] 在本公开的第十七方面,本公开提供了前述的物质A或者前述的药物组合物在制备治疗和/或预防与细胞活动异常相关的疾病(例如癌症疾病)的药物中的用途。所述的物质A或者前述的药物组合物可为治疗有效量的。

[1074] 在一些实施例中,提供本公开的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物偶联物,或者多特异性抗体在制备药物中的用途,所述药物用于调整(抑制或阻断)B7H3的活性。

[1075] 在一些实施例中,提供本公开的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物偶联物,或者多特异性抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防与B7H3的活性有关的疾病。

[1076] 在一些实施例中,提供本公开的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物偶联物,或者多特异性抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防与B7H3的活性有关的肿瘤。

[1077] 在一些实施方案中,所述癌症疾病选自食管癌(例如食管腺癌和食管鳞状细胞癌)、脑瘤、肺癌(例如小细胞性肺癌,非小细胞性肺癌或肺腺癌)、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌(例如人结肠腺癌)、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤(例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤)、前列腺癌或甲状腺癌。

[1078] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2、Her 2、B7H3、Her 3、EGFR相关的癌症疾病。在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2或Her 2相关的癌症疾病。

[1079] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2相关的癌症疾病。

[1080] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Her 3相关的癌症疾病。

[1081] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与EGFR相关的癌症疾病。

[1082] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与B7H3相关的癌症疾病。

[1083] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为实体肿瘤。

[1084] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为乳腺癌或肺癌(优选非小细胞肺癌)。

[1085] 在本公开的第十七方面,本公开提供了前述的物质A或者前述的药物组合物,其用于治疗和/或预防与细胞活动异常相关的疾病(例如癌症疾病)。

[1086] 在一些实施方案中,所述癌症疾病选自食管癌(例如食管腺癌和食管鳞状细胞癌)、脑瘤、肺癌(例如小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌或肺腺癌)、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌(例如人结肠腺癌)、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤(例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤)、前列腺癌或甲状腺癌。

[1087] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2、Her 2、B7H3、Her 3、EGFR相关的癌症疾病。在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2或Her 2相关的癌症疾病。

[1088] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2相关的癌症疾病。

[1089] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Her 3相关的癌症疾病。

[1090] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与EGFR相关的癌症疾病。

[1091] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与B7H3相关的癌症疾病。

[1092] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为实体肿瘤。在一些实施方案中,所述癌症疾病为乳腺癌或肺癌(优选非小细胞肺癌)。

[1093] 在本公开的第十八方面,本公开提供了预防和/或治疗与细胞活动异常相关的疾病(例如癌症疾病)的方法,其包括:给予有需要的个体预防和/或治疗有效量的前述的物质A,或者前述的药物组合物。

[1094] 在一些实施方案中,所述癌症疾病选自食管癌(例如食管腺癌和食管鳞状细胞癌)、脑瘤、肺癌(例如小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌或肺腺癌)、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌(例如人结肠腺癌)、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤(例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤)、前列腺癌或甲状腺癌。

[1095] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2、Her 2、B7H3、Her 3、EGFR相关的癌症疾病。

[1096] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2或Her 2相关的癌症疾病。

[1097] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Trop-2相关的癌症疾病。

[1098] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与Her 3相关的癌症疾病。

[1099] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与EGFR相关的癌症疾病。

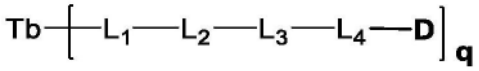
[1100] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为与B7H3相关的癌症疾病。

[1101] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为实体肿瘤。

[1102] 在一些实施方案中,所述癌症疾病为乳腺癌或肺癌(优选非小细胞肺癌)。

[1103] 在另一方面,本公开提供了如下实施方案:

[1104] 1.式XV所示的配体药物偶联物，

[1105] 

式XV

[1106] 或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，

[1107] 其中：

[1108] Tb为和靶点结合的配体或靶向部分；

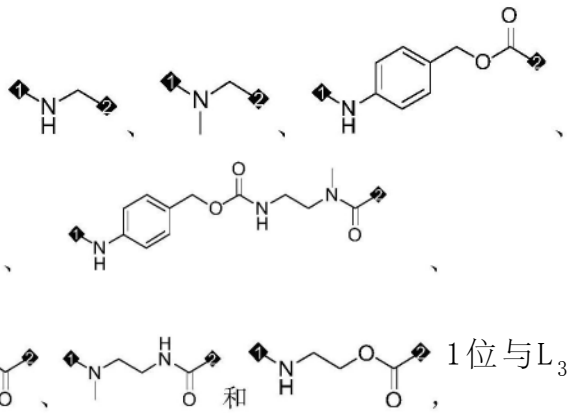
[1109] q为药物配体偶联比；

[1110] D为生物活性分子片段；

[1111] L_1为延伸单元；

[1112] L_2不存在或为连接单元；

[1113] L_3选自氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽；

[1114] L_4不存在或存在，L_4存在时，L_4选自  1位与L_3相连，2位与D相连。

[1115] 2.如实施方案1所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

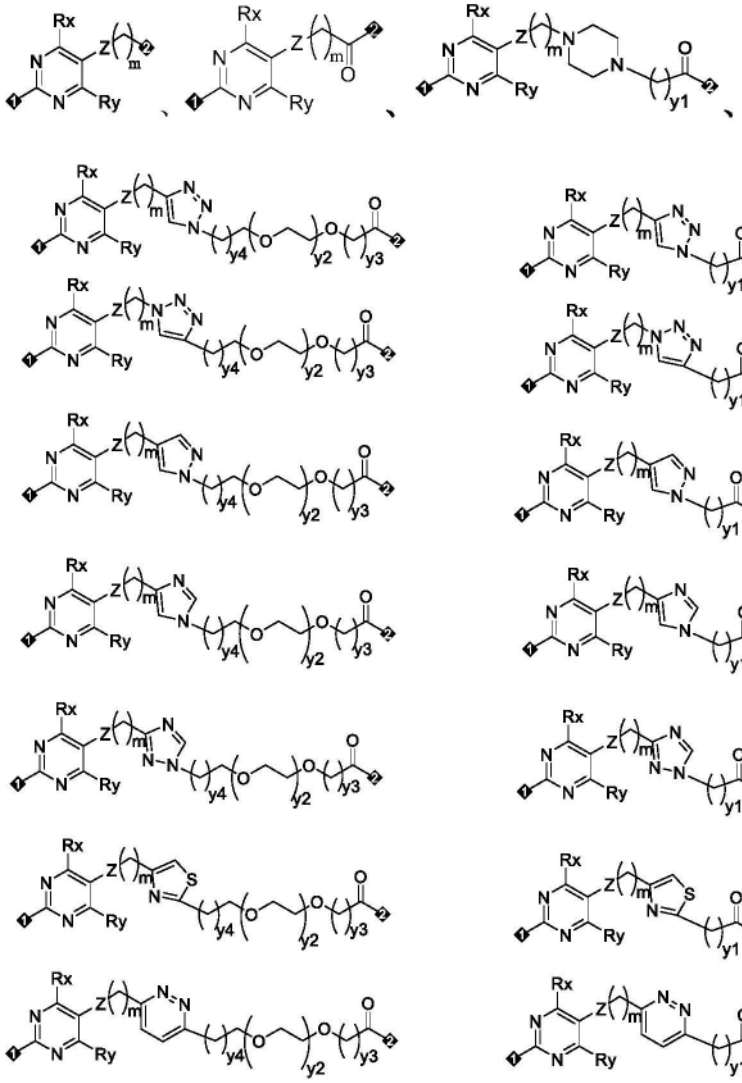
[1116] (1)Tb为抗体或其抗原结合片段；

[1117] (2)q选自0.1-16.0之间的任意数值；

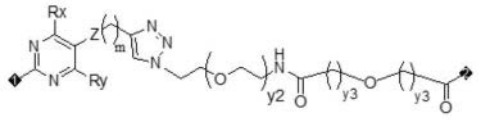
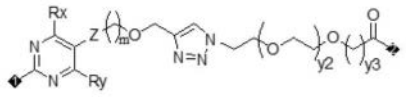
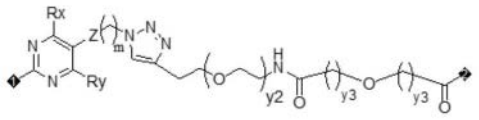
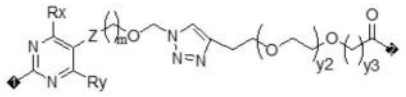
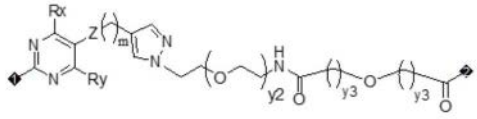
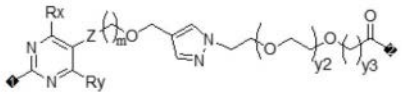
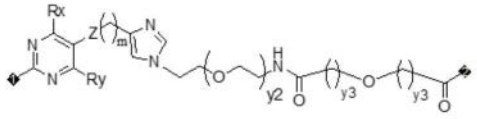
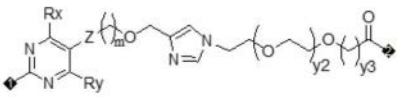
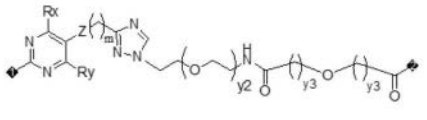
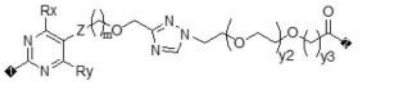
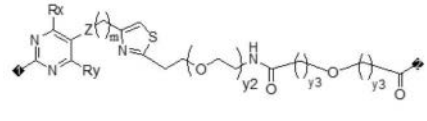
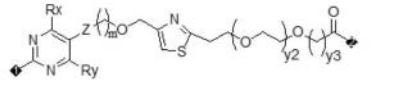
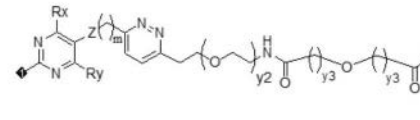
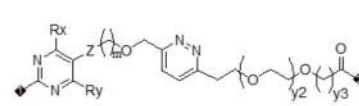
[1118] (3)D为具有抗肿瘤生物活性分子片段；

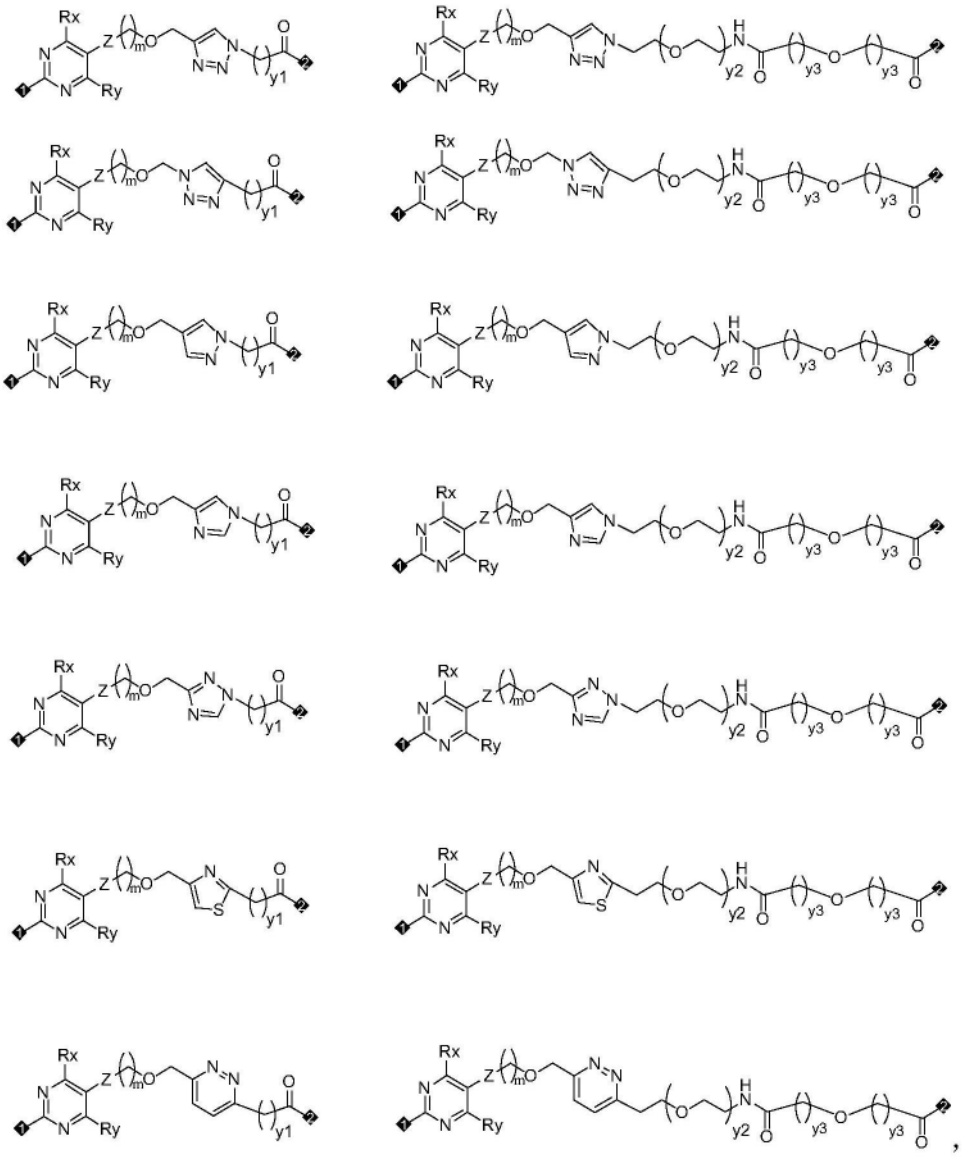
[1119] (4)L_1选自：

[1120]



[1121]

[1122] 

[1123] 各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10芳基、5-10元杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、亚胺基和CF_2；

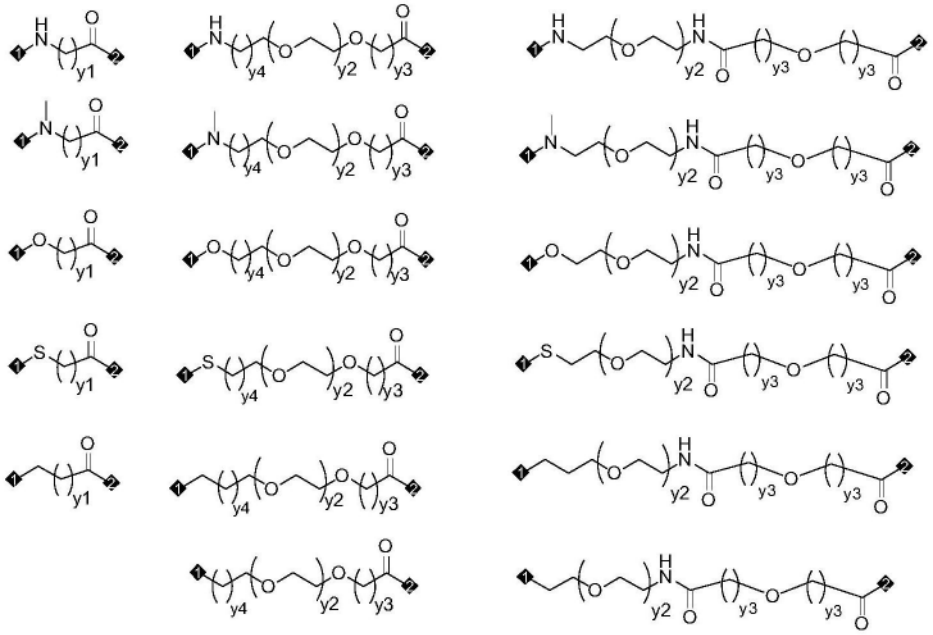
[1124] Rx和Ry各自独立地选自H和C1-4烷基；

[1125] 各m独立地选自0、1、2、3、4、5和6；

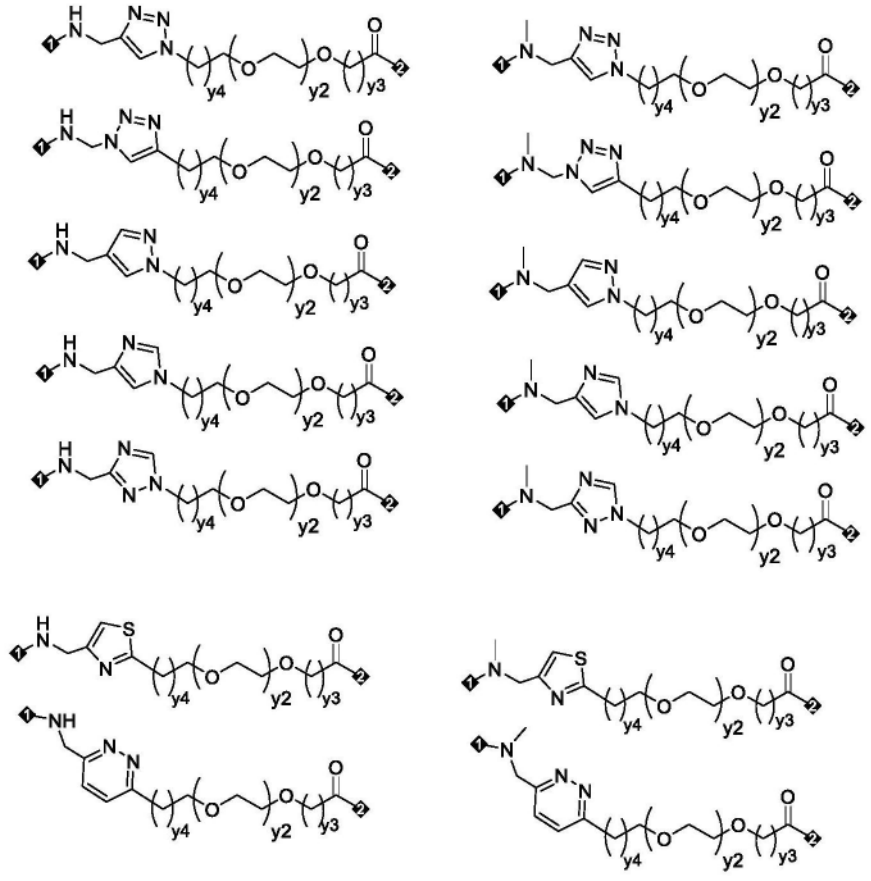
[1126] y1、y2、y3和y4各自独立地选自0-20之间的任意整数；

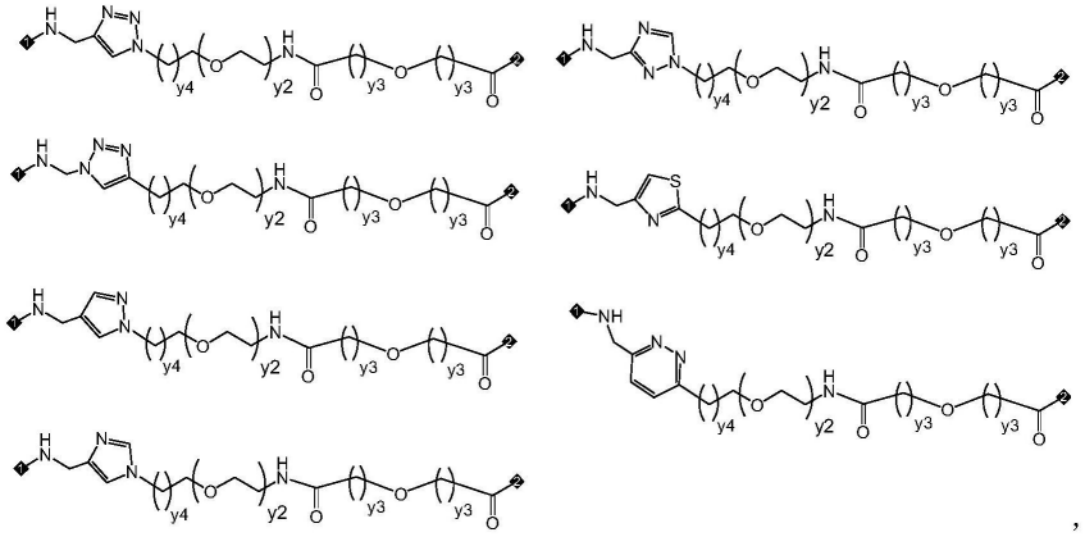
[1127] 1位通过S原子与Tb相连，2位与L_2或L_3相连；

[1128] (5)L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自：



[1129]

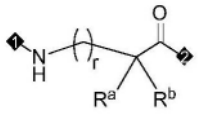


[1130] 

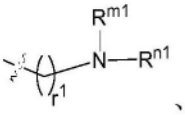
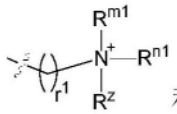
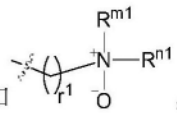
[1131] y1、y2、y3和y4各自独立地选自0-20之间的任意整数,1位与L_1相连,2位与L_3相连;

[1132] (6)L_3选自氨基酸残基或由2-10个氨基酸残基组成的短肽;所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、或选自AA^1所示氨基酸残基或其立体异构体;

[1133] AA^1所示氨基酸残基的结构如下所示,

[1134] 

AA^1

[1135] 其中:R^a、R^b各自独立地选自H、  、  和  ,且R^a、R^b不同时为H;

[1136] 或者,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成4-10元杂环,所述4-10元杂环任选地被一个或多个R^0所取代;

[1137] r、r^1各自独立地选自0到20的任意整数;

[1138] R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基、C3-6环烷基和-$COOR^{x1}$;

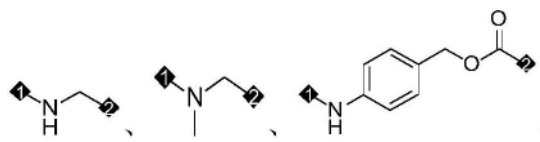
[1139] R^{x1}选自C1-6烷基;

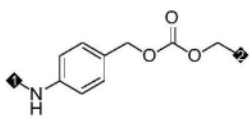
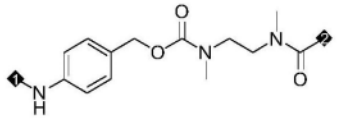
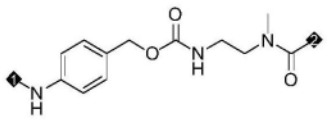
[1140] 或者,R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起,形成4-10元杂环,所述4-10元杂环任选地被一个或多个$R^{0'}$所取代;

[1141] R^z选自C1-6烷基;

[1142] R^0、$R^{0'}$各自独立地选自C1-6烷基、C3-6环烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$和任选被C1-6烷基取代的4-10元杂环基;

[1143] R^{m2}、R^{n2}各自独立地选自H和C1-6烷基;

[1144] (7)L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4选自  、

 、  、  、1位与L_3相连，2位与D相连。

[1145] 3.如实施方案2所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

[1146] (1)Tb为抗体或其抗原结合片段，其满足如下条件中的一个或多个：

[1147] (i)所述抗体或其抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、全人抗体、前抗、单克隆抗体、双特异性抗体或多特异性抗体；

[1148] (ii)Tb为单克隆抗体或其抗原结合片段；

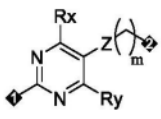
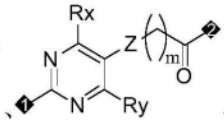
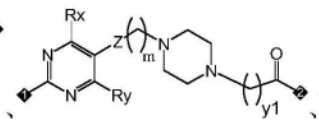
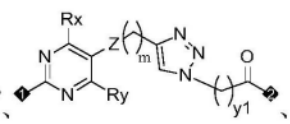
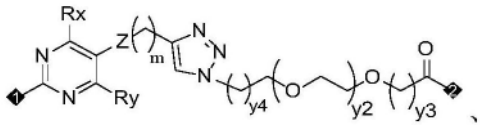
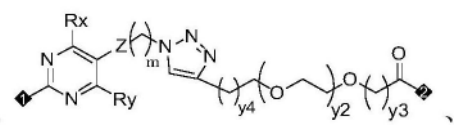
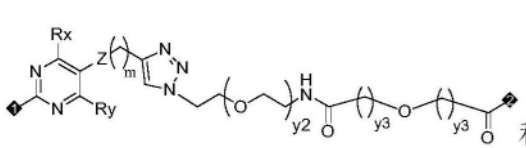
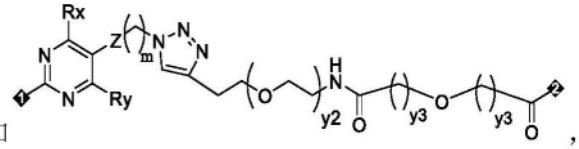
[1149] (iii)Tb为具有内吞、不内吞或内吞较弱的抗体或其抗原结合片段；

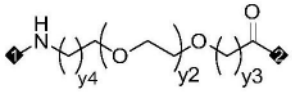
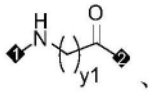
[1150] (iv)Tb为具有结合肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原活性的抗体或其抗原结合片段；

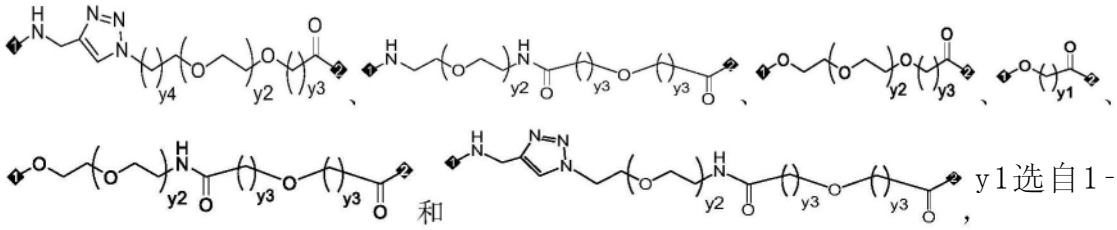
[1151] (v)Tb为不具有结合肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原活性的抗体或其抗原结合片段；

[1152] (2)q选自0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12和之间的任意数值；

[1153] (3)所述的生物活性分子片段中，所述的生物活性分子为DNA拓扑异构酶抑制剂或微管蛋白抑制剂；

[1154] (4)L_1选自  、  、  、  、  、  、  和  ，各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10芳基、5-10元杂芳基和酰胺基；Rx、Ry各自独立地选自H和C1-4烷基；各m独立地选自0、1、2、3、4、5和6；y1选自1-6之间任意整数；各y2独立地选自0-15之间任意整数；各y3独立地选自1、2和3；各y4独立地选自0和1；1位通过S原子与Tb相连，2位与L_2或L_3相连；

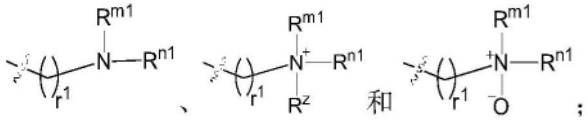
[1155] (5)L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  、



y1选自1-6之间任意整数，各y2独立地选自0-10之间任意整数，各y3独立地选自1和2，各y4独立地选自0和1，1位与L_1相连，2位与L_3相连；

[1156] (6)L_3选自氨基酸残基Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg和AA^1或由2-10个选自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp和AA^1的氨基酸残基组成的短肽；

[1157] (7)AA^1的氨基酸残基中，R^a、R^b中，任一个为H，另一个选自



；

[1158] 或者，AA^1的氨基酸残基中，R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元杂环；

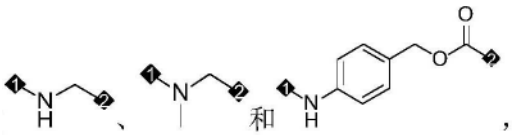
[1159] (8)AA^1的氨基酸残基中，r、r^1各自独立地选自0、1、2、3、4和5；

[1160] (9)AA^1的氨基酸残基中，R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3和-COOCH2CH2CH2CH3；或者，R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起，形成被$R^{0'}$取代的5-6元杂环；

[1161] (10)AA^1的氨基酸残基中，R^z为甲基；

[1162] (11)AA^1的氨基酸残基中，R^0、$R^{0'}$各自独立地选自C1-6烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$和任选被C1-6烷基取代的5-6元杂环基；

[1163] (12)L_4不存在或存在，L_4存在时，L_4选自



1位与L_3相连，2位与D相连。

[1164] 4.如实施方案3所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

[1165] (1)Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段、抗Trop-2抗体或其抗原结合片段、抗Her2抗体或其抗原结合片段、抗Her3抗体或其抗原结合片段、抗EGFR抗体或其抗原结合片段、或IgG1同型抗体抗鸡融菌酶抗体；

[1166] (2)q选自0.1、1、2、3、4、5、6、7、8和之间的任意数值；

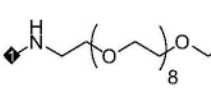
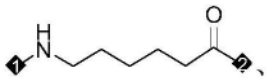
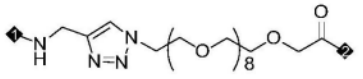
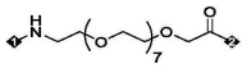
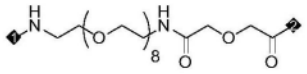
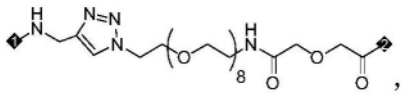
[1167] (3)当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为DNA拓扑异构酶抑制剂时，所述的DNA拓扑异构酶抑制剂为喜树碱类生物活性分子；

[1168] (4)当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为微管蛋白抑制剂时，所述的微管蛋白抑制剂为MMAF类微管蛋白抑制剂，MMAE类微管蛋白抑制剂；

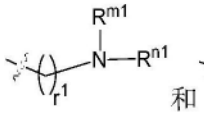
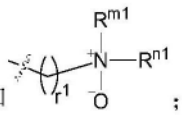
[1169] (5)L_1中，各Z独立地选自直接键、碳碳三键和碳碳双键；

[1170] (6)L_1中,y1为4、5或6;

[1171] (7)L_1中,各y2独立地选自6-10之间任意整数;

[1172] (8)L_2不存在或存在,L_2存在时,L_2选自  、  、  、  、  和  ,1位与L_1相连,2位与L_3相连;

[1173] (9)L_3选自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys和Lys-Ala-Asn;

[1174] (10)AA^1所示氨基酸残基中,R^a、R^b中,任一个为H,另一个选自  和  ;或,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成被R^0取代的5-6元杂环为被R^0取代的哌啶环或哌嗪环;

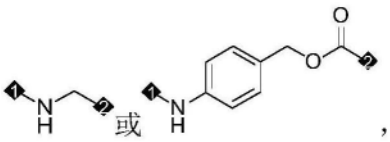
[1175] (11)AA^1的氨基酸残基中,r、r^1各自独立地选自0和4;

[1176] (12)AA^1的氨基酸残基中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H、C1-6烷基、C3-6环烷基和叔丁氧羰基;或者,R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起,形成被$R^{0'}$取代的哌啶环或哌嗪环;

[1177] (13)AA^1的氨基酸残基中,R^0选自C1-6烷基和被C1-6烷基取代的5-6元杂环基,所述5-6元杂环基选自哌啶基和哌嗪基;

[1178] (14)AA^1的氨基酸残基中,$R^{0'}$选自C1-6烷基和-$NR^{m2}R^{n2}$;

[1179] (15)AA^1的氨基酸残基中,R^{m2}、R^{n2}为甲基;

[1180] (16)L_4不存在或存在,L_4存在时,L_4为  ,1位与L_3相连,2位与D相连。

[1181] 5.如实施方案1-4中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其满足如下条件中的一个或多个:

[1182] (1)q选自2、3、4、5、6、7、8和之间的任意数值;

[1183] (2)Tb为如下任一方案:

[1184] (i)Tb为抗Her 2的抗体或其抗原结合片段,所述的抗Her 2的抗体为anbenitamab,coprelotamab,disitamab,gancotamab,margetuximab,pertuzumab,timigutuzumab,zanidatamab,Trastuzumab,Pertuzumab或其抗原结合片段;

[1185] (ii)Tb为抗Trop-2的抗体或其抗原结合片段,所述的抗Trop-2的抗体为datopotamab,Sacituzumab或其抗原结合片段;或

[1186] (iii)Tb为抗EGFR的抗体或其抗原结合片段,所述的抗EGFR的抗体为demupitamab,depatuxizumab,futuximab,imgatuzumab,laprituximab,losatuxizumab,matuzumab,modotuximab,necitumumab,nimotuzumab,panitumumab,pimurutamab,serclutamab,tomuzotuximab,zalutumumab,Cetuximab或其抗原结合片段;或

[1187] (iv)Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗B7H3抗体为enoblituzumab,mirzotamab,omburtamab,1D1-01,2E3-02抗体或其抗原结合片段;或

[1188] (v)Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗B7H3抗体其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR),其中CDR按kabat编号系统定义:

[1189] (a)序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[1190] 序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3;

[1191] (b)序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[1192] 序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[1193] (c)序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[1194] 序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[1195] 或(d)序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[1196] 序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3;或

[1197] (vi)Tb为抗Her3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗Her3抗体为barecetamab,duligotuzumab,elgemtumab,lumretuzumab,patritumab,seribantumab,202-2-1或其抗原结合片段;或

[1198] (vii)Tb为抗Her3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR),其中CDR按kabat编号系统定义:

[1199] 序列为SEQ ID NO:53的HCDR1,序列为SEQ ID NO:54的HCDR2,序列为SEQ ID NO:55的HCDR3;和/或,

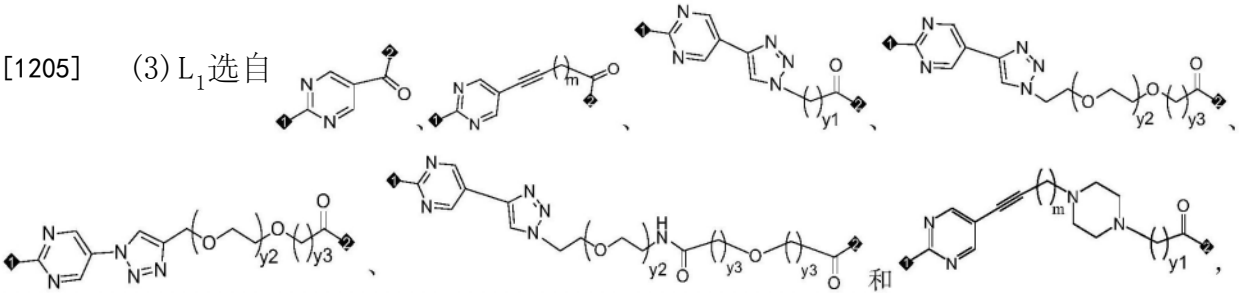
[1200] 序列为SEQ ID NO:59的LCDR1,序列为SEQ ID NO:60的LCDR2,序列为SEQ ID NO:21的LCDR3;

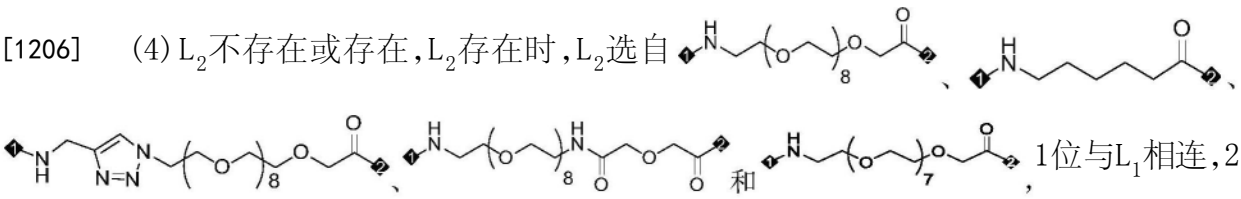
[1201] (viii)有肿瘤细胞内吞活性,且有肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段;

[1202] (ix)肿瘤细胞内吞活性较弱或无内吞活性,且有肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段;

[1203] (x)肿瘤细胞内吞活性较弱或无内吞活性,且无肿瘤组织中游离抗原或肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段;例如,Tb为抗鸡溶菌酶人IgG1同型抗体

[1204] (xi)结合非内吞抗原的抗体或其抗原结合片段;例如ALCAM/CD166;

[1205] (3)L_1选自  和,m选自2、3和4,y1选自1-6之间任意整数,各y2独立地选自0-10之间任意整数,各y3独立地选自1或2,1位通过S原子与Tb相连,2位与L_2或L_3相连;

[1206] (4)L_2不存在或存在,L_2存在时,L_2选自  ,1位与L_1相连,2位与L_3相连;

[1207] (5)L_3选自AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn和Gly-Gly-Phe-Gly;

[1208] (6)AA^1所示氨基酸残基中,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成被R^0取代的5-6元杂环为被R^0取代的哌啶环;

[1209] (7)AA^1的氨基酸残基中,r、r^1中,任一个为0,另一个为4;

[1210] (8)AA^1的氨基酸残基中,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H和C1-6烷基;或,R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起,形成被$R^{0'}$取代的哌啶环;

[1211] (10)AA^1的氨基酸残基中,R^0选自甲基、乙基和被甲基取代的5-6元杂环基,所述5-6元杂环基为哌啶基;

[1212] (11)AA^1的氨基酸残基中,$R^{0'}$选自甲基和-$NR^{m2}R^{n2}$;

[1213] (12)当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为DNA拓扑异构酶抑制剂、所述的DNA拓扑异构酶抑制剂为喜树碱类生物活性分子时,所述的喜树碱类生物活性分子为喜树碱、DXD、取代基被修饰的喜树碱或取代基被修饰的DXD。

[1214] 6.如实施方案1-4中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其满足如下条件中的一个或多个:

[1215] (1)q选自3、4、5、6、7、8和之间的任意数值;

[1216] (2)Tb为如下任一方案:

[1217] (vi)Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR),其中CDR按kabat编号系统定义:

[1218] (a)序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[1219] 序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:

19的LCDR3;

[1220] (b)序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[1221] 序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[1222] (c)序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[1223] 序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[1224] 或(d)序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[1225] 序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3;

[1226] 且所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含含有以上含有(a)-(d)中一组重链CDR的VH和含有(a)-(d)中一组轻链CDR的VL;

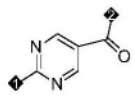
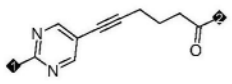
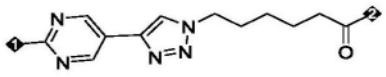
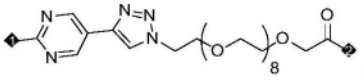
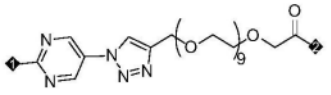
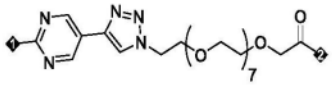
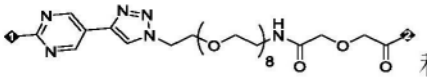
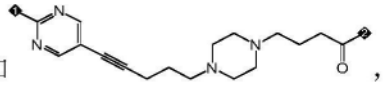
[1227] (ii)Tb为抗Her3抗体或其抗原结合片段,

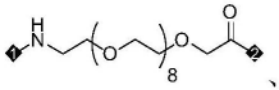
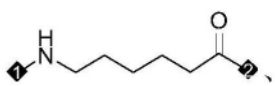
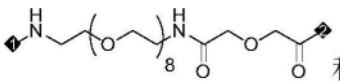
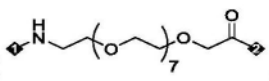
[1228] 其中所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区(CDR),其中CDR按kabat编号系统定义:

[1229] 序列为SEQ ID NO:53的HCDR1,序列为SEQ ID NO:54的HCDR2,序列为SEQ ID NO:55的HCDR3;和/或,

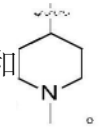
[1230] 序列为SEQ ID NO:59的LCDR1,序列为SEQ ID NO:60的LCDR2,序列为SEQ ID NO:21的LCDR3;

[1231] 所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含以上组重链CDR的VH和含有以上组轻链CDR的VL;

[1232] (3)L_1选自  、  、  、  、  、  、  和  ,1位通过S原子与Tb相连,2位与L_2或L_3相连;

[1233] (4)L_2不存在或存在,L_2存在时,L_2选自  、  、  和  ,1位与L_1相连,2位与L_3相连;

[1234] (5)L_3选自AA^1、Val-AA^1-Gly;

[1235] (6)AA^1的氨基酸残基中,R^0选自甲基、乙基和  。

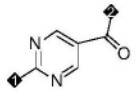
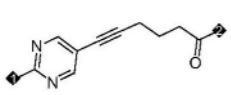
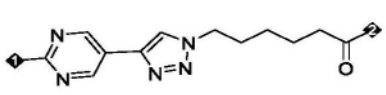
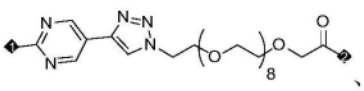
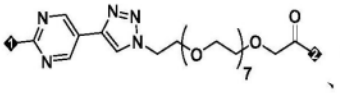
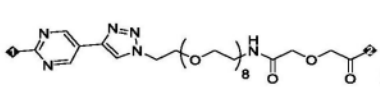
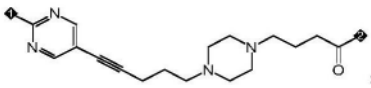
[1236] 7.如实施方案1-4中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其满足如下条件中的一个或多个:

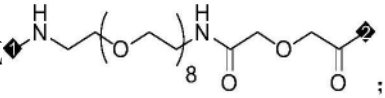
[1237] (1)q选自4、5、6、7、8和之间的任意数值;

[1238] (2)Tb为如下任一方案:

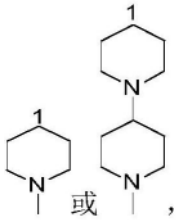
[1239] (i)Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含:SEQ ID NO:3或23所示的VH,和/或,SEQ ID NO:13或33所示的VL;

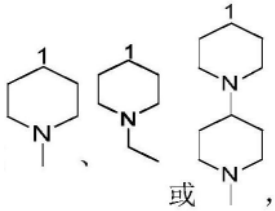
[1240] (ii)Tb为抗Her3抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含:SEQ ID NO:49所示的VH,和/或,SEQ ID NO:50所示的VL;

[1241] (3)L_1选自  、  、  、  、  、  和  ,1位通过S原子与Tb相连,2位与L_2或L_3相连;

[1242] (4)L_2不存在或  ;

[1243] (5)L_3选自Val-AA^1-Gly;

[1244] (6)AA^1所示氨基酸残基中,R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成  ,1号碳原子为与R^a和R^b共同相连的碳原子;

[1245] (7)r、r^1中,r为4,r^1为0时,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H和C1-6烷基;r为0,r^1为4时,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自C1-6烷基,或,R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起,形成  ,1号碳原子为与R^a和R^b共同相连的碳原子。

[1246] 8.如实施方案7所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,

[1247] (1)q选自6、7、8和之间的任意数值;

[1248] (2)Tb为如下任一方案:

[1249] (i)Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含:SEQ ID NO:3或23所示的VH,和/或,SEQ ID NO:13或33所示的VL;

[1250] 进一步包含:

[1251] (a)人免疫球蛋白的重链恒定区(CH)或其变体;和/或

[1252] (b)人免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)或其变体,

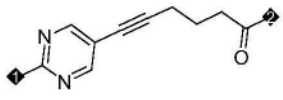
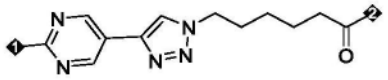
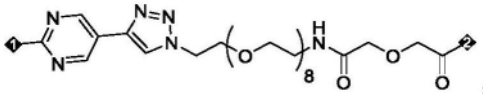
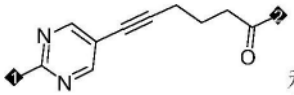
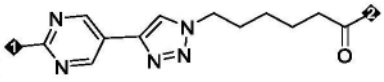
[1253] (ii)Tb为抗Her3抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含:SEQ ID NO:49所示的VH,和/或,SEQ ID NO:50所示的VL;

[1254] 进一步包含:

[1255] (a)人免疫球蛋白的重链恒定区(CH)或其变体;和/或

[1256] (b)人免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)或其变体;

[1257] (3)r、r^1中,r为4,r^1为0时,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自H和C1-6烷基;r为0,r^1为4时,R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自C2-6烷基;

[1258] (4)L_1选自  、  和  ,1位通过S原子与Tb相连,2位与L_2或L_3相连;例如L_1选自  和  ,1位通过S原子与Tb相连,2位与L_2或L_3相连。

[1259] 9.如实施方案8所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,

[1260] (1)Tb为如下任一方案:

[1261] (i)Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含:

[1262] SEQ ID NO:3所示的VH,SEQ ID NO:43所示的CH或其变体,和/或,SEQ ID NO:13所示的VL,SEQ ID NO:44所示的CL或其变体;

[1263] SEQ ID NO:23所示的VH,SEQ ID NO:43所示的CH或其变体,和/或,SEQ ID NO:33所示的VL,SEQ ID NO:44所示的CL或其变体;

[1264] 优选地,所述B7H3抗体或其抗原结合片段包含:

[1265] SEQ ID NO:45所示的重链,和/或,SEQ ID NO:46所示的轻链;

[1266] SEQ ID NO:47所示的重链,和/或,SEQ ID NO:48所示的轻链;

[1267] (ii)Tb为抗Her3抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含:

[1268] SEQ ID NO:49所示的VH,SEQ ID NO:43所示的CH或其变体,和/或,SEQ ID NO:50所示的VL,SEQ ID NO:44所示的CL或其变体;

[1269] 优选地,所述抗Her3抗体或其抗原结合片段包含:

[1270] SEQ ID NO:51所示的重链,和/或,SEQ ID NO:52所示的轻链;

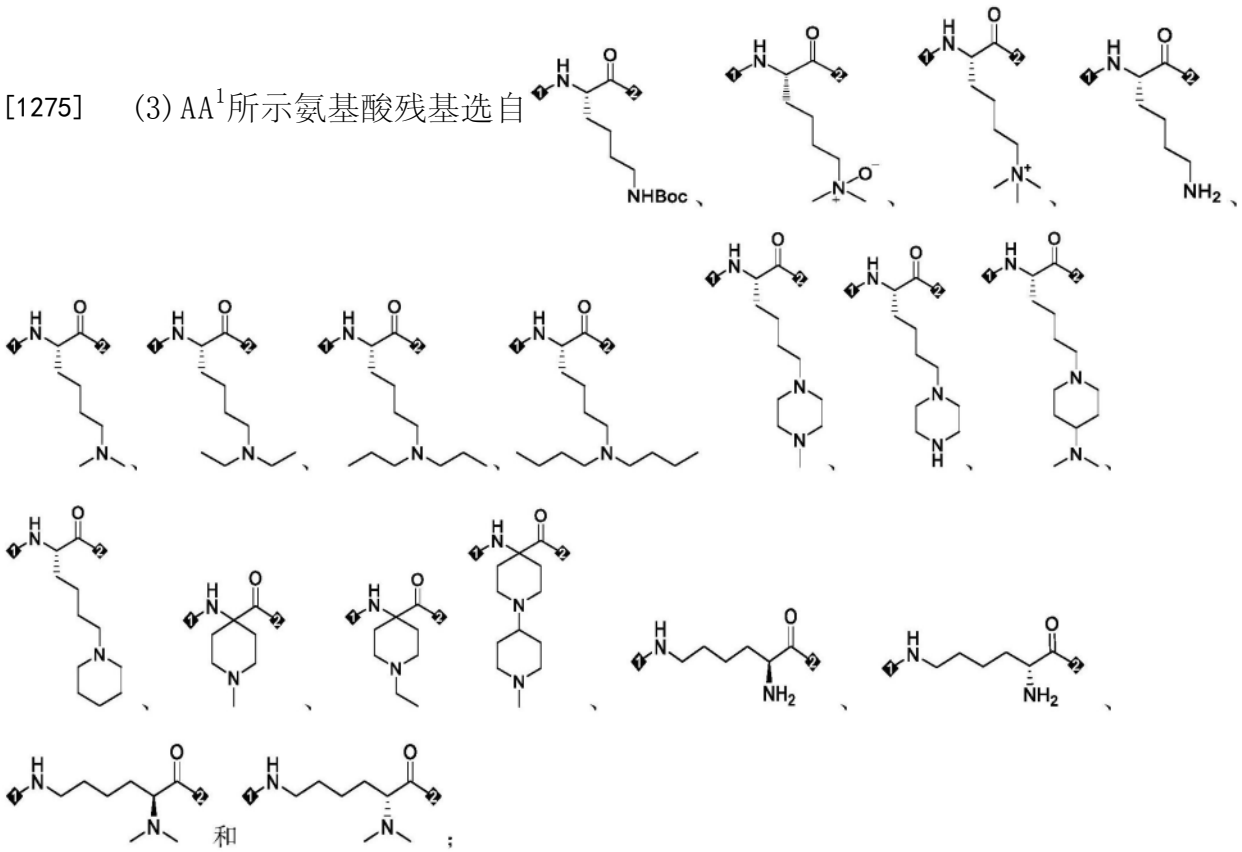
[1271] (2)R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自C1-6烷基中,所述的C1-6烷基选自甲基、乙基和正丙

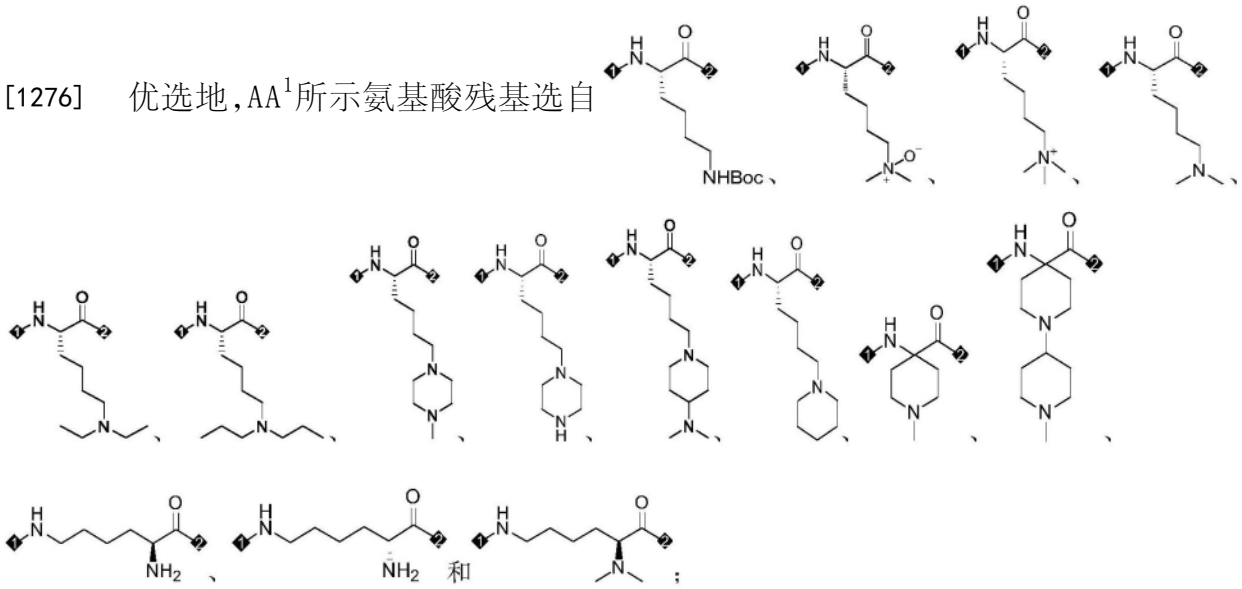
基;或R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自C2-6烷基中,所述的C2-6烷基选自乙基和正丙基。

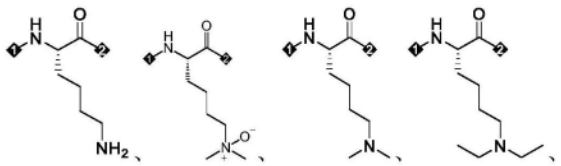
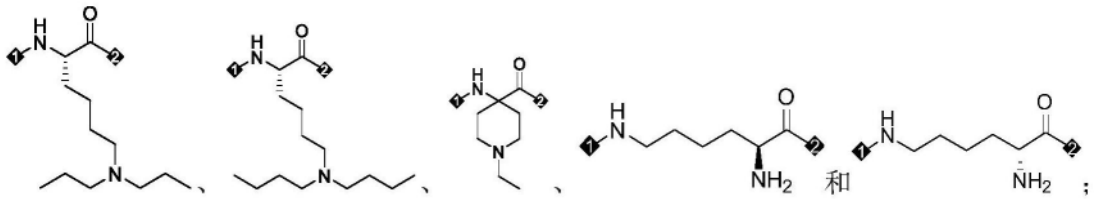
[1272] 10.如实施方案1-9中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其满足如下条件中的一个或多个:

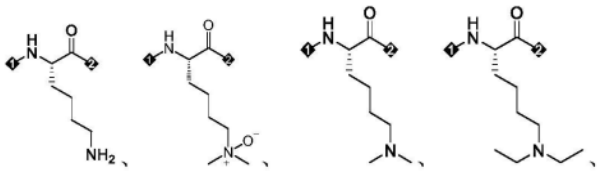
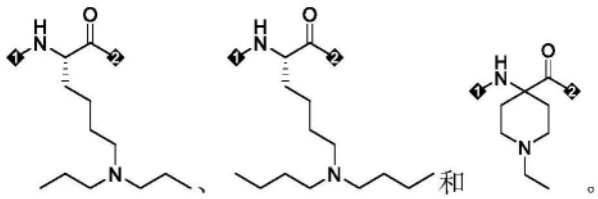
[1273] (1)Tb为抗体或其抗原结合片段、所述抗体或其抗原结合片段包括单链抗体时,所述的单链抗体为scFv;

[1274] (2)Tb为具有内吞活性的抗体或其抗原结合片段;

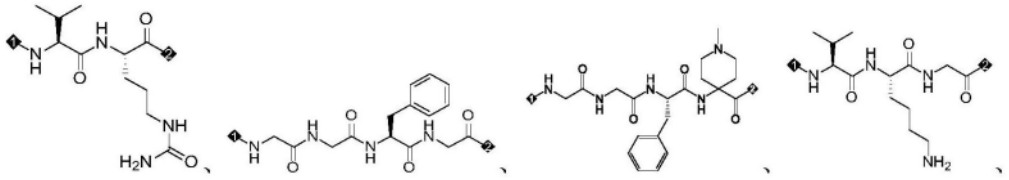
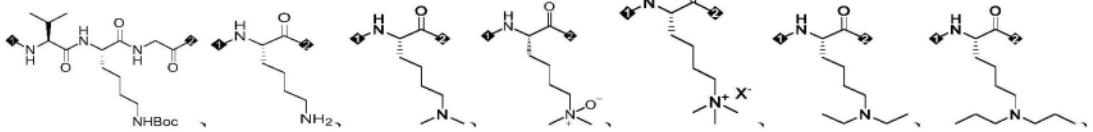
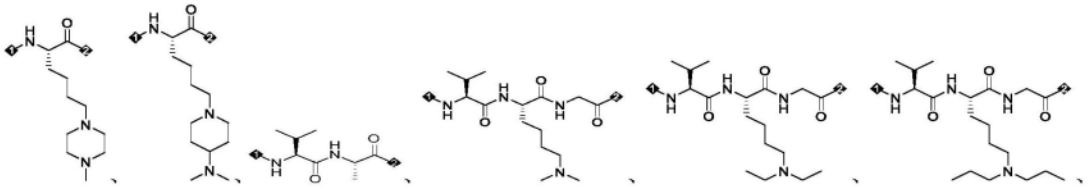
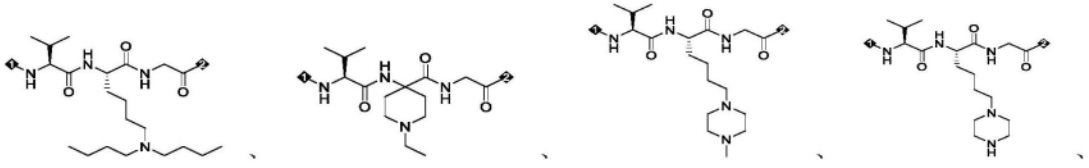
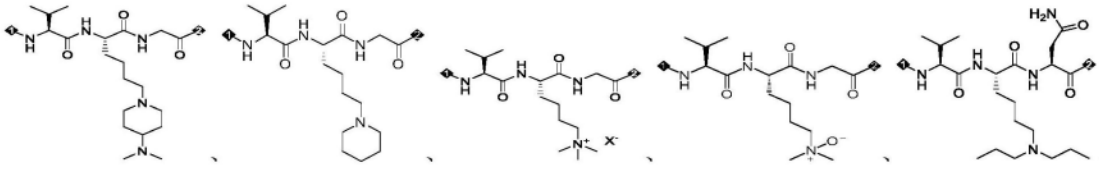
[1275] (3)AA^1所示氨基酸残基选自  和;

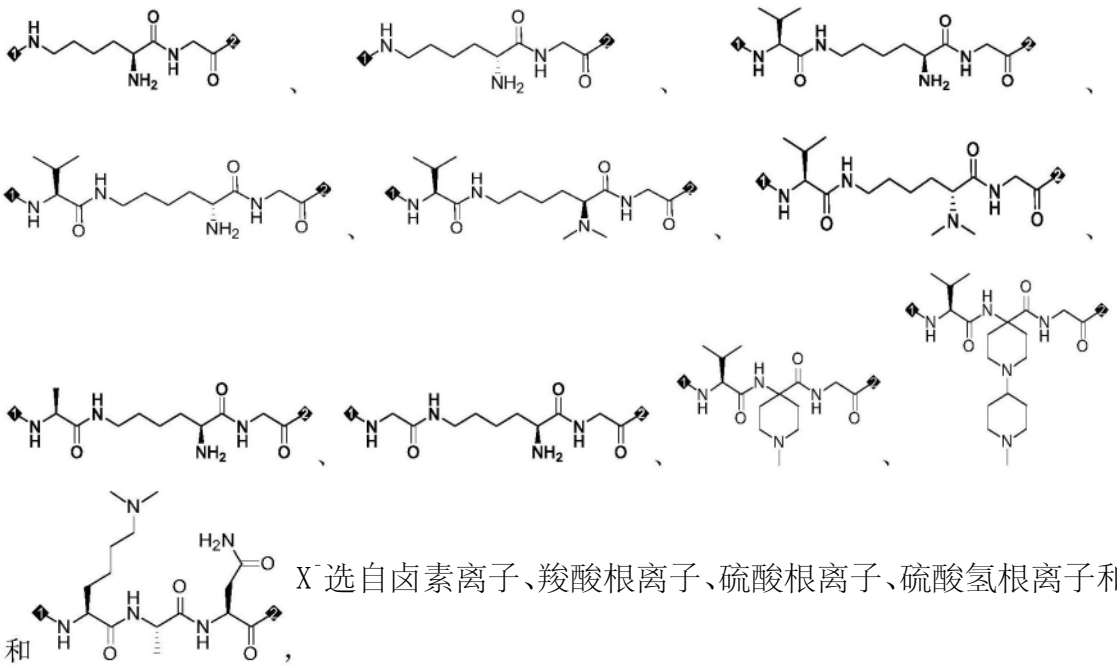
[1276] 优选地,AA^1所示氨基酸残基选自  和;

[1277] 进一步优选地，AA^1所示氨基酸残基选自   和 ；

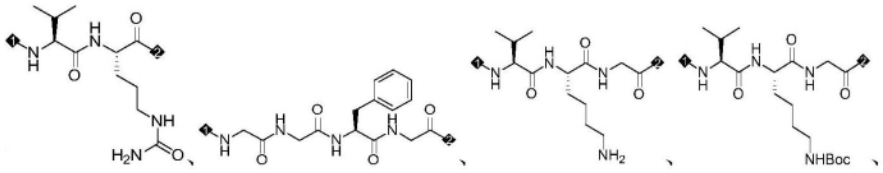
[1278] 最优选地，AA^1所示氨基酸残基选自   和 。

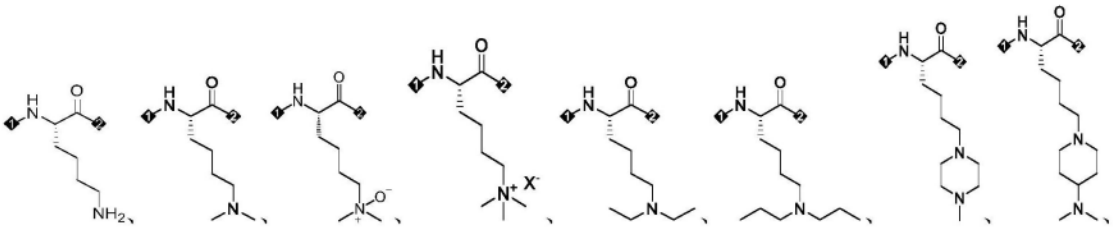
[1279] 11.如实施方案1-10中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

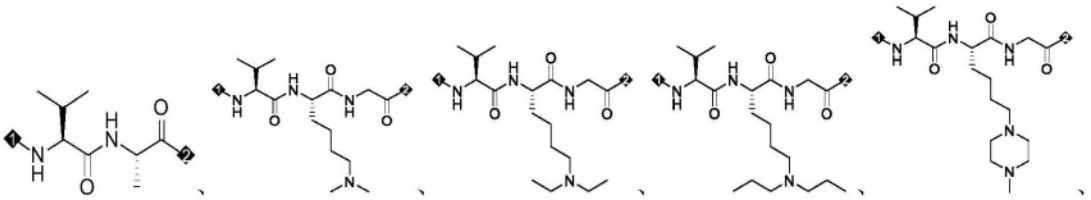
[1280] L_3选自     

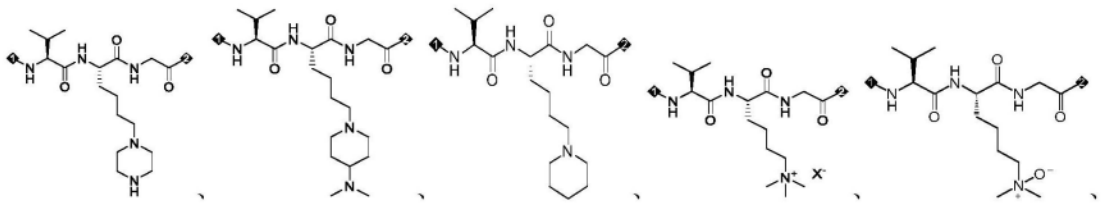


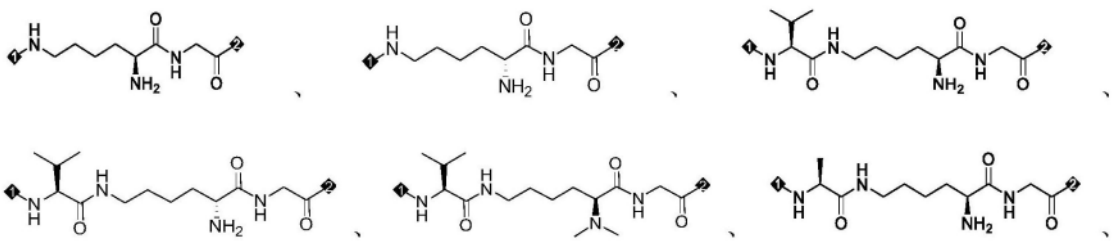
和 ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或D相连；

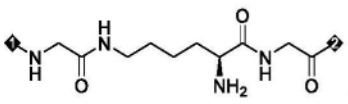
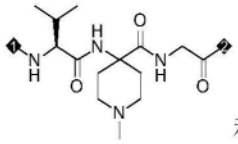
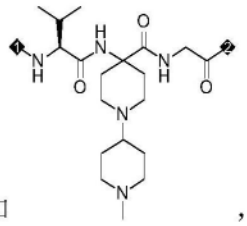
[1281] 优选地，L_3选自 

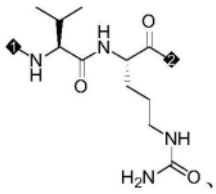
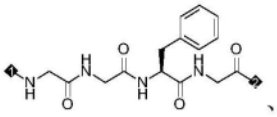
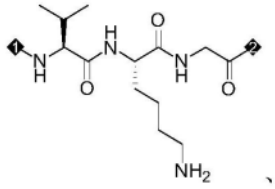
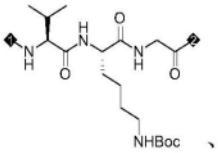
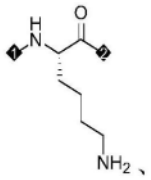
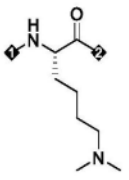
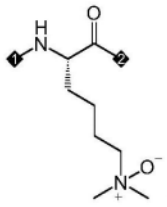
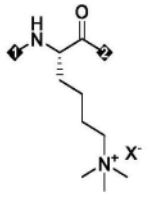
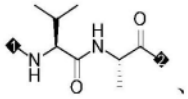
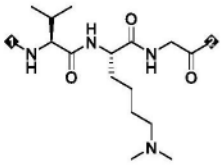
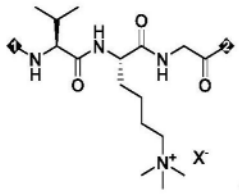
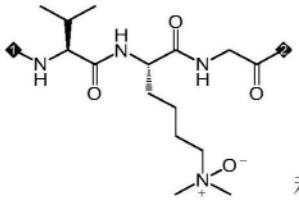
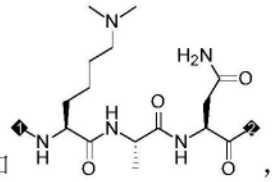
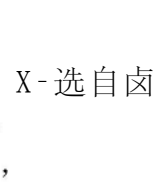


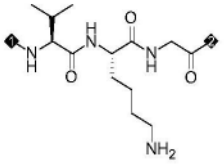
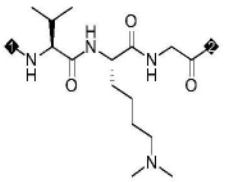
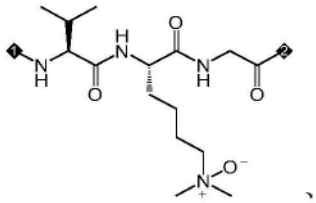
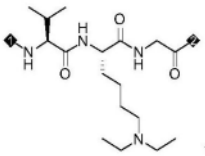
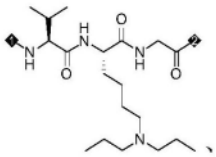
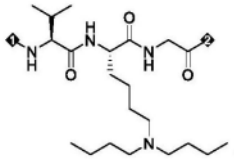
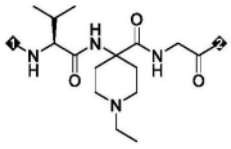
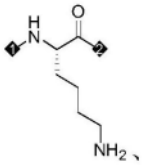
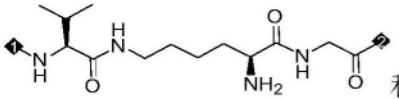
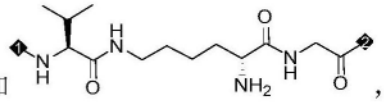


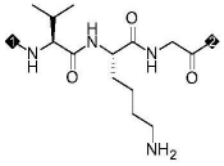
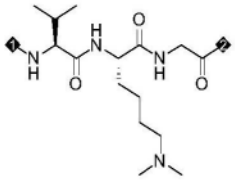
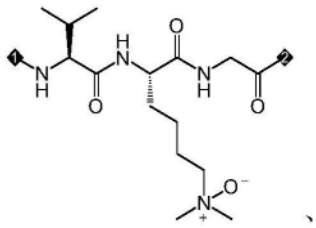


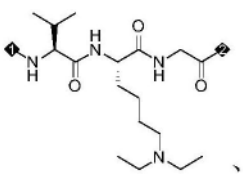
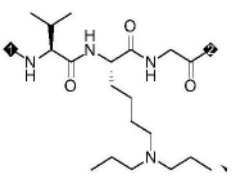
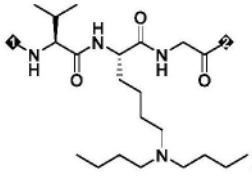
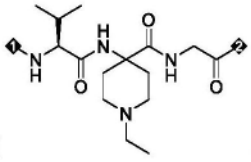


 、  和  ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或D相连；

[1282] 进一步优选地，L_3选自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或D相连；

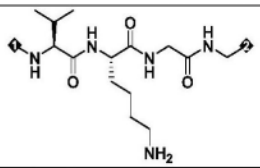
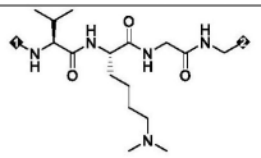
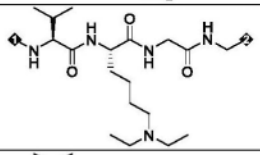
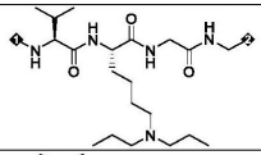
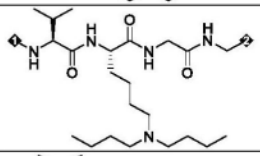
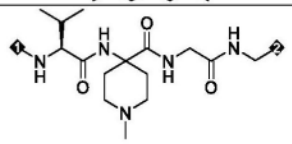
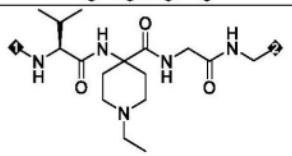
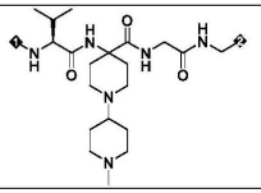
[1283] 还优选地，L_3选自  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或D相连；

[1284] 最优选地，L_3选自  、  、  、

 、  、  和  ，1位与L_1或L_2相连，2位与L_4或D相连；

[1285] 例如❶—L_3—L_4—❷的结构选自以下结构片段：

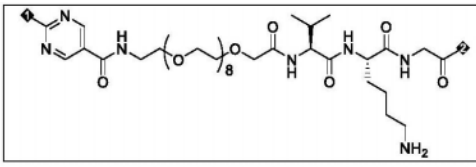
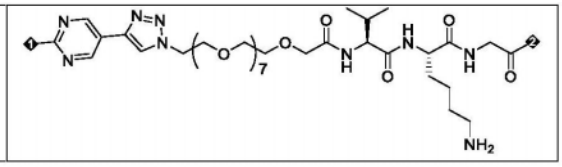
[1286]

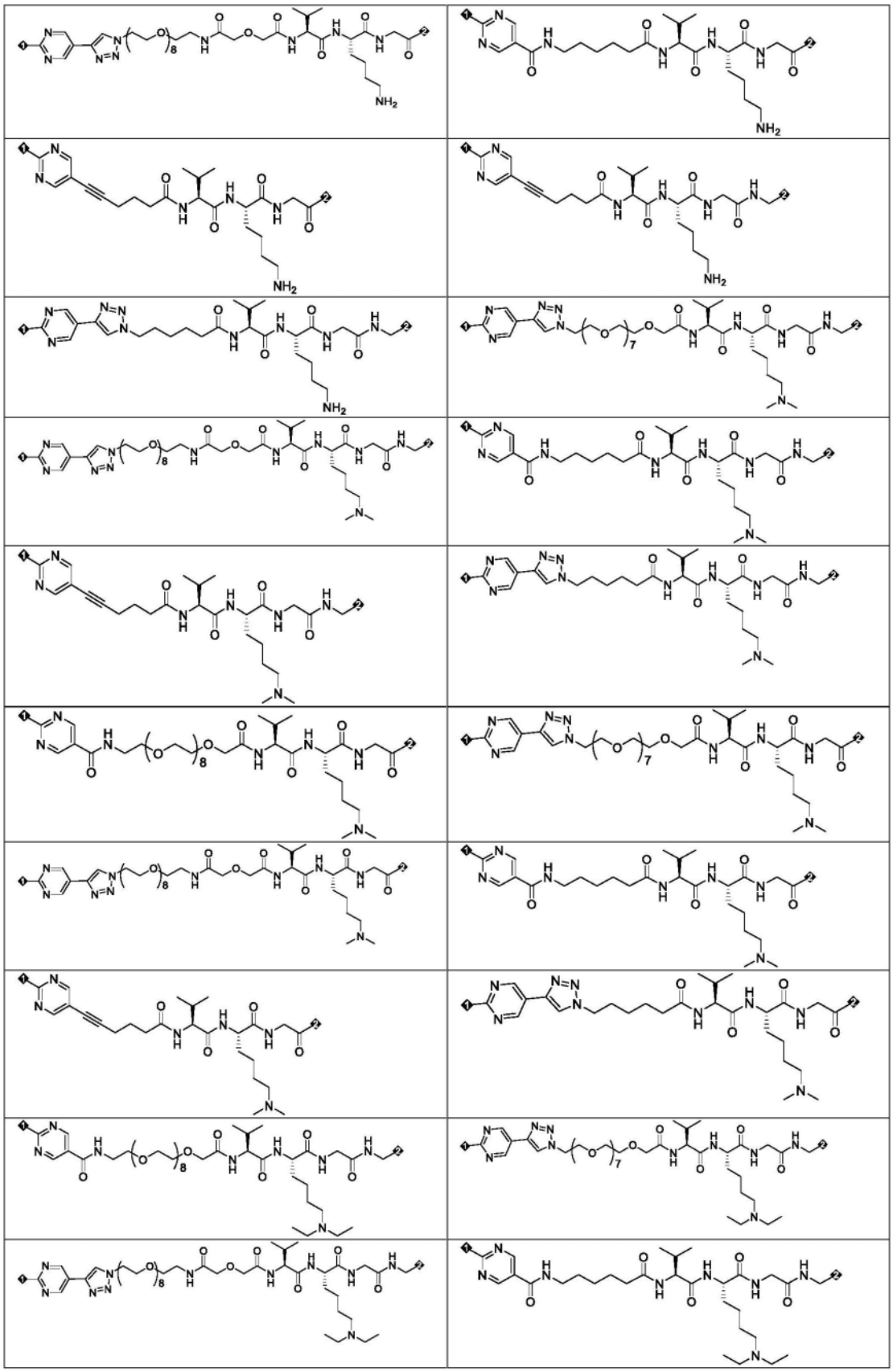
[1287] 12.如实施方案1-11中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

[1288] 其中❶—L_1—L_2—L_3—L_4—❷的结构选自以下：

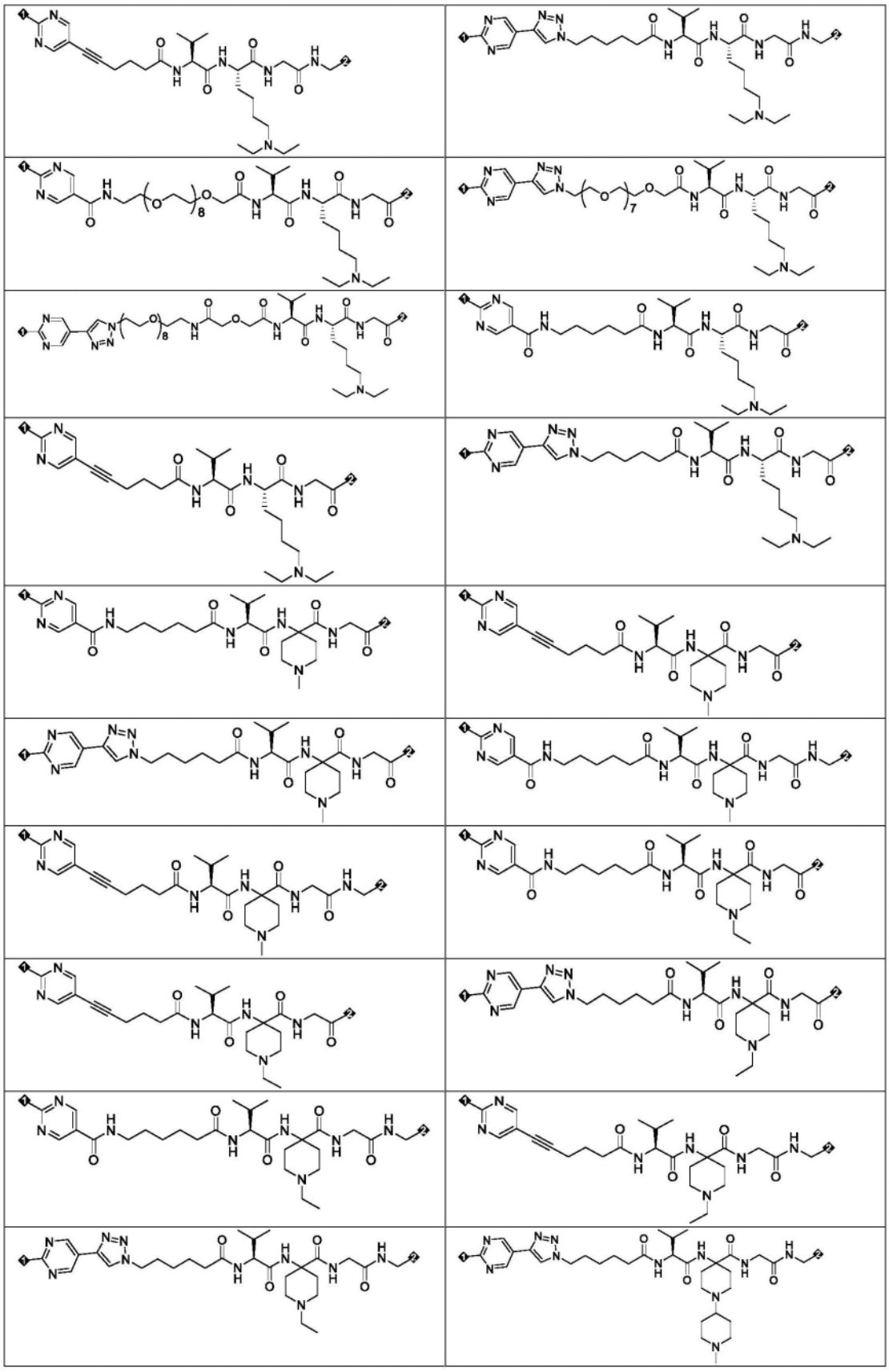
[1289]

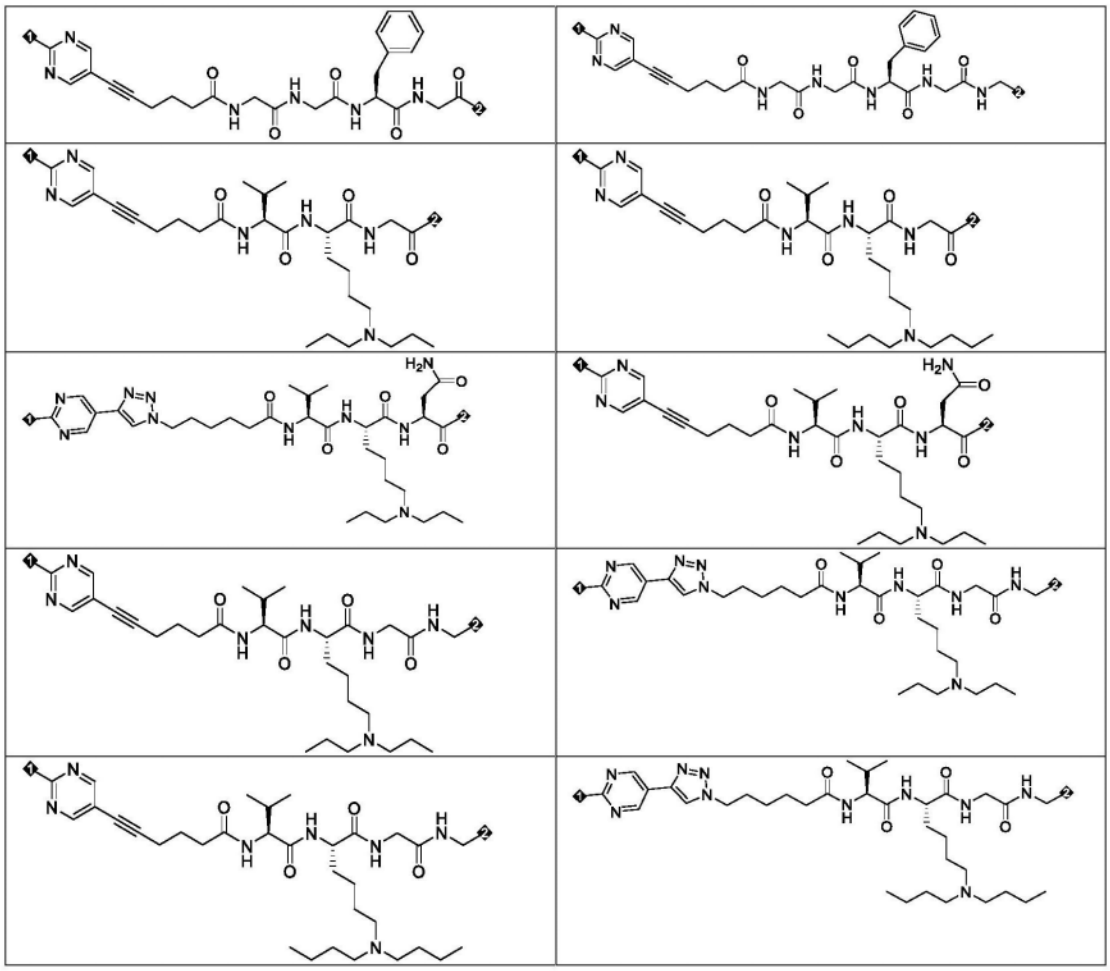
	

[1290]



[1291]

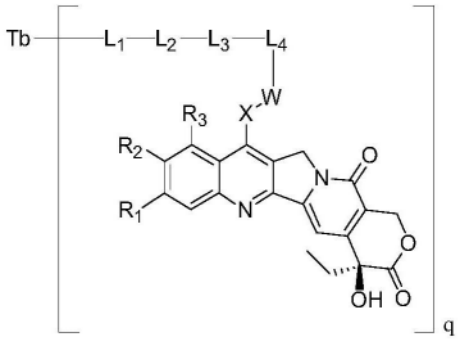


[1292] 

[1293] 其中,1位与Tb相连,2位与D相连。

[1294] 13.如实施方案1-12中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,

[1295] 其中,所述配体药物偶联物具有式I所式结构:

[1296] 

式I

[1297] 其中:Tb、L1、L2、L3、L4和q的定义如实施方案1-12中任一项所述;

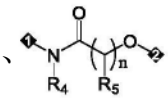
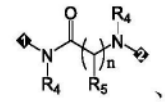
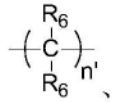
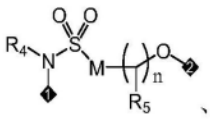
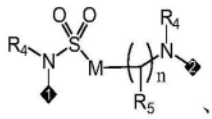
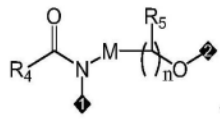
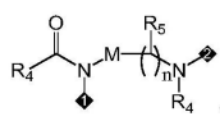
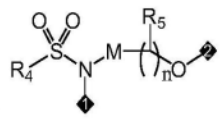
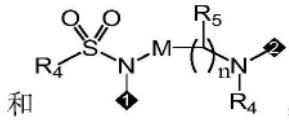
[1298] R_1、R_2各自独立地选自H、卤素、-OH、任选取代的C1-6烷基和任选取代的C1-6烷氧基,或者,

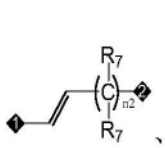
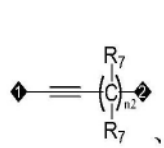
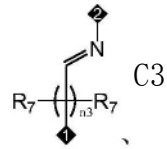
[1299] R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

[1300] R_3选自H、卤素、-OH、-NH_2、任选取代的C1-6烷基和任选取代的C1-6烷氧基,或者,

[1301] R_3和X和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合,或者,

[1302] R_3和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-7元碳环或5-7元杂环,所述杂环含有1个或多个O,S,N,羰基,亚砜基或砜基或其任意组合;

[1303] W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  、  、  和,1位与X相连,2位与L_4或L_3相连;

[1304] X选自直接键,任选取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-NR_4-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$-、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C3-6环烷基、C6-10芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基,1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基选自一个或多个C1-4烷基、C3-6环烷基,或者多个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基;

[1305] 各M独立地选自直接键和-$CR^{5a}R^{5b}$-;

[1306] R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R_7各自独立地选自H、任选取代的C1-4烷基、任选取代的C1-4烷氧基和任选取代的C3-6环烷基;

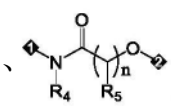
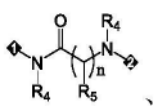
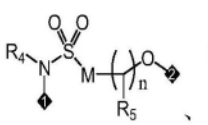
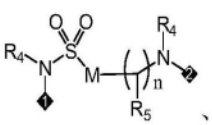
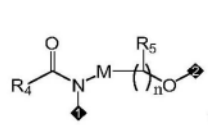
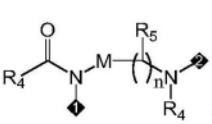
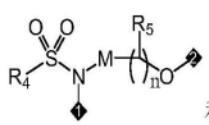
[1307] n、n'、n1、n2、n3各自独立地选自0到6之间的任意整数;

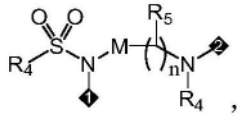
[1308] 1位与喜树碱母核相连,2位与W或L_4相连。

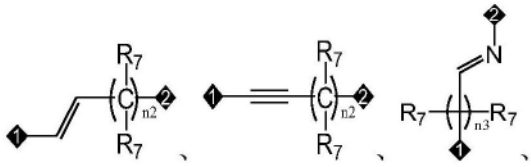
[1309] 14.如实施方案13所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其满足如下条件中的一个或多个:

[1310] (1)R_1、R_2各自独立地选自H、卤素、C1-4烷基;或者,R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成5-6元杂环,所述杂环含有1个、2个或3个O,S或N或其任意组合;

[1311] (2)R_3选自H、C1-4烷基;或,R_3和X和与其相连的碳原子一起形成5-6元碳环;

[1312] (3)W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  和


1位与X相连,2位与L_4或L_3相连;

[1313] (4)X选自任选取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  C6-10芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基,1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基选自1个或2个C1-4烷基,或者2个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基;

[1314] (5)R_4、R_5各自独立地选自H、C1-4烷基和C3-6环烷基;

[1315] (6)R^{5a}、R^{5b}各自独立地选自H和C1-4烷基;

[1316] (7)各R_7独立地选自H和C1-4烷基;

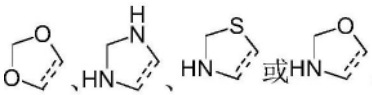
[1317] (8)n选自1、2和3;

[1318] (9)n1选自1、2、3和4;

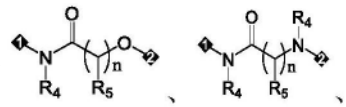
[1319] (10)n2为1;

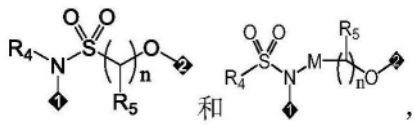
[1320] (10)n3为0。

[1321] 15.如实施方案13或14所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其满足如下条件中的一个或多个:

[1322] (1)R_1选自H和卤素,R_2选自H和C1-4烷基;或,R_1和R_2和与其相连的碳原子形成  ,虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置;

[1323] (2)R_3为H;或,R_3和X和与其相连的碳原子一起形成  ,虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置;

[1324] (3)W不存在或存在,W存在时,W选自-O-、-S-、-NR_4-、  、

 和,1位与X相连,2位与L_4或L_3相连;

[1325] (4)各R_4独立地选自H、C1-4烷基和C3-6环烷基,R_5为H;

[1326] (5)R^{5a}、R^{5b}各自独立地选自H和甲基;

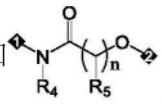
[1327] (6)R_7为H;

[1328] (7)n为1。

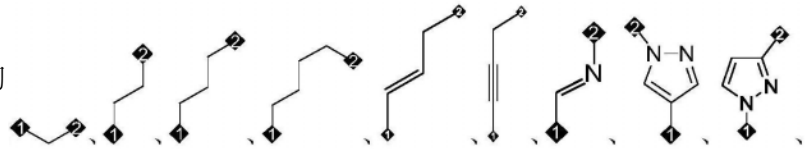
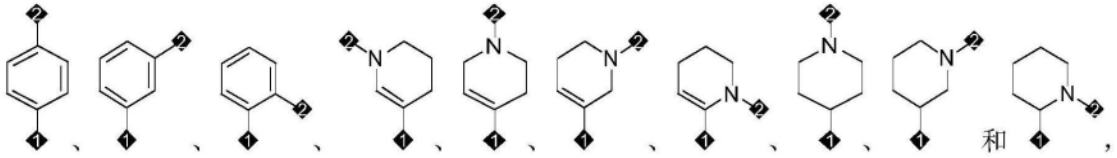
[1329] 16.如实施方案13-15中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其满足如下条件中的一个或多个:

[1330] (1)R_1为H或F,R_2为H或甲基;或,R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  ,虚线表

示所述杂环与苯环稠合的位置;

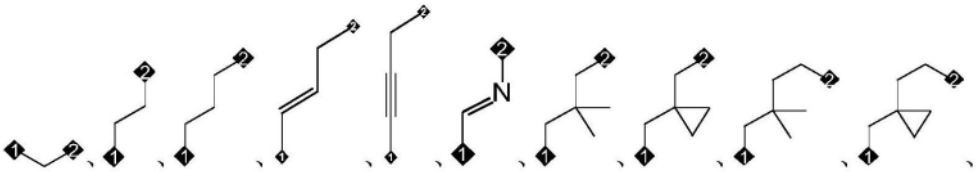
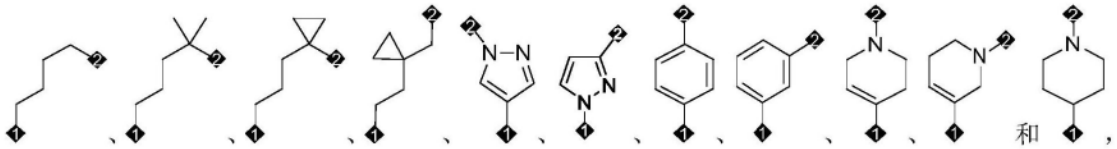
[1331] (2)W选自-O-、-NR_4-和  ，1位X相连,2位与L_4或L_3相连;

[1332] (3)各R_4独立地选自H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基和环丙基,R_5为H;

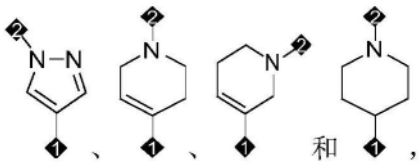
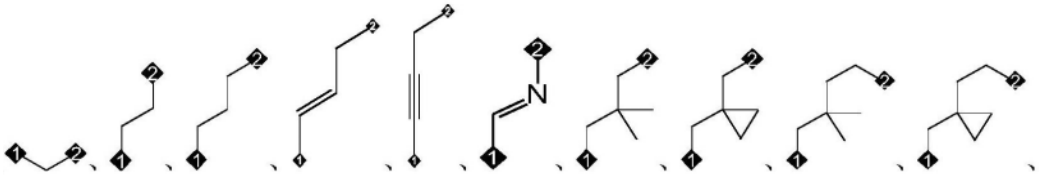
[1333] (4)X选自任选取代的  、  和，1位和母环相连,2位和W或L_4相连;所述取代基选自1个或2个C1-4烷基,或者2个C1-4烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基;所述的C1-4烷基如甲基;所述的C3-6环烷基如环丙基。

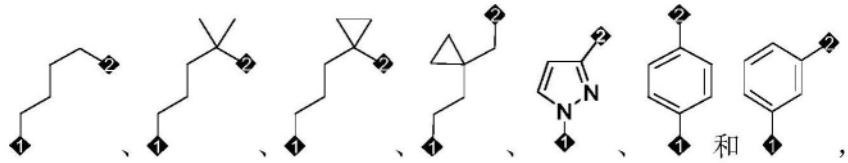
[1334] 17.如实施方案13-16中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,

[1335] (1)W选自-O-和-NR_4-;

[1336] (2)X选自  、  和，1位和母环相连,2位和W或L_4相连。

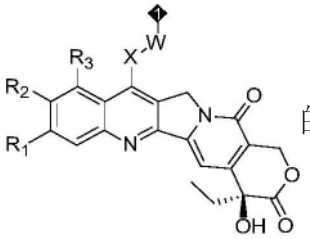
[1337] 18.如实施方案13-17中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,

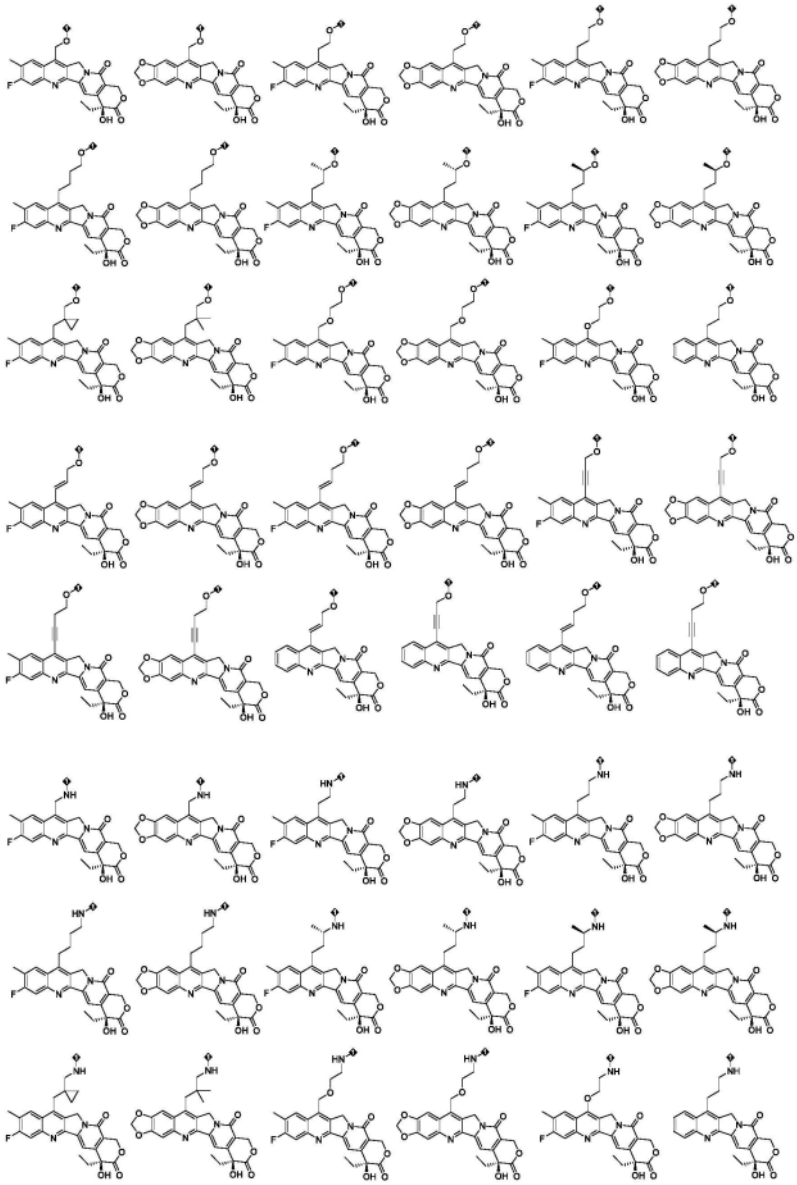
[1338] W不存在时,X选自  和，1位和母环相连,2位和L_4相连;W存在时,X选自 



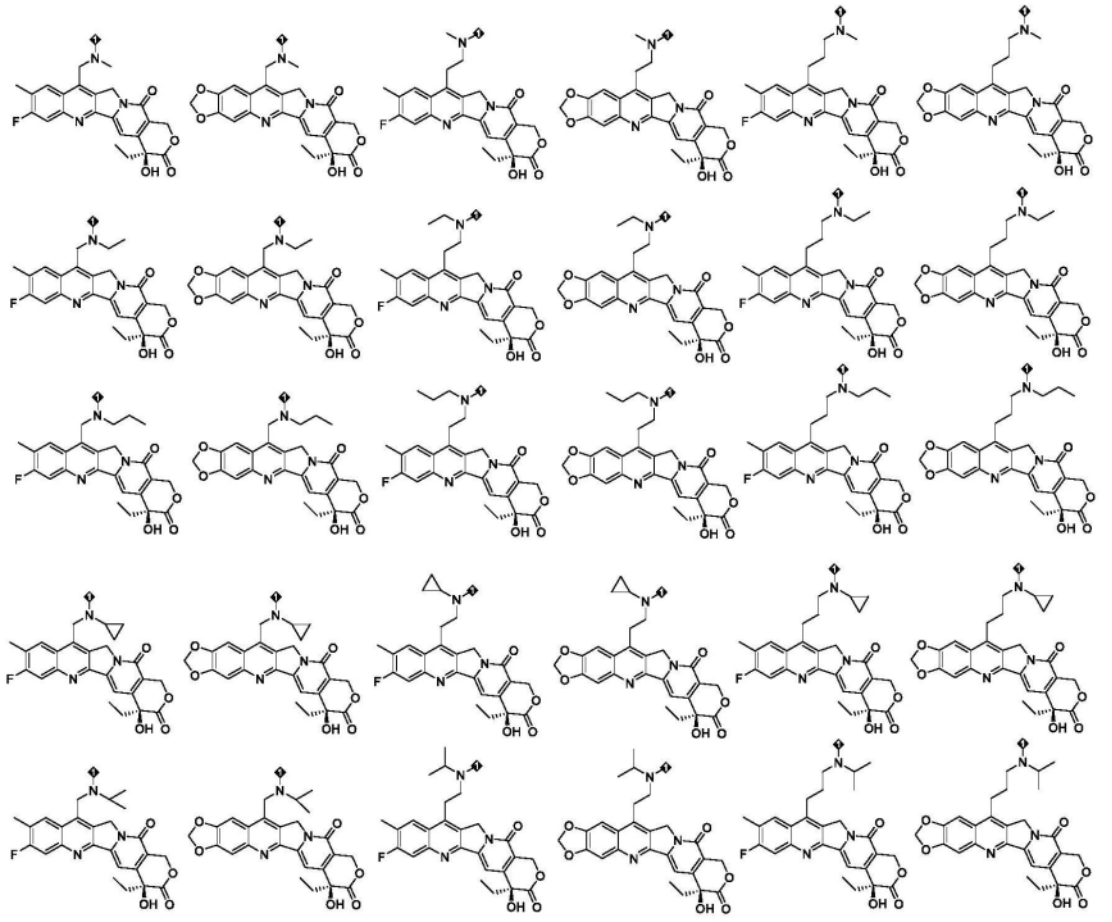
1位和母环相连，2位和W相连。

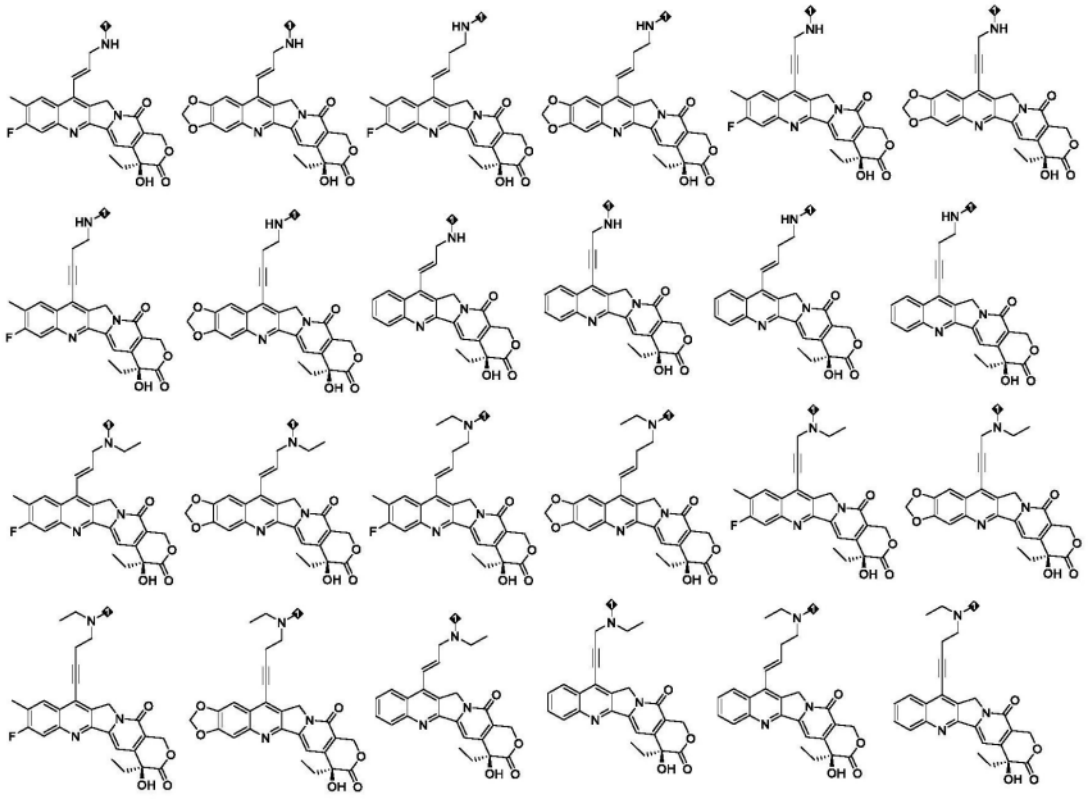
[1339] 19.如实施方案13-18中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

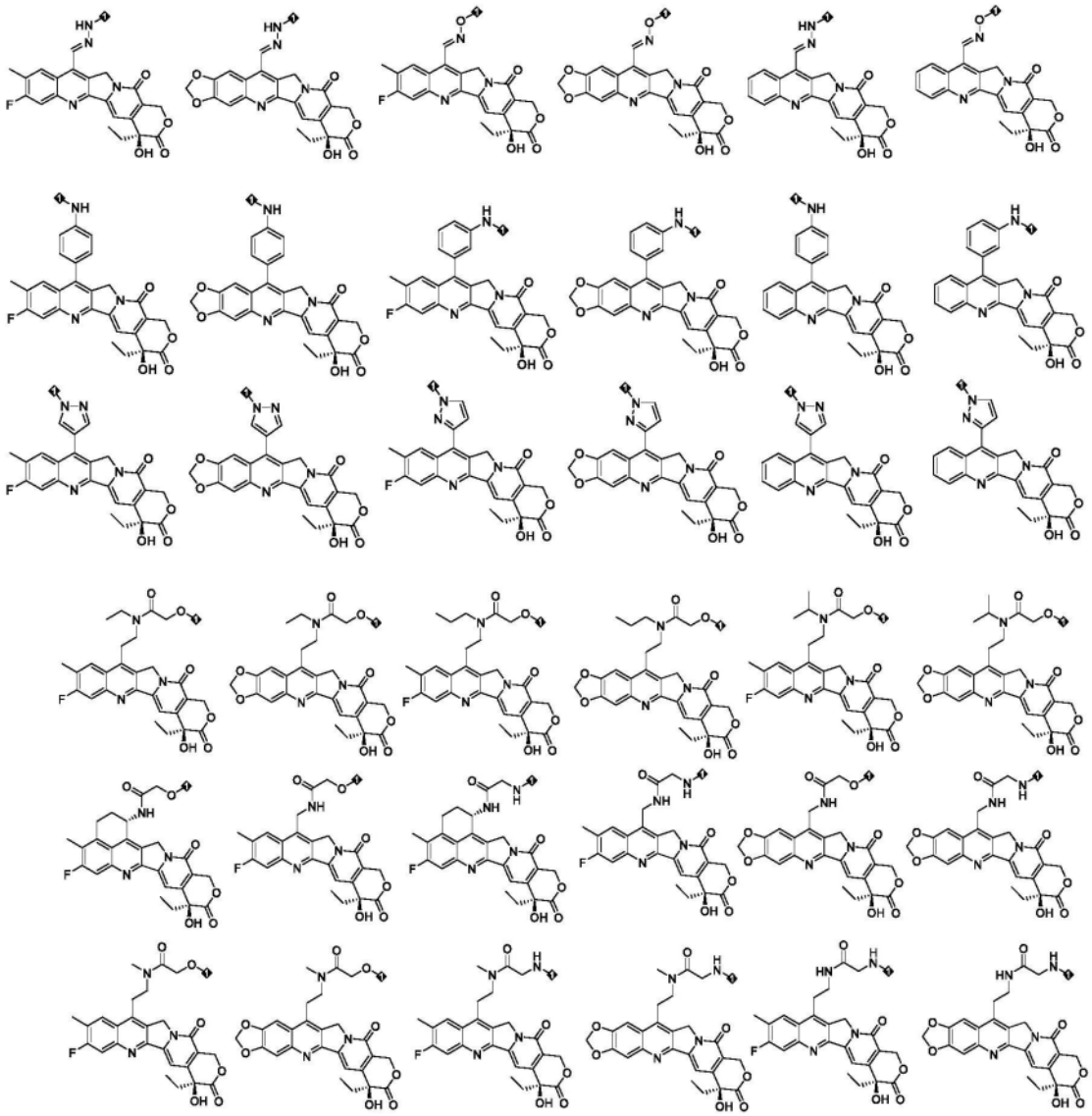
[1340]  的结构选自以下：

[1341] 

[1342]

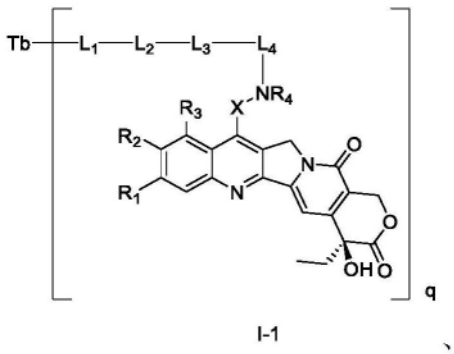




[1343] 

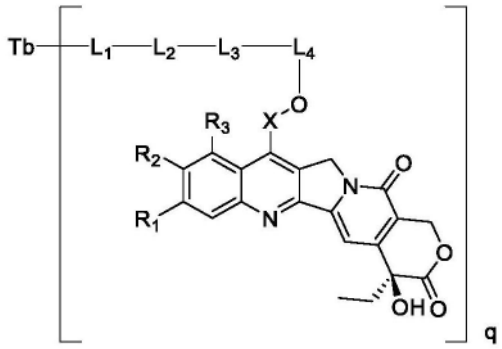
[1344] 其中,1位与L_4相连;当L_4不存在时,1位与L_3相连。

[1345] 20.如实施方案13-19中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,所述的配体药物偶联物具有式I-1、式I-2或式I-3所式结构:

[1346] 

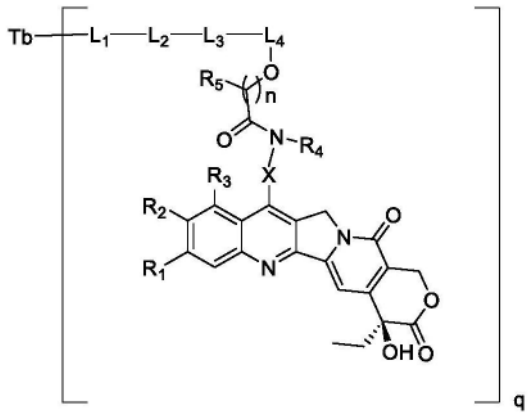
I-1

[1347] 其中,Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q如实施方案13-19中任一项所定义;

[1348] 

I-2

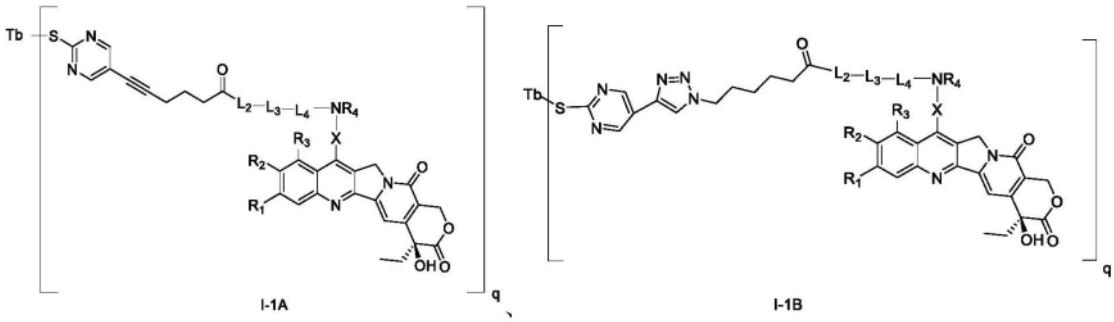
[1349] 其中,Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q如实施方案13-19中任一项所定义;

[1350] 

I-3

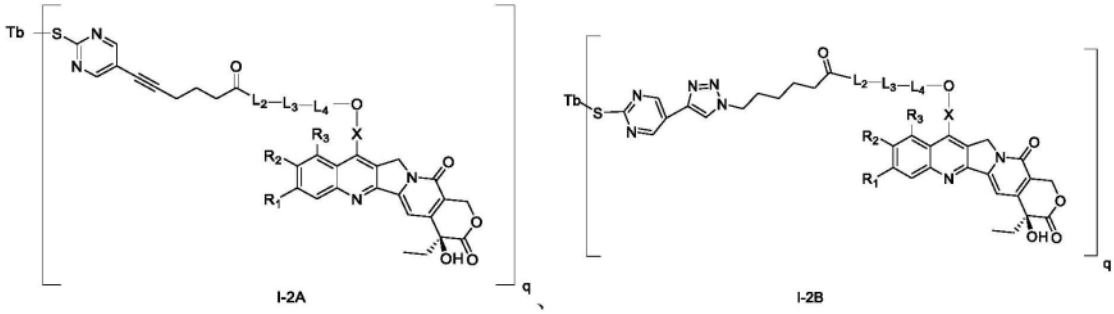
[1351] 其中,Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和q如实施方案13-19中任一项所定义。

[1352] 21.如实施方案13-20中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,所述配体药物偶联物具有式I-1A、式I-1B、式I-2A、式I-2B、式I-3A或式I-3B所式结构:

[1353] 

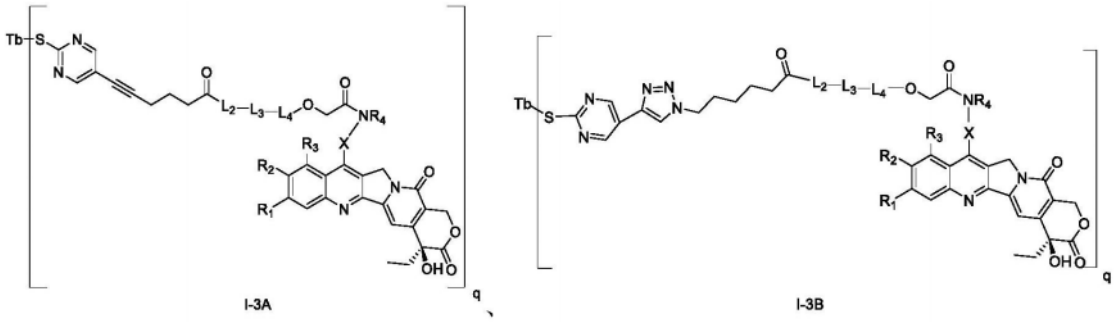
I-1A I-1B

[1354] 其中,Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q如实施方案13-19中任一项所定义;

[1355] 

I-2A I-2B

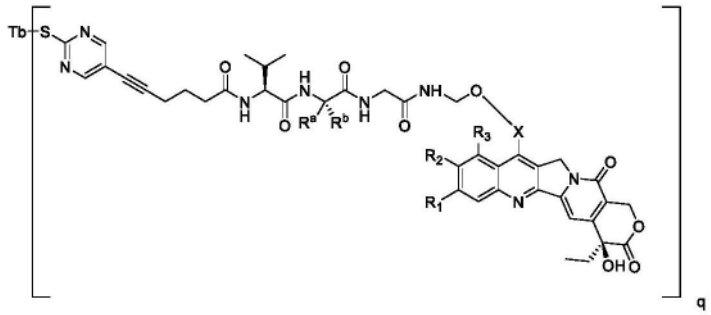
[1356] 其中,Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和q如实施方案13-19中任一项所定义;

[1357] 

I-3A I-3B

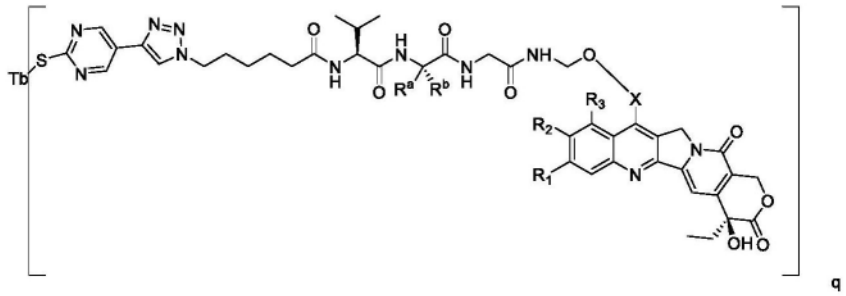
[1358] 其中,Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和q如实施方案13-19中任一项所定义。

[1359] 22.实施方案13-21中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其中,所述的配体药物偶联物具有式I-A或式I-B所式结构:

[1360] 

I-A

[1361] 其中,Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q如实施方案13-19中任一项所定义;

[1362] 

I-B

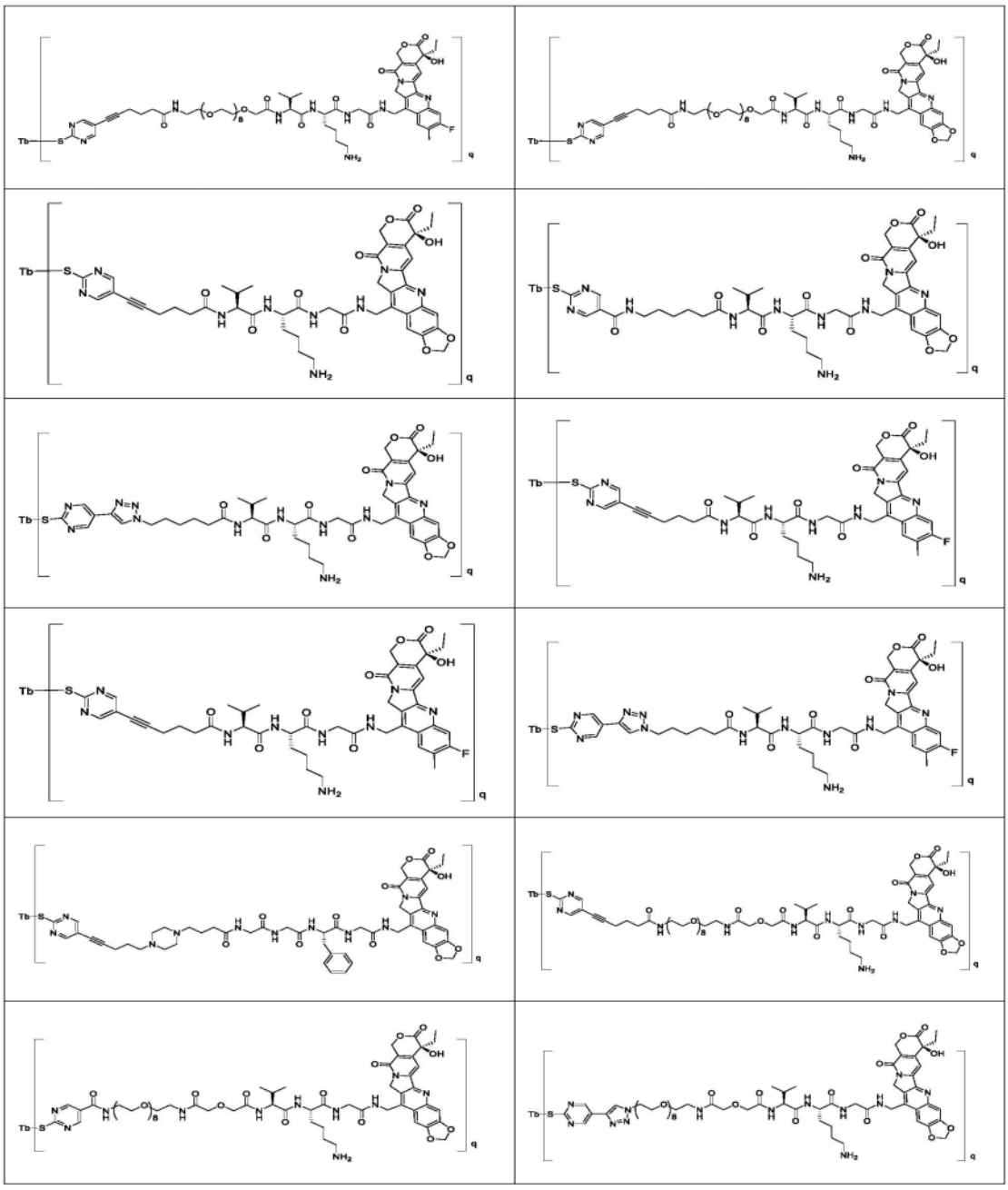
[1363] 其中,Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q如实施方案13-19中任一项所定义。

[1364] 23.实施方案1-22中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其中,所述的配体药物偶联物选自以下:

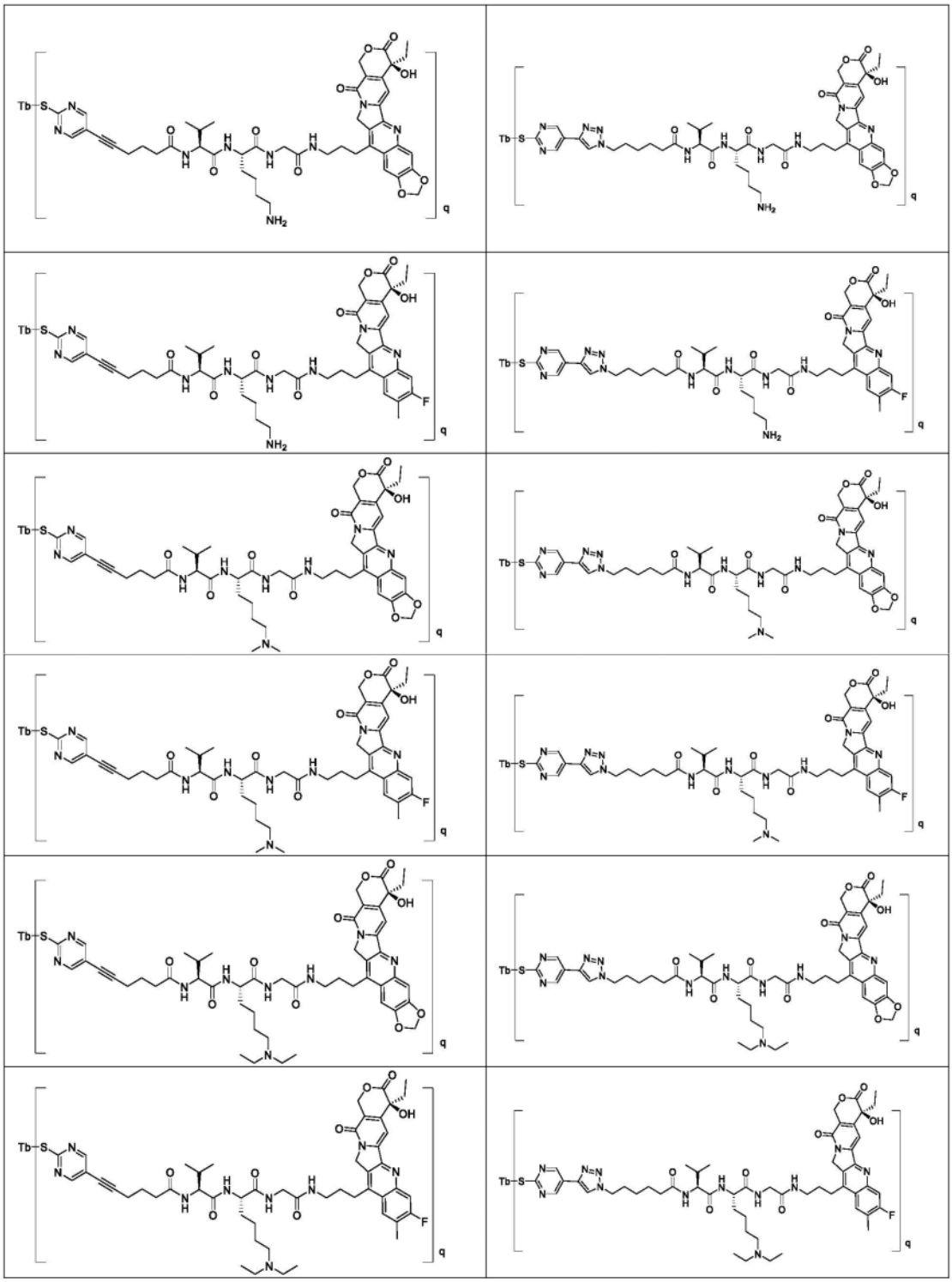
[1365]



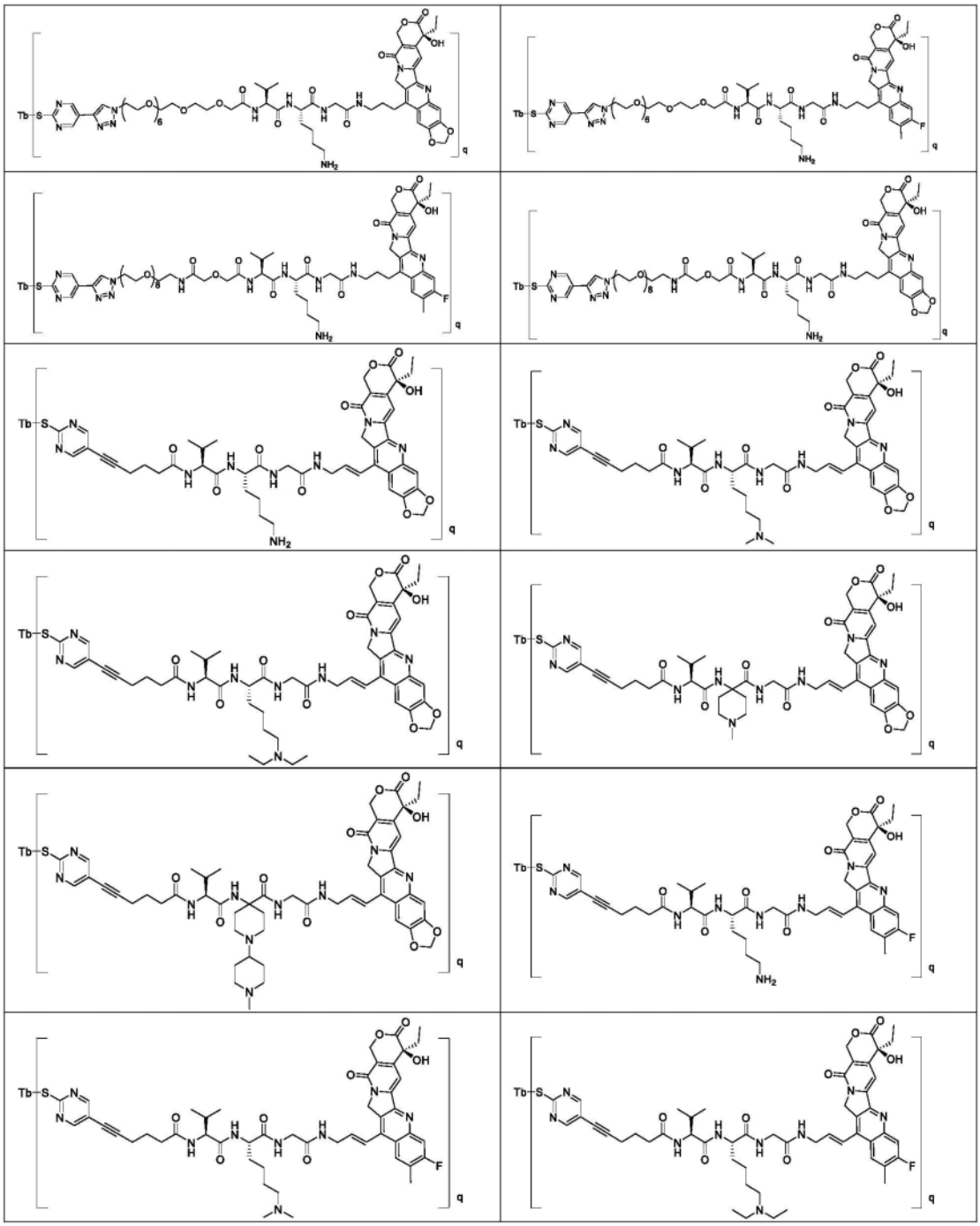
[1366]



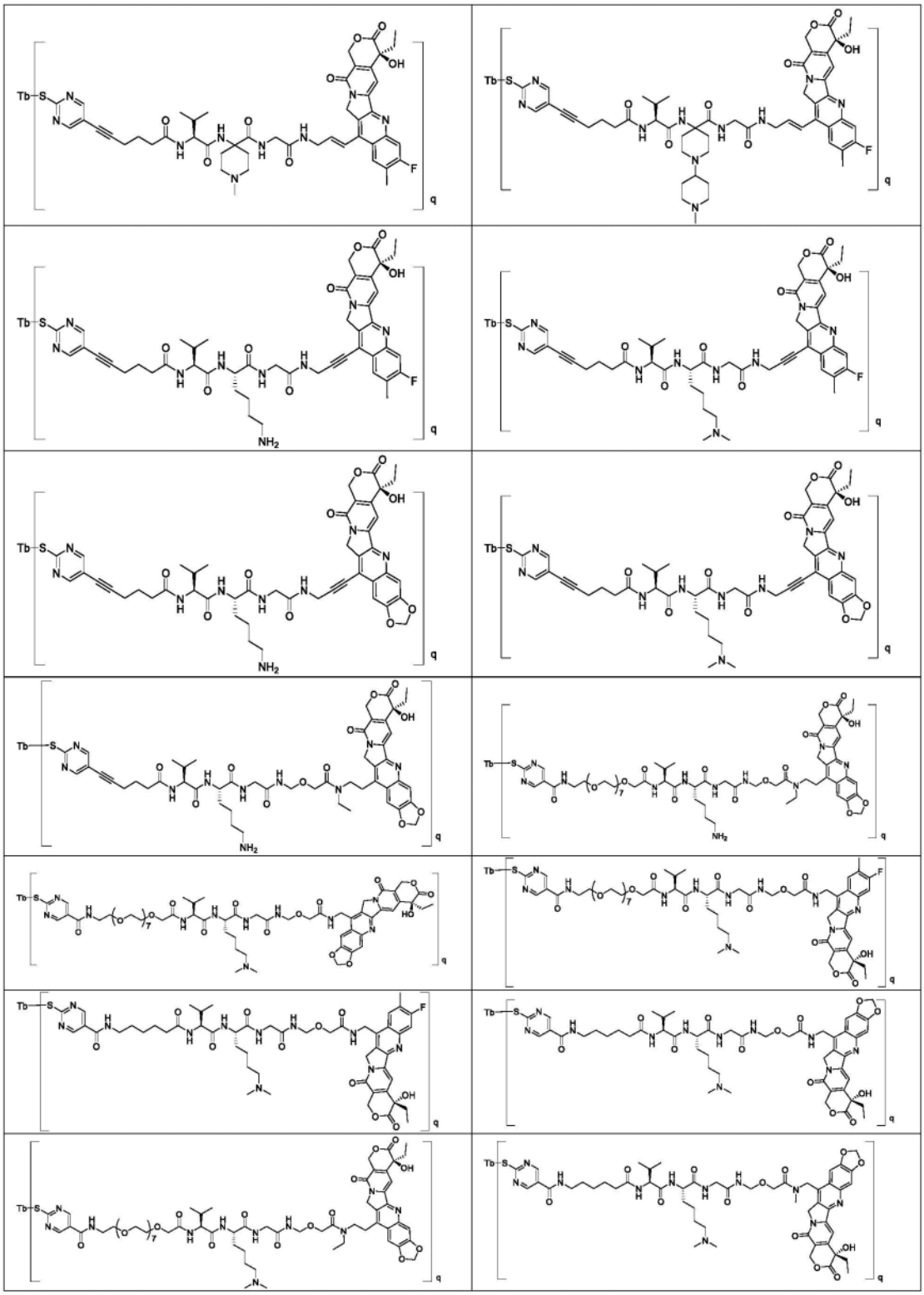
[1367]



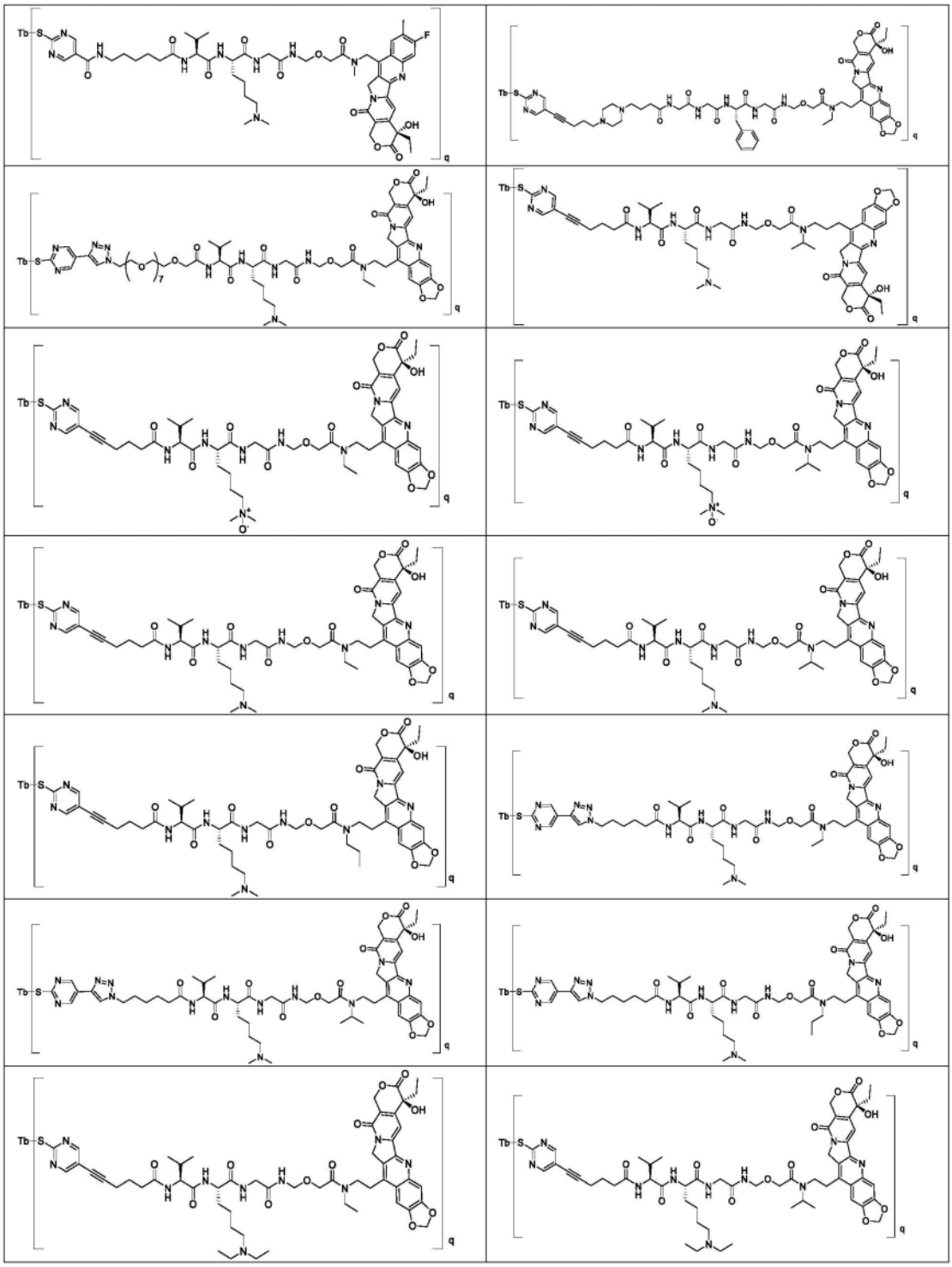
[1368]



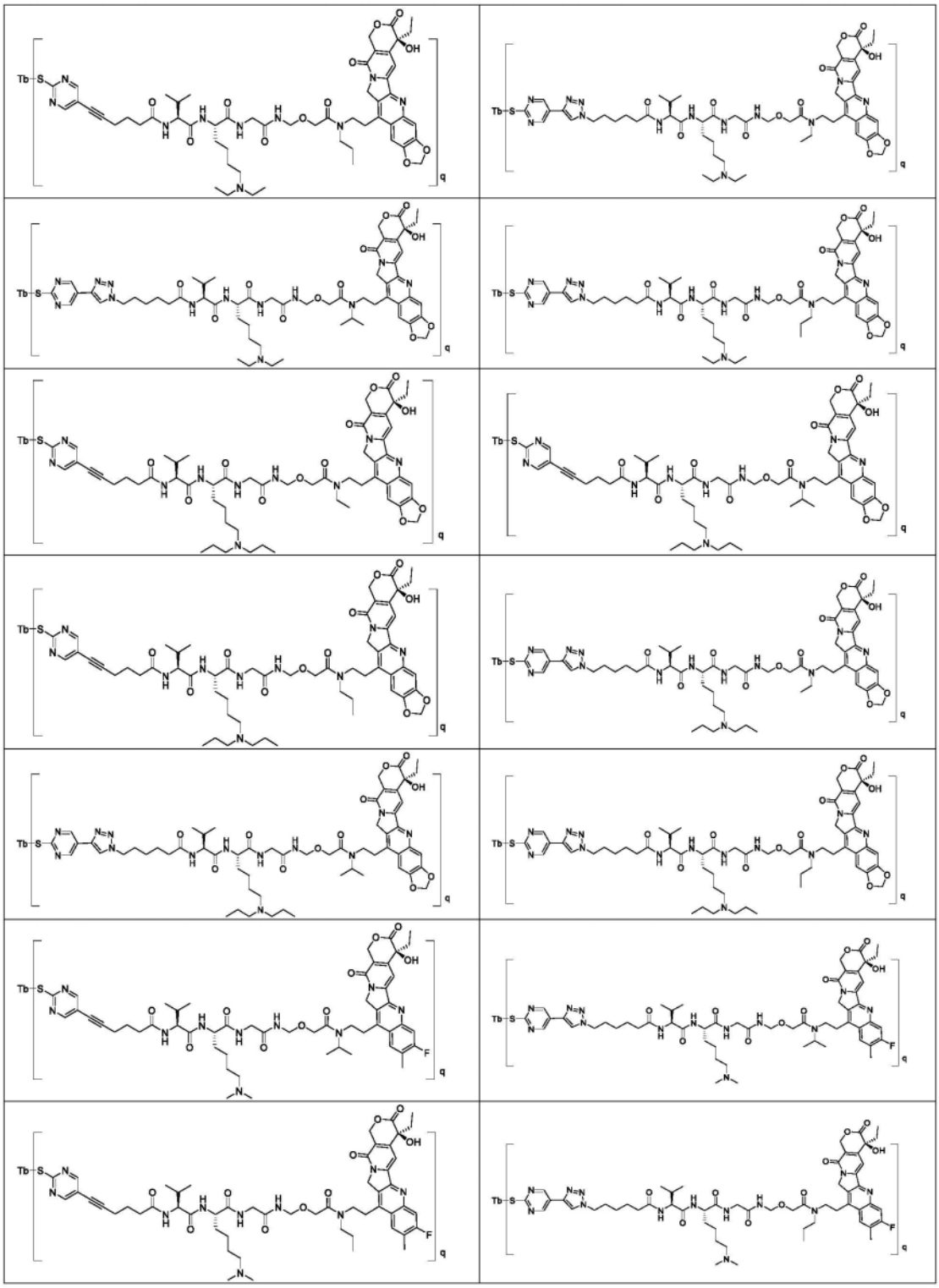
[1369]



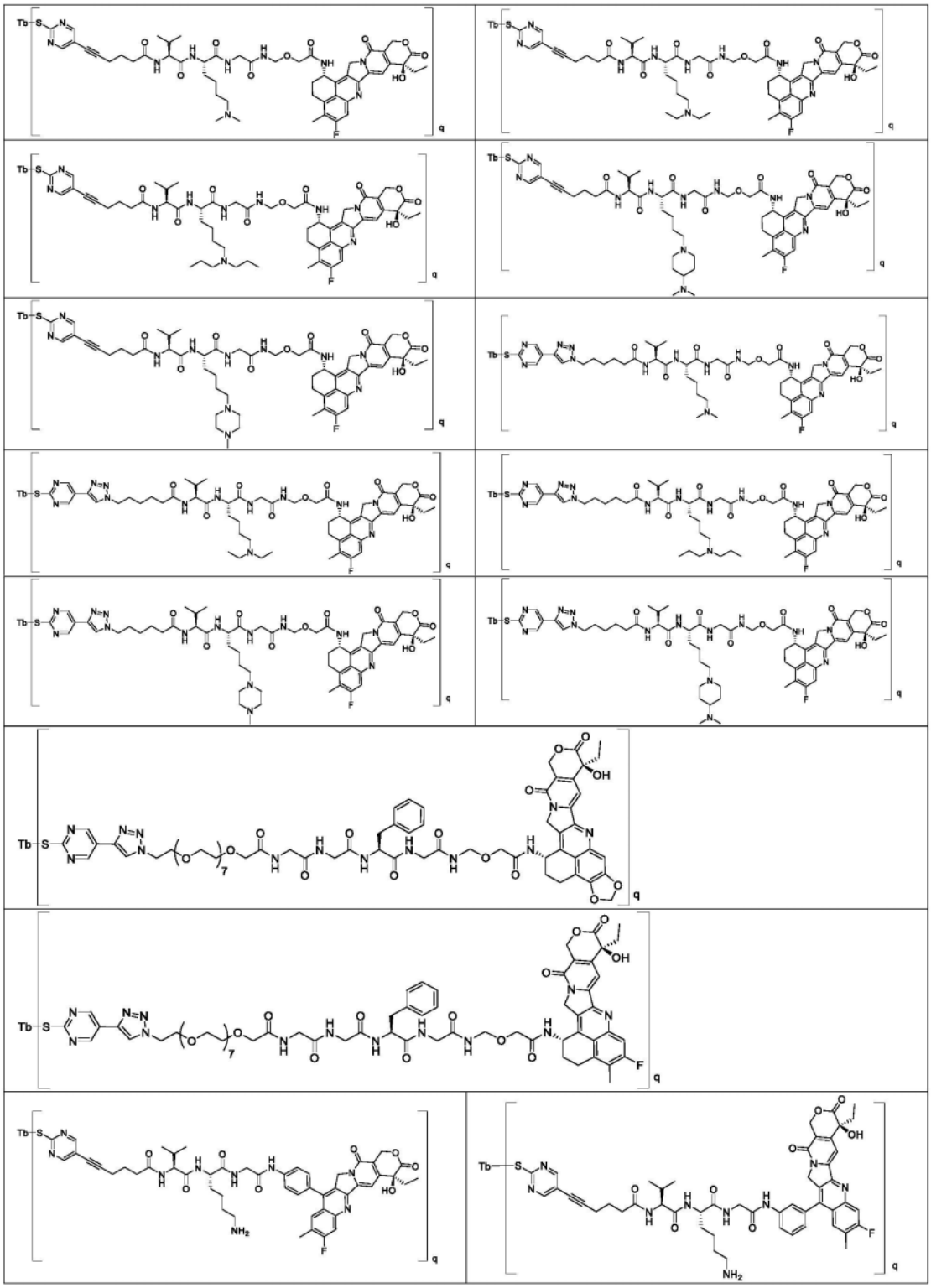
[1370]



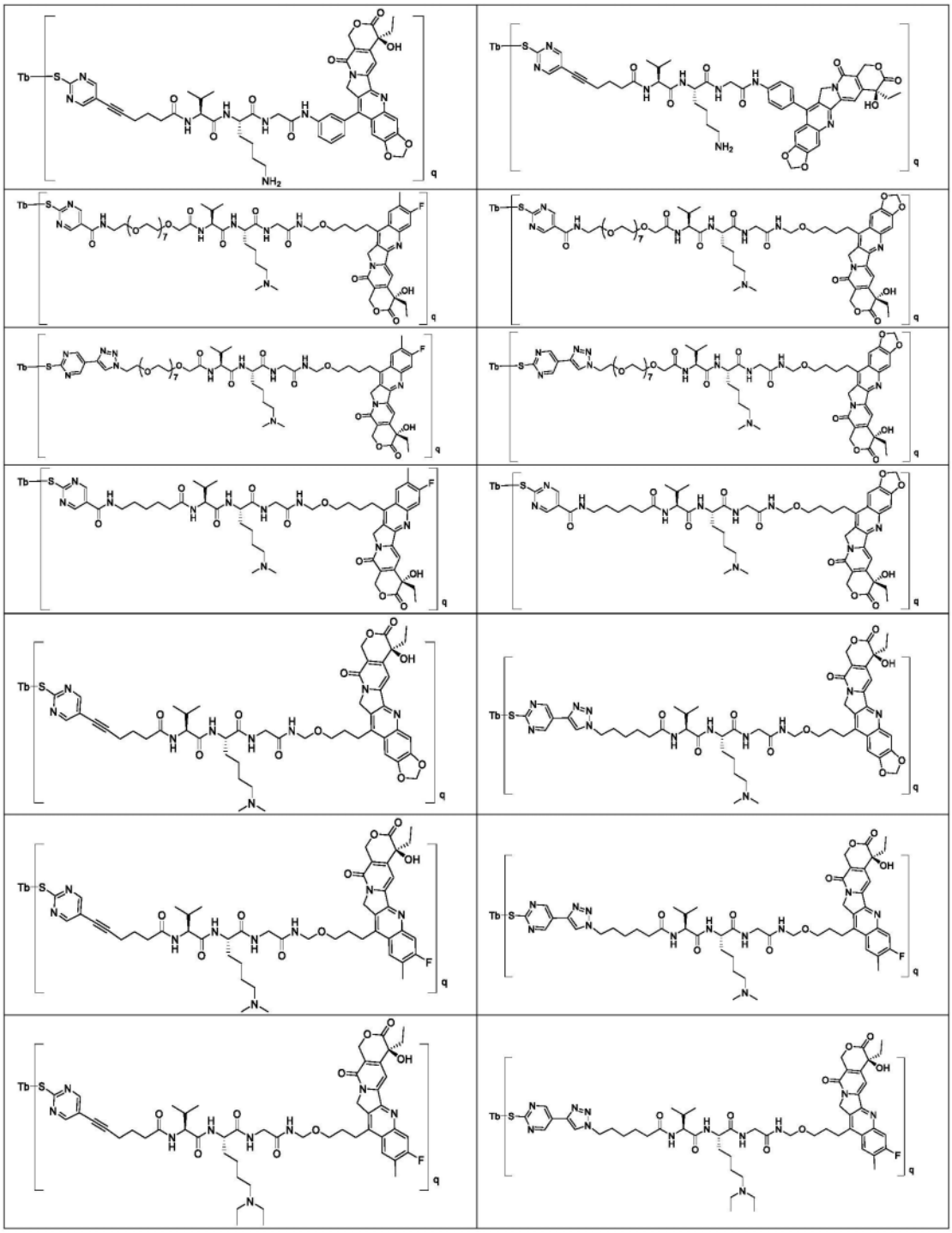
[1371]



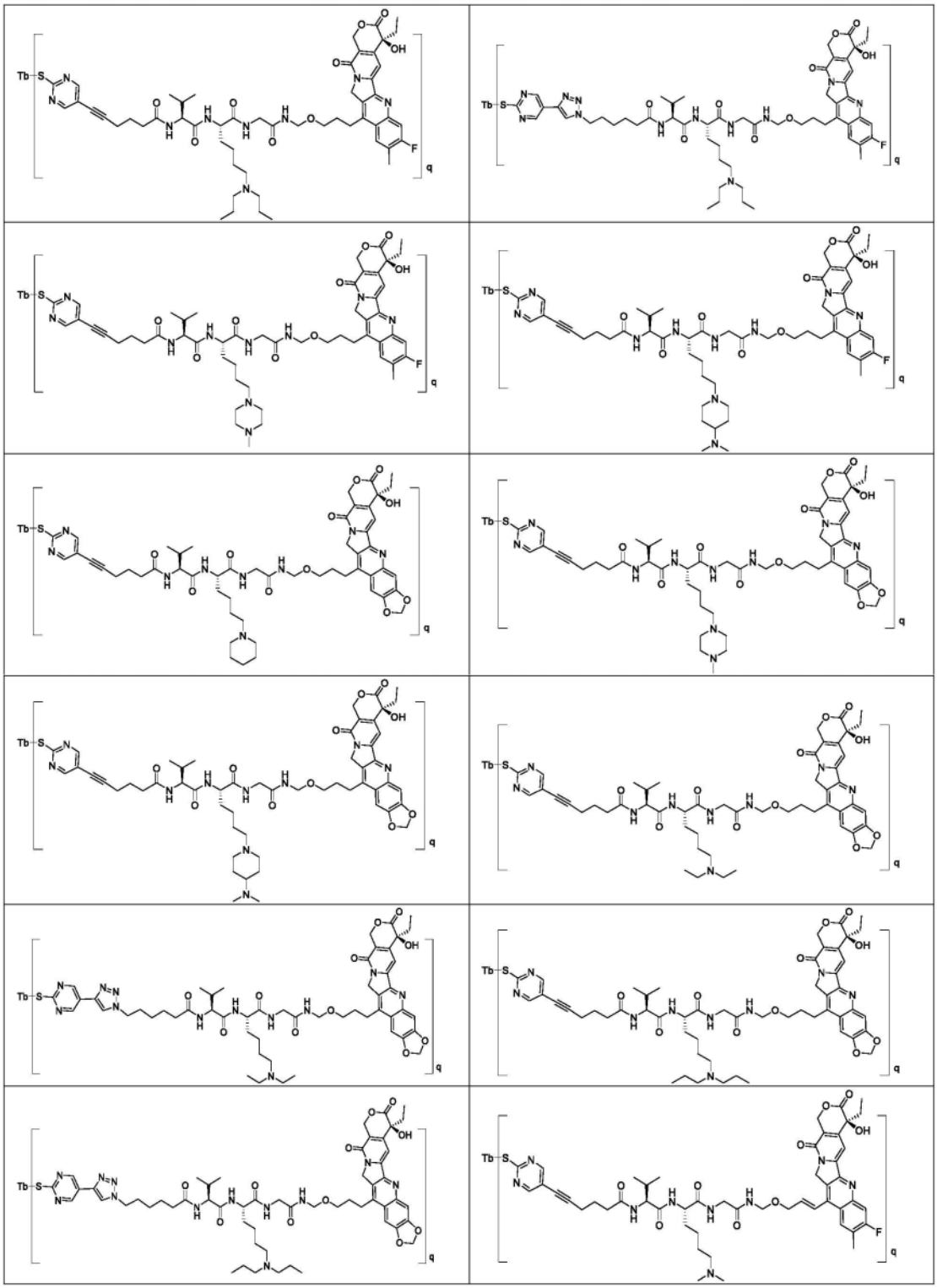
[1372]



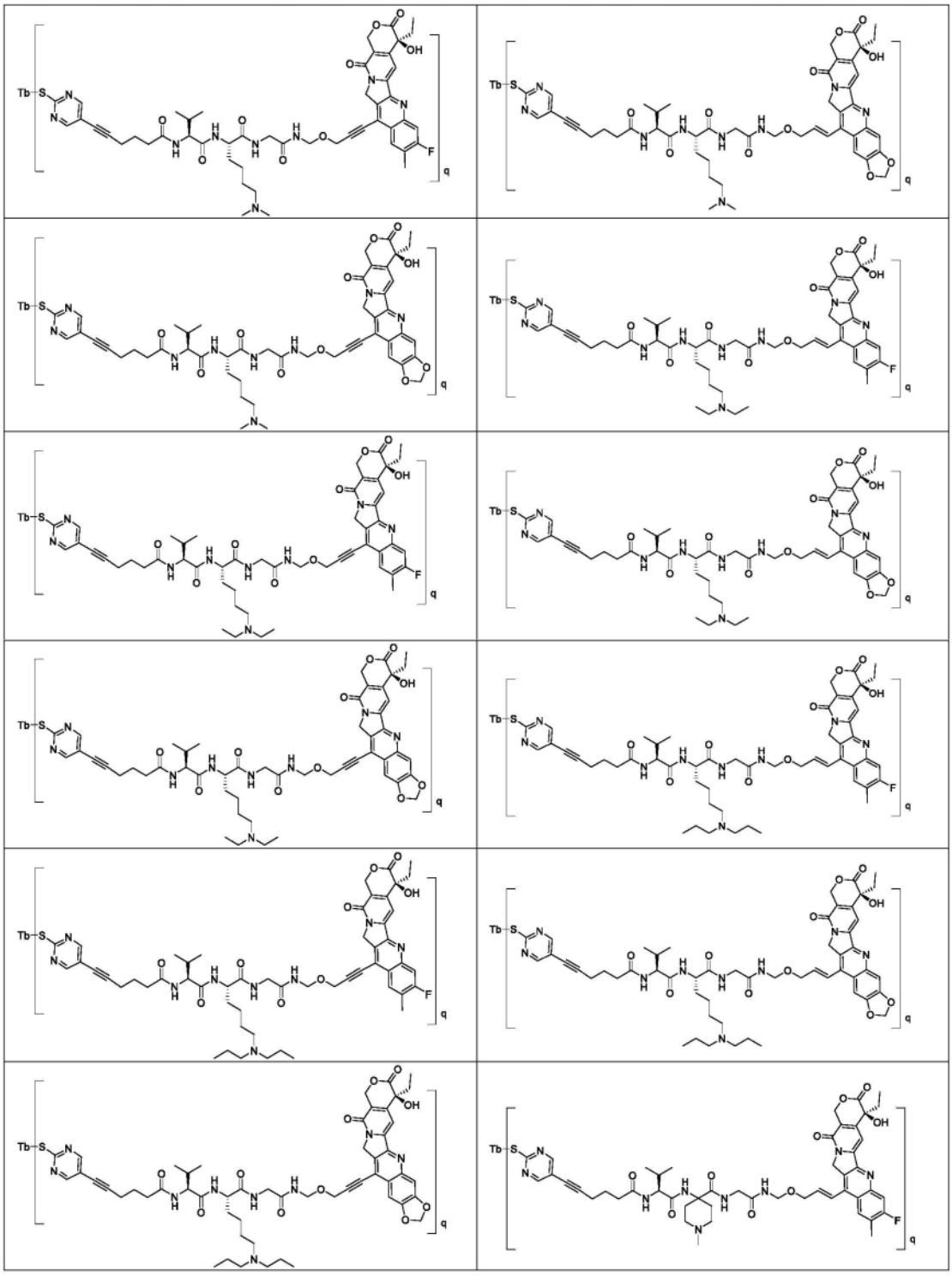
[1373]



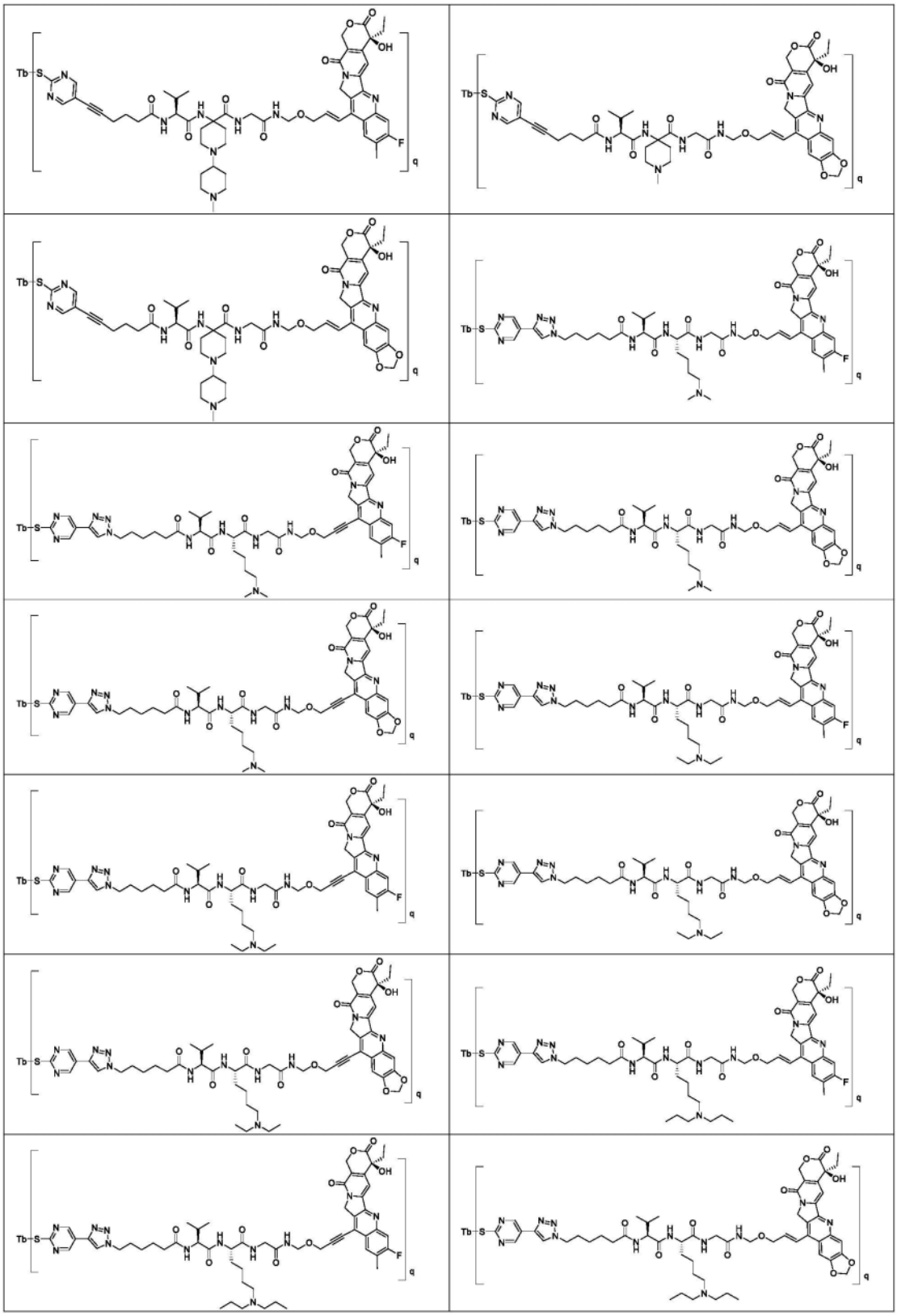
[1374]



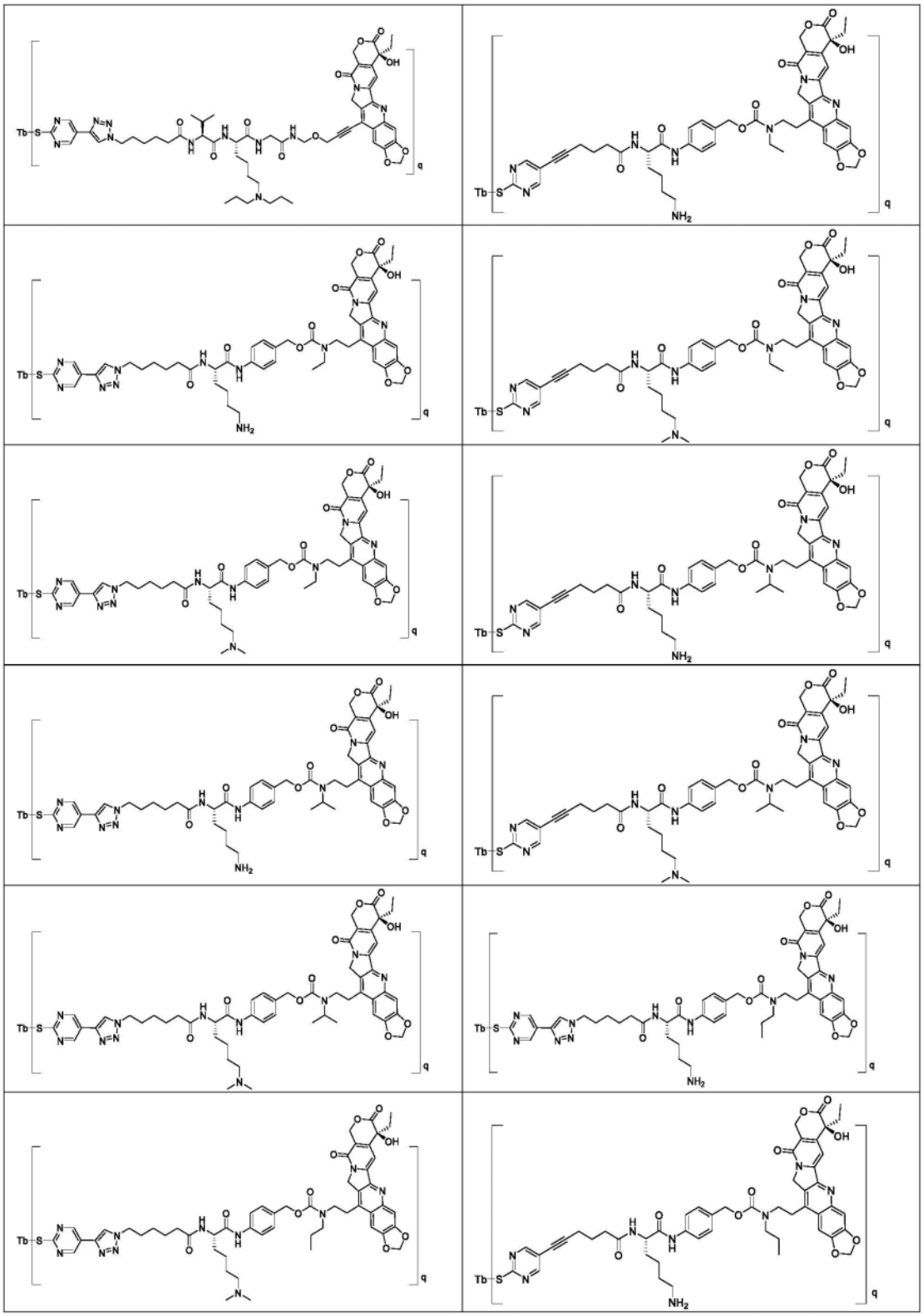
[1375]



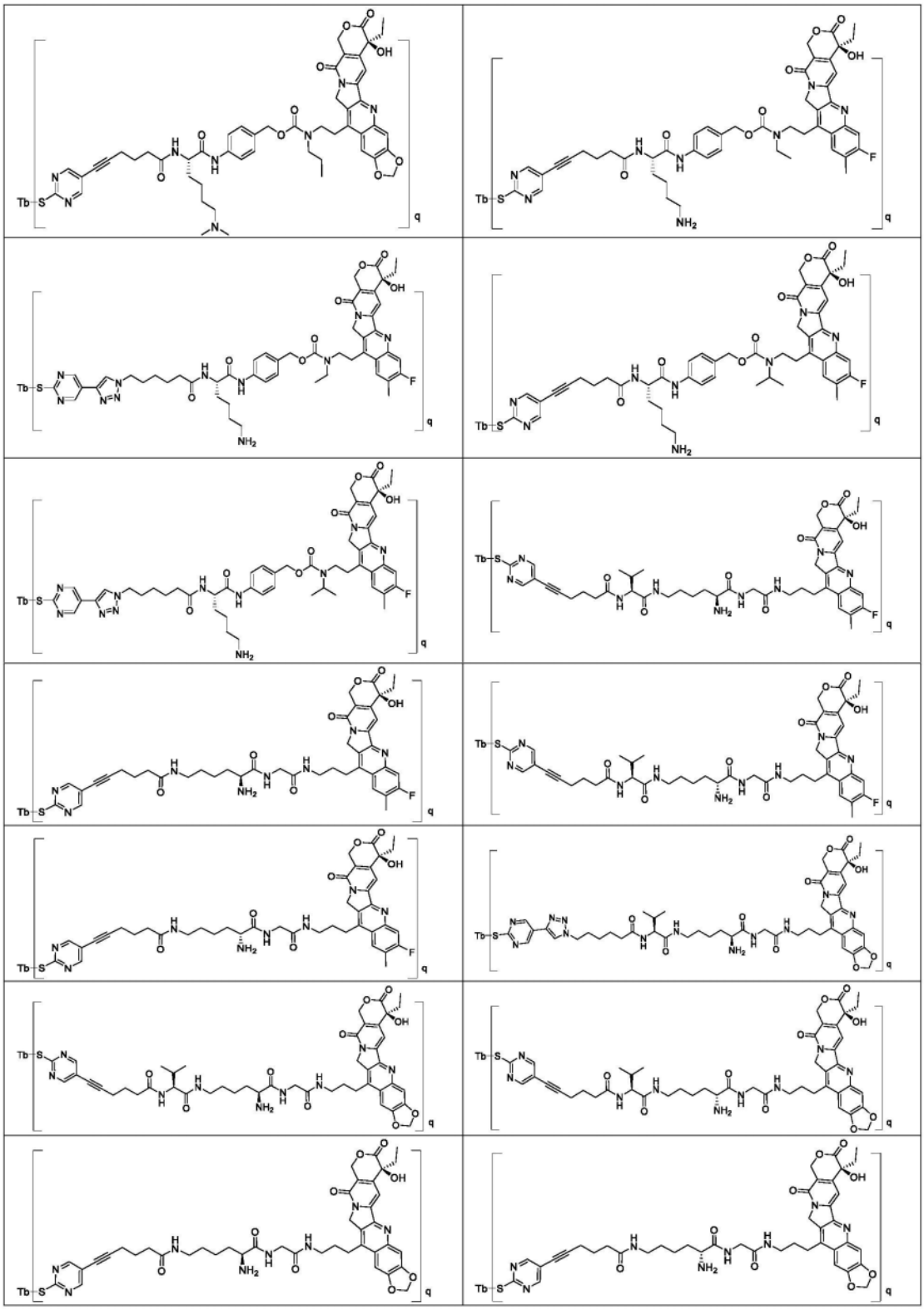
[1376]



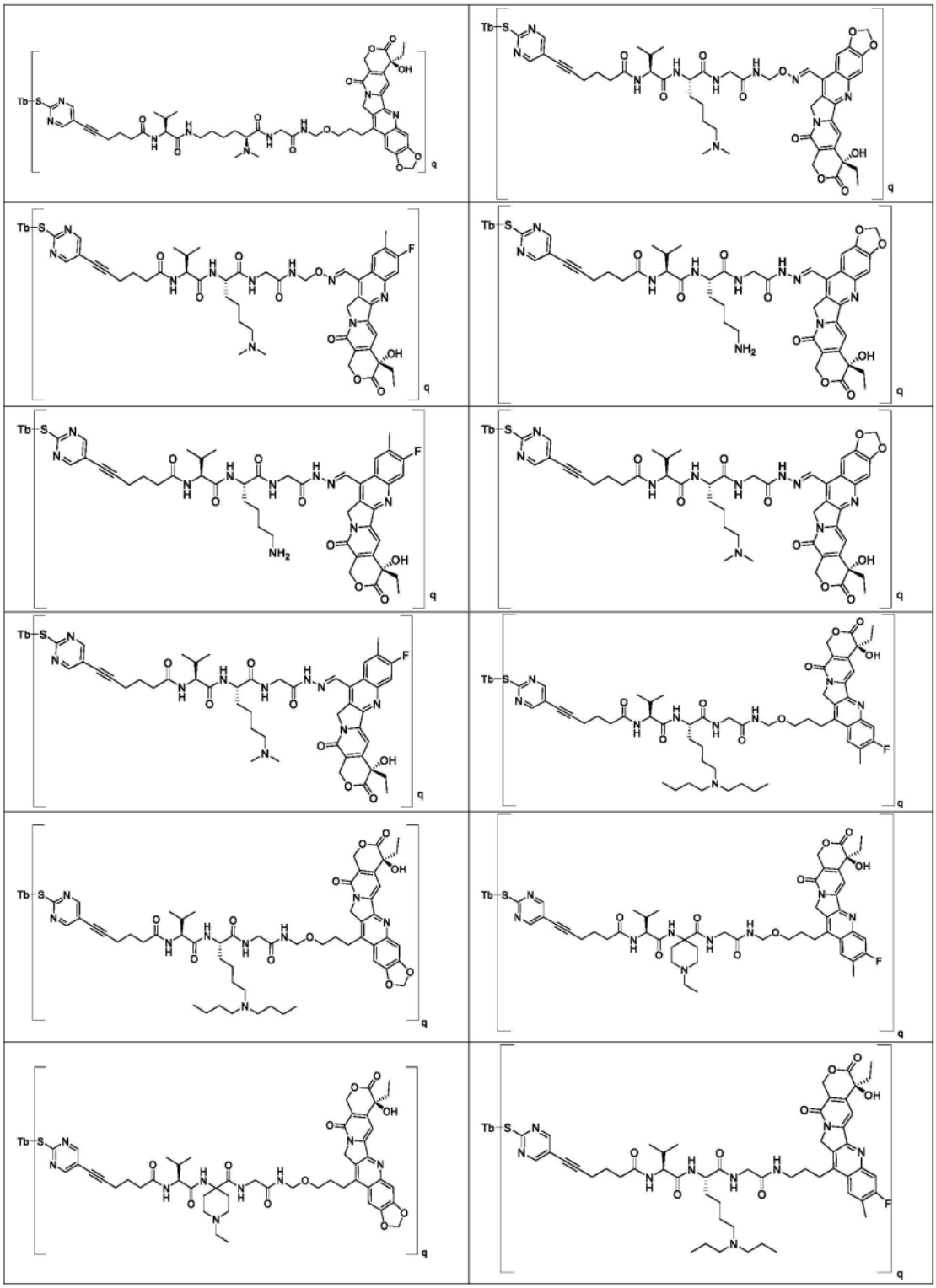
[1377]



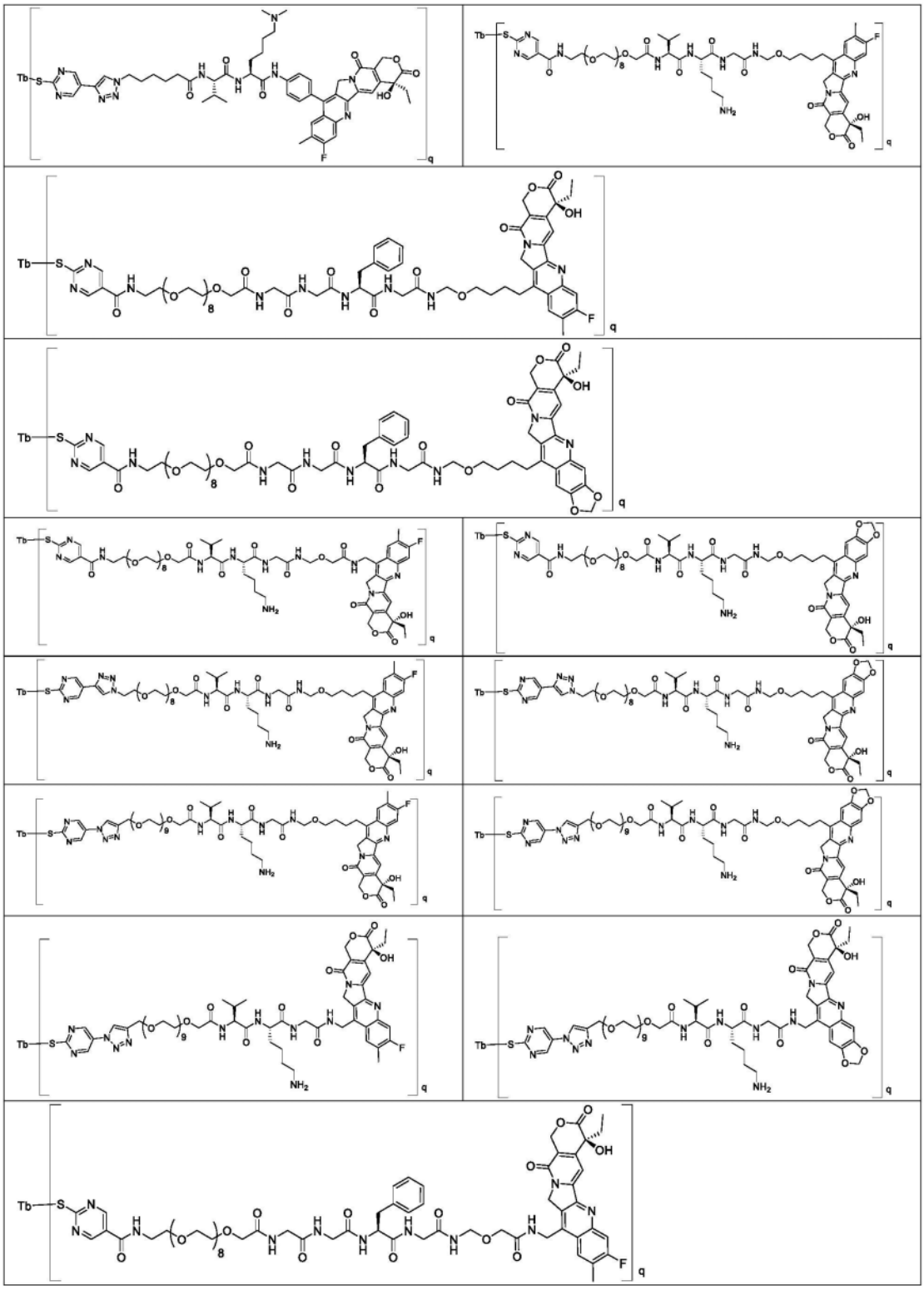
[1378]



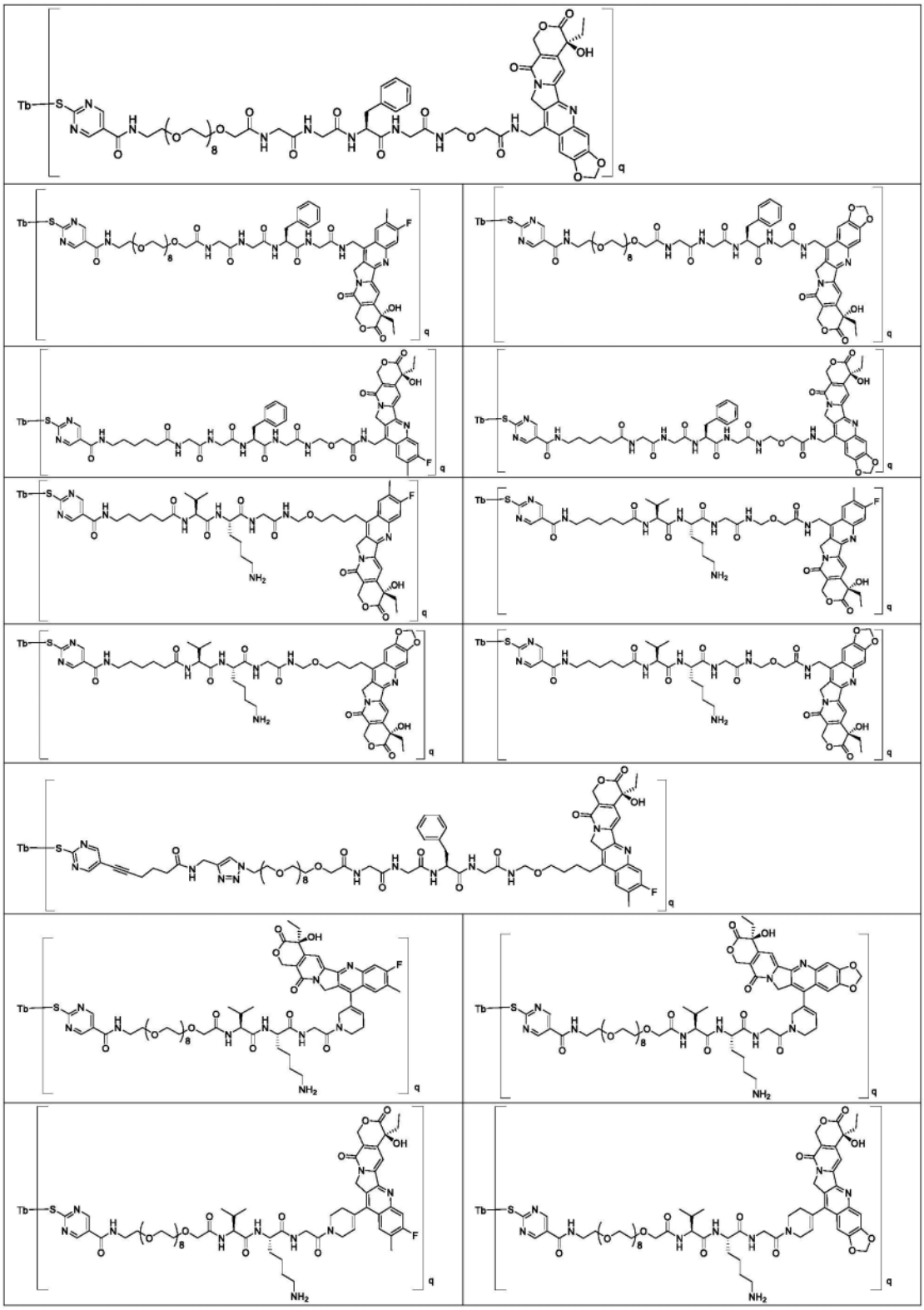
[1379]



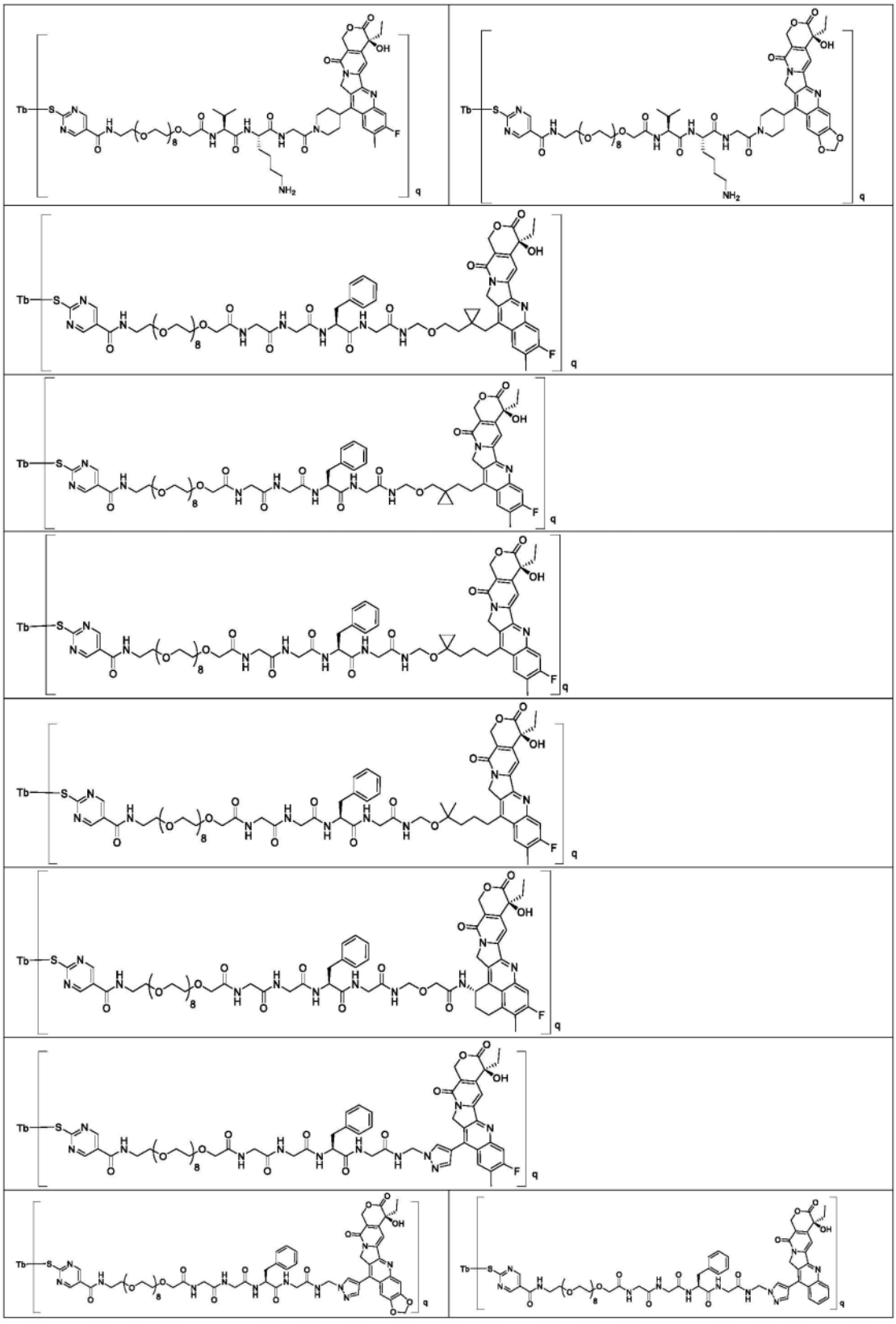
[1380]



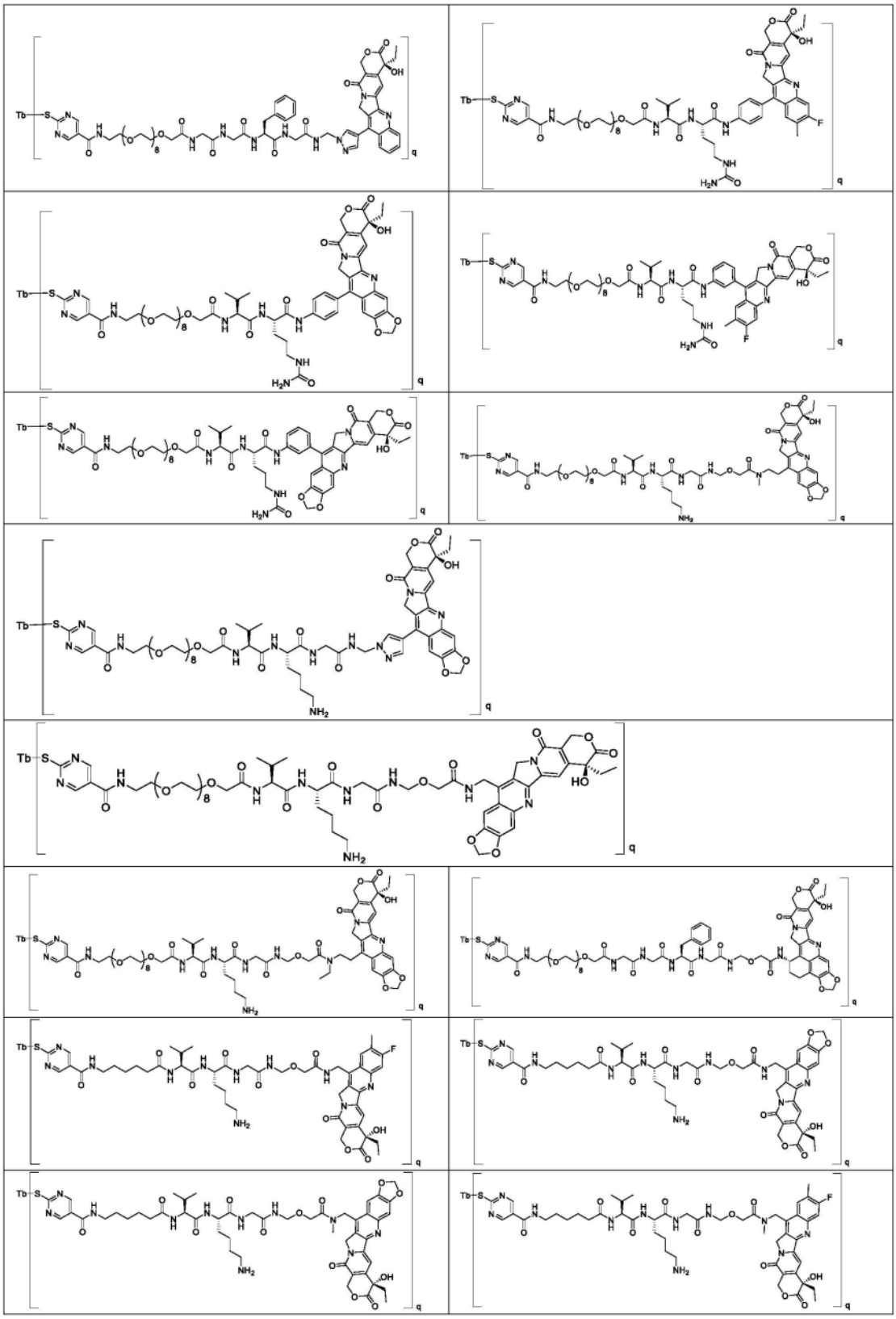
[1381]



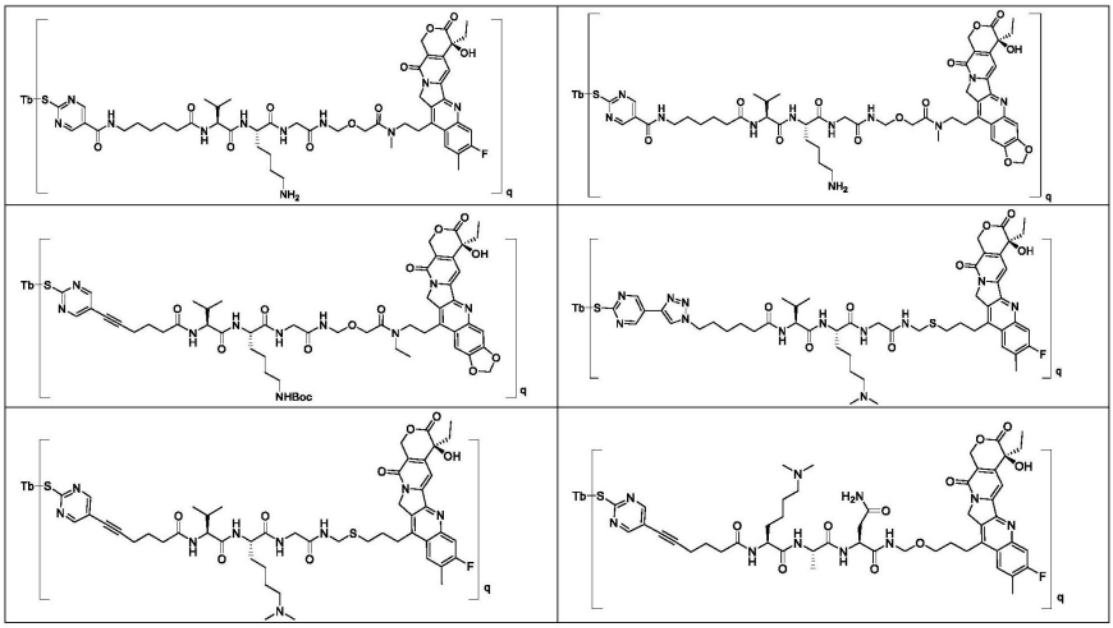
[1382]



[1383]

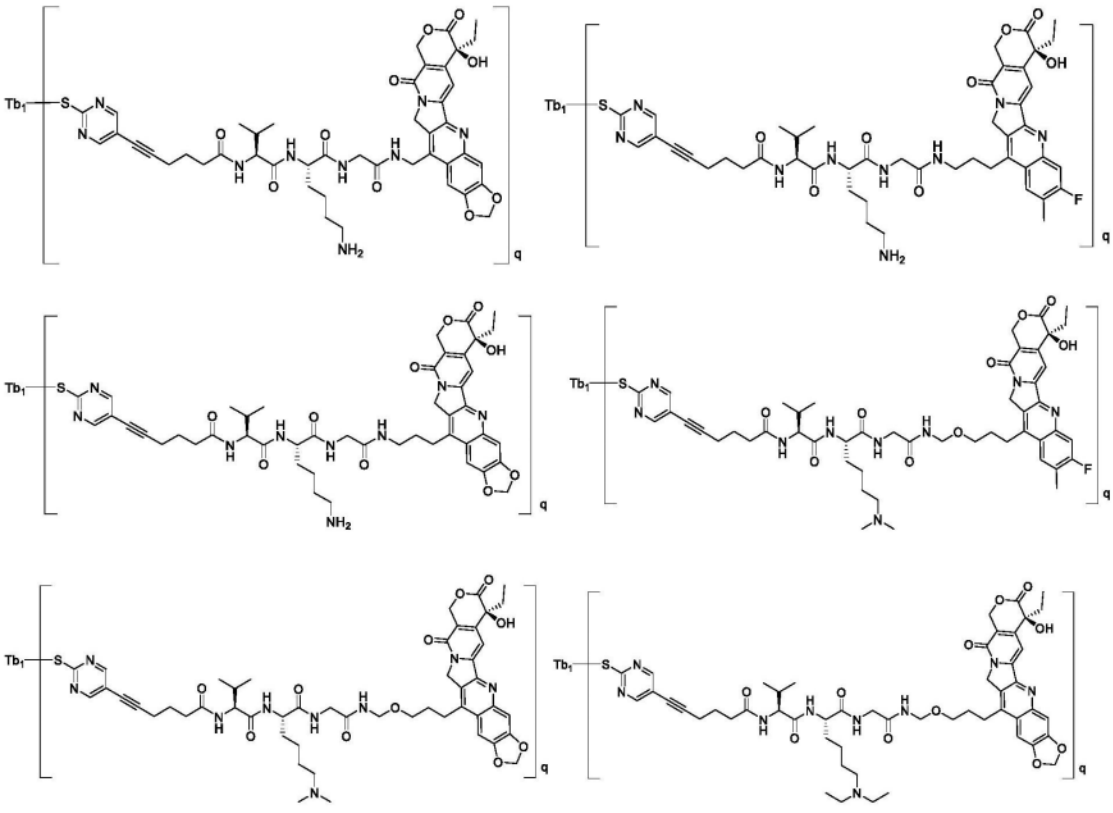


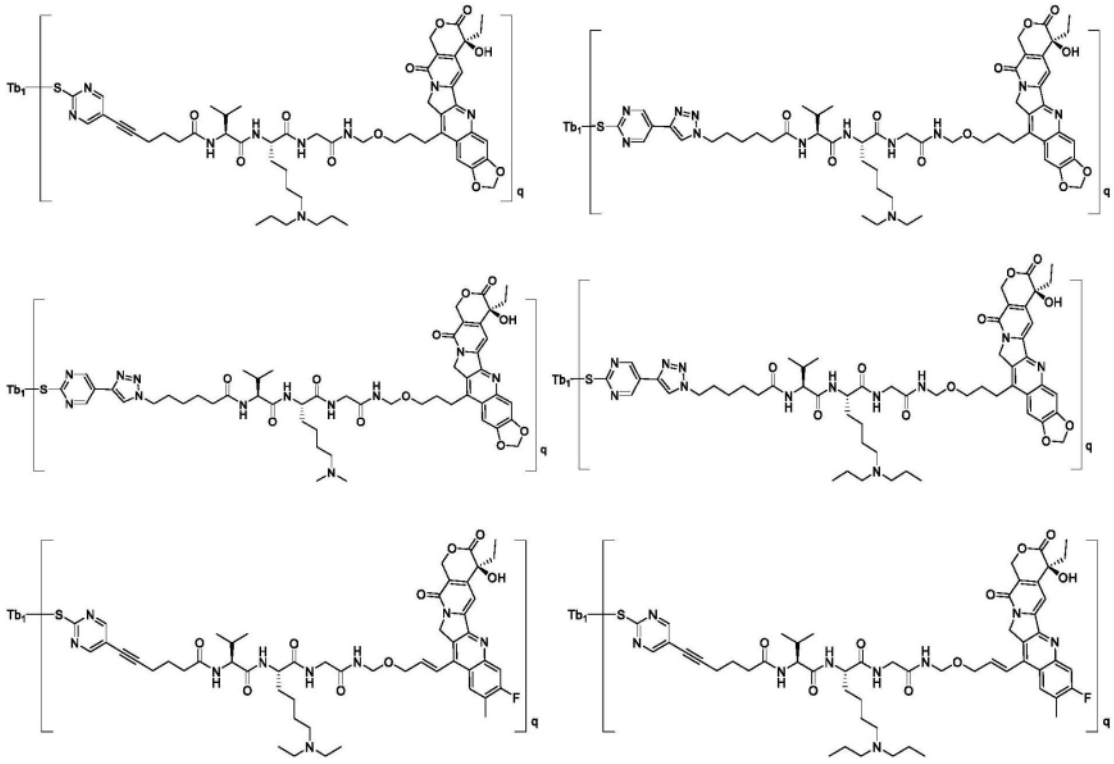
[1384]



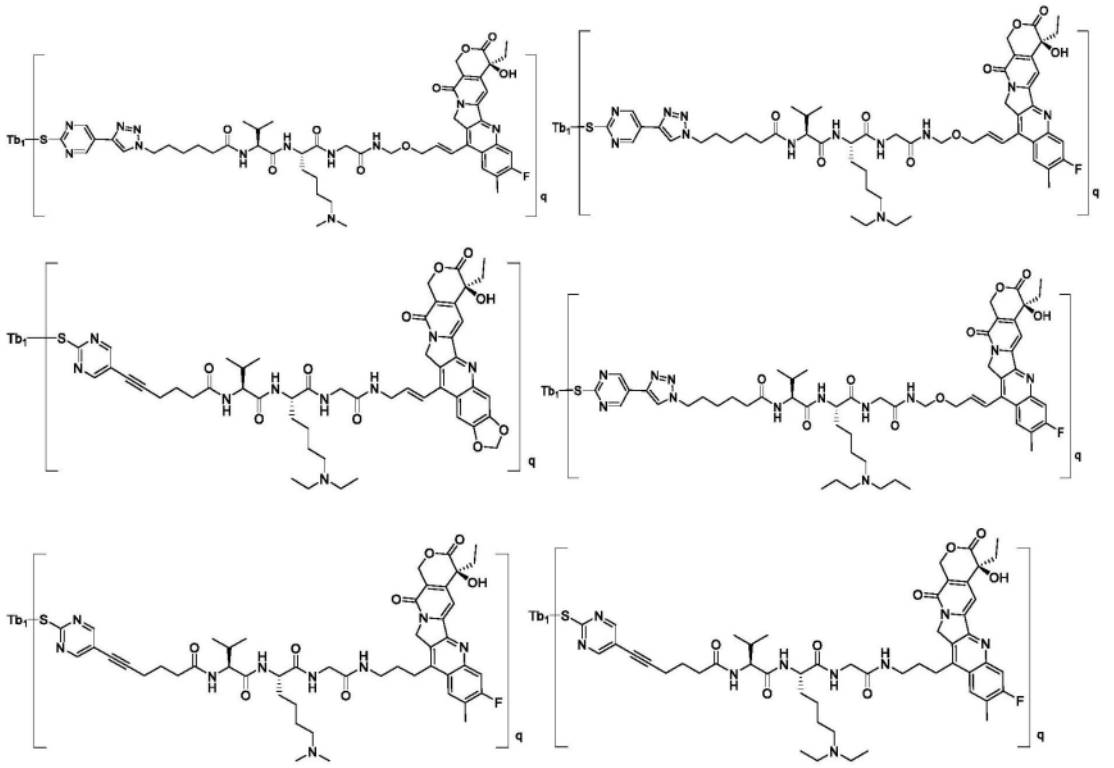
[1385] 24.实施方案1-23中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其中,所述配体药物偶联物选自:

[1386]

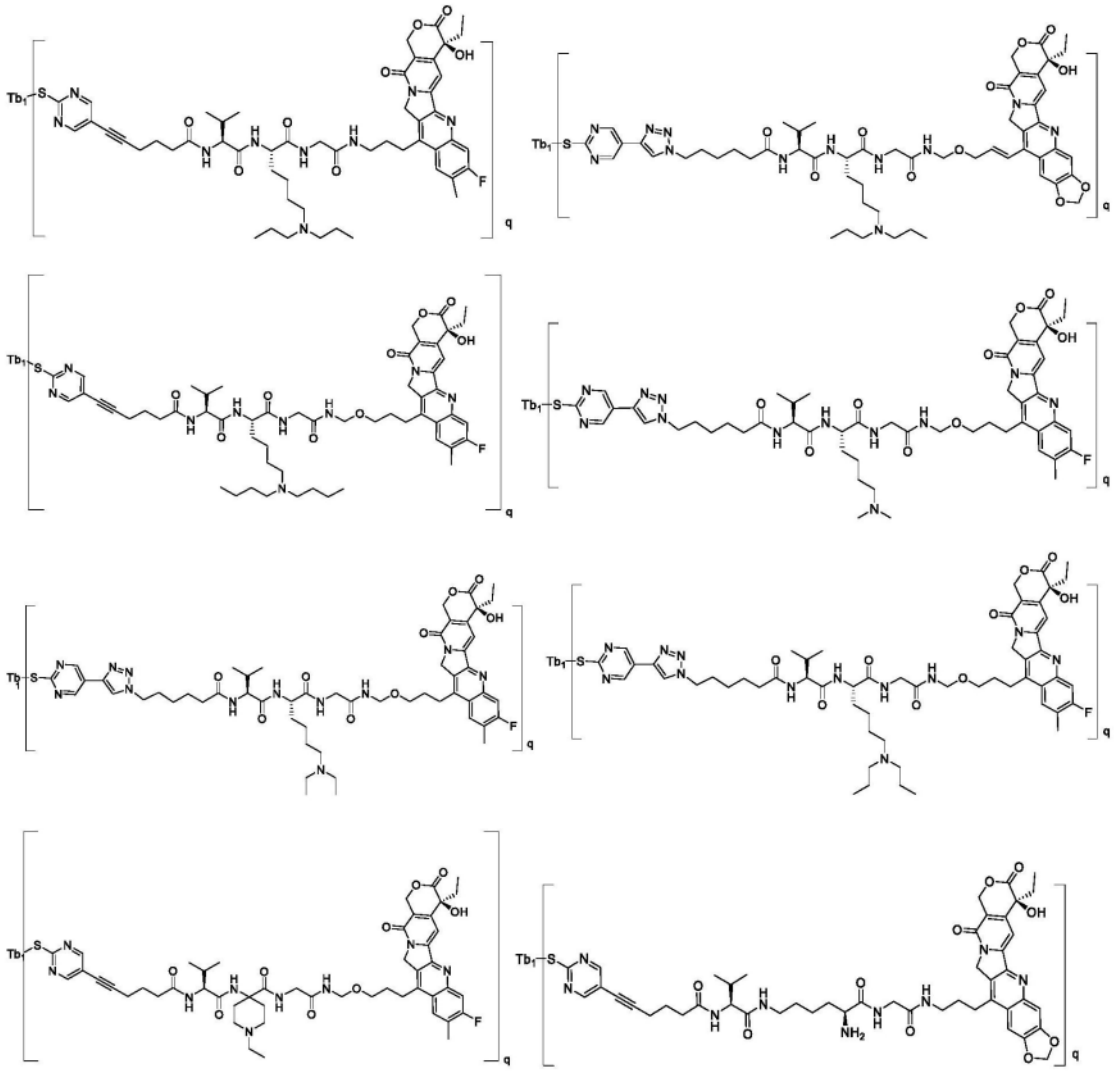




[1387]

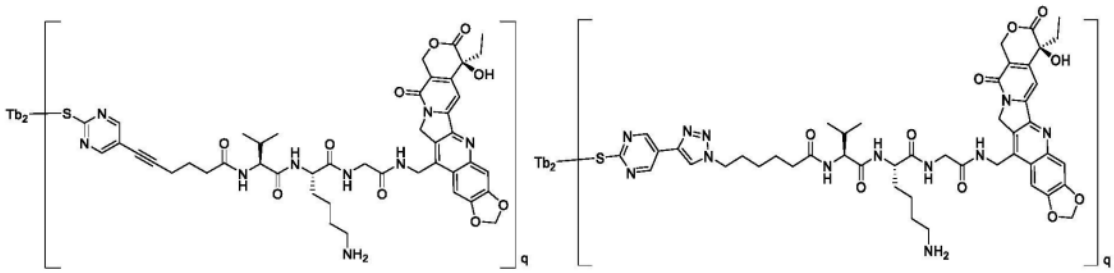


[1388]

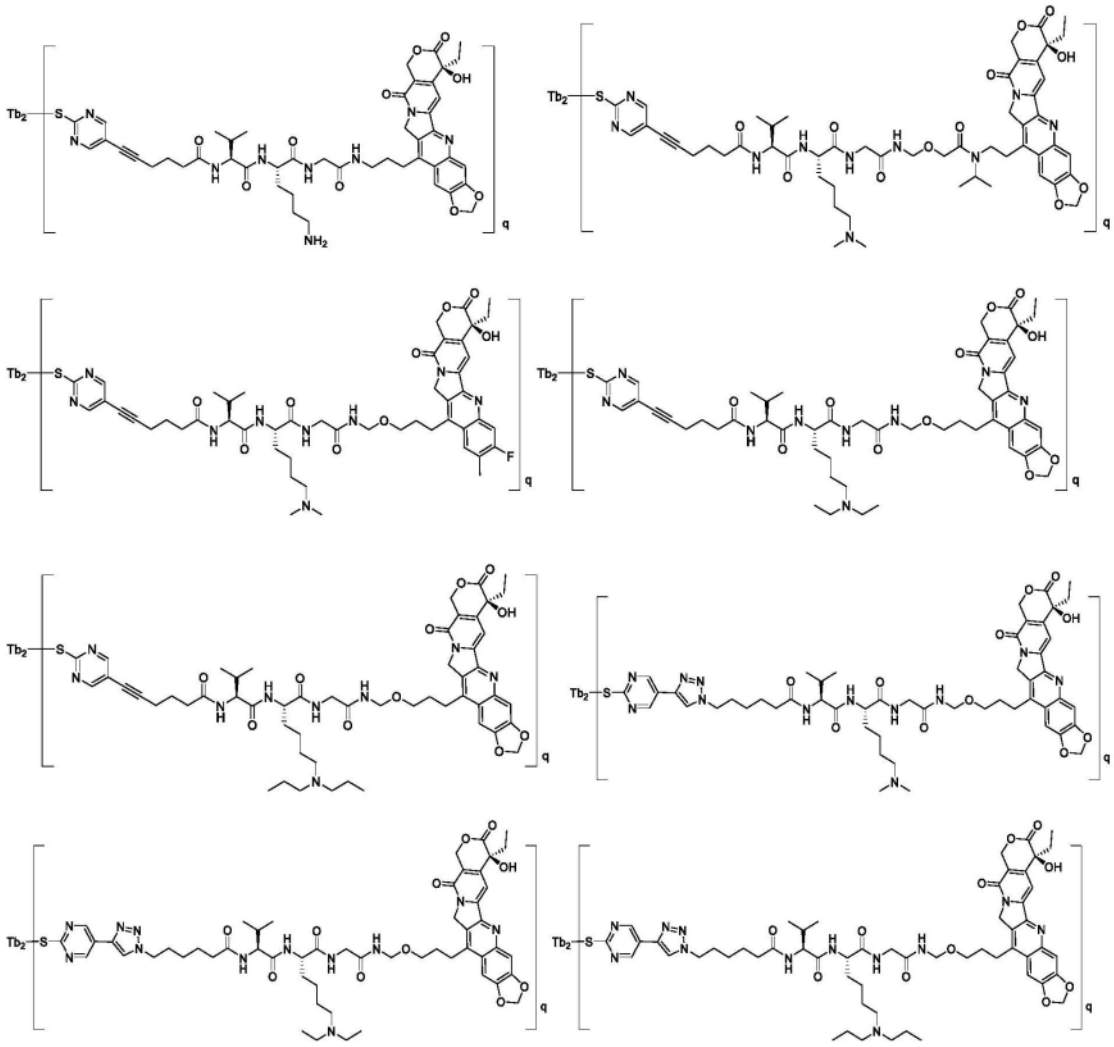


[1389] 其中，Tb_1为抗B7H3抗体或其抗原结合片段，例如enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab，1D1-01，2E3-02抗体；q选自0.1-16.0之间的任意数值，优选2-8之间的任意数值，更优选地，q为2、4、6或8；

[1390]

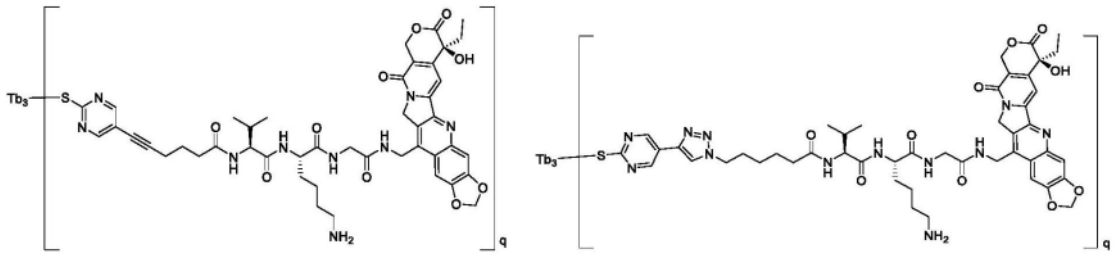


[1391]

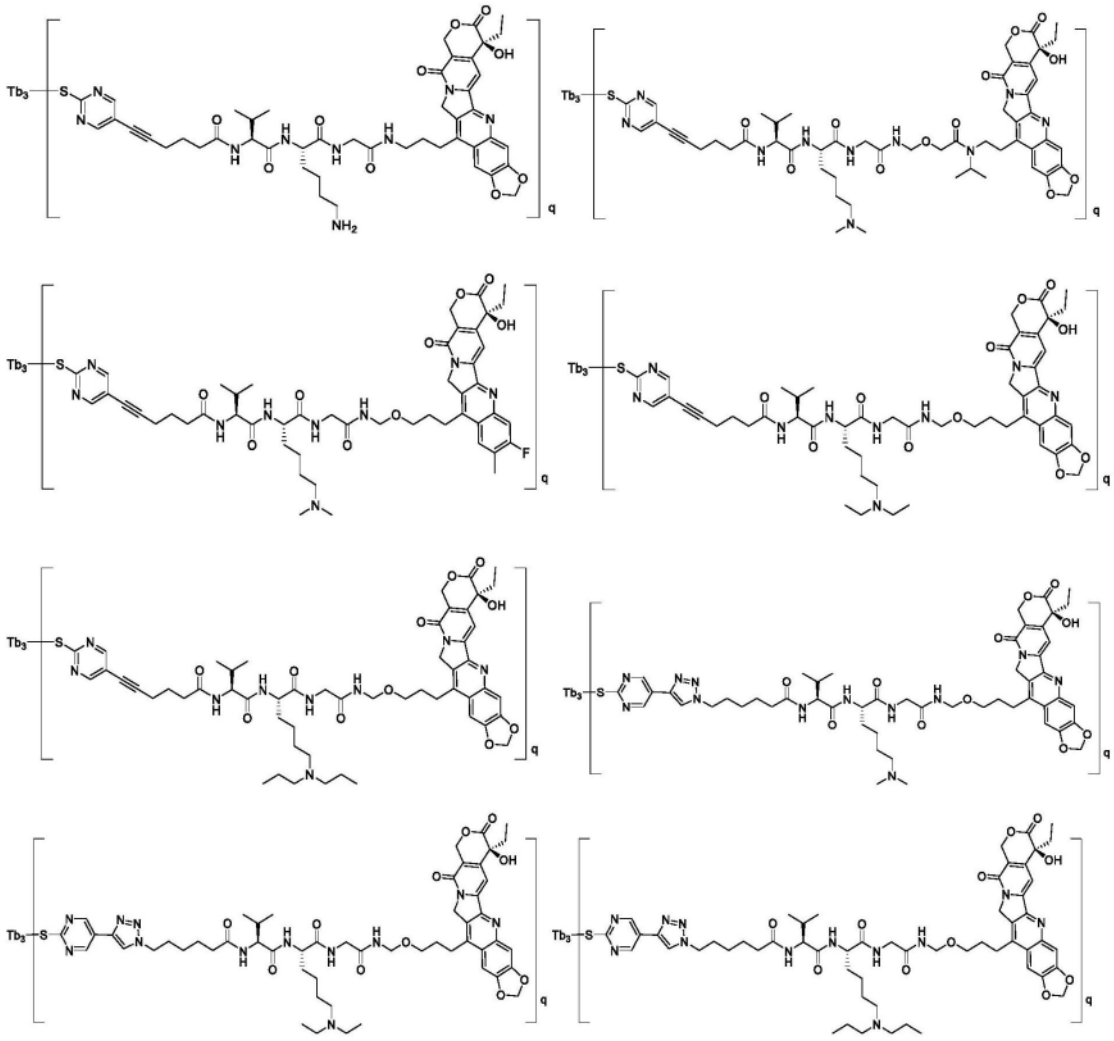


[1392] 其中,Tb_2为抗Trop-2抗体或其抗原结合片段,例如datopotamab,sacituzumab;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值,更优选地,q为2、4、6或8;

[1393]

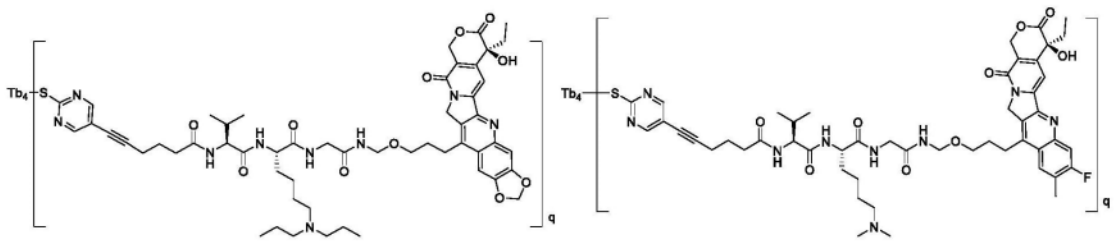


[1394]

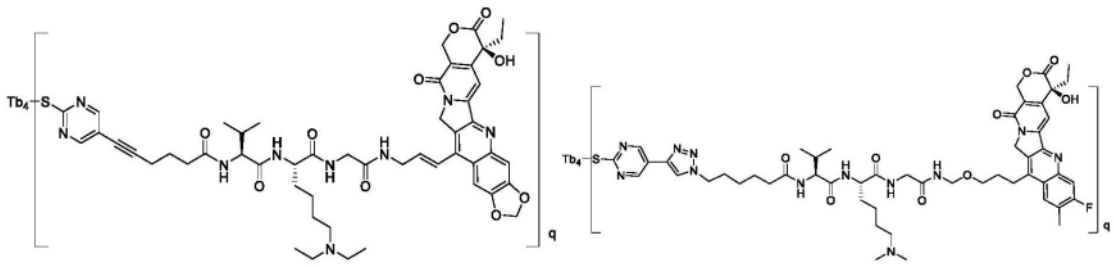


[1395] 其中,Tb_3为抗Her2抗体或其抗原结合片段,例如anbenitamab,coprelotamab,disitamab,gancotamab,margetuximab,pertuzumab,timigutuzumab,zanidatamab,Trastuzumab;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值,更优选地,q为2、4、6或8;

[1396]

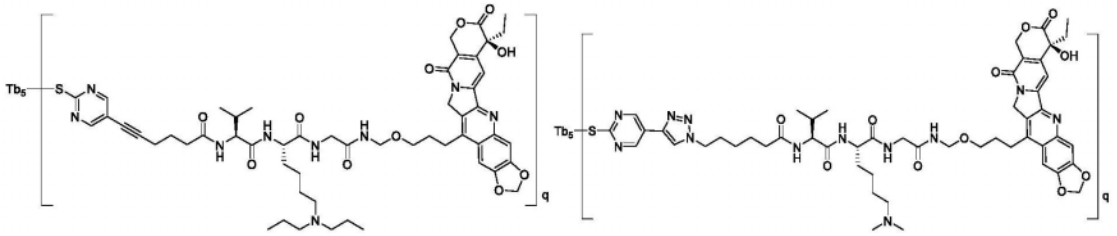


[1397]

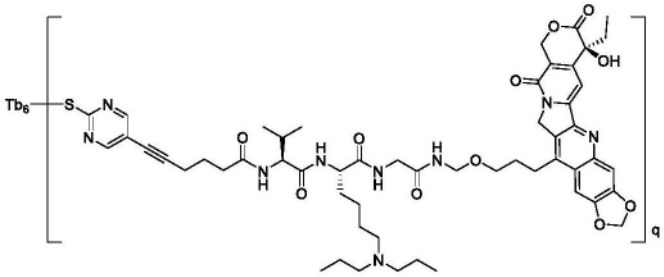


[1398] 其中,Tb_4为抗Her3抗体或其抗原结合片段,例如barecetamab,duligotuzumab,

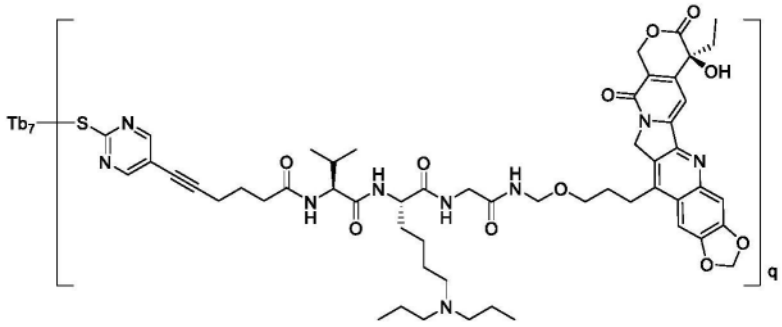
elgemtumab,lumretuzumab,patritumab,seribantumab,IMGT/mAb-DB ID:546所示的抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值,更优选地,q为2、4、6或8;

[1399] 

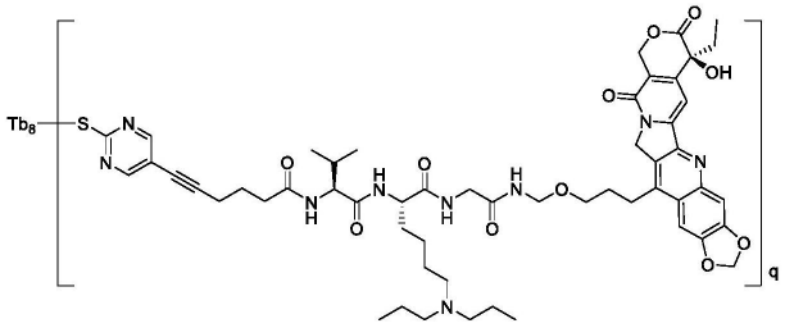
[1400] 其中,Tb_5为抗EGFR抗体或其抗原结合片段,例如demupitamab,depatuxizumab,futuximab,imgatuzumab,laprituximab,losatuxizumab,matuzumab,modotuximab,necitumumab,nimotuzumab,panitumumab,pimurutamab,serclutamab,tomuzotuximab,zalutumumab,Cetuximab;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值,更优选地,q为2、4、6或8;

[1401] 

[1402] 其中,Tb_6为无肿瘤细胞内吞活性的且没有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体,或者具有结合非内吞(例如ALCAM/CD166)抗原活性的抗体,例如:人体内没有相应细胞表面抗原的IgG同型抗体,抗CD166的抗体;更具体的,抗鸡溶菌酶人IgG1同型抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值,更优选地,q为2、4、6或8;

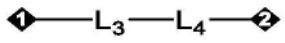
[1403] 

[1404] 其中,Tb_7为肿瘤细胞内吞活性较弱或无,但有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体;例如所述抗体具有结合B7H3、Her3、GD-2、Trop-2、EGFR、CD19、CD30、GPNMB、CD20、CD79b和BCMA抗原但不具有内吞活性的抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值,更优选地,q为2、4、6或8;

[1405] 

[1406] 其中,Tb_8为具有肿瘤细胞内吞活性的且有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体,例如1D1-01,2E3-02抗体,sacituzumab,pertuzumab,Trastuzumab或Cetuximab抗体;q选自0.1-16.0之间的任意数值,优选2-8之间的任意数值,更优选地,q为2、4、6或8。

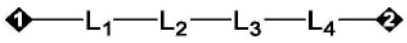
[1407] 25.一种配体药物偶联物中的连接体,含如下所示片段:

[1408] 

[1409] 其中,2位与生物活性分子片段相连;

[1410] L_3、L_4的定义如实施方案1-24中任一项所述;

[1411] 优选地,其结构如下所示:

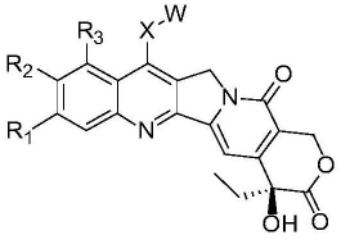
[1412] 

[1413] 其中,1位与和靶点结合的配体或靶向部分相连,2位与生物活性分子片段相连;

[1414] L_3、L_4的定义如实施方案1-24中任一项所述;

[1415] 较佳地,所述的靶点结合的配体或靶向部分和所述的生物活性分子片段的定义分别如实施方案1-24中任一项中的Tb和D所述。

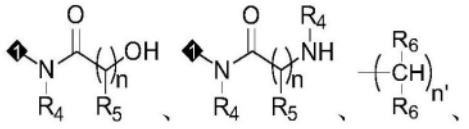
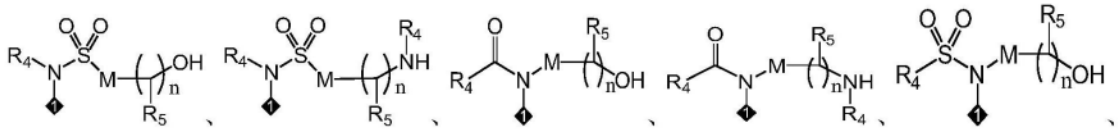
[1416] 26.式II所示的化合物:

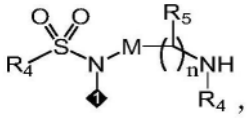
[1417] 

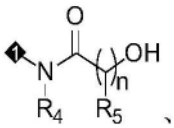
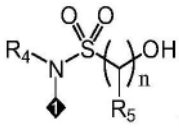
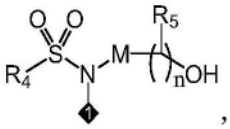
式 II

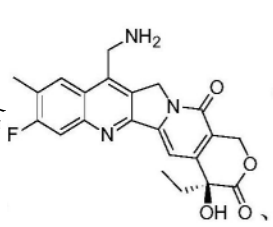
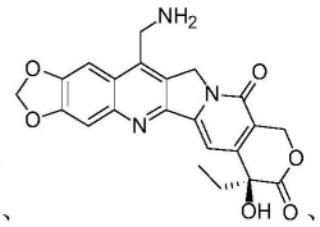
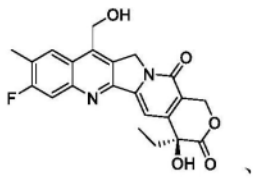
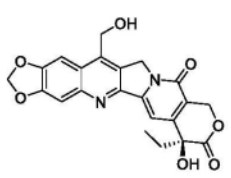
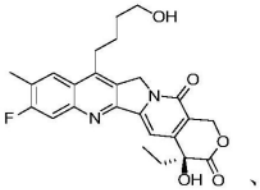
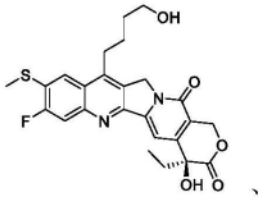
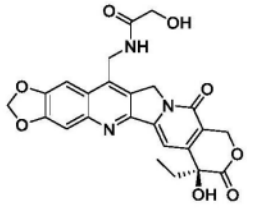
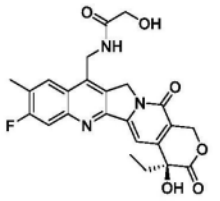
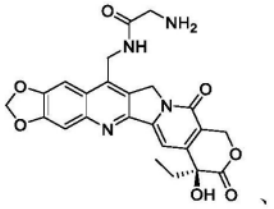
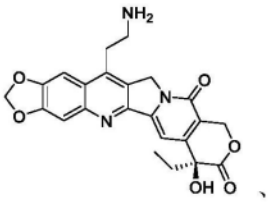
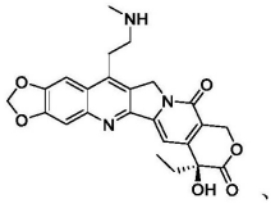
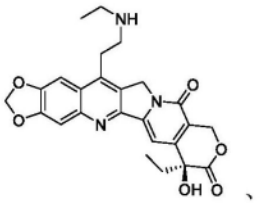
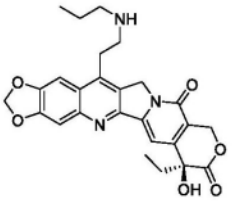
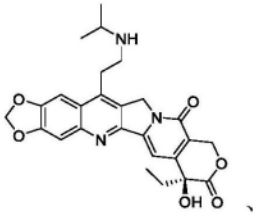
[1418] 或所述化合物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的溶剂合物或其配体药物偶联物,

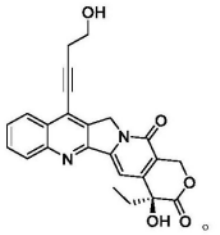
[1419] 其中,R_1、R_2、R_3和X的定义如实施方案13-24中任一项所述;

[1420] W不存在或存在,W存在时,W选自-OH、-SH、-NHR_4、  、 

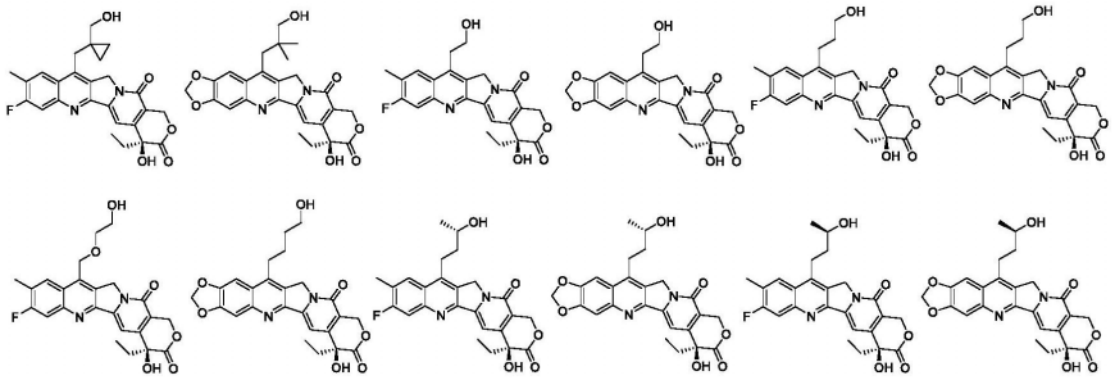
 1位与X相连；

[1421] 优选地，W不存在或存在，W存在时，W选自-OH、-SH、-NHR$_4$、  、  、  ，1位与X相连；

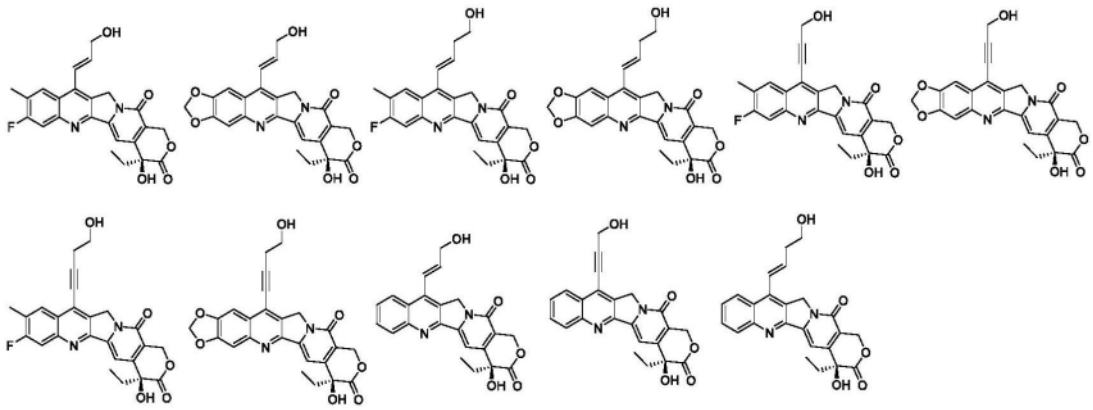
[1422] 且当W不存在时，X与H相连接；其中，当R_1、R_2同时为H，且X为-$(CH_2)_{n1}$-，n1为1、2、3、4时，W不为-OH或-NHR$_4$；且式II所示化合物不包含  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、

[1423]  。

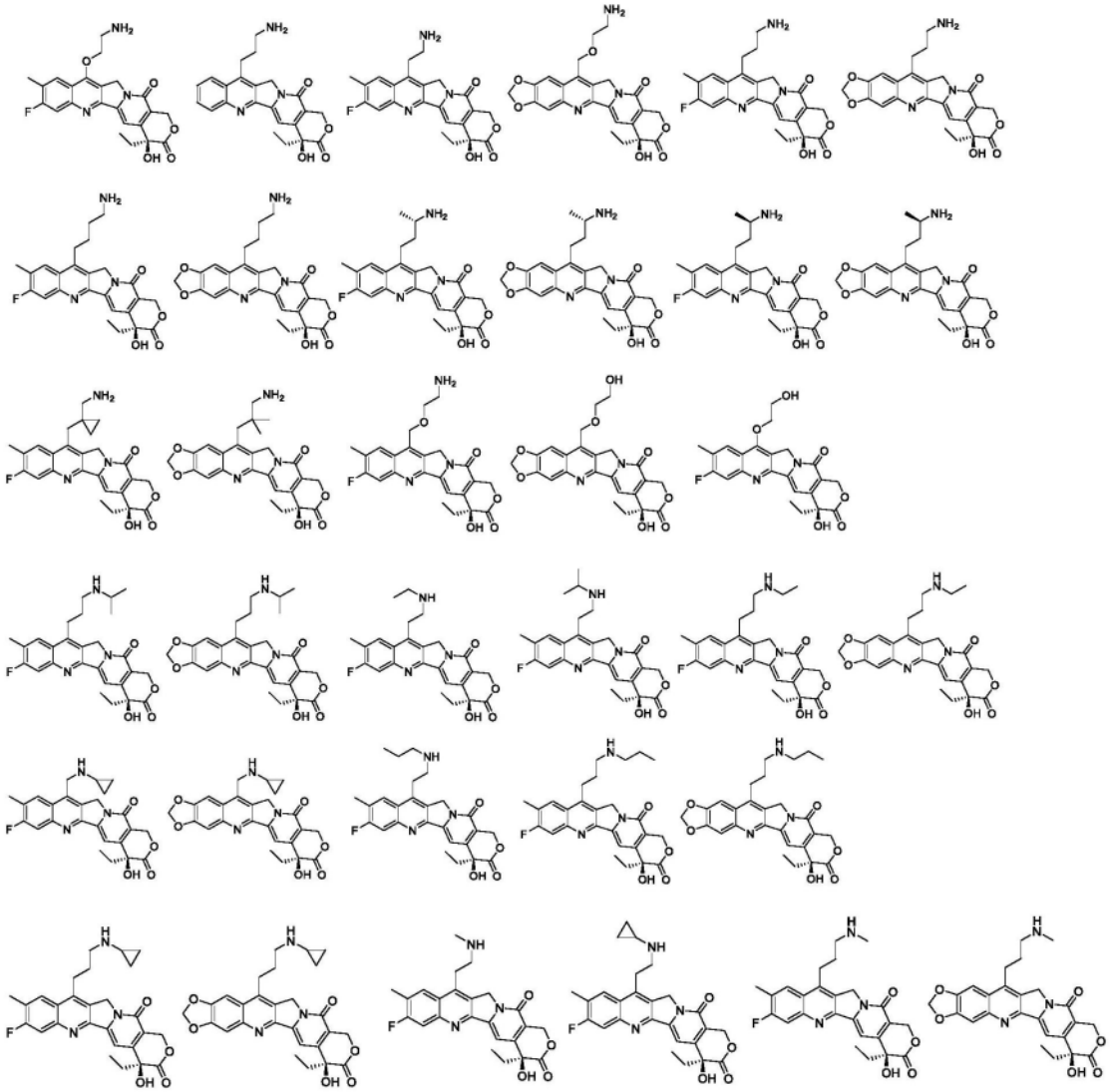
[1424] 27.实施方案26化合物，其中，式II所示化合物选自以下：



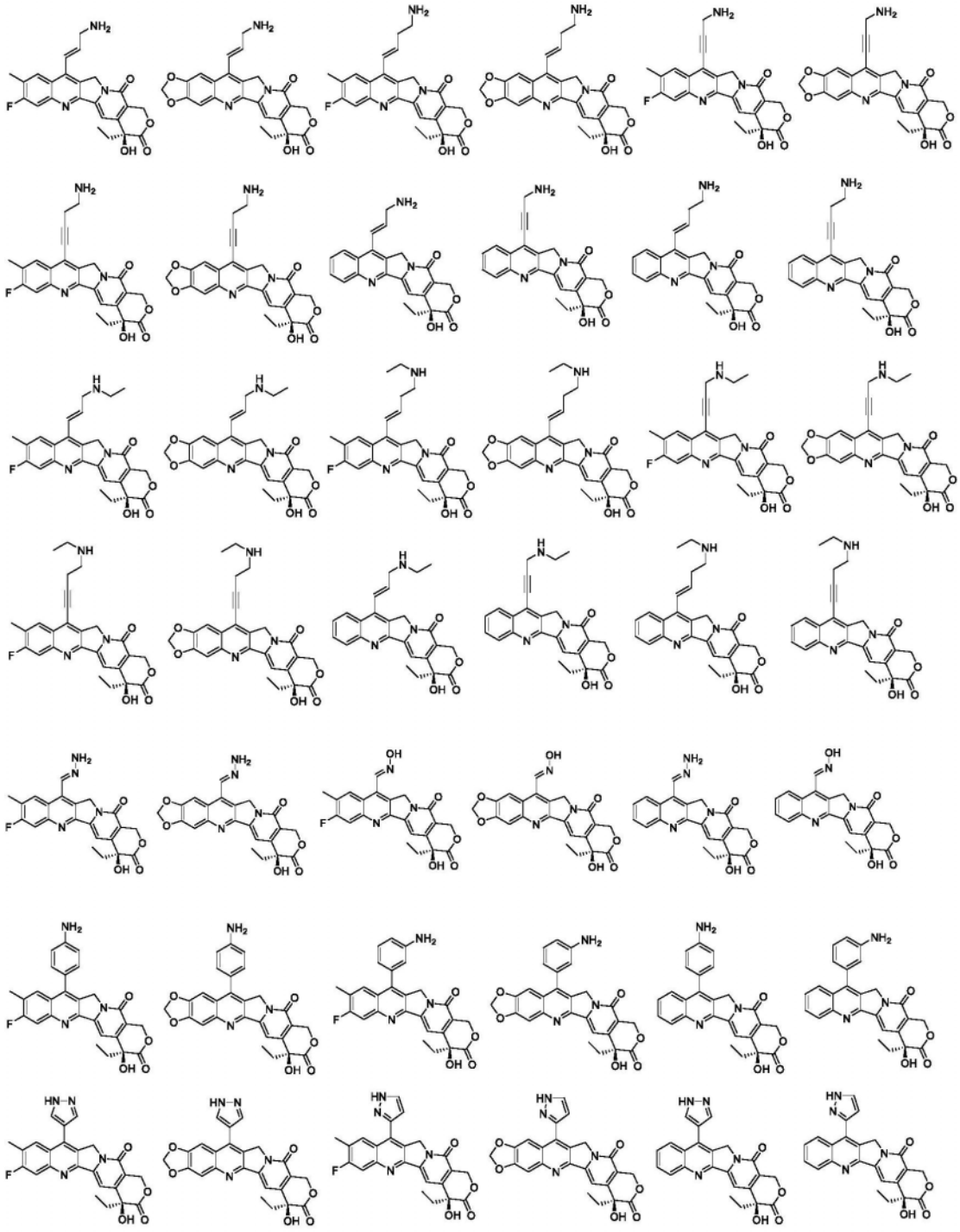
[1425]

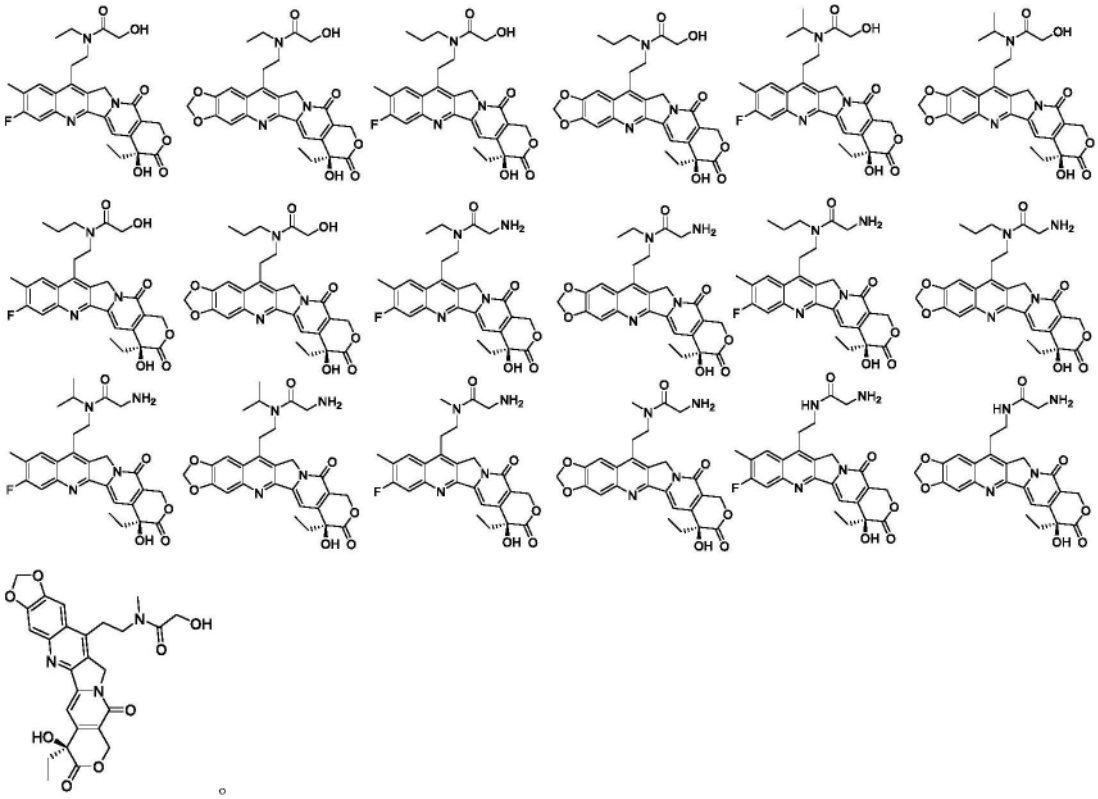


[1426]

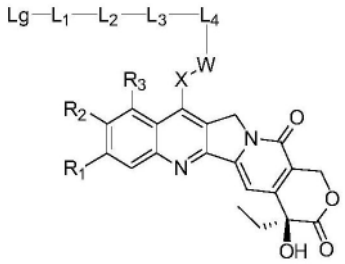


[1427]



[1428] 

[1429] 28.式III所示的药物连接体偶联物,

[1430] 

式 III

[1431] 或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,

[1432] 其中:

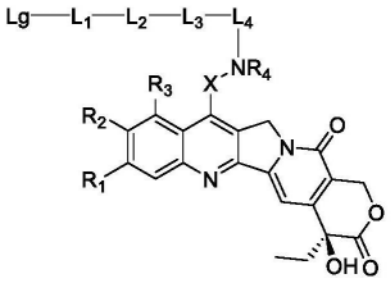
[1433] R_1、R_2、R_3、X、L1、L2、L3和L4的定义如实施方案1-24中任一项所述;W的定义如实施方案13-24中任一项所述;L1的1位与Lg相连;

[1434] Lg为离去基团,Lg选自卤素、砜基、三级胺盐基(Me_3N^+、Et_3N^+)、重氮盐基、-OMs、$MeSO_2^-$和$CF_3SO_3^-$;

[1435] 优选地,Lg选自F、Cl和$MeSO_2^-$;三级胺盐基选自Me_3N^+和Et_3N^+;

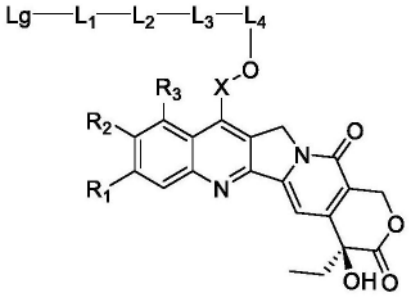
[1436] 更优选地,Lg选自F和$MeSO_2^-$。

[1437] 29.实施方案28所述的药物连接体偶联物或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其具有式III-(1)、式III-(2)或式III-(3)所式结构:

[1438] 

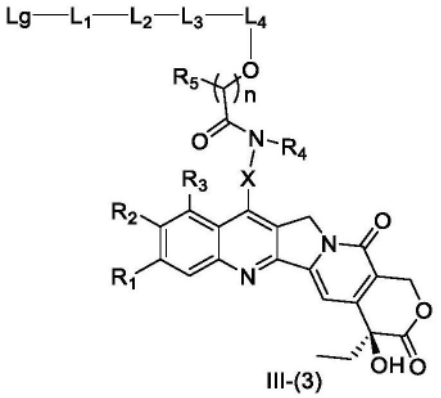
III-(1) ,

[1439] 其中,L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg如实施方案28所定义;

[1440] 

III-(2)

[1441] 其中,L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg如实施方案28所定义,

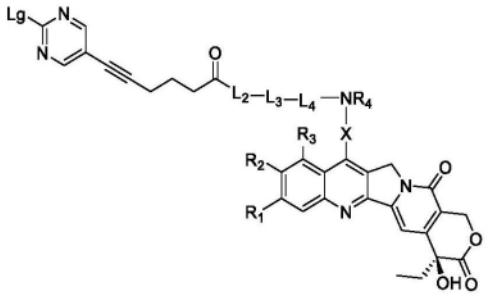
[1442] 

III-(3)

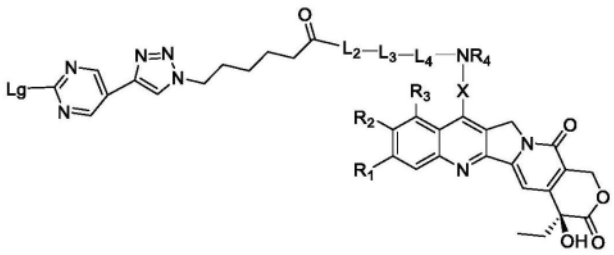
[1443] 其中,L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n和Lg如实施方案28所定义。

[1444] 30.实施方案28或29所述的药物连接体偶联物或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其具有式III-(1A)、III-(1B)、III-(2A)、III-(2B)、III-(3A)或III-(3B)所式结构;

[1445] 式III-(1A)或III-(1B)所式结构:

[1446] 

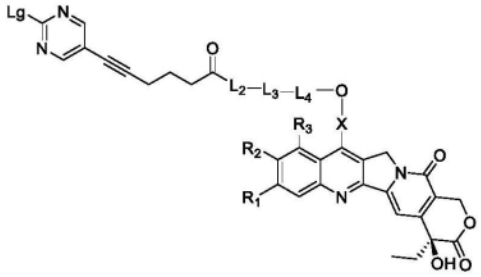
III-(1A)



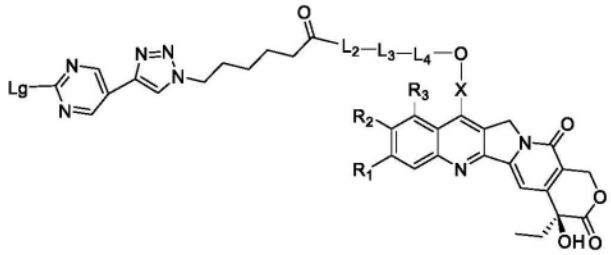
III-(1B)

[1447] 其中,L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg如实施方案28或29所定义;

[1448] 式III-(2A)或III-(2B)所式结构:

[1449] 

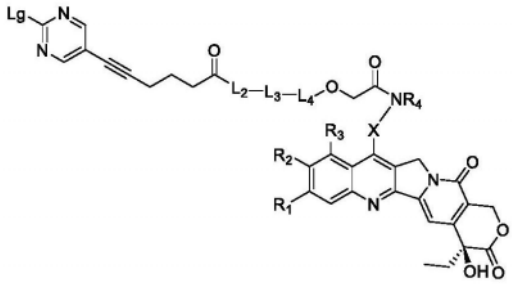
III-(2A)



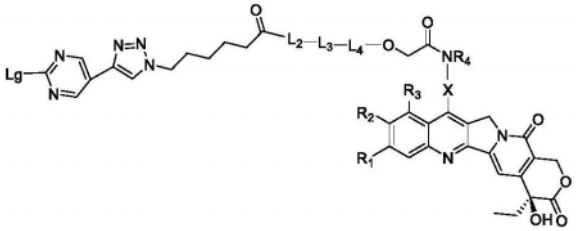
III-(2B)

[1450] 其中,L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和Lg如实施方案28或29所定义;

[1451] 式III-(3A)或III-(3B)所式结构:

[1452] 

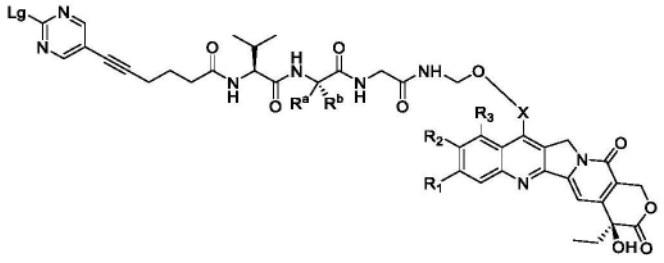
III-(3A)



III-(3B)

[1453] 其中,L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和Lg如实施方案28或29所定义。

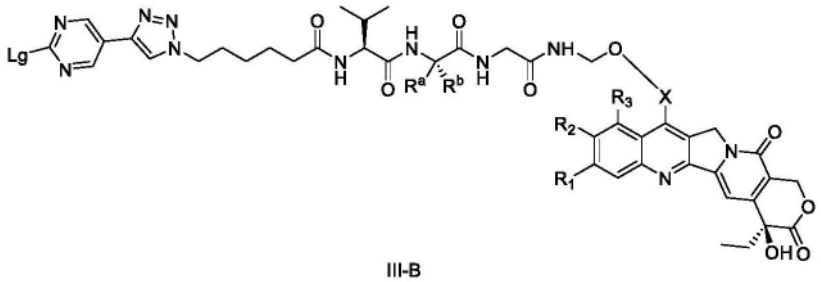
[1454] 31.实施方案28-30中任一项所述的药物连接体偶联物或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其中,所述药物连接体偶联物具有式III-A或式III-B所式结构:

[1455] 

III-A

[1456] 其中,Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q如实施方案28-30中任一项所定义;

[1457]

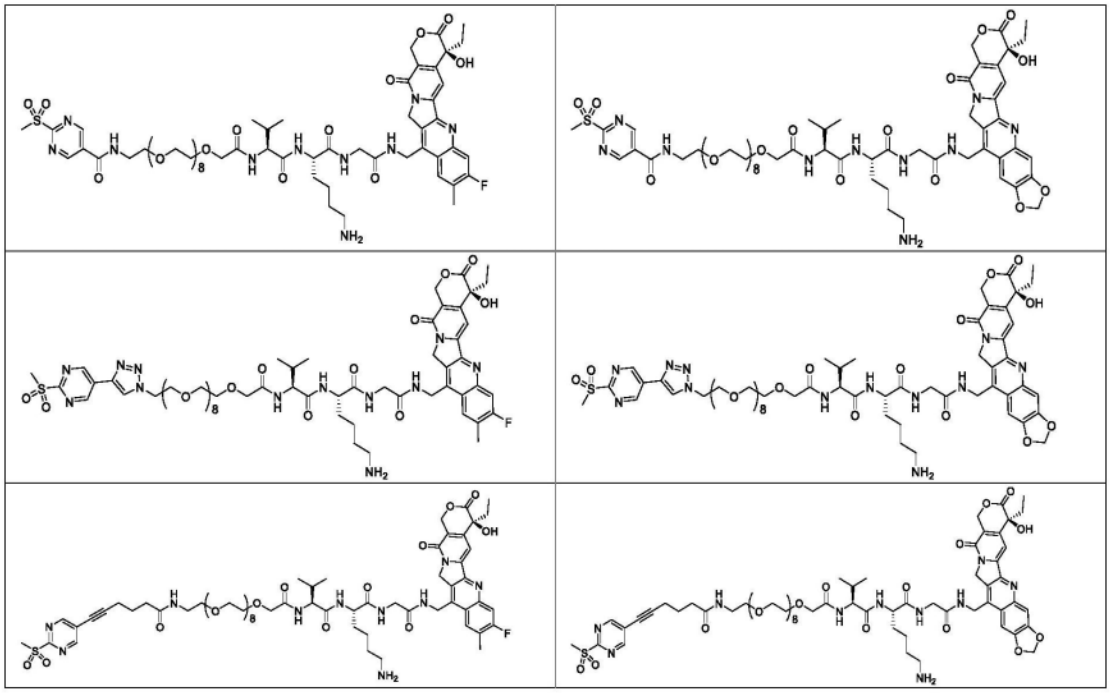


III-B

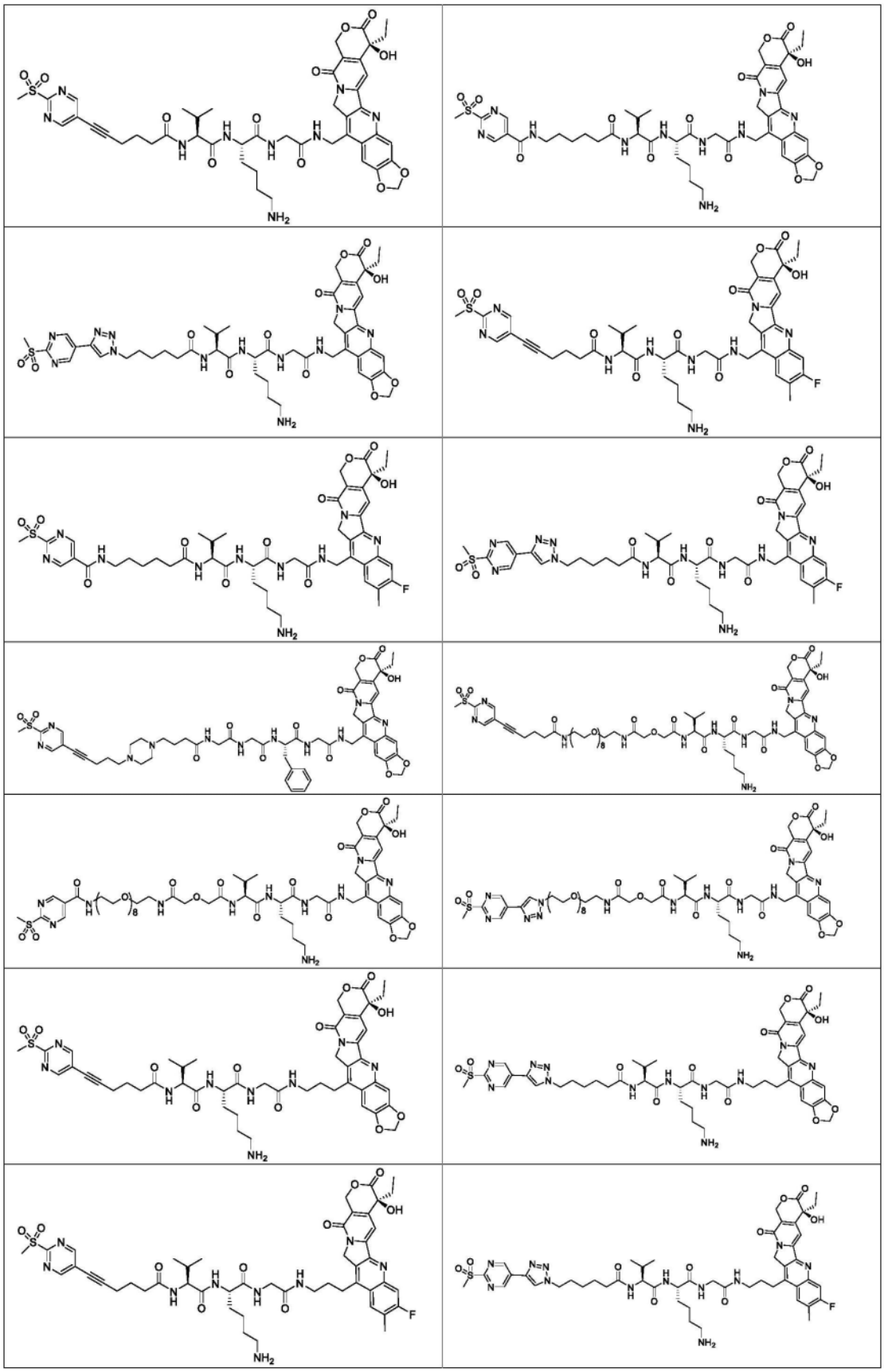
[1458] 其中,Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和q如实施方案28-30中任一项所定义。

[1459] 32.实施方案28-31中任一项所述的药物连接体偶联物或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物,其特征在于,其中,所述药物连接体偶联物选自以下:

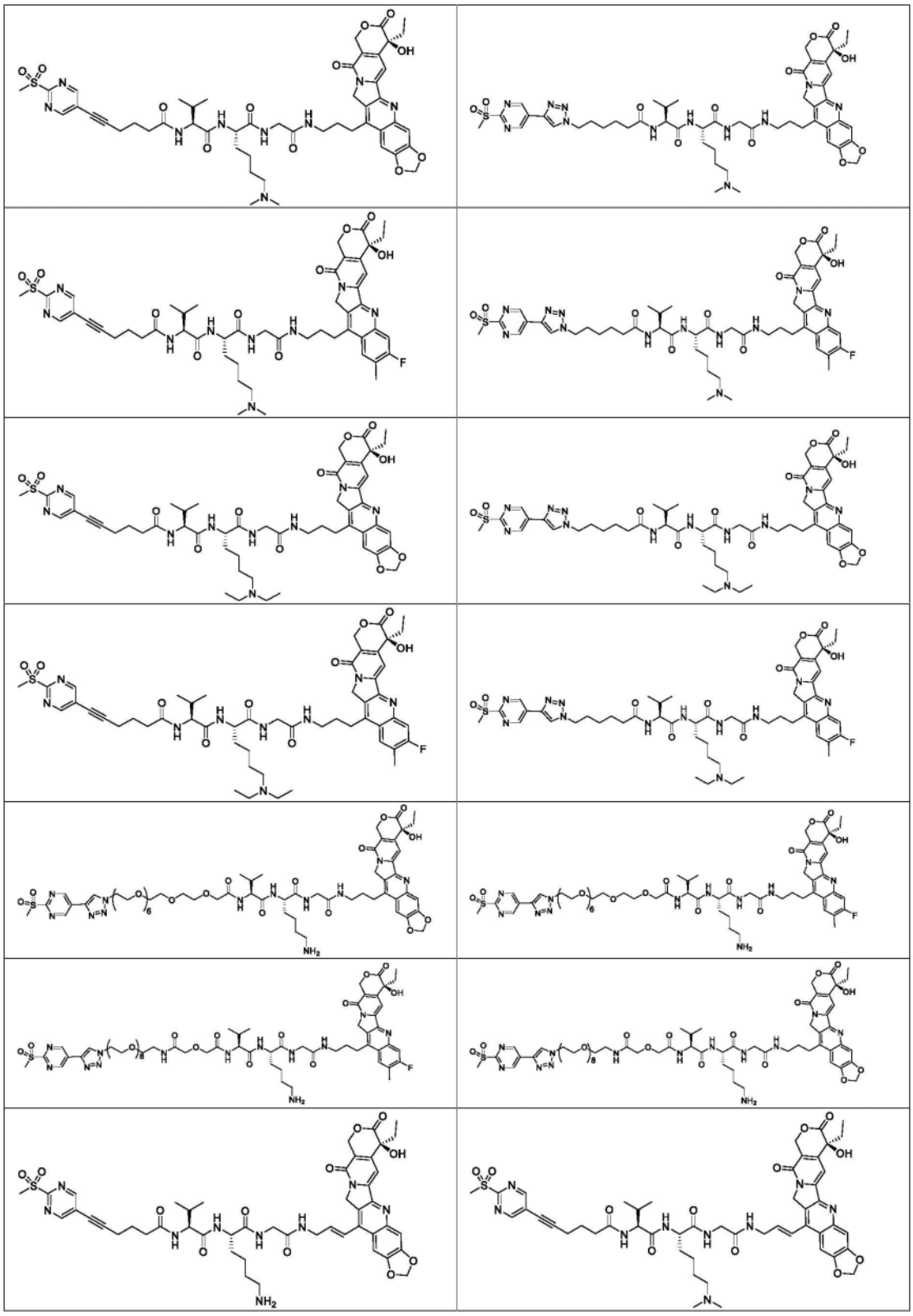
[1460]



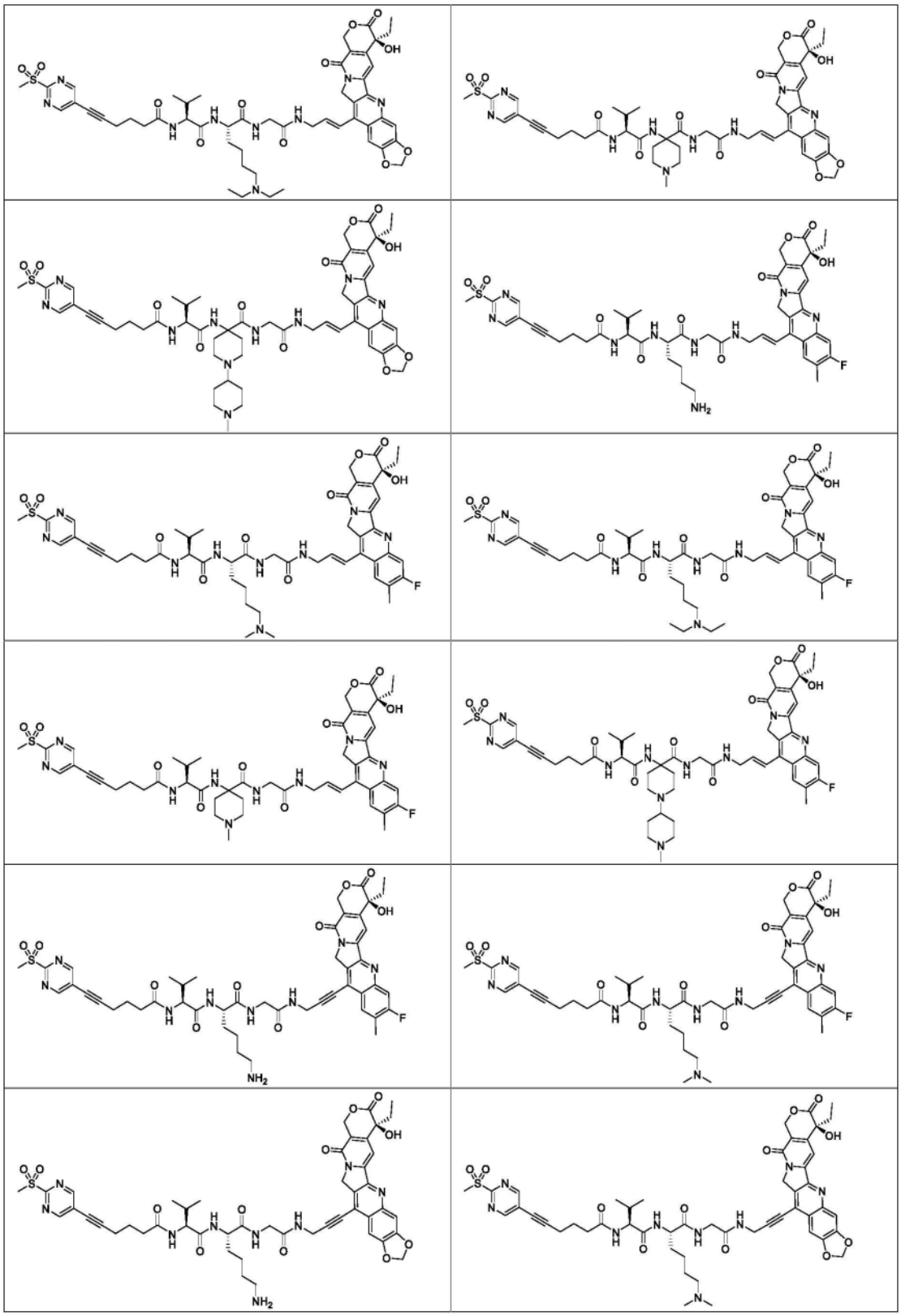
[1461]



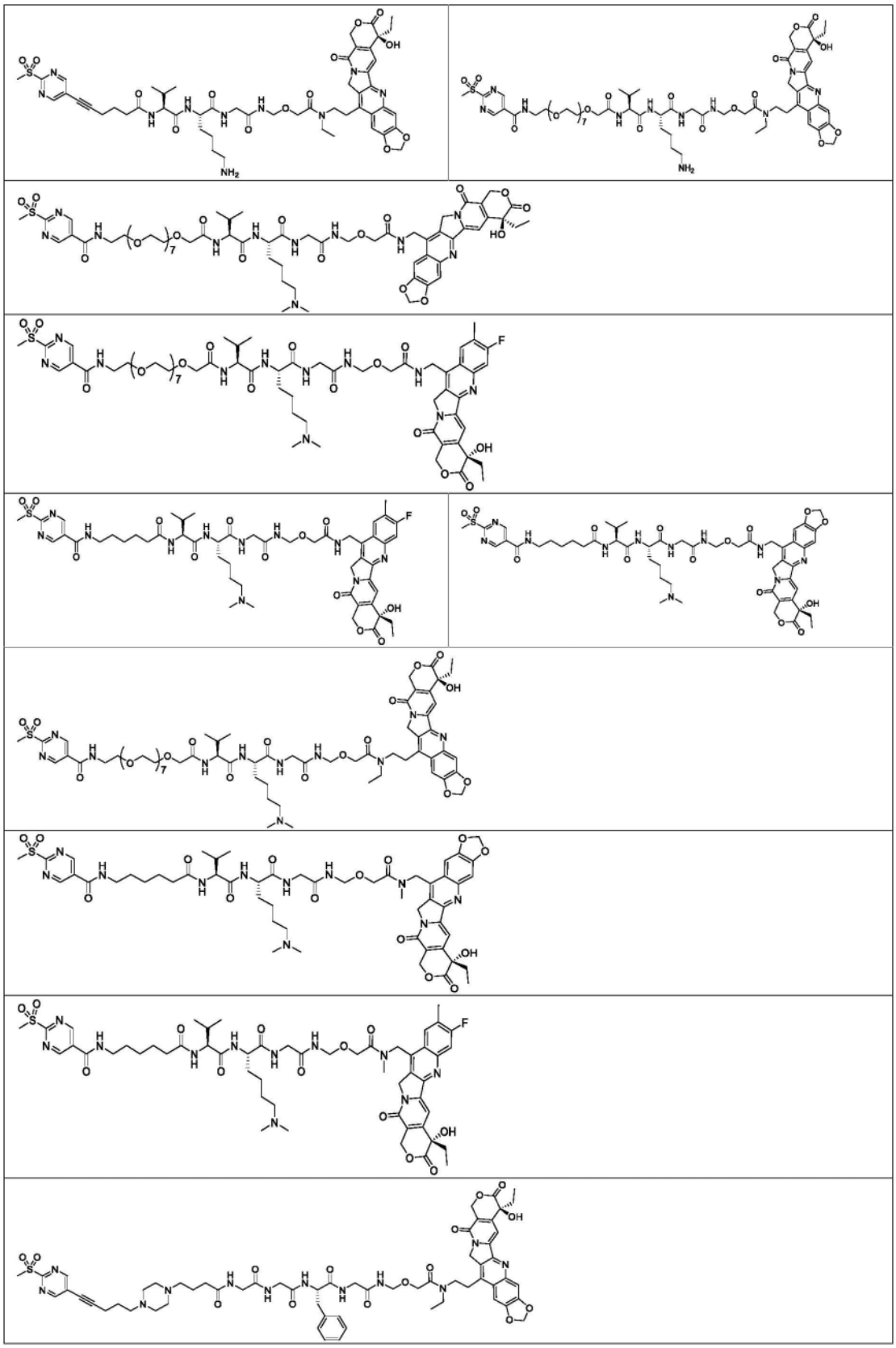
[1462]



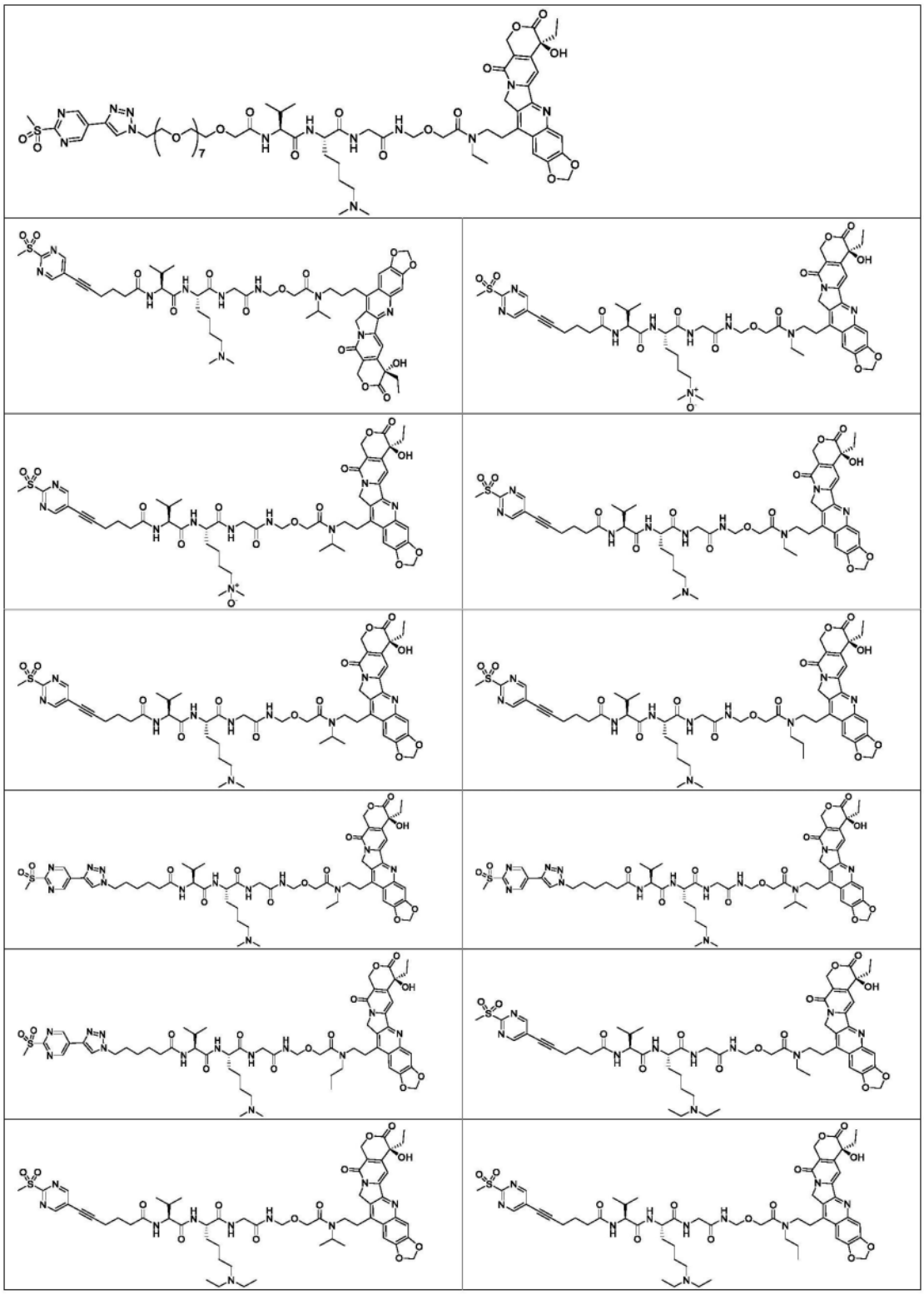
[1463]



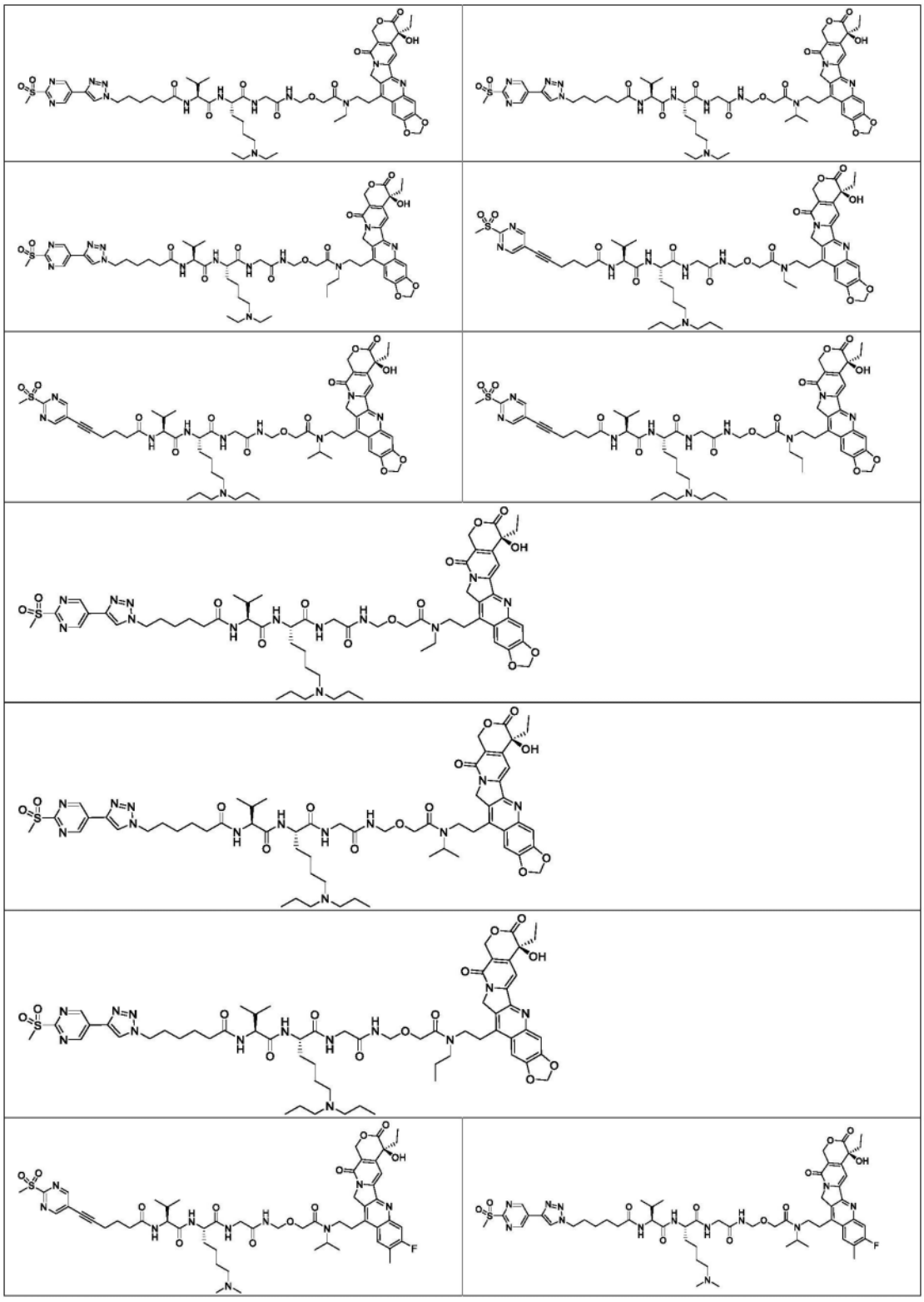
[1464]



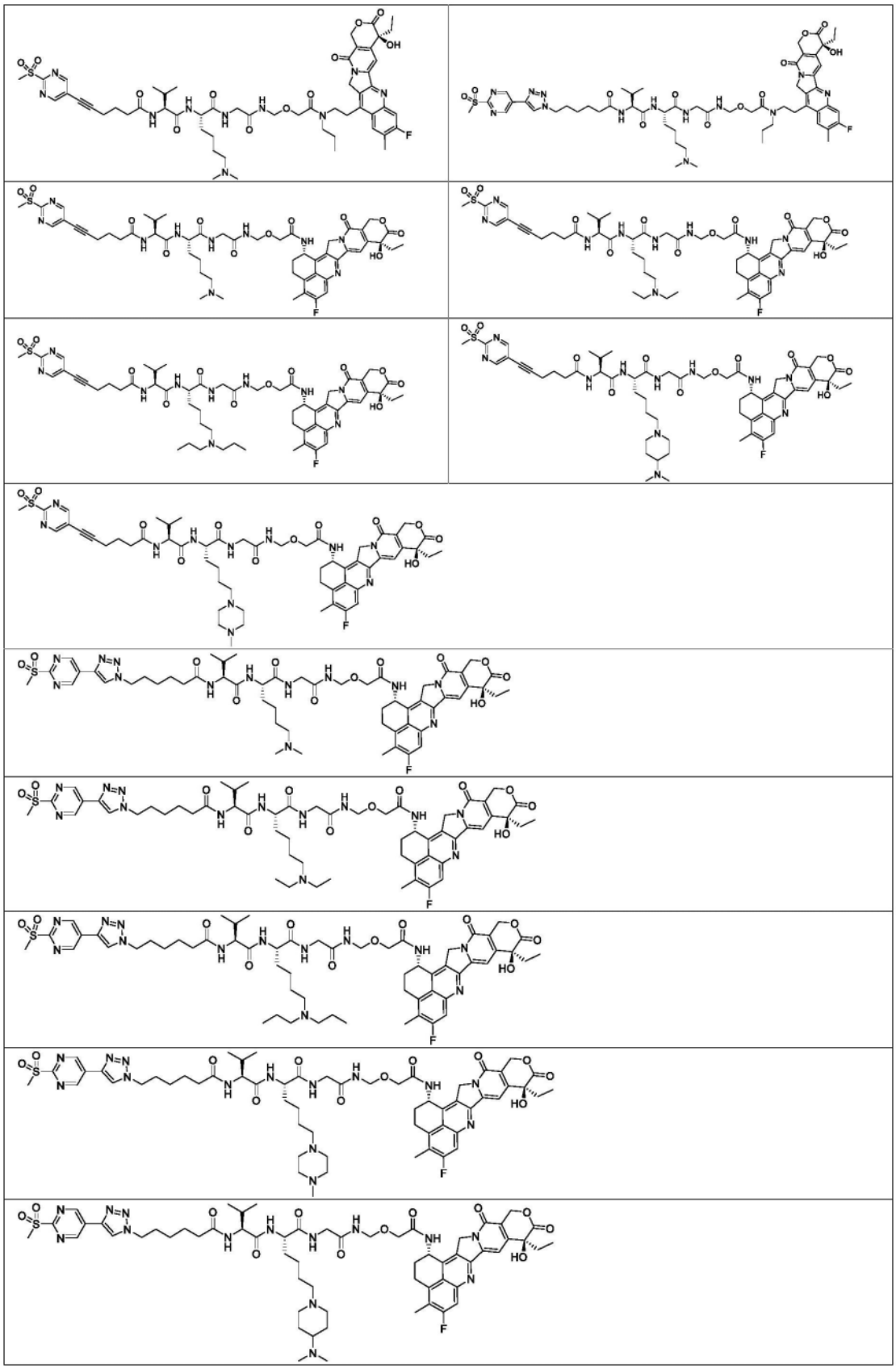
[1465]



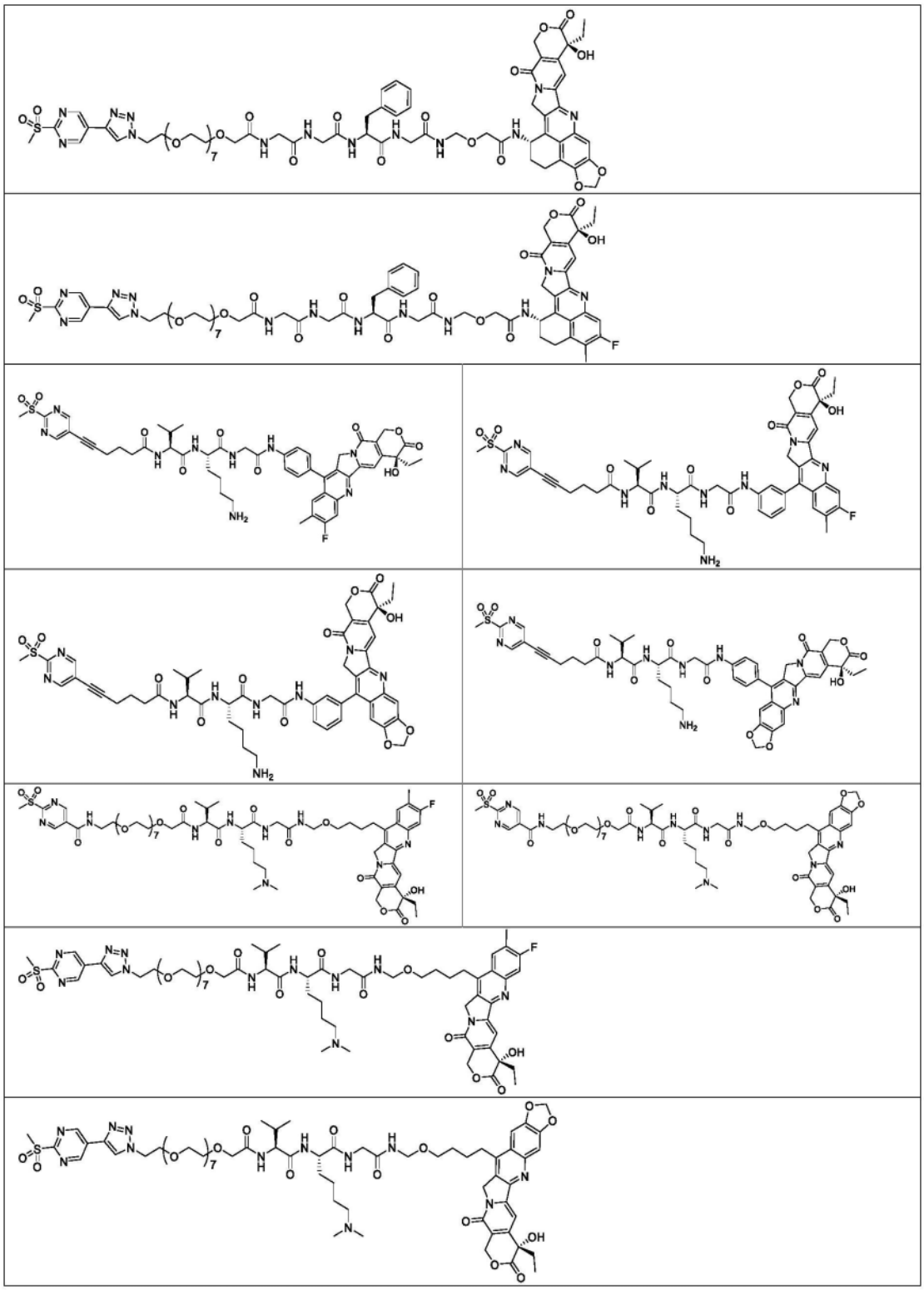
[1466]



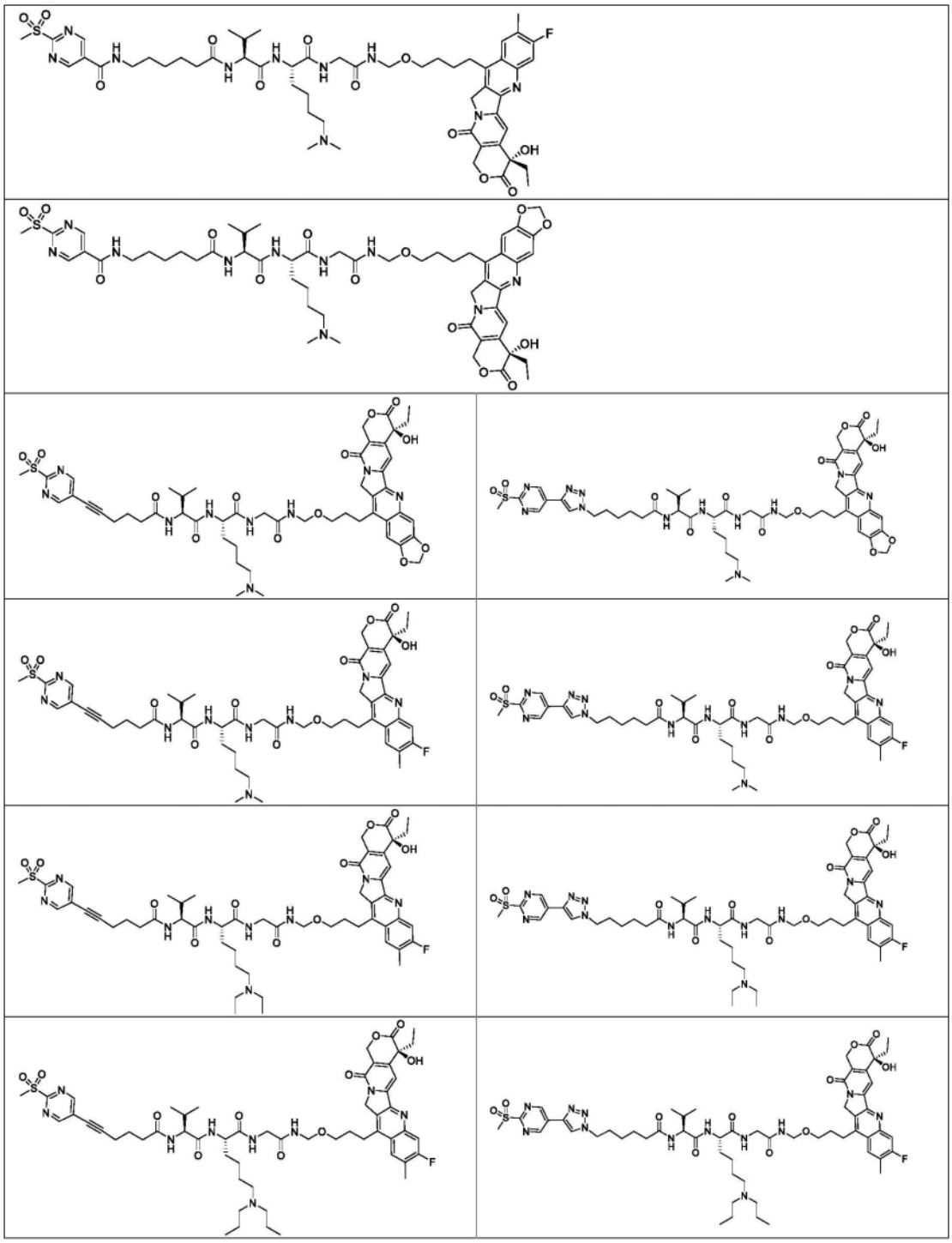
[1467]



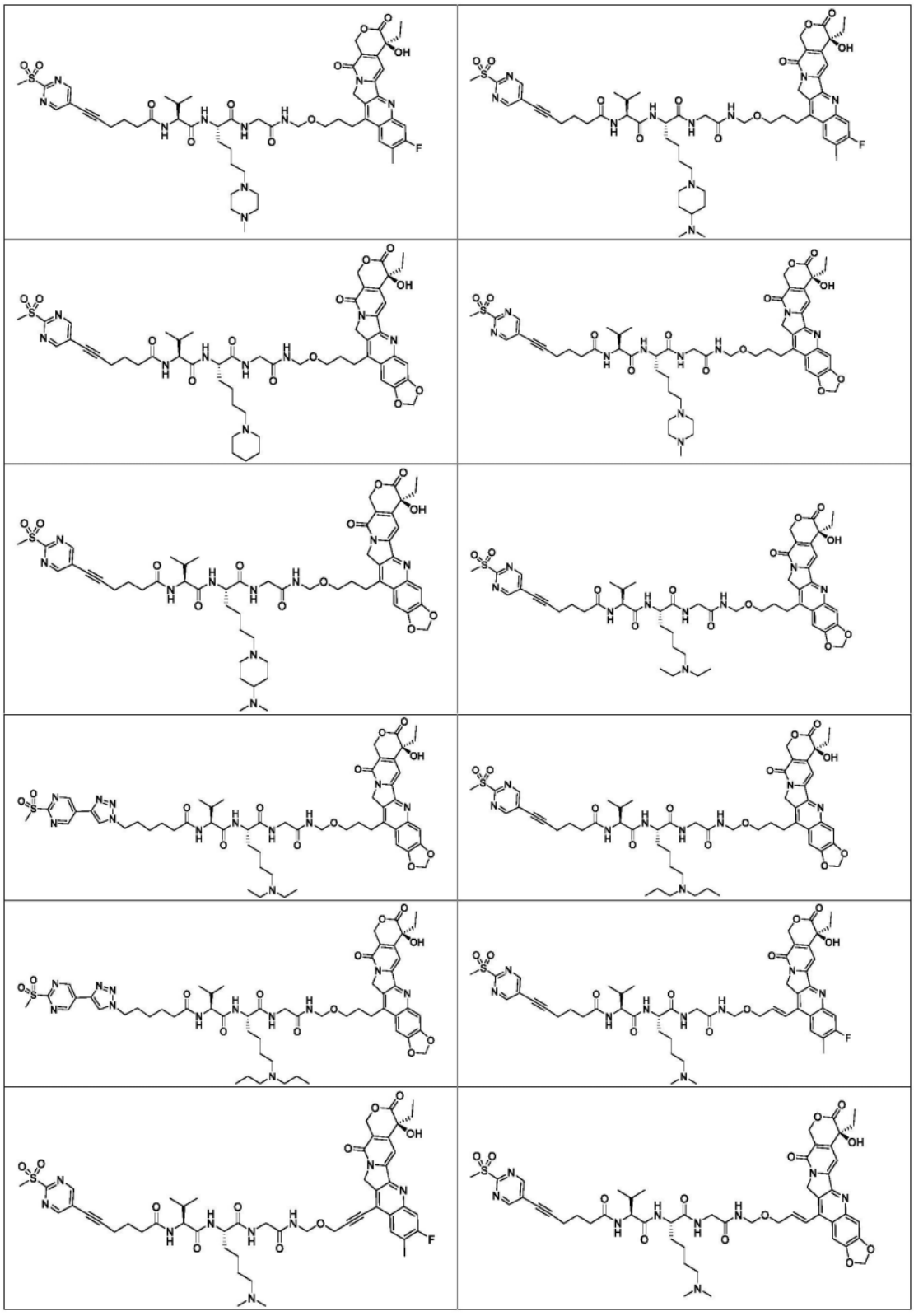
[1468]



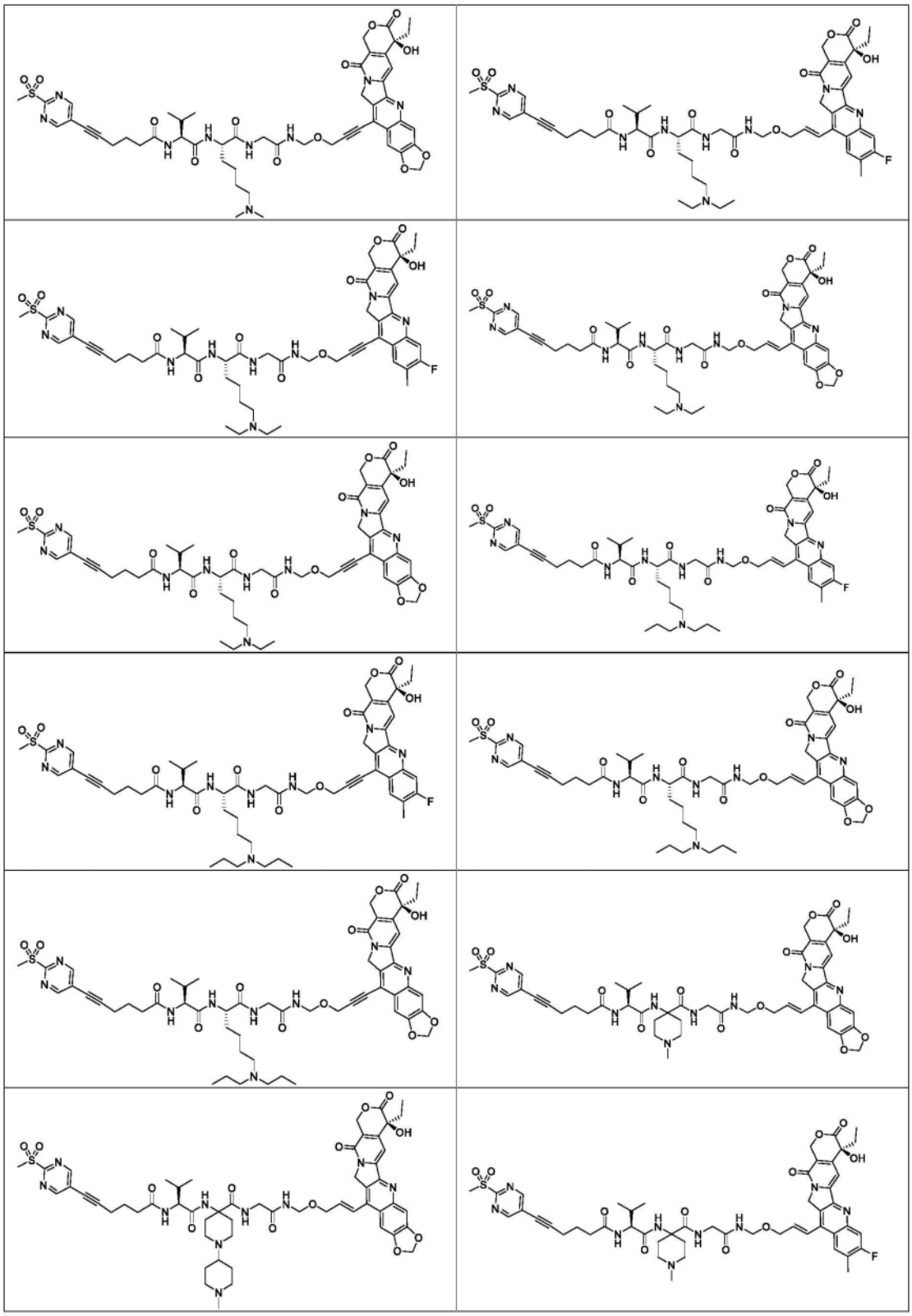
[1469]



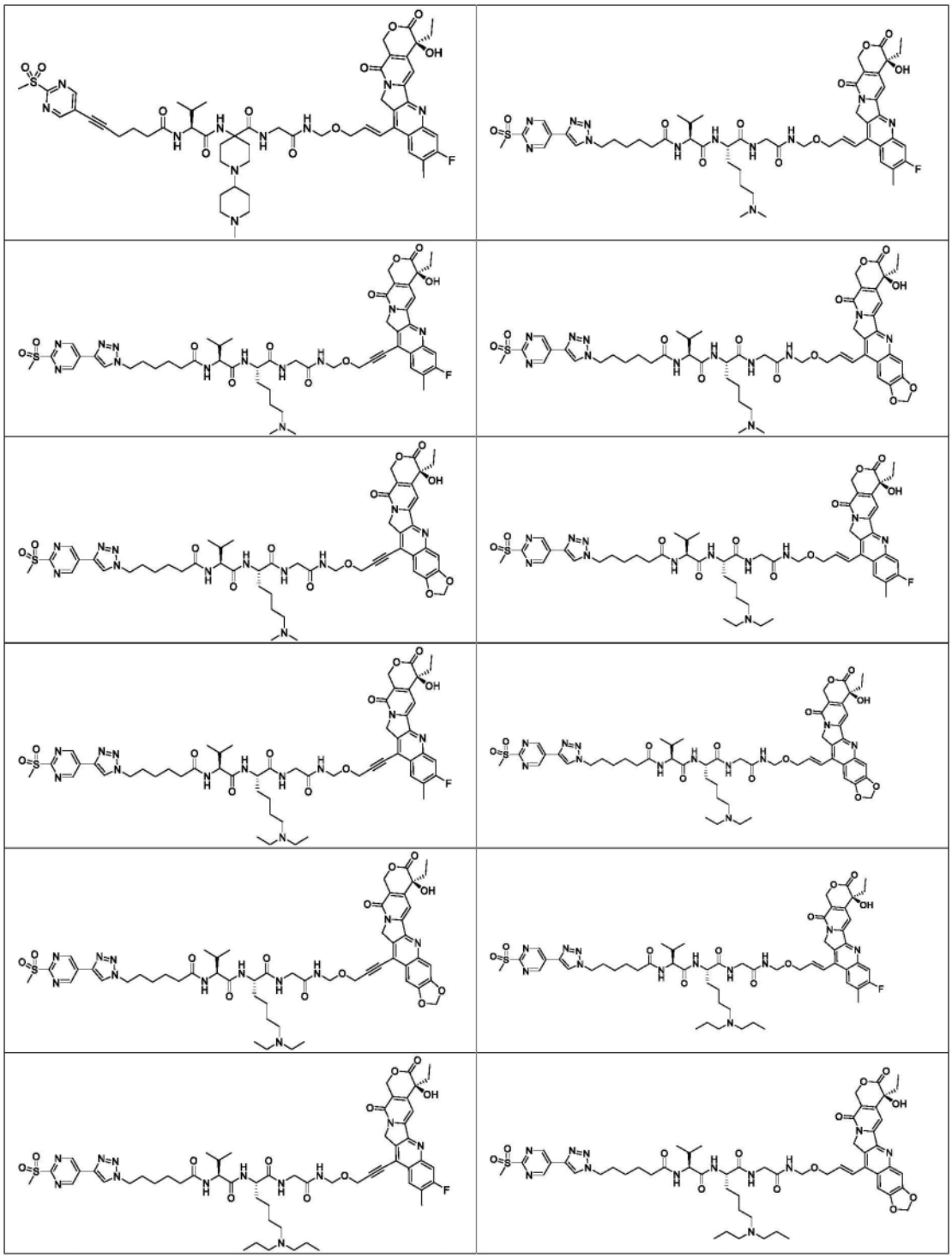
[1470]



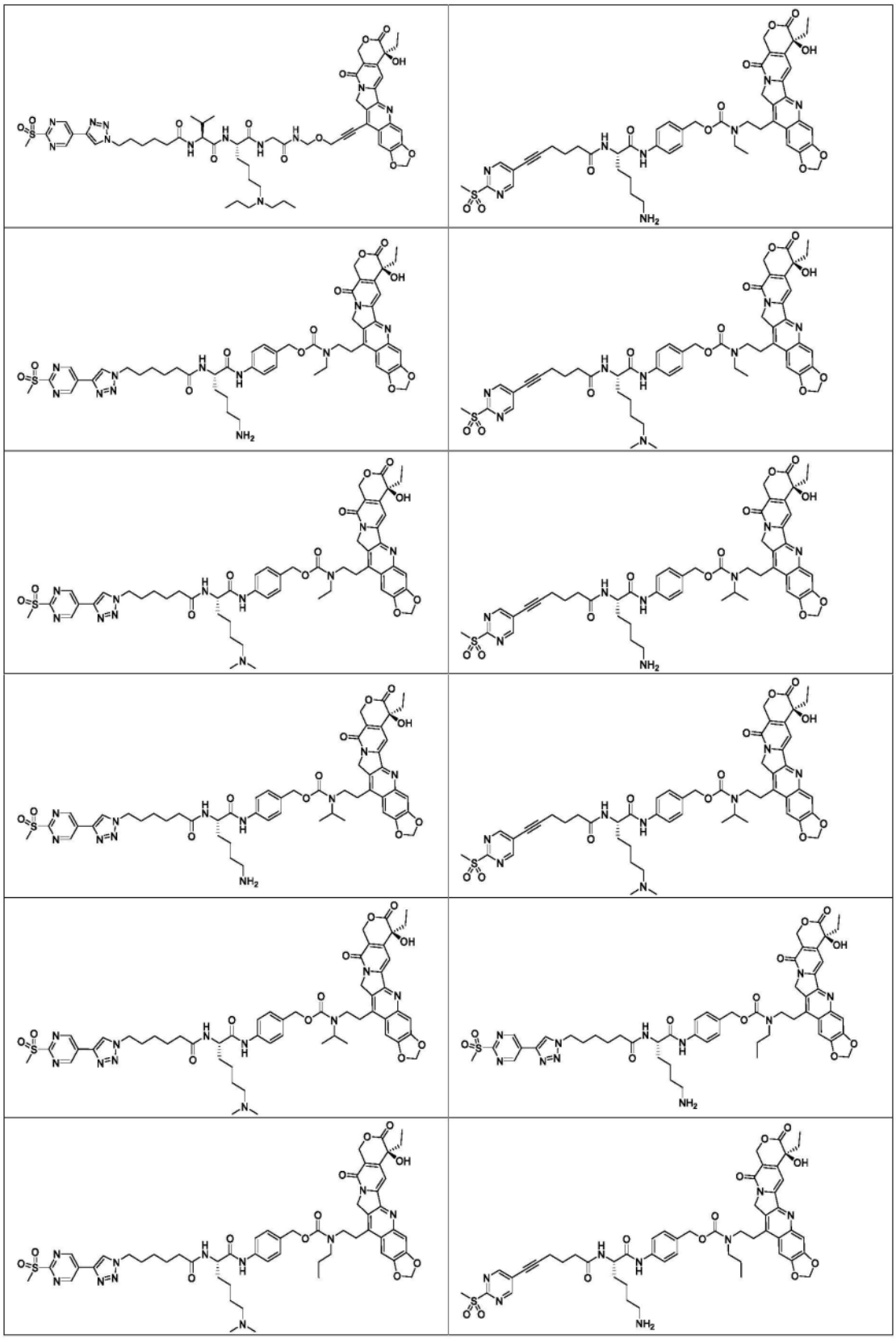
[1471]



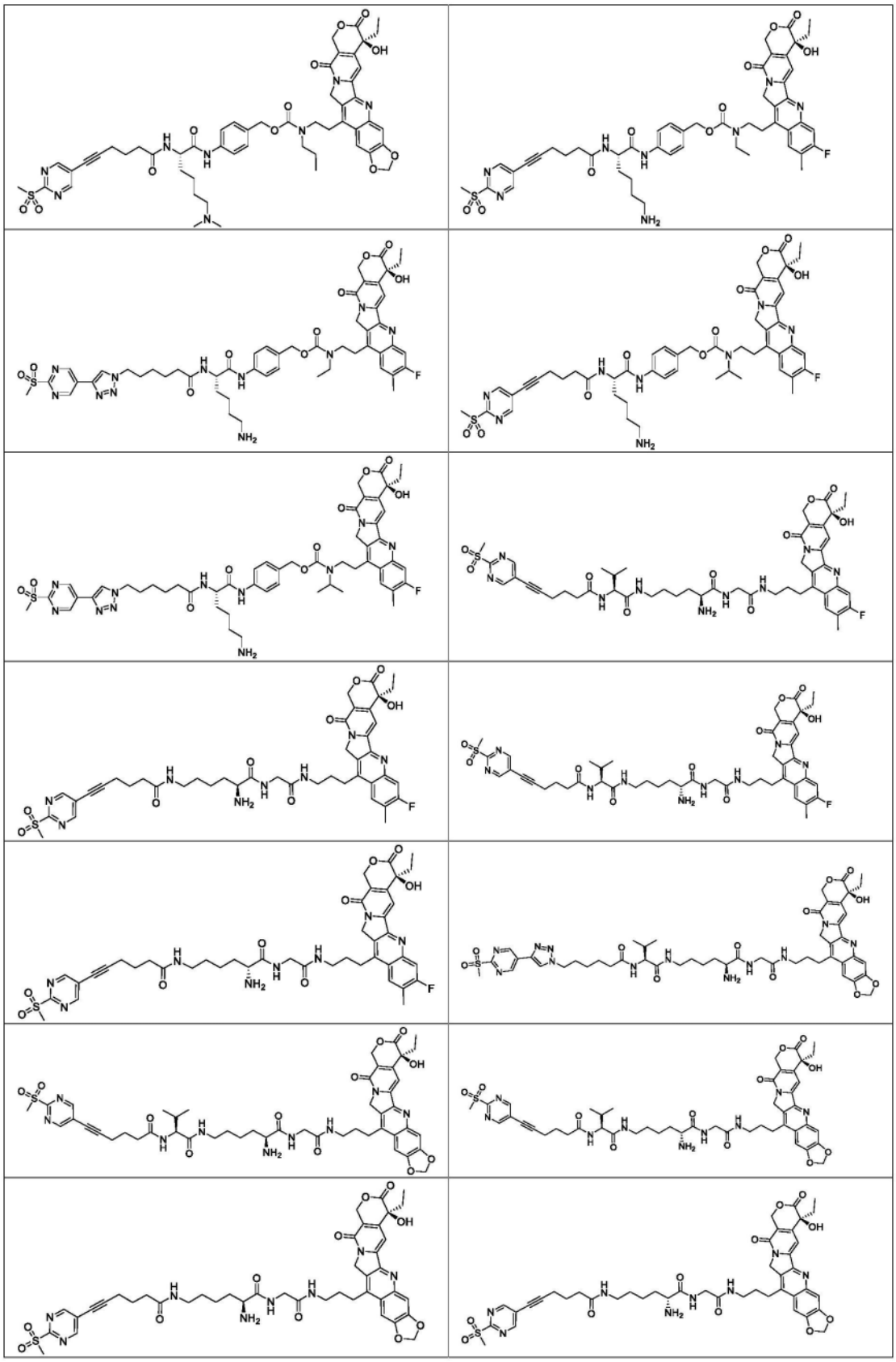
[1472]



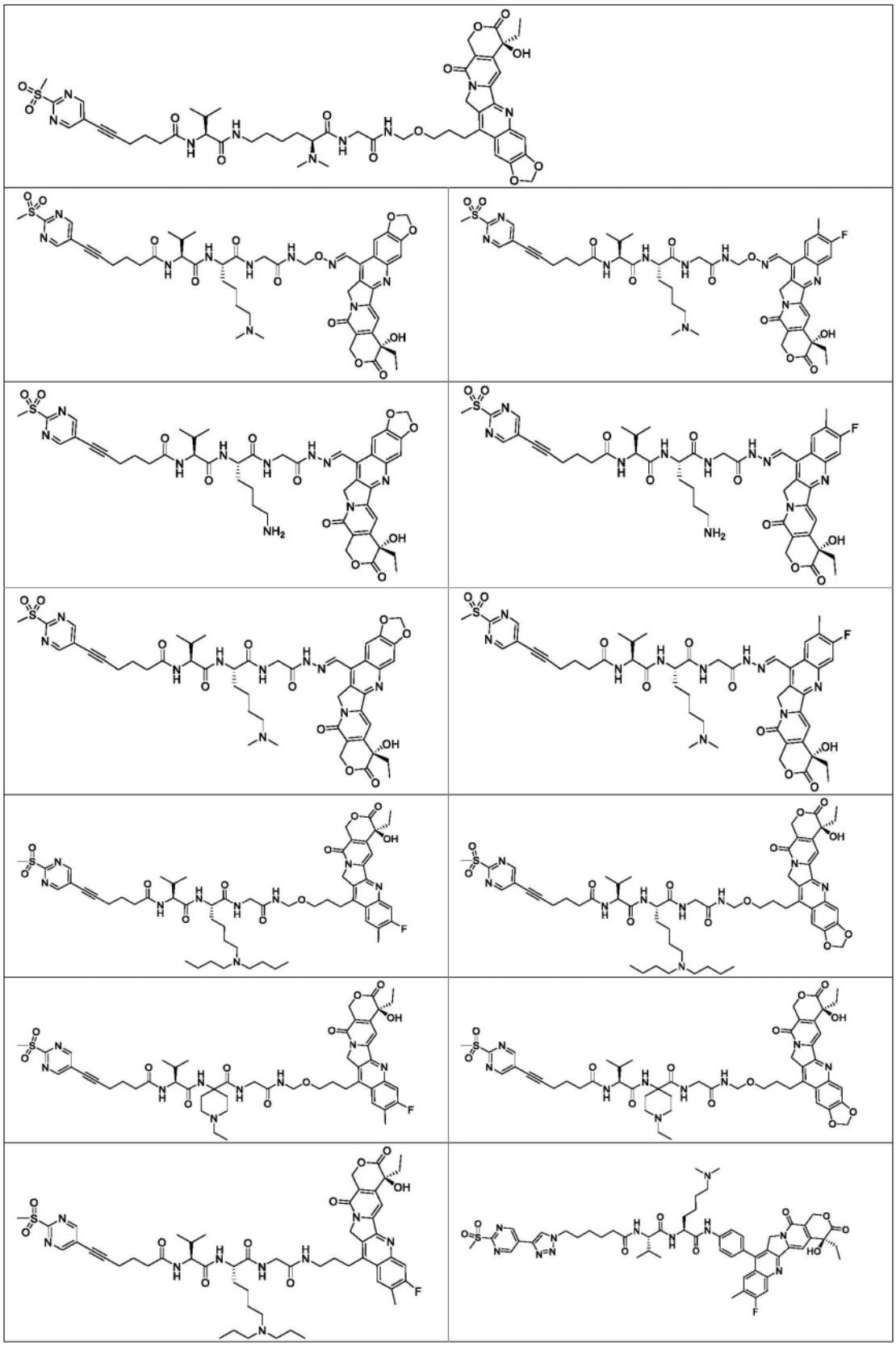
[1473]



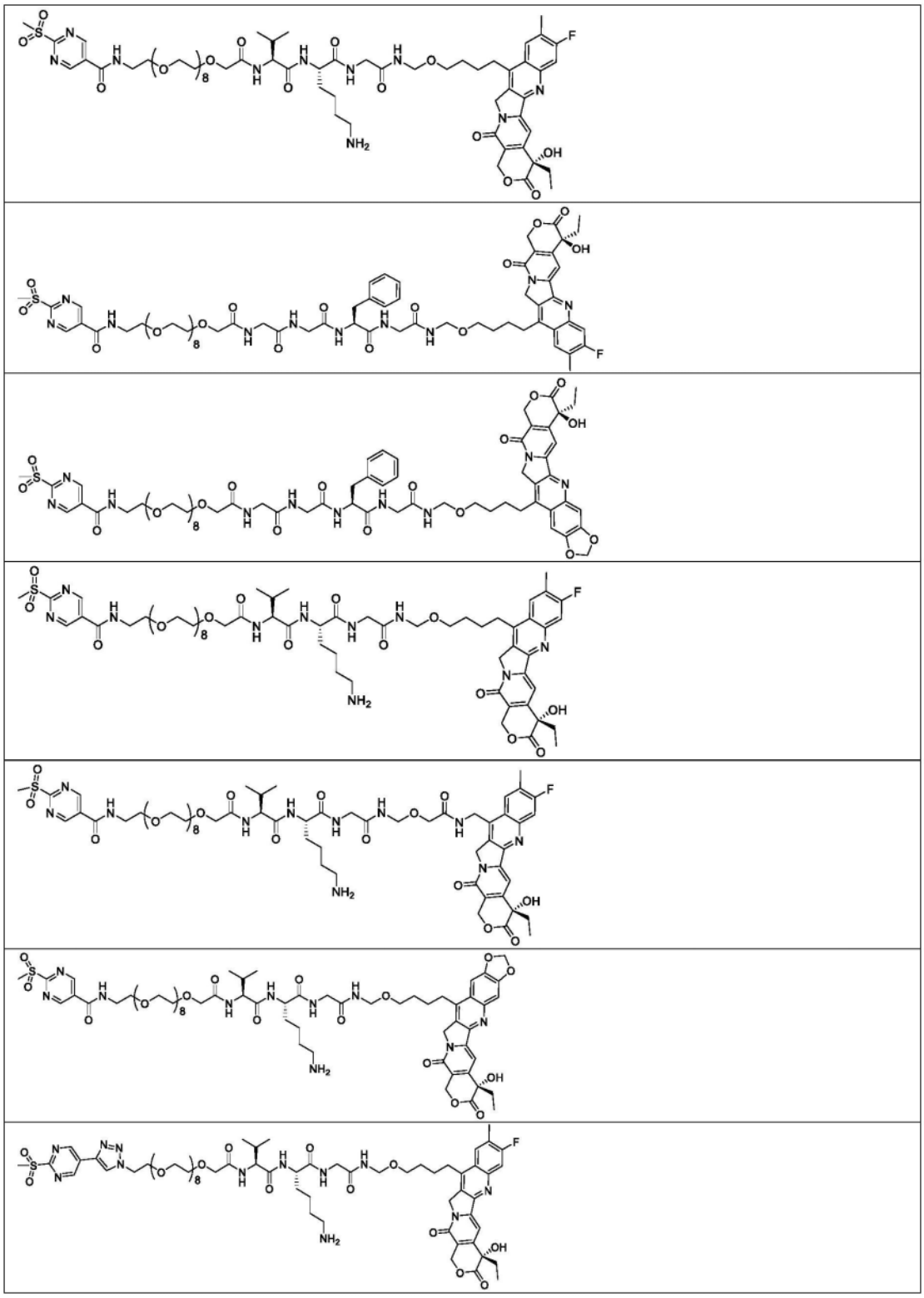
[1474]



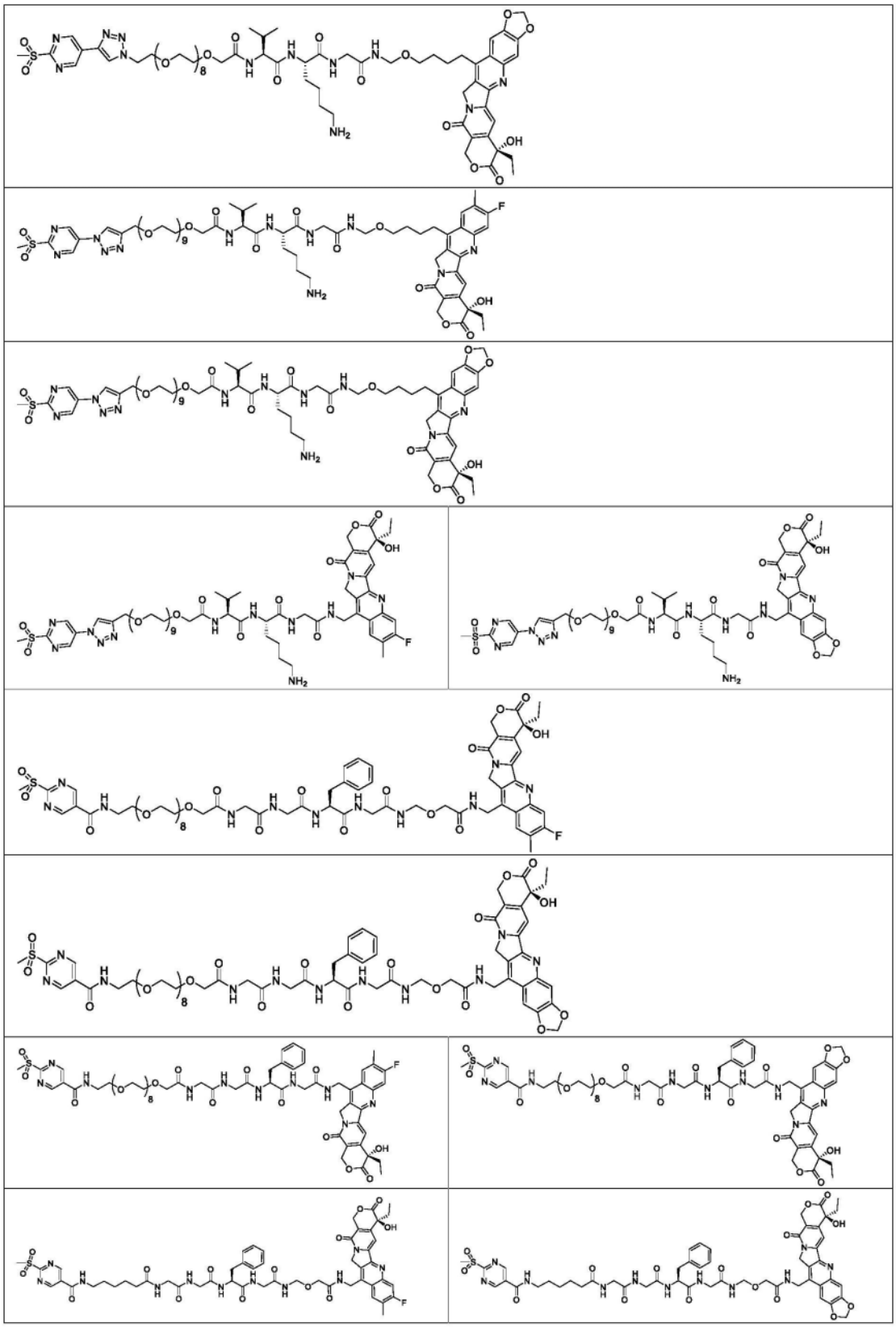
[1475]



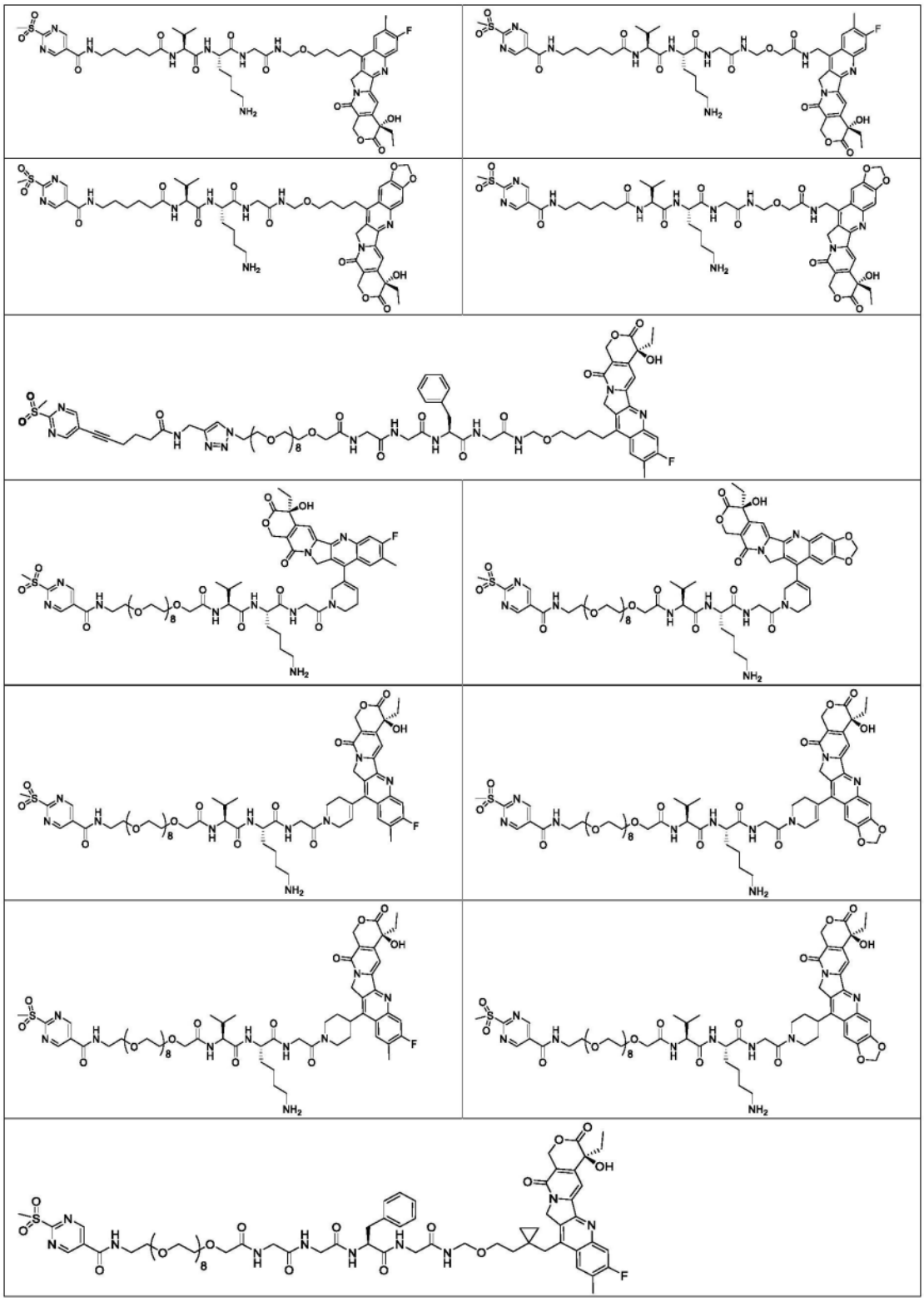
[1476]



[1477]



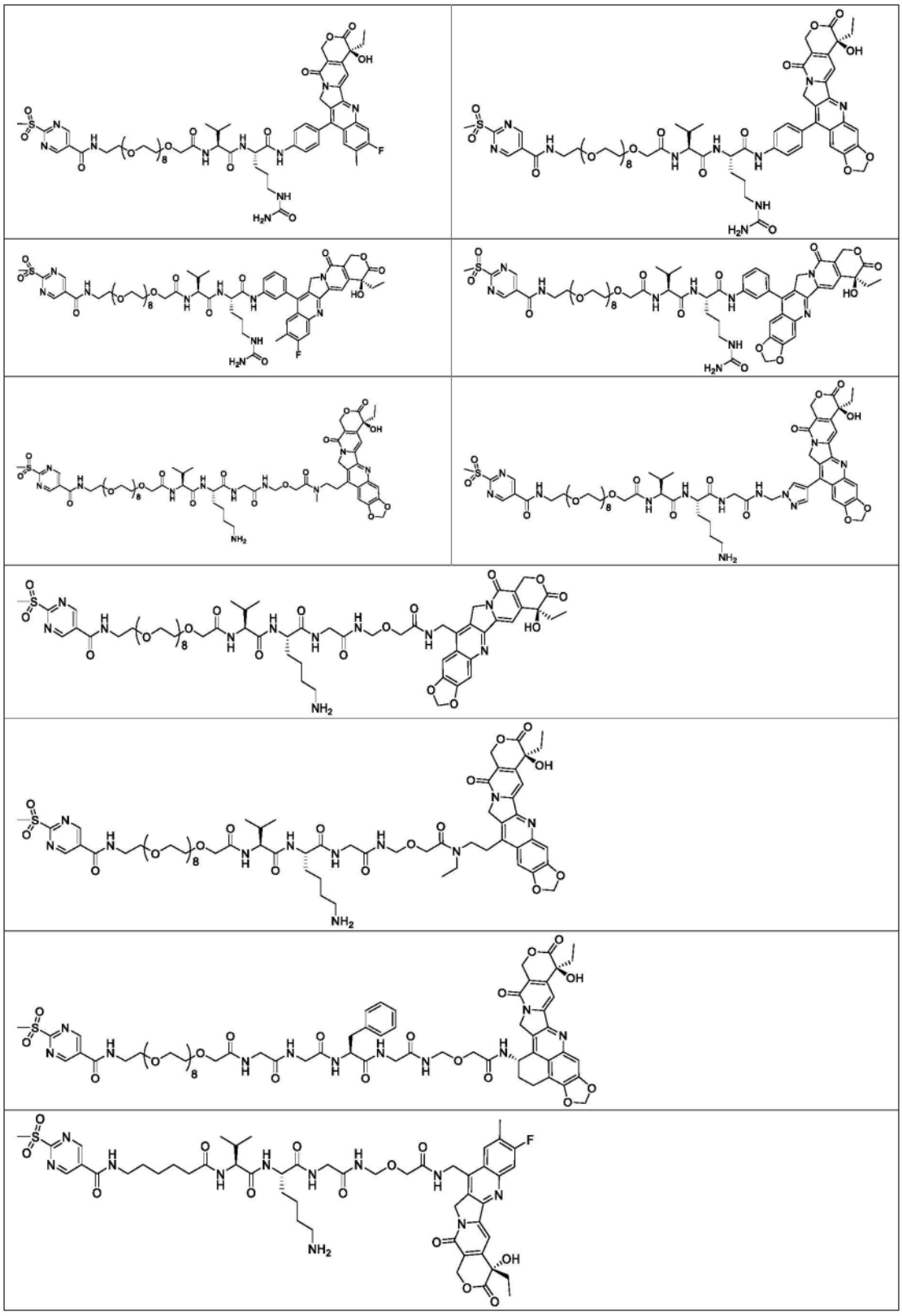
[1478]



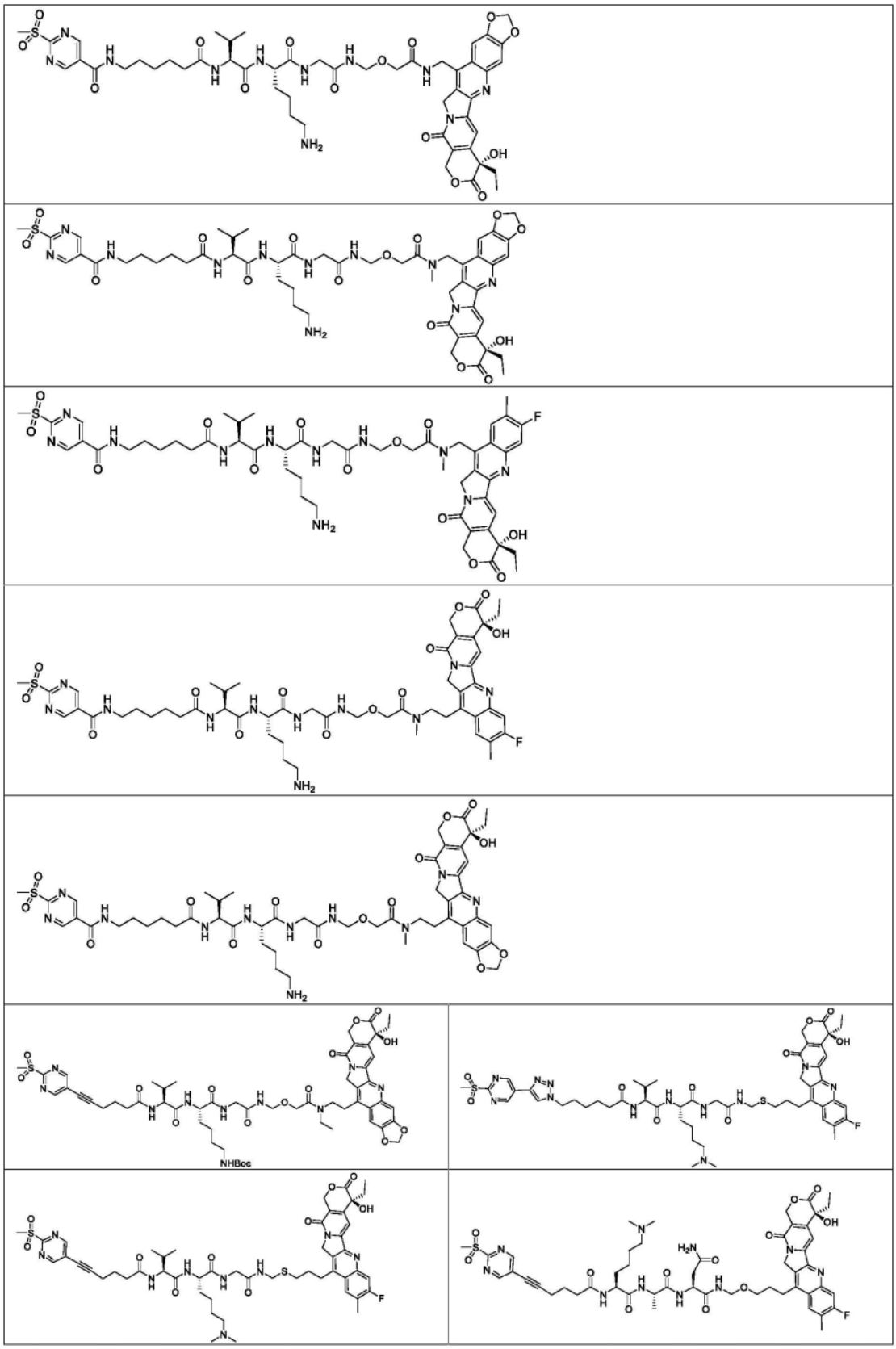
[1479]



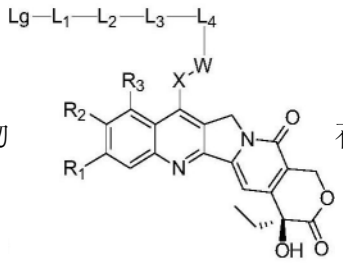
[1480]



[1481]



[1482] 33.制备实施方案28-32中任一项所述的配体药物偶联物的方法,其包括:

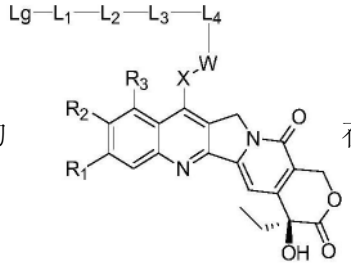
[1483] 将Tb与式III所示的药物连接体偶联物  在合适的溶剂和条件下进行偶联反应；

[1484] 其中：

[1485] L_1、L_2、L_3、L_4、Tb如实施方案1-24中任一项所定义；

[1486] R_1、R_2、R_3、X、W如实施方案13-24所定义；

[1487] Lg如实施方案28-32中任一项所定义。

[1488] 34.实施方案33的方法，其中，所述方法包括将Tb与式III所示的药物连接体偶联物  在合适的溶剂和条件下进行偶联反应形成C-S键的步骤；

[1489] 优选地，所述Tb与所述药物连接体偶联物的物质的量的比为1:(1-20)；

[1490] 优选地，所述偶联反应在水和/或有机溶剂中进行；优选地，所述有机溶剂选自N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、N-甲基吡咯烷酮、腈类(例如乙腈)、醇类(例如甲醇、乙醇)或其任意组合；所述的腈类可为乙腈，所述的醇类可为甲醇、乙醇；

[1491] 优选地，所述方法进一步包括将偶联产物进行纯化的步骤；优选地，通过层析方法对所述偶联产物进行纯化；优选地，所述层析方法包括离子交换层析、疏水层析、反相层析或亲和层析中的一种或多种。

[1492] 35.一种结合B7H3的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区CDR：

[1493] (a)SEQ ID NO:3或23所示的重链可变区VH中含有的HCDR1或其序列的变体、HCDR2或其序列的变体、以及HCDR3或其序列的变体；和/或

[1494] (b)SEQ ID NO:13或33所示的轻链可变区VL中含有的LCDR1或其序列的变体、LCDR2或其序列的变体、以及LCDR3或其序列的变体；

[1495] 优选地，所述序列的变体为与其来源CDR相比为具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加，例如1个、2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加的CDR；优选地，所述的置换为保守置换。

[1496] 36.实施方案35所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

[1497] (1)VH和/或VL，其中按IMGT编号系统定义：

[1498] (a)所述VH包含：序列为SEQ ID NO:10的HCDR1，序列为SEQ ID NO:11的HCDR2，序列为SEQ ID NO:12的HCDR3；和/或，

[1499] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:20的LCDR1,序列为GTF的LCDR2,序列为SEQ ID NO:22的LCDR3;

[1500] (b)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:10的HCDR1,序列为SEQ ID NO:11的HCDR2,序列为SEQ ID NO:12的HCDR3;和/或,

[1501] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:40的LCDR1,序列为GAS的LCDR2,序列为SEQ ID NO:42的LCDR3;

[1502] (c)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:30的HCDR1,序列为SEQ ID NO:31的HCDR2,序列为SEQ ID NO:32的HCDR3;和/或,

[1503] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:40的LCDR1,序列为GAS的LCDR2,序列为SEQ ID NO:42的LCDR3;

[1504] 或

[1505] (d)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:30的HCDR1,序列为SEQ ID NO:31的HCDR2,序列为SEQ ID NO:32的HCDR3;和/或,

[1506] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:20的LCDR1,序列为GTF的LCDR2,序列为SEQ ID NO:22的LCDR3;

[1507] (2)VH和/或VL,其中按chothia编号系统定义:

[1508] (a)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:4的HCDR1,序列为SEQ ID NO:5的HCDR2,序列为SEQ ID NO:6的HCDR3;和/或,

[1509] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:14的LCDR1,序列为SEQ ID NO:15的LCDR2,序列为SEQ ID NO:16的LCDR3;

[1510] (b)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:24的HCDR1,序列为SEQ ID NO:25的HCDR2,序列为SEQ ID NO:26的HCDR3;和/或,

[1511] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:34的LCDR1,序列为SEQ ID NO:35的LCDR2,序列为SEQ ID NO:36的LCDR3;

[1512] (c)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:4的HCDR1,序列为SEQ ID NO:5的HCDR2,序列为SEQ ID NO:6的HCDR3;和/或,

[1513] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:34的LCDR1,序列为SEQ ID NO:35的LCDR2,序列为SEQ ID NO:36的LCDR3;

[1514] 或

[1515] (d)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:24的HCDR1,序列为SEQ ID NO:25的HCDR2,序列为SEQ ID NO:26的HCDR3;和/或,

[1516] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:14的LCDR1,序列为SEQ ID NO:15的LCDR2,序列为SEQ ID NO:16的LCDR3;

[1517] (3)VH和/或VL,其中按kabat编号系统定义:

[1518] (a)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[1519] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3;

[1520] (b)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序

列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[1521] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[1522] (c)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:7的HCDR1,序列为SEQ ID NO:8的HCDR2,序列为SEQ ID NO:9的HCDR3;和/或,

[1523] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:37的LCDR1,序列为SEQ ID NO:38的LCDR2,序列为SEQ ID NO:39的LCDR3;

[1524] 或

[1525] (d)所述VH包含:序列为SEQ ID NO:27的HCDR1,序列为SEQ ID NO:28的HCDR2,序列为SEQ ID NO:29的HCDR3;和/或,

[1526] 所述VL包含:序列为SEQ ID NO:17的LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的LCDR2,序列为SEQ ID NO:19的LCDR3;

[1527] 可选地,本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区VH和/或轻链可变区VL,其中,与前述IMGT、chothia或kabat定义的CDR相比,所述重链可变区VH和/或轻链可变区VL中至少一个CDR含有突变,所述突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合,例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;优选地,所述的置换为保守置换;

[1528] 更优选地,所述抗体或其抗原结合片段结合人B7-H3和/或猴B7-H3。

[1529] 37.实施方案35或36所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[1530] (a)SEQ ID NO:3或23所示的VH,和/或,SEQ ID NO:13或33任一项所示的VL;

[1531] (b)与(a)中的任一VH相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VH;和/或,与(a)中的任一VL相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VL;或者

[1532] (c)与(a)中的任一VH相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的VH;和/或,与(a)中的任一VL具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的VL;优选地,所述的置换是保守置换。

[1533] 38.实施方案35-37任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[1534] (a)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[1535] (b)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[1536] (c)SEQ ID NO:3所示序列的VH和SEQ ID NO:33所示序列的VL;

[1537] (d)SEQ ID NO:23所示序列的VH和SEQ ID NO:13所示序列的VL;

[1538] (e)VH和VL,与(a)至(d)任一组中的VH和VL相比,其VH具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少

97％、至少98％或至少99％的序列同一性;和/或,其VL具有至少70％、至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性;或者

[1539] (f)VH和VL,与(a)至(d)任一组中的VH和VL相比,其VH具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;和/或,其VL具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;优选地,所述的置换是保守置换。

[1540] 39.实施方案35-38任一项所述抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体;

[1541] 可选地,所述抗体或其抗原结合片段选自scFv、Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、双抗体(diabody)和多特异性抗体;

[1542] 可选地,所述scFv包含:

[1543] (i)SEQ ID NO:1或2所示的序列;

[1544] (ii)与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)的序列;或

[1545] (iii)与(i)所示的序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的序列;

[1546] 优选地,(ii)中所述的置换是保守置换。

[1547] 40.实施方案35-39任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段进一步包含:

[1548] (a)人免疫球蛋白的重链恒定区CH或其变体;和/或

[1549] (b)人免疫球蛋白的轻链恒定区CL或其变体,

[1550] 其中,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至少70％、至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性;或者,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如至多50个、至多45个、至多40个、至多35个、至多30个、至多25个、至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;优选地,所述的置换是保守置换;

[1551] 优选地,所述重链恒定区是IgG重链恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区;和/或,所述轻链恒定区是κ或λ轻链恒定区;

[1552] 更优选地,所述抗体或其抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区;和/或所述抗体或其抗原结合片段包含人κ轻链恒定区。

[1553] 41.实施方案40所述的抗体或其抗原结合片段,其中,

[1554] 所述重链恒定区包括SEQ ID NO:43所示的CH或其变体,所述变体与SEQ ID NO:43

相比具有至多20个氨基酸的保守置换例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的保守置换;或者与SEQ ID NO:43相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;和/或

[1555] 所述轻链恒定区包括SEQ ID NO:44所示的CL或其变体,所述变体与SEQ ID NO:44相比具有至多20个氨基酸的保守置换例如至多20个、至多15个、至多10个或至多5个氨基酸的保守置换,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的保守置换,或者与SEQ ID NO:44相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;

[1556] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:43所示的重链恒定区CH和SEQ ID NO:44所示的轻链恒定区CL。

[1557] 42.实施方案35-41任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体包括:

[1558] (a)包括SEQ ID NO:3所示的VH和SEQ ID NO:43所示的CH的重链,和,包括SEQ ID NO:13所示的VL和SEQ ID NO:44所示的CL的轻链;优选包括SEQ ID NO:45所示的重链和SEQ ID NO:46所示的轻链;

[1559] (b)包括SEQ ID NO:23所示的VH和SEQ ID NO:43所示的CH的重链,和,包括SEQ ID NO:33所示的VL和SEQ ID NO:44所示的CL的轻链;优选包括SEQ ID NO:47所示的重链和SEQ ID NO:48所示的轻链。

[1560] 43.多特异性抗体,其包含实施方案35-42任一项所述的抗体或其抗原结合片段,和另外的抗体或其片段或抗体类似物;

[1561] 优选地,所述多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体或四特异性抗体。

[1562] 44.分离的核酸分子,其编码实施方案35-42任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或实施方案43所述的多特异性抗体。

[1563] 45.载体,其包含实施方案44所述的分离的核酸分子;优选地,所述载体为克隆载体或表达载体。

[1564] 46.宿主细胞,其包含实施方案44所述的分离的核酸分子或实施方案45所述的载体。

[1565] 47.制备实施方案35-42任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或实施方案43所述的多特异性抗体的方法,其包括,在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下,培养实施方案46所述的宿主细胞,和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段,或所述多特异性抗体。

[1566] 48.一种抗体-药物偶联物,其中抗体为实施方案35-42任一项的抗体或其抗原结合片段,或实施方案43所述的多特异性抗体,其通过接头与偶联部分连接,所述偶联部分选自:可检测的标记、放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质、酶、聚乙二醇、核素、核酸、小分子毒素、具有结合活性多肽、蛋白、受体、配体,以及其它抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡或坏死的活性物质。

[1567] 49.一种配体药物偶联物,其包含实施方案1-28中任一项所述的配体药物偶联物,所述的配体药物偶联物具有两种或多种q值;

[1568] 可选地,所述配体药物偶联物中的药物与抗体的比例(DAR)选自1-10中的整数或小数;

[1569] 优选地,所述配体药物偶联物中的药物与抗体的比例(DAR)选自1.5-2.5、3.5-4.5、5.5-6.5和7.5-8.5;

[1570] 优选地,所述配体药物偶联物中的药物与抗体的比例(DAR)选自约2.0、4.0、6.0和8.0;

[1571] 优选地,所述配体药物偶联物中的药物与抗体的比例(DAR)选自2、2.5、3、3.5、4、4.5,5、5.5、6、6.5、7、7.2、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.7、8.9和9。

[1572] 50.一种药物组合物,其包含物质A,及任选的一种或多种药用辅料,所述的物质A为如实施方案1-24中任一项所述的配体药物偶联物、或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物、或如实施方案26或27所述的化合物、或如实施方案28-32任一项药物连接体偶联物、或如实施方案35-42任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或如实施方案43所述的多特异性抗体、或如实施方案44所述的核酸分子、或如实施方案45所述的载体、或如实施方案46所述的宿主细胞、或如实施方案49所述的配体药物偶联物;优选还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[1573] 51.一种物质A或者实施方案50所述的药物组合物在制备治疗和/或预防与细胞活动异常相关的疾病的药物中的用途;所述的物质A为如实施方案1-24中任一项所述的配体药物偶联物、或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物、或如实施方案26或27所述的化合物、或如实施方案28-32任一项所述的药物连接体偶联物、或如实施方案35-42任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或如实施方案43所述的多特异性抗体、或如实施方案44所述的核酸分子、或如实施方案45所述的载体、或如实施方案46所述的宿主细胞或如实施方案49所述的配体药物偶联物;所述的与细胞活动异常相关的疾病可为癌症疾病;

[1574] 优选地,所述癌症疾病选自食管癌、脑瘤、肺癌、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤、前列腺癌或甲状腺癌;所述的食管癌例如食管腺癌或食管鳞状细胞癌;所述的肺癌例如小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌或肺腺癌;所述的中枢神经系统肿瘤例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤;所述结肠癌例如人结肠腺癌;

[1575] 优选地,所述癌症疾病选自结肠癌,结直肠癌,结肠腺癌,肺癌,乳腺癌,前列腺癌,食管鳞癌;

[1576] 更优选地,所述癌症疾病为与B7H3相关的癌症疾病;

[1577] 更优选地,所述癌症疾病为与Her3相关的癌症疾病;

[1578] 更优选地,所述癌症疾病为与EGFR相关的癌症疾病;

[1579] 更优选地,所述癌症疾病为与Trop-2或Her 2相关的癌症疾病;

[1580] 最优选地,所述癌症疾病为乳腺癌或肺癌为非小细胞肺癌。

[1581] 在本公开中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验

室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本公开,下面提供相关术语的定义和解释。

[1582] 如本文所使用,术语“药学上可接受的盐”的例子是由形成药学上可以接受的阴离子的有机酸形成的有机酸加合盐,包括但不限于甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、苯甲酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、抗坏血酸盐、α-酮戊二酸盐、α-甘油磷酸盐、烷基磺酸盐或芳基磺酸盐;优选地,所述烷基磺酸盐为甲基磺酸盐或乙基磺酸盐;所述芳基磺酸盐为苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。也可形成合适的无机盐,包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐、硫酸盐或磷酸盐等。

[1583] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences.Edited by Gennaro AR,19th ed.Pennsylvania:Mack Publishing Company,1995),并且包括但不限于:pH调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂,稀释剂,维持渗透压的试剂,延迟吸收的试剂,防腐剂。

[1584] 药学上可接受的盐可使用本领域熟知的标准程序获得,例如,通过将足量的碱性化合物和提供药学上可以接受的阴离子的合适的酸反应。

[1585] 本公开中,所述药用辅料是指生产药品和调配处方时,使用的赋形剂和附加剂,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。药用辅料除了赋型、充当载体、提高稳定性外,还具有增溶、助溶、缓控释等重要功能,是可能会影响到药品的质量、安全性和有效性的重要成分。根据其来源可分为天然物、半合成物和全合成物。根据其作用与用途可分为:溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、黏合剂、崩解剂、填充剂、润滑剂、湿润剂、渗透压调节剂、稳定剂、助流剂、矫味剂、防腐剂、助悬剂、包衣材料、芳香剂、抗黏着剂、抗氧剂、螯合剂、渗透促进剂、pH调节剂、缓冲剂、增塑剂、表面活性剂、发泡剂、消泡剂、增稠剂、包合剂、保湿剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂与反絮凝剂、助滤剂、释放阻滞剂等;根据其给药途径可分为口服、注射、黏膜、经皮或局部给药、经鼻或口腔吸入给药和眼部给药等。同一药用辅料可用于不同给药途径的药物制剂,且有不同的作用和用途。

[1586] 所述药物组合物可根据给药途径制成各种适宜的剂型。例如片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服溶液剂、口服混悬剂、口服乳剂、散剂、酊剂、糖浆剂、注射剂、栓剂、软膏剂、乳膏剂、糊剂、眼用制剂、丸剂、植入剂、气雾剂、粉雾剂、喷雾剂等。其中,所述的药物组合物或适宜的剂型可以含有0.01mg至1000mg的本公开的化合物或其药学上可接受的盐或偶联物,适宜含有0.1mg至800mg,优选含有0.5-500mg,优选含有0.5至350mg,特别优选1-250mg。

[1587] 所述药物组合物可以注射剂形式用药,包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液。其中,可使用的载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,灭菌的非挥发油也可用作溶剂或悬浮介质,如单甘油酯或二甘油酯。

[1588] 本文使用的术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状,可以是预防性的;和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用,可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗,包括:(a)预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状;(b)抑制疾病的症状,即阻止其发展;或(c)缓解疾病的症状,即,导致疾病或症状退化。

[1589] 在本公开中,术语“个体”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。本公开中术语“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)。

[1590] 本公开中,术语“有效剂量”指被给药后会在一定程度上缓解所治疗病症的一种或多种症状的化合物的量。

[1591] 本公开中,术语“配体药物偶联物”是指生物活性分子(药物分子)与靶向部分连接得到的物质。在本公开的部分实施方案中,生物活性分子与靶向部分通过连接体相连。所述连接体在特定环境(例如肿瘤内的水解酶和/或低pH值环境)中或特定作用(例如溶酶体蛋白酶的作用)下能够断裂,从而使生物活性分子与靶向部分分离。在本公开的部分实施方案中,所述连接体包含可切割或不可切割的单元,例如肽或二硫键。在本公开的部分实施方案中,生物活性分子与靶向部分直接通过共价键相连,所述共价键在特定环境或作用下能够断裂,从而使生物活性分子与靶向部分分离。在本公开的部分实施方案中,所述配体药物偶联物包含靶向部分、连接体以及本公开的式II化合物片段。

[1592] 本公开中,术语“生物活性物”、“生物活性分子”或“药物分子”指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质,在本公开的部分实施方案中,偶联物中的生物活性物、生物活性分子或药物分子为具有抗肿瘤生物活性的分子。例如:放射性同位素,例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}和Lu的放射性同位素;金属配合物,例如金属铂配合物、金属金配合物,奥沙利铂等;糖肽类抗生素,例如博来霉素、平阳霉素;DNA拓扑异构酶抑制剂,例如拓扑异构酶I抑制剂,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,拓扑异构酶II抑制剂,放线菌素D、阿霉素、多柔比星、多卡米星,柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素、依托泊苷等;干扰DNA合成药物,例如甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、巯嘌呤、喷司他丁、氟达拉滨、克拉屈滨、奈拉滨等;作用于结构蛋白的药物,例如微管蛋白抑制剂,长春花生物碱类、长春新碱、长春碱、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛等;肿瘤信号通路抑制剂,例如丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、天冬氨酸激酶抑制剂或组氨酸激酶抑制剂等;还包括蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、肿瘤新生血管生成抑制剂、细胞周期蛋白抑制剂、美登素衍生物、卡里奇霉素衍生物、奥瑞他汀衍生物、Pyrrolobenzodiazepines(PBD)衍生物、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、或其它抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡和坏死的活性物质;酶及其片段,诸如核溶酶;抗生素;毒素,诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;生长抑制剂;药物模块。术语“毒素”指能够对细胞的生长或增殖产生有害效果的物质。

[1593] 本公开中,术语“小分子”是指具有生物活性的小分子药物。术语小分子毒素具有细胞损伤活性,即以某种形式造成细胞的病理学变化的状态,并且细胞损伤不限于直接损伤,包括对细胞的结构和功能的所有种类的损伤,诸如DNA裂解、碱基-二聚体形成、染色体裂解、对细胞分裂机制的损伤和不同酶促活性的下降。

[1594] 本公开中,术语“连接体”是指将生物活性分子(药物分子)与靶向部分连接起来的片段。

[1595] 本公开中,术语“靶向部分”是指偶联物中能够与细胞表面的靶标(或靶标的部分)

特异性结合的部分。通过靶向部分与靶标的相互作用,偶联物可以被递送至特定的细胞群。

[1596] 本公开中,当偶联物中的靶向部分为抗体时,偶联物可被称为“药物-抗体偶联物”。

[1597] 本公开中,抗体或其抗原结合片段包括衍生化的抗体或其抗原结合片段,例如具有巯基的抗体或其抗原结合片段,其中所述衍生化使得抗体具有与药物连接体偶联物反应的基团或能力。所述巯基-SH可以打开二硫键(例如,通过还原剂TCEP还原)衍生获得。

[1598] 本文中使用的术语“癌症”和“肿瘤”以相同的含义使用。

[1599] 本文中使用的术语“基因”不仅包括DNA,而且包括其mRNA、其cDNA和其cRNA。

[1600] 本文中使用的术语“多核苷酸”以与核酸相同的含义使用,并且还包括DNA、RNA、探针、寡核苷酸和引物。

[1601] 本文中使用的术语“Tb”为“target binding”的缩写,包括抗体或与靶标结合的任意分子,术语“Ab”为“antibody”的缩写,与“抗体”无区别地使用。

[1602] 本文中使用的术语“多肽”和“蛋白”无区别地使用。

[1603] 本文中使用的术语“细胞”也包括动物个体内的细胞和培养的细胞。

[1604] 本公开中所述的抗B7H3抗体中涉及的B7H3可为本领域常规的B7H3,例如可溶性B7H3、膜形式B7H3等,并且还表示B7H3变体1和/或B7H3变体2。

[1605] KD指获得自Kd(具体结合分子-靶蛋白相互作用的解离速率)与Ka(具体结合分子-靶蛋白相互作用的结合速率)之比(或Kd/Ka,以摩尔浓度(M)表示)的解离常数。可使用本领域充分建立的方法测定KD值。测定结合分子的KD的优选方法是通过使用表面等离子共振,例如生物传感器系统,如Biacore TM(GE Healthcare Life Sciences)系统。

[1606] 术语“B7H3变体”是指一种多肽,其与B7H3多肽,B7H3片段,抗B7H3抗体或其抗体片段具有相似或相同的功能,但非必需包含相似或相同的B7H3多肽,B7H3片段,抗B7H3抗体或其片段的氨基酸序列,或具有相似或相同的B7H3多肽,B7H3片段,抗B7H3抗体或其片段的结构。

[1607] 术语“Her3变体变体”是指一种多肽,其与Her3多肽,Her3片段,抗Her3抗体或其抗体片段具有相似或相同的功能,但非必需包含相似或相同的Her3多肽,Her3片段,抗Her3抗体或其片段的氨基酸序列,或具有相似或相同的Her3多肽,Her3片段,抗Her3抗体或其片段的结构。

[1608] 如本文所用,两个氨基酸序列之间的百分比同源性等于两个序列之间的百分比同一性(identity)。两个序列之间的序列百分比同一性是序列共享的相同位置的数目的函数(即,%同源性=相同位置的数目/位置总数目X100),其中考虑缺口(gap)的数目和每一缺口的长度,需要将其引入用于两个序列的最优对比。可用本领域通常所知的方法进行序列比较和确定序列间的百分比同一性,可用数学算法实现这种序列比较和百分比同一性的确定。例如,可用Meyers和Miller,1988Comput.Appl.Biosci.4:11-17的算法(已整合入ALIGN程序(版本2.0))来确定氨基酸序列之间和/或核苷酸序列之间的百分比同一性。此外,可用从Accelrys在线获得的GCG软件包中的GAP程序(使用其缺省参数)来确定氨基酸序列之间或核苷酸序列之间的百分比同一性。在一个实施方案中,所述两个序列是等长的。

[1609] 术语“表位”是指在动物体优选哺乳动物体内具有抗原性或免疫原性活性的B7H3多肽或蛋白的一部分。B7H3本公开的抗体或其抗原结合片段的表位可以通过现有技术测

定,例如合成肽法,免疫信息学预测,多肽活性的测定,表位肽扫描法,噬菌体展示技术,X射线衍射和核磁共振分析,抗体同源建模蛋白对接预测法。本文中使用的短语“结合相同表位的抗体”表示,结合共同表位的不同抗体。如果第二抗体结合第一抗体所结合的部分肽或部分三级结构,那么可以确定,所述第一抗体和所述第二抗体结合相同表位。

[1610] 本公开中,术语“抗体”取其最广义的解释,包括完整的单克隆抗体、多克隆抗体以及由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体),只要它们具有所需的生物学活性。在本公开中,“抗体”和“免疫球蛋白”可以互换使用。如本文所述的“抗体分子”或“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。因此,术语抗体广义上不仅涵盖完整抗体分子,还包括所述抗体的片段以及所述抗体和抗体片段的变体(包括衍生物)。当“抗体分子”或“抗体”与抗原结合片段在同一语境下使用时,“抗体分子”或“抗体”指完整抗体分子或全长抗体。在本说明书中所述术语抗体分子例如包括但非限于单链Fv(scFv),Fab片段,Fab’片段,F(ab’)2,二硫键连接的Fv(sdFv),Fv,及完整抗体或全长抗体。术语“单链Fv”或“scFv”是指一种多肽,其包含与抗体VH结构域连接的抗体的VL结构域。例如免疫特异性结合B7H3的抗体可以与其它抗原发生交叉反应。优选地,免疫特异性结合B7H3的抗体与其它抗原不发生交叉反应。免疫特异性结合B7H3的抗体可以例如通过免疫测定或其它本领域技术人员已知的方法鉴别。“完整”抗体或“全长”抗体指包含两条重链(H)和两条轻链(L)的蛋白,所述重链和轻链通过二硫键相互连接,所述蛋白包含:(1)就重链而言,包含可变区(本文缩写为“VH”)和含有三个结构域CH1、CH2、CH3的重链恒定区;和(2)就轻链而言,包含轻链可变区(本文缩写为″VL″)和含有一个结构域CL的轻链恒定区。本公开的抗体包括但非限于单克隆,多特异性,人或嵌合抗体,单链抗体,Fab片段,F(ab′)片段,抗独特型(抗-Id)抗体(包括例如本公开抗体的抗-Id抗体),和上述任何抗体的表位结合片段。本公开的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白的任何类型(例如IgG,IgE,IgM,IgD,IgA和IgY),类别(例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA1和IgA2)或亚类。优选地,本公开的抗体包含或由具有序列及其具体信息表所述任一氨基酸序列或其片段或变体的VH结构域,VH CDR(本文中多用HCDR表示),VL结构域,或VL CDR(本文中多用LCDR表示)组成。

[1611] 在本公开中,术语“单克隆抗体”指抗体来自一群基本均一的抗体,即构成该集群的各抗体完全相同,除了可能存在的少量天然突变。单克隆抗体具有针对抗原的一个决定簇(表位)的高特异性,而与其相对的多克隆抗体则包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体。除了特异性之外,单克隆抗体的优点还在于合成时可以不受其他抗体的污染。此处修饰语“单克隆”表示该抗体的特征在于来自一个基本均一的抗体群,而不应理解成需由特殊方法制得。

[1612] 在本公开的部分实施方案中,单克隆抗体还特别包括嵌合抗体,即重链和/或轻链的一部分与某种、某类或某亚类抗体相同或同源,其余部分则与另一种、另一类或另一亚类抗体相同或同源,只要它们具有所需的生物学活性(参见例如US 4,816,567;和Morrison等人,1984,PNAS,81:6851-6855)。可用于本公开的嵌合抗体包括灵长类化(primatized)抗体,其包含来自非人灵长类(例如古猴、猩猩等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列。

[1613] 术语“抗原结合片段”是指抗体的一部分,优选是抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab′、$F(ab')_2$、Fd、Fv、dAb和互补决定区片段,二抗体(diabody),线性抗体

和单链抗体分子。本文中使用的术语“抗原结合片段”表示抗体的具有抗原结合活性的部分片段,其中所述片段具有抗体的完全或部分功能,包括非限于单链Fv(scFv),Fab,Fab',F(ab')2,二硫键连接的Fv(sdFv),Fv,di-scFv等。该术语也包括Fab',其为在还原条件下处理F(ab')2得到的抗体的可变区的单价片段。但是,该术语不限于这些分子,只要所述片段具有与抗原的结合亲和力即可。此外,这些功能片段不仅包括用适当的酶处理抗体蛋白的全长分子得到的片段,而且包括使用遗传修饰的抗体基因在适当宿主细胞中生产的蛋白。

[1614] 本文中使用的术语“Fab'”表示如上所述在还原条件下处理F(ab')2得到的抗体的可变区的单价片段。但是,本公开的Fab'也包括使用遗传修饰的抗体基因生产的Fab'。

[1615] 如本文中所使用的,术语“scFv”是指,包含VL和VH结构域的单个多肽链,其中所述VL和VH通过接头(linker)或直接相连(参见,例如,Bird等人,Science 242:423-426(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988);和Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Roseburg和Moore编,Springer-Verlag,纽约,第269-315页(1994))。此类scFv分子可具有一般结构:NH2-VL-接头-VH-COOH或NH2-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(GGGGS)4的接头,但也可使用其变体(Holliger等人(1993),Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448)。可用于本公开的其他接头由Alfthan等人(1995),Protein Eng.8:725-731,Choi等人(2001),Eur.J.Immunol.31:94-106,Hu等人(1996),Cancer Res.56:3055-3061,Kipriyanov等人(1999),J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001),Cancer Immunol.描述。在一些情况下,scFv的VH与VL之间还可以存在二硫键。如本文中所使用的,术语“di-scFv”是指,由两个scFv连接形成的抗体片段。

[1616] 如本文所用,在所述抗体或其抗原结合片段中的即使含有变体、氨基酸的置换、缺失或添加,也仍然具有结合所述抗原的活性。

[1617] 术语“双特异性抗体”亦称为“双功能抗体偶联物”,是指由第一抗体(片段)和第二抗体(片段)通过偶联臂所形成的偶联物,该偶联物保留了各自抗体的活性,故具有双功能和双特异性。

[1618] 术语“多特异性抗体”包括例如三特异性抗体和四特异性抗体,前者是具有三种不同抗原结合特异性的抗体,而后者是具有四种不同抗原结合特异性的抗体。

[1619] 术语“完整抗体”或“全长抗体”指包含抗原结合可变区和轻链恒定区(CL)、重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的抗体。恒定区可以是天然序列(例如人天然恒定区序列)或其氨基酸序列变体。完整抗体优选是具有一种或多种效应功能的完整抗体。

[1620] 术语“前抗(Probody)”是一种修饰的抗体,包括一种抗体或一种抗体片段,能专门与其靶点结合,能够与掩蔽基团耦合,其中掩蔽基团指对抗体或抗体片段与其靶点的结合能力的裂解常数比没有耦合掩蔽基团的抗体或抗体片段与其靶点的结合能力的裂解常数至少大100倍或1000倍、或者10000倍。

[1621] 在本公开中,非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指包含最少量非人免疫球蛋白序列的嵌合抗体。大多数人源化抗体是人接受者免疫球蛋白的超变区残基被置换成具有所需特异性、亲和力和功能的非人(例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)超变区残基(供者抗体)。在一些实施方案中,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基也被置换成非人残基。而且,人源化抗体还可以包含受者抗体或供者抗体中没有的残基。这些修饰是为了进一步优化抗体的性

能。人源化抗体一般包含至少一个,通常是两个可变区,其中所有或几乎所有超变环(hypervanable loops)与非人免疫球蛋白的相对应,而FR则完全或几乎完全是人免疫球蛋白的序列。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc,通常是人免疫球蛋白Fc)的至少一部分。有关细节参见例如Jones等人,1986,Nature,321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature,332:323-329;和Presta,1992,Curr Op Struct Bwl 2:593-596。

[1622] 完整抗体可根据重链恒定区的氨基酸序列分为不同的“类”。主要的五类是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中几类还可以分为不同的“亚类”(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。抗体不同类的重链恒定区分别称为α、β、ε、γ 和μ。免疫球蛋白不同类的亚基结构和三维构型是本领域中公知的。

[1623] 在本文中,本公开的抗体或其抗原结合片段含有的CDR可根据本领域已知的各种编号系统确定。在某些实施方案中,本公开的抗体或其抗原结合片段含有的CDR优选地通过Kabat、Chothia或,AbM或IMGT编号系统确定。其中根据IMGT编号系统,其CDR和FR对应的编号如下:

[1624]

	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CDR2-IMGT	FR3-IMGT	For germline V-GENE (*) CDR3-IMGT	For rearranged V-J-GENEs and V-D-J-GENEs	
						T		
						Germline CDR3-IMGT	Rearranged CDR3-IMGT	FR4-IMGT
						T	T	
氨基酸编号	1 --> 26 (C 23)	27 --> 38	39 --> 55 (W 41)	56 --> 65	66 --> 104 (C 104)	105 --> 116	105 --> 117 (112.1, 111.1, 112.2, 111.2, etc.)	118 --> 129
氨基酸个数	25-26 aa	5-12 aa	16-17 aa	0-10 aa	36-39 aa	2-12 aa	2-13 aa (more than 13 aa)	10-12 aa

[1625]

[1626] 如本文中所使用的,术语“构架残基区”或“FR残基”是指,抗体可变区中除了如上定义的CDR残基以外的那些氨基酸残基。

[1627] 如本文中所使用的,术语“胚系抗体基因”是非淋巴细胞表达的免疫球蛋白的编码基因,它没有经历导致表达特异免疫球蛋白的遗传学重排及成熟的成熟过程。本公开的各种实施方案所提供的一个优点来源于一种认识,那就是胚系抗体基因编码的氨基酸序列比成熟抗体基因编码的氨基酸序列更多地保留了动物物种个体的特征性的重要氨基酸序列结构。因此当被治疗性应用于该物种时,更少地被该物种识别为外源物质。

[1628] 作为氨基酸取代,在本说明书中,保守的氨基酸取代是优选的。保守的氨基酸取代表示,在与氨基酸侧链有关的氨基酸集合内发生的取代。优选的氨基酸集合如下:酸性集合(天冬氨酸和谷氨酸);碱性集合(赖氨酸、精氨酸和组氨酸);非极性集合(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸和色氨酸);和不带电荷的极性家族(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)。更优选的氨基酸集合如下:脂族羟基(丝氨酸和苏氨酸);含有酰胺的集合(天冬酰胺和谷氨酰胺);脂族集合(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸);和芳族集合(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)。这样的氨基酸取代优选地在不会损害具有原始氨基酸序列的物质的性能的集合内进行。

[1629] 此外,已知的是,缺失在培养的哺乳动物细胞中生产的抗体的重链的羧基端的赖氨酸残基(Journal of Chromatography A,705:129-134(1995)),还已知的是,缺失在培养的哺乳动物细胞中生产的抗体的重链的羧基端的2个氨基酸残基(甘氨酸和赖氨酸),并且新位于羧基端处的脯氨酸残基被酰胺化(Analytical Biochemistry,360:75-83(2007))。但是,重链序列的这样的缺失和修饰不会影响抗体的抗原结合亲和力和效应子功能(补体的活化、抗体依赖性的细胞的细胞毒性等)。

[1630] 本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如,Immunology-A Synthesis(2nd Edition,E.S.Golub and D.R.Gren,Eds.,Sinauer Associates,Sunderland,Mass.(1991)),其以引用的方式并入本文中。在本文中,术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本公开中,氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示;精氨酸可用R或Arg表示;甘氨酸可用G或Gly表示;谷氨酰胺可用Q或Gln表示。

[1631] 如本文中所使用的,术语“预防”是指,为了阻止或延迟疾病或病症或症状(例如,肿瘤和传染病)在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的,术语“治疗”是指,为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本公开的目的,有益或所需的临床结果包括但不限于,减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即,不再恶化)疾病的状态,延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状(无论部分或全部),无论是可检测或是不可检测的。此外,“治疗”还可以指,与期望的存活期相比(如果未接受治疗),延长存活期。

[1632] 如本文中使用的,术语“受试者”是指哺乳动物,例如灵长类哺乳动物,例如非人灵长类哺乳动物或人。在某些实施方式中,所述受试者(例如人)肿瘤和传染病,或者,具有患有上述疾病的风险。

[1633] 如本文中所使用的,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如,预防疾病(例如,肿瘤和传染病)有效量是指,足以预防,阻止,或延迟疾病(例如,肿瘤和传染病)的发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总

体状态、患者的一般情况例如年龄,体重和性别,药物的施用方式,以及同时施用的其他治疗等等。

[1634] 如本文中所使用的,术语“效应子功能(effector function)”是指,那些可归因于抗体Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的生物学活性,且其随抗体同种型而变化。

[1635] 术语“药学上可接受的”指当分子本体、分子片段或组合物适当地给予动物或人时,它们不会产生不利的、过敏的或其他不良反应。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体示例包括糖类(如乳糖)、淀粉、纤维素及其衍生物、植物油、明胶、多元醇(如丙二醇)、海藻酸等。

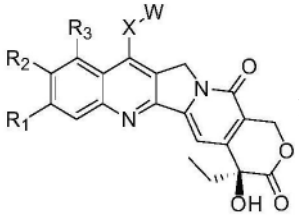
[1636] 使用实验动物可以确定抗体和抗体-药物偶联物对癌症的体内治疗效果,例如,将抗体施用给植入了表达B7H3的肿瘤细胞系的裸鼠,并测量癌细胞的任何变化。

[1637] 在本公开中,尽管大多数情况下抗体中的氨基酸取代是被L-氨基酸取代,但也不限于此。在一些实施方案中,抗体肽链中可以包括一个或多个D-氨基酸。包含D-氨基酸的肽在口腔、肠道或血浆中比仅包含L-氨基酸的肽更加稳定而不易降解。

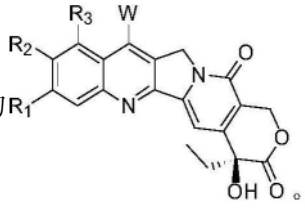
[1638] 本公开所用的单克隆抗体可以由许多方法生产。例如,用于本公开的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法,使用许多物种(包括小鼠、仓鼠、大鼠和人的细胞)获得(参见例如Kohler等人,1975,Nature,256:495),或者通过重组DNA技术制得(参见例如US 4,816,567),或者从噬菌体抗体库中分离得到(参见例如Clackson等人,1991,Nature,352:624-628;和Marks等人,1991,Journal of Molecular Biology,222:581-597)。

[1639] 本文中,除非以其他方式明确指出,在本文中通篇采用的描述方式“各…独立地选自”和“…各自独立地选自”可以互换,均应做广义理解,其既可以是指在不同基团中,相同或不同的符号之间所表达的具体选项之间互相不影响,也可以表示在相同的基团中,相同或不同的符号之间所表达的具体选项之间互相不影响。

[1640] 本文中,术语“直接键”表示其两侧的基团直接相连,例如,式II所示的化合物

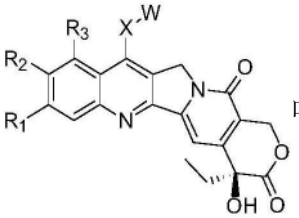


中,若X为直接键,则其结构式为

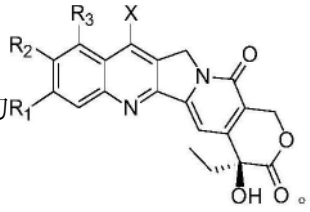


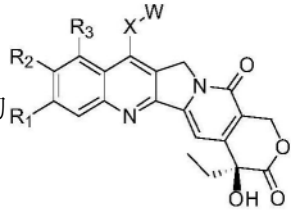
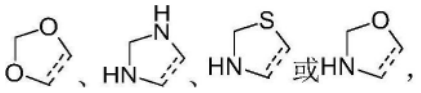
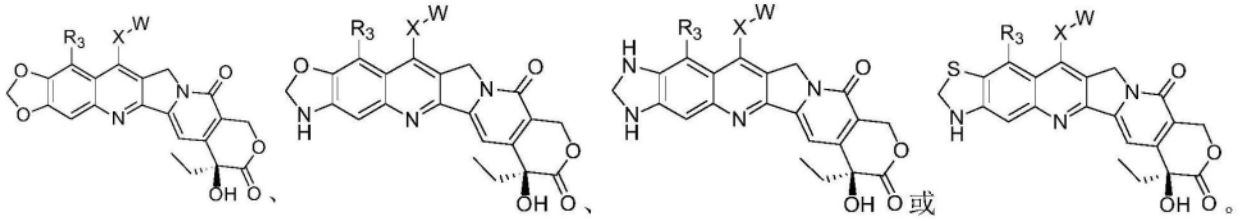
其余直接键可参照前述内容进行理解。

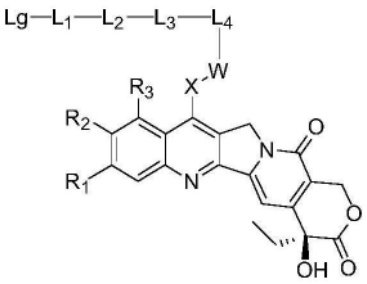
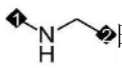
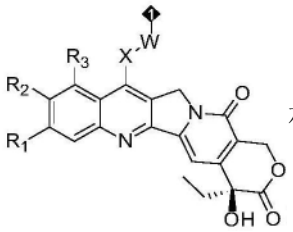
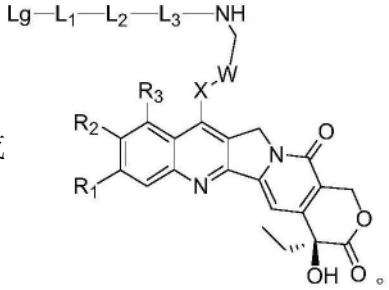
[1641] 本文中,术语“不存在”表示该基团不存在,例如,式II所示的化合物

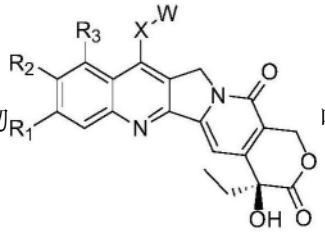


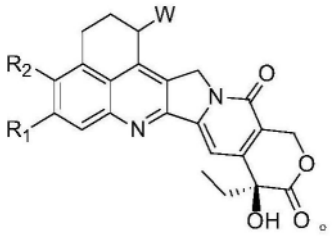
中,若W不存在,则其结构式为

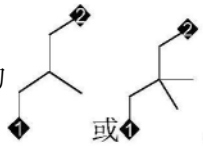


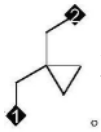
[1642] 式II所示的化合物  中，R_1和R_2和与其相连的碳原子形成  ，“虚线”键表示所述杂环与苯环稠合的位置，例如，形成 

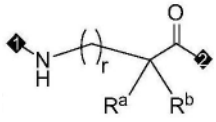
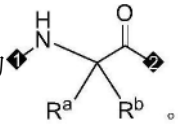
[1643] 本文中，式III所示的药物连接体偶联物  中，L_4为  时，其中的标号1、2表示L_4与其余基团的连接位置，具体地，1位与L_3相连，2位与药物分子即  相连时，形成  其余标号1、2可参照前述内容进行理解。

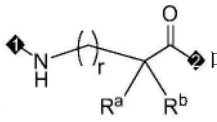
[1644] 本文中，式II所示的化合物  中，R_3和X和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置，形成



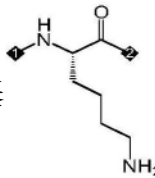
[1645] 本文中,X的定义例如为,“X选自任选取代的  所述取代基选自1个或2个C1-4烷基(如甲基)”,则X例如可以为  或。X其余类似的定义可参照前述内容进行理解。

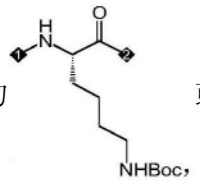
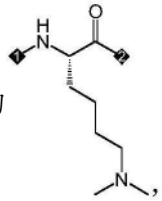
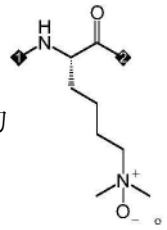
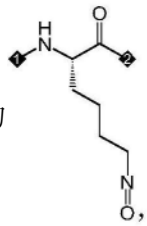
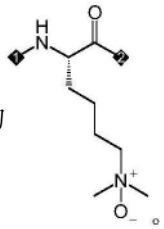
[1646] 本文中,X的定义例如为,“X选自任选取代的  所述取代基选自2个C1-4烷基(如甲基)和与它们同时相连的碳原子一起形成C3-6环烷基(如环丙基)”,则X例如可以为  。X其余类似的定义可参照前述内容进行理解。

[1647] AA^1所示氨基酸残基的结构  中,若r为0,则本领域技术人员可以理解的是,AA^1所示氨基酸残基的结构将变为  。

[1648] AA^1所示氨基酸残基的结构  中,若R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起,形成4-10元杂环,所述4-10元杂环任选地被一个或多个R^0所取代,其中,术语“所述4-10元杂环任选地被一个或多个R^0所取代”的含义为,所述4-10元杂环可以不被取代,也可以被一个或多个R^0所取代,且所述多个R^0中,各R^0的定义可以相同,也可以不同。其余类似的定义可以参照前述内容进行理解。

[1649] 本文中,例如,L_3选自Lys、Val-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Ala、Lys-Ala-Asn时,“所述赖氨酸(Lys)的远端氨基任选地被1个、2个或3个选自叔丁氧羰基、C1-6烷基(优选甲基)、O的取代基所取代”的含义为,所述L_3各选项中的Lys的远端氨基任选地被1个、2个或3个选自叔丁氧羰基、C1-6烷基(优选甲基)、O的

取代基所取代。其中,“Lys的远端氨基”指的是赖氨酸残基  中裸露的氨基-NH_2。

“所述赖氨酸(Lys)的远端氨基任选地被1个、2个或3个选自叔丁氧羰基、C1-6烷基(优选甲基)、O的取代基所取代”表示所述赖氨酸(Lys)的远端氨基可以不被取代,也可以被1个、2个或3个选自叔丁氧羰基、C1-6烷基(优选甲基)、O的取代基所取代,例如,可以被1个叔丁氧羰基取代,即变为  或者,可以被2个甲基取代,即变为  或者被2个甲基和1个O同时取代,即变为  需要说明的是,“所述赖氨酸(Lys)的远端氨基被O取代”指的是所述赖氨酸(Lys)的远端氨基被氧代,即变为  若该远端氨基进一步被两个甲基所取代,则其变为 

[1650] 在本说明书的各部分,本公开化合物的取代基按照基团种类或范围公开。特别指出,本公开包括这些基团种类和范围的各个成员的每一个独立的次级组合。例如,术语“C1-6烷基”特别指独立公开的甲基、乙基、C3烷基、C4烷基、C5烷基和C6烷基。

[1651] 在本文中,术语“C1-6烷基”表示直链或支链的含有1-6个碳原子的烷基,包括例如“C1-3烷基”或“C1-4烷基”,甲基,乙基等,具体实例包括但不限于:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、已基。

[1652] 在本文中,术语“C_{1-4}烷基”表示直链或支链的含有1-4个碳原子的烷基,包括例如“C_{1-3}烷基”,甲基,乙基等,具体实例包括但不限于:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基。

[1653] 在本文中,术语“C_{2-6}烯基”是指含有至少一个双键且碳原子数为2-6的直链、支链或环状的烯基,包括例如“C_{2-4}烯基”等。其实例包括但不限于:乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、1,3-丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊

二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,4-己二烯基、环戊烯基、1,3-环戊二烯基、环己烯基、1,4-环己二烯基等。

[1654] 在本文中,术语“C_{2-6}炔基”是指含有至少一个三键且碳原子数为2-6的直链或支链的炔基,包括例如“C_{2-4}炔基”等。其实例包括但不限于:乙炔基、丙炔基、2-丁炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-甲基-2-戊炔基、2-己炔基、3-己炔基、5-甲基-2-己炔基等。

[1655] 在本文中,术语“卤素”包括氟、氯、溴、碘。

[1656] 在本文中,术语“3-6元环烷基”或“C_{3-6}环烷基”是指含有3-6个碳原子的饱和环状烷基,包括环丙烷基(即环丙基)、环丁烷基(即环丁基)、环戊烷基(即环戊基)、环己基。

[1657] 在本文中,术语“3-7元碳环烷基”或“C_{3-7}环烷基”是指含有3-7个碳原子的饱和环状烷基,包括环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己基、环庚基。

[1658] 在本文中,术语“C1-6烷氧基”是指通过氧原子连接至母体分子部分的如上文所定义的烷基。具体实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。

[1659] 在本文中,术语“C_{1-4}烷氧基”是指通过氧原子连接至母体分子部分的如上文所定义的烷基。具体实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基等。

[1660] 在本文中,术语“4-10元杂环基”是指含有4-10个环原子(其中至少一个环原子为杂原子,例如氮原子、氧原子或硫原子)的环状基团。术语“4-6元杂环基”是指含有4-6个环原子(其中至少一个环原子为杂原子,例如氮原子、氧原子或硫原子)的环状基团。任选地,环状结构中的环原子(例如碳原子、氮原子或硫原子)可以被氧代。“4-8元杂环基”包括例如“4-8元含氮杂环基”、“4-8元含氧杂环基”、“4-7元杂环基”、“4-7元含氧杂环基”、“4-7元杂环基”、“4-6元杂环基”、“5-7元杂环基”、“5-6元杂环基”、“5-6元含氮杂环基”,包括但不限于氧代环丁烷基、吡咯烷基、四氢呋喃基、哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、高哌嗪基等。

[1661] 在本文中,术语“4-10元杂环”是指含有4-10个环原子(其中至少一个环原子为杂原子,例如氮原子、氧原子或硫原子)的环。术语“5-6元杂环”是指含有5-6个环原子(其中至少一个环原子为杂原子,例如氮原子、氧原子或硫原子)的环,包括但不限于吡咯烷、四氢呋喃、哌啶、哌嗪、四氢吡喃等环。

[1662] 在本文中,术语“芳基”是指具有芳香性的单环或多环烃基,例如6-10元芳基、5-8元芳基等。具体的实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基、菲基等。所述“6-10元芳基”是指含有6-10个环原子的芳基。所述“C6-10芳基”是指含有6-10个碳原子的芳基。

[1663] 在本文中,术语“杂芳基”是指具有芳香性的环状基团,其中至少一个环原子为杂原子,例如氮原子、氧原子或硫原子。任选地,环状结构中的环原子(例如碳原子、氮原子或硫原子)可以被氧代。具体实例包括但不限于5-10元杂芳基、5-6元杂芳基、5-10元含氮杂芳基、6-10元含氧杂芳基、6-8元含氮杂芳基、5-8元含氧杂芳基等,例如呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、咪唑基、吡唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、吡啶基、2-吡啶酮基、4-吡啶酮基、嘧啶基、1,4-二氧杂环己二烯基、2H-1,2-噁嗪基、4H-1,2-噁嗪基、6H-1,2-噁嗪基、4H-1,3-噁嗪基、6H-1,3-噁嗪基、4H-1,4-噁嗪基、哒嗪基、吡嗪基、1,2,3-三嗪基、1,3,5-三嗪基、1,2,4,5-四嗪基、氮杂环庚三烯基、1,3-二氮杂环庚三烯

基、氮杂环辛四烯基等。

[1664] 本文用波浪线“~ ~”表示的结构式中的键意在表示,该结构表示顺式或反式异构体,或任意比例的顺式和反式异构体的混合物。

[1665] 术语“药物与抗体比”或“DAR”是指药物的数量,例如,与ADC的抗体附接的小分子毒素。ADC的DAR可以在1到16的范围内,但是取决于抗体上的连接位点的数量,更高的负载(例如20)也是可能的。提及负载到单个抗体上的药物的数量时,或可替代地,提及一组ADC的平均或均值DAR时,可以使用术语DAR。

[1666] 发明的有益效果

[1667] 本公开通过大量研究获得高活性和高细胞渗透性的生物活性药物(生物活性分子或payload)、高体内循环稳定性和高化学稳定性的连接子、通过调节连接子的理化性质(如碱性和亲油性)实现抗体偶联药物(ADC)对肿瘤微环境的富集、连接子特有的体内酶切特性以及与靶向部分的偶联方式、结合大量体内体外药效的筛选验证,获得一类新颖的抗体生物活性分子偶联物。利用上述方式获得的偶联物,能够实现多种下述的惊奇的技术效果:

[1668] 根据上述方式得到的偶联物具有更好的溶解度和优异的化学稳定性,如不发生传统ADC中马来酰亚胺连接方式引起的可逆Michael加成反应,因此可以获得高药物-抗体比,在一些实施方案中,所述偶联物的DAR值能够达到6-8;

[1669] 具有极高的偶联效率,在一些实施方案中,所述偶联效率能够达到或超过90%;

[1670] 通过大量研究发现了一类具有高血浆稳定性,但同时又能在肿瘤微环境中(肿瘤细包内和肿瘤细胞外均可)裂解的链接子,因此可以在抗原低表达或者抗原不表达肿瘤中产生好的抗肿瘤效果;

[1671] 根据上述方式得到的偶联物(ADC)通过对连接子和整体ADC分子的理化性质的调整,提高了整个ADC分子在相对酸性肿瘤环境中的暴露量,因而ADC具有更好的肿瘤组织靶向性,即在肿瘤微环境中的富集能力,增加了生物活性分子在瘤内和血液浓度比,降低了ADC分子的机理相关的毒性(ADC结合非肿瘤组织中细胞表面抗原并内吞后产生的毒性,或者又叫“on-target毒性”),因此具有更高的治疗指数;

[1672] 根据上述方式得到的偶联物具有很高的在体内循环中的稳定性,减少了药物分子在非靶组织中的脱落,减少了非靶组织中毒素脱落引起的“off-target”毒性;

[1673] 所述偶联物的生物活性分子具有更高的抗肿瘤细胞活性,因此具有优异的旁观者效应(by-stander effect),ADC能够更有效地杀死抗原高表达肿瘤细胞以及肿瘤组织中抗原低表达或抗原不表达的肿瘤细胞;

[1674] 本公开的毒素-连接子,利用其连接子在肿瘤微环境中的胞外裂解能力,可以和没有细胞内吞能力的抗体组成抗体偶联药物,这类抗体偶联药物依然具有高抗肿瘤活性;

[1675] 本公开的毒素-连接子,利用其连接子在肿瘤微环境中的胞外裂解能力以及其在肿瘤微环境中的富集能力,可以和没有细胞内吞能力的抗体以及没有肿瘤细胞外抗原结合能力的抗体组成抗体偶联药物,这类抗体偶联药物依然具有高抗肿瘤活性;

[1676] 本公开提供的抗体具有极高的人源化程度或者全人源抗体,从而可安全地施用给人受试者,而不引发免疫原性反应。具有能够很高的结合人和非人B7H3的能力,尤其涉及与非人灵长类动物(例如食蟹猴)的B7H3具有交叉反应性的抗体的分子;

[1677] 综上,本发明的连接子、抗体和ADC具有重大的临床价值。

附图说明

[1678] 图1A抗B7H3抗体1D1-01与人B7H3-4IgG-His蛋白ELISA结合检测

[1679] 图1B抗B7H3抗体2E3-02与人B7H3-4IgG-His蛋白ELISA结合检测

[1680] 图2A抗B7H3抗体1D1-01与猴B7H3-4IgG-His蛋白ELISA结合检测

[1681] 图2B抗B7H3抗体2E3-02与猴B7H3-4IgG-His蛋白ELISA结合检测

[1682] 图3A抗B7H3抗体1D1-01与MCF-7肿瘤细胞流式结合检测

[1683] 图3B抗B7H3抗体2E3-02与MCF-7肿瘤细胞流式结合检测

[1684] 图4A抗B7H3抗体1D1-01与A549肿瘤细胞流式结合检测

[1685] 图4B抗B7H3抗体2E3-02与A549肿瘤细胞流式结合检测

[1686] 图5抗B7H3抗体2E3-02与PC-3肿瘤细胞流式结合检测

[1687] 图6A抗B7H3抗体1D1-01与B7H3蛋白特异性结合检测

[1688] 图6B抗B7H3抗体2E3-02与B7H3蛋白特异性结合检测

[1689] 图7A肿瘤细胞A549对候选抗体1D1-01内吞检测

[1690] 图7B肿瘤细胞A549对候选抗体2E3-02内吞检测

[1691] 图7C肿瘤细胞A549对候选抗体202-2-1内吞检测

[1692] 图8偶联前后的SEC图谱

[1693] 图9抗B7H3-ADC在NCI-HT29移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试之一

[1694] 图10抗B7H3-ADC在NCI-HT29移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试之二

[1695] 图11抗B7H3-ADC在NCI-H358移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试

[1696] 图12抗B7H3-ADC在食管鳞癌PDX模型中抑制肿瘤生长的测试

[1697] 图13抗B7H3-ADC在前列腺PDX模型中抑制肿瘤生长的测试

[1698] 图14抗Her3-ADC在NCI-H358移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试

[1699] 图15抗Her3-ADC在SW480移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试之一

[1700] 图16抗Her3-ADC在SW480移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试之二

[1701] 图17HT29模型中A1.9在血浆和肿瘤中的分布比

[1702] 图18HT29模型中ADC在血浆和肿瘤中的分布比。

[1703] 图19A抗体-药物偶联物在肿瘤匀浆中孵育并检测结果

[1704] 图19B抗体-药物偶联物在肌肉组织匀浆中孵育结果

具体实施方式

[1705] 以下通过具体实施方式的描述对本公开作进一步说明,但这并非是对本公开的限制。本领域技术人员根据本公开的教导,可以做出各种修改或改进,而不脱离本公开的基本思想和范围。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[1706] 本公开中的缩写具有以下含义:

[1707]

OMs	甲磺酸酯基	FA	甲酸
OTs	对甲苯磺酸酯基	ACN	乙腈
OTf	三氟甲磺酸酯基	CCK8 试剂	2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐
TBS	叔丁基二甲基硅基	FBS	胎牛血清
MMT	对甲氧基苯基二苯甲基	DMSO	二甲基亚砜
PB/PBS	磷酸盐缓液	HBTU	O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐
HOBT	1-羟基苯并三唑	HATU	2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐
NBS	N-溴代琥珀酰亚胺	TFA	三氟乙酸
PPTS	吡啶对甲苯磺酸盐	DCM	二氯甲烷
THF	四氢呋喃	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
EDC	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐	IgG	免疫球蛋白 G
CDR	免疫球蛋白可变区中的互补决定	HRP	辣根过氧化物酶

	区		
FR	抗体构架区：抗体可变区中除CDR残基以外的氨基酸残基	hFc	人IgG抗体Fc段
VH	抗体重链可变区	KD	平衡解离常数
VL	抗体轻链可变区	HCDR1	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区1
AbM	AbM CDR定义方式来源于Martin的相关研究（Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86:9268–9272），此定义方法整合了Kabat及Chothia两者的部分定义。	HCDR2	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区2
Kabat	由Elvin A. Kabat提出的免疫球蛋白比对及编号系统（参见，例如Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）。	HCDR3	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区3
Chothia	由Chothia等人提出的免疫球蛋白编号系统，其是基于结构环区的位置鉴定CDR区边界的经典规则(参见，例如Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人(1989) Nature 342:878-883)。	LCDR1	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区1
IMGT	基于由Lefranc等人发起的国际免疫遗传学信息系统（The	LCDR2	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区2

[1708]

[1709]

	international ImMunoGeneTics information system ® (IMGT))的编号系统，可参阅 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003。		
mAb	单克隆抗体	LCDR3	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区 3
EC50	产生 50%功效或结合的浓度	SEC-HPLC	分子排阻高效液相色谱
ELISA	酶联免疫吸附测定	HC	疫球蛋白重链
PCR	聚合酶链式反应	LC	疫球蛋白轻链

[1710] 序列及其具体信息：

[1711]

SEQ ID NO	序列名称	氨基酸序列
1	scFv 1D1	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRMYSSGWYWGAFDMWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWNQQKPGQAPRLLIYGTFKRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRLEIK
2	scFv 2E3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVQGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARSGYDYFFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTKVEIK
3	1D1-01 VH	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRMYSSGWYWGAFDMWGQGTMVTVSS
4	1D1-01 chothia HCDR1	GFTISSY
5	1D1-01 chothia	KQDGSE

[1712]

	HCDR2	
6	1D1-01 chothia HCDR3	RMYSSGWYWGAFDM
7	1D1-01 kabat HCDR1	SYWMN
8	1D1-01 kabat HCDR2	NIKQDGSEKYYVDSVQG
9	1D1-01 kabat HCDR3	RMYSSGWYWGAFDM
10	1D1-01 IMGT HCDR1	GFTISSYW
11	1D1-01 IMGT HCDR2	IKQDGSEK
12	1D1-01 IMGT HCDR3	ARRMYSSGWYWGAFDM
13	1D1-01 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWNQQKPGQAPRLLIYGT FKRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRL EIK
14	1D1-01 chothia LCDR1	RASQSVSSIYLA
15	1D1-01 chothia LCDR2	GTFKRAT

[1713]

16	1D1-01 chothia LCDR3	QQYDTSSIT
17	1D1-01 kabat LCDR1	RASQSVSSIYLA
18	1D1-01 kabat LCDR2	GTFKRAT
19	1D1-01 kabat LCDR3	QQYDTSSIT
20	1D1-01 IMGT LCDR1	QSVSSIY
\	1D1-01 IMGT LCDR2	GTF
21	202-2-1 kabat/IMGT LCDR3	QQLNSYPLT
22	1D1-01 IMGT LCDR3	QQYDTSSIT
23	2E3-02 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVS GISGSGGSTYYADSVQGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKA RSGYDYFFDYWGQGTLVTVSS
24	2E3-02 chothia HCDR1	GFTFSSY

[1714]

25	2E3-02 chothia HCDR2	SGSGGS
26	2E3-02 chothia HCDR3	ARSGYDYFFDY
27	2E3-02 kabat HCDR1	SYAMN
28	2E3-02 kabat HCDR2	GISGSGGSTYYADSVQG
29	2E3-02 kabat HCDR3	ARSGYDYFFDY
30	2E3-02 IMGT HCDR1	GFTFSSYA
31	2E3-02 IMGT HCDR2	ISGSGGST
32	2E3-02 IMGT HCDR3	AKARSGYDYFFDY
33	2E3-02 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTK VEIK
34	2E3-02 chothia LCDR1	RASQRISSSFLA

[1715]

35	2E3-02 chothia LCDR2	GASSRAT
36	2E3-02 chothia LCDR3	QQYSNSPLT
37	2E3-02 kabat LCDR1	RASQRISSSFLA
38	2E3-02 kabat LCDR2	GASSRAT
39	2E3-02 kabat LCDR3	QQYSNSPLT
40	2E3-02 IMGT LCDR1	QRISSSF
\	2E3-02 IMGT LCDR2	GAS
41	202-2-1 IMGT LCDR1	QGISSY
42	2E3-02 IMGT LCDR3	QQYSNSPLT
43	IgG1 CH，即 IgG1 恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

[1716]

		KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	Kappa CL，即 kappa 恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
45	1D1-01 HC，即 1D1-01 重链	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMNWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR RMYSSGWYWGAFDMWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
46	1D1-01 LC，即 1D1-01 轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWNQQKPGQAPRLLIYGT FKRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
47	2E3-02 HC，即 2E3-02 重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVS GISGSGGSTYYADSVQGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKA RSGYDYFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

[1717]

		DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	2E3-02 LC，即 2E3-02 轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
49	202-2-1 VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDVSHKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA RDWGDPDAFDIWGQGTMVTVSS
50	202-2-1 VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKV EIK
51	202-2-1 HC，即 202-2-1 重链	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDVSHKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA RDWGDPDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
52	202-2-1 LC，即 202-2-1 轻链	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP

[1718]

		VTKSFNRGEC
53	202-2-1 kabat HCDR1	TYGMH
54	202-2-1 kabat HCDR2	VIWYDVSHKYYADSVKG
55	202-2-1 kabat HCDR3	DWGDPDAFDI
56	202-2-1 IMGT HCDR1	GFTFSTYG
57	202-2-1 IMGT HCDR2	IWYDVSHK
58	202-2-1 IMGT HCDR3	ARDWGDPDAFDI
59	202-2-1 kabat LCDR1	RASQGISSYLA
60	202-2-1 kabat LCDR2	AASTLQS
\	202-2-1 IMGT LCDR2	AAS

[1719] 现参照下列意在举例说明本公开(而非限定本公开)的实施例来描述本公开。

[1720] 除非特别指明,本公开中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法,基本上参照J.Sambrook等人,分子克隆:实验室手册,第2版,冷泉港实验室出版社,1989,以及F.M.Ausubel等人,精编分子生物学实验指南,第3版,John Wiley&Sons,Inc.,1995中所述的方法进行。本领域技术人员知晓,实施例以举例方式描述本公开,且不意欲限制本公开所

要求保护的范围。

[1721] 制备方案

[1722] 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。

[1723] 核磁共振(^{1}H NMR)的测定仪器使用Bruker 400MHz核磁共振仪;测定溶剂为氘代甲醇(CD_3OD)、氘代氯仿($CDCl_3$)或六氘代二甲基亚砜(DMSO-d_6);内标物质为四甲基硅烷(TMS)。

[1724] 实施例中使用的核磁共振(NMR)图谱中的缩写示于以下。

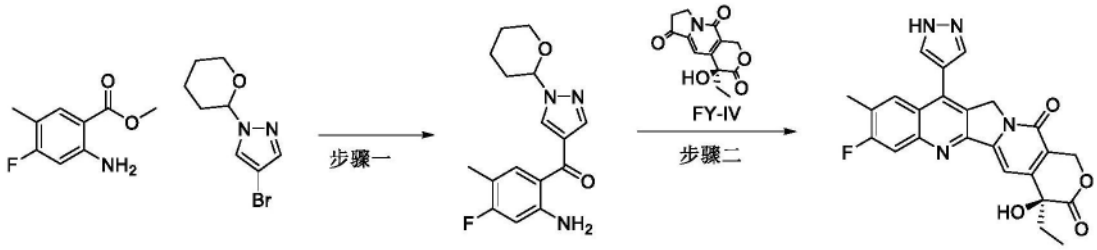
[1725] s:单峰(singlet)、d:二重峰(doublet)、t:三重峰(triplet)、q:四重峰(quartet)、dd:双二重峰(doubledoublet)、qd:四二重峰(quartet doublet)、ddd:双双二重峰(double double doublet)、ddt:双双三重峰(double double triplet)、dddd:双双双二重峰(double double double doublet)、m:多重峰(multiplet)、br:宽峰(broad)、J:偶合常数、Hz:赫兹、DMSO-d_6:氘化二甲基亚砜。δ值用ppm值表示。

[1726] 质谱(MS)的测定仪器使用Agilent(ESI)质谱仪,型号为Agilent 6120B。

[1727] 一、生物活性分子和合成“药物-连接体化合物”过程使用的中间体的合成

[1728] A、生物活性分子的合成

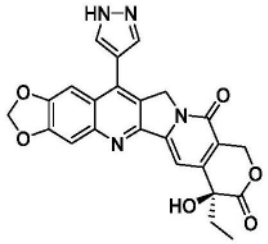
[1729] 实施例A1.1:(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.1)的合成

[1730] 

[1731] 步骤一:4-溴-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑(4.6g)溶于无水四氢呋喃中(50ml),上述溶液在氮气保护下干冰-丙酮冷却到-78℃,然后滴加正丁基锂(12ml,2M),反应液在-78℃搅拌20分钟,然后加入2-氨基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯(1.83g),加完后,反应自然升至室温,并连续搅拌反应5小时。反应甲甲醇(3ml)猝灭后加入乙酸乙酯(200ml),溶液用水洗(100ml x 3),有机相干燥后除去有机溶剂,用硅胶柱色谱分离得到目标产物(2-氨基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮,ESI-MS(m/z):304 $[M+H]^+$。

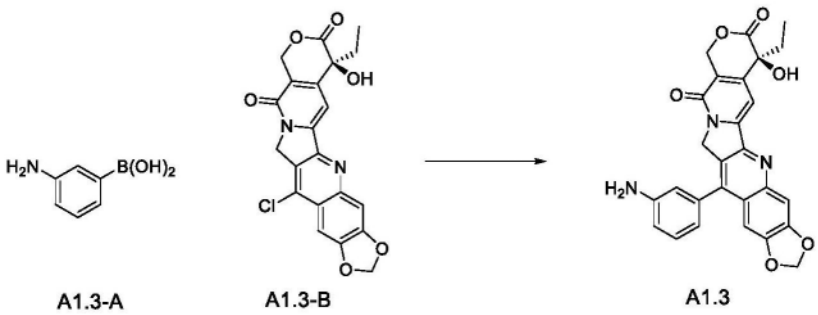
[1732] 步骤二:(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃[3,4-f]中氮茚并-3,6,10(4H)-三酮(2.63g),(2-氨基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮(3.03g),对甲苯磺酸(1.74g)溶于二氯甲烷(50ml)中,然后除去溶剂,混合物在氮气保护下加热至120℃反应4小时。混合物溶于乙酸乙酯(300ml),有机相水洗(100ml x 2),干燥后除去有机溶剂,残留物用硅胶柱层析分离得到目标产物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.1)。ESI-MS(m/z):447$[M+H]^+$。

[1733] 实施例A1.2:(S)-7-乙基-7-羟基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.2)的合成

[1734] 

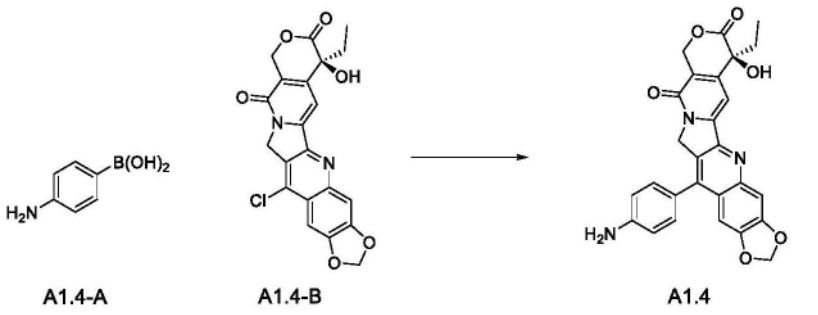
[1735] 用实施例A1.1相同的方法和反应条件,用6-氨基苯并[d][1,3]二氧环戊烷-5-羧酸甲酯代替2-氨基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯,得到目标产物(S)-7-乙基-7-羟基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.2)。ESI-MS(m/z):459[M+H]$^+$。

[1736] 实施例A1.3:(S)-14-(3-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.3)的合成

[1737] 

[1738] 化合物(A1.3-A)(1.4g),化合物(A1.3-B)(2.2g),$Pd_2(DBA)_3$(300mg),三环己基磷(300mg),醋酸钾(1.1g)依次加入二氧六环(30ml)和水(5ml)的混合溶剂中,混合物在氮气保护下100℃加热搅拌反应12小时。冷却后加入乙酸乙酯(200ml),水洗(100ml),干燥后,硅胶柱层析分离得到目标产物(S)-14-(3-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.3)。ESI-MS(m/z):484[M+H]$^+$。

[1739] 实施例A1.4:(S)-14-(4-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.4)的合成

[1740] 

[1741] 化合物(A1.4-A)(1.4g),化合物(A1.4-B)(2.2g),$Pd_2(DBA)_3$(300mg),三环己基磷(300mg),醋酸钾(1.1g)依次加入二氧六环(30ml)和水(5ml)的混合溶剂中,混合物在氮气保护下100℃加热搅拌反应12小时。冷却后加入乙酸乙酯(200ml),水洗(100ml),干燥后,硅胶柱层析分离得到目标产物(S)-14-(4-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,

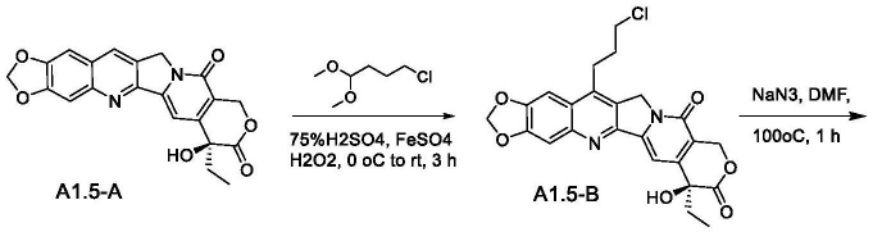
3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.4)。

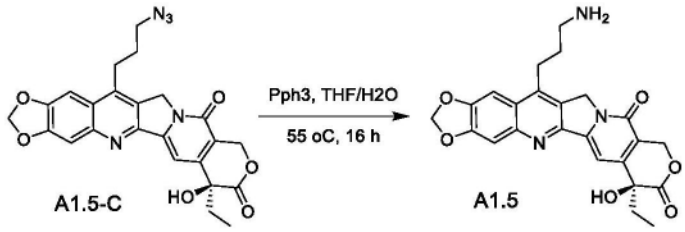
[1742] ESI-MS(m/z):484[M+H]$^+$;

[1743] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.56(s,1H),7.34(d,J=8.0Hz,2H),7.27(s,1H),7.14(s,1H),6.89(d,J=7.8Hz,2H),6.26(s,2H),5.40(s,2H),5.05(s,2H),1.96-1.78(m,2H),0.88(t,J=7.2Hz,3H)。

[1744] 实施例A1.5:(S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.5)的合成

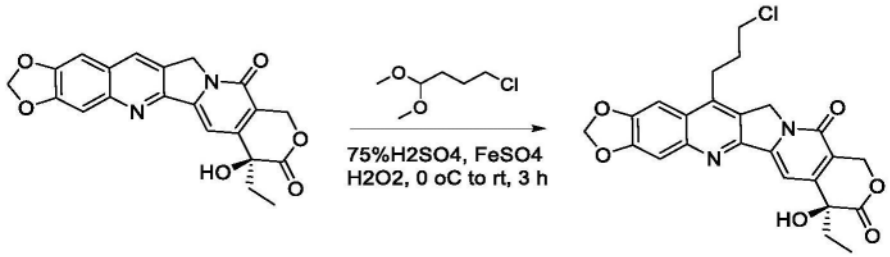
[1745]





[1746] 步骤一:(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

[1747]



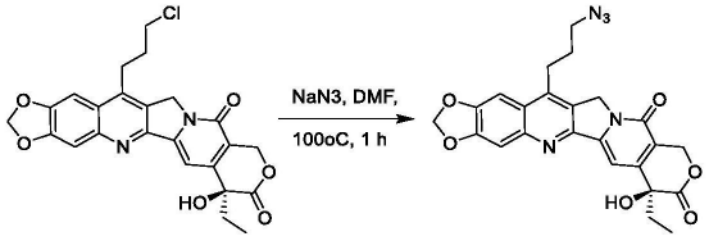
[1748] 冰浴条件下,向化合物(S)7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]茚并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.5-A,500mg)的75%硫酸溶液(5mL)中加入七水合硫酸亚铁(570mg七水合硫酸亚铁溶于1mL水中),和4,4-二甲氧基氯丁烷(3.89g),反应液搅拌三分钟后滴加双氧水(29%,2.5mL)。反应液在0℃下搅拌反应5分钟后升至室温,并搅拌反应3小时。反应液加入水(50mL)稀释,乙酸乙酯(80mL×2)萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到粗产品,粗产品用C18柱(乙腈/0.05%甲酸的水溶液:5%-60%)进一步纯化得到目标化合物(黄色固体,400mg,收率:67%)。

[1749] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:468.9;

[1750] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.65(s,1H),7.51(s,1H),7.24(s,1H),6.50(s,1H),6.30(s,2H),5.42(s,2H),5.26(s,2H),3.81(d,J=5.9Hz,2H),3.22(s,2H),1.98(d,J=6.7Hz,4H),0.88(t,J=7.2Hz,3H)。

[1751] 步骤二:(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂

环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

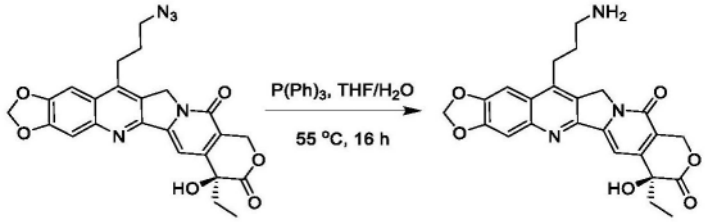
[1752] 

[1753] 向化合物(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(200mg)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(3mL)中,加入叠氮化钠(284mg),反应液在100℃下搅拌反应1小时。向反应液中加入水(30mL),乙酸乙酯(60mL×2)萃取,有机相用经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到目标化合物(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(黄色固体,180mg,收率:88%)。

[1754] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:476;

[1755] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.65(s,1H),7.51(s,1H),7.24(s,1H),6.48(s,1H),6.29(s,2H),5.42(s,2H),5.25(s,2H),3.53-3.49(m,2H),3.16-3.12(m,2H),1.93-1.80(m,4H),0.88(t,J=7.2Hz,3H)。

[1756] 步骤三:(S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

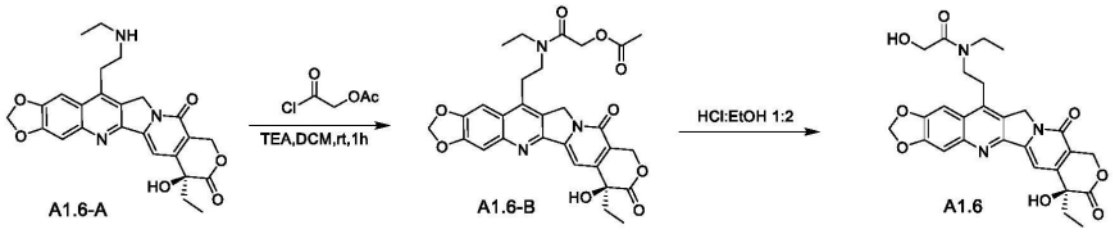
[1757] 

[1758] 向化合物(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成(130mg,0.274mmol)的四氢呋喃(3mL)和水(1mL)混合溶液中加入三苯基膦(108mg,0.411mmol),在55℃下反应16小时。LCMS显示反应完全。向反应液中加入水(5mL),用2N盐酸(3mL)调至酸性,用乙酸乙酯(10mL)萃取。水相经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%甲酸的水溶液)得到目标化合物(S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成(A1.5,黄色固体,15mg,收率:12%)。

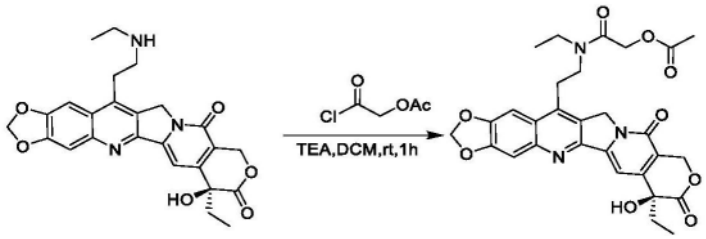
[1759] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:449.9;

[1760] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.72(s,3H),7.53(s,1H),7.25(s,1H),6.50(s,1H),6.30(s,2H),5.43(s,2H),5.24(s,2H),3.15(d,J=6.4Hz,2H),3.03(t,J=6.9Hz,2H),1.96-1.81(m,4H),0.88(t,J=7.3Hz,3H)。

[1761] 实施例A1.6:(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺(A1.6)的合成

[1762] 

[1763] 步骤一:(S)-2-(乙基(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)氨基)-2-氧乙基乙酸酯(A1.6-B)的制备:

[1764] 

[1765] 将化合物(S)-7-乙基-14-(2-(乙胺基)乙基)-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.6-A,50mg),乙酰氧基乙酰氯,(73mg),三乙胺(50mg)依次加入二氯甲烷(5mL)中,室温搅拌反应1小时。反应液旋蒸除去溶剂,得到粗品油状化合物75mg。

[1766] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:564.2。

[1767] 步骤二:(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺(A1.6)的合成

[1768] 

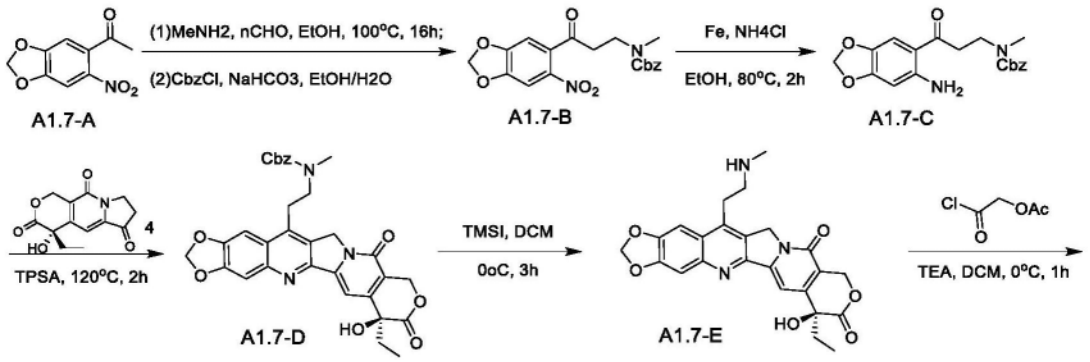
[1769] 将粗品化合物(S)-2-(乙基(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)氨基)-2-氧乙基乙酸酯(75mg,0.13mmol)溶在浓盐酸和无水乙醇混合溶液(体积比为1/2,3mL)中,然后反应液85℃回流反应1小时。LCMS显示反应完成。反应液浓缩,粗产品经制备色谱(0.01%三氟乙酸的水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺(A1.6)(15mg,收率:26%)为白色固体。

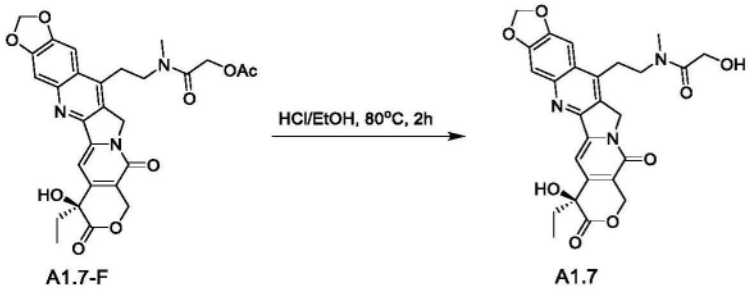
[1770] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:522.0;

[1771] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.92(s,1H),7.53(m,1H),7.25(s,1H),6.50(s,1H),6.31(s,2H),5.43(s,2H),5.34(m,2H),4.65(m,1H),4.07(m,2H),3.52(m,2H),3.41(m,2H),2.00(m,2H),1.88(m,2H),1.16-1.04(m,3H),0.89-0.83(m,3H)。

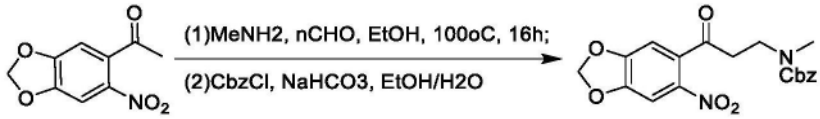
[1772] 实施例A1.7:(S)-N-甲基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-

10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺(A1.7)的合成

[1773] 



[1774] 步骤一:化合物甲基苄基(3-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环-5-基)-3-氧丙基)氨基甲酸酯的制备

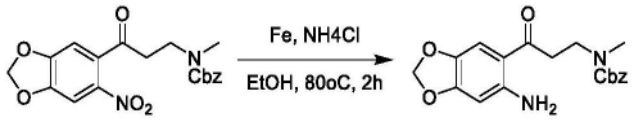
[1775] 

[1776] 将化合物1-(6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)乙烷-1-酮(A1.7-A,500mg),甲胺盐酸盐(1.6g)和多聚甲醛(714mg)溶在乙醇(8mL)中,100℃下闷罐反应16小时。反应液降至室温并减压浓缩,所得残渣用二氯甲烷(80mL)溶解,有机相经水(50mL×3)萃取。所得水相用碳酸氢钠调至PH=9,然后加入氯甲酸苄酯(513mg,3.0mmol),在室温下反应16小时。反应液用乙酸乙酯(30mL×3)萃取,有机相经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,浓缩得到粗品,粗产品经C18分离纯化(乙腈/水含0.05%甲酸=5~95%)得到目标化合物(A1.7-B,180mg,收率23%)。

[1777] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:387.1.

[1778] ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.56(s,1H),7.35(m,5H),7.32(m,1H),6.17(s,2H),5.13(s,2H),3.71(m,2H),3.03(m,3H),2.99-2.86(m,2H)。

[1779] 步骤二:化合物苄基(3-(6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)-3-氧丙基)(甲基)氨基甲酸酯(A1.7-C)的制备

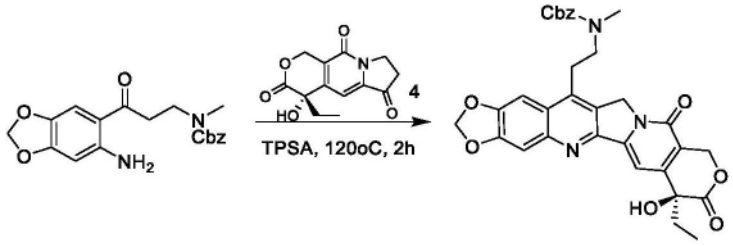
[1780] 

[1781] 将化合物A1.7-B甲基苄基(3-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环-5-基)-3-氧丙基)氨基甲酸酯(180mg,0.47mmol)溶于饱和氯化铵水溶液(8mL)和乙醇(8mL)混合溶液中,然后

向反应液中加入铁粉(130mg),反应在80℃下搅拌2小时。将反应液过滤,滤液减压浓缩成固体,粗产品经TLC分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=2/1)得到目标化合物A1.7-C(76mg)。

[1782] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:357.0。

[1783] 步骤三:苄基(S)-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(甲基)氨基甲酸酯(A1.7-D)的制备

[1784] 

[1785] 室温下,将化合物A1.7-C苄基(3-(6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)-3-氧丙基)(甲基)氨基甲酸酯(38mg),化合物(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10(4H)-三酮(29mg)和对甲苯磺酸(23mg)溶于二氯甲烷(5mL)溶液中,溶液澄清混匀后减压浓缩,用油泵抽至真空,反应在120℃真空下反应2小时。将反应液降至室温,加入水(30mL)并用二氯甲烷(30mL×3)萃取。合并有机相依次经无水硫酸钠干燥、过滤,滤液减压浓缩得到目标化合物A1.7-D(50mg)。

[1786] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=584.0。

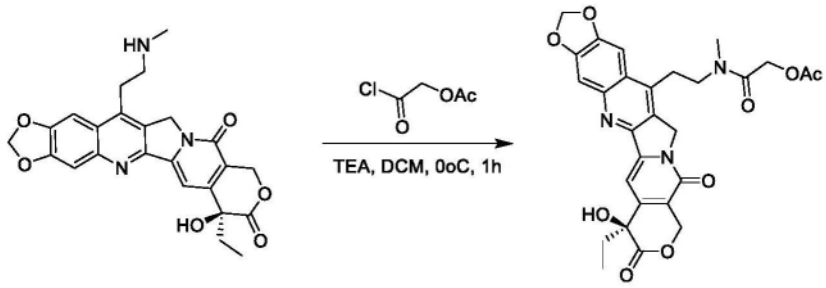
[1787] 步骤四:(S)7-乙基-7-羟基-14-(2-(甲胺基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.7-E)的制备

[1788] 

[1789] 室温下,将化合物A1.7-D苄基(S)-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(甲基)氨基甲酸酯(50mg)溶于二氯甲烷(5mL)溶液中,于0℃下加入三甲基碘硅烷(51mg,0.26mmol),反应3小时。将反应液浓缩除去溶剂,经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%甲酸)得到褐色固体化合物A1.7-E(15mg)。

[1790] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:450.0。

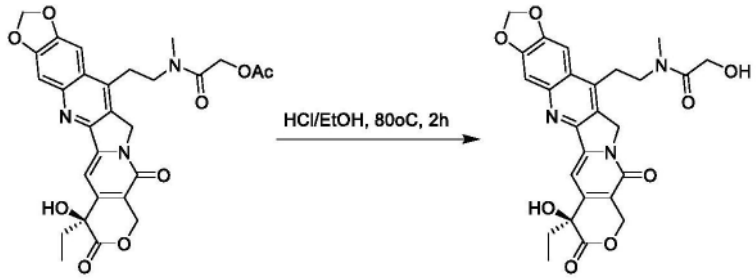
[1791] 步骤五:化合物(S)-2-((2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(甲基)氨基)-2-氧乙基乙酸酯(A1.7-F)的制备

[1792] 

[1793] 将化合物A1.7-E(S)7-乙基-7-羟基-14-(2-(甲胺基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(15mg)和三乙胺(15mg)溶于二氯甲烷(5mL)溶液中,于0℃下加入乙酰氧基乙酰氯(20mg)反应1小时。将反应液浓缩除去溶剂得到粗品,所得固体直接用于下一步,未做进一步纯化。

[1794] LCMS(ESI)$[M5+H]^+$=550.1。

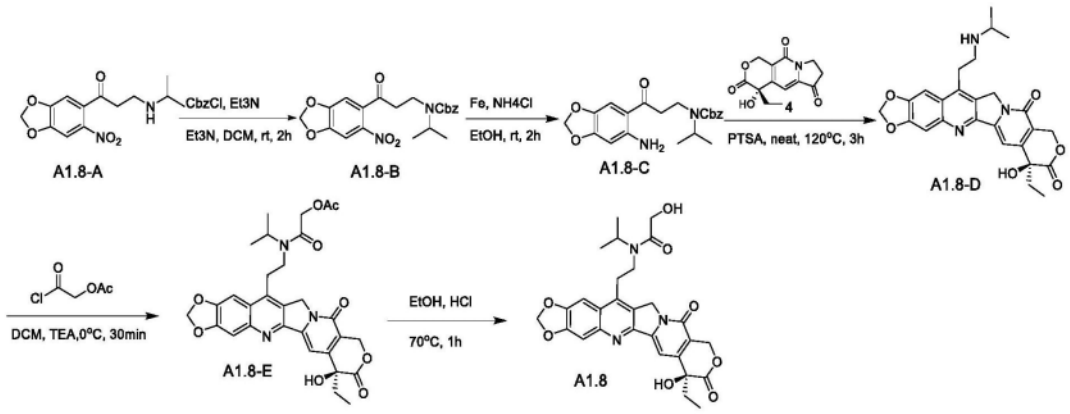
[1795] 步骤六:化合物(S)-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基-N-甲基乙酰胺(A1.7)的制备

[1796] 

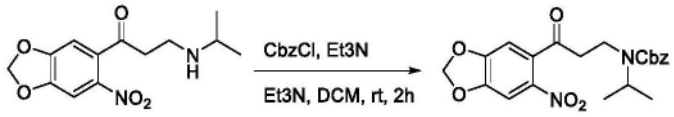
[1797] 将化合物A1.7-F(S)-2-((2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(甲基)氨基)-2-氧乙基乙酸酯(15mg)溶于乙醇(5mL)溶液中,加入浓盐酸(1.5mL),于80℃下反应2小时。将反应液浓缩除去溶剂,经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%甲酸)得到白色固体化合物A1.7(1.6mg)。

[1798] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:508.2。

[1799] 实施例A1.8:(S)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺(A1.8)的合



[1800] 步骤一:化合物异丙基苄基(3-(6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)-3-氧丙基)氨基甲酸酯(A1.8-B)的制备

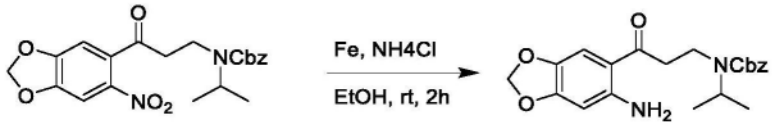
[1801] 

[1802] 向化合物(A1.8-A)3-(异丙胺基)-1-(6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)丙-1-酮(900mg)的二氯甲烷溶液(10mL)中,依次加入三乙胺(1.8g)和苄氧基碳酰氯(734mg,4.3mmol),在室温下反应2小时。反应液加水(50mL)稀释,用二氯甲烷(50mL×3)萃取,有机相经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到粗品,粗产品经柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=3/1)得到目标化合物(A1.8-B)(600mg)。

[1803] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:414.9;

[1804] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.72(s,1H),7.34(br s,6H),6.31(s,2H),5.08(s,2H),4.14-4.10(m,1H),3.48(d,J=7.9Hz,2H),3.03(s,2H),1.13-1.11(m,6H)。

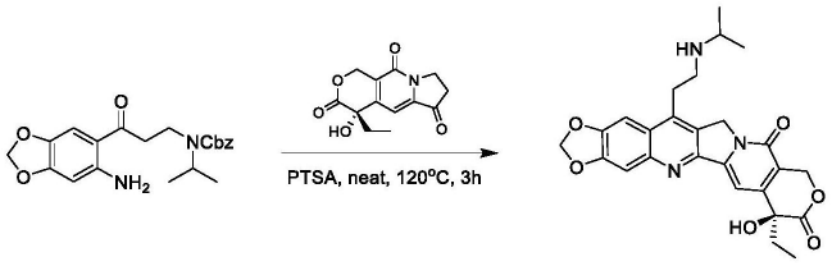
[1805] 步骤二:化合物苄基(3-(6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)-3-氧丙基)(异丙基)氨基甲酸酯(A1.8-C)的制备

[1806] 

[1807] 将化合物(A1.8-B)异丙基苄基(3-(6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)-3-氧丙基)氨基甲酸酯(200mg,0.48mmol)溶于饱和氯化铵(3mL)和乙醇(3mL)混合溶液中,然后向反应液中加入铁粉(135mg),反应在室温下搅拌2小时。将反应液过滤,滤液减压浓缩成固体,粗产品经柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=3/1)得到目标化合物(A1.8-C)(65mg)。

[1808] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:395.2。

[1809] 步骤三:(S)7-乙基-7-羟基-14-(2-(异丙胺基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.8-D)的制备

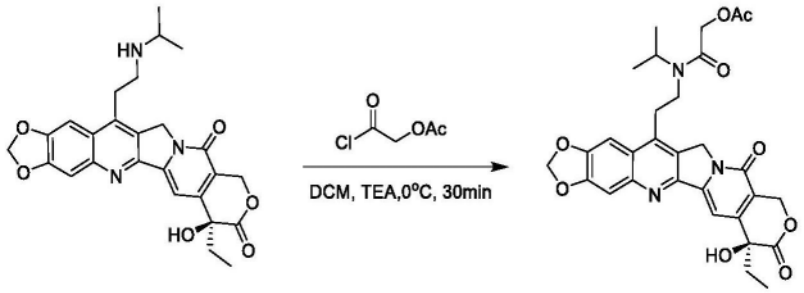
[1810] 

[1811] 室温下,将化合物(A1.8-C)苄基(3-(6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基)-3-氧丙基)(异丙基)氨基甲酸酯(65mg),化合物(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10(4H)-三酮(45mg)和对甲苯磺酸(33mg,0.17mmol)溶于二氯甲烷(10mL)溶液中,溶液澄清混匀后减压浓缩,用油泵抽至真空,反应在120℃真空下反应2小时。将反应液降至室温,加入水(50mL),用二氯甲烷(30mL×3)萃取,合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤,滤液减压浓缩,粗产品经柱层析分离纯化(二氯甲烷/甲醇=10/1)得到目标化合物(A1.8-D)(40mg)。

[1812] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:478.0;

[1813] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.46(s,1H),7.67(s,1H),7.57(s,1H),7.27(s,1H),6.52(s,1H),6.33(s,2H),5.44(s,2H),5.35(s,2H),3.41(br s,2H),3.23(br s,3H),1.94-1.78(m,2H),1.25(d,J=6.4Hz,6H),0.88(t,J=7.3Hz,3H)。

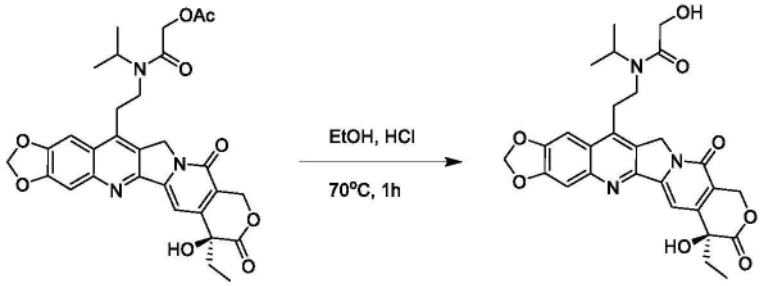
[1814] 步骤四:化合物((S)-2-((2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(异丙基)氨基)-2-氧代乙酸乙酯(A1.8-E)的制备

[1815] 

[1816] 冰浴下,向化合物(S)-7-乙基-7-羟基-14-(2-(异丙胺基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.8-D)(40mg)的二氯甲烷溶液(2mL)中加入三乙胺(35mg),2-氯-2-氧乙基乙酸酯(57mg),在零度下反应30分钟。将反应液减压浓缩得到化合物A1.8-E,直接应用于下一步。

[1817] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:578.0。

[1818] 步骤五:化合物(S)-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基-N-异丙基乙酰胺(A1.8)的制备

[1819] 

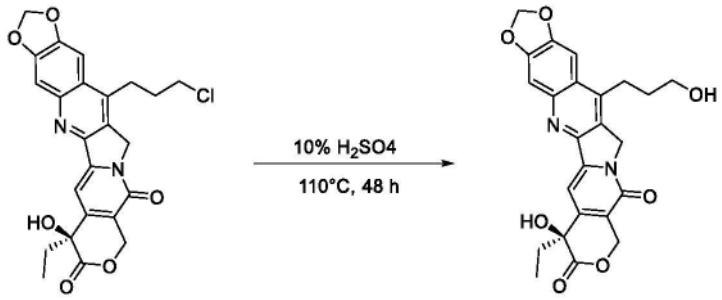
[1820] 向化合物(S)-2-((2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)(异丙基)氨基)-2-氧代乙酸乙酯(A1.8-E,50mg)的乙醇溶液(3mL)中,加入浓盐酸(0.5mL),在70℃下反应1小时。将反应液浓缩得到粗产品。再经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%甲酸的水溶液)得到目标化合物(A1.8,3mg)。

[1821] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:464.0;

[1822] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.99(s,1H),7.53(s,1H),7.26(s,1H),6.31(s,2H),5.43(s,2H),5.36(s,2H),4.22(s,2H),3.99-3.94(m,1H),3.44(dd,J=16.7,7.8Hz,2H),3.33-3.21(m,2H),1.95-1.79(m,2H),1.19(dd,J=16.4,5.8Hz,6H),0.88(t,J=7.2Hz,3H)。

[1823] 实施例A1.9:(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.9)的合

成

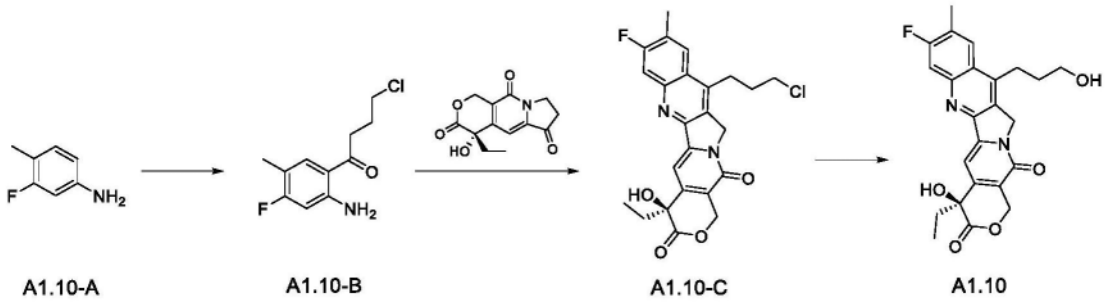
[1824] 

[1825] 将化合物(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-氯丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(100mg,0.213mmol)溶于10%硫酸(5mL)溶液中,反应在110℃下反应48小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠(30mL)溶液,用二氯甲烷(10mL X5)萃取,无水硫酸钠干燥,抽滤,减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%甲酸)得到(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.9,1.78mg)。

[1826] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:451.0;

[1827] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.63(s,1H),7.50(s,1H),7.24(s,1H),6.48(s,1H),6.28(s,2H),5.47-5.37(m,2H),5.32-5.19(m,2H),3.51-3.46(m,2H),3.17-3.13(m,2H),1.92-1.76(m,4H),0.90-0.84(m,3H)。

[1828] 实施例A1.10:(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.10)的合成

[1829] 

[1830] 步骤一:

[1831] 0℃下,向化合物A1.10-A(10g)的1,2-二氯乙烷(200mL)溶液,滴加1mol/L三氯化硼(96mL),4-氯丁腈(9.9g)。80℃下搅拌反应2小时。反应液降至室温,加入2mol/L盐酸(90mL)并在80℃下回流搅拌0.5小时。反应液降至室温,加入少量水稀释,用二氯甲烷(200mL X 3)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,抽滤,浓缩得到粗品,粗产品经柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=10/1)得到目标化合物A1.10-B(4g)。

[1832] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:230.0。

[1833] 步骤二:

[1834] 向化合物A1.10-B(50mg)中加入(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10(4H)-三酮(35mg),一水合对甲苯磺酸(41.4mg),溶于二氯甲烷(30mL)溶液中,溶液澄清混匀后减压浓缩,用油泵抽至真空,反应在120℃真空下反应3小时。LCMS显示反应完全。将反应液降至室温,加入水(20mL),用二氯甲烷(20mL X 3)萃取。合并有机相

依次并无水硫酸钠干燥、过滤,滤液减压浓缩得到粗产品。粗产品经柱层析分离纯化(二氯甲烷比甲醇=20比1)得到目标化合物A1.10-C(80mg)为白色固体。

[1835] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:457.0。

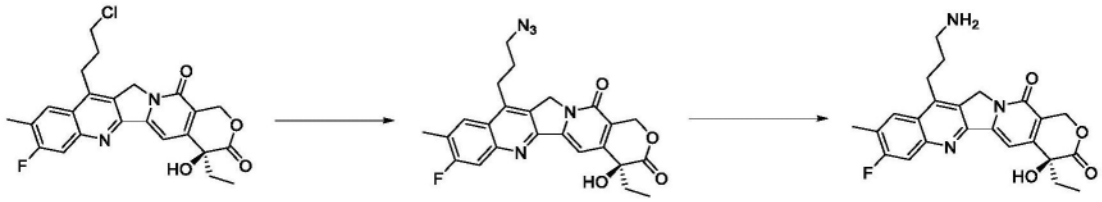
[1836] 步骤三:

[1837] 将化合物A1.10-C(75mg)溶于六甲基磷酰三胺,加入纯水(0.8mL)反应液在100℃下搅拌72小时。LCMS检测反应完成。经制备色谱(0.01% TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物(10mg)。

[1838] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:439.2;

[1839] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.22(d,J=8.4Hz,1H),7.87(d,J=10.9Hz,1H),7.31(s,1H),6.50(s,1H),5.43(s,2H),5.30(s,2H),4.67(t,J=4.9Hz,1H),3.55-3.47(m,2H),3.28-3.20(m,2H),2.51(s,3H),1.93-1.81(m,4H),0.88(t,J=7.3Hz,3H)。

[1840] 实施例A1.11:(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.11)的合成

[1841] 

[1842] 步骤一:

[1843] 向A1.10-C(395mg)的N'N-二甲基甲酰胺(10mL)溶液中加入叠氮化钠(432mg),反应液80℃反应16小时,然后冷却至室温,加入水(50mL)稀释,用乙酸乙酯(80mL*3)萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,抽滤浓缩得到目标产物A1.11-A(290mg)。

[1844] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:464.0。

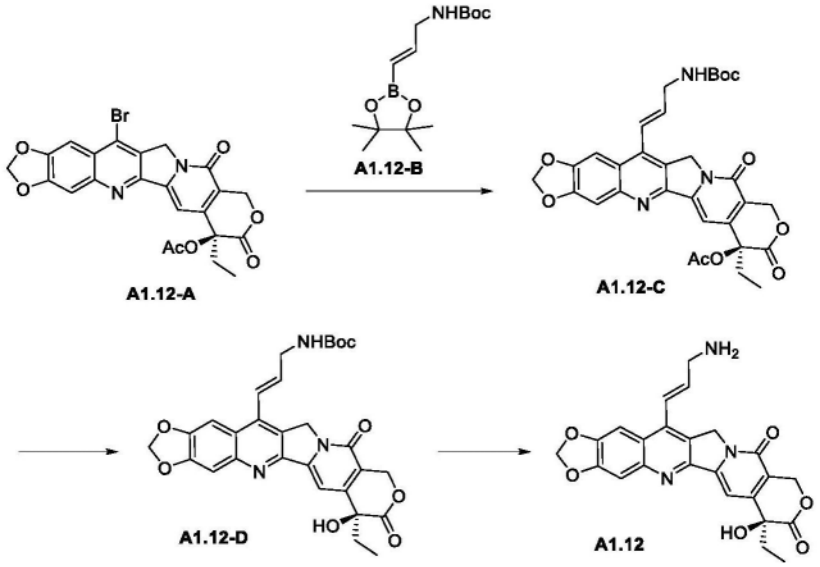
[1845] 步骤二:

[1846] 将化合物A1.11-A(93mg)溶于四氢呋喃(5mL)中,加入三苯基膦(78mg),室温反应4小时。然后向反应液中加入盐酸(4M,1mL),反应液升至55℃反应16小时,LCMS监测反应完全。反应液直接浓缩,粗品经过反相柱(流动相A为0.05%甲酸水溶液,B为乙腈)提纯得到目标产物A1.11(28mg,收率:36%)为白色固体。

[1847] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:438.4;

[1848] ^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δ8.52(s,1H),8.16(d,J=7.8Hz,1H),7.76(d,J=10.7Hz,1H),7.63(s,1H),5.49(ABq,J=78.9,16.3Hz,2H),5.31(br s,2H),3.35-3.32(m,2H),3.22-3.10(m,2H),2.55(s,3H),2.13-2.11(m,2H),1.96-1.94(m,2H),1.01(t,J=7.4Hz,3H)。

[1849] 实施例A1.12:(S,E)-14-(3-氨基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.12)的合成

[1850] 

[1851] 步骤一：

[1852] 将化合物A1.12-A(200mg,0.39mmol),化合物A1.12-B(112mg,0.39mmol),氟化铯(152mg,0.975mmol)和四三苯基膦钯(45mg,0.039mmol)加入1,4-二氧六环溶液(8mL)。在氮气气氛下120℃微波反应0.5小时。LCMS显示反应完全。向反应液加入二氯甲烷(20mL)和甲醇(10mL)混合溶液稀释,过滤。滤液浓缩,粗品通过制备TLC纯化(二氯甲烷:甲醇＝30:1)得到目标化合物(S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-7-基乙酸酯(A1.12-C,60mg,收率:26%)为棕色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝590.3;

[1853] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.63(s,1H),7.49(s,1H),7.35(s,1H),7.09(d,J＝16.7Hz,1H),6.93(s,1H),6.45(d,J＝16.6Hz,1H),6.30(s,2H),5.47(s,2H),5.34-5.24(m,2H),3.94(s,2H),2.21(br s,3H),2.03-1.96(m,2H),1.45(s,9H),0.91(t,J＝6.7Hz,3H).

[1854] 步骤二：

[1855] 向化合物(S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-7-基乙酸酯(A1.12-C,50mg,0.085mmol)的甲醇溶液(15mL)和加入甲醇钠(9.2mg,0.17mmol),在50℃下搅拌反应2小时。LCMS显示反应完全。将反应液浓缩得到目标化合物(S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.12-D,50mg)粗品为棕色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝548;

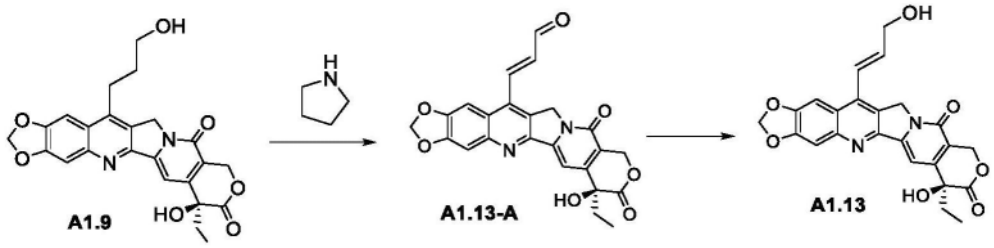
[1856] 步骤三：

[1857] 向化合物(S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.12-D,50mg,0.091mmol)的二氯甲烷溶液(2mL)中,加入三氟乙酸(1mL),在室温下搅拌反应30分钟。LCMS显示反应完全。将反应液浓缩,粗品经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%甲酸的水溶液)得到目标化合物(S,E)-14-(3-氨基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.12)(8.1mg,收率21%)为棕色固体。

[1858] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=448.3;

[1859] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.20(s,2H),7.72(s,1H),7.54(s,1H),7.40(d,J=16.5Hz,1H),7.27(s,1H),6.52-6.46(m,2H),6.31(s,2H),5.42(s,2H),5.27(s,2H),3.86(br s,2H),1.90-1.83(m,2H),0.88(t,J=7.1Hz,3H).

[1860] 实施例A1.13:(S,E)-14-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.13)的合成

[1861] 

[1862] 步骤一:

[1863] 将化合物A1.9(200mg,0.444mmol)溶在二甲亚砜(2mL)中,加入IBX(311mg,1.11mmol),室温下搅拌2小时,然后补加入IBX(186mg,0.666mmol)于反应液中,再向反应液中加入四氢吡咯(6.3mg,0.089mmol)和乙腈(3mL),反应液在室温下搅拌过夜。LCMS检测反应完成,用乙酸乙酯萃取(20mL x 3),有机相经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,旋干,得到粗产品,粗产品通过硅胶柱纯化(DCM:MeOH=50:1to 10:1)得到目标化合物(S,E)-14-(3-氧代-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.13-A,100mg,纯度50.0%,收率25.0%)为黄色固体。LCMS(ESI)[M+H]$^+$=447.1。

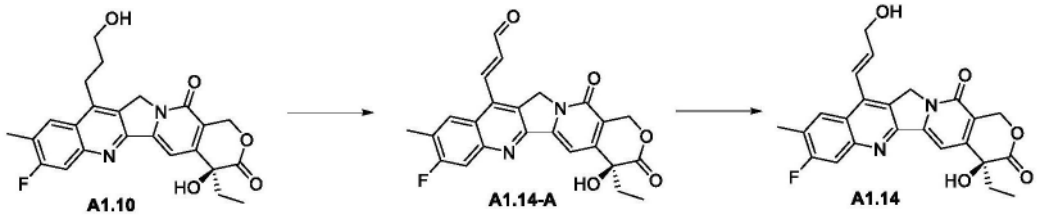
[1864] 步骤二:

[1865] 将化合物A1.13-A(40mg,0.09mmol)溶在四氢呋喃(1mL)中,然后向反应液中加入氰基硼氢化钠(28mg,0.448mmol),在室温下搅拌过夜。LCMS显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品,粗产品纯化通过prep-HPLC(HCl in water/MeCN)得目标化合物(3.56mg,纯度93.6%,收率9.0%)为淡黄色固体。

[1866] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=449.2;

[1867] 1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.61(s,1H),7.50(s,1H),7.24(s,1H),7.20(d,J=16.4Hz,1H),6.69-6.59(m,1H),6.49(s,1H),6.30(s,2H),5.42(s,2H),5.26(s,2H),5.16(br s,1H),4.34(br s,2H),1.93-1.81(m,2H),0.88(t,J=7.3Hz,3H).

[1868] 实施例A1.14:(S,E)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉--3,14(4H)-二酮(A1.14)的合成

[1869] 

[1870] 步骤一：

[1871] 向25mL的单口瓶中加入化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.10,100mg,0.228mmol),DMSO(0.5mL)和乙腈(0.75mL),依次加入IBX(160mg,0.571mmol)和(R)-二苯基(吡咯烷-2-基)甲醇(12mg,0.047mmol),室温下继续搅拌反应16小时,然后向反应液中加入甲醇和二氯甲烷混合溶剂(200mL)(DCM:MeOH＝10:1),饱和食盐水(300mL)萃取,合并有机相,水洗、干燥、过滤,滤液减压蒸干溶剂得粗品,粗品用快速Flash纯化(DCM:MeOH＝10:1)得到目标化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-氧代丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.14-A,40mg,收率40%)。

[1872] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝435.1.

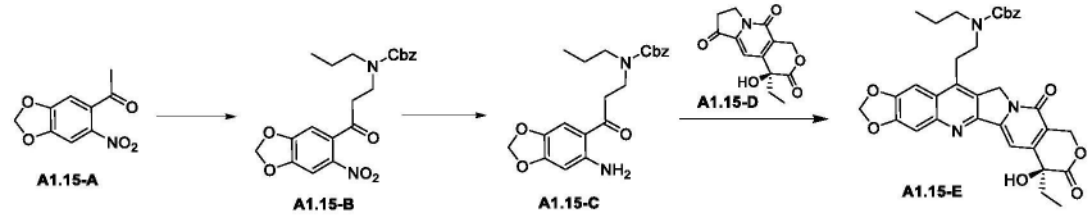
[1873] 步骤二：

[1874] 向50mL的三口瓶中加入化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-氧代丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.14-A,40mg,0.228mmol),无水THF(5mL),N_2保护下降温至-78℃,缓慢滴加三仲丁基硼氢化锂的THF溶液(0.11mL,1N),保持-78℃继续搅拌1小时。反应完成后加入饱和氯化铵水溶液淬灭反应,升至室温,用饱和食盐水稀释(50mL),用乙酸乙酯萃取(20mL X 3),合并有机相水洗、干燥、过滤,减压蒸干溶剂得到(S,E)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉--3,14(4H)-二酮(A1.14,28mg)为类白色固体。

[1875] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝437.1。

[1876] 实施例A1.15:(S)-7-乙基-7-羟基-14-(2-(正丙基氨基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.15a)和(S)-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基-N-正丙基乙酰胺(A1.15b)的合成

[1877]



[1878] 步骤一：

[1879] 将化合物A1.15-A(5.0g,23.9mmol),丙基胺盐酸盐(22.8g,239mmol)和多聚甲醛

(7.18g,239mmol)溶在乙醇(100mL)中,110℃下闷罐反应12小时。LCMS检测反应完全。反应液降至室温并减压浓缩,向反应固体中加入二氯甲烷(100mL),用水(80mL X 3)洗涤,水相用碳酸氢钠调至pH=9。向水溶液中加入苄氧基碳酰氯(3.7g,21.8mmol),在室温下反应2小时。LCMS检测反应完全。用二氯甲烷(100mL X 3)萃取,有机相经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,浓缩得到粗品,粗产品经柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=10/1)得到目标化合物A1.15-B(1.5g,收率20.1%)为黄色油状液体。

[1880] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=415.1;

[1881] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.56(s,1H),7.35(m,6H),6.18(s,2H),5.17-5.12(m,2H),3.69-3.67(m,2H),3.32-3.30(m,2H),3.09-2.90(m,2H),1.59(m,2H),0.90(m,3H)。

[1882] 步骤二:

[1883] 将化合物A1.15-B(1.5g,3.63mmol)溶在饱和氯化铵(20mL)和乙醇(20mL)混合溶液中,然后向反应液中加入铁粉(1.02g,18.1mmol),反应在80℃下搅拌1小时。LCMS显示反应完成。将反应液过滤,滤液减压浓缩成固体,粗产品用C18柱反相分离纯化(乙腈/0.05%FA的水溶液:5%到55%)得到目标化合物A1.15-C(600mg,收率43.0%)为黄色固体

[1884] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=385.2,t_R=1.329min.

[1885] 步骤三:

[1886] 室温下,将化合物A1.15-C(350mg,0.91mmol),化合物(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10(4H)-三酮(A1.15-D,218mg,0.83mmol)和对甲苯磺酸(170mg,0.87mmol)溶于二氯甲烷(5mL)溶液中,溶液澄清混匀后减压浓缩,用油泵抽至真空,反应在120℃真空下反应2小时。LCMS显示反应完全。将反应液降至室温,加入水(50mL),用二氯甲烷(30mL X 3)萃取,合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤,滤液减压浓缩得到化合物A1.15-E(390mg,收率76%)为褐色固体。

[1887] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=612.0。

[1888] 步骤四:

[1889] 室温下,将化合物A1.15-E(390mg,0.638mmol)溶于二氯甲烷(5mL)溶液中,0℃氮气保护下滴加三甲基碘硅烷(510mg,2.55mmol),反应体系室温搅拌2小时。向反应液中加入乙醚(2mL)和浓盐酸(4mL),搅拌30分钟,用饱和碳酸氢钠将反应体系调至H=9,用二氯甲烷(50mL X 5)萃取,合并有机相经无水硫酸钠干燥、过滤,滤液减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%甲酸)得到化合物A1.15a(200mg,收率66.1%)为米白色固体。

[1890] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=478.2;

[1891] 1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.30(s,1H,HCO_2H),7.67(s,1H),7.51(s,1H),7.23(s,1H),6.62-6.41(m,1H),6.29(s,2H),5.42(s,2H),5.28(s,2H),3.27-3.25(m,2H),2.91-2.79(m,2H),2.58-2.56(m,2H),1.91-1.79(m,2H),1.44-1.42(m,2H),0.90-0.84(m,6H)。

[1892] 步骤五:

[1893] 室温下,将化合物A1.15a(120mg,0.251mmol)溶于二氯甲烷(5mL)中,0℃下滴加化合物乙酰氧基乙酰氯(167mg,1.25mmol)和三乙胺(133mg,1.25mmol),反应在0℃下搅拌反应30分钟。LCMS检测反应完全。将反应液减压浓缩得到粗品化合物A1.15-F(120mg,收率82.8%)为黄色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=578.3。

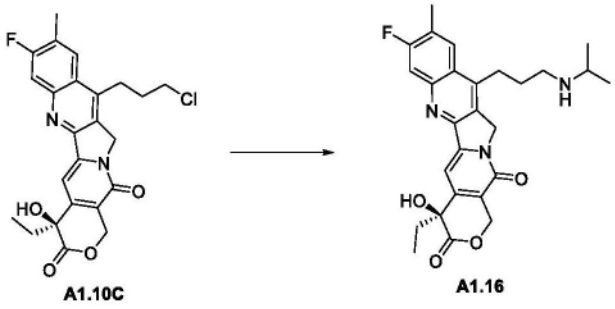
[1894] 步骤六：

[1895] 室温下，将化合物A1.15-F(120mg，0.207mmol)溶于乙醇(4mL)中，然后向反应液中加入浓盐酸(2mL)，反应在70℃下搅拌反应1小时。LCMS检测反应完全。向反应液加入水(20mL)，用二氯甲烷(30mL X 5)萃取，合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05％甲酸)得到化合物A1.15b(20mg，收率18.1％)为米白色固体。

[1896] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝536.2；

[1897] 1H NMR(400MHz，DMSO-d6)δ7.93(s，0.7H)，7.69(s，0.3H)，7.51(s，1H)，7.24(s，1H)，6.49(s，1H)，6.30(s，2H)，5.42(s，2H)，5.35(s，1.5H)，5.29(s，0.5H)，4.65-4.62(m，1H)，4.13-3.97(m，2H)，3.51-3.49(m，2H)，3.33-3.30(m，2H)，3.24-3.20(m，2H)，1.86-1.84(m，2H)，1.60-1.52(m，2H)，0.89-0.86(m，6H)。

[1898] 实施例A1.16：(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-异丙基氨基丙基)-9-甲基-1，12-二氢-14H-吡喃并[3'，4':6，7]吲哚嗪并[1，2-b]喹啉-3，14(4H)-二酮(A1.16)的合成

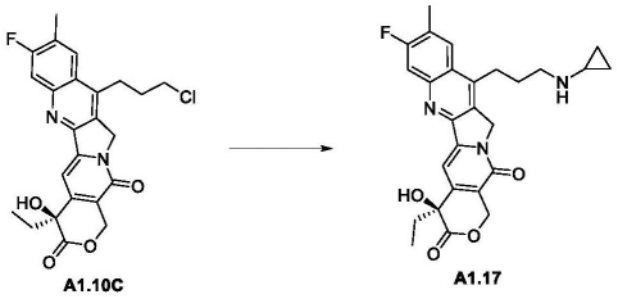
[1899] 

[1900] 向A1.10-C(200mg，0.439mmol)和异丙基胺(50mg，0.877mmol)的DMF溶液(10mL)中加入二异丙基乙胺(170mg，1.32mmol)和碘化钠(99mg，0.659mmol)，反应在50℃封管下反应2小时。向反应液中加入乙酸乙酯，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到粗品。粗品经pre-TLC分离纯化(二氯甲烷:甲醇＝10:1)后得到黄色固体，化合物继续经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05％甲酸)得到目标化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-异丙基氨基丙基)-9-甲基-1，12-二氢-14H-吡喃并[3'，4':6，7]吲哚嗪并[1，2-b]喹啉-3，14(4H)-二酮(A1.16，2.03mg)。

[1901] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝480.2；

[1902] ^{1}H NMR(400MHz，DMSO-d6)δ8.28(d，J＝8.0Hz，1H)，8.27(s，1H，HCO2H)7.92(d，J＝11.0Hz，1H)，7.33(s，1H)，6.53(s，1H)，5.45(s，2H)，5.30(s，2H)，33.30-3.22(m，3H)，3.18-3.10(m，2H)，2.54(s，3H)，2.06-1.94(m，2H)，1.93-1.80(m，2H)，1.26-1.20(m，6H)，0.88(t，J＝7.3Hz，3H)。

[1903] 实施例A1.17：(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-环丙基氨基丙基)-9-甲基-1，12-二氢-14H-吡喃并[3'，4':6，7]吲哚嗪并[1，2-b]喹啉-3，14(4H)-二酮(A1.17)的合成

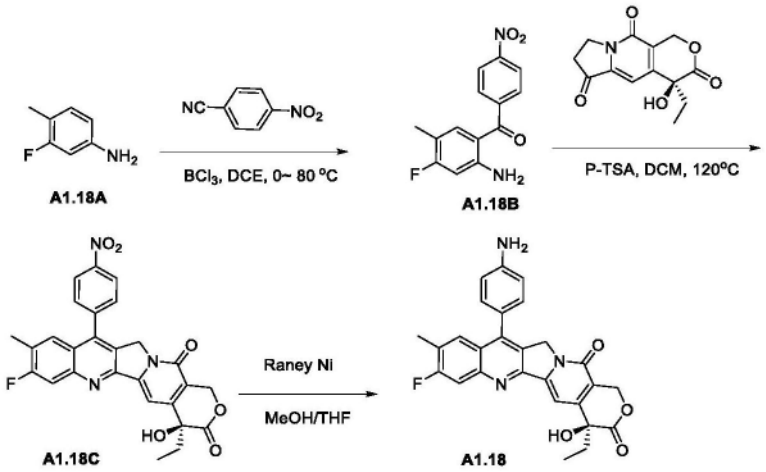
[1904] 

[1905] 向A1.10C(200mg,0.439mmol)和环丙基胺(52mg,0.881mmol)的DMF溶液(10mL)中加入二异丙基乙胺(165mg,1.28mmol)和碘化钠(96mg,0.640mmol),反应在50℃封管下反应2小时。LCMS监测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯,有机相经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,减压浓缩得到粗品。粗品经TLC分离纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1)后继续经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%甲酸)得到目标化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-环丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.17,5.12mg)。

[1906] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=478.2;

[1907] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.22(br s,2H,one is HCO2H),7.86(br s,1H),7.30(s,1H),6.51(s,1H),5.43(s,2H),5.28(s,2H),3.24-3.19(m,2H),2.75-2.68(m,2H),2.49(s,3H),2.16-2.09(m,1H),1.95-1.76(m,4H),0.91-0.83(t,J=7.3Hz,3H),0.43-0.33(m,2H),0.31-0.21(m,2H)。

[1908] 实施例A1.18:(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(4-氨基苯基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.18)的合成

[1909] 

[1910] 步骤一:

[1911] 氮气保护下,将3-氟-4-甲基苯胺(A1.18A,2.0g,16.3mmol)溶在1,2-二氯乙烷(40mL)中,在0℃下向其中滴加三氯化硼(19.2mL,19.2mmol)后,再缓慢加入对硝基苯腈(2.8g,19.2mmol),加入完毕将反应液升至80℃搅拌过夜。将反应液冷却至室温向其中加入盐酸(40mL,2M),后升温至80℃继续搅拌30分钟,经LCMS检测反应完全后,向反应液中加入水(80mL),用二氯甲烷萃取(100mL x 3),合并有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,粗产品经硅胶柱色谱(PE:EA=10:1)纯化得目标化合物(A1.18B,2.0g,收率46.5%)。

[1912] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=275.1;

[1913] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ8.34(d,J=8.6Hz,2H),7.77(d,J=8.6Hz,2H),7.39(s,2H),7.11(d,J=8.8Hz,1H),6.63(d,J=12.4Hz,1H),2.00(s,3H)。

[1914] 步骤二:

[1915] 将化合物A1.18B(620mg,2.28mmol),(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]中氮茚-3,6,10(4H)-三酮(600mg,2.28mmol),对甲苯磺酸(560mg,2.96mmol)加入到反应瓶中,用二氯甲烷将其溶解均匀,将二氯甲烷旋干,抽真空,在真空状态下将其加热到120℃,在此温度下保持六个小时,经LCMS检测反应完成后,向体系中加入甲醇(10mL),再加入水(80mL)有大量沉淀析出,沉淀过滤后干燥得到目标化合物(A1.18C,800mg,收率80.0%)为黄色固体。

[1916] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=502.2;

[1917] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ8.52(d,J=8.2Hz,2H),8.13-7.89(m,3H),7.64(d,J=8.4Hz,1H),7.37(d,J=13.4Hz,1H),6.54(s,1H),5.41(s,2H),5.06(m,2H),2.40(s,3H),1.94-1.84(m,2H),0.87(m,3H)。

[1918] 步骤三:

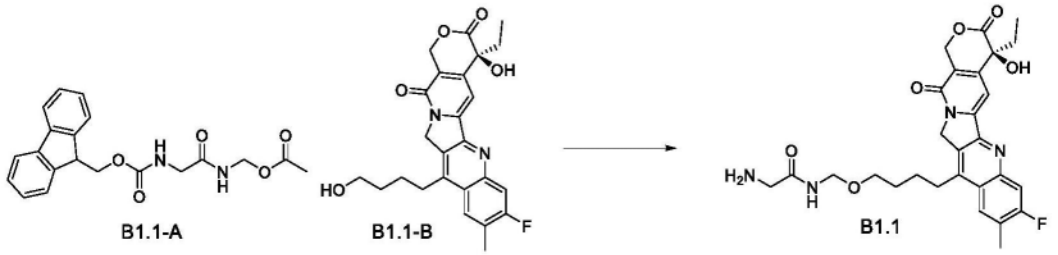
[1919] 将雷尼镍(609mg,10.5mmol)加入到化合物A1.18C(1.0g,2.1mmol)的甲醇(25mL)和四氢呋喃(50mL)混合溶液中,反应液在室温氢气氛围下搅拌5小时。LCMS检测反应完全,将反应液过滤,滤液旋干得到目标化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(4-氨基苯基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(A1.18,650mg,收率67%)为黄色固体。

[1920] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=472.3;

[1921] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.93-7.81(m,2H),7.40-7.25(m,3H),6.81(d,J=8.2Hz,2H),6.51(s,1H),5.62(s,2H),5.41(s,2H),5.10(s,2H),2.41(s,3H),1.93-1.80(m,2H),0.88(t,J=7.2Hz,3H)。

[1922] B、含生物活性分子片段中间体的合成

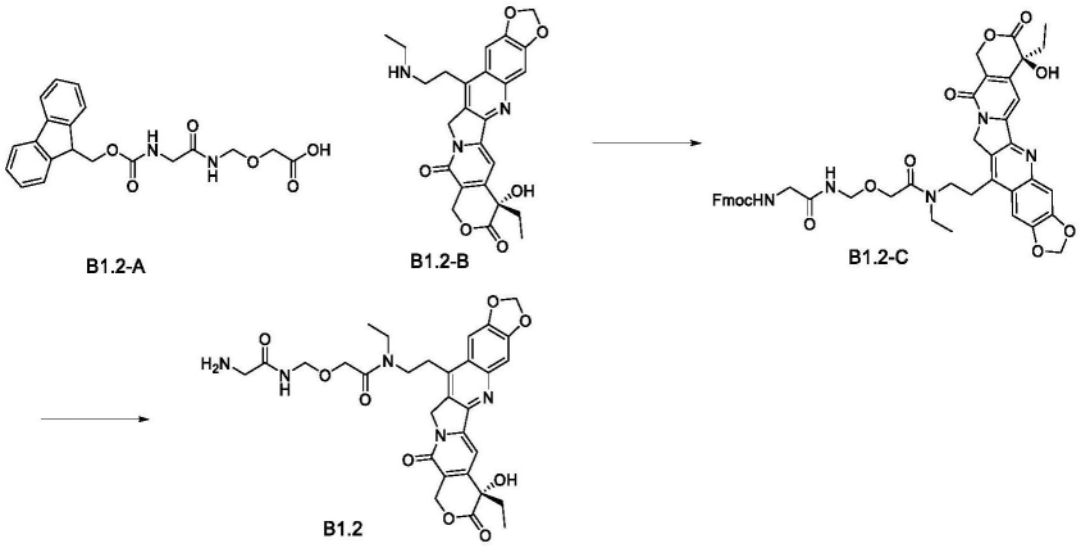
[1923] 实施例B1.1:(S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙酰胺(B1.1)的合成

[1924] 

[1925] 化合物(B1.1-A)(368mg),化合物(B1.1-B)(452mg)和对甲苯磺酸吡啶盐(PPTS)(25mg)在二氯甲烷(20ml)中回流20小时,然后用碳酸氢钠水溶液和盐酸水溶液分别洗涤,减压除去有机溶剂,残留物溶于DMF(5ml),加入哌啶(1ml),化合物搅拌20分钟,溶于减压除去大部分低沸点组分,残留物制备HPLC分离得到目标产物(S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙酰胺(B1.1)。

[1926] ESI-MS(m/z):539[M+H]$^+$。

[1927] 实施例B1.2:(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺(B1.2)的合成

[1928] 

[1929] 步骤一:

[1930] 依次将化合物B1.2-A(274mg),二异丙基乙胺(334mg)和HBTU(369mg)加入N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中,随后加入化合物B1.2-B(300mg)。反应液在室温下搅拌2小时。向反应液中加入乙酸乙酯(50mL),用饱和食盐水(30mL X 3)洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,滤液减压浓缩成固体,粗产品经柱层析分离纯化(二氯甲烷:甲醇=10/1)得到目标化合物B1.2-C(300mg)。

[1931] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:830.2;

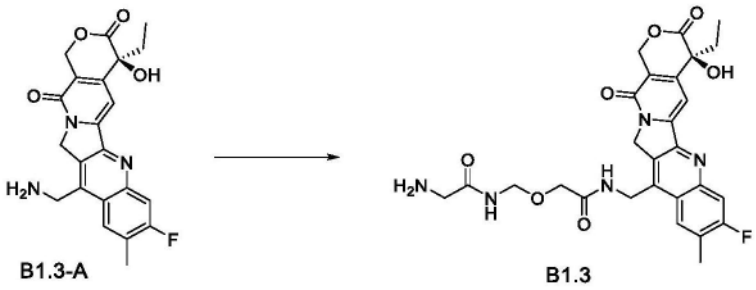
[1932] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.74(s,1H),7.91-7.84(m,2H),7.80-7.67(m,2H),7.65-7.54(m,2H),7.53-7.46(m,1H),7.45-7.37(m,2H),7.36-7.27(m,2H),7.25-7.23(m,1H),6.57-6.44(m,1H),6.29(s,2H),5.50-5.19(m,4H),4.71-4.57(m,2H),4.32-3.97(m,7H),3.80-3.53(m,4H),3.20-3.14(m,2H),1.92-1.80(m,2H),1.28-1.22(m,3H),0.87-0.82(m,3H).

[1933] 步骤二:

[1934] 向化合物B1.2-C(300mg)的N,N-二甲基甲酰胺(4mL)溶液加入哌啶(1mL),反应液在室温下搅拌20分钟。反应液除去低沸点组分后得到目标产物,直接用于下步合成。

[1935] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=608.0。

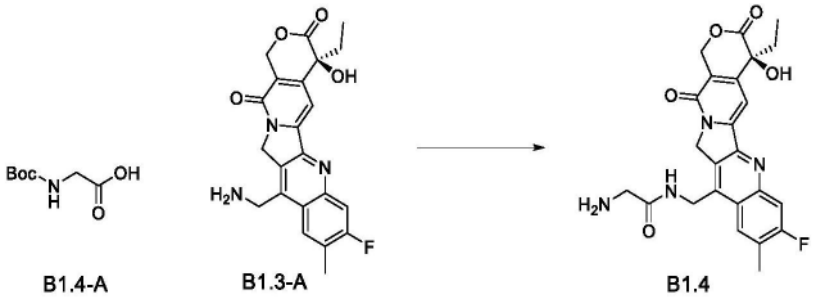
[1936] 实施例B1.3:(S)-2-氨基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺(B1.3)的合成

[1937] 

[1938] 用实施例B1.1相同的方法和反应条件,用化合物(B1.3-A)代替(B1.2-B),得到目标产物(S)-2-氨基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺(B1.3)。

[1939] ESI-MS(m/z):554[M+H]$^+$。

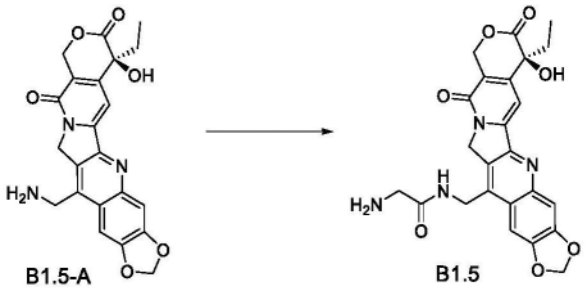
[1940] 实施例B1.4:(S)-2-氨基-N-((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙酰胺(B1.4)的合成

[1941] 

[1942] 向化合物(B1.4-A)(175mg),化合物(B1.3-A)(409mg)的DMF(5ml)溶液中加入DIPEA(200ul),HBTU(420mg)。化合物室温小搅拌反应20小时,混合物加入乙酸乙酯(100ml),水洗(100ml x 3),减压除去有机溶剂,然后向残留物中加入1:1DCM/TFA(10ml),室温放置20分钟。减压除去低沸点组分,残留物用制备HPLC分离得到目标产物(S)-2-氨基-N-((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙酰胺(B1.4)。

[1943] ESI-MS(m/z):467[M+H]$^+$。

[1944] 实施例B1.5:(S)-2-氨基-N-((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙酰胺(B1.4)的合成

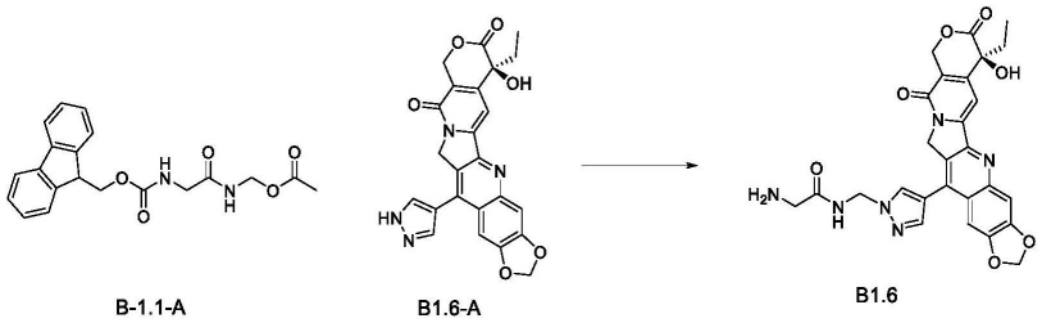
[1945] 

[1946] 将B1.5-A(200mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中,依次加入N,N-二异丙基乙胺(154.80mg),2,5-二氧吡咯烷-1-基(叔丁氧羰基)甘氨酸(157mg)于反应液中,反应液在25

℃下搅拌60分钟。向反应液中加入水(30mL),抽滤,干燥滤饼得到白色固体产物(ESI-MS(m/z):579.4[M+H]$^+$)。将上述白色固体产物溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为1:3;4mL)中,反应液室温下搅拌1小时。然后将反应液浓缩得粗产品,粗产品用C18柱反相分离纯化(乙腈/0.05%甲酸水溶液:5%到50%)得到目标产物(S)-2-氨基-N-((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙酰胺(B1.5,110mg)。

[1947] ESI-MS(m/z):479.3[M+H]$^+$。

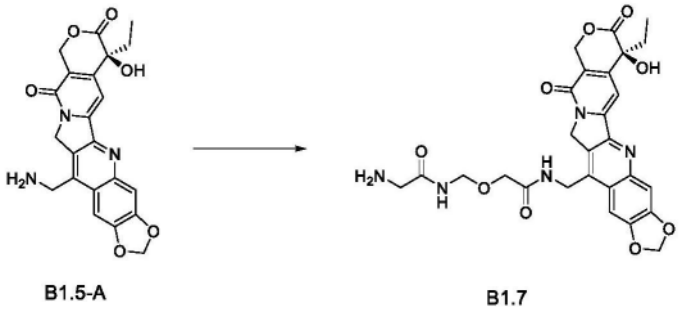
[1948] 实施例B1.6:(S)-2-氨基-N-((4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)乙酰胺(B1.6)的合成

[1949] 

[1950] 用实施例B1.1相同的方法和反应条件,用化合物(B1.6-A)代替化合物(B1.1-B),得到目标产物(S)-2-氨基-N-((4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)乙酰胺(B1.6)。

[1951] ESI-MS(m/z):545[M+H]$^+$。

[1952] 实施例B1.7:(S)-2-氨基-N-((2-(((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺(B1.7)的合成

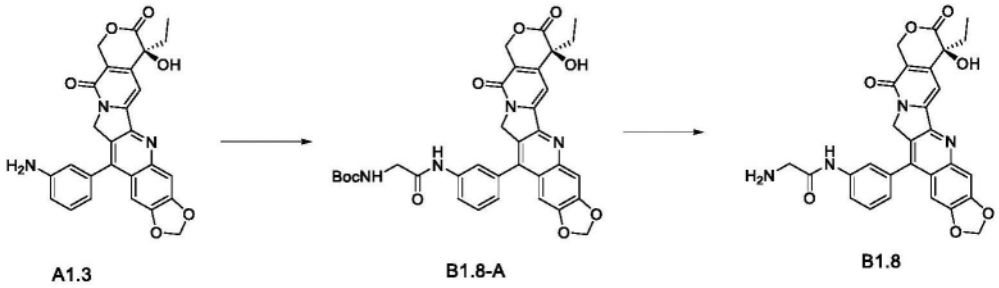
[1953] 

[1954] 用实施例B1.2相同的方法和反应条件,用化合物(B1.5-A)代替化合物(B1.2-B),得到含目标产物(S)-2-氨基-N-((2-(((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺(B1.7)的混合物,上述混合物直接用于下面合成反应。

[1955] ESI-MS(m/z):566[M+H]$^+$。

[1956] 实施例B1.8:(S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-

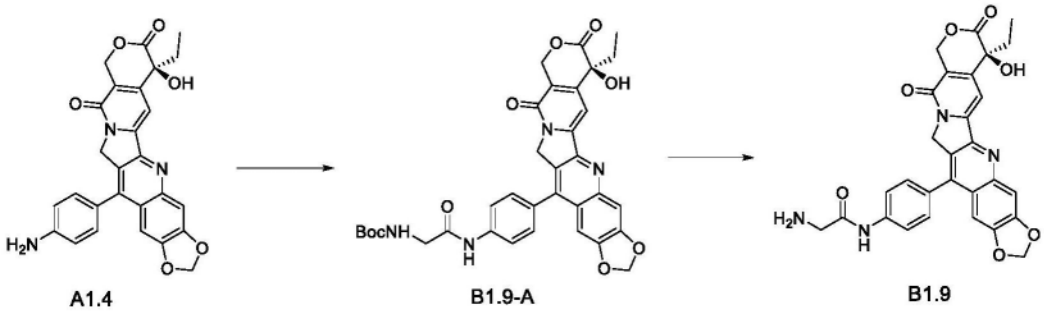
10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺(B1.8)的合成

[1957] 

[1958] 用实施例B1.4相同的方法和反应条件,用化合物(A1.3)代替化合物(B1.3-A),得到目标产物(S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺(B1.8)。

[1959] ESI-MS(m/z):541[M+H]$^+$。

[1960] 实施例B1.9:(S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺(B1.9)的合成

[1961] 

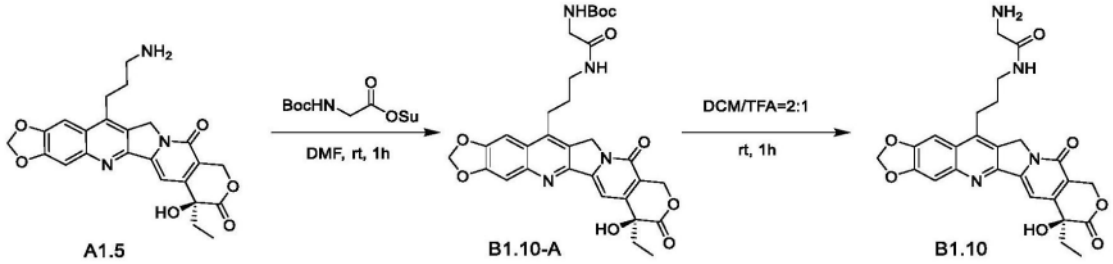
[1962] 用实施例B1.4相同的方法和反应条件,用化合物(A1.4)代替化合物(B1.3-A),得到目标产物(S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺(B1.9)。或者采用下列反应条件得到目标产物。

[1963] 将化合物A1.4(60mg,0.12mmol)溶在N,N-二甲基甲酰胺(3mL),依次加入(叔丁氧羰基)甘氨酸(26mg,0.15mmol)、HATU(56mg,0.15mmol),N,N-二异丙基乙胺(48mg,0.37mmol),室温下搅拌1小时,TLC检测反应完成。然后直接向上述反应液中加入TFA(1.0mL)。在室温下继续搅拌1小时,LCMS检测反应完成,将反应液浓缩除去三氟乙酸得粗产物,粗产物经制备色谱(0.01%三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标产物(S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺(B1.9)(26.3mg,收率38%)为黄色固体。

[1964] ESI-MS(m/z):541[M+H]$^+$;

[1965] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ10.71(s,1H),8.16(s,2H),7.86(d,J=8.6Hz,2H),7.67-7.58(m,3H),7.29(s,1H),7.04(s,1H),6.50(s,1H),6.28(s,2H),5.40(s,2H),5.05(s,2H),3.87(s,2H),1.93-1.81(m,2H),0.88(t,J=7.3Hz,3H)。

[1966] 实施例B1.10:(S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙酰胺(B1.10)的合成

[1967] 

[1968] 步骤一:

[1969] 室温下,向化合物A1.5(200mg)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(5mL)中加入三乙胺(67mg)和2,5-二氧吡咯烷-1-基(叔丁氧羰基)甘氨酸(182mg),在室温下反应1小时。反应液加入水(30mL)稀释,乙酸乙酯(30mL×2)萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到粗产品,粗产品用C18柱(乙腈/0.05%甲酸的水溶液:5%-60%)进一步纯化得到目标化合物(B1.10-A,100mg)。

[1970] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:607。

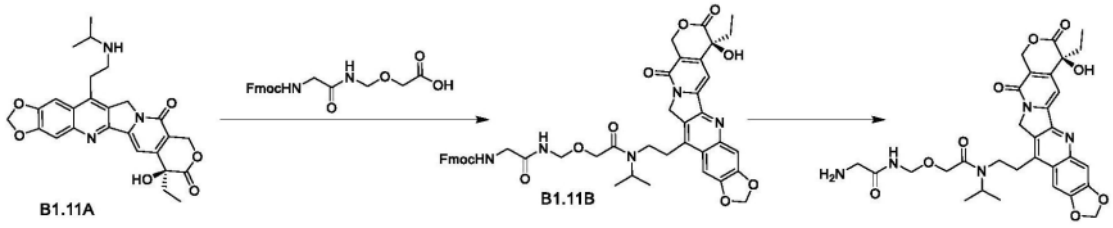
[1971] 步骤二:

[1972] 向化合物B1.10-A(100mg)的二氯甲烷溶液(4mL)中,加入三氟乙酸(2mL),在室温下搅拌反应1小时。将反应液浓缩,粗品加入N,N-二甲基甲酰胺溶液(3mL),用C18柱(乙腈/0.05%甲酸的水溶液:5%-60%)进一步纯化得到目标化合物(S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙酰胺(B1.10,80mg)。

[1973] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:507;

[1974] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.26(s,1H),7.64(s,1H),7.51(s,1H),7.24(s,1H),6.51(s,1H),6.29(s,2H),5.42(s,2H),5.23(s,2H),3.31(s,2H),3.30-3.27(m,2H),3.13-3.07(m,2H),2.04-1.76(m,4H),0.87(t,J=7.3Hz,3H)。

[1975] 实施例B1.11:(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺(B1.11)的合成

[1976] 

[1977] 步骤一:

[1978] 将化合物1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧-2,9-二氧-4,7-二氮杂环-11-甲酸(242mg),二异丙基乙胺(330mg)和N,N,N`,N`-四甲基脲六氟磷酸酯(359mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(10mL)溶液中。随后加入化合物(S)-7-乙基-7-羟基-14-(2-(异丙胺基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮

(300mg),反应在室温下反应2小时。向反应液中加入乙酸乙酯(50mL),用饱和食盐水(30mL X 3)洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,滤液减压浓缩成固体,粗产品经柱层析分离纯化(二氯甲烷:甲醇=10/1)得到目标化合物化合物B1.11B(220mg)。

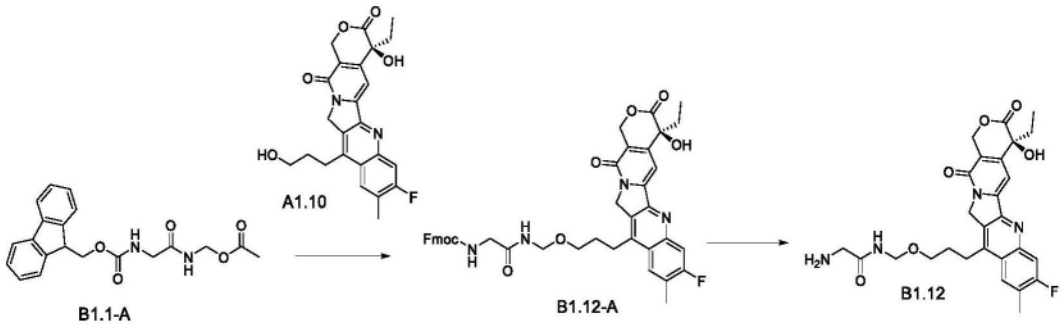
[1979] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:844.0。

[1980] 步骤二:(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺的制备

[1981] 向化合物B1.11B(220mg,0.261mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(4mL)溶液中加入哌啶(1mL),反应在室温下搅拌20分钟。LCMS检测反应反应完全。反应液减压浓缩得到目标化合物(220mg)为褐色固体,上述产物未经纯化直接用于下步合成。

[1982] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:622.1。

[1983] 实施例B1.12:(S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙酰胺(B1.12)的合成

[1984] 

[1985] 步骤一:

[1986] 将化合物A1.10(160mg,0.365mmol)溶在N,N-二甲基甲酰胺(3mL)中,加入(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯((B1.1-A,672mg,1.83mmol),然后加入盐酸乙酸乙酯(0.073mL,3M)于反应液中,反应液在室温下搅拌过夜。LCMS检测反应完成。该反应液直接经反相色谱(乙腈/0.05%FA的水溶液:5%到50%)纯化后得目标化合物(80mg,收率29.0%)为白色固体。

[1987] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=747.4;

[1988] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.74(t,J=6.4Hz,1H),8.28-8.17(m,1H),7.99-7.88(m,3H),7.73(d,J=7.3Hz,2H),7.63(t,J=5.7Hz,1H),7.44(t,J=7.4Hz,2H),7.35(t,J=7.2Hz,3H),6.58(s,1H),5.48(s,2H),5.29(s,2H),4.66(d,J=6.3Hz,2H),4.32(d,J=6.9Hz,2H),4.26(d,J=6.1Hz,1H),3.71(d,J=5.8Hz,2H),3.57(t,J=5.7Hz,2H),3.29-3.20(m,2H),2.55(s,3H),2.00-1.86(m,4H),0.93(t,J=7.2Hz,3H).

[1989] 步骤二:B1.12-A(240mg)溶于DMF(5ml),加入哌啶(1ml),化合物搅拌20分钟,溶于减压除去低沸点组分,残留物直接用于下步合成。

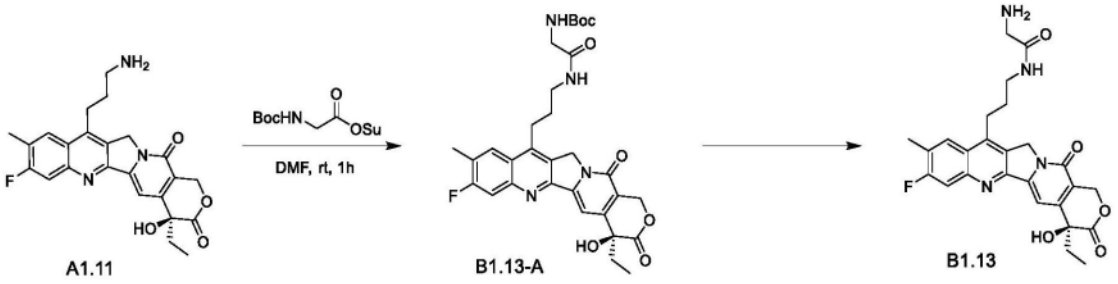
[1990] ESI-MS(m/z):525.2[M+H]$^+$。

[1991] 少量粗产物经反相色谱(乙腈/0.05%FA的水溶液:5%到50%)纯化后得目标化合物。

[1992] ESI-MS(m/z):525.1[M+H]$^+$;

[1993] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.13(t,J=6.6Hz,1H),8.21(d,J=8.1Hz,1H),8.02(brs,2H),7.89(d,J=10.8Hz,1H),7.32(s,1H),6.54(s,1H),5.44(s,2H),5.28(s,2H),4.66(d,J=6.5Hz,2H),3.64(s,2H),3.53(t,J=6.1Hz,2H),3.25-3.18(m,2H),2.52(s,3H),1.98-1.84(m,4H),0.88(t,J=7.3Hz,3H)。

[1994] 实施例B1.13:(S)-2-氨基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙酰胺(B1.13)的合成

[1995] 

[1996] 步骤一:

[1997] 室温下,向化合物A1.11(200mg)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(5mL)中加入三乙胺(67mg)和2,5-二氧吡咯烷-1-基(叔丁氧羰基)甘氨酸(182mg),在室温下反应1小时。反应液加入水(30mL)稀释,乙酸乙酯(30mL×2)萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到粗产品,粗产品用C18柱(乙腈/0.05%甲酸的水溶液:5%-60%)进一步纯化得到目标化合物(B1.13-A,104mg)。

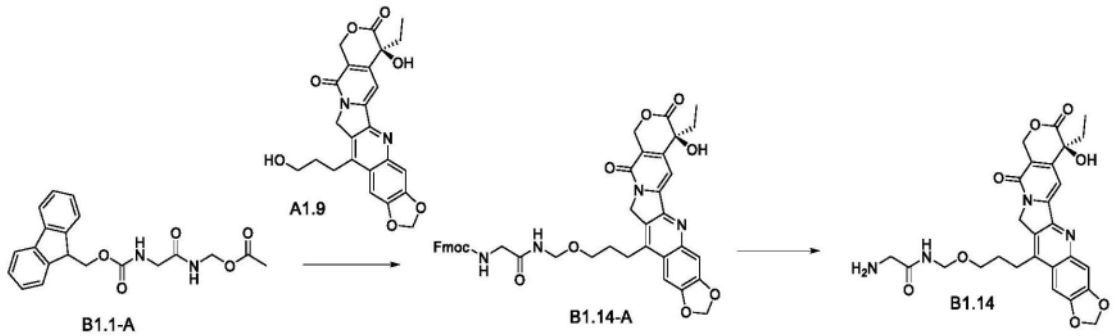
[1998] LCMS(ESI)[M+H]$^{+}$:595。

[1999] 步骤二:

[2000] 向化合物B1.13-A(100mg)的二氯甲烷溶液(4mL)中,加入三氟乙酸(2mL),在室温下搅拌反应1小时。将反应液浓缩,粗品加入N,N-二甲基甲酰胺溶液(3mL),用C18柱(乙腈/0.05%甲酸的水溶液:5%-60%)进一步纯化得到目标化合物(S)-2-氨基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙酰胺(B1.13,88mg)。

[2001] LCMS(ESI)[M+H]$^{+}$:495。

[2002] 实施例B1.14:(S)-2-氨基-N-((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙氧基)甲基)乙酰胺(B1.14)的合成

[2003] 

[2004] 步骤一:化合物(B1.1-A)(368mg),化合物(A1.9)(440mg)和对甲苯磺酸吡啶盐

(PPTS)(25mg)在二氯甲烷(20ml)中回流20小时,然后用碳酸氢钠水溶液和盐酸水溶液分别洗涤,减压除去有机溶剂,得到粗产物,粗产品经柱层析分离纯化(二氯甲烷:甲醇=10/1)得到目标化合物化合物B1.14A(240mg)。

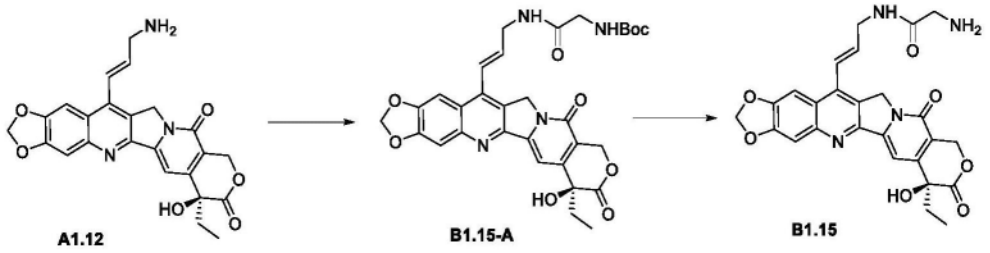
[2005] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:747。

[2006] 步骤二:B1.14-A(240mg)溶于DMF(5ml),加入哌啶(1ml),化合物搅拌20分钟,溶于减压除去低沸点组分,残留物直接用于下步合成。少量粗产物经反相色谱(乙腈/0.05%FA的水溶液:5%到50%)纯化后得目标化合物。

[2007] ESI-MS(m/z):525[M+H]$^+$;

[2008] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.13(t,1H),8.04(br,2H),7.58(s,1H),7.51(s,1H),7.25(s,1H),6.29(s,2H),5.43(S,2H),5.21(s,2H),4.65(d,2H),3.63(m,2H),3.53(m,2H),3.11(m,2H),1.87(m,4H),0.88(t,3H)。

[2009] 实施例B1.15:(S,E)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)乙酰胺

[2010] 

[2011] 步骤一:

[2012] 室温下,向化合物A1.12(200mg,0.447mmol)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(5mL)中加入三乙胺(135mg,1.341mmol)和N-羟基-2,5-二氧吡咯烷叔丁氧羰基甘氨酸酯(183mg,0.671mmol),在室温下反应1小时。LCMS显示反应完全。向反应液中加入水(20mL),用乙酸乙酯(20mL×3)萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到目标化合物B1.15A(130mg,收率:48%)为棕色固体。

[2013] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=605.6。

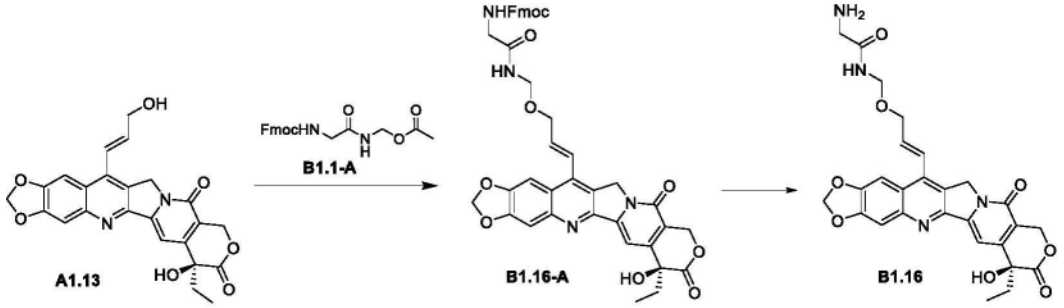
[2014] 步骤二:

[2015] 室温下,将化合物B1.15-A(130mg,0.215mmol)用盐酸1,4-二氧六环溶液(5mL)溶解,在室温下反应30分钟。LCMS显示反应完全。反应液通过反向纯化得到目标化合物(60mg,收率:52%)为棕色固体。

[2016] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=505.2;

[2017] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.85(s,1H),8.15(s,2H),7.70(s,1H),7.54(s,1H),7.26(s,1H),7.21(d,J=16.2Hz,1H),6.51(d,J=16.2Hz,1H),6.31(s,2H),5.42(s,2H),5.28(s,2H),4.19(s,2H),1.86-1.82(m,4H),0.87(t,J=7.3Hz,3H).

[2018] 实施例B1.16:(S,E)-2-氨基-N-(((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺

[2019] 

[2020] 步骤一:

[2021] 在氮气保护下,将原料A1.13(150mg,0.335mmol)溶在甲苯(3mL)中,加入(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯(B1.1-A,308mg,0.84mmol),然后将醋酸锌(123mg,0.67mmol)加入到反应液中,反应液在100℃下搅拌过夜。LCMS检测反应完成。该反应液直接经反相色谱(乙腈/0.05%甲酸的水溶液:5%到50%)纯化后得目标化合物(9H-芴-9-基)甲基(S,E)-(2-(((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃[3',4':6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯(B1.16-A,80mg,收率31%)为白色固体。

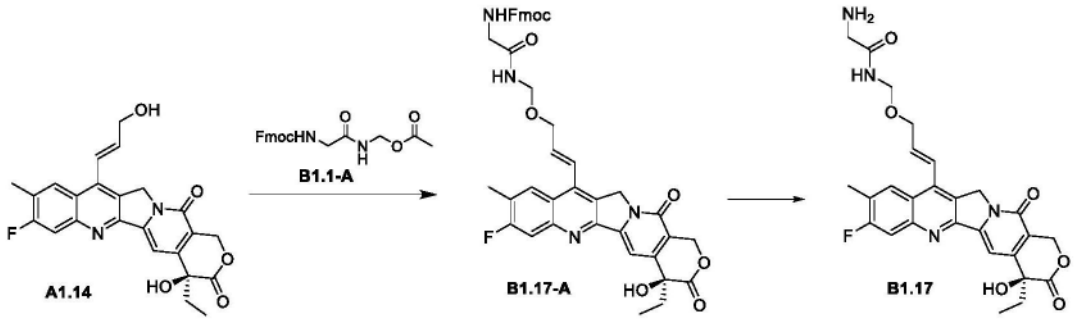
[2022] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=757.4。

[2023] 步骤二:

[2024] 将化合物B1.16-A(80mg,0.11mmol)溶在N,N-二甲基甲酰胺(2mL)中,然后向反应液中加入哌啶(0.05mL),在室温下搅拌1小时。LCMS显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品,粗产品用C18柱反相分离纯化(乙腈/0.05%氨水的水溶液:5%到50%)得到目标化合物(35mg,收率62%)为棕色固体。

[2025] LCMS(ESI)[M+H]+=535.2,tR=1.070min.

[2026] 实施例B1.17:(S,E)-2-氨基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺

[2027] 

[2028] 步骤一:

[2029] 将化合物A1.14(80mg,0.183mmol)和化合物(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯(B1.1-A,135mg,0.367mmol)溶于甲苯(4mL),加入醋酸锌(190mg,1.03mmol),反应液在100摄氏度下搅拌48小时。冷却至室温,向其中加入水(10mL),用乙酸乙酯(10mL×3)萃取。合并有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到粗产物,粗产物经反相色谱(0.05% FA的水溶液/乙腈:5%到100%)纯化后得到目标化合物(S,E)-2-(Fmoc氨基)-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',

4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺(B1.17-A,30mg)为白色固体。

[2030] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=745.2;

[2031] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ8.82(m 1H),8.21(m,1H),7.89(m,2H),7.84(d,J=7.8Hz,2H),7.68(m,1H),7.61(m,1H),7.42(m,1H),7.37(m,1H),7.33-7.28(m,4H),6.72-6.55(m,1H),6.53(s,1H),5.42(s,2H),5.28(s,2H),4.75(m,2H),4.34(m,2H),4.28-4.24(m,2H),4.20(m,1H),3.70(d,J=6.1Hz,2H),2.47(s,3H),1.90-1.82(m,2H),0.88(t,J=7.3Hz,3H)。

[2032] 步骤二:

[2033] 将化合物B1.17-A(25mg,0.034mmol),溶于N,N-二甲基甲酰胺(2mL)中,然后加入二乙胺(0.2mL),加毕,反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液直接减压蒸干溶剂得到粗产品目标化合物(S,E)-2-氨基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺为黄色粘稠状产品。

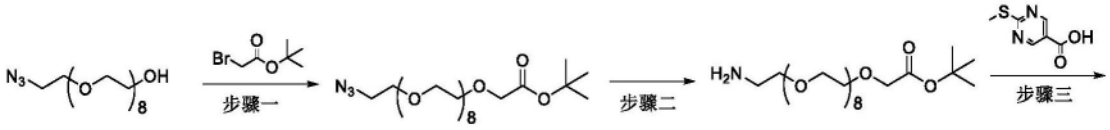
[2034] LCMS(ESI)[M+H]+=523.2;

[2035] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=523.1,t_R=0.446min,1.311min.

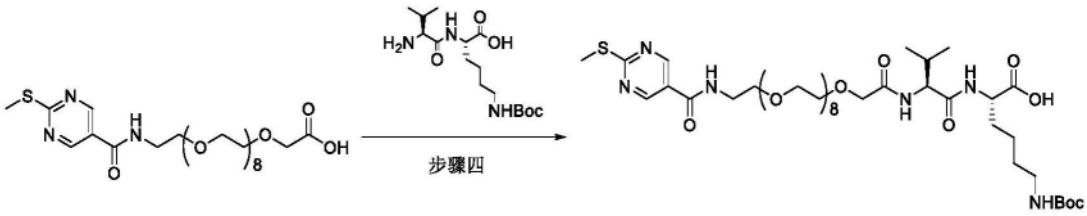
[2036] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.26(t,J=6.5Hz,1H),8.23(d,J=8.2Hz,1H),8.06(s,2H),7.91(m,1H),7.40(d,J=16.3Hz,1H),7.34(s,1H),6.70-6.60(m,1H),6.54(s,1H),5.44(s,2H),5.35(s,2H),4.80(d,J=6.6Hz,2H),4.38(d,J=3.9Hz,2H),3.68(d,2H),2.52(s,3H),1.90-1.84(m,2H),0.88(m,3H)。

[2037] C、含偶联连接段分子片段中间体的合成

[2038] 实施例C1.1:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.1)



[2039]



[2040] 步骤一:29-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

[2041] 向26-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-26-烷-1-醇(4.39g)的DMF(40ml)溶液中加入NaH(0.6g,60%)。上述混合物搅拌30分钟后,加入溴乙酸叔丁酯(2.4g)。混合物在干燥条件下搅拌20小时。然后向混合物中加入乙酸乙酯(200ml)和水(200ml,开始时慢慢加入),有机相水洗(100ml x 3),无水硫酸钠干燥,减压除去溶剂,残留物经过硅胶柱色谱分离得到目标产物,29-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯。

[2042] ESI-MS(m/z):554[M+H]$^+$。

[2043] 步骤二:29-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

[2044] 向29-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯(1.16g)的乙酸乙酯(20ml)溶液中加入钯碳催化剂(Pd/C,10%,100mg)。上述溶液在氢气气氛下搅拌5小时,然后滤去钯碳后,减压除去溶剂得到目标产物。

[2045] ESI-MS(m/z):528$[M+H]^+$。

[2046] 步骤三:1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸

[2047] 29-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯(527mg)和2-甲硫基-嘧啶-5-羧酸(170mg)加入干燥DMF(10ml),然后在冰浴冷却下向上述溶液中依次加入DIPEA(0.2ml),HBTU(420mg)。上述混合物室温小搅拌20小时。然后用乙酸乙酯(100ml)稀释,水洗(100ml x 4),有机相无水硫酸钠干燥后,减压除去有机溶剂,残留物溶于DCM(10ml),然后加入TFA(10ml),混合物室温下搅拌1小时,然后减压除去低沸点组分,残留物经过制备HPLC分离得到1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸。

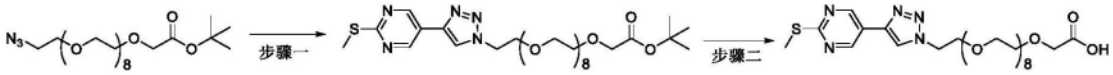
[2048] ESI-MS(m/z):624$[M+H]^+$。

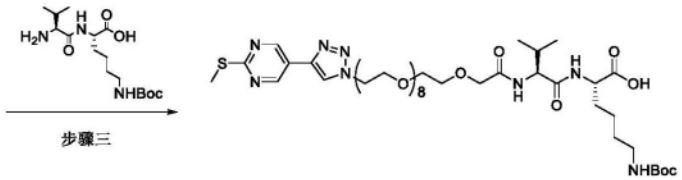
[2049] 步骤四:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

[2050] 1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸(623mg)溶于DMF(10ml),0℃下加入DIPEA(300ul),HBTU(420mg)。混合物搅拌30分钟,然后加入缬氨酸-(Boc)赖氨酸二肽化合物(345mg)。反应搅拌20小时,然后加入乙酸乙酯(100ml),稀盐酸(20ml x 3)洗,有机相干燥后减压除去有机溶剂,粗产物通过制备HPLC分离得到目标化合物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.1)。

[2051] ESI-MS(m/z):951$[M+H]^+$。

[2052] 实施例C1.2:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.2)



[2053] 

[2054] 步骤一:29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

[2055] 29-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯(1.7g),2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶(450mg)溶于DMSO-水(20ml,4:1)中,向混合物中加入溴化亚铜(50mg)。反应液室温下搅拌2小时,然后加入乙酸乙酯(100ml),水洗(100ml x 3),干燥后减压除去有

机溶剂,粗产物用硅胶柱层析分离得到目标产物29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯。

[2056] MS(m/z):704[M+H]$^+$。

[2057] 步骤二:29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯(1g)溶于二氯甲烷(10ml),然后加入TFA(5ml)。混合物室温静置1小时,然后减压除去低沸点组分得到目标产物29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸。

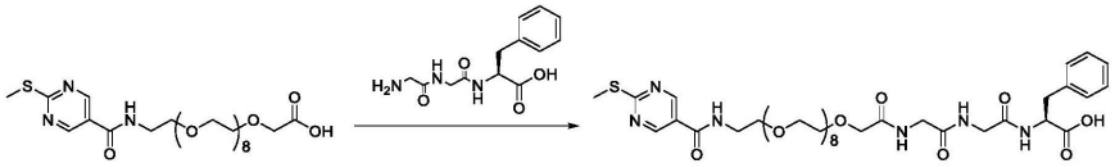
[2058] MS(m/z):648[M+H]$^+$。

[2059] 步骤三:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

[2060] 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸(647mg)溶于DMF(10ml),0℃下加入DIPEA(300ul),HBTU(420mg)。混合物搅拌30分钟,然后加入缬氨酸-赖氨酸二肽化合物(345mg)。反应搅拌20小时,然后加入乙酸乙酯(100ml),稀盐酸(20ml x 3)洗,有机相干燥后减压除去有机溶剂,粗产物通过制备HPLC分离得到目标化合物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.2)。

[2061] ESI-MS(m/z):975[M+H]$^+$。

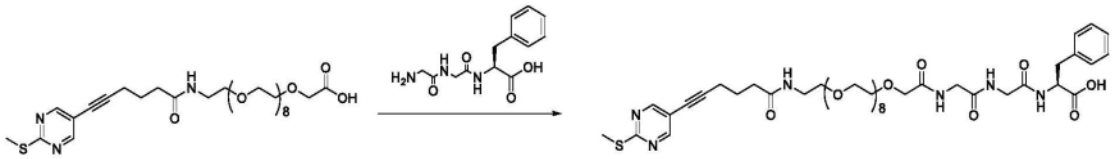
[2062] 实施例C1.3:(1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-甘胺酸-甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物C1.3)

[2063] 

[2064] 用实施例C1.1步骤四相同的方法和反应条件,用相应的原料,得到目标产物(1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-甘胺酸-甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物C1.3)。

[2065] ESI-MS(m/z):885[M+H]$^+$。

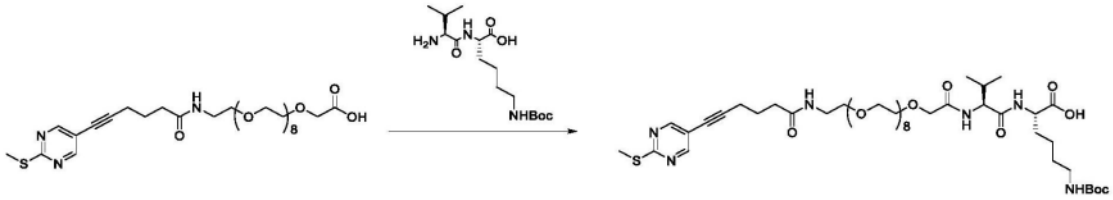
[2066] 实施例C1.4:(36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸苯丙氨酸(化合物C1.4)

[2067] 

[2068] 用实施例C1.1步骤四相同的方法和反应条件,用反应式所示的原料,得到目标产物(36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸苯丙氨酸(化合物C1.4)。

[2069] ESI-MS(m/z):951[M+H]$^+$。

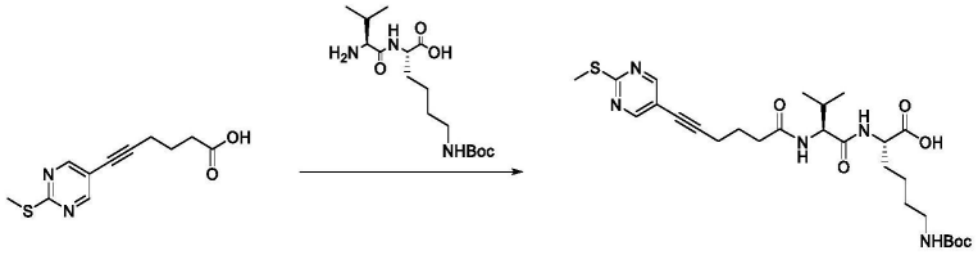
[2070] 实施例C1.5:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C1.5)

[2071] 

[2072] 用实施例C1.1步骤四相同的方法和反应条件,用反应式所示的化合物作为原料,得到目标产物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.5)。

[2073] ESI-MS(m/z):1017$[M+H]^+$。

[2074] 实施例C1.6:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.6)

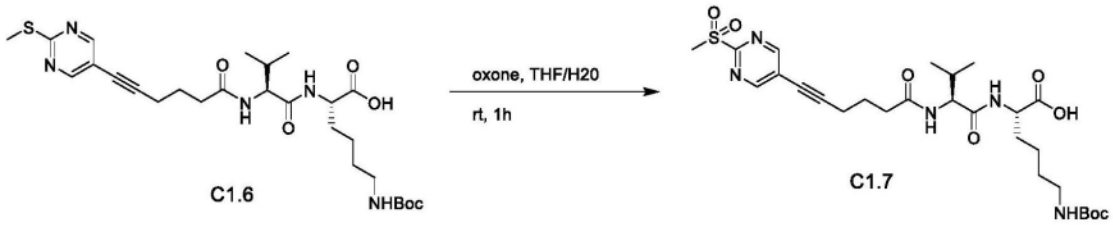
[2075] 

[2076] 将6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(920mg)和N-羟基丁二酰亚胺(537mg)溶于二氯甲烷(50mL)中,然后加入二环已基碳二亚胺(963mg)。反应液室温搅拌1小时,然后减压除去二氯甲烷,残留物溶于N,N-二甲基甲酰胺(50mL),然后加入N^2-L-缬氨酸-N^6-(Boc)-L-赖氨酸(1.5g),反应液室温下搅拌反应16小时,将反应液倒入200mL水中,用饱和碳酸氢钠溶液调节pH至11,上述水溶液用乙酸乙酯萃取两次,弃掉有机相,将水相用柠檬酸调节pH到4-5,用乙酸乙酯(100mL x 3)萃取三次,有机相用饱和食盐水(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,旋蒸,得到粗产品2.8g,粗产品用快速色谱法分离纯化(DCM:MeOH=30:1)得到目标化合物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(1.0g)(化合物C1.6)。

[2077] ESI-MS(m/z):564.3$[M+H]^+$。

[2078] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ12.45(s,1H),8.68(s,2H),8.12(d,J=7.3Hz,1H),7.88(d,J=8.9Hz,1H),6.76(s,1H),4.27-4.19(m,1H),4.11(d,J=4.9Hz,1H),2.88(d,J=7.9Hz,3H),2.73(s,1H),2.59(s,1H),2.52(s,4H),2.40-2.24(m,3H),2.03-1.88(m,2H),1.77(d,J=3.2Hz,2H),1.68(d,J=7.0Hz,1H),1.60-1.49(m,1H),1.36(s,15H),0.85(dd,J=14.8,6.7Hz,7H)。

[2079] 实施例C1.7:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.7)

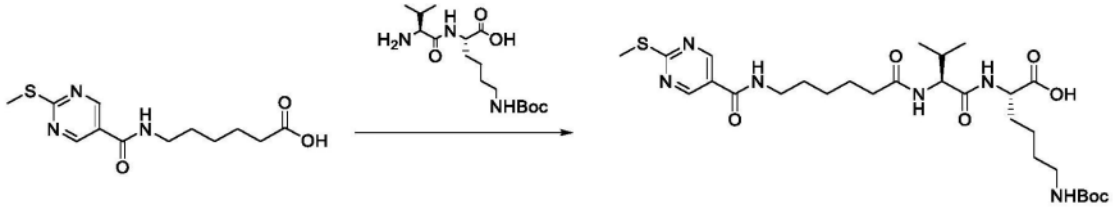
[2080] 

[2081] 向化合物C1.6(260mg)的四氢呋喃(3mL)和水(3mL)混合溶液中加入过氧单磺酸钾(1.414g),在室温下搅拌反应1小时。将反应液过滤,滤液用C18柱(乙腈/0.05%甲酸的水溶液:5%-60%)纯化得到目标化合物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.7)(120mg)。

[2082] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:596;

[2083] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ12.48(s,1H),9.13(s,2H),8.14(d,J=7.0Hz,1H),7.90(d,J=9.1Hz,1H),6.77(s,1H),4.24(t,J=7.7Hz,1H),4.12(br s,1H),3.41(s,3H),2.89(d,J=6.0Hz,2H),2.43-2.29(m,2H),2.03-1.93(m,2H),1.82(br s,2H),1.63-1.60(m,4H),1.37(s,12H),0.88-0.83(m,6H)。

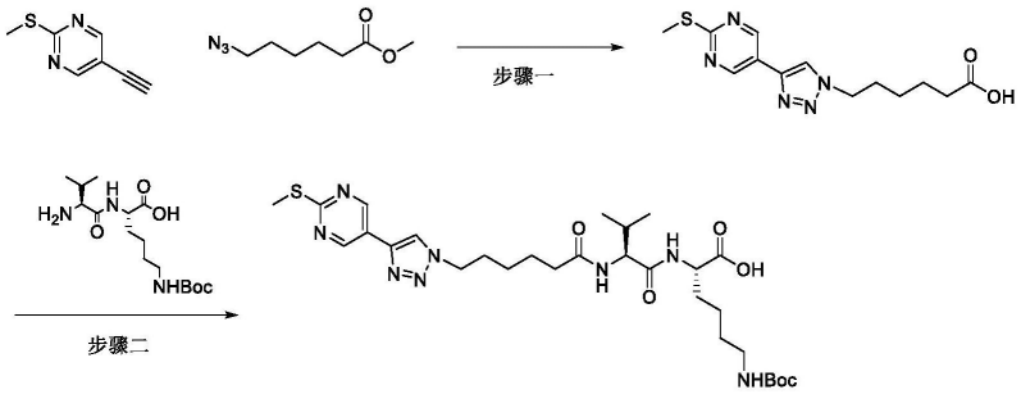
[2084] 实施例C1.8:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲酰胺基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.8)

[2085] 

[2086] 用实施例C1.6相同的方法和反应条件,用反应式所示的已知化合物作为原料,得到目标产物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲酰胺基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.8)。

[2087] ESI-MS(m/z):611$[M+H]^+$。

[2088] 实施例C1.9:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.9)

[2089] 

[2090] 步骤一:6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸

[2091] 室温下,将2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶(1.5g)、6-叠氮基己酸甲酯(1.71g)溶于叔丁醇与水的混合溶剂(20mL/25mL)中,加入维生素C钠(5.7g),溴化亚铜(2.9g)搅拌反应10h。反应加入乙酸乙酯(200ml),水洗(100ml x 5),干燥后除去有机溶剂,硅胶柱层析得到6-

(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸甲酯(2.8g),ESI-MS(m/z):321.9[M+H]$^+$。上述产物溶于四氢呋喃(100ml),加入氢氧化锂(1M,20ml),混合物搅拌3小时,然后加入盐酸至反应液pH 2,然后加入乙酸乙酯(200ml),水洗(100ml x 3),干燥,除去有机溶剂得到目标产物6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸。ESI-MS(m/z):308.4[M+H]$^+$。

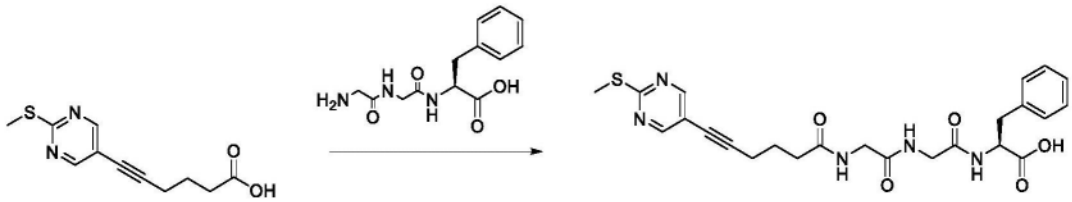
[2092] 步骤二:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

[2093] 将化合物6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸(370mg,)和N-羟基丁二酰亚胺(152mg)溶在二氯甲烷(5mL)中搅拌,再加入二环乙基碳二亚胺(273mg),然后反应液在室温下搅拌1小时。向反应液中加入10mL水,用乙酸乙酯萃取(20mL x 2),有机相用饱和食盐水洗,用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩得到粗品。将此粗品溶解在N,N-二甲基甲酰胺(10mL)搅拌,加入化合物N^2-L-缬氨酸-N^6-(Boc)-L-赖氨酸,反应液在室温下反应16小时,向反应液中缓慢加入柠檬酸将PH调至5左右,加入水,再用乙酸乙酯萃取(3x 10mL),有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩除去乙酸乙酯得到目标产物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物C1.9,400mg)。

[2094] ESI-MS(m/z):635.3[M+H]$^+$;

[2095] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ12.46(s,1H),9.06(s,2H),9.06(s,1H),8.70(s,1H),8.07(d,J=7.4Hz,1H),7.77(d,J=9.0Hz,1H),6.76(t,J=5.6Hz,1H),4.41(t,J=7.0Hz,2H),4.19(dd,J=8.9,7.0Hz,1H),4.14-4.05(m,1H),2.92-2.85(m,2H),2.56(s,3H),2.24-2.10(m,2H),1.97-1.81(m,3H),1.71-1.64(m,1H),1.61-1.50(m,3H),1.36(s,9H),1.28-1.22(m,6H),0.88-0.76(m,6H)。

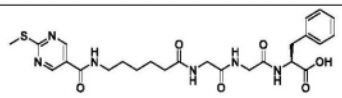
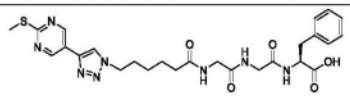
[2096] 实施例C1.10:(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-(5-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物C1.10)

[2097] 

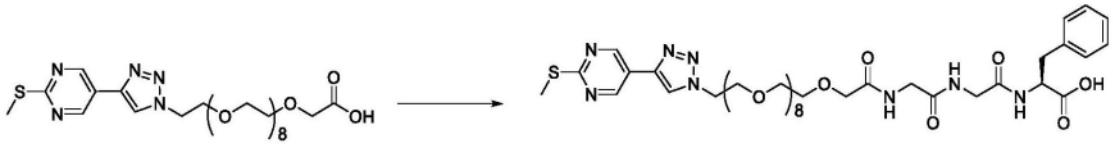
[2098] 用实施例C1.6相同的方法和反应条件,上述反应式所示的已知原料,得到目标产物(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物C1.10)。ESI-MS(m/z):498[M+H]$^+$。

[2099] 用实施例C1.6相同的方法和反应条件,利用不同的反应原料,得到下表中目标产物。

[2100]

化合物	化学结构	化学名称	ESI-MS (*m/z*): $[M+H]^+$
C1.11		(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲酰胺基)己酰基) 甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸	545
C1.12		(6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基) 甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸	569

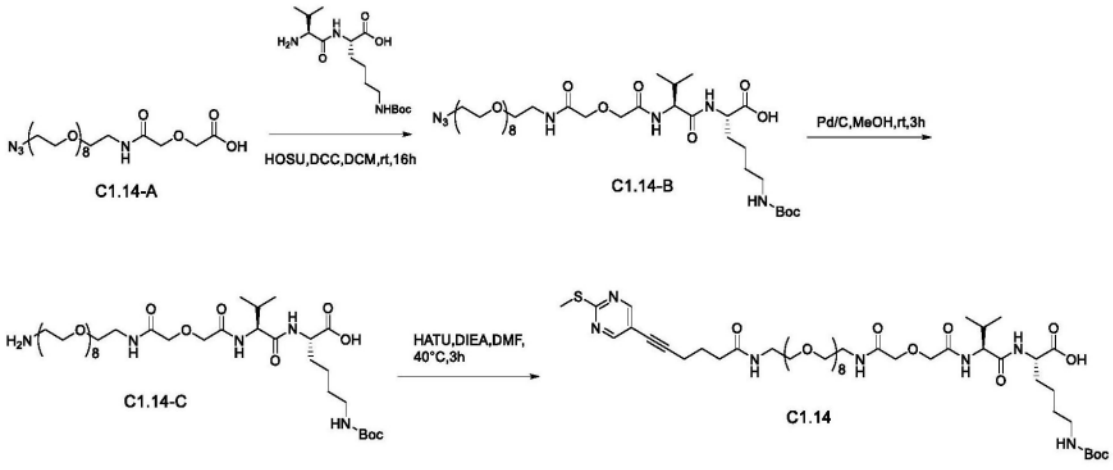
[2101] 实施例C1.13:(29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂29烷酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物C1.13)

[2102] 

[2103] 用实施例C1.1步骤四相同的方法和反应条件,利用已知原料,得到目标产物(29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂29烷酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸(化合物C1.13)。

[2104] ESI-MS(m/z):909$[M+H]^+$。

[2105] 实施例C1.14:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6,33-二氮杂三十九烷-38-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C1.14)

[2106] 

[2107] 步骤一:

[2108] 将化合物C1.14-A(336mg)溶于二氯甲烷(5mL)中,加入N-羟基丁二酰亚胺(98mg,0.85mmol),二环已基碳二亚胺(175mg,0.85mmol)室温搅拌反应1小时,然后将化合物N^2-L-缬氨酸-N^6-(Boc)-L-赖氨酸(230mg)加入反应液,室温搅拌反应过夜。浓缩除去溶剂得到粗产品,粗产品用C18柱反相分离纯化(乙腈/0.01%FA的水溶液:5%-50%)得到无色油状目标化合物(C1.14B,290mg)。

[2109] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=882.3。

[2110] 步骤二:

[2111] 将化合物C1.14-B(300mg)溶于无水甲醇(5mL)中,加入Pd/C(10%,60mg),氢气置换三次,室温搅拌反应过夜,抽滤,浓缩得到目标化合物C1.14-C(293mg)为无色油状物。

[2112] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:856.1。

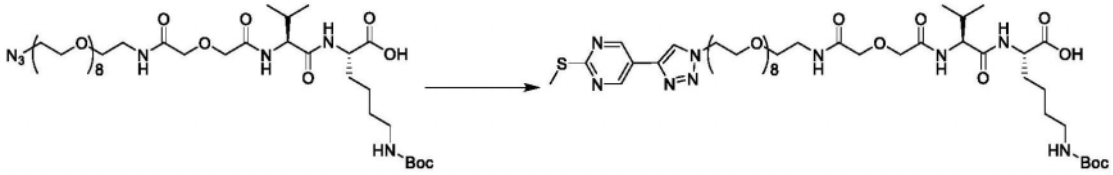
[2113] 步骤三:

[2114] 将6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(84mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(3mL)中,然后依次加入N,N-二异丙基乙胺(61mg),HATU(108mg)。反应液室温搅拌20分钟,然后加入化合物C1.14-C(196mg),40℃搅拌反应3小时,粗产品用C18柱反相分离纯化(乙腈/0.01%FA的水溶液:5%-65%)得到目标化合物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6,33-二氮杂三十九烷-38-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C1.14)(170mg)。

[2115] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1074.0;

[2116] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.68(s,2H),8.23(t,J=5.7Hz,1H),8.13(d,J=8.9Hz,1H),7.99(t,J=5.6Hz,1H),7.43(d,J=6.5Hz,1H),6.69(s,1H),4.09(dd,J=8.8,6.5Hz,1H),4.02(s,2H),3.98(d,J=2.9Hz,2H),3.74-3.70(m,1H),3.50(s,30H),3.45(d,J=6.2Hz,2H),3.39(d,J=5.8Hz,2H),3.26(d,J=6.1Hz,2H),3.20(q,J=5.9Hz,2H),2.81(t,J=6.6Hz,2H),2.52(s,3H),2.24(t,J=7.4Hz,2H),2.12-2.06(m,1H),1.79-1.74(m,2H),1.67-1.59(m,1H),1.50(d,J=5.3Hz,1H),1.36(s,9H),1.24(s,2H),1.20-1.09(m,2H),0.85(t,J=6.3Hz,6H)。

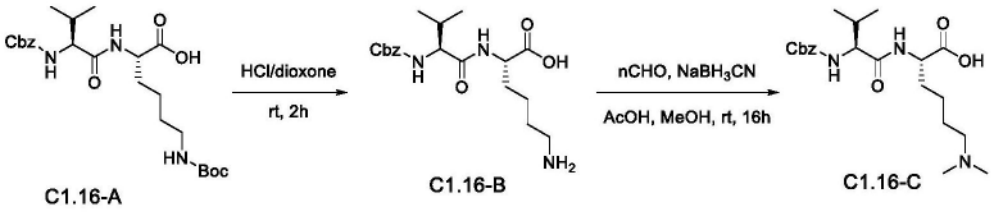
[2117] 实施例C1.15:N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十二烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C1.15)

[2118] 

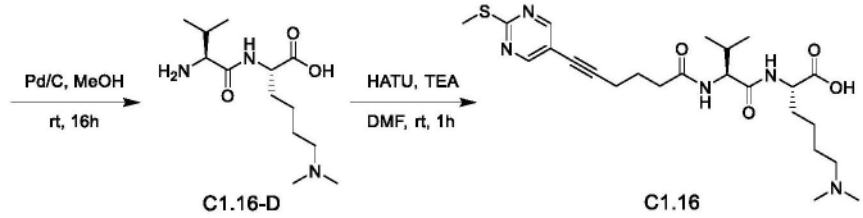
[2119] 将化合物C1.14-B(130mg),5-乙炔基-2-甲硫基嘧啶(44mg),维生素C钠(3mg)和硫酸铜(5mg)加入到叔丁醇(2mL)和水(2mL)的混合溶液中,反应在室温氮气下反应3小时。向反应液中加入水(10mL),用二氯甲烷(30mL×3)萃取,有机相经饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,浓缩得到粗品,粗产品TLC分离纯化(二氯甲烷:甲醇=10比1)得到目标化合物N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十二烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C1.15)(90mg)。

[2120] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1032.3。

[2121] 实施例C1.16:N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



[2122]



[2123] 步骤一：

[2124] 向化合物C1.16-A(10.0g)加入氯化氢-二氧六环(100mL)溶液，在室温下反应2小时。反应液减压浓缩得到白色固体目标化合物C1.16-B(8.0g)。

[2125] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:380.1。

[2126] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ8.18(d,J＝7.4Hz,1H),7.40-7.30(m,5H),7.26(d,J＝8.8Hz,1H),5.08-4.99(m,2H),4.23-4.11(m,1H),3.94-3.88(m,1H),2.78-2.73(m,2H),2.03-1.94(m,1H),1.77-1.51(m,4H),1.44-1.31(m,2H),0.87(dd,J＝17.3,6.6Hz,6H)。

[2127] 步骤二：

[2128] 将化合物C1.16-B(3.0g)和醋酸钠(1.90g)溶在甲醇(100mL)溶液中，室温下反应10分钟，向反应液中加入多聚甲醛(2.8g)，室温下搅拌反应30分钟，再向反应液中加入氰基硼氢化钠(1.0g)，反应在室温下搅拌反应16小时。反应液过滤后滤液用C18柱反向分离纯化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液:5%到55%)得到目标化合物C1.16-C(1.70g)。

[2129] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:408.1;

[2130] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.86(d,J＝7.3Hz,1H),7.40-7.26(m,6H),5.03(s,2H),4.08-4.06(m,1H),3.90-3.85(m,1H),2.50-2.45(m,2H),2.35(s,6H),2.05-1.93(m,1H),1.73-1.55(m,2H),1.51-1.40(m,2H),1.33-1.22(m,2H),0.85(dd,J＝16.5,6.8Hz,6H)。

[2131] 步骤三：

[2132] 室温下，将化合物C1.16-C(1.6g)溶于甲醇(80mL)中，然后向反应液中加入Pd/C(10%,0.16g)，氢气下室温下搅拌反应12小时。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物C1.16-D(680mg)。

[2133] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:274.2。

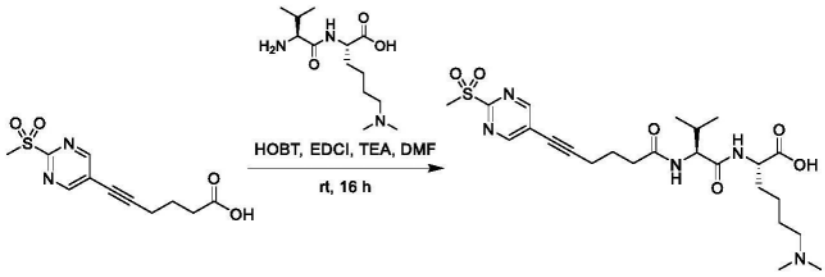
[2134] 步骤四：

[2135] 将6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(944mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(30mL)中，然后依次加入N,N-二异丙基乙胺(1.3g)，2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU,1.8g)。反应液室温搅拌20分钟，然后加入化合物C1.16-D(1.1g)，40℃搅拌反应3小时，粗产品用C18柱反相分离纯化(乙腈/0.01%甲酸的水溶液:5%-65%)得到白色固体目标化合物N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸C1.16(1.2g)。

[2136] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:492.1;

[2137] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ8.68(s,2H),8.00(d,J=7.6Hz,1H),7.91(d,J=9.0Hz,1H),4.20(t,1H),4.08(dd,J=12.7,7.7Hz,1H),2.47-2.40(m,4H),2.37-2.31(m,2H),2.30(s,6H),2.01-1.92(m,1H),1.82-1.73(m,2H),1.71-1.56(m,2H),1.49-1.37(m,2H),1.33-1.23(m,2H),0.88-0.82(m,6H).

[2138] 实施例C1.17:N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸C1.17

[2139] 

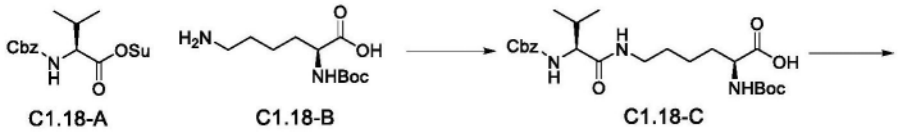
[2140] 将6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(268mg),化合物C1.16-D(328mg),三乙胺(322mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL)。然后再加入1-羟基苯并三唑(HOBT,162mg)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI,229mg),

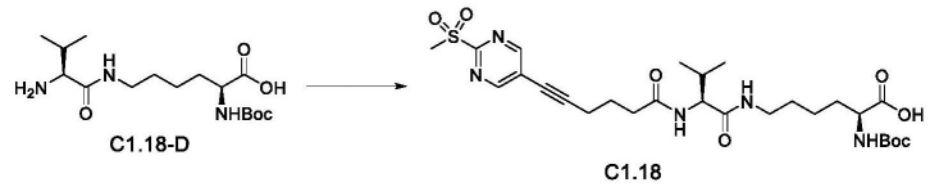
[2141] 反应液室温搅拌16小时,反应液直接经过C18柱反相(乙腈和0.05%的甲酸水溶液体系)提纯得到目标化合物N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C1.17,白色固体,327mg)。

[2142] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:524.4。

[2143] ^{1}H NMR(400MHz,)δ9.13(s,2H),7.95(t,J=8.8Hz,2H),4.21(dd,J=8.8,6.9Hz,1H),4.08-4.03(m,1H),3.41(s,3H),2.55(t,J=7.0Hz,2H),2.42-2.32(m,4H),2.27(s,6H),1.98(dd,J=13.6,6.8Hz,1H),1.86-1.77(m,2H),1.74-1.55(m,2H),1.47-1.37(m,2H),1.31-1.23(m,2H),0.85(dd,J=12.8,6.8Hz,6H)。

[2144] 实施例C1.18:N^2-(叔丁氧基羰基)-N^6-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



[2145] 

[2146] 步骤一:

[2147] 化合物C1.18-B(3g)溶于二氯甲烷(30ml),加入DIPEA(4ml),然后加入化合物C1.18-A(3.48g),混合物室温下搅拌反应20小时。向反应液中加入乙酸乙酯(200ml),混合物依次用盐酸(0.1M,30ml x 3)、水(30ml x 3)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压浓缩后得到目标混合物C1.18-C(4.7g)。

[2148] 步骤二:

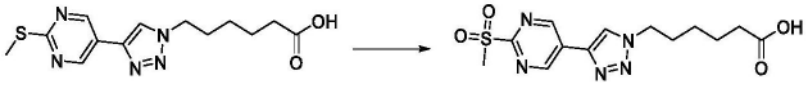
[2149] 室温下,将化合物C1.18-C(4.7g)溶于甲醇(80mL)中,然后向反应液中加入Pd/C(10%,0.6g),在氢气下室温下搅拌反应12小时。将反应液过滤,滤液减压浓缩得到目标化合物C1.18-D(3.4g)。LCMS(ESI)[M+H]$^+$:346.2。

[2150] 步骤三:

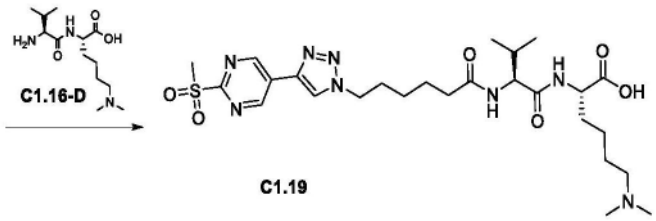
[2151] 将6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(2.68g),溶于N,N-二甲基甲酰胺(50mL),然后再加入三乙胺(3ml),HBTU(3.8g),混合物室温下搅拌10分钟,然后加入乙酸乙酯(200ml),混合物用饱和碳酸氢钠(20ml x 2),盐酸(0.1M,50ml x 2),水(50ml x 2)洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩得到粗产物中间体,上述粗产物溶于DMF(30ml),加入DIPEA(1.6ml),然后加入C1.18-D(3.4g),反应液室温搅拌3小时,然后加入乙酸乙酯(200ml),用盐酸(0.1M,50ml x 2),水(50ml x 2)洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩得到粗产物,经硅胶柱色谱分离提纯得到目标化合物N^2-(叔丁氧基羰基)-N^6-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C1.18,白色固体,3.8g)。

[2152] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:596.4。

[2153] 实施例C1.19:N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



[2154]



[2155] 步骤一:

[2156] 将化合物6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸(1.0g,3.3mmol)溶在四氢呋喃和水(40mL,3:1)混合溶液中,加入过氧单磺酸钾(10.0g,16.3mmol)。室温搅拌反应3小时,LCMS检测反应完成。反应液过滤,滤饼用DMSO洗涤,合并滤液。经反相纯化(C18,乙腈:0.1%甲酸=5%-55%)纯化,得到6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸(750mg,收率67.9%)白色固体。

[2157] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=340.1;

[2158] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.48(s,2H),8.95(s,1H),4.49(t,J=7.0Hz,2H),3.45(s,3H),2.22(t,J=7.3Hz,2H),1.95-1.84(m,2H),1.61-1.50(m,2H),1.36-1.26(m,2H)。

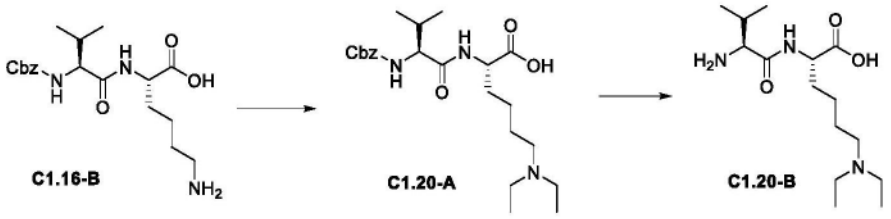
[2159] 步骤二:

[2160] 将化合物6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸(300mg,0.88mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(6mL),加入HATU(337mg,0.88mmol),DIPEA(286mg,2.21mmol),室温搅拌反应30分钟,然后加入二肽C1.16-D(243mg,0.88mmol),室温搅拌反应2小时。LCMS检测反应完成,反应液通过C18柱分离纯化(乙腈/0.01%FA的水溶液:5%-50%)得到目标化合物N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(300mg,收率57%)白色固体。

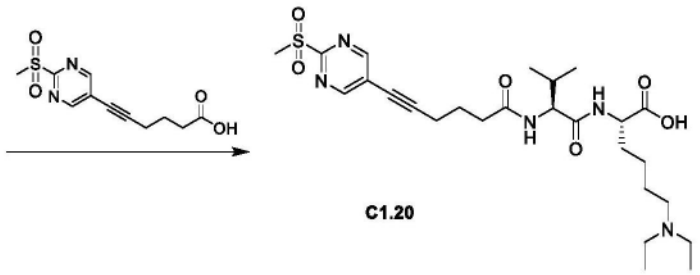
[2161] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=595.5,t_R=2.024min。

[2162] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.49(s,2H),9.01(s,1H),7.85(br s,1H),7.84(d,J=8.9Hz,1H),4.48(t,J=6.8Hz,2H),4.17-4.15(m,1H),4.02(br s,1H),3.44(s,3H),2.42(br s,2H),2.30(s,6H),2.18-2.14(m,2H),1.99-1.96(m,1H),1.88(dd,J=14.6,7.1Hz,2H),1.67(br s,1H),1.59-1.53(m,2H),1.43(br s,2H),1.28-1.26(m,5H),0.83-0.89(m,6H).

[2163] 实施例C1.20:N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



[2164]



[2165] 步骤一:

[2166] 将化合物C1.16-B(5.0g,12.05mmol)溶在二氯甲烷(100mL)中,向反应液中加入乙醛(3.2g,72.3mmol),室温下搅拌反应10分钟,再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠(12.8g,60.25mmol),反应在室温下搅拌反应1小时。LCMS显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时,旋干,过滤后滤液用C18柱反向分离纯化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液:5%到55%)得到目标化合物C1.20-A(4.57g,收率82.0%)为白色固体。

[2167] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=436.4;

[2168] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.70(d,J=7.0Hz,1H),7.41(d,J=9.0Hz,1H),7.38-7.26(m,5H),5.08-4.99(m,2H),4.00(dd,J=12.6,6.5Hz,1H),3.86(dd,J=8.6,6.8Hz,1H),2.74(dd,J=14.0,6.9Hz,4H),2.64-2.54(m,2H),2.05-1.94(m,1H),1.72-1.52(m,2H),1.52-1.38(m,2H),1.38-1.18(m,2H),1.04(t,J=7.1Hz,6H),0.87-0.81(m,6H)。

[2169] 步骤二:

[2170] 室温下,将化合物C1.20-A(1.6g,3.68mmol)溶于甲醇(80mL)中,然后向反应液中加入Pd/C(0.16g),氢气下室温下搅拌反应12小时。LCMS显示反应完成。将反应液过滤,滤液减压浓缩得到目标化合物C1.20-B(900mg,收率82%)为米白色固体。

[2171] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.04(br s,1H),4.02-3.99(m,1H),3.10(d,J=4.5Hz,1H),2.65(q,J=7.1Hz,4H),2.55-2.51(m,2H),2.06-1.93(m,1H),1.73-1.54(m,2H),1.47-1.38(m,2H),1.30-1.21(m,2H),1.01(t,J=7.1Hz,6H),0.89(d,J=6.9Hz,3H),0.79(d,J=6.8Hz,3H)。

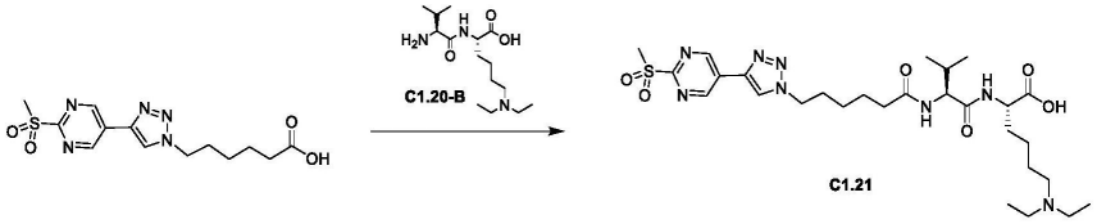
[2172] 步骤三:

[2173] 将化合物6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(268mg,1mmol)溶于DMF(8mL)中,依次加入HATU(380mg,1mmol)和三乙胺(322mg,2.5mmol),室温搅拌20分钟后加入化合物C1.20-B(301mg,1mmol),室温继续搅拌30分钟。LCMS检测反应完成后,反应液直接经过C18柱反相(乙腈和0.05%的甲酸水溶液体系)提纯得到目标化合物(280mg,收率51%)为白色固体。

[2174] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=552.3;

[2175] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.13(s,2H),7.95(d,J=8.9Hz,1H),7.86(d,J=7.2Hz,1H),4.18(dd,J=8.8,6.8Hz,1H),4.02(dd,J=12.8,7.2Hz,1H),3.41(s,3H),2.74-2.69(m,4H),2.62-2.52(m,4H),2.44-2.29(m,2H),2.04-1.94(m,1H),1.86-1.77(m,2H),1.72-1.54(m,2H),1.51-1.39(m,2H),1.33-1.23(m,2H),1.02(t,J=7.2Hz,6H),0.87-0.82(m,6H)。

[2176] 实施例C1.21:N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

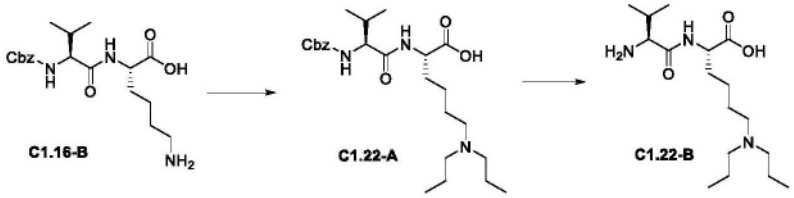
[2177] 

[2178] 将化合物6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸(500mg,1.475mmol),溶于N,N-二甲基甲酰胺(10mL),然后加入HATU(560mg,1.475mmol),N,N-二异丙基乙胺(476mg,3.688mmol),搅拌30分钟,然后加入化合物C1.20-B(444mg,1.475mmol),反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,反应液直接经过C18柱反相(乙腈和0.05%的甲酸水溶液体系)提纯得到目标化合物N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(330mg,收率34%)为白色固体。

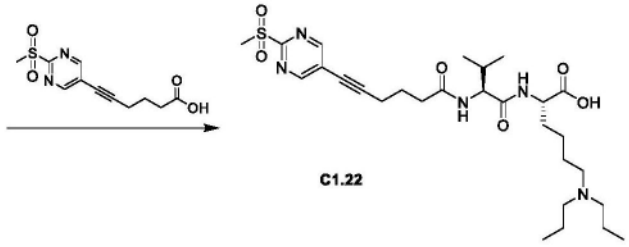
[2179] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=623.4;

[2180] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.49(s,2H),9.04(s,1H),7.84(d,J=8.9Hz,1H),7.80(d,J=7.1Hz,1H),4.47(t,J=7.0Hz,2H),4.14(dd,J=8.8,6.6Hz,1H),4.06-3.95(m,1H),3.44(s,3H),2.67-2.64(m,4H),2.55(t,J=7.4Hz,2H),2.21-2.10(m,2H),2.02-1.94(m,1H),1.92-1.84(m,2H),1.72-1.63(m,1H),1.72-1.63(m,3H),1.59-1.54(m,2H),1.32-1.21(m,4H),1.01(t,J=7.1Hz,6H),0.81(dd,J=9.6,6.8Hz,6H)。

[2181] 实施例C1.22:N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



[2182]



[2183] 步骤一：

[2184] 将化合物C1.16-B(5.0g,12mmol)溶在二氯甲烷(100mL)中,向反应液中加入正丙醛(4.2g,72.3mmol),室温下搅拌反应10分钟,再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠(12.8g,60.25mmol),反应在室温下搅拌反应1小时。LCMS显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时,旋干,过滤后滤液用C18柱反向分离纯化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液:5%到55%)得到目标化合物C1.22-A(4.57g,收率82.0%)为白色固体。

[2185] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=464.0;

[2186] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.81(d,J=7.3Hz,1H),7.38-7.28(m,5H),5.04(d,J=1.7Hz,2H),4.12-4.02(m,1H),3.94-3.82(m,1H),2.65-2.52(m,6H),2.06-1.94(m,1H),1.76-1.64(m,1H),1.64-1.53(m,1H),1.52-1.40(m,6H),1.34-1.18(m,2H),0.92-0.80(m,12H)。

[2187] 步骤二：

[2188] 室温下,将化合物C1.22-A(2.0g,4.32mmol)溶于甲醇(80mL)中,然后向反应液中加入Pd/C(0.16g),氢气下室温下搅拌反应12小时。LCMS显示反应完成。将反应液过滤,滤液减压浓缩得到目标化合物C1.22-B(1.2g,收率85.5%)为白色固体。

[2189] 步骤三：

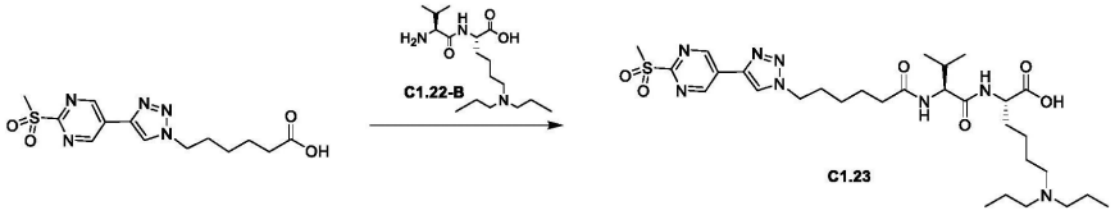
[2190] 将化合物6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(100mg,0.373mmol),溶于N,N-二甲基甲酰胺(1mL),然后加入HATU(142mg,0.373mmol),N,N-二异丙基乙胺(120mg,0.93mmol),该体系搅拌30分钟,然后加入化合物C1.22-B(122mg,0.371mmol),反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,反应液直接经过C18柱反相(乙腈和0.05%的甲酸水溶液体系)提纯得到目标化合物N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(50mg,收率28%)为淡黄色固体。

[2191] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=580.0;

[2192] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.24(s,2H),7.98-7.93(m,2H),4.24-4.16(m,1H),4.10(d,J=5.2Hz,1H),3.41(s,3H),2.79-2.64(m,6H),2.55(t,J=7.1Hz,2H),2.45-2.26(m,2H),2.06-1.91(m,1H),1.89-1.78(m,2H),1.76-1.66(m,1H),1.64-1.57(m,1H),1.57-1.42(m,6H),1.37-1.24(m,2H),0.93-0.78(m,12H)。

[2193] 实施例C1.23:N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三

唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

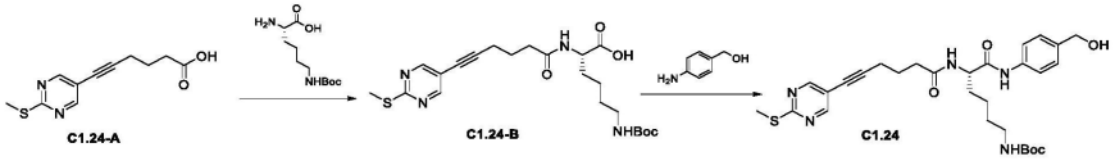
[2194] 

[2195] 将化合物6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸(500mg,1.475mmol),溶于N,N-二甲基甲酰胺(10mL),然后加入HATU(560mg,1.475mmol),N,N-二异丙基乙胺(476mg,3.688mmol),该体系搅拌30分钟,然后加入化合物C1.22-B(485mg,1.475mmol),反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,反应液直接经过C18柱反相(乙腈和0.05%的甲酸水溶液体系)提纯得到目标化合物N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(320mg,收率33%)为白色固体。

[2196] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=651.5;

[2197] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.49(s,2H),9.00(s,1H),7.95(d,J=7.2Hz,1H),7.79(d,J=8.9Hz,1H),4.47(t,J=6.9Hz,2H),4.21-4.11(m,1H),4.09-4.01(m,1H),3.44(s,3H),2.45-2.35(m,6H),2.23-2.09(m,2H),1.97-1.86(m,3H),1.72-1.64(m,1H),1.61-1.50(m,3H),1.43-1.34(m,6H),1.32-1.22(m,4H),0.86-0.77(m,12H)。

[2198] 实施例C1.24:(S)-(6-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯

[2199] 

[2200] 步骤一:

[2201] 将化合物C1.24-A(3.70g,15.7mmol),二异丙基乙胺(11.0mL,62.8mmol)和HBTU(8.90g,23.6mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(30mL)中,反应在室温下反应30分钟。随后加入化合物Boc保护的赖氨酸(3.86g,15.7mmol),反应在室温下反应2小时。LCMS检测反应完全。向反应液中加入柠檬酸水溶液(30mL)调至PH=5,用二氯甲烷(50mL X 3)萃取水溶液,合并有机相并用无水硫酸钠干燥,抽滤,减压浓缩得到目标化合物C1.24-B(7.0g,粗品)为黄色油状物。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=465.1,t_R=1.751min.

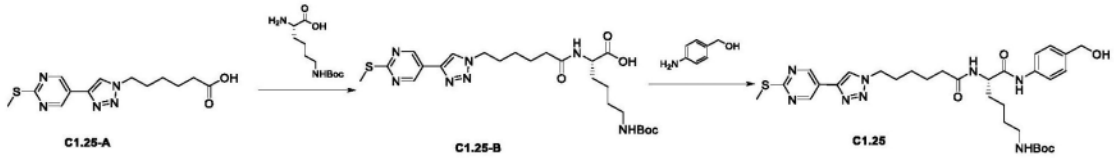
[2202] 步骤二:

[2203] 将化合物C1.24-B(7.00g,5.60mmol),二异丙基乙胺(10.7mL,60.4mmol)和HBTU(8.60g,22.7mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(100mL)中,随后加入对氨基苄醇(3.71g,30.2mmol),反应在室温下反应2小时。LCMS检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯(300mL),用饱和食盐水(100mL X 3)洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,滤液减压浓缩成固体,粗产品经柱层析分离纯化(二氯甲烷:甲醇=10/1)得到目标化合物(S)-(6-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯(6.00g,收率:69.9%)为黄色油状物。

[2204] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=570.1;

[2205] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ9.24(s,1H),8.46(s,2H),7.51-7.47(m,2H),7.31-7.23(m,3H),7.02-6.95(m,1H),4.83(br s,1H),4.63-4.60(m,2H),3.19-2.96(m,4H),2.57(s,3H),2.52-2.48(m,2H),2.47-2.41(m,2H),1.99-1.92(m,2H),1.87-1.77(m,2H),1.76-1.63(m,2H),1.43(s,9H)。

[2206] 实施例C1.25:(S)-(6-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯

[2207] 

[2208] 步骤一:

[2209] 将化合物C1.25-A(1.60g,5.21mmol),二异丙基乙胺(2.68mL,20.8mmol)和HBTU(2.97g,7.82mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(30mL),反应在室温下反应30分钟。随后加入Boc保护的赖氨酸(1.28g,5.21mmol),反应在室温下反应2小时。LCMS检测反应完全。向反应液中加入柠檬酸水溶液(30mL)调至PH=5,用二氯甲烷(50mL X 3)萃取水溶液,合并有机相并用无水硫酸钠干燥,抽滤,减压浓缩得到目标化合物C1.25-B(3.0g,粗品)为黄色油状物。

[2210] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=536.0;

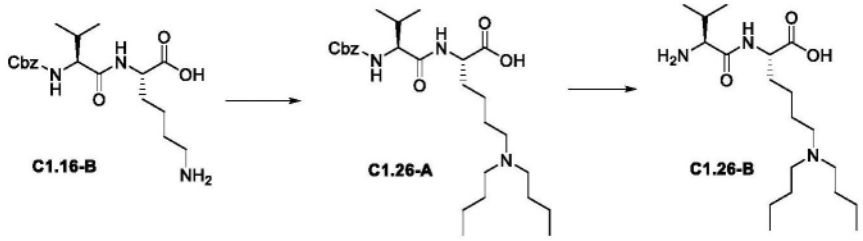
[2211] 步骤二:

[2212] 将化合物C1.25-B(3.00g,5.60mmol),二异丙基乙胺(2.89g,22.4mmol)和HBTU(3.19g,8.40mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(30mL)。随后加入对氨基苄醇(1.38g,11.2mmol),反应在室温下反应2小时。LCMS检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯(200mL),用饱和食盐水(80mL X 3)洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,滤液减压浓缩成固体,粗产品经柱层析分离纯化(二氯甲烷:甲醇=10/1)得到目标化合物(S)-(6-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯(2.90g)为黄色油状物。

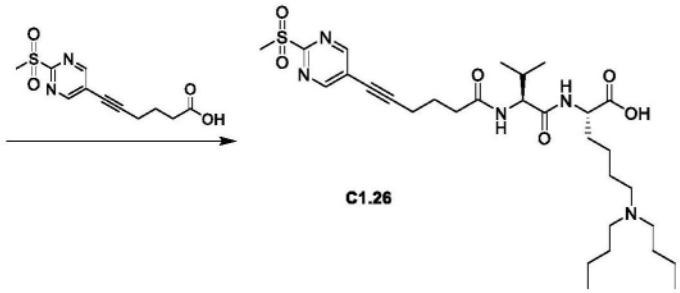
[2213] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=641.1;

[2214] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ9.13(s,1H),8.95(s,2H),7.94(s,1H),7.47(d,J=8.4Hz,2H),7.24(d,J=8.4Hz,2H),6.83-6.77(m,1H),4.93-4.80(m,1H),4.64-4.58(m,2H),4.40-4.29(m,2H),3.12-2.97(m,4H),2.60(s,3H),2.31-2.23(m,2H),1.96-1.83(m,4H),1.76-1.61(m,4H),1.41(s,9H),1.37-1.29(m,4H)。

[2215] 实施例C1.26:N^6,N^6-二丁基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



[2216]



[2217] 步骤一：

[2218] 将化合物C1.16-B(10.0g)溶在二氯甲烷(200mL)溶液中，向反应液中加入正丁醛(10.4g)，室温下搅拌反应10分钟，再向反应液中分批次加入三乙酰氧基硼氢化钠(25.6g)，反应在室温下搅拌反应1小时。LCMS显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时，旋干，过滤后滤液用C18柱反向分离纯化(乙腈比0.05％的甲酸水溶液:5％到55％)得到目标化合物C1.26-A(4.9g)为白色固体。

[2219] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝492.7；

[2220] ^{1}H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.35-7.30(m,5H)，5.14-5.08(m,2H)，4.33-4.30(m,1H)，4.14-4.12(m,1H)，2.94-2.80(m,6H)，2.13-2.11(m,1H)，1.85-1.82(m,2H)，1.58-1.55(m,4H)，1.40-1.22(m,8H)，0.98-0.87(m,12H)。

[2221] 步骤二：

[2222] 室温下，将化合物C1.26-A(5.0g)溶于甲醇(100mL)溶液中，然后向反应液中加入Pd/C(10％，1g)，氢气下搅拌反应12小时。LCMS显示反应完成。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物C1.26-B(3.68g)为白色固体。

[2223] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝358.3。

[2224] 步骤三：

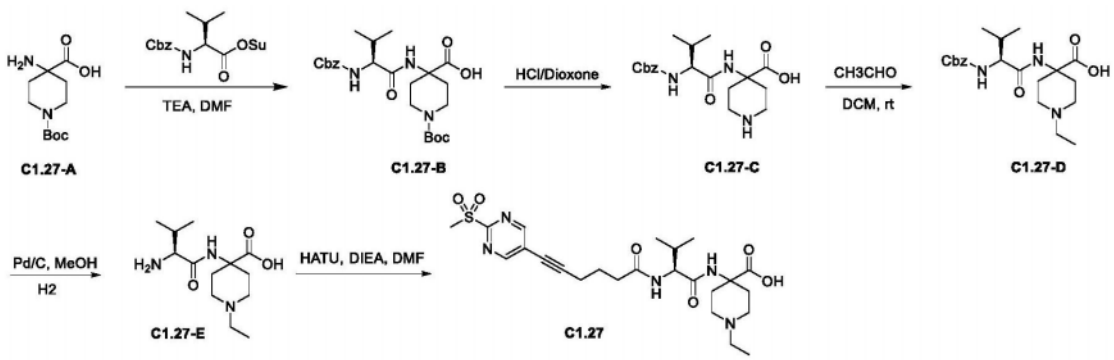
[2225] 将化合物6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(1.0g)溶于N,N-二甲基甲酰胺(15mL)，然后依次加入N,N-二异丙基乙胺(1.2g)，HATU(1.4g)，反应搅拌30分钟，然后加入化合物C1.26-B(1.3g)，反应液室温搅拌1小时，LCMS检测反应完成后，反应液，反应液直接经制备色谱(0.01％三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物N^6,N^6-二丁基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C1.26,500mg)为黄色固体。

[2226] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝608.7；

[2227] 1H NMR(400MHz,DMSO)δ9.37(s,1H)，9.13(s,2H)，8.19(d,J＝7.3Hz,1H)，7.92(d,J＝8.8Hz,1H)，4.25-4.20(m,1H)，4.20-4.13(m,1H)，3.42(s,3H)，3.06-2.99(m,6H)，2.57-2.53(m,2H)，2.41-2.30(m,2H)，1.99-1.95(m,2H)，1.87-1.79(m,2H)，1.78-1.71(m,1H)，1.62-1.56(m,4H)，1.34-1.32(m,8H)，0.94-0.85(m,12H)。

[2228] 实施例C1.27：(S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔

酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-羧酸

[2229] 

[2230] 步骤一:

[2231] 将化合物C1.27-A(5.0g,20.49mmol)溶在DMF(100mL)中,向反应液中加入N-((苄氧基)羰基)-L-缬氨酸2,5-二氧吡咯烷-N-羟基酯(7.13g,20.49mmol),100℃下搅拌反应48小时。LCMS显示反应完全。反应液用C18柱反向分离纯化(乙腈比0.05%的甲酸水溶液:5%到55%)得到目标化合物C1.27-B(1.3g,收率13.3%)为黄色固体。

[2232] LCMS(ESI)[M-boc]$^+$=378.2;

[2233] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.38-7.33(m,5H),7.32-7.27(m,1H),7.20(d,J=9.0Hz,1H),5.14-5.02(m,2H),3.97-3.87(m,1H),3.70-3.59(m,2H),3.08-2.95(m,2H),2.04-1.97(m,1H),1.95-1.87(m,2H),1.76-1.69(m,2H),1.40(s,9H),0.91-0.84(m,6H)。

[2234] 步骤二:

[2235] 室温下,将化合物C1.27-B(1.3g,2.71mmol)溶于乙酸乙酯中(10mL)溶液中,然后向反应液中加入二氧六环-HCl(3N,10mL),室温下搅拌反应1小时。LCMS显示反应完成。将反应液减压浓缩得到目标化合物C1.27-C(1.06g,收率94.4%)为黄色固体。

[2236] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=378.4。

[2237] 步骤三:

[2238] 将化合物C1.27-C(1.06g,2.81mmol)溶在二氯甲烷(10mL)中,向反应液中加入乙醛(0.75g,16.87mmol),室温下搅拌反应10分钟,再向反应液中发批次加入三乙酰氧基硼氢化钠(3g,14.05mmol),反应在室温下搅拌反应1小时。LCMS显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时,减压蒸馏除去二氯甲烷,剩余水相经反相分离(乙腈比0.05%的甲酸水溶液:5%到55%)得到目标化合物C1.27-D(1.13g,收率99.23%)为白色固体。

[2239] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=406.1;

[2240] 1H NMR(400MHz,MeOD)δ7.42-7.25(m,5H),5.22-5.06(m,2H),3.91(d,J=7.0Hz,1H),3.52-3.36(m,2H),3.25-2.93(m,4H),2.66-2.54(m,1H),2.47-2.36(m,1H),2.27-2.14(m,2H),2.13-2.06(m,1H),1.35-1.29(m,4H),0.98-0.90(m,6H)。

[2241] 步骤四:

[2242] 室温下,将化合物C1.27-D(1.13g,2.78mmol)溶于甲醇(20mL)溶液中,然后向反应液中加入Pd/C(0.5g),氢气下搅拌反应12小时。LCMS显示反应完成。将反应液过滤,滤液减压浓缩得到目标化合物C1.27-E(0.58g,收率76.18%)为白色固体。LCMS(ESI)[M+H]$^+$=272.4。

[2243] 步骤五：

[2244] 将化合物6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(1g,3.73mmol),溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL),然后依次加入N,N-二异丙基乙胺(1.2g,9.32mmol),HATU(1.42g,3.73mmol),反应液搅拌30分钟,然后加入化合物C1.27-E(1.01g,3.73mmol),反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,反应液直接经制备色谱(0.01%三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物(S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-羧酸(C1.27,500mg,收率28.7%)为黄色固体。

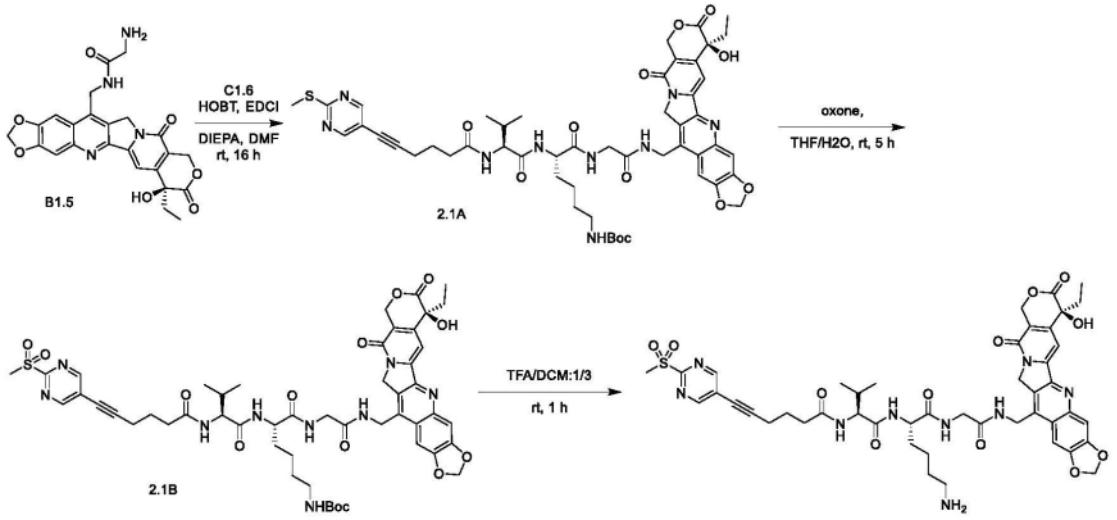
[2245] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=522.5;

[2246] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.12(s,2H),8.08(s,1H),7.88(d,J=9.0Hz,1H),4.28-4.25(m,1H),3.41(s,3H),2.89-2.78(m,2H),2.57-2.52(m,4H),2.45-2.30(m,4H),2.07-2.01(m,2H),1.99-1.96(m,1H),1.95-1.88(m,2H),1.85-1.79(m,2H),1.04(t,J=7.1Hz,3H),0.88-0.83(m,6H)。

[2247] 二、药物-连接体化合物合成

[2248] 实施例2.1:N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-001)

[2249]



[2250] 步骤一：

[2251] 将化合物C1.6(50mg,0.10mol),化合物B1.5(71mg,0.12mol),N,N-二异丙基乙胺(39mg,0.30mol)溶于DMF(5mL)。然后依次加入1-羟基苯并三唑(16mg,0.12mmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23mg,0.12mmol),上述反应液室温搅拌16小时,加入50mL乙酸乙酯稀释,有机相用水洗涤三次(25mL x 3),无水硫酸钠干燥,浓缩除去乙酸乙酯得到粗品,粗产品用快硅胶柱层析分离纯化(DCM:MeOH=100:0到90:10)得到目标化合物2.1A,(62mg,黄色固体,收率58%)。

[2252] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:1024.8。

[2253] 步骤二：

[2254] 将化合物2.1A(40mg,0.04mmol)溶于四氢呋喃和水的混合溶液(体积比为1/1;4mL)中,加入过氧单磺酸钾(246mg,0.4mmol),反应液在室温下搅拌5小时,加入30mL乙酸乙

酯稀释,有机相用水洗涤三次(25mL x 3),无水硫酸钠干燥,浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物2.1B(30mg,黄色固体,收率74%)。

[2255] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1055.9。

[2256] 步骤三:

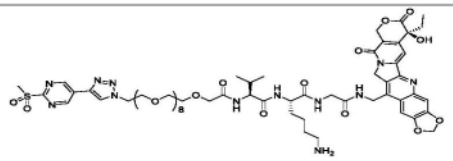
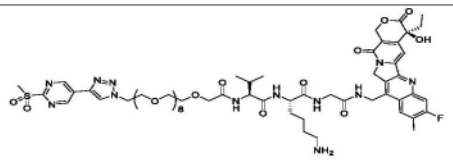
[2257] 将化合物2.1B(30mg,0.03mmol)溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为1:3;4mL)中,反应液在室温下搅拌1小时。然后减压浓缩得粗产品,粗产品经制备色谱(0.01%TFAin water,MeCN)纯化得到目标化合物N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(9mg,白色固体,收率33%)。

[2258] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:955.8;

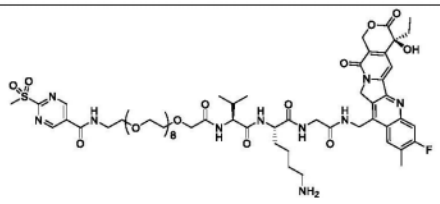
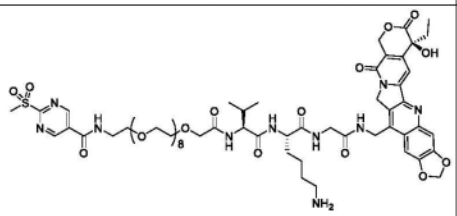
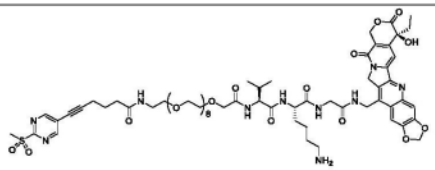
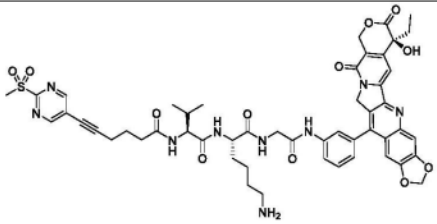
[2259] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.09(s,2H),8.54(s,1H),8.15(m,2H),7.84(m,1H),7.80(s,1H),7.64(br s,3H),7.53(s,1H),7.26(s,1H),6.51(s,1H),6.30(d,J=2.9Hz,2H),5.59-5.46(m,2H),5.43(s,2H),4.87-4.78(m,1H),4.70-4.60(m,1H),4.17-4.03(m,2H),3.82-3.58(m,2H),3.41(s,3H),2.80-2.70(m,2H),2.40-2.22(m,2H),1.93-1.68(m,6H),1.65-1.57(m,1H),1.56-1.45(m,3H),1.36-1.22(m,2H),0.87(t,J=7.3Hz,3H),0.80(d,J=5.2Hz,6H)。

[2260] 用实施例2.1相同的方法和反应条件,用所示的不同起始原料,得到下表中实施例2.2到实施例2.8所示的目标产物。

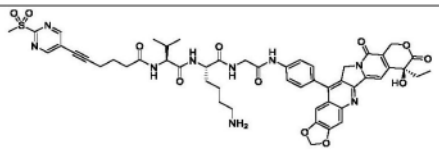
[2261]

实施例	化合物	名称	(m/z):[M+H]$^+$
实施例2.2	 DL-002 原料:C1.2,B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代-己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代-丁-2-基)-29-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂二十九烷酰胺	1366.9
实施例2.3	 DL-003 原料:C1.2,B1.4	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-己)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂二十九烷酰胺	1354.9

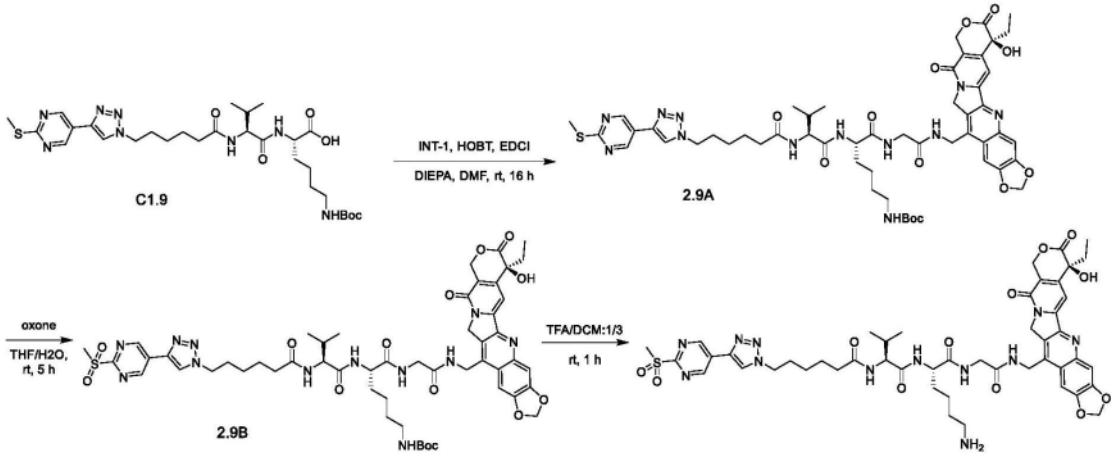
[2262]

实施例2.4	 DL-004 原料：C1.1，B1.4	N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-10-异丙基-3,6,9,12-四氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧杂-2,5,8,11-四氮杂四十烷-40-基)-2-(甲磺酰基)嘧啶-5-甲酰胺	1330.9
实施例2.5	 DL-005 原料：C1.1，B1.5	N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)- 10-异丙基-3,6,9,12-四氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧杂-2,5,8,11-四氮杂四十烷-40-基)-2-(甲磺酰基)嘧啶-5-甲酰胺	1342.8
实施例2.6	 DL-006 原料：C1.5，B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂二十九烷酰胺	1408.5
实施例2.7	 DL-007 原料：C1.7，B1.8	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-己)氨基)-3-甲基-1-氧	1017.9

[2263]

		代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔-酰胺	
实施例2.8	 DL-008 原料：C1.7，B1.9	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((4-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺	1017.8

[2264] 实施例2.9:(S)-6-氨基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-009)

[2265] 

[2266] 步骤一：

[2267] 将化合物B1.5(30mg),化合物C1.9(48mg),N,N-二异丙基乙胺(23mg)溶于DMF(5mL)。向上述溶液中加入1-羟基苯并三唑(9mg)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(13mg),反应室温搅拌16小时,加入50mL乙酸乙酯稀释,有机相用水洗涤三次(25mL x 3),无水硫酸钠干燥,浓缩除去乙酸乙酯得到粗品,粗产品用快速色谱法分离纯化(DCM:MeOH＝100:0to 90:10)得到目标化合物2.9A(35mg,淡黄色固体,收率43%)。

[2268] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:1095.8

[2269] 步骤二：

[2270] 将化合物2.9A(35mg)溶于四氢呋喃和水的混合溶液(体积比为1/1;4mL)中,加入

过氧单磺酸钾(184mg),反应液室温下搅拌5小时,加入30mL乙酸乙酯稀释,有机相用水洗涤三次(25mL x 3),无水硫酸钠干燥,浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物2.9B(25mg,淡黄色固体,收率71%)。

[2271] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1126.9。

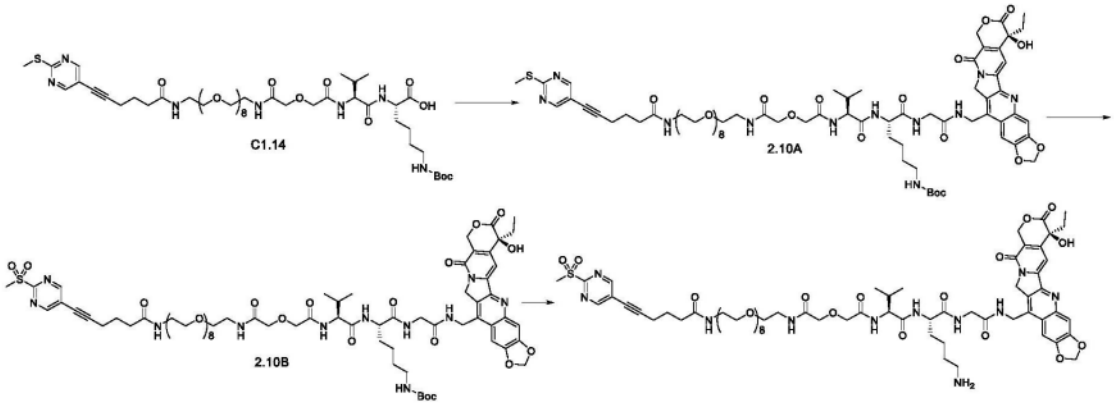
[2272] 步骤三:

[2273] 将化合物2.9B(25mg)溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为1:3;4mL)中,反应液在室温下搅拌1小时。液浓缩得粗产品,经prep-HPLC(0.01% TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-氨基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺三氟乙酸盐(5.1mg)。

[2274] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1026.9;

[2275] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.46(s,2H),8.91(s,1H),8.53(s,1H),8.18(s,1H),8.11-8.10(m,1H),7.79(s,1H),7.73-7.72(m,1H),7.63(s,3H),7.53(s,1H),7.26(s,1H),6.52(s,1H),6.29(m,2H),5.61-5.46(m,2H),5.43(s,2H),4.85-4.83(m,1H),4.63-4.60(m 1H),4.44(s,2H),4.06-4.03(m,3H),2.75(s,2H),2.12-2.10(m,2H),1.89-1.85(m,6H),1.56-1.53(m,8H),1.24(br s,4H),0.87-0.84(m,3H),0.77(d,J=6.1Hz,6H).

[2276] 实施例2.10:N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-10-异丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧杂-2,5,8,11,17-五氮杂四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-010)

[2277] 

[2278] 步骤一:

[2279] 将化合物C1.14(112mg)溶在N,N-二甲基甲酰胺(2mL)中,依次加入三乙胺(32mg,0.31mmol),1-羟基苯并三唑(17mg,0.13mmol),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(24mg,0.13mmol),搅拌20分钟,然后将化合物B1.5(50mg)加入于反应液中,反应液在40℃下搅拌过夜。向反应液中加入10mL水,二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥,抽滤,旋干得到粗品。粗产品用C18柱反相分离纯化(乙腈/0.01%FA的水溶液:0%-55%)得到白色固体目标化合物2.10A(75mg,收率46%)。

[2280] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1534.0。

[2281] 步骤二：

[2282] 将化合物2.10A(75mg)溶在四氢呋喃和水(8mL,1:1)溶液中,加入过氧单磺酸钾(211mg)室温搅拌反应10小时。向反应液中加入10mL二氯甲烷,萃取,分液,无水硫酸钠干燥,抽滤旋干得到目标产物2.10B(50mg,收率65%)。

[2283] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:1566.2。

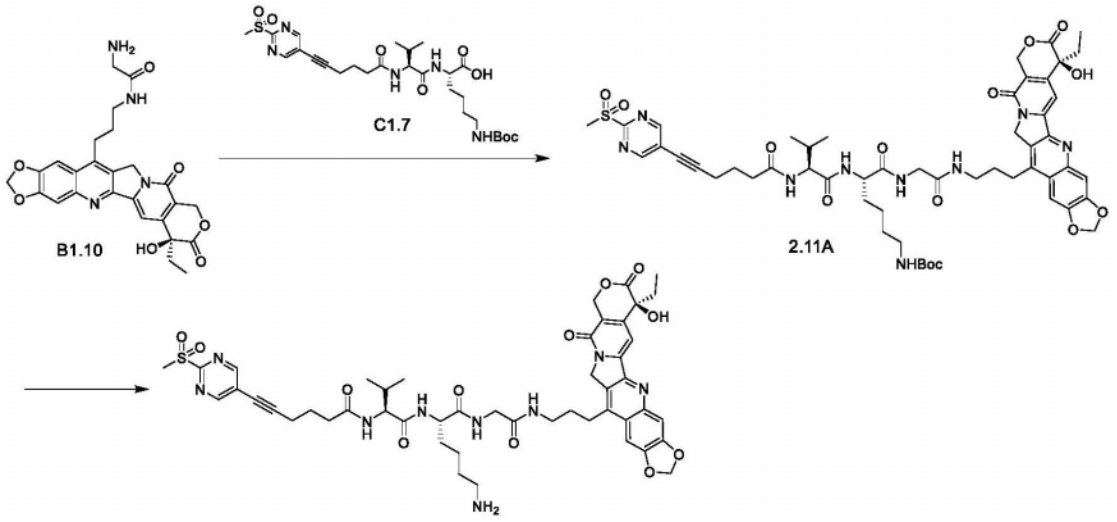
[2284] 步骤三：

[2285] 将化合物2.10B(50mg)溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为1:2;4mL)中,然后反应液在室温下搅拌1小时。将反应液浓缩得粗产品,粗产品经制备色谱(0.01%TFAin water,MeCN)得到目标化合物N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-10-异丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧杂-2,5,8,11,17-五氮杂四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(10.5mg,收率21%)。

[2286] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:1466.9;

[2287] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.12(s,2H),8.62(t,J=5.7Hz,1H),8.26-8.11(m,2H),8.03(t,J=5.8Hz,1H),7.93(t,J=5.3Hz,1H),7.85(d,J=8.7Hz,1H),7.79(d,J=5.6Hz,1H),7.61(s,3H),7.54(s,1H),7.26(s,1H),6.50(s,1H),6.31(d,J=1.7Hz,2H),5.46(d,J=17.2Hz,4H),4.76(dt,J=14.8,8.7Hz,2H),4.20-4.15(m,4H),4.00(s,3H),3.95(d,J=5.5Hz,3H),3.72-3.67(m,2H),3.50(d,J=3.9Hz,30H),3.41(s,3H),3.25-3.19(m,4H),2.76(d,J=5.6Hz,2H),2.56(t,J=4.9Hz,2H),2.27(t,J=7.3Hz,2H),1.90(dd,J=16.1,7.4Hz,2H),1.84-1.78(m,2H),1.63(s,1H),1.53-1.48(m,2H),1.30(d,J=7.7Hz,2H),0.87-0.84(m,4H),0.78-0.75(m,6H)。

[2288] 实施例2.11:N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-011)

[2289] 

[2290] 步骤一：

[2291] 向化合物B1.10(75mg)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(3mL)中依次加入化合物C1.7

(107mg),三乙胺(45mg),HOBT(25mg)和EDCI(35mg),在35℃下反应4小时。向反应液中加入水(30mL),乙酸乙酯(30mL×2)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,浓缩得到目标化合物2.11A(60mg,收率:37%)。

[2292] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:1084;

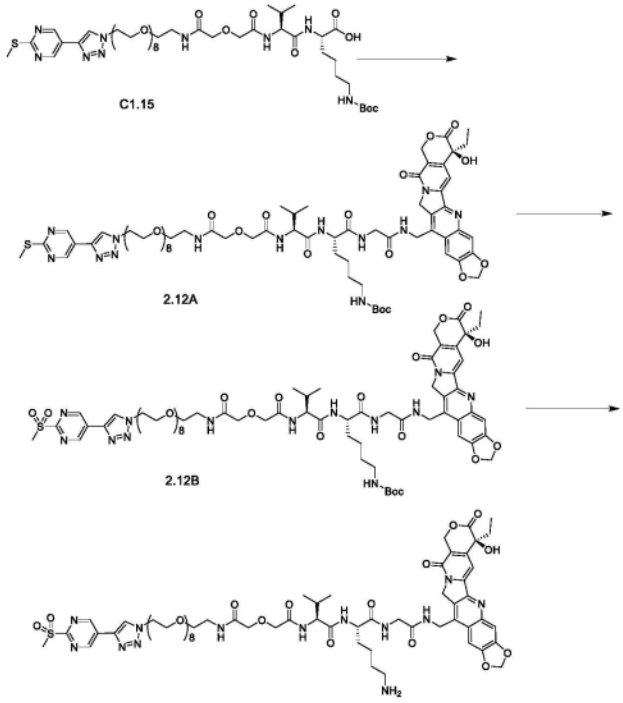
[2293] 步骤二:

[2294] 向化合物2.11A(60mg)的二氯甲烷溶液(4mL)中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为1:2;4mL),在室温下搅拌反应1小时。将反应液浓缩,粗品经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%甲酸的水溶液)得到目标化合物N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(9mg,收率18%)。

[2295] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:983.9;

[2296] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.08(s,2H),8.34(s,1H),8.24(s,1H),8.19(d,J=7.1Hz,1H),8.00(d,J=8.3Hz,1H),7.95(s,1H),7.63(s,1H),7.49(d,J=2.8Hz,1H),7.24(s,1H),6.50(s,1H),6.28(d,J=1.9Hz,2H),5.42(s,2H),5.24(s,2H),4.25-4.07(m,2H),3.74-3.70(m,3H),3.25(d,J=12.4Hz,3H),3.08(d,J=7.6Hz,2H),2.73(s,2H),2.40-2.19(m,3H),2.01-1.64(m,10H),1.52(br s,4H),1.34(br s,2H),0.87(t,J=7.3Hz,3H),0.83-0.75(m,6H)。

[2297] 实施例2.12:(S)-6-氨基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五酰胺)己酰胺(DL-012)

[2298] 

[2299] 步骤一：

[2300] 将化合物C1.15(80mg)，化合物B1.5(37mg)，三乙胺(23mg，0.231mo，)溶于DMF(5mL)。然后再加入1-羟基苯并三唑(12mg)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(17mg)，反应液室温搅拌16小时，加入50mL乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次(25mL x 3)，无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到粗品，粗产品用快速色谱法分离纯化(DCM:MeOH＝100:0到90:10)得到目标化合物2.12A(75mg，收率65％)。

[2301] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1492.0。

[2302] 步骤二：

[2303] 将化合物2.12A(50mg)溶于四氢呋喃和水的混合溶液(体积比为1/1；4mL)中，加入过氧单磺酸钾(202mg)，反应液在室温下搅拌5小时，加入30mL乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次(25mL x 3)，无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物2.12B(40mg，收率80％)。

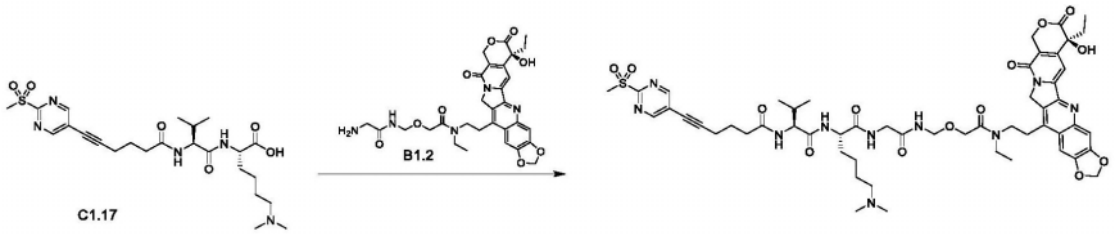
[2304] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1524.1。

[2305] 步骤三：

[2306] 将化合物2.12B(30mg)溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为1比3；4mL)中，然后反应液在室温下搅拌1小时。将反应液浓缩得粗产品，粗产品经prep-HPLC(水含0.01％三氟乙酸，乙腈)纯化得到目标化合物(S)-6-氨基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五酰胺)己酰胺(9mg，收率30％)。

[2307] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1423.9。

[2308] 实施例2.13：N-((13S,16S)-13-(4-(二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-013)

[2309] 

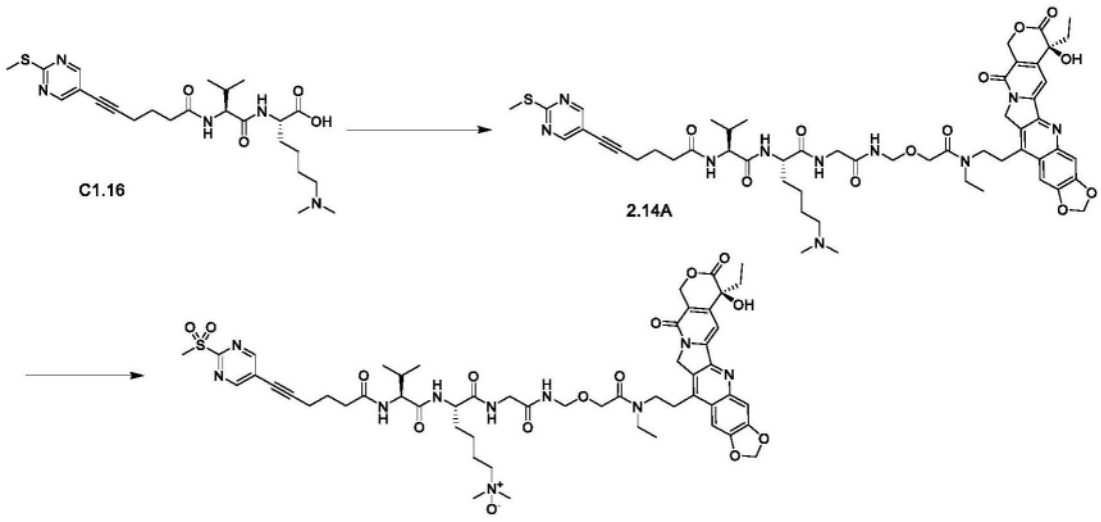
[2310] 将化合物C1.17(50mg)，化合物B1.2(58mg)，三乙胺(24mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(2mL)。然后依次加入1-羟基苯并三唑(16mg)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(22mg)，反应液室温搅拌16小时。反应液直接经制备色谱(0.01％甲酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物(21mg，收率10％)。

[2311] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1113.0；

[2312] ^{1}H NMR(400MHz，MeOD)δ8.93(s，2H)，8.40-8.33(m，1H)，8.30-8.25(m，1H)，8.25-8.21(m，1H)，7.65(s，1H)，7.48(s，1H)，7.34(s，1H)，6.22(s，2H)，5.47(dd，J＝78.6，16.4Hz，2H)，5.28-5.13(m，2H)，4.73-4.59(m，2H)，4.30-4.05(m，4H)，3.94-3.82(m，2H)，

3.70-3.57(m,2H),3.54-3.44(m,1H),3.34(s,6H),3.16-3.08(m,2H),2.90(s,6H),2.58-2.40(m,4H),2.04-1.83(m,6H),1.80-1.68(m,3H),1.54-1.36(m,2H),1.24-1.15(m,3H),1.03-0.86(m,9H)。

[2313] 实施例2.14:N-((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-014)

[2314] 

[2315] 步骤一:

[2316] 将化合物C1.16(49mg),化合物B1.2(71mg),N,N-二异丙基乙胺(39mg)溶于DMF(5mL)。然后依次加入1-羟基苯并三唑(16mg)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23mg),加完后反应液室温搅拌16小时,加入50mL乙酸乙酯稀释,有机相用水洗涤三次(25mL x 3),无水硫酸钠干燥,浓缩除去乙酸乙酯得到粗品,粗产品用快硅胶柱层析分离纯化(DCM:MeOH=100:0到90:10)得到目标化合物2.14A(61mg,收率60%)。

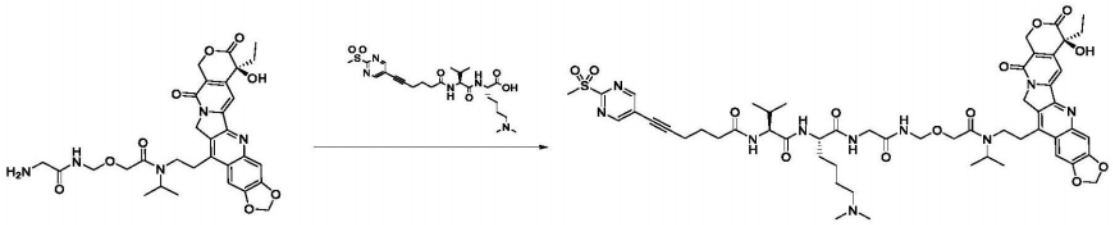
[2317] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:1081.6;

[2318] 步骤二:

[2319] 将化合物2.14A(40mg)溶于四氢呋喃和水的混合溶液(体积比为1/1;4mL)中,加入过氧单磺酸钾(227mg,0.37mmol),反应液在室温下搅拌5小时,LCMS显示反应完毕,加入30mL乙酸乙酯稀释,有机相用水洗涤三次(25mL x 3),无水硫酸钠干燥,浓缩除去乙酸乙酯得到粗品化合物,粗产品经制备色谱(0.01%甲酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物N-((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(9mg,收率33%)。

[2320] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1129.0。

[2321] 实施例2.15:N-((13S,16S)-13-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-3-异丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-015)

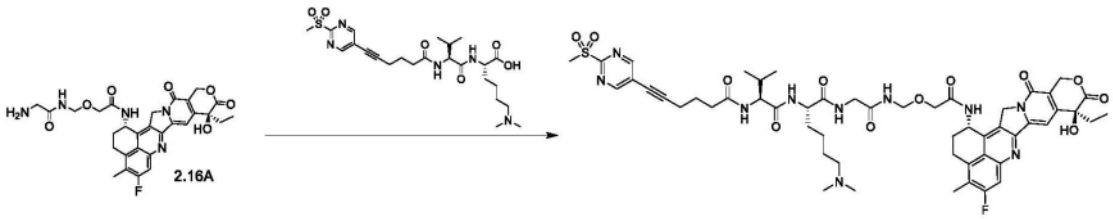
[2322] 

[2323] 向化合物N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(42mg,C1.17)和化合物(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺(50mg,B1.11),的N,N-二甲基甲酰胺(10mL)溶液中,依次加入HBTU(31mg)和二异丙基乙胺(21mg)。反应在室温下搅拌2小时。反应液过滤后经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%三氟乙酸)得到目标化合物N-((13S,16S)-13-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-3-异丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(15.2mg)。

[2324] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1127.6;

[2325] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),8.73(t,J=8.7Hz,1H),8.23-8.17(m,1H),8.10(d,J=7.5Hz,1H),7.97-7.93(m,2H),7.52(s,1H),7.25(s,1H),6.50(s,1H),6.30(s,2H),5.42(s,2H),5.36(s,2H),4.66(d,J=6.6Hz,2H),4.33-4.21(m,4H),4.20-4.13(m,2H),3.76-3.74(m,2H),3.40(s,3H),3.40-3.38(m,1H),3.30-3.21(m,2H),3.04-2.95(m,2H),2.76(s,3H),2.74(s,3H),2.39-2.31(m,2H),2.00-1.74(m,6H),1.68-1.49(m,4H),1.37-1.27(m,2H),1.23-1.16(m,6H),0.89-0.82(m,9H)。

[2326] 实施例2.16:N-((10S,13S)-10-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-14-甲基-1,6,9,12-四氧代-3-氧杂-5,8,11-三氮杂十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-016)

[2327] 

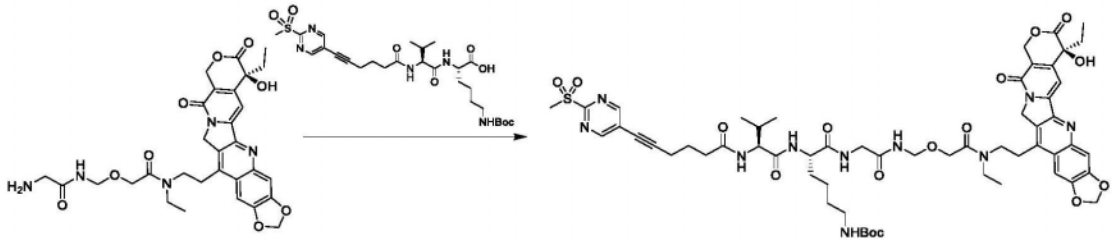
[2328] 将化合物N6,N6-二甲基-N2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)十六烷基-5-炔酰基)-L-丙酰基)-L-赖氨酸(C1.17,52.3mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(2mL),然后再依次加入HBTU(38mg,0.10mmol)和N,N-二异丙基乙胺(26mg,0.20mmol),加完后反应液室温搅拌30分钟,然后加入化合物2-氨基-N-((2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺(2.16A,根据CN104755494A中第147-148页报道的相同方法制备的,63mg),LCMS检测反应完成后,反应液直接经制备色谱(0.01%三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物N-((10S,13S)-10-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-1-(((1S,

9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-14-甲基-1,6,9,12-四氧代-3-氧杂-5,8,11-三氮杂十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(8.1mg,收率7%)。

[2329] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1085.5;

[2330] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.31(s,1H),9.11(s,2H),8.72(t,J=6.8Hz,1H),8.51(d,J=8.8Hz,1H),8.19(t,J=6.8Hz,1H),8.10(d,J=7.1Hz,1H),7.91(d,J=8.6Hz,1H),7.79(d,J=10.9Hz,1H),7.32(s,1H),6.53(s,1H),5.63-5.54(m,1H),5.42(s,2H),5.20(s,2H),4.68-4.58(m,2H),4.26-4.12(m,2H),4.01(s,2H),3.73(d,J=5.4Hz,2H),3.20-3.10(m,2H),3.05-2.95(m,2H),2.76(d,J=4.7Hz,6H),2.55-2.53(m,2H),2.42-2.28(m,6H),2.21-2.13(m,2H),2.02-1.77(m,6H),1.76-1.62(m,2H),1.62-1.51(m,3H),1.37-1.21(m,2H),0.90-0.80(m,9H)。

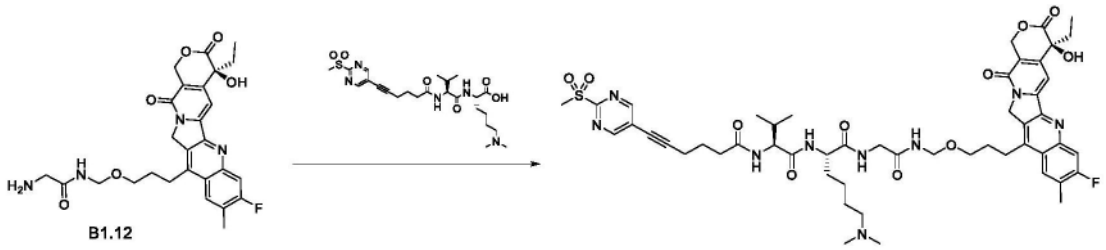
[2331] 实施例2.17:叔丁基((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)-4,9,12-三氧代-6-氧杂-3,8,11-三氮杂十七烷-17-基)氨基甲酸酯(DL-017)

[2332] 

[2333] 将化合物C1.7(90.0mg),二异丙基乙胺(68.0mg)和HATU(100mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中。随后加入化合物B1.2(80mg),室温下反应2小时。LCMS检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯(50mL),用饱和食盐水(30mL X 3)洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,滤液减压浓缩成固体,粗产品经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%甲酸)得到黄色固体化合物叔丁基((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)-4,9,12-三氧代-6-氧杂-3,8,11-三氮杂十七烷-17-基)氨基甲酸酯(2.06mg,收率10.6%)。

[2334] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1184.9。

[2335] 实施例2.18:N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-018)

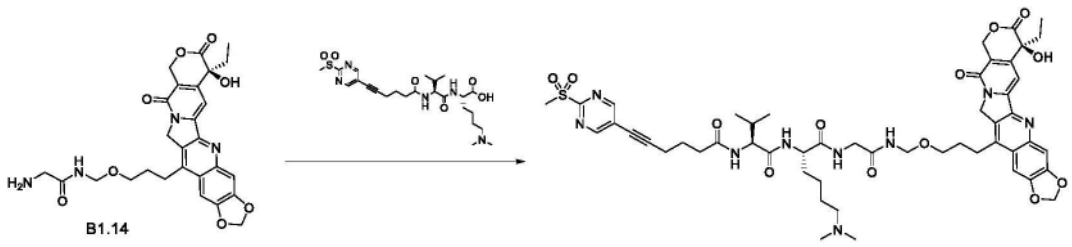
[2336] 

[2337] 将化合物N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(126mg)(C1.17),B1.12(150mg),1-羟基苯并三唑(49mg),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(69mg)和二异丙基乙胺(156mg,1.21mmol)溶在N,N-二甲基甲酰胺(10mL)溶液中,反应在40℃下搅拌12小时。LCMS显示反应完成。反应液过滤经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05%甲酸)得到黄色固体化合物N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-018)(12mg,收率6.0%)。

[2338] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1030.6;

[2339] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),8.62(t,J=6.4Hz,1H),8.23-8.13(m,2H),8.07(d,J=7.2Hz,1H),7.95-7.83(m,2H),7.31(s,1H),6.53(s,1H),5.44(s,2H),5.29(s,2H),4.64-4.53(m,2H),4.28-4.20(m,1H),4.19-4.11(m,1H),3.76-3.69(m,2H),3.50(t,J=5.7Hz,2H),3.41(s,3H),3.23-3.19(m,2H),2.67-2.62(m,2H),2.57-2.54(m,2H),2.54(s,3H),2.42-2.26(m,3H),2.02-1.77(m,6H),1.68-1.66(m,1H),1.58-1.45(m,3H),1.36-1.25(m,2H),0.88(t,J=7.4Hz,3H),0.82(t,J=6.3Hz,6H)。

[2340] 实施例2.19:N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-019)

[2341] 

[2342] 将化合物B1.14(100mg,0.186mmol),化合物N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(100mg,0.191mmol)溶于DMF(2mL)。然后再加入1-羟基苯并三唑(38mg,0.280mmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(53mg,0.280mmol),然后再加入三乙胺(56mg,0.559mmol)加完后反应液室温搅拌16小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺

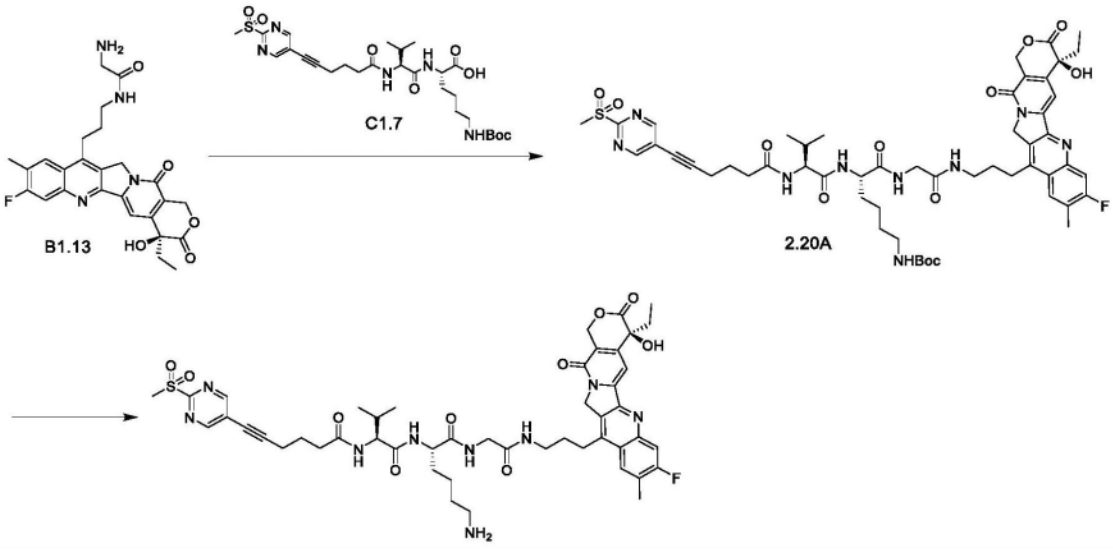
酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(20mg,收率10%)为黄色固体。

[2343] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1042.5;

[2344] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.28(s,1H,TFA),9.10(s,2H),8.64(br s,1H),8.19(br s,1H),8.09(d,J=6.4Hz,1H),7.92(d,J=7.8Hz,1H),7.59(s,1H),7.51(s,1H),7.24(s,1H),6.50(s,1H),6.29(s,2H),5.43(s,2H),5.24(s,2H),4.67-4.52(m,2H),4.30-4.10(m,2H),3.74(br s,2H),3.50(br s,2H),3.41(s,3H),3.17-3.07(m,2H),3.04-2.91(m,2H),2.75(s,6H),2.46-2.24(m,3H),2.04-1.66(m,9H),1.63-1.46(m,3H),1.32-1.29(m,2H),0.87-0.82(m,9H)。

[2345] 实施例2.20:N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-020)

[2346]



[2347] 步骤一:

[2348] 向化合物B1.13(75mg)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(3mL)中依次加入化合物C1.7(107mg),三乙胺(45mg),HOBT(25mg)和EDCI(35mg),在35℃下反应4小时。向反应液中加入水(30mL),乙酸乙酯(30mL×2)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,浓缩得到目标化合物2.20A(76mg)。

[2349] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:1072.5;

[2350] 步骤二:

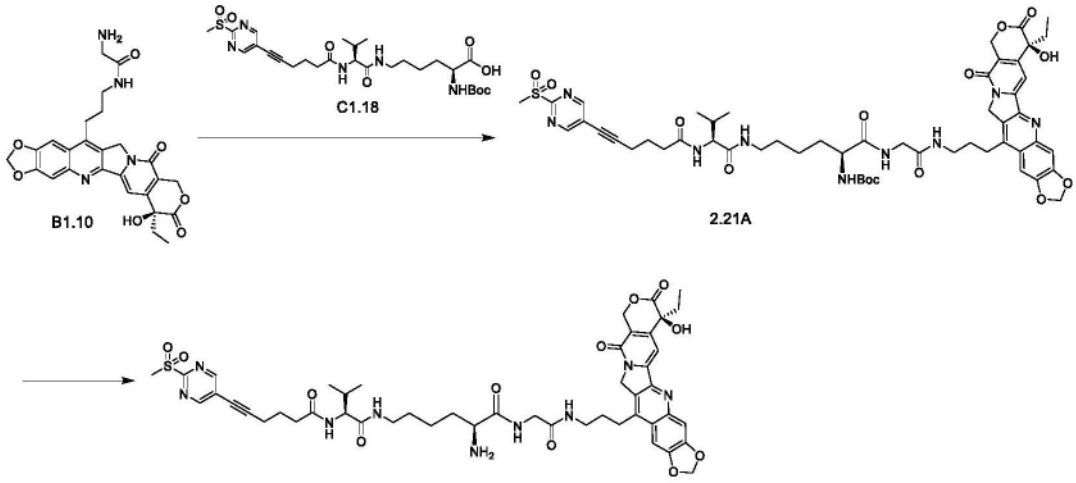
[2351] 向化合物2.20A(60mg,0.06mmol)的二氯甲烷溶液(2mL)中,加入三氟乙酸(1mL),在室温下搅拌反应1小时。LCMS显示反应完全。将反应液浓缩,经制备色谱(0.01% TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(43mg,收率80%)为黄色固体。

[2352] LCMS(ESI)[M+H]$^+$:972.9;

[2353] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.09(s,2H),8.24-8.17(m,2H),8.12(d,J=7.0Hz,

1H),7.99-7.93(m,1H),7.88-7.84(m,2H),7.64(s,3H,NH2-TFA),7.31(s,1H),6.52(s,1H),5.44(s,2H),5.30(s,2H),4.25-4.18(m,1H),4.15-4.11(m,1H),3.76-3.71(m,2H),3.41(s,3H),3.32-3.26(m,2H),3.21-3.17(m,1H),2.79-2.70(m,2H),2.52(s,3H),2.40-2.24(m,3H),1.94-1.82(m,7H),1.80-1.73(m,2H),1.58-1.49(m,3H),1.36-1.31(m,1H),1.18-1.14(m,1H),0.87(t,J=7.4Hz,3H),0.80-0.76(m,6H)。

[2354] 实施例2.21:N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺

[2355] 

[2356] 步骤一:

[2357] 将化合物C1.18(430mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中,然后加入EDCI(160mg),HOBT(115mg)和三乙胺(214mg)。加完毕后反应液室温搅拌20分钟,然后加入化合物B1.10(314mg),室温搅拌反应3小时,LCMS检测反应完全,加水稀释,乙酸乙酯萃取,有机相浓缩的粗品2.21A(350mg)。

[2358] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:1084.3;

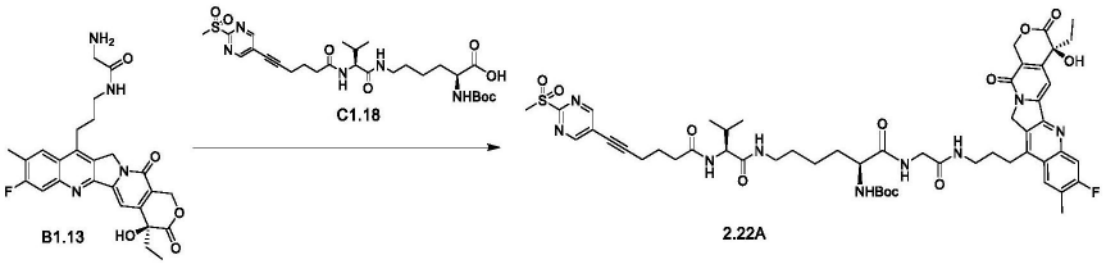
[2359] 步骤二:

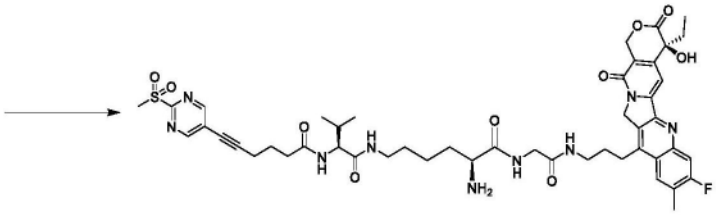
[2360] 向化合物2.21A(350mg)的二氯甲烷溶液(4mL)中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为1:2;4mL),在室温下搅拌反应1小时。将反应液浓缩,粗品经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%甲酸的水溶液)得到目标化合物N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(100mg)。

[2361] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:984.4;

[2362] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),8.69(t,J=6.1Hz,1H),8.14(t,J=5.4Hz,1H),8.08(s,3H,NH2-TFA),7.95(t,J=4.9Hz,1H),7.89(d,J=8.9Hz,1H),7.66(s,1H),7.51(s,1H),7.25(s,1H),6.48(s,1H),6.29(s,2H),5.42(s,2H),5.25(s,2H),4.09(t,J=8.1Hz,1H),3.83(d,J=5.7Hz,2H),3.40(s,3H),3.33-3.27(m,2H),3.15-3.06(m,3H),2.97-2.94(m,1H),2.57-2.53(m,2H),2.43-2.28(m,3H),1.95-1.68(m,9H),1.46-1.28(m,4H),0.88(t,J=7.3Hz,3H),0.82(d,J=6.7Hz,6H)。

[2363] 实施例2.22:N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代已基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)已-5-炔酰胺DL-022)

[2364] 



[2365] 步骤一:

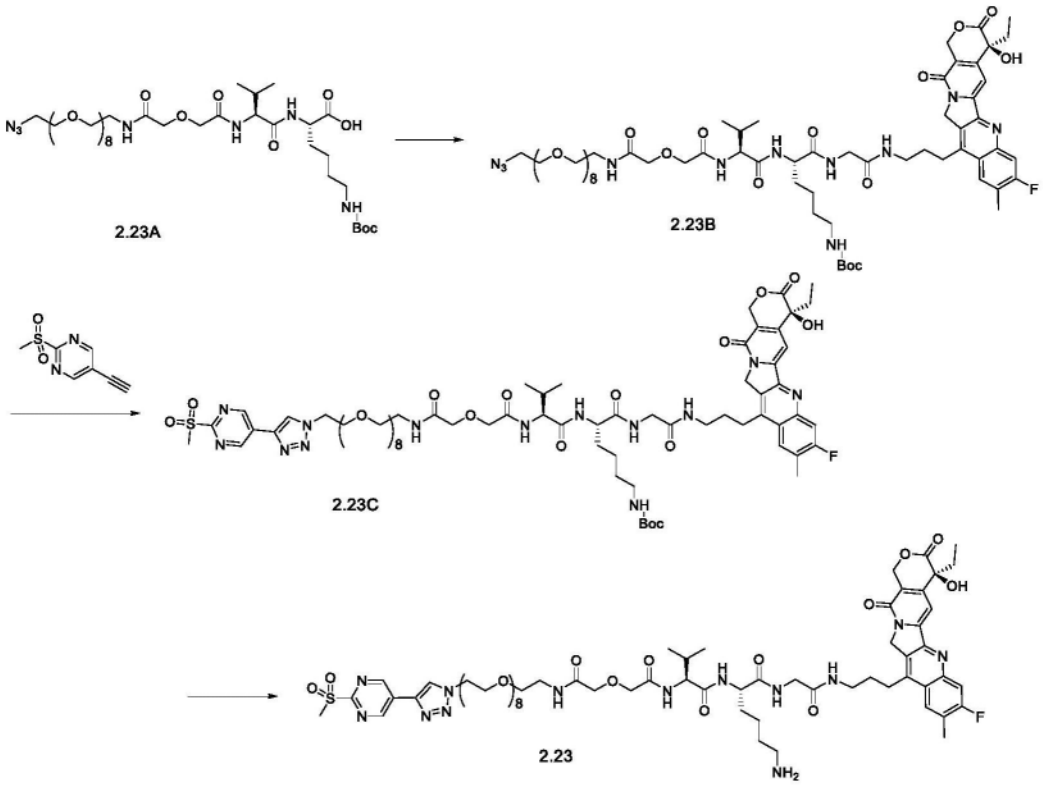
[2366] 将化合物C1.18(136mg,0.23mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中,然后加入EDCI(48mg,0.25mmol),HOBT(34mg,0.25mmol)和三乙胺(64mg,0.63mmol)。加完毕后反应液室温搅拌20分钟,然后加入化合物B1.13(3105mg,0.19mmol),室温搅拌反应3小时,LCMS检测反应完全,加水稀释,乙酸乙酯萃取,有机相浓缩的粗品。所得化合物溶于二氯甲烷(4mL)中,然后加入三氟乙酸(2mL),反应1小时后,浓缩,粗品经制备提纯得目标化合物N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代已基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)已-5-炔酰胺(DL-022)(88mg)。

[2367] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=972.9;

[2368] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),8.72(t,J=5.5Hz,1H),8.23(d,J=8.4Hz,1H),8.17(t,J=5.4Hz,1H),8.11(s,3H,NH2-TFA),7.97(t,J=5.6Hz,1H),7.93-7.86(m,2H),7.32(s,1H),6.53(s,1H),5.44(s,2H),5.29(s,2H),4.14-4.02(m,2H),3.85-3.83(m,2H),3.41(s,3H),3.32(d,J=6.2Hz,2H),3.24-3.16(m,2H),3.11-2.94(m,2H),2.55(s,3H),2.35-2.30(m,3H),1.92-1.69(m,10H),1.43-1.29(m,4H),0.88(t,J=7.3Hz,3H),0.82(d,J=6.7Hz,6H)。

[2369] 实施例2.23:(S)-6-氨基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)已酰胺(DL-023)

[2370]



[2371] 步骤一：

[2372] 向化合物B1.13(46mg)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(3mL)中依次加入化合物2.23A(100mg),三乙胺(50ul),HOBT(16mg)和EDCI(23mg),在35℃下反应4小时。向反应液中加入水(30mL),乙酸乙酯(30mL×2)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,浓缩得到目标化合物2.23B(105mg)。

[2373] LCMS(ESI)$[M+H]^+$:1358.4;

[2374] 步骤二：

[2375] 化合物2.23B(105mg),2-甲磺酰基-5-乙炔基嘧啶(45mg)溶于DMSO-水(2ml,4:1)中,向混合物中加入溴化亚铜(50mg)。反应液室温下搅拌2小时,然后加入乙酸乙酯(100ml),水洗(100ml x 3),干燥后减压除去有机溶剂,粗产物用硅胶柱层析分离得到目标产物2.23C(84m mg),MS(m/z):1540.8$[M+H]^+$;

[2376] 步骤三：

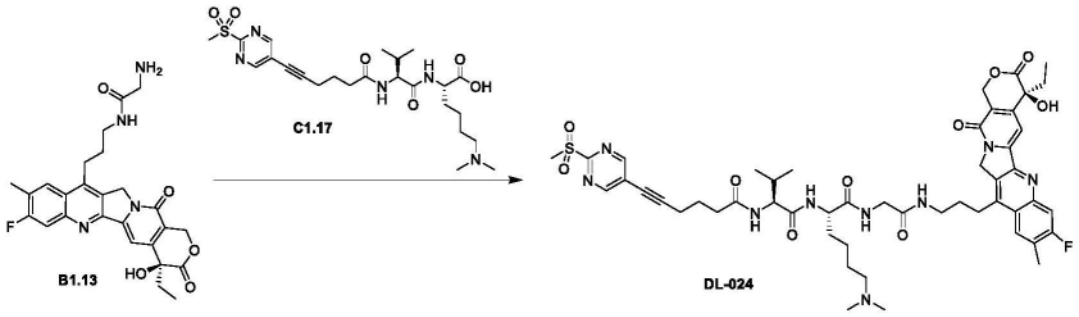
[2377] 将化合物2.23C溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为1:2;4mL)中,然后反应液在室温下搅拌30分钟。LCMS显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品,粗产品经制备色谱(0.01% TFA in water,MeCN)得到目标化合物(S)-6-氨基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)己酰胺(DL-023,8mg,三氟乙酸盐,收率5%)。

[2378] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1440.8;

[2379] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.49(s,2H),8.91(s,1H),8.24-8.18(m,3H),8.01(t,J=5.6Hz,1H),7.96(t,J=5.5Hz,1H),7.90-7.84(m,2H),7.63(s,3H,TFA salt),7.32(s,

1H),5.44(s,2H),5.30(s,2H),4.66(t,J＝5.1Hz,2H),4.21(dd,J＝15.2,7.9Hz,2H),3.97(s,2H),3.93(s,2H),3.89(t,J＝5.1Hz,2H),3.75-3.72(m,2H),3.56-3.54(m,2H),3.54-3.38(m,30H),3.33-3.13(m,5H),2.75(d,J＝7.1Hz,2H),2.52(s,3H),2.02-1.94(m,1H),1.91-1.81(m,3H),1.71-1.65(m,1H),1.58-1.46(m,3H),1.38-1.29(m,2H),0.88(t,J＝7.3Hz,3H),0.81-0.75(m,6H)。

[2380] 实施例2.24:N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-024)

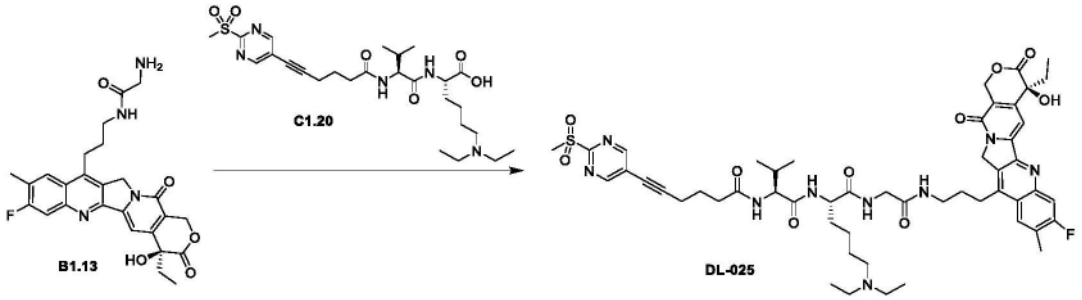
[2381] 

[2382] 向化合物B1.13(40mg,0.081mmol)和化合物C1.17(42mg,0.081mmol)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(2mL)溶解中依次加入PyBOP(41mg,0.081),DIPEA(20mg,0.16mmol),反应液在室温下搅拌2小时。LCMS显示反应完全。反应液经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%三氟乙酸的水溶液)得到化合物N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(11.54mg,收率14%)为黄色固体。

[2383] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝1000.6;

[2384] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.42(s,1H),9.08(s,2H),8.27-8.18(m,2H),8.14(d,J＝6.9Hz,1H),7.96(t,J＝6.9Hz,1H),7.91-7.77(m,2H),7.31(s,1H),5.44(s,2H),5.29(s,2H),4.15-4.12(m,1H),3.81-3.65(m,3H),3.41(s,3H),3.33-3.25(m,2H),3.22-3.15(m,2H),3.03-2.95(m,2H),2.77-2.71(m,6H),2.38-2.23(m,3H),1.92-1.81(m,7H),1.78-1.73(m,2H),1.62-1.56(m,3H),1.38-1.29(m,2H),0.92-0.84(m,3H),0.84-0.72(m,6H)。

[2385] 实施例2.25:N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-025)

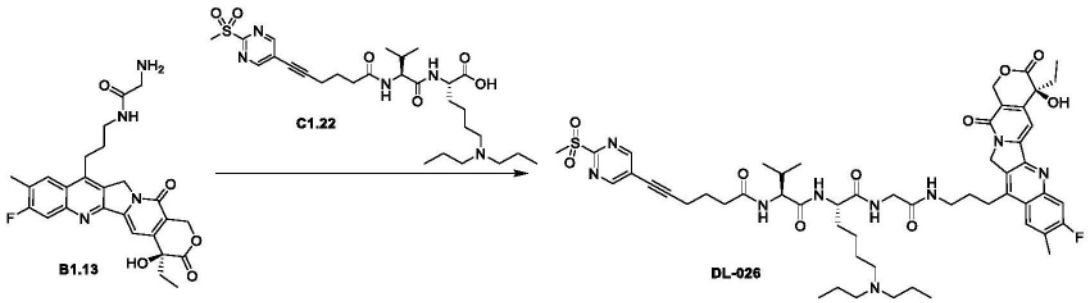
[2386] 

[2387] 将化合物C1.20(30mg,0.054mmol),化合物B1.13(27mg,0.054mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(2mL)。然后再依次加入HBTU(22mg,0.054mmol)以及N,N-二异丙基乙胺(17mg,0.135mmol,加完毕后反应液室温搅拌30分钟。LCMS检测反应完成后,反应液直接经制备色谱(0.01%三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(23mg,收率42%)为黄色固体。

[2388] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1028.5;

[2389] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.08(s,2H),9.02(s,1H),8.21(d,J=7.4Hz,2H),8.13(d,J=7.1Hz,1H),7.97(t,J=5.4Hz,1H),7.87(d,J=10.6Hz,2H),7.31(s,1H),6.52(s,1H),5.44(s,2H),5.30(s,2H),4.28-4.18(m,1H),4.14(t,J=7.7Hz,1H),3.80-3.65(m,2H),3.41(s,3H),3.31-3.24(m,2H),3.22-3.15(m,2H),3.12-3.06(m,4H),3.02-2.91(m,2H),2.36-2.23(m,2H),1.95-1.68(m,9H),1.68-1.49(m,4H),1.38-1.28(m,2H),1.13(t,J=7.2Hz,6H),0.86(t,J=7.2Hz,3H),0.79-0.76(m,6H)。

[2390] 实施例2.26:N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-026)

[2391] 

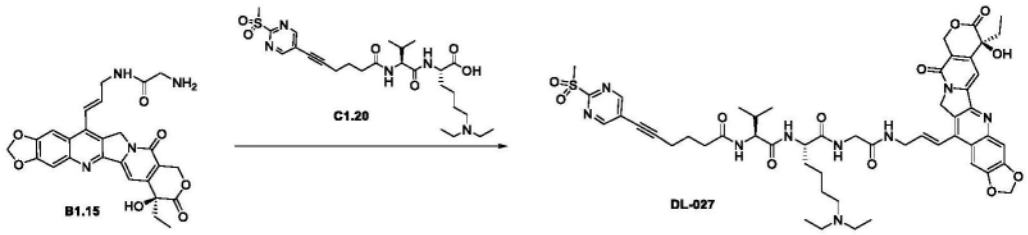
[2392] 将化合物C1.22(31mg,0.054mmol,化合物B1.13(27mg,0.054mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(2mL)。然后再依次加入HBTU(22mg,0.054mmol)以及N,N-二异丙基乙胺(17mg,0.135mmol,反应液室温搅拌30分钟。LCMS检测反应完成后,反应液直接经制备色谱(0.01%三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(25mg,收率45%)

为黄色固体。

[2393] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1056.6;

[2394] H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.09(s,2H),8.27-8.19(m,2H),8.13(d,J=7.3Hz,1H),7.97(t,J=5.3Hz,1H),7.91-7.84(m,2H),7.31(s,1H),6.53(s,1H),5.44(s,2H),5.29(s,2H),4.24(d,J=6.7Hz,1H),4.13(t,J=7.8Hz,1H),3.73(dd,J=14.7,5.9Hz,2H),3.41(s,3H),3.28(d,J=6.4Hz,2H),3.19(t,J=7.6Hz,2H),2.99(br,6H),2.33-2.27(m,2H),1.95-1.70(m,9H),1.62-1.57(m,8H),1.33-1.30(m,2H),0.96-0.82(m,9H),0.82-0.73(m,6H)。

[2395] 实施例2.27:N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺

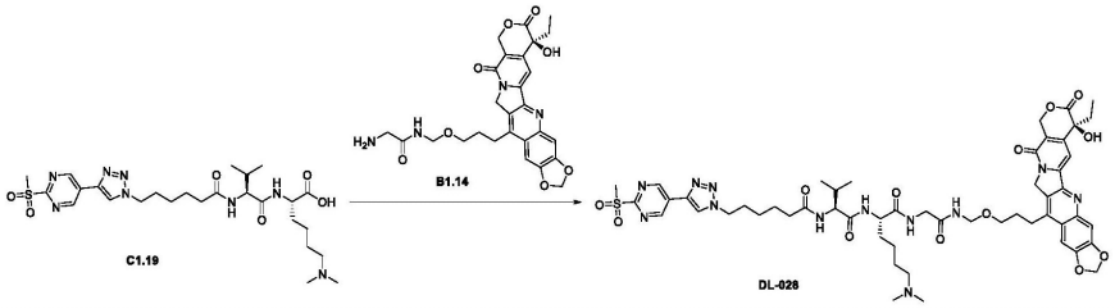
[2396] 

[2397] 向化合物B1.15(40mg,0.074mmol)和化合物C1.20(40mg,0.072mmol)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(4mL)溶解中依次加入HBTU(30mg,0.079mmol)、DIPEA(26mg,0.2mmol)。反应液室温下反应1小时。LCMS显示反应完全。反应液经高效液相制备纯化(乙腈/0.05%三氟乙酸水溶液)得到化合物N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(11.1mg,收率14%)。

[2398] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1038.6;

[2399] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),9.02(s,1H,TFA),8.33-8.25(m,2H),8.12(d,J=7.3Hz,1H),7.92(d,J=8.4Hz,1H),7.68(d,J=4.1Hz,1H),7.52(d,J=2.8Hz,1H),7.26(s,1H),7.15(d,J=16.2Hz,1H),6.52-6.50(m,2H),6.30(s,2H),5.43(s,2H),5.28-5.24(m,2H),4.27(d,J=6.2Hz,2H),4.12(br s,2H),3.81(br s,2H),3.41(s,3H),3.11-3.07(m,6H),2.97(br s,2H),2.53-2.50(m,1H),2.39-2.24(m,4H),1.85-1.79(m,8H),1.16(t,J=6.4Hz,6H),0.88(t,J=6.4Hz,3H),0.78(d,J=6.4Hz,6H)。

[2400] 实施例2.28:(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

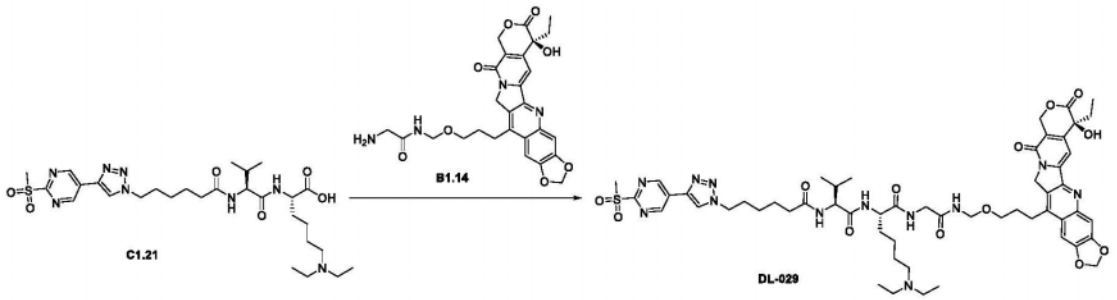
[2401] 

[2402] 将化合物C1.19(40mg,0.06mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(1.5mL),依次加入HBTU(26mg,0.06mmol)、B1.14(36mg,0.06mmol)和DIPEA(66mg,0.17mmol,室温搅拌反应1小时。LCMS检测反应完成,反应液通过制备(乙腈/0.05%三氟乙酸水溶液)分离纯化得到目标化合物(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(13.88mg,TFA salt收率16%)为米黄色固体。

[2403] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1113.7;

[2404] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.46(s,2H),9.29(s,1H,TFA salt),8.92(s,1H),8.63(t,J=6.6Hz,1H),8.18(br s,1H),8.03(d,J=7.6Hz,1H),7.81(d,J=8.3Hz,1H),7.59(s,1H),7.50(s,1H),7.24(s,1H),6.48(s,1H),6.28(s,2H),5.42(s,2H),5.24(s,2H),4.64-4.55(m,2H),4.46(t,J=7.0Hz,2H),4.28-4.20(m,1H),4.15-4.09(m,1H),3.76-3.71(m,4H),3.53-3.48(m,4H),3.44(s,3H),3.10-3.08(m,2H),2.97-2.95(m,2H),2.75(d,J=4.9Hz,6H),2.20-2.09(m,2H),1.92-1.83(m,5H),1.68-1.65(m,1H),1.63-1.50(m,5H),0.90-0.74(m,9H)。

[2405] 实施例2.29:(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺



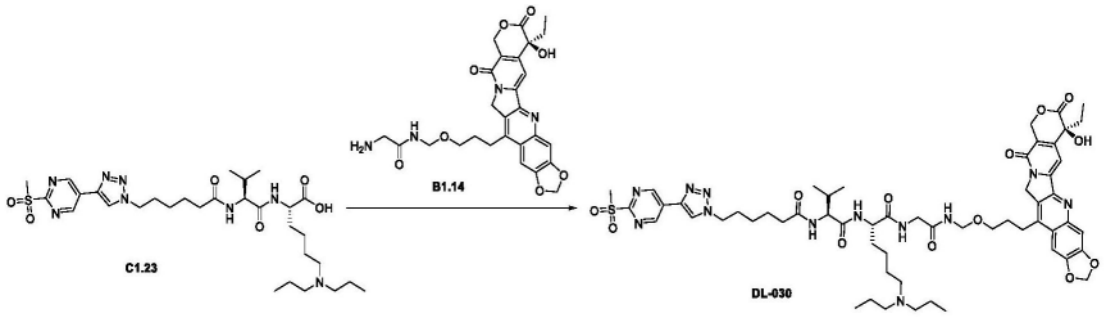
[2406] 将化合物C1.21(58mg,0.09mmol),化合物B1.14(50mg,0.09mmol)溶于DMF(1mL),然后再加入HBTU(35mg,0.09mmol)和N,N-二异丙基乙胺(30mg,0.23mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFAin water,MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]

喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(14mg,收率13%)为黄色固体。

[2407] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1141.7;

[2408] 1H NMR(400MHz,DMSO)δ9.46(s,2H),8.98(s,1H,TFA),8.93(s,1H),8.64(t,J=6.5Hz,1H),8.18(d,J=5.7Hz,1H),8.03(d,J=7.4Hz,1H),7.81(d,J=8.5Hz,1H),7.58(s,1H),7.50(d,J=3.1Hz,1H),7.24(s,1H),6.52(s,1H),6.28(s,2H),5.42(s,2H),5.23(s,2H),4.62-4.55(m,2H),4.46(t,J=6.9Hz,2H),4.27-4.23(m,1H),4.11-4.09(m,1H),3.74(d,J=5.8Hz,2H),3.49(t,J=5.8Hz,2H),3.44(s,3H),3.13-3.06(m,6H),3.01-2.93(m,2H),2.22-2.07(m,2H),1.91-1.83(m,6H),1.70-1.51(m,5H),1.33-1.21(m,6H),1.16(t,J=7.2Hz,6H),0.87(t,J=7.4Hz,3H),0.82-0.76(m,6H)。

[2409] 实施例2.30:(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

[2410] 

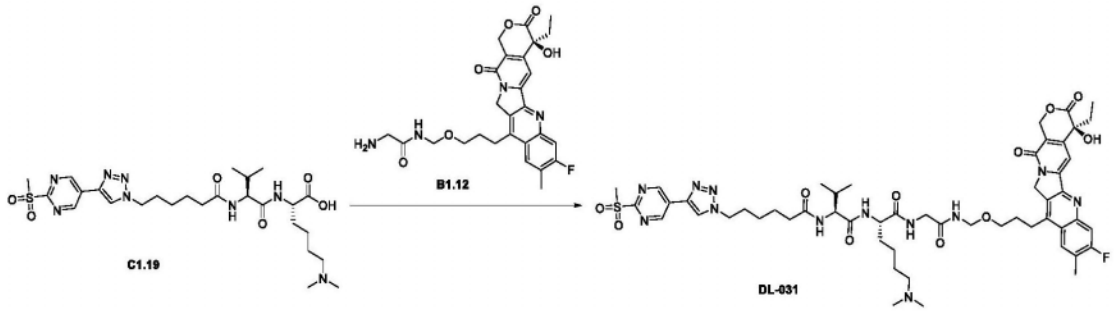
[2411] 将化合物C1.23(61mg,0.09mmol),化合物B1.14(50mg,0.09mmol)溶于DMF(1mL),然后再加入HBTU(35mg,0.09mmol)和N,N-二异丙基乙胺(30mg,0.23mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液浓缩得粗产品,粗产品经制备色谱(0.01%TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(21mg,收率19%)为黄色固体。

[2412] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1169.8;

[2413] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.46(s,2H),9.01(s,1H,TFA),8.93(s,1H),8.64(t,J=6.4Hz,1H),8.19(t,J=5.4Hz,1H),8.02(d,J=7.3Hz,1H),7.81(d,J=8.3Hz,1H),7.58(s,1H),7.51(s,1H),7.24(s,1H),6.50(s,1H),6.28(s,2H),5.42(s,2H),5.23(s,2H),4.60-4.58(m,2H),4.46(t,J=6.9Hz,2H),4.24(d,J=6.0Hz,1H),4.13-4.09(m,1H),3.74(d,J=5.7Hz,2H),3.49(t,J=5.8Hz,2H),3.44(s,3H),3.10(br s,2H),3.02-2.95(m,6H),2.19-2.15(m,2H),1.88-1.86(m,6H),1.71-1.69(m,1H),1.61-1.56(m,8H),1.28-1.26(m,6H),0.88-0.83(m,9H),0.81-0.78(m,6H)。

[2414] 实施例2.31:(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲

基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

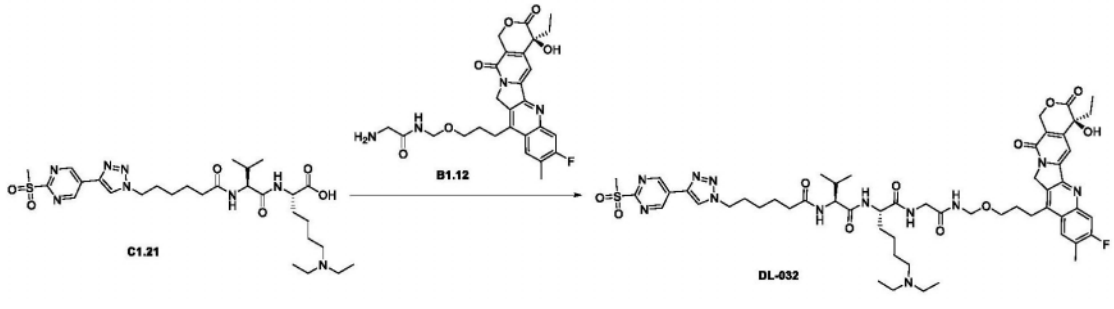
[2415] 

[2416] 将化合物C1.19(113mg,0.19mmol),化合物B1.12(100mg,0.19mmol)溶于DMF(1mL),然后加入HBTU(72mg,0.19mmol)和N,N-二异丙基乙胺(61mg,0.48mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFA的水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(16mg,收率8%)为白色固体。

[2417] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1101.6;

[2418] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.46(s,2H),8.93(s,1H),8.63(t,J=6.3Hz,1H),8.20-8.28(m,2H),8.04(d,J=7.2Hz,1H),7.88(d,J=10.8Hz,1H),7.81(d,J=8.3Hz,1H),7.31(s,1H),6.53(s,1H),5.44(s,2H),5.29(s,2H),4.63-4.54(m,2H),4.46(t,J=7.0Hz,2H),4.29-4.19(m,1H),4.15-4.08(m,1H),3.73(d,J=6.9Hz,2H),3.50(t,J=5.8Hz,2H),3.44(s,3H),3.24-3.14(m,2H),3.01-2.91(m,2H),2.72(s,6H),2.53(s,3H),2.23-2.07(m,2H),1.93-1.84(m,6H),1.72-1.64(m,1H),1.61-1.45(m,6H),1.34-1.22(m,4H),0.87(t,J=7.4Hz,3H),0.82-0.76(m,6H)。

[2419] 实施例2.32:(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

[2420] 

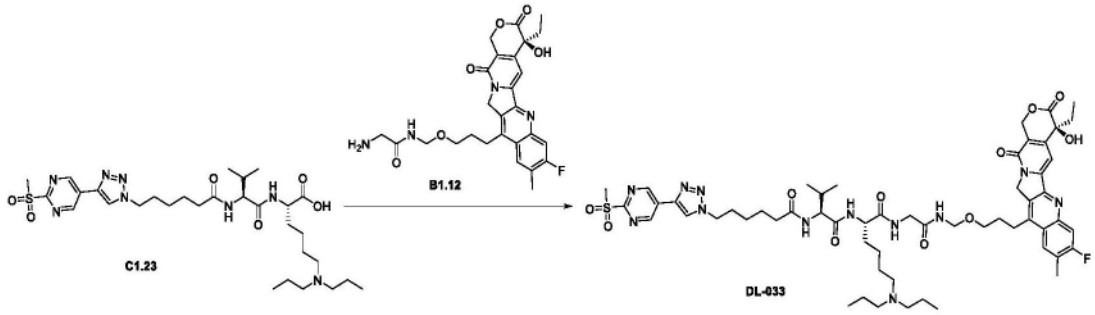
[2421] 将化合物C1.21(59mg,0.10mmol),化合物B1.12(50mg,0.10mmol),溶于DMF(1mL),然后再加入HBTU(36mg,0.10mmol)和N,N-二异丙基乙胺(31mg,0.24mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01%甲酸溶液,乙腈)纯化得

到目标化合物(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(33.8mg,收率32%)为白色固体。

[2422] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1129.7;

[2423] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.46(s,2H),8.93(s,1H),8.61(t,J=6.4Hz,1H),8.29(s,1H),8.24-8.15(m,2H),8.00(d,J=7.2Hz,1H),7.85(d,J=10.5Hz,2H),7.31(s,1H),5.44(s,2H),5.26(s,2H),4.63-4.55(m,2H),4.46(t,J=6.8Hz,2H),4.23-4.18(m,1H),4.11(d,J=7.9Hz,1H),3.77-3.69(m,2H),3.50(t,J=5.9Hz,2H),3.44(s,3H),3.17-3.15(m,3H),2.61(q,J=6.7Hz,4H),2.22-2.10(m,2H),1.92-1.84(m,6H),1.68(d,J=6.7Hz,1H),1.57-1.48(m,3H),1.39(d,J=5.9Hz,2H),1.30-1.22(m,4H),0.97(t,J=6.9Hz,6H),0.88(t,J=7.3Hz,3H),0.82-0.77(m,6H)。

[2424] 实施例2.33:(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

[2425] 

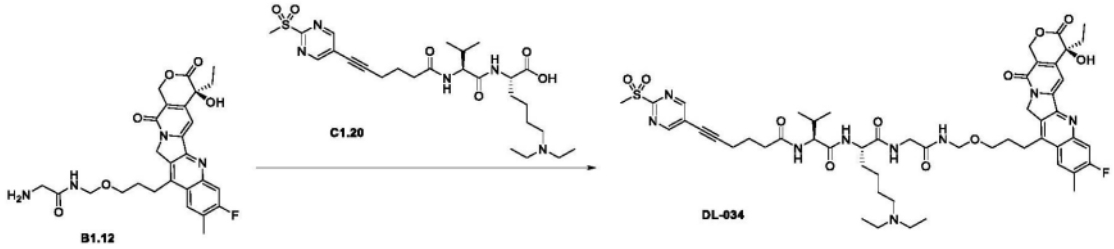
[2426] 将化合物C1.23(62mg,0.10mmol),化合物B1.12(50mg,0.10mmol)溶于DMF(1mL),然后加入HBTU(36mg,0.10mmol)和N,N-二异丙基乙胺(31mg,0.24mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFAin water,MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(35.2mg,收率32%)为黄色固体。

[2427] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1157.8;

[2428] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.46(s,2H),9.05(s,1H,TFA),8.93(s,1H),8.64(t,J=6.7Hz,1H),8.20(d,J=7.4Hz,2H),8.03(d,J=7.2Hz,1H),7.88(d,J=10.8Hz,1H),7.81(d,J=8.4Hz,1H),7.32(s,1H),6.54(s,1H),5.44(s,2H),5.28(s,2H),4.62-4.55(m,2H),4.46(t,J=7.0Hz,2H),4.24(m,1H),4.13-4.07(m,1H),3.74(m,2H),3.50(m,2H),3.44(s,3H),3.23-3.16(m,2H),3.01-2.95(m,6H),2.50(s,3H),2.22-2.09(m,2H),1.95-1.84(m,8H),1.67-1.56(m,9H),1.33-1.23(m,6H),0.91-0.86(m,9H),0.82-0.77(m,6H)。

[2429] 实施例2.34:N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹

啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-034)

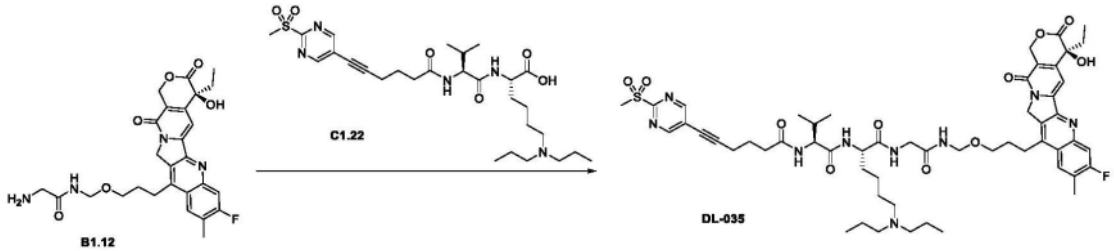
[2430] 

[2431] 将化合物(S)-2-氨基-N-((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙酰胺(B1.12,30mg,0.057mmol),N6,N6-二乙基-N2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)十六烷基-5-炔酰基)-L-丙酰基)-L-赖氨酸(C1.20,31mg,0.057mmol)溶于DMF(1mL)中。然后依次加入HBTU(22mg,0.057mmol)以及N,N-二异丙基乙胺(18mg,0.143mmol),加完毕后反应液室温搅拌一小时。LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01%的三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物三氟乙酸盐N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(3.18mg,收率5%)为黄色固体。

[2432] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1058.7;

[2433] 1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),8.65(t,J=6.5Hz,1H),8.21-8.19(m,2H),8.09(d,J=7.3Hz,1H),7.92(d,J=8.6Hz,1H),7.88(d,J=10.8Hz,1H),7.32(s,1H),6.53(s,1H),5.44(s,2H),5.28(s,2H),4.64-4.56(m,2H),4.29-4.22(m,1H),4.15(t,J=7.4Hz,1H),3.74(d,J=4.6Hz,2H),3.51-3.49(m,2H),3.24-3.18(m,2H),3.13-3.07(m,4H),3.01-2.95(m,2H),2.55(s,3H),2.40-2.31(m,3H),1.99-1.74(m,8H),1.65-1.49(m,4H),1.38-1.25(m,2H),1.16(t,J=7.2Hz,6H),0.89-0.79(m,9H)。

[2434] 实施例2.35:N-((11S,14S)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-035)

[2435] 

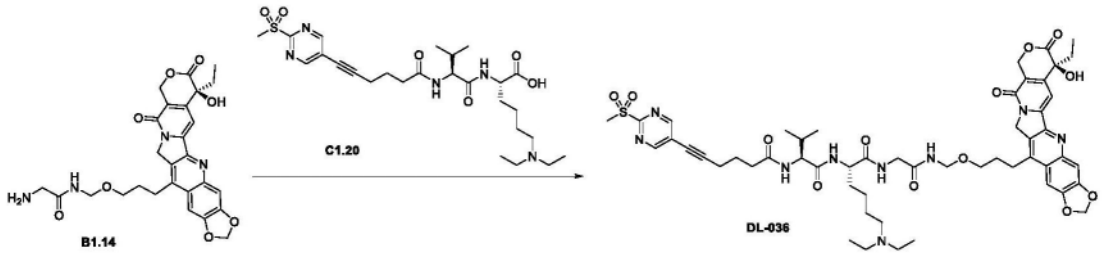
[2436] 将化合物(S)-2-氨基-N-((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙酰胺(B1.12,30mg,0.057mmol),N2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-丙酰基)-N6,N6-二丙基-L-赖氨酸(C1.22,33mg,0.057mmol)溶于DMF(1mL)中。然后再依次加入HBTU(22mg,0.057mmol)以及N,N-二异丙基乙胺(18mg,0.143mmol),加完毕后反应液室温搅拌一

小时。LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01%的三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物N-((11S,14S)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-035)(10.65mg,收率16%)为黄色固体。

[2437] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1086.7;

[2438] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),8.65(t,J=6.2Hz,1H),8.28-8.16(m,2H),8.08(d,J=6.8Hz,1H),7.92(d,J=8.1Hz,1H),7.88(d,J=10.9Hz,1H),7.32(s,1H),6.53(s,1H),5.44(s,2H),5.29(s,2H),4.63-4.52(m,2H),4.31-4.19(m,1H),4.19-4.08(m,1H),3.74(d,J=4.9Hz,2H),3.50(t,J=5.2Hz,2H),3.41(s,3H),3.24-3.18(m,2H),3.03-2.94(m,6H),2.55(s,3H),2.46-2.24(m,3H),2.05-1.67(m,8H),1.66-1.51(m,8H),1.36-1.22(m,4H),0.91-0.80(m,15H)。

[2439] 实施例2.36:N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-036)

[2440] 

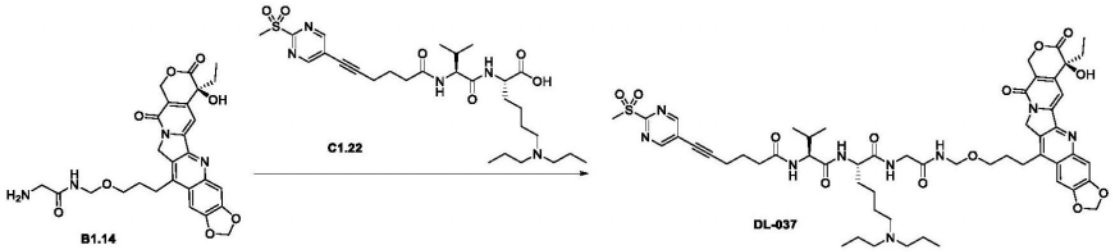
[2441] 将化合物C1.20(40mg,0.075mmol),化合物B1.14(41mg,0.075mmol)溶于DMF(1mL),然后再加入HOBt(15.2mg,0.113mmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(21.5mg,0.113mmol),然后再加入三乙胺(23mg,0.225mmol)加完后反应液室温搅拌16小时,LCMS检测反应完成后,将反应液浓缩得粗产品,粗产品经制备色谱(0.01% TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(16mg,收率20%)为黄色固体。

[2442] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1070.6;

[2443] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.13-9.08(m,2H),9.01(s,1H),8.64(t,J=6.5Hz,1H),8.20(t,J=5.7Hz,1H),8.09(d,J=7.4Hz,1H),7.92(d,J=8.4Hz,1H),7.59(s,1H),7.51(s,1H),7.24(s,1H),6.50(s,1H),6.29(s,2H),5.43(s,2H),5.24(s,2H),4.65-4.53(m,2H),4.26(d,J=6.5Hz,1H),4.20-4.10(m,1H),3.74(d,J=5.5Hz,2H),3.50(t,J=5.8Hz,2H),3.41(s,3H),3.14-3.07(m,6H),2.98(s,2H),2.55(d,J=7.3Hz,2H),2.41-2.29(m,2H),2.03-1.89(m,2H),1.89-1.77(m,7H),1.61-1.56(m,2H),1.32(s,2H),1.16(t,J=7.2Hz,6H),0.91-0.78(m,9H)。

[2444] 实施例2.37:N-((11S,14S)-11-(4-(二正丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟

基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-037)

[2445] 

[2446] 将化合物C1.22(43mg,0.074mmol),化合物B1.14(40mg,0.075mmol),溶于N,N-二甲基甲酰胺(1mL),然后依次加入HBTU(28mg,0.075mmol),N,N-二异丙基乙胺(24mg,0.187mmol),反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,反应液直接经制备色谱(0.01%三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物的三氟乙酸盐(8.5mg,收率10%)为黄色固体。

[2447] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1098.6;

[2448] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),9.03(s,1H),8.64(t,J=6.4Hz,1H),8.19(t,J=5.9Hz,1H),8.08(d,J=7.4Hz,1H),7.92(d,J=8.5Hz,1H),7.59(s,1H),7.51(s,1H),7.24(s,1H),6.49(s,1H),6.29(s,2H),5.42(s,2H),5.24(s,2H),4.66-4.52(m,2H),4.31-4.21(m,1H),4.19-4.10(m,1H),3.74(d,J=5.5Hz,2H),3.49-3.48(m,2H),3.40(s,3H),3.15-3.06(m,2H),3.02-2.95(m,6H),2.59-2.52(m,3H),2.41-2.29(m,2H),2.05-1.90(m,2H),1.91-1.77(m,6H),1.63-1.57(m,6H),1.31-1.29(m,2H),0.92-0.80(m,15H).

[2449] 采用本实施例中同样的操作,反应液直接经制备色谱(0.1%甲酸水溶液,乙腈)纯化,冻干,得到目标化合物的甲酸盐(32.6mg,收率39%),为白色固体。

[2450] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1098.6;

[2451] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ9.09(s,2H),8.56(t,J=6.5Hz,1H),8.17(s,1H),8.14(t,J=5.7Hz,1H),7.97(d,J=7.3Hz,1H),7.89(d,J=8.6Hz,1H),7.58(s,1H),7.50(s,1H),7.24(s,1H),6.45(s,1H),6.28(s,2H),5.48-5.35(m,2H),5.24(s,2H),4.64-4.54(m,2H),4.23-4.07(m,2H),3.79-3.66(m,2H),3.50(t,J=5.9Hz,2H),3.40(s,3H),3.14-3.08(t,J=8.2Hz,2H),2.59-2.52(m,2H),2.36-2.27(m,8H),2.00-1.76(m,7H),1.72-1.62(m,1H),1.58-1.48(m,1H),1.40-1.20(m,8H),0.88-0.77(m,15H).

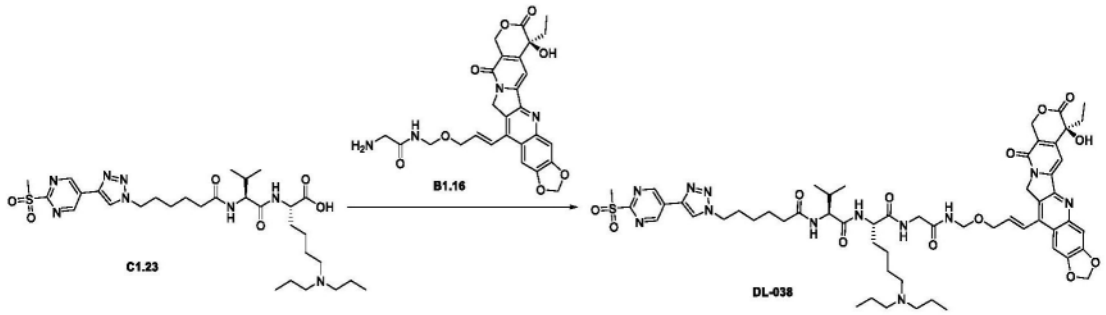
[2452] 取DL-037甲酸盐(16mg),通过制备HPLC纯化(0.1%碳酸氢铵水,乙腈),冻干,得游离态的目标化合物(DL-037,10mg,收率65%),为白色固体。

[2453] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1098.6;

[2454] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.10(s,2H),8.61(t,J=6.4Hz,1H),8.21(t,J=5.6Hz,1H),8.04(d,J=7.2Hz,1H),7.95(d,J=8.5Hz,1H),7.53(s,1H),7.48(s,1H),7.22(s,1H),6.50(s,1H),6.26(s,2H),5.48-5.35(m,2H),5.16(s,2H),4.63-4.51(m,2H),4.25-4.10(m,2H),3.82-3.63(m,2H),3.49(t,J=5.8Hz,2H),3.40(s,3H),3.06(t,J=8.0Hz,2H),2.56-2.51(m,2H),2.41-2.23(m,8H),1.96-1.76(m,7H),1.71-1.57(m,1H),1.57-1.48(m,1H),1.37-1.21(m,8H),0.88-0.78(m,15H).

[2455] 实施例2.38:(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-

二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

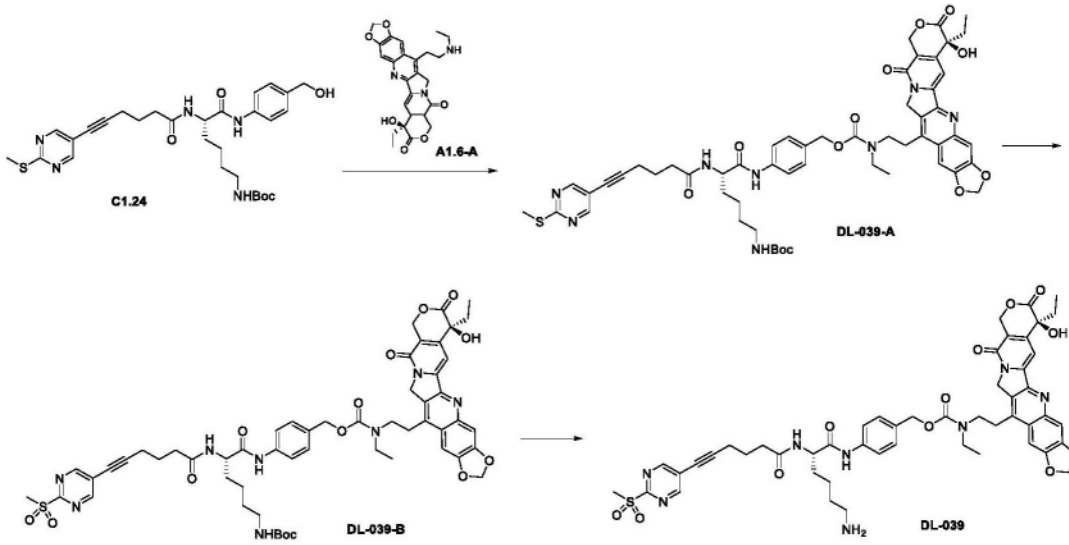
[2456] 

[2457] 将化合物B1.16(30mg,0.06mmol),化合物C1.23(37mg,0.06mmol)溶于DMF(1mL)。然后再加入HBTU(21mg,0.06mmol)和N,N-二异丙基乙胺(16mg,0.12mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(4mg,收率6%)为黄色固体。

[2458] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1167.6;

[2459] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.45(s,2H),8.98(s,1H,TFA),8.92(s,1H),8.74(t,J=6.8Hz,1H),8.25(t,J=5.8Hz,1H),8.05(d,J=7.3Hz,1H),7.82(d,J=8.4Hz,1H),7.63(s,1H),7.53(s,1H),7.26(d,J=12.0Hz,1H),7.26(s,1H),6.58-6.52(m,1H),6.50(s,1H),6.30(s,2H),5.42(s,2H),5.31(s,2H),4.74-4.67(m,2H),4.46(m,2H),4.30(m,1H),4.10(m,1H),3.77(m,2H),3.44(s,3H),3.01-2.95(m,8H),2.23-2.18(m,1H),2.13(m,1H),2.00(m,2H),1.90-1.84(m,6H),1.63-1.57(m,9H),0.88(m,9H),0.81-0.78(m,6H)。

[2460] 实施例2.39:4-((S)-6-氨基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺)己酰胺基)苄基N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯

[2461] 

[2462] 步骤一：

[2463] 在0℃冰浴条件下，向C1.24(150mg，0.264mmol)和三乙胺(89mg，0.88mmol)的二氯甲烷(10mL)溶液中加入N，N-琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC，90mg，0.352mmol)，反应在0℃氮气下反应30分钟，随后滴加化合物A1.6-A(82mg，0.176mmol)，反应在室温下反应12小时。LCMS监测反应完全。反应液减压浓缩成粗产品，经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05％甲酸)得到黄色油状化合物DL-039-A(27mg，收率：14.4％)为黄色油状物。

[2464] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝1059.2；

[2465] 步骤二：

[2466] 向化合物DL-039-A(60mg，0.057mmol)的四氢呋喃(5mL)和水(1mL)的混合溶液中加入过氧单磺酸钾(Oxone，349mg，0.567mmol)，反应在室温下搅拌12小时。TLC检测反应完全。向反应液中加入水(10mL)，用二氯甲烷(10mL X 3)萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到目标化合物DL-039-B(60mg，粗品)为黄色固体。

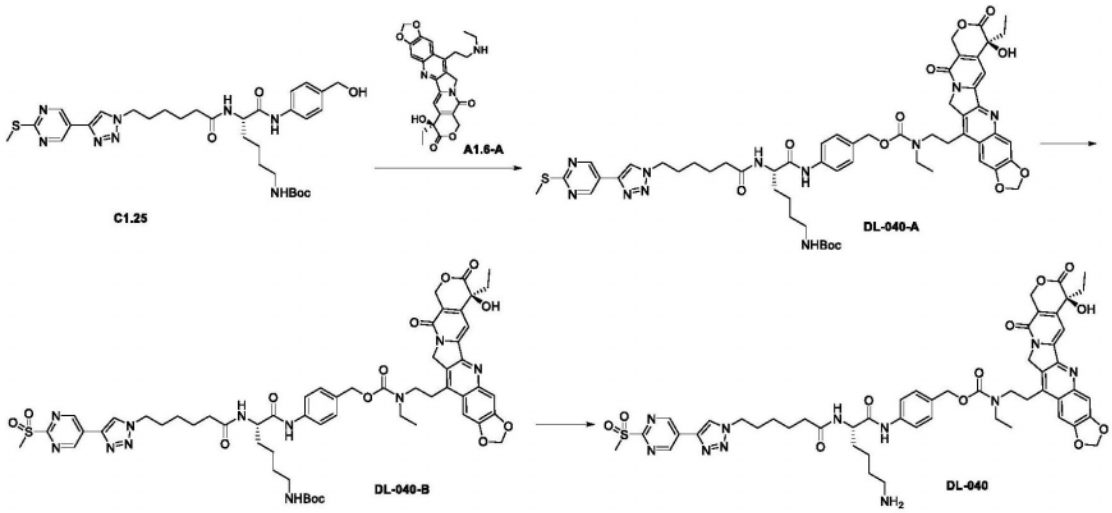
[2467] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝1091.0；

[2468] 步骤三：

[2469] 将化合物DL-039-B(60mg，0.055mmol)溶在二氯甲烷(1mL)溶液中，0℃下向反应液中加入二氯乙酸(1mL)，反应在室温下搅拌3小时。LCMS显示反应完成。滤液减压浓缩成粗产品，经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05％三氟乙酸)得到黄色固体化合物4-((S)-6-氨基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺)己酰胺基)苄基N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8，11-二氧代-7，8，11，13-四氢-10H-[1，3]二氧杂环戊烷并[4，5-g]吡喃并[3’，4’：6，7]吲哚嗪并[1，2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯(2.44mg，收率3.69％)。

[2470] LCMS(ESI)$[1/2M+H]^+$＝496.3，t_R＝2.252min。

[2471] 实施例2.40：4-((S)-6-氨基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1，2，3-三唑-1-基)己酰胺基)己酰胺基)苄基N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8，11-二氧代-7，8，11，13-四氢-10H-[1，3]二氧杂环戊烷并[4，5-g]吡喃并[3’，4’：6，7]吲哚嗪并[1，2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯(DL-040)

[2472] 

[2473] 步骤一：

[2474] 在0℃冰浴条件下，向C1.25(300mg，0.469mmol)和三乙胺(126mg，1.25mmol)的二氯甲烷(10mL)中加入N，N-琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC，160mg，0.626mmol)，反应在0℃反应30分钟，随后滴加化合物A1.6-A(145mg，0.313mmol)，然后反应在室温下反应12小时。LCMS监测反应完全。反应液减压浓缩成粗产品，经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05％甲酸)得到黄色油状化合物DL-040-A(70mg，收率：19.8％)为黄色油状物。LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝1130.1。

[2475] 步骤二：

[2476] 向化合物DL-040-A(70mg，0.062mmol)的四氢呋喃(5mL)和水(1mL)的混合溶液中加入过氧单磺酸钾(Oxone，381mg，0.619mmol)，反应在室温下搅拌12小时。TLC检测反应反应完全。向反应液中加入水(10mL)，用二氯甲烷(10mL x 3)萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到目标化合物DL-040-B(70mg，粗品)为黄色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝1162.6，t_R＝1.710min。

[2477] 步骤三：

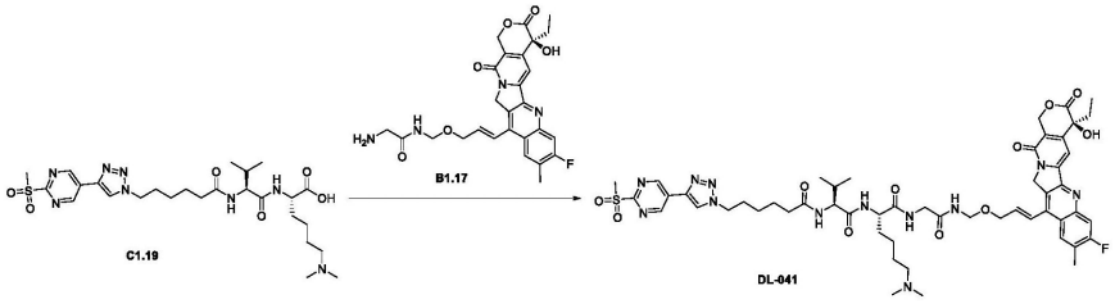
[2478] 将化合物DL-040-B(70mg，0.060mmol)溶在二氯甲烷(1mL)溶液中，0℃下向反应液中加入二氯乙酸(1mL)，反应在室温下搅拌3小时。LCMS显示反应完成。滤液减压浓缩成粗产品，经高效液相制备纯化(乙腈/水含0.05％三氟乙酸)得到黄色固体化合物4-((S)-6-氨基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)己酰胺基)苄基N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯(5.54mg，收率8.66％)。

[2479] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝1062.5，t_R＝4.052min；

[2480] ^{1}H NMR(400MHz，DMSO-d6)δ10.22(br s，1H)，9.46(s，2H)，8.93(s，1H)，8.22-8.03(m，1H)，7.85(br s，3H，NH2-TFA)，7.61-7.45(m，3H)，7.32-7.26(m，1H)，7.26-7.17(m，2H)，6.54(s，1H)，6.35(s，2H)，5.91(s，2H)，5.47(s，2H)，5.37-5.30(m，1H)，5.27-5.20(m，1H)，5.10-5.00(m，1H)，4.97-4.78(m，1H)，4.52-4.26(m，3H)，3.56-3.46(m，2H)，3.44(s，3H)，2.83-2.71(m，2H)，2.21-2.11(m，2H)，1.98-1.78(m，4H)，1.67-1.48(m，6H)，1.37-1.22(m，4H)，1.09-0.96(m，3H)，0.93-0.78(m，3H)。

[2481] 实施例2.41：(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-

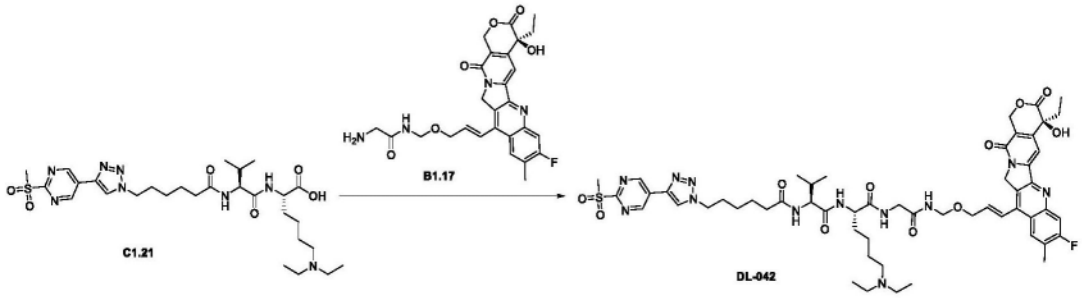
9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-041)

[2482] 

[2483] 将化合物B1.17(30mg),化合物C1.19(37mg)溶于DMF(1mL)。然后再加入HBTU(21mg)和N,N-二异丙基乙胺(16mg),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(11mg)。

[2484] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1099.5。

[2485] 实施例2.42:(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-042)

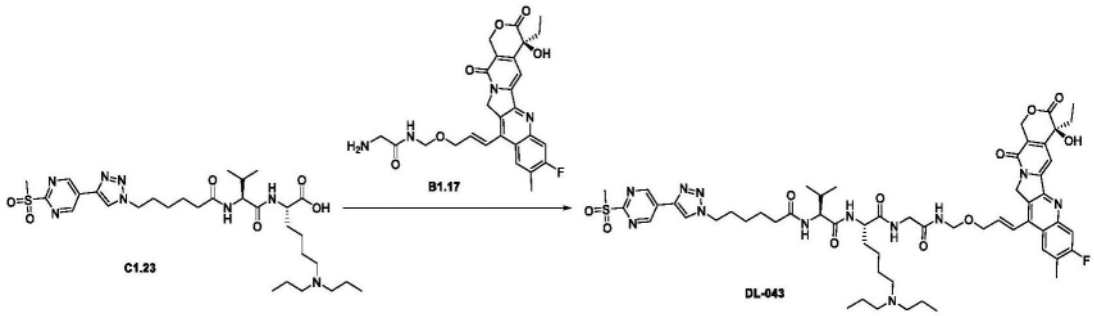
[2486] 

[2487] 将化合物B1.17(30mg),化合物C1.21(37mg)溶于DMF(1mL)。然后再加入HBTU(21mg)和N,N-二异丙基乙胺(16mg),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water,MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(7mg)。

[2488] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1127.5。

[2489] 实施例2.43:(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧

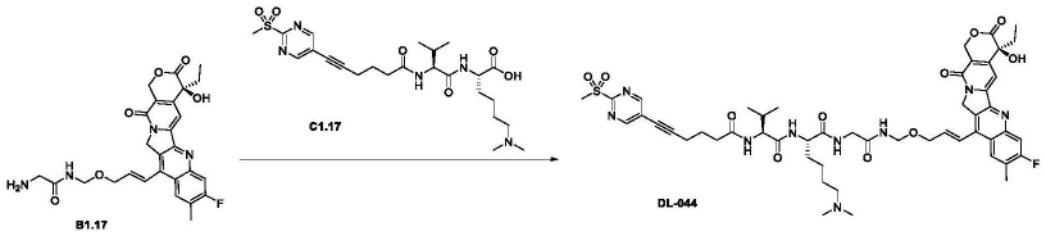
啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-043)

[2490] 

[2491] 将化合物B1.17(17.5mg,0.033mmol)和化合物C1.23(22mg,0.034mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(2mL)中,然后依次加入HOBT(7mg,0.051mmol),EDCI(10mg,0.051mmol),DIPEA(9mg,0.068mmol),加毕,反应液室温搅拌1小时,反应液直接经制备高效液相色谱(0.01%三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化,制备液冷冻干燥得到目标化合物(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(7mg,收率18%)为淡黄色固体产品。

[2492] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1155.5.

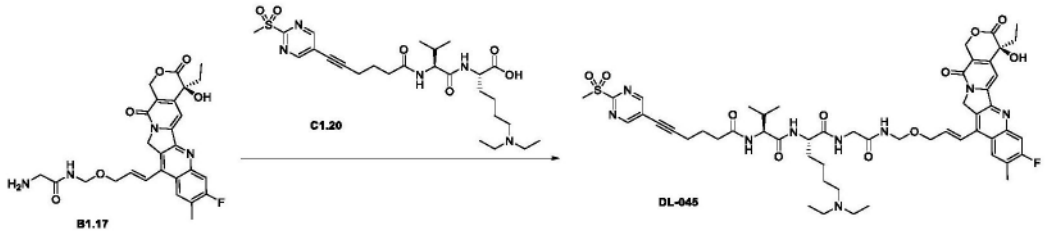
[2493] 实施例2.44:N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-044)

[2494] 

[2495] 将化合物B1.17(60mg),化合物C1.17(80mg)溶于DMF(2mL)。然后再加入HBTU(45mg)和N,N-二异丙基乙胺(35mg),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFAin water,MeCN)纯化得到目标化合物N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(21mg)。

[2496] LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1028.5。

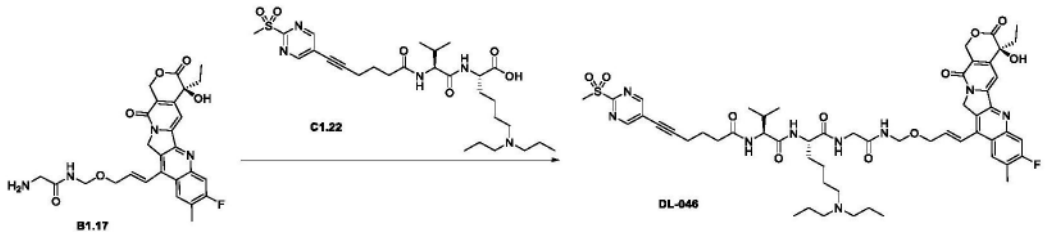
[2497] 实施例2.45:N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-045)

[2498] 

[2499] 将化合物B1.17(60mg),化合物C1.20(80mg)溶于DMF(2mL)。然后再加入HBTU(45mg)和N,N-二异丙基乙胺(35mg),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFAin water,MeCN)纯化得到目标化合物N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(29mg)。

[2500] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1056.5。

[2501] 实施例2.46:N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-046)

[2502] 

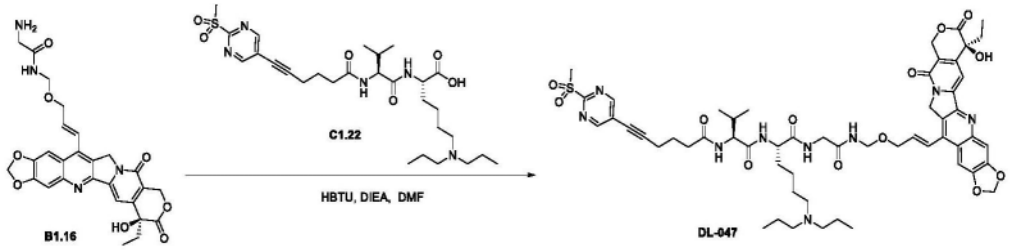
[2503] 将化合物B1.17(60mg),化合物C1.22(80mg)溶于DMF(2mL)。然后再加入HBTU(45mg)和N,N-二异丙基乙胺(35mg),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% TFAin water,MeCN)纯化得到目标化合物N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(30mg)。

[2504] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1084.2;

[2505] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.09(s,2H),8.73(d,J=6.3Hz,1H),8.30-8.24(m,2H),8.05(m,1H),7.94-7.88(m,2H),7.38-7.33(m,2H),6.67-6.60(m,1H),6.53(s,1H),5.44(s,2H),5.37(s,2H),4.73(t,J=6.2Hz,2H),4.34(d,J=4.2Hz,2H),4.26-4.20(m,1H),4.17-4.13(m,1H),3.86-3.69(m,4H),3.40(s,3H),2.41-2.30(m,8H),2.02-1.94(m,2H),1.89-1.85(m,2H),1.82-1.77(m,2H),1.74-1.63(m,2H),1.60-1.50(m,2H),1.47-1.39(m,8H),0.90-0.86(m,6H),0.85-0.80(m,9H)。

[2506] 实施例2.47:N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]

吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-047)

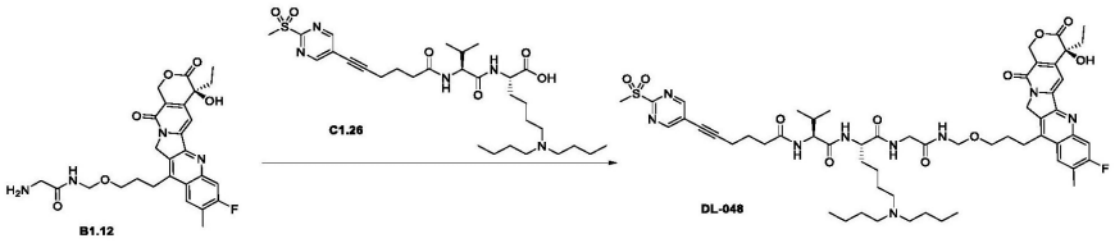
[2507] 

[2508] 将化合物B1.16(45mg,0.08mmol),化合物C1.22(49mg,0.08mmol),溶于DMF(1mL)。然后再加入HBTU(32mg,0.08mmol)和N,N-二异丙基乙胺(27mg,0.2mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01%三氟乙酸的水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-047,10mg)为黄色固体。

[2509] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1096.6;

[2510] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.10(s,2H),9.05(s,1H,TFA),8.75(t,J=5.3Hz,1H),8.26(t,J=6.4Hz,1H),8.11(d,J=7.6Hz,1H),7.93(d,J=8.4Hz,1H),7.63(s,1H),7.53(s,1H),7.26-2.24(m,2H),6.65-6.43(m,2H),6.30(s,2H),5.42(s,2H),5.30(s,2H),4.74-4.69(m,1H),4.31-4.29(m,2H),4.26-424(m,1H),4.19-4.12(m,1H),3.79-2.76(m,1H),3.40(s,3H),3.02-2.95(m,8H),2.55(m,2H),2.39-2.32(m,2H),2.01-1.93(m,2H),1.92-1.77(m,5H),1.62-1.58(m,6H),1.36-1.30(m,2H),0.91-0.83(m,15H)。

[2511] 实施例2.48:N-((11S,14S)-11-(4-(二丁基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-048)

[2512] 

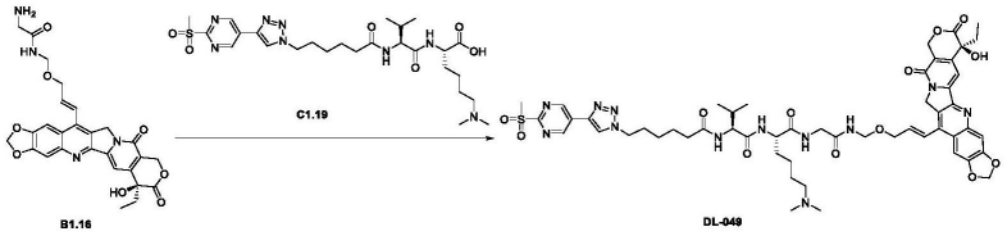
[2513] 将化合物C1.26(50mg,0.08mmol),化合物B1.12(43mg,0.08mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(1.5mL),然后依次加入DIPEA(26mg,0.21mmol),HBTU(31mg,0.08mmol),室温搅拌反应1小时。LCMS检测反应完成,反应液直接通过高效制备(0.01%三氟乙酸的水溶液,乙腈)分离纯化得到目标化合物(13.57mg)为黄色固体。

[2514] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1114.6;

[2515] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.09(s,2H),9.05(s,1H,TFA),8.64(t,J=7.2Hz,1H),8.23-8.16(m,2H),8.07(d,J=7.3Hz,1H),7.93-7.85(m,2H),7.32(s,1H),6.52(s,1H),5.44(s,2H),5.29(s,2H),4.61-4.59(m,2H),4.24-4.22(m,1H),4.19-4.10(m,1H),3.73-

3.70(m,2H),3.50(s,3H),3.21-3.18(m,6H),3.00-2.98(m,8H),2.54(s,3H),1.97-1.78(m,7H),1.56-1.52(m,8H),1.36-1.25(m,6H),0.93-0.78(m,15H)。

[2516] 实施例2.49:(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-049)

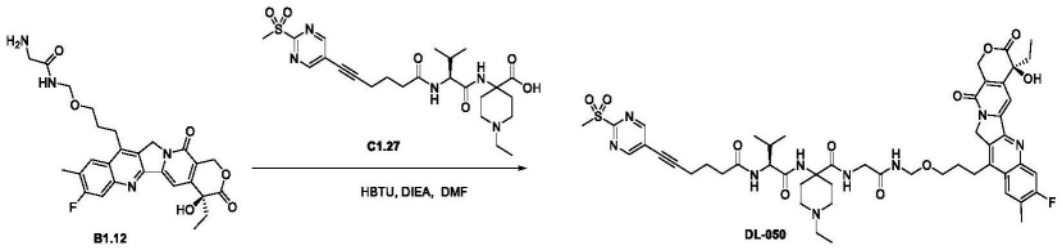
[2517] 

[2518] 将化合物B1.16(45mg,0.08mmol),化合物C1.19(50mg,0.08mmol),溶于DMF(1mL)。然后依次加入N,N-二异丙基乙胺(27mg,0.2mmol),HBTU(32mg,0.08mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液直接经制备色谱(0.01%的甲酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-049,3mg)为白色固体。

[2519] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1111.1;

[2520] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.45(s,2H),8.92(s,1H),8.69(t,J=6.6Hz,1H),8.25(t,J=5.9Hz,1H),8.19(s,1H,FA),7.99(d,J=7.0Hz,1H),7.83(d,J=8.5Hz,1H),7.64(s,1H),7.52(s,1H),7.27(m,2H),6.59-6.48(m,2H),6.29(s,2H),5.42(s,2H),5.31(s,2H),4.74-4.67(m,2H),4.44(m,2H),4.30(d,J=4.8Hz,2H),4.21(m,1H),4.12(m,1H),3.83-3.70(m,4H),3.43(s,3H),2.25(m,2H),2.15(s,6H),2.04-1.97(m,2H),1.90-1.85(m,4H),1.55-1.51(m,3H),1.39-1.34(m,6H),0.90-0.83(m,3H),0.80(t,J=7.2Hz,6H)。

[2521] 实施例2.50:1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-甲酰胺(DL-050)

[2522] 

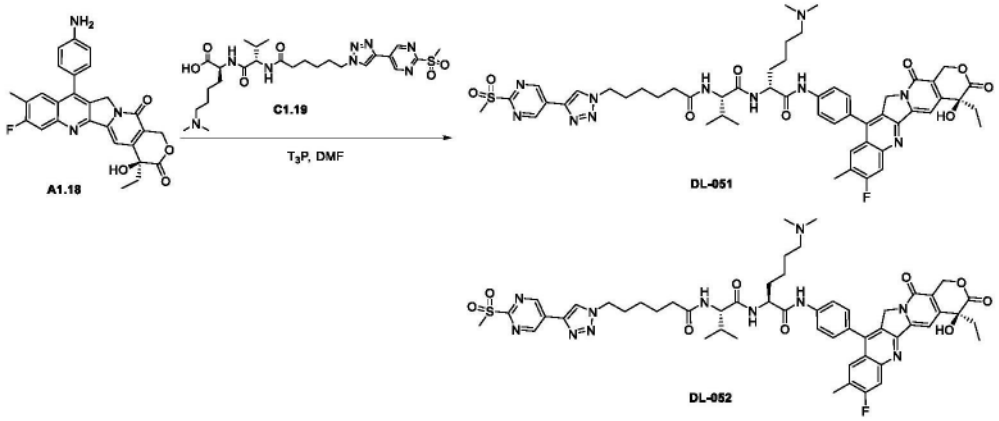
[2523] 将化合物B1.12(50mg,0.10mmol),化合物C1.27(50mg,0.10mmol),溶于DMF(1mL)。然后依次加入N,N-二异丙基乙胺(30mg,0.24mmol)和HBTU(36mg,0.10mmol),加完后反应液室温搅拌1小时,LCMS检测反应完成后,将反应液经制备色谱(0.01% FA in water,MeCN)

纯化得到目标化合物1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-甲酰胺(DL-050,10mg)为白色固体。

[2524] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1028.6;

[2525] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ9.08(s,2H),8.42(s,1H,FA),8.18-8.15(m,4H),7.98(t,J=5.6Hz,1H),7.86(d,J=10.9Hz,1H),7.30(s,1H),6.51(s,1H),5.43(s,2H),5.28(s,2H),4.72-4.63(m,1H),4.53-4.45(m,1H),4.07-4.06(m,1H),3.79-3.69(m,1H),3.58-3.55(m,2H),3.55-3.48(m,5H),3.21-3.16(m,3H),2.55(s,3H),2.66-2.64(m,2H),2.40-2.26(m,5H),1.99-1.71(m,12H),0.96(t,J=7.1Hz,3H),0.93-0.85(m,9H)。

[2526] 实施例2.51:(R)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-051)和(S)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-052)

[2527] 

[2528] 将化合物A1.18(40mg,0.08mmol)和C1.19(71mg,0.12mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(3mL)。再加入T_3P(254mg,0.40mmol,50%w/w乙酸乙酯的混合物),将反应液于室温下搅拌1小时。LCMS检测反应完成后,反应液直接经制备色谱(0.01%三氟乙酸水溶液,乙腈)纯化得到目标化合物(R)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-051,8.1mg)和(S)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-052,8.8mg)均为白色固体。

[2529] DL-051:

[2530] LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1048.2,t_R=1.258min;

[2531] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ10.12(s,1H),9.40(s,2H),8.84(s,1H),8.55(d,J=

7.4Hz,1H),8.26(s,1H),8.05(d,J＝7.8Hz,1H),7.99-7.89(m,3H),7.73(d,J＝8.4Hz,1H),7.57(d,J＝8.7Hz,2H),7.36(s,1H),5.41(s,2H),5.10(s,2H),4.40(m,3H),4.22-4.10(m,1H),3.44(s,3H),2.40(s,3H),2.30-2.25(m,2H),2.24-2.20(m,2H),2.19-2.15(m,6H),2.03-1.93(m,2H),1.92-1.78(m,6H),1.72-1.66(m,1H),1.61-1.54(m,2H),1.48-1.42(m,2H),1.30-1.26(m,2H),0.91-0.86(m,9H)。

[2532] DL-052:

[2533] LCMS(ESI)$[M+H]^+$＝1048.2,t_R＝1.283min;

[2534] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ10.34(s,1H),9.45(s,2H),8.94(s,1H),8.20(s,1H),7.99-7.85(m,4H),7.75(d,J＝7.4Hz,1H),7.59(m,2H),7.36(s,1H),6.55(s,1H),5.42(s,2H),5.10(s,2H),4.52-4.42(m,3H),4.25-4.17(m,1H),3.44(s,3H),2.41(s,3H),2.30-2.13(m,8H),2.05-1.97(m,2H),1.95-1.81(m,7H),1.60-1.55(m,2H),1.50-1.44(m,2H),1.33-1.28(m,4H),0.95-0.83(m,9H)。

[2535] 三、抗体制备与鉴定

[2536] 实施例3.1B7H3抗原和抗B7H3抗体B7H3-C1和B7H3-C2制备

[2537] 选取人2Ig B7H3的29-245位氨基酸(NCBI蛋白编号NP_001316557.1)的核酸序列,其中C端添加检测6×His标签,命名为人B7H3-2IgG-his;选取人4Ig B7H3的27-461位氨基酸(Uniprot蛋白编号Q5ZPR3-1)的核酸序列,其中C端添加纯化6×His标签,命名为人B7H3-4IgG-his;选取猴B7H3 4Ig的27-465位氨基酸(Uniprot蛋白编号F7G5V3)的核酸序列,其中C端添加纯化6x His标签,命名为猴B7H3-4IgG-his;B7H3-C1参考CN 103687945B中编号M30-H1-L4的抗体;B7H3-C2参考CN109069633A中编号mAb-C-DUBA的抗体。

[2538] 分别合成上述三种B7H3抗原的基因,以及密码子优化合成B7H3-C1和B7H3-C2抗体的基因(上海生工生物技术有限公司),构建到PTT5表达载体上,并大量抽提质粒。将抽提制备好的表达载体分别于HEK293F中瞬转表达7天,表达上清经ProteinA化制备获得抗原蛋白和B7H3-C1抗体和B7H3-C2抗体。

[2539] 实施例3.2全人源噬菌体库制备

[2540] 征集20-30岁左右10名健康男性以及10名健康女性志愿者,抽取约50mL新鲜血液体,通过Ficol抽提新鲜PBMC细胞,然后通过Trizol抽提mRNA进行反转录获得cDNA。通过VH和VK引物对从cDNA中扩增抗体重链及轻链,再通过Overlap PCR获得ScFv片段,通过SfiI酶切连接到pTT-1载体上,通过电转获得全人源ScFv噬菌体库,库容量约$5.2*10^9$。

[2541] 在1.0L新鲜培养基2YT+100μg/ml Amp+2%葡萄糖中加入1mL文库,菌液起始OD600＜0.1,在37℃、220rpm的条件下培养。当OD600为0.6左右时,按细胞:噬菌体＝1:20的比例加入M13K07噬菌体,辅助噬菌粒侵染,在37℃条件静止培养30min,然后在37℃、200rpm条件下培养30min,最后采用4000rpm条件下离心10min,用1.0L等体积的2YT+100μg/mlAmp+50μg/ml Kana重悬,30℃培养16h,用于表达。待表达培养完成后,取菌液于4℃条件下,8000rpm离心30分钟,去上清。高速离心,去掉菌体,上清中加入1/5体积的PEG/NACL,沉淀上清中的Phage,离心后将Phage溶解于PBS中,测phage滴度约为$2*10^{11}$。

[2542] 实施例3.3噬菌体库筛选抗B7H3抗体

[2543] 3.3.1hB7H3-his/cynoB7H3-his/MCF-7亲和淘选

[2544] 第一轮亲和淘洗:将hB7H3-his抗原(义翘神州)用PH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释

至终浓度为5μg/mL,按100μL/孔加入酶标孔中,包被8孔,4℃包被过夜;第二轮亲和淘洗:将cynoB7H3-his抗原(义翘神州)用PH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为2μg/mL,按100μL/孔加入酶标孔中,包被4孔,4℃包被过夜。第三轮亲和淘洗:胰酶消化MCF-7细胞,采用DMEM+10%FBS重选,50000细胞/孔铺于96孔细胞板,37℃5% CO2培养箱中培养过夜。弃包被液或细胞培养液,PBS洗涤3次,每孔加入300μL 3% OVA-PBS封闭液,37℃封闭1小时;PBS洗涤3次,加入100μL噬菌体文库,37℃孵育0.5-1小时;吸出未结合的噬菌体,用PBST洗涤6-8次,PBS洗涤2次;加入100μLGly-HCl洗脱液,37℃孵育8分钟,洗脱特异性结合的噬菌体;将该洗脱液转移至1.5mL无菌离心管中,迅速用10μLTris-HCl中和缓冲液中和;取10μL进行梯度稀释,测定滴度,计算淘选回收率,其余洗脱物混合后进行扩增和纯化,用于下一轮亲和淘选,改变淘选条件,每一轮淘选条件如下表1。

[2545] 表1亲和淘选条件

[2546]

轮次	抗原包被浓度(μg/mL)	封闭液	文库投入量(cfu)	结合时间(h)	PBST浓度	PBST洗涤次数
1	5	OVA-PBS	2×10^{11}	1	0.1%	6
2	2	OVA-PBS	1×10^{11}	0.75	0.25%	8
3	MCF-7 50000细胞/孔	OVA-PBS	1×10^{11}	0.5	0.5%	8

[2547] 3.3.2噬菌体的救援

[2548] 从淘选洗脱物滴度的平板上,用灭菌牙签从第三轮滴度测定平板上各随机挑选96个克隆,接种于1mL 2×YT-A中,37℃,230r/min振荡培养8h。取100μL上述培养物,按cell:phage=1:20的比例加入M13K07噬菌体,37℃,静置15min,220r/min振荡培养45min。补加800μL体积的2×YT-AK,30℃,剧烈振荡培养过夜。第二天12000rpm离心2min,取上清,用于单克隆ELISA鉴定。

[2549] 3.3.3阳性噬菌体克隆的鉴定

[2550] 将人B7H3-4IgG-his用PH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为1μg/mL,和2%OVA-PBS按100μL/孔分别加入酶标孔中,4℃包被过夜;弃包被液,PBST洗涤3次,每孔加入300μL 5%脱脂牛奶,37℃封闭1h;PBST洗涤1次,每孔加入50μL噬菌体培养菌液上清和50μL5%脱脂牛奶,37℃,孵育1h;PBST洗涤5次,加入辣根过氧化物酶标记的抗M13抗体(用PBS按1:10000稀释),100μL/孔,37℃作用1h;PBST洗板6次。加入TMB显色液显色,100μL/孔,37℃,7min,加入终止液终止反应,50μL/孔,于450nm下测定吸光度,共筛选到9个抗B7H3的scFv抗体具有独特序列,其中与肿瘤细胞结合最强的scFv抗体1D1序列如SEQ ID NO:1所示、2E3序列如SEQ ID NO:2所示。

[2551] 实施例3.4抗B7H3抗体表达

[2552] 将1D1和2E3的ScFv的VH氨基酸序列SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:23分别加上IgG1的恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO:43)通过密码子优化及基因合成(上海生工生物技术有限公司),然后构建到PTT5载体上,分别命名为PTT5-01-CH和PPT5-02-CH;将1D1和2E3的ScFv的VL氨基酸序列SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:33加上Kappa恒定区序列(SEQ ID NO:44)通过密码子优化及基因合成(上海生工生物技术有限公司),然后构建到PTT5载体上,分别命名为PTT5-01-CL和PTT5-01-CL;通过PEI max试剂将抗体B7H3抗体表达质粒PTT5-01-CH/PTT5-01-CL、PTT5-02-CH/PTT5-02-CL共转染HEK293F细胞进行表达,37℃5%CO2摇床表达7天,收

集上清液,通过ProA磁珠进行纯化,获得抗B7H3抗体分别命名为1D1-01、2E3-02。

[2553] 实施例3.5抗B7H3抗体蛋白亲和力检测

[2554] 通过ELISA实验方法检测B7H3全人源抗体与人B7H3-4IgG-his和猴B7H3-4IgG-his蛋白的亲和力。具体实验操作:将人B7H3-4IgG-his或猴B7H3-4IgG-his蛋白用PH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为1μg/mL按100μL/孔分别加入96孔酶标孔中,4℃包被过夜;弃包被液,PBST洗涤1次,每孔加入100μL PBS(含2%BSA),37℃封闭1小时;然后每孔加入100μL PBS(含2%BSA)稀释好的B7H3全人源抗体(10μg起始,3倍稀释,2复孔),37℃,孵育2h;PBST洗涤3次,加入辣根过氧化物酶标记的抗人Fc抗体(用PBS按1:10000稀释),100μL/孔,37℃作用1小时;PBST洗板5次。加入TMB显色液显色,100μL/孔,37℃,7min,加入终止液终止反应,50μL/孔,于450nm下测吸光度。根据原始数据计算EC50值。

[2555] 结果见图1A,1B,2A和2B,详细结果如表1-1和1-2所示,1D1-01、2E3-02与人B7H3-4IgG均具有较高亲和力,分别是43.56pM和17.54pM,其中2E3-02强于B7H3-C1的亲和力51.85pM;1D1-01、2E3-02与猴B7H3-4IgG较高结合能力,分别是35.82pM和27.72pM。

[2556] 表1-1.1D1-01抗体蛋白亲和力检测结果

[2557]

抗体	人 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)	猴 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)
1D1-01	43.56	35.82
B7H3-C1	48.03	166.52

[2558] 表1-2.2E3-02抗体蛋白亲和力检测结果

[2559]

抗体	人 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)	猴 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)
2E3-02	17.54	27.72
B7H3-C1	51.85	3921

[2560] 实施例3.6抗B7H3抗体细胞亲和力检测

[2561] B7H3蛋白在多种实体瘤细胞上高表达,通过FACS实验方法检测B7H3全人源抗体与肿瘤细胞亲和力。具体实验操作:将生长至对数期的MCF-7乳腺癌细胞、A549人非小细胞肺癌以及PC3人前列腺癌细胞通过胰酶消化,用含2%BSA的PBS缓冲液重悬到5*10^5细胞每毫升,加入100uL细胞悬液至96孔板中;用含有2%BSA的PBS缓冲液稀释B7H3-C1、B7H3-C2,1D1-01以及2E3-02,起始浓度40μg/mL,3倍稀释,然后加入100μL抗体悬液至96孔板中混匀;4℃孵育1小时,采用预冷的PBS清洗2次,每次300μL/孔,500g离心5分钟;加入1:50荧光二抗APC anti-Human IgG或者PE anti-human IgG(购买自Biolegend)100μL/每孔,混匀;4℃孵育0.5小时,采用预冷的PBS清洗2次,每次300μL/孔,500g离心5分钟,用500μl PBS重选,采用贝克曼流式细胞仪进行检测平均荧光信号值。将平均荧光信号值计算EC50值,结果见图3A、3B、4A、4B及图5,具体数据见表2-1和2-2。

[2562] 表2-1.1D1-01抗体细胞亲和力检测结果

[2563]

抗体	MCF-7 肿瘤细胞		A549 肿瘤细胞	
	EC50 (nM)	最大 MFI	EC50 (nM)	最大 MFI
1D1-01	0.524	94465	0.322	11288
B7H3-C1	1.709	83992	1.865	8273

[2564] 表2-2.2E3-02抗体细胞亲和力检测结果

[2565]

抗体	MCF-7 肿瘤细胞		A549 肿瘤细胞		PC-3 肿瘤细胞	
	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI
2E3-02	0.398	77732	0.150	84806	0.063	9729

[2566]

B7H3-C1	1.360	63194	1.054	47956	0.618	6436
B7H3-C2	0.278	27925	未检测	未检测	0.167	2170

[2567] 如表2-1和2-2所示,在B7H3高表达肿瘤细胞MCF-7上,1D1-01和2E3-02亲和力分别是0.524nM和0.398nM,均远高于B7H3-C1,同时最大荧光信号值比B7H3-C1分别高12％和23％,其中2E3-02最大荧光信号值比B7H3-C2高2.78倍。在B7H3中表达肿瘤细胞A549上,1D1-01和2E3-02亲和力分别是0.322nM和0.150nM,均远高于B7H3-C1,同时最大荧光信号值比B7H3-C1分别高36％和77％。在B7H3低表达肿瘤细胞PC-3上,2E3-02亲和力0.06nM远高于B7H3-C1亲和力0.618nM,也高于B7H3-C2亲和力0.167nM,同时最大荧光信号值分别是B7H3-C1和B7H3-C2的1.51和4.48倍。综合来看,抗B7H3抗体1D1-01和2E3-02比B7H3-C1、B7H3-C2均有更好的肿瘤细胞亲和力。

[2568] 实施例3.7抗B7H3抗体动态亲和力检测

[2569] Fortibio是常用的动态亲和力检测设备,通过其检测抗B7H3抗体与B7H3蛋白的动态亲和力。简述方法如下:对人B7H3-4IgG-His、人B7H3-2IgG-His或猴B7H3-4IgG-His采用PBST进行系列稀释,得到200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM、1.5625nM和0nM。ProA生物传感器(Pall生命科学)在使用前用PBST缓冲液预湿。将抗B7H3抗体用PBST稀释到5μg/mL并固化在ProA传感器上。然后将固化了抗体的传感器在PBST缓冲液中平衡60s以获得基线,然后转移到抗原稀释液结合60s,再在PBST中解离180s。在一个分析循环后,传感器用10mM Gly(pH 1.5)再生。使用Date analysis用1:1模型分析,确定结合(Ka)和解离(Kd)速率常数并使用其来计算解离平衡常数(KD)。

[2570] 如表3所示,1D1-01、2E3-02与人B7H3-4Ig-his动态亲和力在4.3E-11M和2.4E-10M,均远高于抗体B7H3-C1和抗体B7H3-C2;同时1D1-01、2E3-02与猴B7H3-4Ig-his动态亲和力在E-10M,具有良好猴交叉;1D1-01、2E3-02与人B7H3-4Ig-his/人B7H3-2Ig-his动态亲和力倍数分别是9.5和32.5。

[2571] 表3抗B7H3抗体分子的动态亲和力分析

[2572]

抗体	人 B7H3-4Ig-his 亲和力 KD（M）	人 B7H3-2Ig-his 亲和力 KD（M）	猴 B7H4-4Ig-his 亲和力 KD（M）
1D1-01	4.3E-11	4.1E-10	2.5E-10
2E3-02	2.4E-10	7.8E-09	4.7E-10
B7H3-C1	5.4E-10	4.8 E-08	2.0 E-10
B7H3-C2	1.8E-09	7.1E-08	2.5 E-09

[2573] 实施例3.8抗B7H3抗体特异性检测

[2574] 通过ELISA实验方法检测B7H3抗体与B7H3结合特异性。具体实验操作:将人B7-1、人B7-2、人B7H1-his、人B7H2-his、人B7H3-his、人B7H4-his蛋白(购买自义翘神州生物技术有限公司)用PH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为1μg/mL按100μL/孔分别加入96孔酶标孔中,4℃包被过夜;弃包被液,PBST洗涤1次,每孔加入100μL PBS(含2％BSA),37℃封

闭1h;然后每孔加入100μL PBS(含2%BSA)稀释好的B7H3全人源抗体10ug/mL,37℃,孵育2h;PBST洗涤3次,加入辣根过氧化物酶标记的抗人Fc抗体(用PBS按1:10000稀释),100μL/孔,37℃作用1h;PBST洗板5次。加入TMB显色液显色,100μL/孔,37℃,7min,加入终止液终止反应,50μL/孔,于450nm下测光密度。1D1-01和2E3-02结果分别如图6A,6B所示。如结果所示1D1-01、2E3-02与人B7H3特异性结合,而不结合人B7-1、人B7-2、人B7H1、人B7H2、人B7H4蛋白。

[2575] 实施例3.9抗B7H3抗体内吞活性检测

[2576] 采用FACS方式检测A549人非小细胞肺癌细胞对抗B7H3抗体被细胞内吞的强弱。将生长至对数生长期的A549细胞采用胰酶进行消化,离心收集细胞,预冷PBS洗三次;用PBS(含1%BSA)重悬细胞,分别加入待检测抗B7H3抗体,浓度为10μg/mL,4℃孵育1小时;离心收集细胞,PBS洗三次,用DMEM+10% FBS重悬细胞,将重悬后细胞分成4份,分别在37℃孵育0、1、2、4小时;孵育相完成后,离心收集细胞,预冷PBS洗三次,用50μL 1%BSA(in PBS)重悬细胞,每孔加入1μL荧光二抗APC anti-Human IgG(Biolegend),混匀,4℃孵育0.5小时;离心收集细胞,预冷PBS洗三次,用200μL PBS重悬细胞,上机检测。按照公式:内吞率(%)=【1-(该时间点检测样品平均荧光值-该时间点阴性对照样品平均荧光值)/(0小时检测样品平均荧光值-0小时阴性对照样品平均荧光值)】*100。1D1-01和2E3-02结果分别如图7A和7B所示,抗B7H3抗体1D1-01和2E3-02在A549肿瘤细胞上具有较强的内吞活性,4小时能达到40%左右,与抗体B7H3-C1相当。

[2577] 实施例3.10抗B7H3抗体表位竞争检测

[2578] 采用竞争ELISA方式检测抗B7H3抗体1D1-01、2E3-02与抗体B7H3-C1是否表位竞争。具体步骤如下:采用CBS包被液包被人B7H3-4Ig-his抗原,100ng/孔,4度过夜孵育;去除包被液,用300μLPBS洗孔一次,用PBS(含2% BSA)溶液封闭每个孔,100μL每孔,37度孵育2小时;弃去除封闭液,将1D1-01、2E3-02抗体用PBS(含2% BSA)进行稀释,40μg/mL起始,2倍稀释,总共11个稀释点,第12个点用稀释液代替,2复孔,50μL每孔加入孔中;将生物素标记的B7H3-C1稀释至50ng/mL,50μL每孔加入孔中,25度孵育2小时;用300μL PBST洗孔,重复3次,加入用PBS(含2% BSA)进行1:5000倍数稀释HRP抗生物素二抗100μL/孔,25度孵育1小时;用300μL PBST洗孔,重复5次;每孔加入100μL TMB显色液(安徽湖州英创),室温显色5分钟后每孔加入50μLH2SO4终止反应,立即用酶标仪读取OD450 nm。将原始数据导入Graph-prism计算EC50值。结果表明,抗B7H3抗体1D1-01与抗体B7H3-C1存在结合表位竞争;抗B7H3抗体2E3-02与抗体B7H3-C1不存在结合表位竞争。

[2579] 实施例3.11Her3抗原制备

[2580] 选取人Her3的1-643位氨基酸(NCBI:NP_001973.2)的核酸序列,其中C端添加检测6xHis标签,命名为人Her3-his。选取猴Her3的氨基酸序列,其中C端添加检测6xHis标签,命名为猴Her3-his。选取鼠Her3的氨基酸序列,其中C端添加检测6×His标签,命名为鼠Her3-his。

[2581] 实施例3.12抗Her3抗体表达

[2582] 将抗体202-2-1重链可变区(SEQ ID NO:49)加上重链IgG1恒定区(SEQ NO:43),抗体202-2-1轻链可变区(SEQ NO:50)与Kappa恒定区序列(SEQ ID NO:44),抗体Her3-C3(patritumab)来自于第一三共公司,其序列来自IMGT数据库IMGT/mAb-DB ID:964,INN编

号:11093,以及来自于MediaPharma公司专利CN 103189392 B(重链SEQ ID NO:10,轻链SEQ ID NO:14)的抗体Her3-C4,通过密码子优化及基因合成,然后分别构建到PTT5载体上。通过PEI max试剂将抗Her3抗体重链和轻链表达质粒分别共转染HEK293F细胞进行表达,37℃5%CO_2摇床表达7天,收集上清液,通过ProteinA磁珠进行纯化,获得抗Her3抗体分别命名为:202-2-1(其重链序列为SEQ ID NO 51,轻链序列为SEQ ID NO 52),抗体Her3-C3。

[2583] 实施例3.13抗Her3抗体蛋白亲和力检测

[2584] 通过ELISA实验方法检测抗Her3抗体与Her3蛋白的亲和力。具体实验操作:将人Her3-his、猴Her3-his蛋白以及大鼠Her3-his用PH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为1μg/mL按100μL/孔分别加入96孔酶标孔中,4℃包被过夜;弃包被液,PBST洗涤1次,每孔加入100μL PBS(含2%BSA),37℃封闭1小时;然后每孔加入100μL PBS(含2%BSA)稀释好的抗Her3抗体(1ug起始,3倍稀释,2复孔),37℃,孵育2h;PBST洗涤3次,加入辣根过氧化物酶标记的抗人Fc抗体(用PBS按1:10000稀释),100μL/孔,37℃作用1小时;PBST洗板5次。加入TMB显色液显色,100μL/孔,37℃,7min,加入终止液终止反应,50μL/孔,于450nm下测吸光度。将原始数据导入Graph-prism计算EC50值,详细结果如表4所示,202-2-1与人Her3蛋白以及猴Her3蛋白有强的结合与抗体Her3-C4相当,均不与大鼠Her3蛋白结合。

[2585] 表4抗Her3抗体蛋白亲和力检测结果

[2586]

抗体名称	人 Her3-his EC50 (pM)	猴 Her3-his EC50 (pM)	大鼠 Her3-his EC50 (pM)
202-2-1	20.97	15.91	不结合
Her3-C4	27.72	9.275	不结合

[2587] 实施例3.14抗Her3抗体内吞活性检测

[2588] 采用FACS方式检测A549-人Her3(人非小细胞肺癌细胞)对抗Her3抗体被细胞内吞的强弱。将生长至对数生长期的A549-人Her3细胞采用胰酶进行消化,离心收集细胞,预冷PBS洗三次;用PBS(含1%BSA)重悬细胞,分别加入待检测抗Her3抗体,浓度为10ug/mL,4℃孵育1小时;离心收集细胞,PBS洗三次,用DMEM+10% FBS重悬细胞,将重悬后细胞分成4份,分别在37℃孵育0、1、2、4小时;孵育相完成后,离心收集细胞,预冷PBS洗三次,用50uL 1% BSA(in PBS)重悬细胞,每孔加入1uL荧光二抗APC anti-Human IgG(Biolegend),混匀,4℃孵育0.5小时;离心收集细胞,预冷PBS洗三次,用200uL PBS重悬细胞,流式细胞仪(贝克曼,型号CytoFlex)上机检测。按照公式:内吞率(%)=【1-(该时间点检测样品平均荧光值-该时间点阴性对照样品平均荧光值)/(0小时检测样品平均荧光值-0小时阴性对照样品平均荧光值)】*100。结果如图7C显示,抗Her3抗体202-2-1在A549-人Her3肿瘤细胞上具有较强的内吞活性4小时能达到26.9%左右,强于抗体Her3-C4的16.6%,与抗体Her3-C3相当。但抗Her3抗体202-2-1内吞先于Her3-C4/Her3-C3达到最大内吞率,具有快于Her3-C4/Her3-C3的内吞速率。

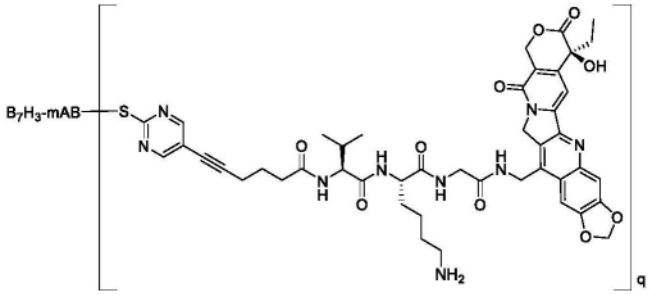
[2589] 四、包含细胞生物活性分子和连接体的化合物与抗体的偶联

[2590] 实施例4.1:B7H3-ADC的制备

[2591] 实施例4.1.1:B7H3-ADC-01的制备

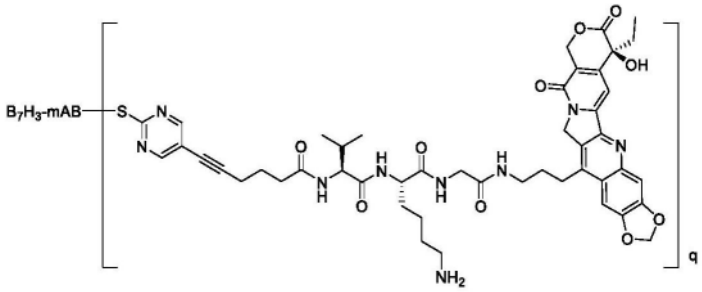
[2592] 取0.3mL B7H3抗体(2E3-02抗体)33.5mg/mL,用0.25mL 20mM PB+150mM NaCl+20mM依地酸钠溶液(pH 7.6)稀释,后加入0.45mL 20mM PB+150mM NaCl溶液(pH 7.6)混匀,

以1M K_2HPO_4溶液调pH至7.4,加入10mM TCEP(三(2-羧乙基)膦,0.033ml,0.33μmol)溶液混匀,室温放置30min。向上述溶液体系加入DL001(1.35mg,20倍抗体物质摩尔数量)的二甲基亚砜(0.1mL)溶液,混匀,室温静置2h,完毕后加入100mM半胱氨酸6.1μl终止反应。最后采用G-25凝胶柱将缓冲液置换为pH6.44的20mM PB缓冲溶液。得到DL-001与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-01。质谱法测定DAR值为7.8。

[2593] 

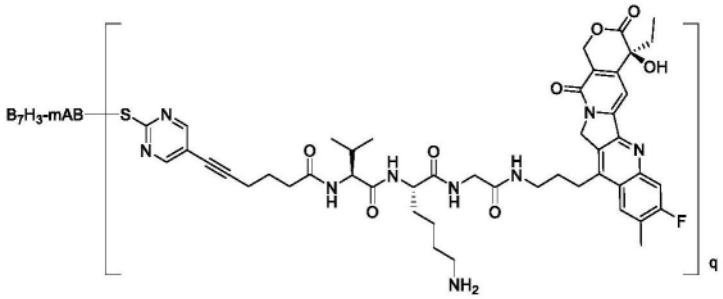
[2594] 实施例4.1.2:B7H3-ADC-02的制备

[2595] 用化合物DL-011代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-011与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-02。质谱法测定DAR值为7.8。

[2596] 

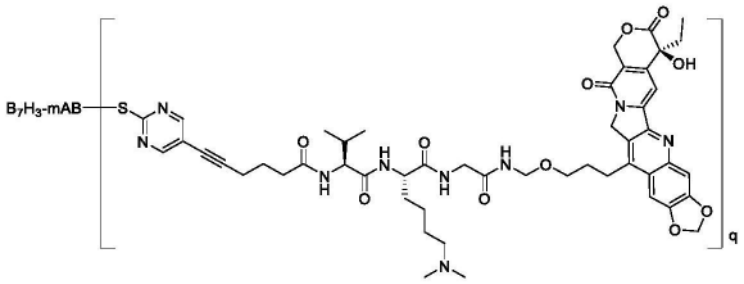
[2597] 实施例4.1.3:B7H3-ADC-03的制备

[2598] 用化合物DL-020代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-020与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-03。质谱法测定DAR值为7.8。

[2599] 

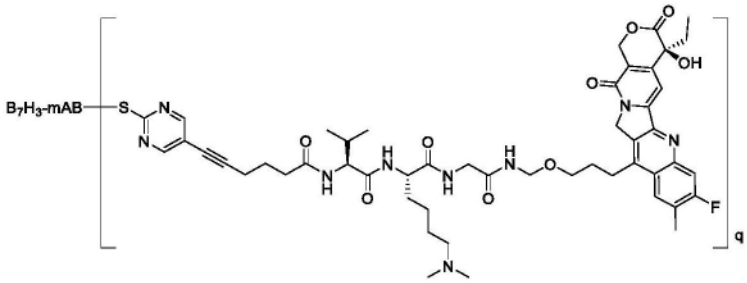
[2600] 实施例4.1.4:B7H3-ADC-04的制备

[2601] 用化合物DL-019代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-019与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-04。质谱法测定DAR值为7.8。

[2602] 

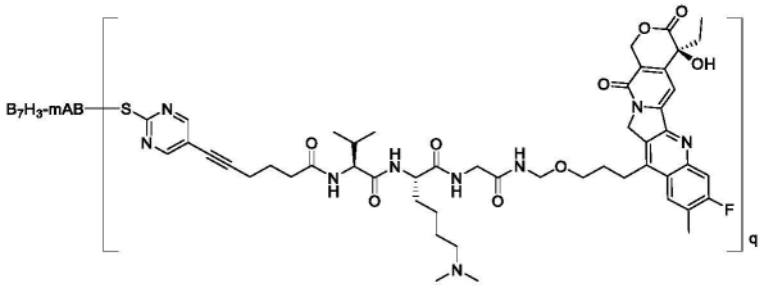
[2603] 实施例4.1.5.1:B7H3-ADC-05(DAR8)的制备

[2604] 用化合物DL-018代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-018与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-05。质谱法测定DAR值为7.8。

[2605] 

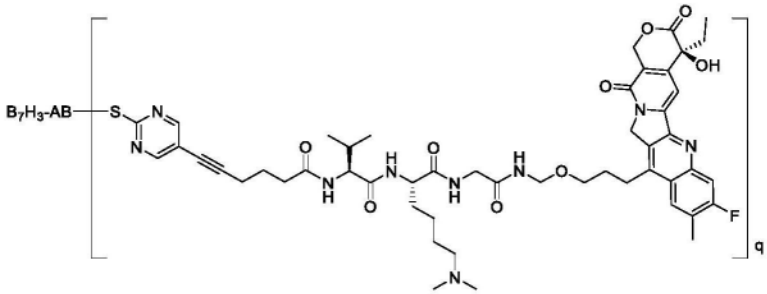
[2606] 实施例4.1.5.2:B7H3-ADC-05(DAR4)的制备

[2607] 用化合物DL-018代替实施例4.1.7.3的化合物DL-037,得到DL-018与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-05(DAR4)。质谱法测定DAR值。

[2608] 

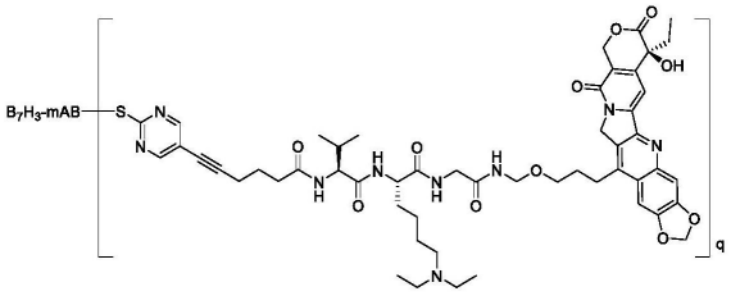
[2609] 实施例4.1.5.3:B7H3-C1-ADC-05(DAR4)的制备

[2610] 用化合物DL-018代替实施例4.1.7.3的化合物DL-037,将2E3-02抗体替换为抗体B7H3-C1,得到DL-018与B7H3抗体的偶联产物B7H3-C1-ADC-05(DAR4)。质谱法测定DAR值。

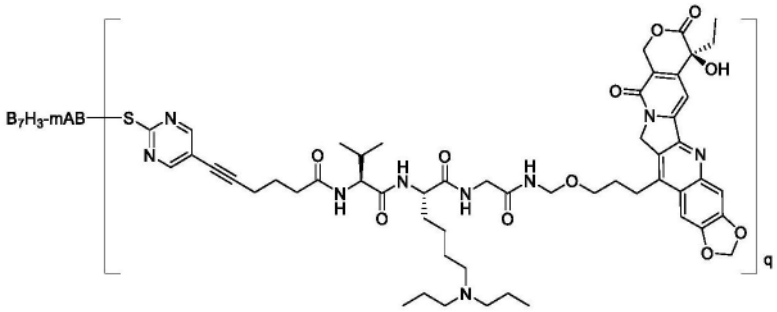
[2611] 

[2612] 实施例4.1.6:B7H3-ADC-06的制备

[2613] 用化合物DL-036代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-036与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-06。质谱法测定DAR值为7.7。

[2614] 

[2615] 实施例4.1.7:B7H3-ADC-07的制备

[2616] 

[2617] 4.1.7.1B7H3-ADC-07(DAR8)样品制备

[2618] 制备方法A:用化合物DL-037代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-037与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-07(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.7。

[2619] 制备方法B:取25ml 2E3-02抗体(抗B7H3,浓度28.5mg/ml,20mM醋酸缓冲液),向其中加入25ml 20mM醋酸缓冲液稀释,随后添加1ml含有0.25M EDTA的水溶液并混匀,用0.5M磷酸氢二钠水溶液调样品pH至7.6后加入抗体4.5倍当量的20mM TCEP(三(2-羧乙基)膦盐酸盐)溶液并混匀,室温下反应90min。最后加入抗体10倍当量的溶解在DMSO中的DL-037,混匀后继续室温反应2h。反应结束后使用30KDa的超滤管将样品置换到pH为5.5的10mM组氨酸缓冲液中并去除低分子物质,最后将样品浓缩以获得含有抗B7H3抗体ADC组合物的溶液B7H3-ADC-07(DAR8),质谱法测定DAR值为7.98。

[2620] 4.1.7.2B7H3-ADC-07(DAR2)样品制备

[2621] 取5ml 2E3-02抗体(抗B7H3,浓度28.5mg/ml,20mM醋酸缓冲液),向其中加入5ml 20mM醋酸缓冲液稀释,随后添加0.2ml含有0.25M EDTA的水溶液并混匀,用0.5M磷酸氢二钠水溶液调样品pH至7.6后加入抗体4.5倍当量的20mM TCEP(三(2-羧乙基)膦盐酸盐)溶液并混匀,室温下反应90min。最后加入抗体2.4倍当量的溶解在DMSO中的DL-037,混匀后继续室温反应2h。反应结束后使用30KDa的超滤管将样品置换到pH为5.5的10mM组氨酸缓冲液中并去除低分子物质,最后将样品浓缩以获得含有抗B7H3抗体ADC组合物的溶液B7H3-ADC-07(DAR2),质谱法测定DAR值为2.3。

[2622] 4.1.7.3

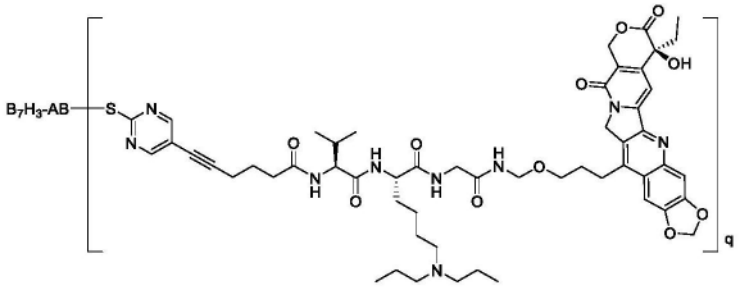
[2623] (1)B7H3-ADC-07(DAR4)样品制备

[2624] 取5ml 2E3-02抗体(抗B7H3,浓度28.5mg/ml,20mM醋酸缓冲液),向其中加入5ml 20mM醋酸缓冲液稀释,随后添加0.2ml含有0.25M EDTA的水溶液并混匀,用0.5M磷酸氢二钠水溶液调样品pH至7.6后加入抗体4.5倍当量的20mM TCEP(三(2-羧乙基)膦盐酸盐)溶液并混匀,室温下反应90min。最后加入抗体4.8倍当量的溶解在DMSO中的DL-037,混匀后继续室

温反应2h。反应结束后使用30KDa的超滤管将样品置换到pH为5.5的10mM组氨酸缓冲液中并去除低分子物质,最后将样品浓缩以获得含有抗B7H3抗体ADC组合物的溶液B7H3-ADC-07(DAR4),质谱法测定DAR值为4.1。

[2625] (2)B7H3-C1-ADC-07(DAR4)样品制备

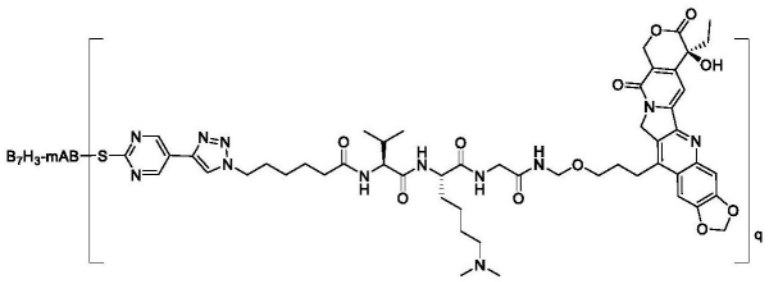
[2626] 利用B7H3-ADC-07(DAR4)制备的方法,将2E3-02抗体替换为抗体B7H3-C1,获得抗体B7H3-C1的ADC组合物的溶液B7H3-C1-ADC-07(DAR4),质谱法测定DAR值为4.9。

[2627] 

[2628] 4.1.7.4B7H3-ADC-07(DAR6)样品制备

[2629] 取5ml 2E3-02抗体(抗B7H3,浓度28.5mg/ml,20mM醋酸缓冲液),向其中加入5ml 20mM醋酸缓冲液稀释,随后添加0.2ml含有0.25M EDTA的水溶液并混匀,用0.5M磷酸氢二钠水溶液调样品pH至7.6后加入抗体4.5倍当量的20mM TCEP(三(2-羧乙基)膦盐酸盐)溶液并混匀,室温下反应90min。最后加入抗体7.2倍当量的溶解在DMSO中的DL-037,混匀后继续室温反应2h。反应结束后使用30KDa的超滤管将样品置换到pH为5.5的10mM组氨酸缓冲液中并去除低分子物质,最后将样品浓缩以获得含有抗B7H3抗体ADC组合物的溶液B7H3-ADC-07(DAR6),质谱法测定DAR值为5.4。

[2630] 实施例4.1.8:B7H3-ADC-08的制备

[2631] 

[2632] 4.1.8.1B7H3-ADC-08(DAR8)样品制备

[2633] 用化合物DL-028代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-028与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-08(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.3。

[2634] 同时,用化合物DL-028代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-028与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-08(DAR8),质谱法测定DAR值,结果如下:

[2635]

肽链	理论值	实测值	面积	比例	DAR
LC	23335	未检出	0	0	7.321946
LC+DAR1	24368.4	23247.05	70520268	1	
HC	50735	50371.9	409745	0.068972	
HC+DAR1	51768.4	51405.98	151226	0.025456	

[2636]

HC+DAR2	52801.8	52438.75	482382	0.081199	
HC+DAR3	53835.2	53471.3	4897381	0.824373	

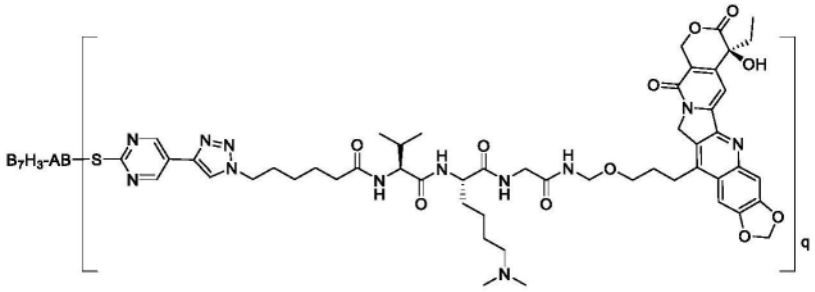
[2637] 4.1.8.2

[2638] (1)B7H3-ADC-08(DAR4)样品制备

[2639] 用化合物DL-028代替实施例4.1.7.3B7H3-ADC-07(DAR4)的制备的化合物DL-037,得到DL-028与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-08(DAR4),质谱法测定DAR值为4.7。

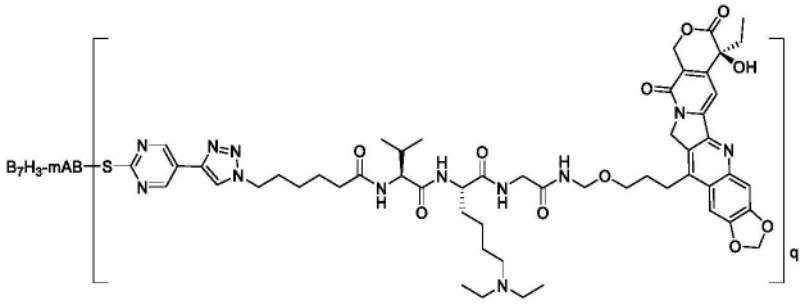
[2640] (2)B7H3-C1-ADC-08(DAR4)

[2641] 用化合物DL-028代替实施例4.1.7.3B7H3-C1-ADC-07(DAR4)的制备的化合物DL-037,得到DL-028与B7H3抗体的偶联产物B7H3-C1-ADC-08,质谱法测定DAR值为4.7。

[2642] 

[2643] 实施例4.1.9:B7H3-ADC-09的制备

[2644] 用化合物DL-029代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-029与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-09。质谱法测定DAR值为7.6。

[2645] 

[2646] 同时,用化合物DL-029代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-029与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-09,质谱法测定DAR值,结果如下:

[2647]

肽链	理论值	实测值	面积	比例	DAR
LC	23245	23247.03	6274384	0.094179	7.811641
LC+DAR1	24306	24308.41	60347328	0.905821	
HC	50367	未检出	0	0	
HC+DAR1	51428	未检出	0	0	
HC+DAR2	52489	未检出	0	0	

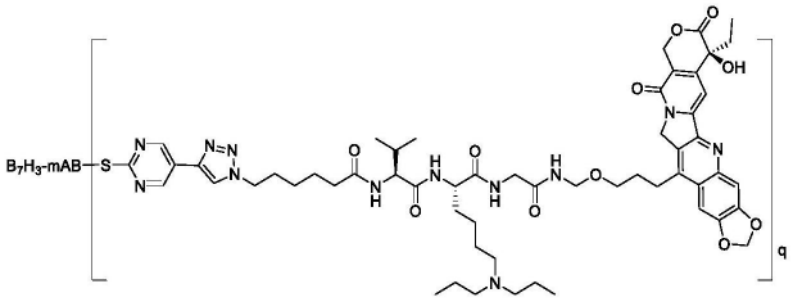
[2648]

HC+DAR3	53550	53555.46	10285189	1	

[2649] 实施例4.1.10:B7H3-ADC-10的制备

[2650] 用化合物DL-030代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-030与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-10。质谱法测定DAR值为7.6。

[2651]



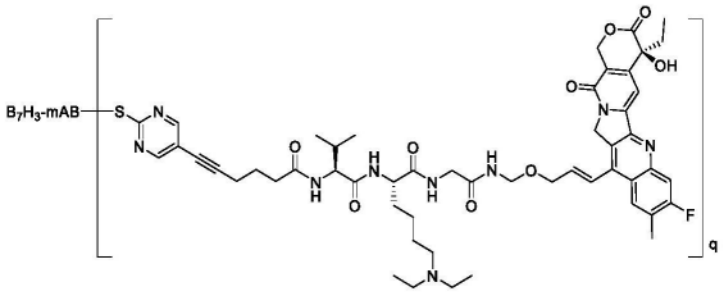
[2652] 同时,用化合物DL-030代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-030与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-10,质谱法测定DAR值,结果如下:

[2653]

肽链	理论值	实测值	面积	比例	DAR
LC	23245	未检出	0	0	8
LC+DAR1	24194.4	24336.45	66512554	1	
HC	50367	未检出	0	0	
HC+DAR1	51316.4	未检出	0	0	
HC+DAR2	52165.8	未检出	0	0	
HC+DAR3	53215.2	未检出	11529758	1	

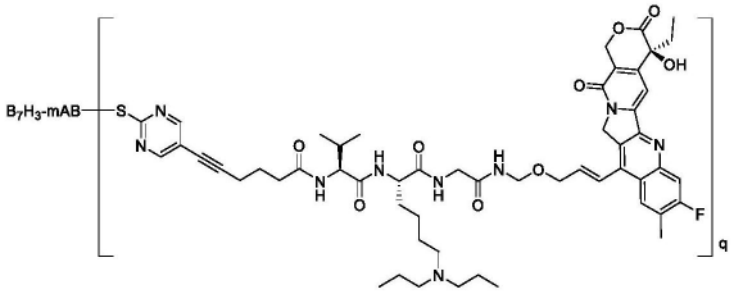
[2654] 实施例4.1.11:B7H3-ADC-11的制备

[2655] 用化合物DL-045代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-045与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-11。质谱法测定DAR值为7.5。

[2656] 

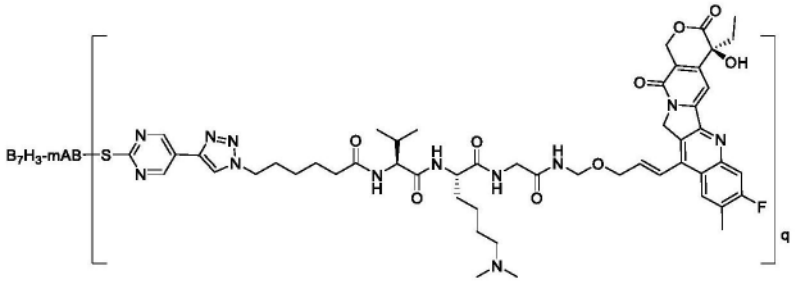
[2657] 实施例4.1.12:B7H3-ADC-12的制备

[2658] 用化合物DL-046代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-046与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-12。质谱法测定DAR值为7.6。

[2659] 

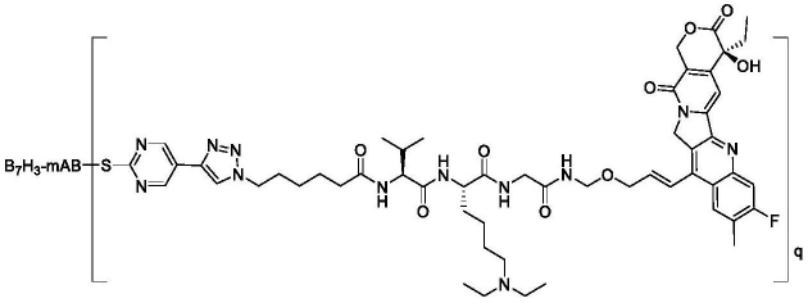
[2660] 实施例4.1.13:B7H3-ADC-13的制备

[2661] 用化合物DL-041代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-041与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-13。质谱法测定DAR值为7.8。

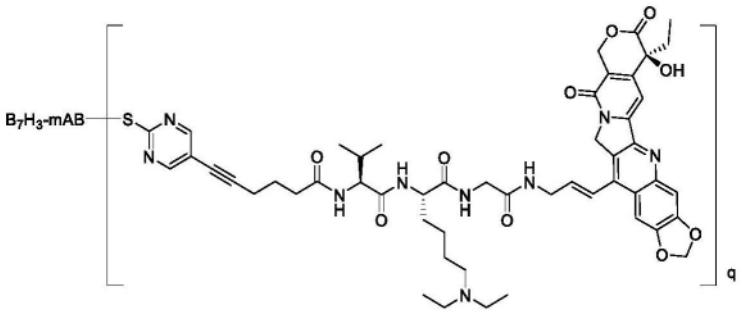
[2662] 

[2663] 实施例4.1.14:B7H3-ADC-14的制备

[2664] 用化合物DL-042代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-042与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-14。质谱法测定DAR值为7.9。

[2665] 

[2666] 实施例4.1.15:B7H3-ADC-15的制备

[2667] 

[2668] 4.1.15.1B7H3-ADC-15(DAR8)样品制备

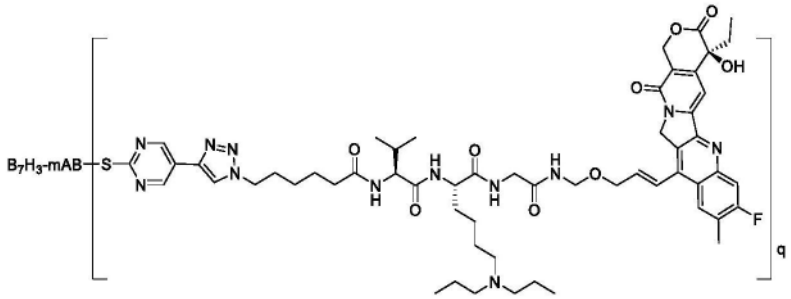
[2669] 用化合物DL-027代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-027与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-15(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.8。

[2670] 4.1.15.2B7H3-ADC-15(DAR4)样品制备

[2671] 用化合物DL-027代替实施例4.1.7.3B7H3-ADC-07(DAR4)的制备的化合物DL-037,得到DL-027与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-15(DAR4),质谱法测定DAR值为3.4。

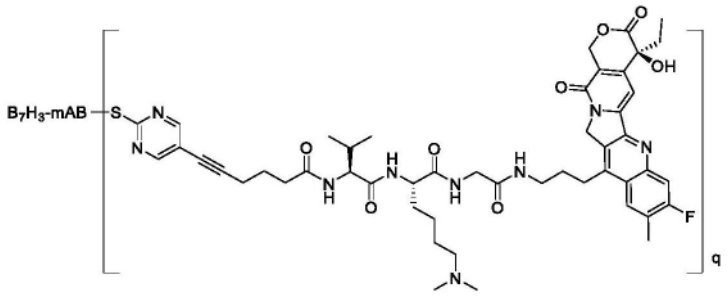
[2672] 实施例4.1.16:B7H3-ADC-16的制备

[2673] 用化合物DL-043代替实施例4.1.1的化合物DL-001,得到DL-043与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-16。质谱法测定DAR值为7.4。

[2674] 

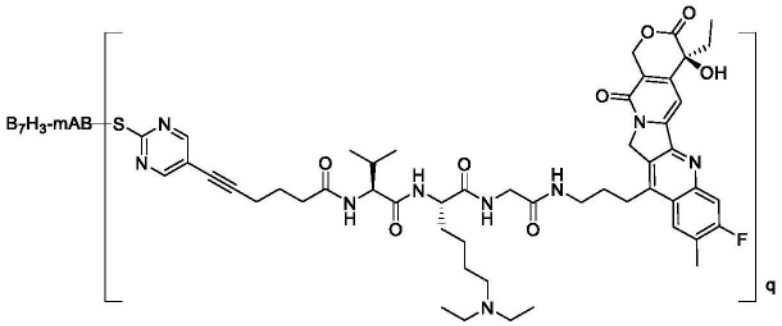
[2675] 实施例4.1.17:B7H3-ADC-17的制备

[2676] 用化合物DL-024代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-024与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-17,质谱法测定DAR值。

[2677] 

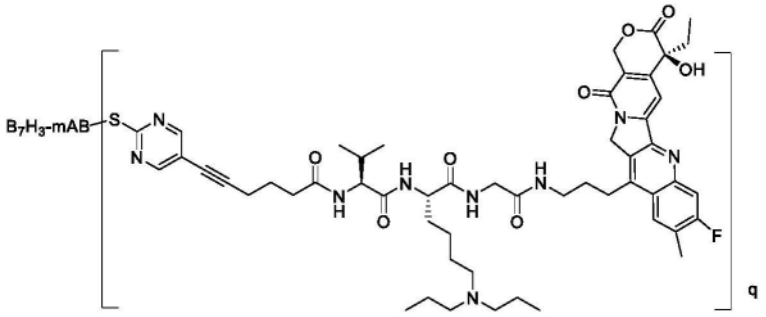
[2678] 实施例4.1.18:B7H3-ADC-18的制备

[2679] 用化合物DL-025代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-025与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-18,质谱法测定DAR值8.0。

[2680] 

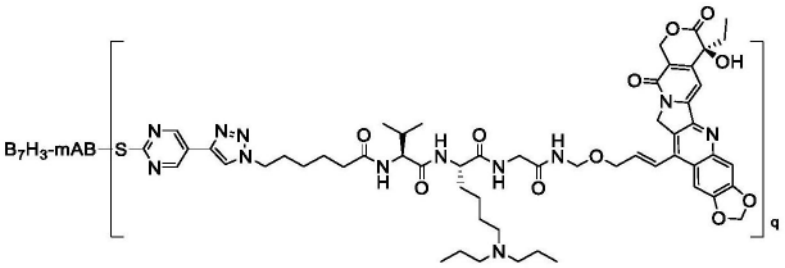
[2681] 实施例4.1.19:B7H3-ADC-19的制备

[2682] 用化合物DL-026代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-026与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-19,质谱法测定DAR值8.0。

[2683] 

[2684] 实施例4.1.20:B7H3-ADC-20的制备

[2685] 用化合物DL-038代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-038与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-20,质谱法测定DAR值为7.3。

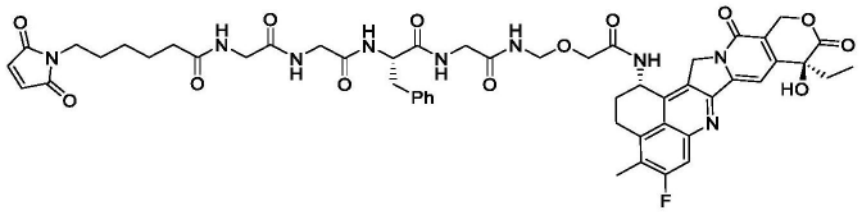
[2686] 

[2687]

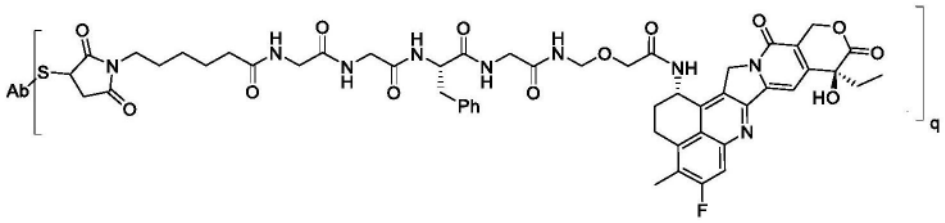
肽链	理论值	实测值	面积	比例	DAR
LC	23245	23247.17	29131808	0.323854	7.306055
LC+DAR1	24331.5	24334.63	60821684	0.676146	
HC	50375	未检出	0	0	
HC+DAR1	51461	未检出	0	0	
HC+DAR2	52547.83	52547.83	159238	0.023119	
HC+DAR3	53633.84	53633.84	6728635	0.976881	

[2688] 实施例4.1.21:B7H3-ADC-21的制备

[2689] 参照CN104755494B制备获得药物-连接体化合物如下,

[2690] 

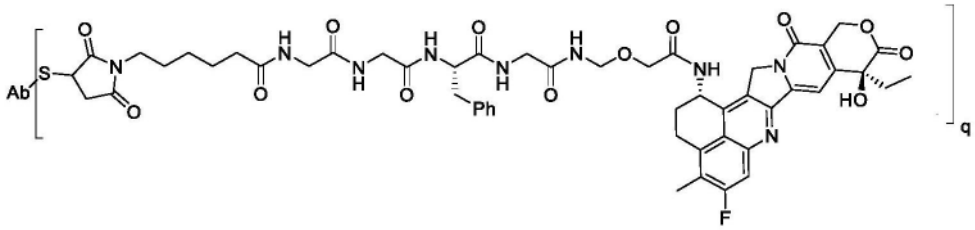
[2691] 用上述药物-连接体化合物代替实施例4.1.7.1制备方法B的化合物DL-037,获得B7H3-ADC-21(DAR8),其结构如下,并质谱法测定DAR值为7.8。

[2692] 

[2693] 用上述药物-连接体化合物代替实施例4.1.7.2的化合物DL-037,获得B7H3-ADC-21(DAR2),其结构如下,并质谱法测定DAR值为2.0。

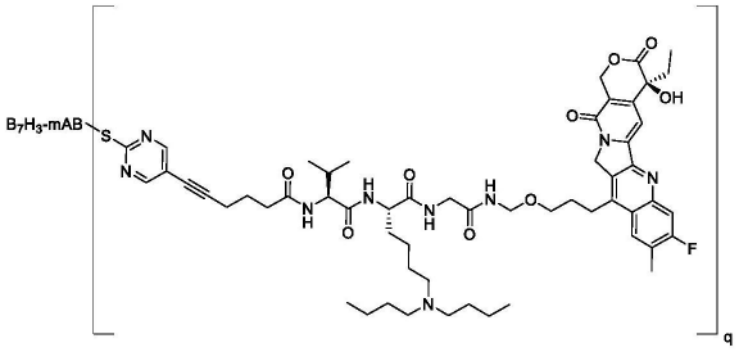
[2694] 用上述药物-连接体化合物代替实施例4.1.7.3的化合物DL-037,对照卡尼1替换2E3-02抗体,获得B7H3-C1-ADC-21(DAR4),其结构如下,并质谱法测定DAR值为4.5。

[2695] 用上述药物-连接体化合物代替实施例4.1.7.4的化合物DL-037,获得B7H3-ADC-21(DAR6),其结构如下,并质谱法测定DAR值为5.4。

[2696] 

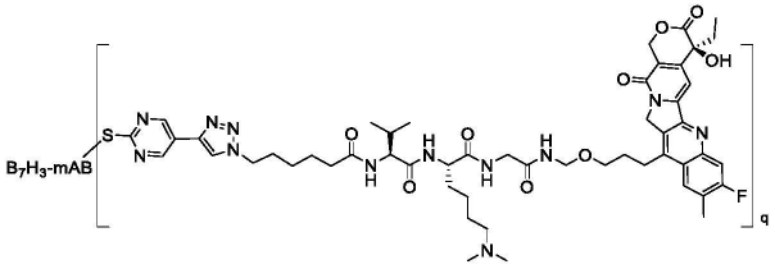
[2697] 实施例4.1.22:B7H3-ADC-22的制备

[2698] 用化合物DL-048代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-048与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-22,质谱法测定DAR值为8.0。

[2699] 

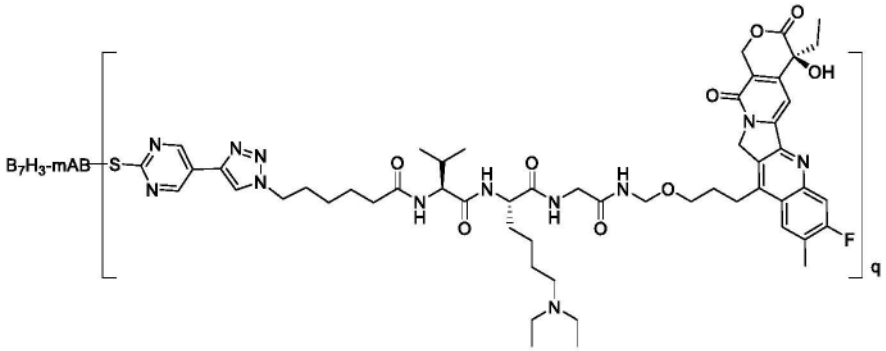
[2700] 实施例4.1.23:B7H3-ADC-23的制备

[2701] 用化合物DL-031代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-031与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-23,质谱法测定DAR值为8.0。

[2702] 

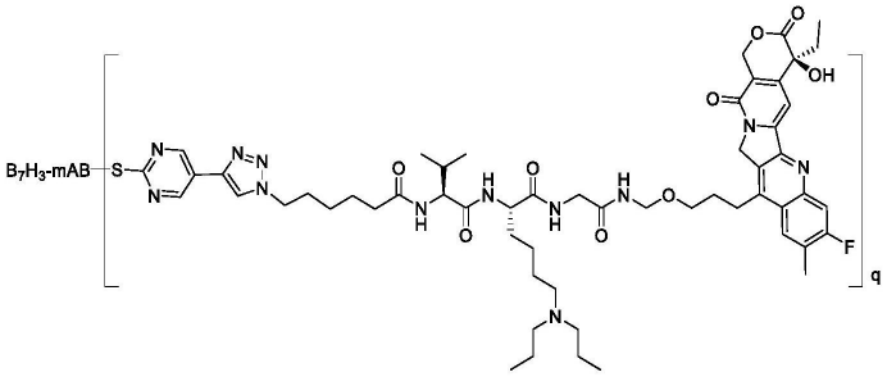
[2703] 实施例4.1.24:B7H3-ADC-24的制备

[2704] 用化合物DL-032代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-032与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-24,质谱法测定DAR值为8.0。

[2705] 

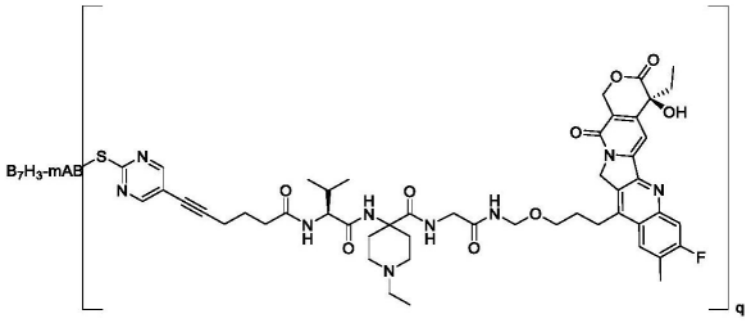
[2706] 实施例4.1.25:B7H3-ADC-25的制备

[2707] 用化合物DL-033代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-033与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-25,质谱法测定DAR值为8.0。

[2708] 

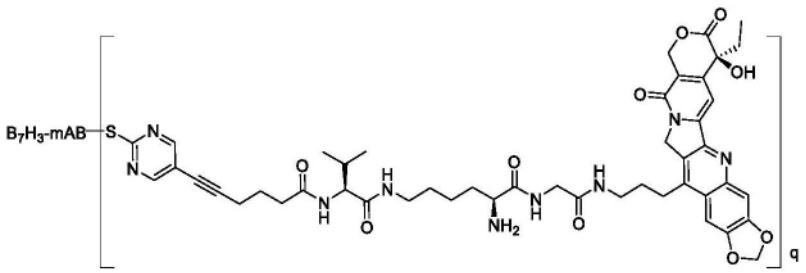
[2709] 实施例4.1.27:B7H3-ADC-27的制备

[2710] 用化合物DL-050代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-050与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-27,质谱法测定DAR值为8.0。

[2711] 

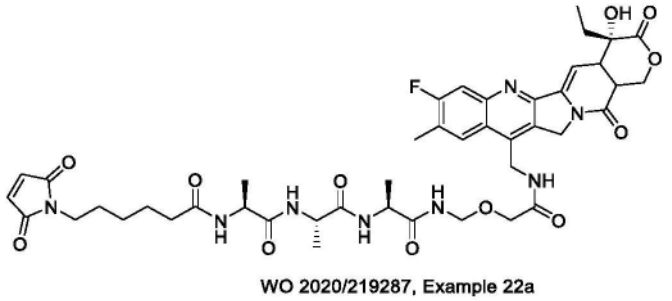
[2712] 实施例4.1.28:B7H3-ADC-28的制备

[2713] 用化合物DL-021代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-021与B7H3抗体的偶联产物B7H3-ADC-28,质谱法测定DAR值为8.0。

[2714] 

[2715] 实施例4.1.29:B7H3-ADC-32的制备

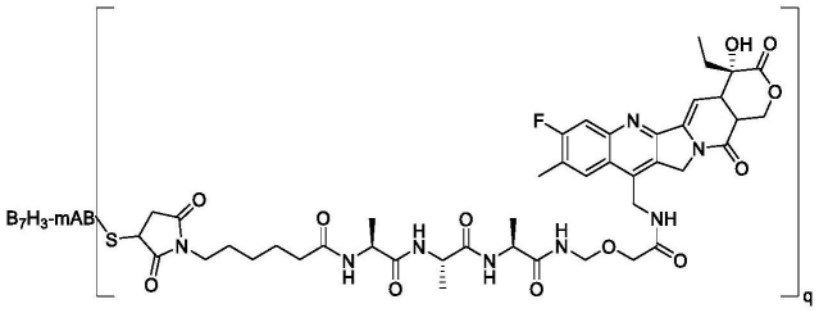
[2716] 参照WO2020219287实施例16制备获得药物-连接体化合物如下,

[2717] 

WO 2020/219287, Example 22a

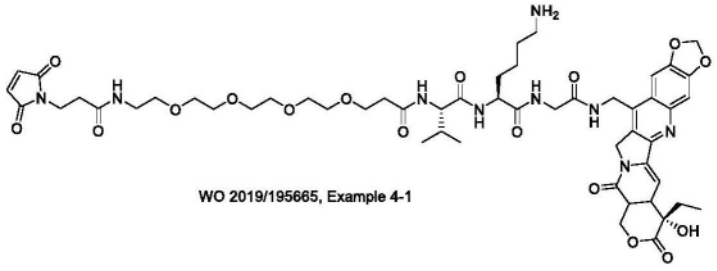
[2718] 用上述药物-连接体化合物代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,获得B7H3-ADC-32。

[2719] 质谱法测定DAR值为7.3。

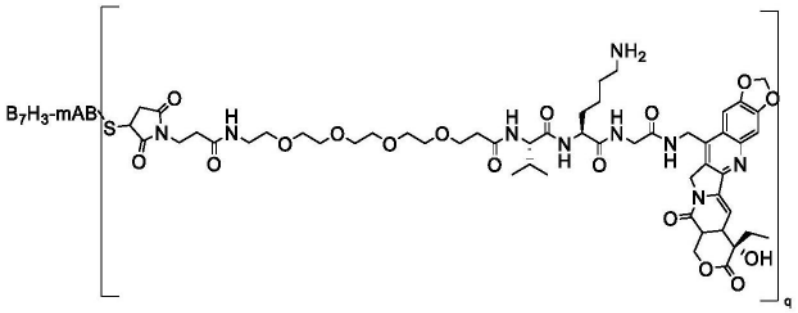
[2720] 

[2721] 实施例4.1.30:B7H3-ADC-33的制备

[2722] 参照WO2019195665实施例4-1制备获得药物-连接体化合物如下,

[2723] 

WO 2019/195665, Example 4-1

[2724] 

[2725] 4.1.30.1B7H3-ADC-33(DAR8)样品制备

[2726] 用上述药物-连接体化合物代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,获得B7H3-ADC-33(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.4。

[2727] 4.1.30.2B7H3-ADC-33(DAR4)样品制备

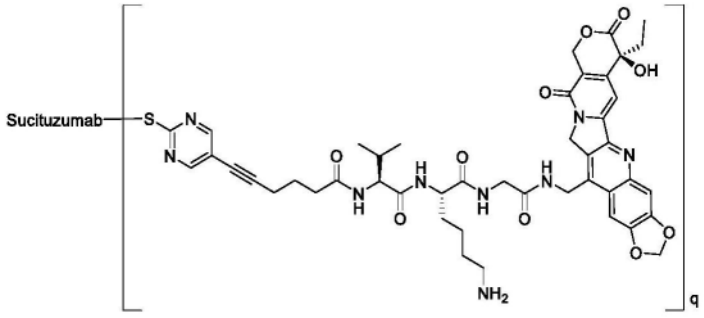
[2728] 用上述药物-连接体化合物代替实施例4.1.7.3B7H3-ADC-07(DAR4)的制备的化合物DL-037,获得B7H3-ADC-33(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.9。

[2729] 注:B7H3-mAB为2E3-02抗体,B7H3-AB为B7H3-C1。

[2730] 4.2:Trop2-ADC的制备

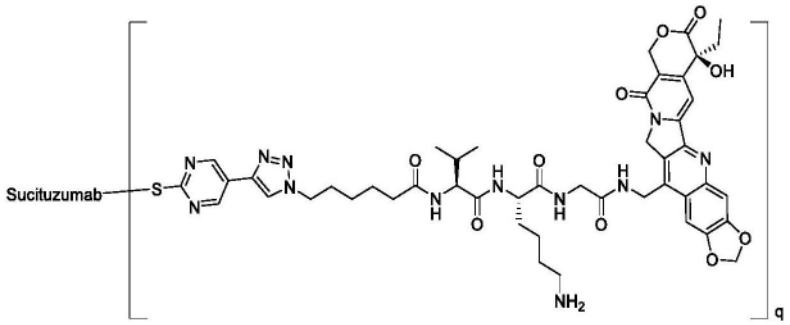
[2731] 实施例4.2.1Trop2-ADC-01(DAR8)的制备

[2732] 取0.3mL Sacituzumab抗体(抗Trop-2,33.5mg/mL),用0.25mL 20mM PB+150mM NaCl+20mM依地酸钠溶液(pH 7.6)稀释,后加入0.45mL 20mM PB+150mM NaCl溶液(pH 7.6)混匀,以1M K_2HPO_4溶液调pH至7.4,加入10mM TCEP(三(2-羧乙基)膦,0.033ml,0.33μmol)溶液混匀,室温放置30min。向上述溶液体系加入DL001(1.35mg,20倍抗体物质摩尔数量)的二甲基亚砜(0.1mL)溶液,混匀,室温静置2h,完毕后加入100mM半胱氨酸6.1μl终止反应。最后采用G-25凝胶柱将缓冲液置换为pH6.44的20mM PB缓冲溶液。得到DL-001与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-01(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.8。

[2733] 

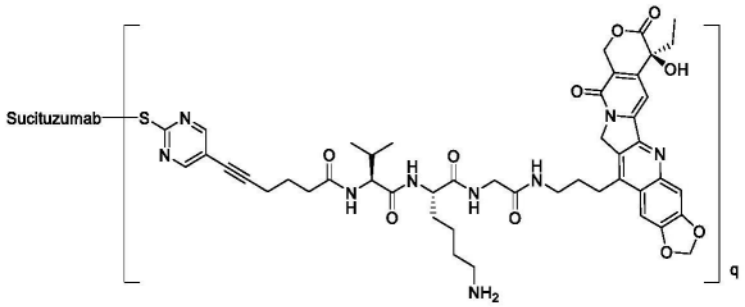
[2734] 实施例4.2.2:Trop2-ADC-02(DAR8)的制备

[2735] 用化合物DL-009代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-009与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-02(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.9。

[2736] 

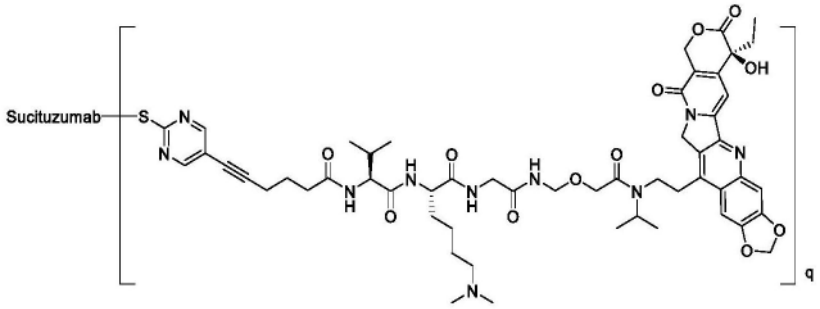
[2737] 实施例4.2.3:Trop2-ADC-03(DAR8)的制备

[2738] 用化合物DL-011代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-011与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-03(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.8。

[2739] 

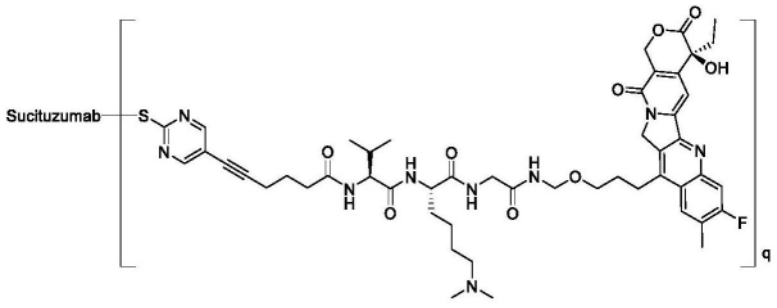
[2740] 实施例4.2.4:Trop2-ADC-04(DAR8)的制备

[2741] 用化合物DL-015代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-015与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-04(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.9。

[2742] 

[2743] 实施例4.2.5:Trop2-ADC-05(DAR8)的制备

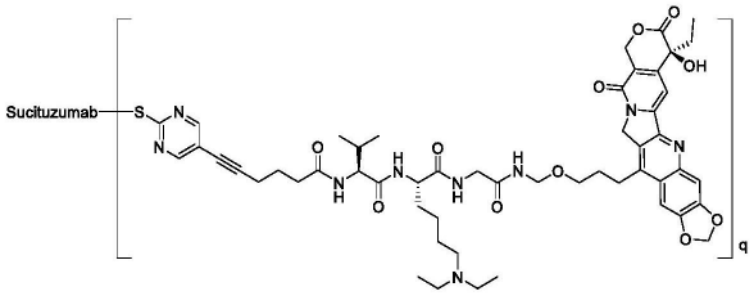
[2744] 用化合物DL-018代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-018与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-05(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.8。

[2745] 

[2746] 实施例4.2.6:Trop2-ADC-06(DAR8)的制备

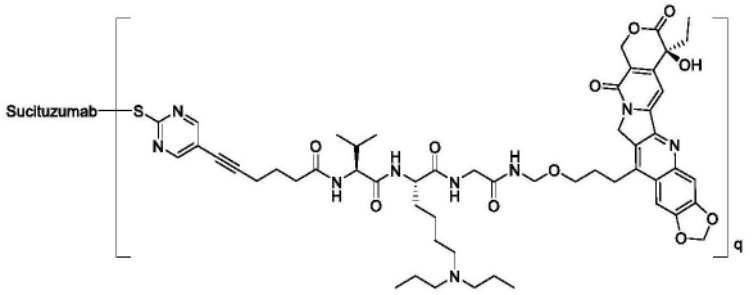
[2747] 用化合物DL-036代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-036与Sacituzumab抗

体的偶联产物Trop2-ADC-06(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.7。

[2748] 

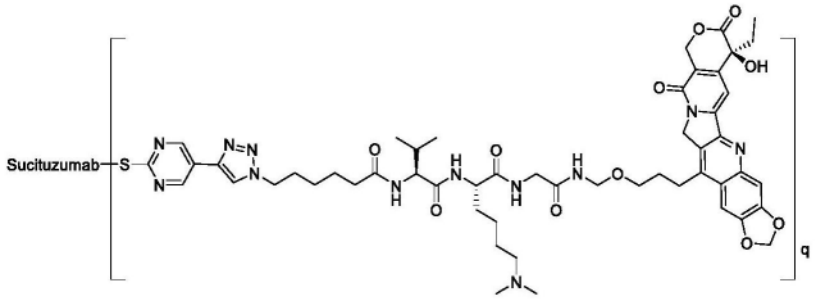
[2749] 实施例4.2.7:Trop2-ADC-07(DAR8)的制备

[2750] 用化合物DL-037代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-037与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-07(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.7。

[2751] 

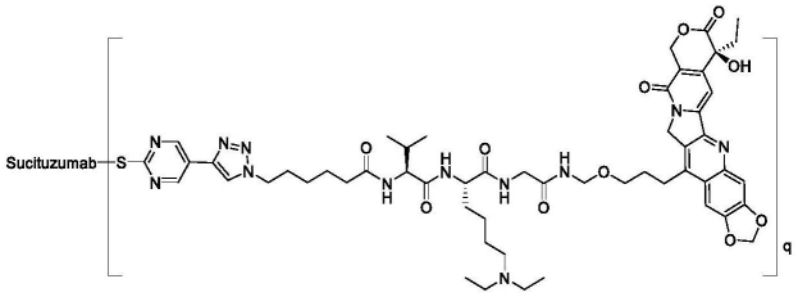
[2752] 实施例4.2.8:Trop2-ADC-08(DAR8)的制备

[2753] 用化合物DL-028代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-028与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-08(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.3。

[2754] 

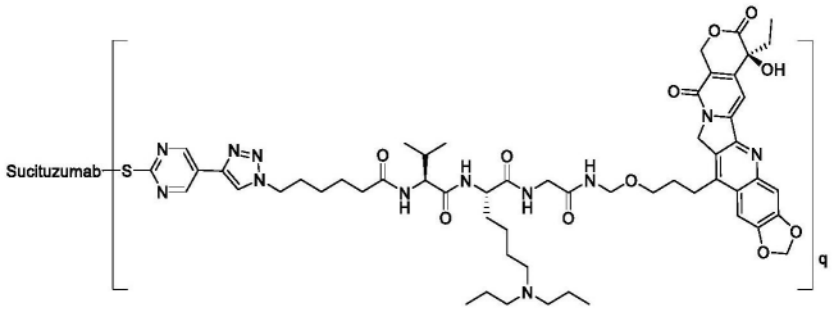
[2755] 实施例4.2.9:Trop2-ADC-09(DAR8)的制备

[2756] 用化合物DL-029代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-029与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-09(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.6。

[2757] 

[2758] 实施例4.2.10:Trop2-ADC-10(DAR8)的制备

[2759] 用化合物DL-030代替实施例4.2.1的化合物DL-001,得到DL-030与Sacituzumab抗体的偶联产物Trop2-ADC-10(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.6。

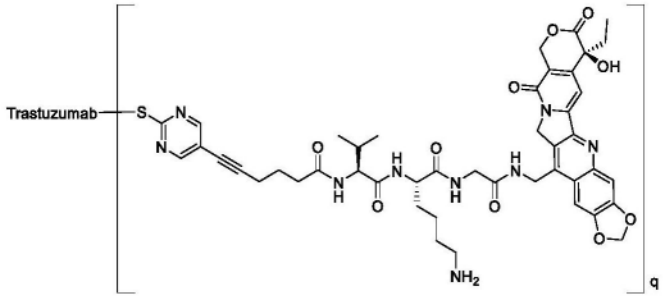
[2760] 

[2761] 4.3:Her2-ADC的制备

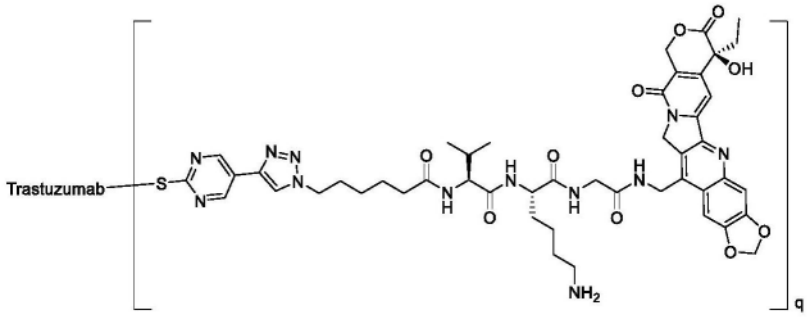
[2762] 实施例4.3.1:Her2-ADC-01(DAR8)的制备

[2763] 在37℃条件下,向Trastuzumab的PBS缓冲溶液(pH=6.5,1ml,10.05mg/ml,0.0677μmol)加入TCEP(10mM,三(2-羧乙基)膦,0.033ml,0.33μmol),溶液混匀,37℃条件下放置3小时。向上述溶液体系加入DL001(1.35mg,20倍抗体物质摩尔数量)的二甲基亚砜(0.1mL)溶液,混匀,室温静置3h,完毕后加入100mM半胱氨酸6.1μl终止反应。最后采用G-25凝胶柱将缓冲液置换为pH6.44的20mM PB缓冲溶液。得到DL-001与Trastuzumab抗体的偶联产物Her2-ADC-01(DAR8)。

[2764] 质谱法测定DAR值为7.9。

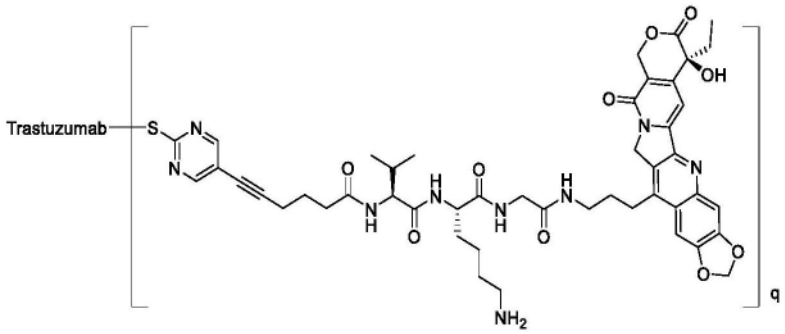
[2765] 

[2766] 实施例4.3.2:Her2-ADC-02(DAR8)的制备

[2767] 

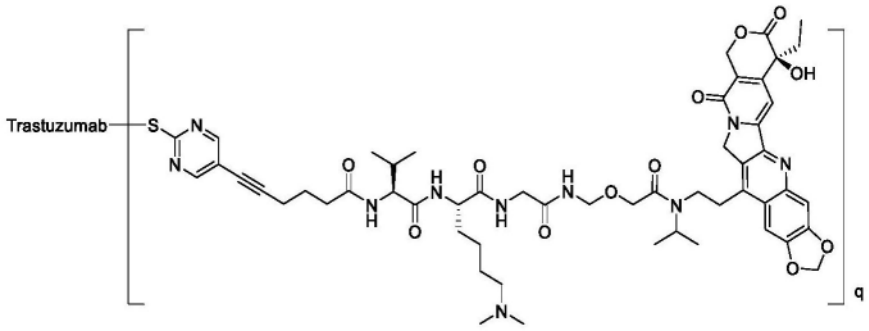
[2768] 用化合物DL-009代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-009与Trastuzumab抗体偶联的产物Her2-ADC-02(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.9。

[2769] 实施例4.3.3:Her2-ADC-03(DAR8)的制备

[2770] 

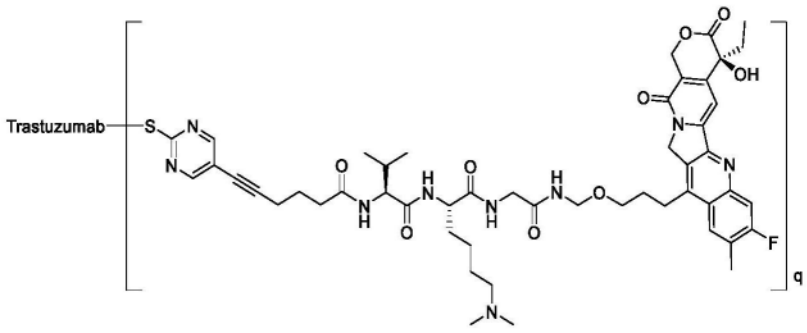
[2771] 用化合物DL-011代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-011与Trastuzumab抗体偶联的产物Her2-ADC-03(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.8。

[2772] 实施例4.3.4:Her2-ADC-04(DAR8)的制备

[2773] 

[2774] 用化合物DL-015代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-015与Trastuzumab抗体偶联的产物Her2-ADC-04(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.9。

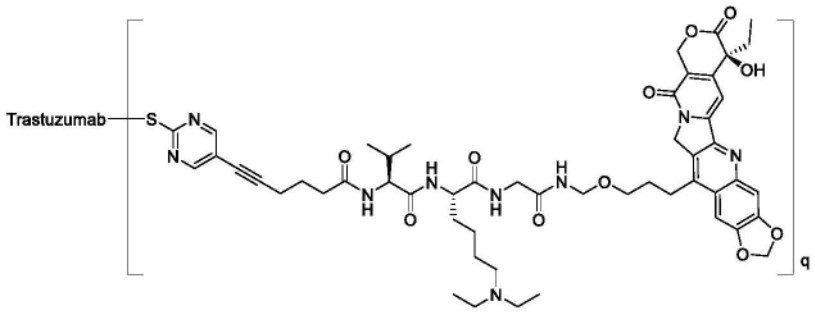
[2775] 实施例4.3.5:Her2-ADC-05(DAR8)的制备

[2776] 

[2777] 用化合物DL-018代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-018与Trastuzumab抗体偶联的产物Her2-ADC-05(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.9。

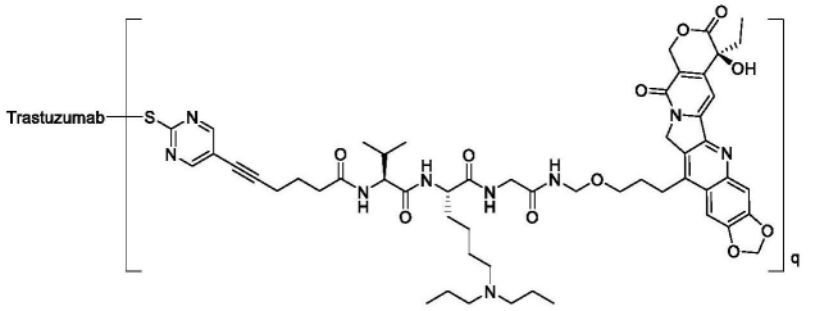
[2778] 实施例4.3.6:Her2-ADC-06(DAR8)的制备

[2779] 用化合物DL-036代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-036与Trastuzumab抗体的偶联产物Her2-ADC-06(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.7。

[2780] 

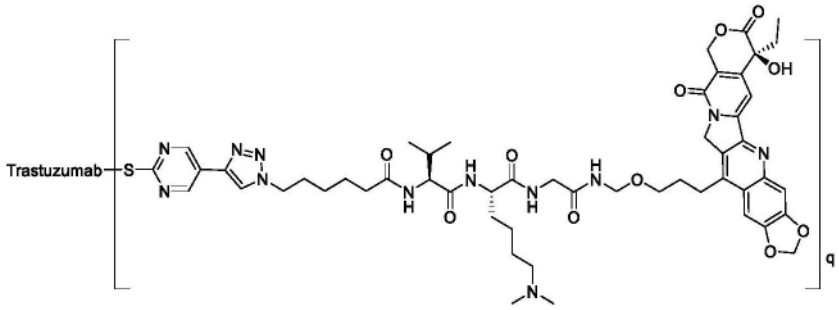
[2781] 实施例4.3.7:Her2-ADC-07(DAR8)的制备

[2782] 用化合物DL-037代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-037与Trastuzumab抗体的偶联产物Her2-ADC-07(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.7。

[2783] 

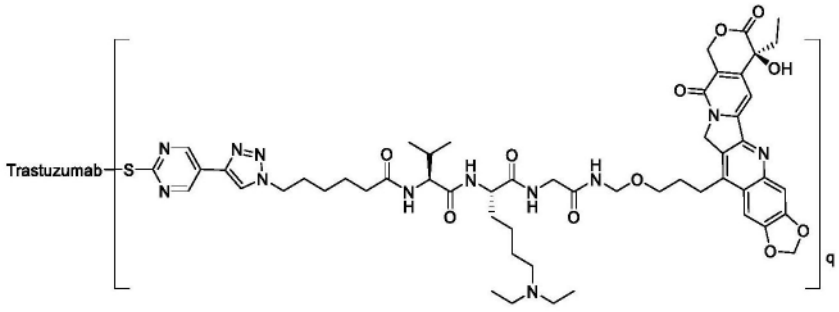
[2784] 实施例4.3.8:Her2-ADC-08(DAR8)的制备

[2785] 用化合物DL-028代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-028与Trastuzumab抗体的偶联产物Her2-ADC-08(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.3。

[2786] 

[2787] 实施例4.3.9:Her2-ADC-09(DAR8)的制备

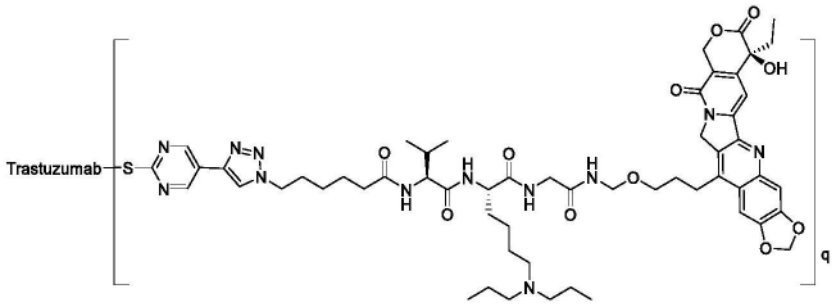
[2788] 用化合物DL-029代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-029与Trastuzumab抗体的偶联产物Her2-ADC-09(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.6。

[2789] 

[2790] 实施例4.3.10:Her2-ADC-10(DAR8)的制备

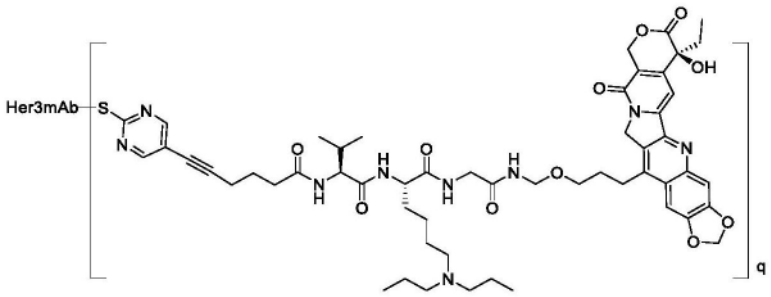
[2791] 用化合物DL-030代替实施例4.3.1的化合物DL-001,得到DL-030与Trastuzumab抗

体的偶联产物Her2-ADC-10(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.6。

[2792] 

[2793] 4.4:Her3-ADC的制备

[2794] 实施例4.4.1:Her3-ADC-07的制备

[2795] 

[2796] 4.4.1.1Her3-ADC-07(DAR8)样品制备

[2797] 将抗Her3抗体202-2-1 30mg,用稀释液(20mM PB+105mM NaCl,pH 7.7)稀释,加入终浓度为5mM的依地酸钠溶液,混匀;加入抗体4.5倍当量的TCEP溶液,混匀,室温放置30分钟;向上述溶液体系加入抗体10倍当量的溶解于二甲基亚砜中的DL-037,混匀,室温静置2小时,得到偶联后样品,反应结束后使用30KDa的超滤管将样品置换到pH为5.5的10mM组氨酸缓冲液中并去除低分子物质,最后将样品浓缩以获得含有202-2-1抗体ADC组合物的溶液Her3-ADC-07(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.98。

[2798] 4.4.1.2Her3-ADC-07(DAR4)样品制备

[2799] 将抗Her3抗体202-2-1 30mg,用稀释液(20mM PB+105mM NaCl,pH 7.7)稀释,加入终浓度为5mM的依地酸钠溶液,混匀;加入抗体4.5倍当量的TCEP溶液,混匀,室温放置30分钟;向上述溶液体系加入抗体4.8倍当量的溶解于二甲基亚砜中的DL-037,混匀,室温静置2小时,得到偶联后样品,反应结束后使用30KDa的超滤管将样品置换到pH为5.5的10mM组氨酸缓冲液中并去除低分子物质,最后将样品浓缩以获得含有202-2-1抗体ADC组合物的溶液Her3-ADC-07(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.5。

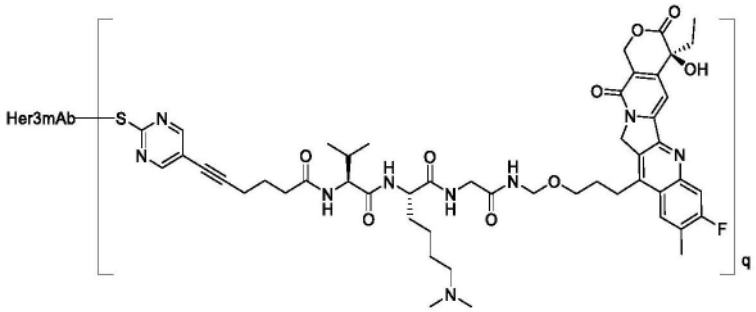
[2800] 4.4.1.3Her3-ADC-07(DAR6)样品制备

[2801] 将抗Her3抗体202-2-1 30mg,用稀释液(20mM PB+105mM NaCl,pH 7.7)稀释,加入终浓度为5mM的依地酸钠溶液,混匀;加入抗体4.5倍当量的TCEP溶液,混匀,室温放置30分钟;向上述溶液体系加入抗体7.2倍当量的溶解于二甲基亚砜中的DL-037,混匀,室温静置2小时,得到偶联后样品,反应结束后使用30KDa的超滤管将样品置换到pH为5.5的10mM组氨酸缓冲液中并去除低分子物质,最后将样品浓缩以获得含有202-2-1抗体ADC组合物的溶液Her3-ADC-07(DAR6)。质谱法测定DAR值为5.8。

[2802] 实施例4.4.2:Her3-ADC-05的制备

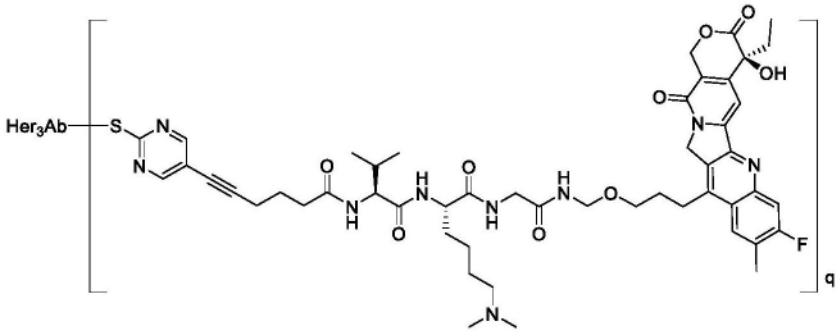
[2803] 4.4.2.1Her3-ADC-05(DAR4)样品制备

[2804] 利用DL-018代替实施例4.4.1.2的化合物DL-037,得到DL-018与202-2-1抗体的偶联产物Her3-ADC-05(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.0。

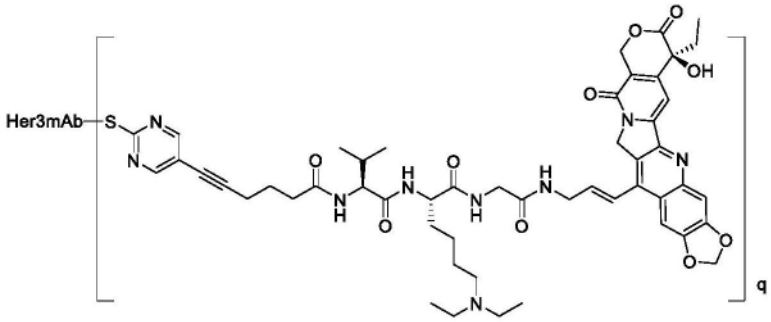
[2805] 

[2806] 4.4.2.2Her3-C3-ADC-05(DAR4)(DAR4)样品制备

[2807] 利用DL-018代替实施例4.4.1.2的化合物DL-037,抗体Her3-C3代替实施例4.4.1.2的抗Her3抗体202-2-1,得到DL-018与Her3-C3的偶联产物Her3-C3-ADC-05(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.7。

[2808] 

[2809] 实施例4.4.3:Her3-ADC-15的制备

[2810] 

[2811] 4.4.3.1Her3-ADC-15(DAR8)样品制备

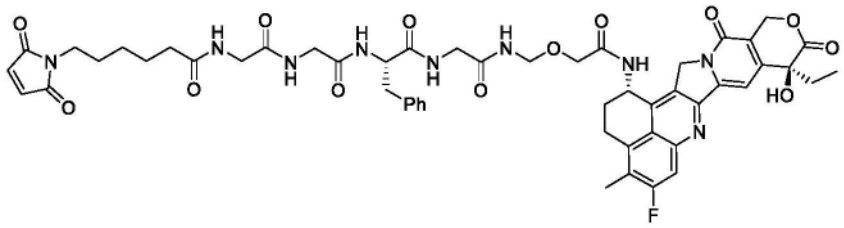
[2812] 利用DL-027代替实施例4.4.1.1的化合物DL-037,得到DL-027与202-2-1抗体的偶联产物Her3-ADC-15(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.9。

[2813] 4.4.3.2Her3-ADC-15(DAR2)样品制备

[2814] 利用DL-027代替实施例4.1.7.2的化合物DL-037,抗Her3抗体202-2-1代替实施例4.1.7.2的2E3-02抗体,得到DL-027与202-2-1抗体的偶联产物Her3-ADC-15(DAR2)。质谱法测定DAR值为2。

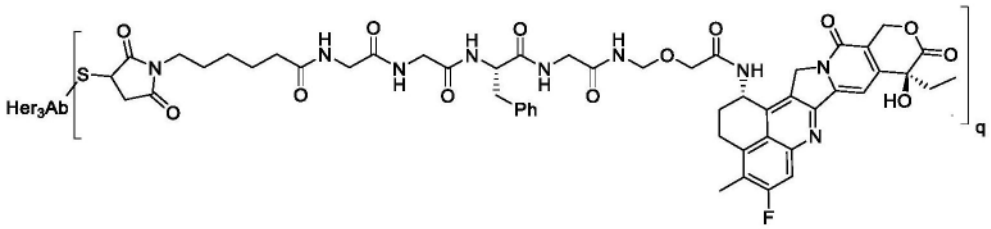
[2815] 实施例4.4.4:Her3-ADC-21的制备

[2816] 参照CN104755494B制备获得药物-连接体化合物如下,

[2817] 

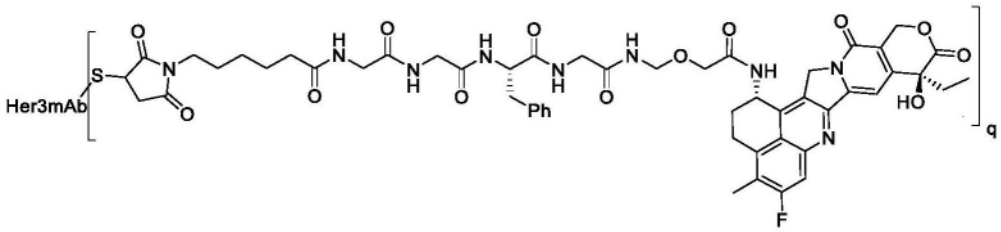
[2818] 4.4.4.1Her3-C3-ADC-21(DAR4)样品制备

[2819] 利用上述药物-连接体化合物代替实施例4.4.1.2的化合物DL-037,抗体Her3-C3代替实施例4.4.1.2的抗Her3抗体202-2-1,得到Her3-C3-ADC-21(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.4。

[2820] 

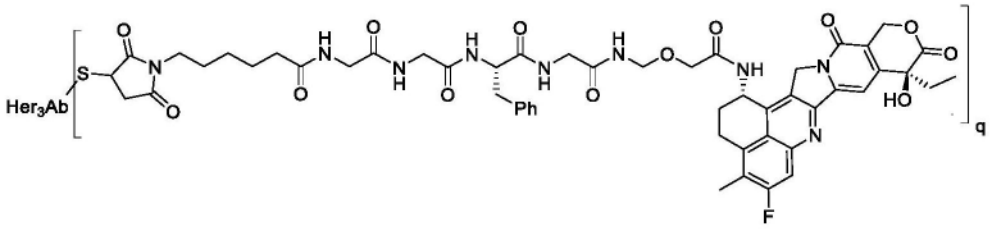
[2821] 4.4.4.2Her3-ADC-21(DAR4)样品制备

[2822] 利用上述药物-连接体化合物代替实施例4.4.1.2的化合物DL-037,得到上述药物-连接体化合物与202-2-1抗体的偶联产物Her3-ADC-21(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.1。

[2823] 

[2824] 4.4.4.3Her3-C3-ADC-21(DAR8)样品制备

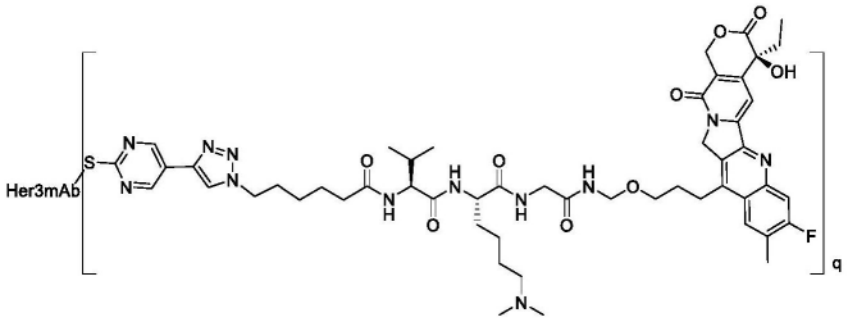
[2825] 利用上述药物-连接体化合物代替实施例4.4.1.1的化合物DL-037,抗体Her3-C3代替实施例4.4.1.1的抗Her3抗体202-2-1,得到Her3-C3-ADC-21(DAR8)。质谱法测定DAR值为9.5。

[2826] 

[2827] 实施例4.4.5:Her3-ADC-23的制备

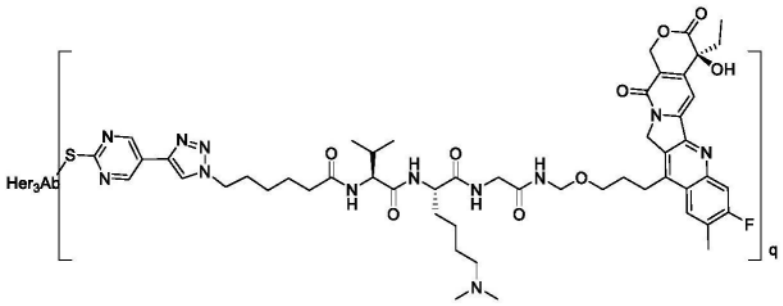
[2828] 4.4.5.1Her3-ADC-23(DAR4)样品制备

[2829] 利用DL-031代替实施例4.4.1.2的化合物DL-037,得到DL-031与202-2-1抗体的偶联产物Her3-ADC-23(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.2.

[2830] 

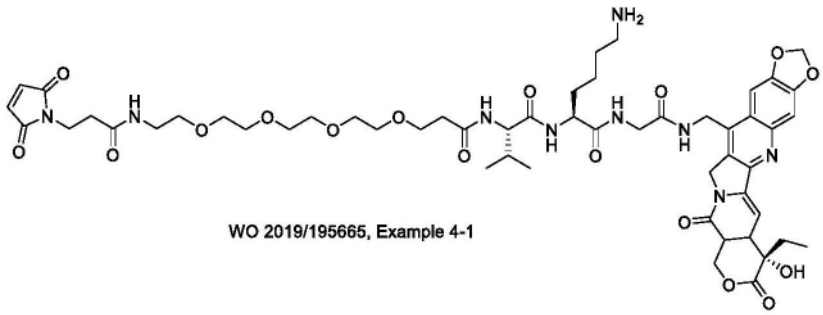
[2831] 4.4.5.2Her3-C3-ADC-23(DAR4)样品制备

[2832] 利用DL-031代替实施例4.4.1.2的化合物DL-037,用抗体Her3-C3代替4.4.1.2的Her3抗体202-2-1,得到DL-031与抗体Her3-C3的偶联产物Her3-C3-ADC-23(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.9。

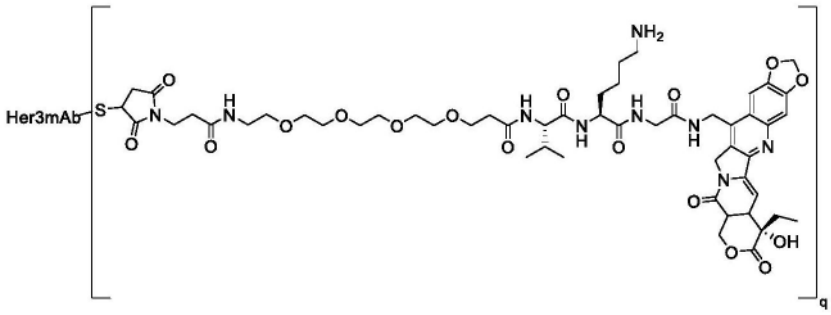
[2833] 

[2834] 实施例4.4.6:Her3-ADC-33的制备

[2835] 参照WO2019195665实施例4-1制备获得药物-连接体化合物如下,

[2836] 

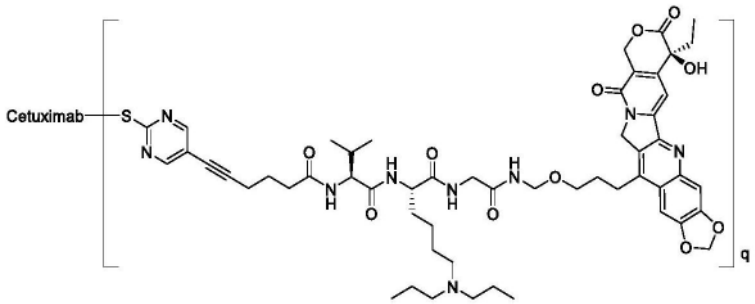
[2837] 用上述药物-连接体化合物代替实施例4.4.1.2的化合物DL-037,得到上述药物-连接体化合物与202-2-1抗体的偶联产物Her3-ADC-33(DAR4)。质谱法测定DAR值为5.6。

[2838] 

[2839] 注:Her3mAb为202-2-1抗体,Her3Ab为抗体Her3-C3。

[2840] 4.5:EGFR-ADC的制备

[2841] 4.5.1EGFR-ADC-07的制备

[2842] 

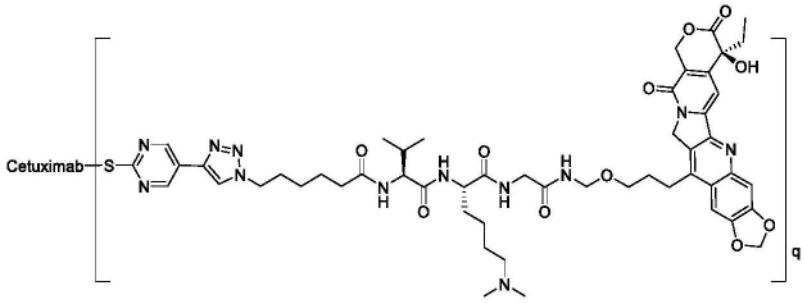
[2843] 4.5.1.1EGFR-ADC-07(DAR8)样品制备

[2844] 用Cetuximab抗体代替实施例4.1.7制备方法B的2E3-02抗体,得到DL-037与Cetuximab抗体的偶联产物EGFR-ADC-07(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.8。

[2845] 4.5.1.2EGFR-ADC-07(DAR4)样品制备

[2846] 用Cetuximab抗体代替实施例4.1.7.3B7H3-ADC-07(DAR4)制备方法的2E3-02抗体,得到DL-037与Cetuximab抗体的偶联产物EGFR-ADC-07(DAR4)。质谱法测定DAR值为5.0。

[2847] 4.5.2EGFR-ADC-08的制备

[2848] 

[2849] 4.5.2.1EGFR-ADC-08(DAR8)样品制备

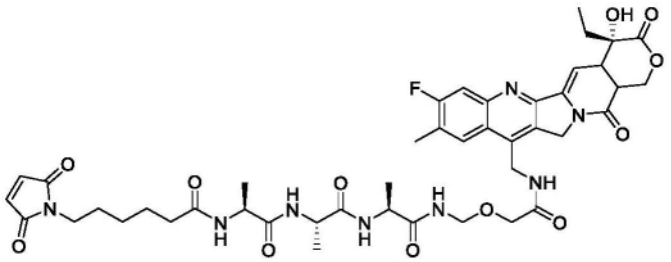
[2850] 用Cetuximab抗体代替实施例4.1.7制备方法B的2E3-02抗体,用DL-028代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-028与Cetuximab抗体的偶联产物EGFR-ADC-08(DAR8)。质谱法测定DAR值为7.3。

[2851] 4.5.2.2EGFR-ADC-08(DAR4)样品制备

[2852] 用Cetuximab抗体代替实施例4.1.7.3B7H3-ADC-07(DAR4)制备方法的2E3-02抗体,用DL-028代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-028与Cetuximab抗体的偶联产物EGFR-ADC-08(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.3。

[2853] 4.5.3EGFR-ADC-32(DAR4)样品制备

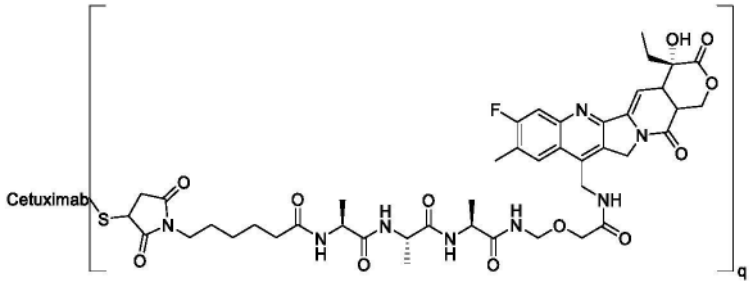
[2854] 参照WO2020219287实施例16制备获得药物-连接体化合物如下,

[2855] 

WO 2020/219287, Example 22a

[2856] 用Cetuximab抗体代替实施例4.1.7.3B7H3-ADC-07(DAR4)制备方法的2E3-02抗体,用上述药物-连接体化合物代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到上述药

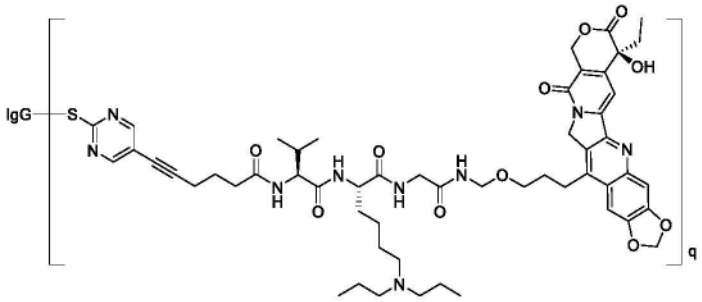
物-连接体化合物与Cetuximab抗体的偶联产物EGFR-ADC-32(DAR4)。质谱法测定DAR值为4.9。

[2857] 

[2858] 4.6:IgG-ADC的制备

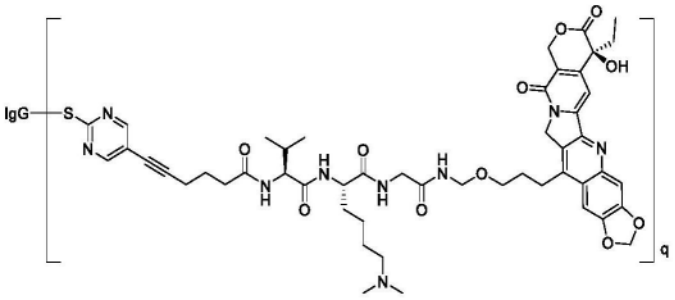
[2859] 实施例4.6.1:IgG1-ADC-07的制备

[2860] 用IgG1同型抗体(抗鸡融菌酶抗体,苏州宜联生物医药有限公司制备)代替实施例4.1.7制备方法B的2E3-02抗体,得到DL-037与IgG1抗体的偶联产物IgG1-ADC-07。质谱法测定DAR值为8.0。

[2861] 

[2862] 实施例4.6.2:IgG1-ADC-04的制备

[2863] 用IgG1同型抗体(抗鸡融菌酶抗体,苏州宜联生物医药有限公司制备)代替实施例4.1.7制备方法B的2E3-02抗体,用化合物DL-019代替实施例4.1.7制备方法B的化合物DL-037,得到DL-019与IgG1抗体的偶联产物IgG1-ADC-04。质谱法测定DAR值为7.9。

[2864] 

[2865] 五、ADC的鉴定

[2866] 实施例5.1.SEC-HPLC测定

[2867] 通过SEC-HPLC监测偶联反应,对抗体偶联物的SEC检测。

[2868] 仪器型号:Agilent 1200

[2869] 色谱条件:

[2870] 色谱柱:TSKgel G3000SWXL,7.8×300mm,5μm

[2871] 流动相:60mmol/L Na_2HPO_4,40mmol/L NaH_2PO_4,200mmol/L NaCl。

[2872] 柱温:室温样品室温度:8℃流速:0.8ml/min

[2873] 进样量:200μg检测波长:280nm。

[2874] 样品处理:用超纯水将样品B7H3-ADC-07(DAR8)稀释至10mg/ml,进样体积20μl。

[2875] 抗体偶联前后的SEC色谱图如图8所示,抗体偶联前后,主峰分子量约为150kD,可知偶联产物仍保持抗体的完整结构。

[2876] 实施例5.2.采用质谱法进行偶联后样品的DAR值测定之一

[2877] 色谱条件:

[2878] 色谱柱:PLRP-S,2.1*50mm,5μm;

[2879] 流动相A:0.1%FA/H2O;流动相B:0.1%FA/ACN

[2880] 柱温:30℃样品室温度:8℃流速:0.6ml/min进样量:2μl

[2881]

时间(min)	1	5	5.1	7	10
流动相A	90	40	10	90	90
流动相B	10	60	90	10	10

[2882] 样品处理:取B7H3-ADC-07样品50μg,加入1M DTT2μl,加超纯水至50μl稀释至约1.0mg/ml浓度,混匀,室温还原30min。

[2883] LC/MS型号:Agilent 1290-6545XT Q-TOF

[2884] 质谱条件:Gas temp:320℃,Drying Gas:Nebulizer:35psi;Sheath Gas Temp:350℃;sheath Gas Flow:111/min;m/z 500～3000。

[2885] 结果如下所示:

[2886]

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
	实测值	23247.41	24265.49	未检出	未检出
HC	理论值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
	实测值	未检出	未检出	未检出	53426.64

[2887] 表中,mAb表示未偶联的抗体;LC代表抗体轻链;HC代表抗体重链;DAR1代表包含轻链或重链偶联1个毒素分子的偶联物;DAR2代表包含轻链或重链偶联2个毒素分子的偶联物;DAR3代表包含轻链或重链偶联3个毒素分子的偶联物;其中,单抗理论分子量以GOF糖型计算。下文中mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3如上说明。

[2888] 测定2E3-02抗体轻链偶联0～1个毒素分子(LC,DAR1比例分别为1.0%,99.0%)、重链偶联0～3个毒素分子(mAb、DAR1、DAR2、DAR3的比例分别为0%,0%,0%,100%),由此计算B7H3-ADC-07(DAR8)的抗体-药物偶联比(DAR值)为7.98。

[2889] 实施例5.3采用质谱法进行偶联后样品的DAR值测定之二

[2890] 利用5.2相同的实验条件,对样品B7H3-ADC-07(DAR2),B7H3-ADC-07(DAR4),B7H3-ADC-07(DAR6)进行分子量测定,结果如下:

[2891]

样品名称	肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
B7H3-ADC-07(DAR2)	LC	理论值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		实测值	23247	未检出	未检出	未检出
	HC	理论值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		实测值	50372	51389	52408	53426
B7H3-ADC-07(DAR4)	LC	理论值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		实测值	23247	24265	未检出	未检出
	HC	理论值	50367	51384.4	52401.8	53419.2

[2892]

		实测值	50372	51389	52408	53426
B7H3-ADC-07(DAR6)	LC	理论值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		实测值	23247	24265	未检出	未检出
	HC	理论值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		实测值	50372	未检出	52408	53426

[2893] 并计算DAR值结果为:B7H3-ADC-07(DAR2)的DAR值为2.3;B7H3-ADC-07(DAR4)的DAR值为4.1;B7H3-ADC-07(DAR6)的DAR值为5.4。

[2894] 实施例5.4LC-MS测定Trop2-ADC-01分子量和药物-抗体比(DAR)

[2895] 对Trop2-ADC-01进行LCMS分子量分析。

[2896] 色谱测定条件:

[2897] 液相色谱柱:ACQUITUUPLC®Protein BEH C4 1.7μm,2.1mm x 100mm;

[2898] 流动相A:0.1%FA/98%H_2O/2%ACN;流动相B:0.1%FA/2%H_2O/98%ACN;

[2899] 流速:0.25mL/min;样品室温度:8℃;柱温:60℃;进样量:1μg;

[2900]

时间(分钟)	1	7	8	9	13
流动相A(体积%)	90	20	20	90	90
流动相B(体积%)	10	80	80	10	10

[2901] 质谱测定条件:

[2902] 质谱型号:Triple TOF 5600+;

[2903] GS1 60;GS2 60;CUR30;TEM600;ISVF5000;DP300;CE10 m/z600-5000。

[2904] Trop2-ADC-01理论分子量及实测分子量

[2905]

糖型		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	理论值	23334.0	24209.7	25085.4		
	实测值	未检出	24209.9	未检出	未检出	未检出
HC-G0F	理论值	50734.0	51609.7	52485.4	53361.1	56024.7
	实测值	未检出	未检出	52485.3	53361.2	未检出

[2906] 表中,mAb表示单克隆抗体;LC代表抗体轻链;HC表示抗体重链;DAR1表示包含一条抗体轻链/重链和一个细胞生物活性分子的偶联物;DAR2表示包含一条抗体轻链/重链和两个细胞生物活性分子的偶联物;DAR3表示包含一条抗体轻链/重链和三个细胞生物活性分子的偶联物;DAR4表示包含一条抗体轻链/重链和四个细胞生物活性分子的偶联物;糖型表示两条重链上的糖链结构:G0F表示岩藻糖化无半乳糖。

[2907] 抗体与化合物DL-001偶联后,轻重链分子量均发生变化,其中轻链偶联1个细胞生物活性分子、重链偶联2.9个细胞生物活性分子,由此推知整个抗体与细胞生物活性分子的偶联比(DAR)为7.8。

[2908] 实施例5.5LC-MS测定Her3-ADC分子量和药物-抗体比(DAR)

[2909] 检测:对Her3-ADC-07(DAR8)进行LC-MS分子量和DAR值分析,条件如下:

[2910] 色谱条件:

[2911] 色谱柱:PLRP-S,2.1*50mm,5μm;

[2912] 流动相A:0.1%FA/H2O;流动相B:0.1%FA/ACN

[2913] 柱温:30℃样品室温度:8℃流速:0.6ml/min进样量:2μl

[2914]

时间(min)	1	5	5.1	7	10
流动相A	90	40	10	90	90
流动相B	10	60	90	10	10

[2915] 样品处理:分别取样品50μg,加入1M DTT2μl,加超纯水至50μl稀释至约1.0mg/ml浓度,混匀,室温还原30min。

[2916] LC/MS型号:Agilent 1290-6545XT Q-TOF

[2917] 质谱条件:Gas temp:320℃,Drying Gas:Nebulizer:35psi;Sheath Gas Temp:350℃;sheath Gas Flow:111/min;m/z 500～3000。

[2918] 结果如下所示:

[2919]

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23243.8	24261.2	25278.6	26296
	实测值	未检出	24258	未检出	未检出
HC	理论值	50598.6	51616	52633.4	53650.8
	实测值	未检出	未检出	未检出	53646

[2920] 上表中,mAb表示未偶联的单克隆抗体;LC代表抗体轻链;HC代表抗体重链;DAR1代表包含轻链或重链偶联1个毒素分子的偶联物;DAR2代表包含轻链或重链偶联2个毒素分子的偶联物;DAR3代表包含轻链或重链偶联3个毒素分子的偶联物;其中,单抗理论分子量以G0F糖型计算。下文中mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3如上说明。

[2921] 检测结果显示,Her3-ADC-07(DAR8)上抗体轻链偶联0～1个毒素分子(LC,DAR1比例分别为0%,100%)、重链偶联0～3个毒素分子(mAb、DAR1、DAR2、DAR3的比例分别为0%,0%,0%,100%),由此计算Her3-ADC-07(DAR8)的药物抗体偶联比(DAR值)为8.0。

[2922] 可以理解,本公开的ADC都可以通过相同或类似的方法测定分子量和药物-抗体比(DAR)。

[2923] 六、生物活性分子以及抗体药物偶联的生物活性测定

[2924] 实施例6.1:生物活性分子对体外细胞活性的抑制活性检测一

[2925] 首先培养肿瘤细胞;将本公开的生物活性分子与肿瘤细胞进行共培养,然后添加CCK8试剂(东仁化学科技有限公司,Cat:CK04,Lot:JJ744),用酶标仪(厂家:Molecular Devices,型号:SpectraMax M2)读数(检测波长为450nm),检测线粒体内的脱氢酶的活性,以评价生物活性分子对细胞增殖的抑制作用。肿瘤细胞来源见表5。

[2926] 表5.

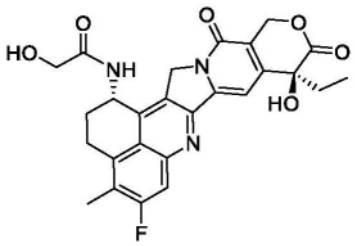
[2927]

细胞名称	肿瘤类型	来源
NCl-H358	人非小细胞肺癌	ATCC,CRL-5807
HT29	人结肠癌细胞	ATCC,HTB-38
LS174T	人结肠腺癌细胞	ATCC,CL-187
NCl-H322M	人非小细胞肺癌	ATCC
PANC-1	人胰腺癌肿瘤细胞	ATCC,CRL-1469
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物

[2928] 体外细胞活性检测方法:用对应检测培养基(含2% FBS)稀释生物活性分子(12个

浓度梯度)。使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2% FBS)重悬。将稀释的生物活性分子加入96孔板中,再加入细胞。然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至4小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。实验结果如表6.1,6.2,6.3,6.4,6.5和6.6所示。

[2929] 参照CN104755494B制备获得DXD,具体结构如下,

[2930] 

[2931] 表6.1生物活性分子对NCl-H358细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.10	NCl-H358	8.11
DXD		39.02

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.8D	NCl-H358	7.919
A1.15a		3.882
DXD		21.43

[2932]

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.4	NCl-H358	29.91
A1.8		296.4
A1.9		60.79
A1.11		202.9
A1.12		167.1
A1.13		49.19
A1.14		122.6
DXD		148.45±10.87 (n=4)

[2933] 表6.2生物活性分子对HT29细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.10	HT29	5.965
DXD		49.47

[2934]

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.15a	HT29	3.574
A1.15b		47.52
DXD		64.84

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.4	HT29	29.45
A1.8		367.1
A1.9		57.5

[2935]

A1.11		284.5
A1.12		211.8
A1.13		96.85
A1.14		155.9
DXD		301.875±69.00 (n=4)

[2936] 表6.3生物活性分子对LS174T细胞杀伤结果

[2937]

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.15a	LS174T	19.49
A1.15b		44.62
DXD		82.05

[2938] 表6.4生物活性分子对NCl-H322M细胞杀伤结果

[2939]

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.9	NCl-H322M	30.45
DXD		76.89

[2940] 表6.5生物活性分子对PANC-1细胞杀伤结果

[2941]

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.9	PANC-1	94.54
DXD		966

[2942] 表6.6生物活性分子对HCC1806细胞杀伤结果

[2943]

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.9	HCC1806 (7500 细胞/孔，3 天)	1.9
Dxd		37

[2944] 测试结果表明,本公开的生物活性分子具有肿瘤细胞杀伤作用。

[2945] 实施例6.2:生物活性分子对体外细胞活性的抑制活性检测二

[2946] 首先培养肿瘤细胞NUCG-4,PC-9,HT29,NCI-H358,KYSE520,A431和A549;将本公开的生物活性分子或片段与肿瘤细胞进行共培养,然后添加CCK8试剂(东仁化学科技有限公司,Cat:CK04,Lot:JJ744),用酶标仪(厂家:Molecular Devices,型号:SpectraMax M2)读

数(检测波长为450nm),检测线粒体内的脱氢酶的活性,以评价生物活性分子对细胞增殖的抑制作用。肿瘤细胞来源见表7。

[2947] 表7.肿瘤细胞来源

[2948]

细胞名称	肿瘤类型	来源
NUCG-4	胃癌	南京科佰
PC-9	肺腺癌	ATCC
HT29	结肠癌	ATCC,HTB-38
NCI-H358	非小细胞肺癌	ATCC,CRL-5807
KYSE520	食管癌	ATCC
A431	人皮肤鳞状癌(人表皮癌)细胞	ATCC
A549	非小细胞肺癌	ATCC

[2949] 体外细胞活性检测方法:使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2% FBS)重悬,将5000-10000细胞/孔加至96孔板。用DMSO稀释的生物活性分子,加入100uL至96孔板,浓度从10μM开始,3倍稀释(12个浓度梯度),37℃5%CO_2培养3-4天,然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至2-6小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。生物活性分子及其检测结果如表8所示。

[2950] 表8A1.9和B1.14的活性测定

[2951]

细胞	A1.9 EC_{50} nM	B1.14EC_{50} nM	DXD EC_{50} nM
NUCG-4	8.73	184.8	43.32
PC-9	2.06	34.32	16.69
HT29	20.32	367.9	210.5
NCI-H358	46.2	581.2	261.6
A431	5.71	67.97	25.08
A549	65.86	252.3	262.2

[2952] 测试结果表明,生物活性分子A1.9和B1.14具有肿瘤细胞杀伤作用,其中A1.9在多个肿瘤细胞中均具有强于Dxd的肿瘤杀伤作用。A1.9在KYSE520的体外细胞活性的抑制活性检测中,EC50为49.62nM,具有杀伤KYSE520的作用。

[2953] 实施例6.3:生物活性分子对体外细胞活性的抑制活性检测三

[2954] 首先培养肿瘤细胞HT29(来源同上),将本公开的生物活性分子或片段与肿瘤细胞进行共培养,然后添加CCK8试剂(东仁化学科技有限公司,Cat:CK04,Lot:JJ744),用酶标仪(厂家:Molecular Devices,型号:SpectraMax M2)读数(检测波长为450nm),检测线粒体内的脱氢酶的活性,以评价生物活性分子对细胞增殖的抑制作用。

[2955] 体外细胞活性检测方法:使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2% FBS)重悬,将5000-10000细胞/孔加至96孔板。用DMSO稀释的生物活性分子,加入100uL至96孔板,浓度从10μM开始,3倍稀释(12个浓度梯度),37℃5%CO_2培养3-4天,然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至2-6小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。生物活性分子及其检测结果如表9所示。

[2956] 表9生物活性分子对HT29细胞杀伤结果

[2957]

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
B1.9	HT29	262.2
B1.12		85.87
B1.17		204.8
DXD		22.89

[2958] 测试结果表明,生物活性分子B1.9、B1.12和B1.17具有肿瘤细胞杀伤作用。

[2959] 实施例6.4:ADC对体外细胞活性的抑制活性检测

[2960] 使用胰酶通过常规方法对HT29和NCI-H358肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2% FBS)重悬,将2000-5000细胞/孔加至96孔板。2% FBS培养基稀释的ADC加入100uL至96孔板,浓度从150μg/ml起始,3倍稀释(12个浓度梯度)。37℃5%CO_2培养7天,然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至2-6小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。ADC及其检测结果如表10,表11所示。

[2961] 表10.部分ADC的活性测定

[2962]

ADC	HT29 (EC_{50}, ng/mL)	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
B7H3-ADC-07(DAR8)	23555	21131
B7H3-ADC-05(DAR8)	33135	33490
B7H3-ADC-04(DAR8)	28793	28493
B7H3-ADC-22(DAR8)	24418	20825

[2963]

B7H3-ADC-12(DAR8)	5032	4068
B7H3-ADC-27(DAR8)	28510	29155
B7H3-ADC-08(DAR8)	31669	34149
B7H3-ADC-23(DAR8)	21074	19578
B7H3-ADC-20(DAR8)	1348	1325
B7H3-ADC-09(DAR8)	22479	20751
2E3-02 抗体	弱	弱
B7H3-ADC-32(DAR8)	32472	30903

[2964] 测试结果表明,本公开的ADC分子具有肿瘤细胞杀伤作用,其中大部分ADC具有强于B7H3-ADC-32(DAR8)的肿瘤细胞杀伤作用。

[2965] 表11.部分ADC的活性测定

[2966]

ADC	HT29(EC_{50},ng/mL)	NCI-H358(EC_{50},ng/mL)
B7H3-ADC-33(DAR8)	18380	20354
B7H3-ADC-15(DAR8)	1181	1015

[2967] 测试结果表明,本公开的ADC分子具有肿瘤细胞杀伤作用,其中B7H3-ADC-15(DAR8)具有强于B7H3-ADC-33(DAR8)的肿瘤细胞杀伤作用。

[2968] 同时对本公开的ADC分子B7H3-ADC-07(DAR8)在B7H3阴性细胞Calu-3上测试,结果显示杀伤效果弱(IC50>10^7ng/ml),说明体外在B7H3阳性与阴性肿瘤细胞间,本公开的ADC分子具有很好的选择靶向性杀伤。

[2969] 实施例6.5:检测多种靶点抗体药物偶联物对多种肿瘤细胞的体外抑制活性

A.B7H3 ADC的多种肿瘤抑制活性测定

[2970] ADC样品:根据实施例制备获得ADC样品

[2971] 体外细胞活性检测方法:使用胰酶通过常规方法对多种肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2% FBS)重悬,将2000-5000细胞/孔加至96孔板。2% FBS培养基稀释的ADC(见表12)加入100uL至96孔板,浓度从150μg/ml起始,3倍稀释(11个浓度梯度)。37℃5%CO_2培养7天,然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至2-6小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。实验细胞和检测结果如表12所示。

[2972] 表12

[2973]

细胞	B7H3-ADC-07(DAR8)	B7H3-ADC-21(DAR8)
PC-9(EC50,ng/mL)	3618	2377
HT29(EC50,ng/mL)	10433	7442
KYSE520(EC50,ng/mL)	5845	2842
NCI-H358(EC50,ng/mL)	15800	8060
NUCG-4(EC50,ng/mL)	4855	4158
A431(EC50,ng/mL)	7624	2478

[2974] 测试结果表明,表12.ADC具有多种肿瘤细胞杀伤作用。

[2975] B.Her3 ADC的多种肿瘤抑制活性测定

[2976] ADC样品:根据实施例制备获得ADC样品Her3-ADC-07(DAR8)

[2977] 体外细胞活性检测方法:使用胰酶通过常规方法对PC-9和NCI-H358肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2% FBS)重悬,将2000-5000细胞/孔加至96孔板。2% FBS培养基稀释的ADC加入100uL至96孔板,浓度从150μg/ml起始,3倍稀释(11个浓度梯度)。37℃5%CO_2培养7天,然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至2-6小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。实验细胞和检测结果如表13所示。

[2978] 表13.

[2979]

细胞	Her3-ADC-07(DAR8)
PC-9(EC_{50},nM/L)	49.26
NCI-H358(EC_{50},nM/L)	183.3

[2980] 测试结果表明,Her3-ADC-07(DAR8)具有肿瘤细胞杀伤作用。

[2981] C.EGFR ADC的肿瘤抑制活性测定

[2982] 使用胰酶通过常规方法对KYSE520肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2%FBS)重悬,将2000-5000细胞/孔加至96孔板。2%FBS培养基稀释的ADC(如表14)加入100uL至96孔板,浓度从50μg/ml起始,3倍稀释(11个浓度梯度)。37℃5%CO_2培养5天,然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至1-4小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。实验细胞和检测结果如表14所示。

[2983] 表14.

[2984]

检测组编号	ADC 样品	KYSE520 (EC_{50}, ng/mL)
1	EGFR-ADC-07(DAR8)	11.56
	EGFR-ADC-07(DAR4)	18.17
	EGFR-ADC-32(DAR4)	29.21
2	Her3-ADC-05(DAR4)	19.01
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	32.94

[2985] 测试结果表明,EGFR-ADC-07、Her3-ADC-05和Her3-C3-ADC-05都具有很强的肿瘤细胞杀伤作用。

[2986] 综合以上测试结果表明,本申请公开多种靶点(如B7H3,Her3,EGFR)的ADC对多种肿瘤细胞均具有杀伤作用。

[2987] D.Trop-2抗体药物偶联物对体外细胞活性的抑制作用

[2988] 首先培养肿瘤细胞HCC1806(Trop-2阳性细胞系)和NCI-H23(Trop-2阴性细胞系);将本公开的生物活性分子及ADC分子与肿瘤细胞进行共培养,然后添加CCK8试剂(东仁化学科技有限公司,Cat:CK04,Lot:JJ744),用酶标仪(厂家:Molecular Devices,型号:SpectraMax M2)读数(检测波长为450nm),检测线粒体内的脱氢酶的活性,以评价ADC对细胞增殖的抑制作用。肿瘤细胞来源见表15。

[2989] 表15.

[2990]

细胞名称	肿瘤类型	来源
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物
NCI-H23	非小细胞肺癌	康诺泰

[2991] 体外细胞活性检测:用对应检测培养基(含2% FBS)稀释生物活性分子或ADC(12个浓度梯度)。使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2% FBS)重悬。将稀释的生物活性分子或ADC加入96孔板中,再加入细胞。然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至4小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。实验条件和检测结果如表16所示。

[2992] 表16.偶联物对Trop-2阳性、阴性细胞系杀伤结果

[2993]

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
Trop2-ADC-01（DAR8）	HCC1806 (7500 细胞/孔，3 天)	2.1
	NCI-H23 (10000 细胞/孔，3 天)	10000
Trop2-ADC-05（DAR8）	HCC1806 (7500 细胞/孔，3 天)	3.4
	NCI-H23 (10000 细胞/孔，3 天)	10000

[2994] 测试结果表明,本公开的ADC分子具有肿瘤细胞杀伤作用。同时在Trop-2阳性与阴性细胞间,具有很好的靶向性。

[2995] 实施例6.6:不同DAR值得抗体药物偶联物对体外细胞活性的抑制作用ADC样品:根据实施例制备获得ADC样品,

[2996] 体外细胞活性检测方法:使用胰酶通过常规方法对NCI-H358肿瘤细胞进行消化,收集管细胞数,用对应的检测培养基(含2% FBS)重悬,将2000-5000细胞/孔加至96孔板。2% FBS培养基稀释的ADC加入100uL至96孔板,浓度从150μg/ml起始,3倍稀释(11个浓度梯度)。37℃5%CO_2培养7天,然后每孔加入CCK8试剂20μL,反应至2-6小时,酶标仪读数(检测波长为450nm)。各组样品和检测结果如表17所示。

[2997] 表17.

[2998]

检测组编号	ADC 样品	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
1	B7H3-ADC-07(DAR4)	30428
	B7H3-C1-ADC-07(DAR4)	22174
	B7H3-C1-ADC-21(DAR4)	31057
2	Her3-ADC-05(DAR4)	47742
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	65109
	Her3-C3-ADC-21(DAR4)	76365
3	B7H3-ADC-07(DAR6)	27858
	B7H3-ADC-21(DAR6)	20629
4	B7H3-ADC-08(DAR4)	83363
	B7H3-C1-ADC-08(DAR4)	101649
5	Her3-ADC-23(DAR4)	49330
	Her3-C3-ADC-23(DAR4)	弱
6	Her3-ADC-15(DAR2)	5572
	Her3-ADC-15(DAR8)	2562
	Her3-ADC-33(DAR4)	50774
7	B7H3-ADC-15(DAR4)	2931
	B7H3-ADC-33(DAR4)	42071
	2E3-02 抗体	弱

[2999] 本实例以及实例6.5C测试结果表明,本申请公开的多种DAR值(如4,6,8)的ADC对肿瘤细胞均具有杀伤作用。

[3000] 实施例6.7:B7H3抗体药物偶联物体内活性测试

[3001] 6.7.1B7H3抗体药物偶联物对NCI-HT29移植瘤药效测试之一

[3002] 1.实验材料

[3003] 受试化合物:B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)、B7H3-ADC-08(DAR8)、B7H3-ADC-05(DAR8)、B7H3-ADC-06(DAR8)、B7H3-ADC-17(DAR8)、B7H3-ADC-18(DAR8)、B7H3-ADC-19(DAR8)、IgG1-ADC-04(DAR8)。

[3004] 实验细胞:NCI-HT29细胞,购自ATCC;

[3005] 实验动物:Balb/c nu裸小鼠,雌性,5-6周龄,购自维通利华实验动物有限公司。

[3006] 2.实验方案

[3007] 2.1.细胞处理

[3008] NCI-HT29细胞用含10%FBS的1640培养基培养于15cm直径培养皿,达80-90%左右融合度时用胰蛋白酶-EDTA消化,用PBS洗两次,然后离心重悬于预冷PBS中,细胞计数仪计数,PBS稀释使细胞浓度为5×10^7/ml。

[3009] 2.2.肿瘤细胞移植

[3010] Balb/c nu小鼠实验室环境适应2-5天,于右肋部皮下接种NCI-HT29细胞,接种细胞量为5×10^6/只,接种体积为0.2ml(含50%Matrigel),待肿瘤生长至250mm^3左右时,进行实验。

[3011] 2.3.动物给药与检测

[3012] 入组的荷瘤裸鼠,按以下方案给药:

[3013] 表18

[3014]

No.	组别	动物数量	给药剂量	给药途径和周期

1	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3
2	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3
3	B7H3-ADC-08(DAR8)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3
4	B7H3-ADC-05(DAR8)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3
5	B7H3-ADC-06(DAR8)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3
6	B7H3-ADC-17(DAR8)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3
7	B7H3-ADC-18(DAR8)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3
8	B7H3-ADC-19(DAR8)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3
9	IgG1-ADC-04(DAR8)(对照组)	5	3mg/kg	i.v.,QW×3

[3015] 给药周期结束后,继续观察1-2周。最后一次瘤体积测量后,分离肿瘤,准确称取肿瘤重量并拍照记录。

[3016] 2.4.肿瘤体积及体重测定:

[3017] 每周测量2次瘤体积及体重,计算T/C(%)和抑瘤率(TGI)(%),计算公式为:相对肿瘤增殖率T/C(%)=TRTV/CRTV×100%(TRTV:治疗组平均RTV;CRTV:对照组平均RTV;RTV=Vt/V0,V0为分组时该动物的瘤体积,Vt为治疗后该动物的瘤体积);相对肿瘤抑制率TGI%=(1-T/C)×100%(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)。

[3018] 肿瘤体积(V)计算公式为:V=1/2×L长×L短^2,其中L长、L短分别表示肿瘤长径、短径。

[3019] 3.实验结果

[3020] 具体结果见表19和附图9,本申请ADC均显示了对肿瘤生长的抑制作用,特别是B7H3-ADC-05,B7H3-ADC-06、B7H3-ADC-07,B7H3-ADC-08和B7H3-ADC-17具有很强的抑制肿瘤的效果,B7H3-ADC-18,B7H3-ADC-19和B7H3-ADC-21的抑制肿瘤的效果接近。给药期间,各组动物无明显体重下降和明显的药物毒性。

[3021] 表19.NCI-HT29移植瘤模型数据

[3022]

	肿瘤体积 mm3						T/C (%)	TGI (%)
样品	给药 Day1	给药 Day4	给药 Day8	给药 Day11	给药 Day15	给药 Day18		
IgG1-ADC-04(DAR8)	244.4	381.0	543.6	1061.2	1285.6	1821.8	-	-
B7H3-ADC-21(DAR8)	244.4	335.4	414.4	781.4	862.2	1233.4	62.70	37.30
B7H3-ADC-08(DAR8)	244.4	268.6	243	418.4	456.6	555.4	19.72	80.28
B7H3-ADC-05(DAR8)	244.4	286.2	221.8	479.6	574	745.2	31.75	68.25
B7H3-ADC-06(DAR8)	245.8	293.6	302.8	482.6	592.2	669	26.83	73.17
B7H3-ADC-07(DAR8)	243.6	276	253.2	414.8	461.8	576.4	21.10	78.90
B7H3-ADC-17(DAR8)	245.4	250.2	304.2	559.2	741	970	45.94	54.06
B7H3-ADC-18(DAR8)	245.2	302.2	413.4	741.4	958.8	1218.6	61.71	38.29
B7H3-ADC-19(DAR8)	245.2	318.6	441.4	784.6	1003.6	1244.6	63.36	36.64

[3023] 6.7.2B7H3抗体药物偶联物对NCI-HT29移植瘤药效测试之二

[3024] 利用5.3.1相同的方法测定B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-08(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)的移植瘤药效,具体的分组和给药方案如表20所示,

[3025] 表20给药方案

[3026]

组号	组别	动物数量	给药剂量	给药方式	给药频次	给药体积
1	生理盐水	5	-	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
2	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	10 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
3	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
4	B7H3-ADC-08(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
5	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	10 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
6	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg

[3027] 获得结果如表21所示,和附图10。

[3028] 表21NCI-HT29移植瘤模型数据

[3029]

分组	平均肿瘤体积（mm^3）D1	平均肿瘤体积（mm^3）D18	T/C（%）D18	抑瘤率 TGI（%）D18
生理盐水	232.2±35.1	1281.8±170.0	-	-
B7H3-ADC-21(DAR8) 10 mg/kg	231.8±49.6	679.2±141.7***	53.1	46.92

[3030]

B7H3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg	232.2±41.4	1081.6±209.7	84.4	15.62
B7H3-ADC-08(DAR8) 3 mg/kg	232.6±37.5	675.8±190.0***	52.6	47.37
B7H3-ADC-07 (DAR8)10 mg/kg	231.6±45.9	363.8±162.4***	28.5	71.54
B7H3-ADC-07 (DAR8)3 mg/kg	231.8±65.0	579.2±281.8***	45.3	54.74

[3031] D1:首次给药的第一天;*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[3032] 肿瘤体积结果显示,至试验结束时(D18),B7H3-ADC-21 10mg/kg组,B7H3-ADC-08 3mg/kg组,B7H3-ADC-07 10mg/kg、3mg/kg组动物肿瘤体积显著低于Vehicle对照组(P<0.001),抑瘤率分别为46.92%,47.37%,71.54%,54.74%;B7H3-ADC-21 3mg/kg组肿瘤体积与Vehicle组相比未见统计学差异。体重结果显示,至给药结束时(D18),所有受试剂量组给药期间体重均增加,显示各剂量组均耐受良好。

[3033] 6.7.3B7H3抗体药物偶联物对NCI-H358移植瘤药效测试

[3034] 1.研究目的

[3035] 评价受试药物在人非小细胞肺癌NCI-H358皮下异种移植雌性Balb/c Nude小鼠模

型中的抗肿瘤作用。

[3036] 2.受试物信息

[3037] B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-05(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)、B7H3-ADC-09(DAR8)、B7H3-ADC-10(DAR8),B7H3-ADC-20(DAR8)。

[3038] 3.试验内容

[3039] 参照本实施例6.7.1进行细胞处理NCl-H358(ATCC,CRL-5807)和肿瘤细胞移植。

[3040] 3.1给药及分组

[3041] 每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见下表22:

[3042] 表22给药方案

[3043]

No.	给药组	动物数量	给药剂量(mg/kg)	给药途径和周期
1	生理盐水	5	3	i.v.,QW×3
2	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3	i.v.,QW×3
3	B7H3-ADC-05(DAR8)	5	3	i.v.,QW×3
4	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3	i.v.,QW×3
5	B7H3-ADC-09(DAR8)	5	3	i.v.,QW×3
6	B7H3-ADC-10(DAR8)	5	3	i.v.,QW×3
7	B7H3-ADC-20(DAR8)	5	3	i.v.,QW×3
8	B7H3-ADC-20(DAR8)	5	1	i.v.,QW×3

[3044] 3.2检测指标

[3045] 肿瘤体积及体重测定,每周测量2次瘤体积(mm^3)及体重,计算相对肿瘤增殖率T/C(%)和相对肿瘤抑制率TGI(%)。

[3046] 肿瘤体积(V)计算公式为:V=1/2×L长×L短^2;

[3047] 相对肿瘤增殖率T/C(%)=TRTV/CRTV×100%(TRTV:治疗组平均RTV;CRTV:对照组平均RTV;RTV=Vt/V0,V0为分组时该动物的瘤体积,Vt为治疗后该动物的瘤体积);

[3048] 相对肿瘤抑制率TGI%=(1-T/C)×100%(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)。

[3049] 3.3试验终点

[3050] 确定给药期结束后,继续观察1-2周,随后解剖取瘤,称重并拍照。

[3051] 3.实验结果

[3052] 具体结果见表23和附图11,本申请ADC均显示了对肿瘤生长的抑制作用,并且ADC-20的3mg/kg剂量优于1mg/kg剂量的抑制肿瘤效果。给药期间,各组动物无明显体重下降和明显的药物毒性。

[3053] 表23.NCI-H358移植瘤模型数据(肿瘤体积mm^3)

[3054]

给药后天数 / 组别	1	3	7	10	14	17	21
生理盐水	234	256	262	294	378	434	604
B7H3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg	234	224	182	176	164	128	126
B7H3-ADC-05 (DAR8)3 mg/kg	233	249	180	130	110	94	87
B7H3-ADC-07 (DAR8)3 mg/kg	234	225	173	120	118	95	95
B7H3-ADC-09(DAR8) 3 mg/kg	233	180	177	139	114	103	97
B7H3-ADC-10(DAR8) 3 mg/kg	233	211	232	197	154	144	125
B7H3-ADC-20(DAR8) 3 mg/kg	233	191	184	172	170	162	202
B7H3-ADC-20(DAR8) 1 mg/kg	234	230	231	238	256	308	411

[3055] 6.7.4B7H3抗体药物偶联物在前列腺癌皮下异种移植PDX模型中的药效测试

[3056] 1.研究目的

[3057] 测试B7H3抗体药物偶联物在HuPrime®前列腺癌PR9586皮下异种移植NPG雄鼠模型中的药效2.受试物

[3058] B7H3-ADC-07(DAR8)、IgG1-ADC-07(DAR8)

[3059] 3.试验内容

[3060] 3.1实验小鼠信息

[3061] NPG PR9586模型的小鼠,周龄6-9周(肿瘤细胞接种时的小鼠预计周龄),雄性,共100只小鼠,购自北京维通达生物技术有限公司。

[3062] 3.2构建荷瘤小鼠模型

[3063] 从HuPrime®前列腺癌PR9586(种族为Western)荷瘤小鼠收取肿瘤组织,切成直径为2-3mm的瘤块接种于NPG右前肩胛处皮下。

[3064] 当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约100-200(~150)mm^3时,将小鼠按照"3.3分组及给药"表格进行随机分组。各组内的肿瘤体积的变异系数(CV)用公式CV=SD/MTV×100%计算,应小于40%。分组当天定义为第1天。

[3065] 3.3.分组及给药

[3066] 每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见下表24。

[3067] 表24.实验动物分组

[3068]

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	8	Vehicle(生理盐水)	/	i.v.	QW×3weeks
2	8	IgG1-ADC-07(DAR8)	10	i.v.	QW×3weeks
3	8	B7H3-ADC-07(DAR8)	1	i.v.	QW×3weeks
4	8	B7H3-ADC-07(DAR8)	3	i.v.	QW×3weeks
5	8	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	i.v.	QW×3weeks

[3069] 注:1.给药体积为10μL/g;2.分组当天定义为第一天(day 1),给药在day 1,day8和day15;3.给药时注意避光;4.分组当天取一只分剩小鼠肿瘤进行FACS检测分析肿瘤细胞表面抗原表达情况,流式结果表明B7H3在PR9586模型中有明显表达。

[3070] 3.4实验观察和数据收集

[3071] 肿瘤细胞接种后,常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响,具体内容有实验动物的活动性,摄食和饮水情况,体重增加或降低情况,眼睛、被毛及其它异常

情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。开始给药后,每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式:肿瘤体积(mm^3)=1/2×(a×b^2)(其中a表示长径,b表示短径)。实验中使用StudyDirector™(版本号3.1.399.19,供应商Studylog System,Inc.)软件收集数据,包括肿瘤的长短径的测量和动物体重的称量,原始数据由天平和游标卡尺测量后直接导入软件,数据的任何变动都将被记录在此软件中。

[3072] 给药、肿瘤测量及体重称量等全部过程都在生物安全柜或超净工作台中进行。

[3073] 3.5数据分析

[3074] 本实验的主要观察指标为:

[3075] 相对肿瘤增殖率,T/C(%),即在某一时间点,治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。计算公式为:

[3076] T/C%=T_{RTV}/C_{RTV}×100%(T_{RTV}:治疗组平均RTV;C_{RTV}:对照组平均RTV;RTV=V_t/V_0,V_0为分组时该动物的瘤体积,V_t为治疗后该动物的瘤体积);

[3077] 或T/C%=T_{TW}/C_{TW}×100%(T_{TW}:治疗组实验终结时平均瘤重;C_{TW}:对照组实验终结时平均瘤重)。

[3078] 相对肿瘤抑制率,TGI(%),计算公式为:

[3079] TGI%=(1-T/C)×100%(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)或瘤重(TW))

[3080] 4.实验结果

[3081] B7H3-ADC-07(DAR8)和IgG1-ADC-07(DAR8)在PR9586模型上的药效结果如图12,表25和表26所示:

[3082] 表25在HuPrime®前列腺癌PR9586模型中各组肿瘤体积分析表

[3083]

实验组	分组后第 22 天			
	肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值
第 1 组 Vehicle	874.80 ± 135.11(8)	--	--	--
第 2 组 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	129.30 ± 49.16(8)	85.73	14.27	<0.001
第 3 组 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	135.42 ± 39.36(8)	84.00	16.00	0.009
第 4 组 B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	92.61 ± 36.73(8)	88.96	11.04	<0.001
第 5 组 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	104.38 ± 33.65(8)	87.7	12.30	<0.001

[3084] 注:1.数据以“平均值±标准误差”表示;2.T/C%=T_{RTV}/C_{RTV}×100%;TGI%=(1-T/C)×100%;

[3085] 表.26在HuPrime®前列腺癌PR9586模型中各组瘤重分析表

实验组	瘤重 (mg)（$\bar{x}\pm s$）分组后第 22 天	TGI（%）	T/C (%)	P 值
第 1 组 Vehicle	473.29 ± 91.75(8)			
第 2 组 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	52.96 ± 22.85(8)	88.81	11.19	0.002
第 3 组 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	52.64 ± 19.72(8)	88.88	11.12	0.006
第 4 组 B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	27.90 ± 14.59(8)	94.11	5.89	<0.001
第 5 组 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	46.40 ± 24.35(8)	90.20	9.80	0.001

[3086] 注:1.数据以“平均值±标准误差”表示;2.T/C%＝T_{TW}/C_{TW}×100%;TGI%＝(1-T/C)×100%;5.结论

[3087] 在PR9586模型中,肿瘤体积测量结果显示,试验结束时(Day22),B7H3-ADC-07(DAR8)3mg/kg和10mg/kg组动物肿瘤体积均显著(p<0.001)低于Vehicle(生理盐水)组,B7H3-ADC-07(DAR8)1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg剂量组肿瘤体积抑瘤率(TGI)分别为84.00%,88.96%,88.7%。动物体重测量结果显示,试验结束时(Day22),B7H3-ADC-07(DAR8)各剂量组给药期间动物体重均增加与对照组无明显差异,显示动物对B7H3-ADC-07(DAR8)1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg剂量均耐受良好。肿瘤重量测量结果显示,试验结束时(Day22)B7H3-ADC-07(DAR8)3mg/kg组与Vehicle组相比,动物平均肿瘤重量显著降低,具有统计学意义(P<0.001),B7H3-ADC-07(DAR8)1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg组的肿瘤重量TGI为88.88%、94.11%(P<0.001)和90.20%。无论按照肿瘤体积或者肿瘤重量,IgG1-ADC-07(DAR8)组都具有很好的肿瘤抑制效果,TGI分别为85.7%和88.8%。结果表明本公开提供的抗体药物偶联物及其药物连接物(毒素-linker)即不需要抗体的细胞内吞、也不需要肿瘤细胞表明抗原阳性表达既可以实现抗肿瘤效果。同时实验各组体重与对照组体重无明显区别,本公开的抗体药物偶联物具有良好的安全性。

[3088] 6.7.5B7H3抗体药物偶联物在食管鳞癌皮下异种移植PDX模型中的药效学评价

[3089] 1.研究目的

[3090] 测试B7H3-ADC-07(DAR8)和IgG1-ADC-07(DAR8)在食管鳞癌ES0204皮下异种移植BALB/c雌性裸鼠模型中的药效。

[3091] 2.受试物

[3092] B7H3-ADC-07(DAR8)、IgG1-ADC-07(DAR8)

[3093] 3.试验内容

[3094] 3.1实验小鼠信息

[3095] BALB/c nude for ES0204模型小鼠,6-9周(肿瘤细胞接种时的小鼠预计周龄),雌性,共100只小鼠(40只加上150%富余),购自江苏集萃药康生物科技有限公司。

[3096] 3.2构建荷瘤小鼠模型

[3097] 从食管鳞癌ES0204(亚型为ECC,种族为Asian)荷瘤小鼠收取肿瘤组织,切成直径为2-3mm的瘤块接种于Balb/c裸小鼠右前肩胛处皮下。

[3098] 当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约100-200(~150)mm^3时,将小鼠按照“3.3分组及给药”表格进行随机分组。各组内的肿瘤体积的变异系数(CV)用公式CV＝SD/MTV×100%计

算,应小于40%。分组当天定义为第1天。

[3099] 3.3.分组及给药

[3100] 每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见下表27。

[3101] 表27.实验动物分组

[3102]

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	8	Vehicle(生理盐水)	/	i.v.	QW×3weeks
2	8	IgG1-ADC-07(DAR8)	10	i.v.	QW×3weeks
3	8	B7H3-ADC-07(DAR8)	1	i.v.	QW×3weeks
4	8	B7H3-ADC-07(DAR8)	3	i.v.	QW×3weeks
5	8	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	i.v.	QW×3weeks

[3103] 注:1.给药体积为10μL/g;2.分组当天定义为第一天(day 1),给药在day 1,day8和day15;3.给药时注意避光;4.分组当天取一只分剩小鼠肿瘤进行FACS检测分析肿瘤细胞表面抗原表达情况,流式结果表明B7H3在ES0204模型中有明显表达

[3104] 3.4实验观察和数据收集

[3105] 肿瘤细胞接种后,常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响,具体内容有实验动物的活动性,摄食和饮水情况,体重增加或降低情况,眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。开始给药后,每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式:肿瘤体积(mm^3)=1/2×($a×b^2$)(其中a表示长径,b表示短径)。实验中使用StudyDirector™(版本号3.1.399.19,供应商Studylog System,Inc.)软件收集数据,包括肿瘤的长短径的测量和动物体重的称量,原始数据由天平和游标卡尺测量后直接导入软件,数据的任何变动都将被记录在此软件中。

[3106] 给药、肿瘤测量及体重称量等全部过程都在生物安全柜或超净工作台中进行。

[3107] 3.5数据分析

[3108] 本实验的主要观察指标为:

[3109] 相对肿瘤增殖率,T/C(%),即在某一时间点,治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。计算公式为:

[3110] $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$($T_{RTV}$:治疗组平均RTV;$C_{RTV}$:对照组平均RTV;$RTV = V_t/V_0$,$V_0$为分组时该动物的瘤体积,$V_t$为治疗后该动物的瘤体积);

[3111] 或$T/C\% = T_{TW}/C_{TW} \times 100\%$($T_{TW}$:治疗组实验终结时平均瘤重;$C_{TW}$:对照组实验终结时平均瘤重)。

[3112] 相对肿瘤抑制率,TGI(%),计算公式为:

[3113] $TGI\% = (1-T/C) \times 100\%$(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)或瘤重(TW))

[3114] 4.实验结果

[3115] B7H3-ADC-07(DAR8)和IgG1-ADC-07(DAR8)在ES0204模型上的药效结果如图13,表28和表29所示:

[3116] 表.28在HuPrime®食管鳞癌ES0204模型中各组肿瘤体积分析表

实验组	分组后第 22 天			
	肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值
第 1 组 Vehicle	959.89 ± 146.45(8)	-	-	-
第 2 组 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	182.05 ± 66.12(8)	81.28	18.72	<0.001
第 3 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg	277.49 ± 115.05(8)	75.71	24.29	<0.001
第 4 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001
第 5 组 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001

[3117] 注:1.数据以“平均值±标准误差”表示;2.T/C%＝T_{RTV}/C_{RTV}×100%;TGI%＝(1-T/C)×100%;

[3118] 表29在HuPrime®食管鳞癌ES0204模型中各组瘤重分析表

[3119]

实验组	瘤重 (mg)（$\bar{x}$±s）	TGI	T/C	P 值

[3120]

	分组后第 22 天		(%)	（相较于对照组）
第 1 组 Vehicle	794.41 ± 143.85(8)	--	--	--
第 2 组 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	38.14 ± 13.37(8)	95.20	4.80	<0.001
第 3 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg	193.65 ± 90.66(8)	75.62	24.38	<0.001
第 4 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001
第 5 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 10 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001

[3121] 注:1.数据以“平均值±标准误差”表示;2.T/C%＝T_{TW}/C_{TW}×100%;TGI%＝(1-T/C)×100%;5.结论

[3122] 在ES0204模型中,肿瘤体积测量结果显示,试验结束时(Day22),B7H3-ADC-07(DAR8)1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg组动物肿瘤体积均显著低于Vehicle(生理盐水)组(P<0.001),B7H3-ADC-07(DAR8)1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg剂量组肿瘤体积抑瘤率(TGI)分别为75.71%,100.00%,100.00%,与剂量呈正相关。动物体重测量结果显示,试验结束时(Day22),B7H3-ADC-07(DAR8)各剂量组给药期间动物体重均增加与对照组无明显差异,显示动物对B7H3-ADC-07(DAR8)1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg剂量均耐受良好。肿瘤重量测量结果显示,试验结束时(Day22)B7H3-ADC-07(DAR8)1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg组与Vehicle组相比,动物平均肿瘤重量均显著降低,具有统计学意义(P<0.001),肿瘤重量TGI为75.62%,100.00%和100.00%;IgG1-ADC-07(DAR8)组同样具有很好的肿瘤抑制效果,TGI分别为81.3%(肿瘤体积)和95.2%(肿瘤重量)。结果表明本公开提供的抗体药物偶联物及其的药物连接物(毒素-linker)即不需要抗体的细胞内吞、也不需要肿瘤细胞表明抗原阳性表达既可以实现抗肿瘤效果。同时实验各组体重与对照组体重无明显区别,本公开的抗体药物

偶联物具有良好的安全性。

[3123] 实施例6.8:Her3抗体药物偶联物和IgG1-ADC体内活性测试

[3124] 6.8.1Her3抗体药物偶联物对NCI-H358移植瘤药效测试

[3125] 本公开通过评价抗Her3抗体ADC药物对Balb/c Nude小鼠皮下人非小细胞肺癌细胞株NCI-H358细胞(ATCC来源,Her3表达阳性率在10%左右)移植瘤模型的抗肿瘤作用来展示体内药效。

[3126] 具体步骤如下:Balb/c nu裸小鼠,雌性,5-6周龄,购自维通利华实验动物有限公司。NCI-H358细胞用含10%FBS的1640培养基培养于15cm直径培养皿,达80-90%左右融合度时用胰蛋白酶-EDTA消化,用PBS洗两次,然后离心重悬于预冷PBS中,细胞计数仪计数,PBS稀释使细胞浓度为5×10^7/ml。Balb/c nu小鼠实验室环境适应7天,于右肋部皮下接种NCI-H358细胞,接种细胞量为5×10^6/只,接种体积为0.2ml(含50%Matrigel),待肿瘤生长至300mm^3左右时,根据肿瘤大小随机分组,每组5只,分别为:抗鸡溶菌酶人IgG1同型抗体(阴性对照,苏州宜联生物制备)组、IgG1-ADC-07(DAR8)、Her3-C3-ADC-21(DAR4),Her3-ADC-21(DAR4)以及Her3-ADC-07(DAR8)剂量组。所有样品均为尾静脉注射,每周1次,共给药3周。给药后观察并定期测量小鼠肿瘤体积及体重。相对肿瘤增殖率,T/C(%),即在某一时间点,治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。相对肿瘤抑制率,TGI(%),计算公式为:TGI%=(1-T/C)×100%(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)或瘤重(TW))。

[3127] 结果见表30及图14。

[3128] 表30.Her3-ADC-07对人非小细胞肺癌NCI-H358裸小鼠皮下移植瘤的疗效

[3129]

分组	平均肿瘤体积（mm^3）D1	平均肿瘤体积（mm^3）D29	T/C（%）D29	抑瘤率TGI（%）D29	*P* 值（D29）
IgG1 5mg/kg	309.0±72.0	1425.0±241.2	-	-	-
IgG1-ADC-07（DAR8）5mg/kg	309.4±53.4	725.2±415.1	50.83	49.17	0.203
Her3-C3-ADC-21（DAR4）1 mg/kg	308.8±67.7	1080.8±741.8	75.89	24.11	0.996
Her3-ADC-21（DAR4）5 mg/kg	309.6±60.6	346.4±123.8**	24.26	75.74	0.002
Her3-ADC-21（DAR4）1 mg/kg	309.6±58.6	1000.6±184.1	70.08	29.92	0.214
Her3-ADC-07（DAR8）5mg/kg	309.4±43.4	205.4±56.7**	14.40	85.60	0.003
Her3-ADC-07（DAR8）1mg/kg	309.6±47.1	339.0±95.8**	23.74	76.26	0.003

[3130] 由实验结果可知,和IgG1组相比,5mg/kg和1mg/kg剂量Her3-ADC-07(DAR8)对NCI-H358人非小细胞肺癌移植瘤模型的肿瘤生长有显著抑制作用,并且呈现剂量梯度趋势。Her3-ADC-071mg/kg组TGI为76.26%,略强于Her3-ADC-21 5mg/kg剂量组的TGI 75.74%。Her3-ADC-21 1mg/kg组TGI为29.92%,略强于Her3-C3-ADC-21 1mg/kg剂量组的TGI 24.11%。

[3131] 令人惊奇的是,和IgG1组相比,IgG1-ADC-07也具有明显的抑制肿瘤作用,说明得到的本公开偶联物(ADC)通过在连接子实现提高了整个ADC(无论是否具有抗原结合活性或内吞活性)在肿瘤环境中的暴露量,具有更好的肿瘤组织靶向性,从而具有更好的抑制肿瘤(无论是否表达相应抗原)效果。

[3132] 另外,动物体重结果显示,整个给药期以及恢复期间,各给药组动物耐受良好。

[3133] 6.8.2.Her3抗体药物偶联物对SW480移植瘤药效测试之一

[3134] 本公开通过评价抗Her3抗体ADC药物对Balb/c Nude小鼠皮下人结肠癌细胞株SW480细胞(ATCC来源,Her3表达阳性率在30%左右)移植瘤模型的抗肿瘤作用来展示体内药效。具体步骤如下:36只Balb/c nu裸小鼠,雌性,5-6周龄,购自维通利华实验动物有限公司。SW480细胞用含10%FBS的1640培养基培养于15cm直径培养皿,达80-90%左右融合度时用胰蛋白酶-EDTA消化,用PBS洗两次,然后离心重悬于预冷PBS中,细胞计数仪计数,PBS稀释使细胞浓度为5×10^7/ml。Balb/c nu小鼠实验室环境适应7天,于右肋部皮下接种SW480细胞,接种细胞量为5×10^6/只,接种体积为0.2ml(含50%Matrigel),待肿瘤生长至250mm3左右时,根据肿瘤大小随机分组,每组5只,分别为抗鸡溶菌酶人IgG1同型抗体(阴性对照,苏州宜联生物)组、IgG1-ADC-07、以及Her3-ADC-07剂量组。所有样品均为尾静脉注射,每周1次,共给药3周。给药后观察并定期测量小鼠肿瘤体积及体重。

[3135] 1)相对肿瘤增殖率,T/C(%),即在某一时间点,治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。

[3136] 2)相对肿瘤抑制率,TGI(%),计算公式为:TGI%=(1-T/C)×100%(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)或瘤重(TW))。

[3137] 具体结果见表32及图15。由实验结果可知,10mg/kg和3mg/kg剂量Her3-ADC-07对SW480人结直肠癌移植瘤模型的肿瘤生长有显著一定抑制作用,并且呈现剂量梯度趋势。

[3138] 表31:SW480+Balb/c Nude小鼠模型药效结果

[3139]

分组	平均肿瘤体积(mm^3)	平均肿瘤体积(mm^3)	T/C(%)	抑瘤率TGI(%)	P值(D18)
	D1	D18	D18	D18	
Ig-G1 10 mg/kg	269.80±32.42	2437.80±378.82	-	-	-
IgG1-ADC-07(DAR8) 10 mg/kg	270.60±33.13	1129.40±856.17**	46.2	53.8	0.007
Her3-ADC-07(DAR8) 10 mg/kg	269.20±31.17	164.80±39.81***	6.8	93.2	0.000
Her3-ADC-07(DAR8) 3 mg/kg	270.20±31.40	939.00±744.80**	38.5	61.5	0.002
Her3-ADC-07 (DAR8) 1 mg/kg	271.60±38.35	2708.80±535.14	110.4	-10.4	0.876

[3140] 6.8.3.Her3抗体药物偶联物对SW480移植瘤药效测试之二

[3141] 参考实施例6.8.2.相同的模型和方法测定IgG1,IgG1-ADC-07(DAR8),Her3-ADC-

07(DAR8),Her3-C3-ADC-21(DAR8)在人结肠癌细胞株SW480细胞(ATCC来源,Her3表达阳性率在30%左右)移植瘤模型的抗肿瘤作用。

[3142] 具体测试结果见下表32及图16。

[3143] 表32.

[3144]

给药后天数 / 各组肿瘤体积（mm^3）	D1	D4	D8	D11	D15	D18	D22	D25	D29	P 值(vs IgG1)D15	T/C(%)D15	TGI(%)D15
IgG1 10mg/kg	291	483	1084	1874	2407	/	/	/	/	/	/	/
IgG1-ADC-07(DAR8) 10mg/kg	290	315	459	931	1497	1691	1939	/	/	0.035	62.36	37.64
Her3-ADC-07(DAR8) 10mg/kg	291	242	200	169	133	196	168	120	237	0.000	5.53	94.47
Her3-ADC-07(DAR8) 3mg/kg	291	254	361	589	716	967	1190	1315	/	0.000	29.71	70.29
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10mg/kg	292	258	129	125	178	228	360	390	890	0.000	7.36	92.64
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3mg/kg	292	246	525	968	1352	1894	2360	/	/	0.012	55.97	44.03

[3145]

[3146] 由测试结果可知,10mg/kg和3mg/kg剂量Her3-ADC-07对SW480人结直肠癌移植瘤模型的肿瘤生长有显著一定抑制作用,并且呈现剂量梯度趋势。

[3147] 难以预料的是,Her3-ADC-07(DAR8)3mg/kg组的抑瘤效果明显强于Her3-C3-ADC-21(DAR8)3mg/kg组,Her3-ADC-07(DAR8)10mg/kg组的抑瘤效果明显强于Her3-C3-ADC-21(DAR8)10mg/kg组。

[3148] 令人惊奇的是,和IgG1组相比,IgG1-ADC-07在SW480人结直肠癌移植瘤模型中也具有明显的抑制肿瘤作用,并且强于Her3-C3-ADC-21(DAR8)3mg/kg组的抑瘤作用,说明得到的本公开偶联物(ADC)通过在连接子实现提高了整个ADC(无论是否具有抗原结合活性或内吞活性)在肿瘤环境中的暴露量,具有更好的肿瘤组织靶向性,从而具有更好的抑制肿瘤(无论是否表达相应抗原)效果。

[3149] 另外,动物体重结果显示,整个给药期以及恢复期间,各给药组动物耐受良好。

[3150] 实施例6.9ADC血浆稳定性测试

[3151] 通过在孵育B7H3-ADC-07(DAR8)的人血浆中测定生物活性分子A1.9的释放,在孵育B7H3-C1-ADC-21(DAR4)的人血浆中测定Dxd的释放,评价B7H3-ADC-07(DAR8)在血浆中的稳定性。

[3152] 样品和组别

[3153] 表33

[3154]

组别	受试物	孵育浓度	体系	检测物	检测时间点
1	B7H3-ADC-07（DAR8）	200 μg/mL	人血浆	A1.9	0 h、4h、24h、2d、3d、7d、10d、14d、17d、21d、28d
5	B7H3-C1-ADC-21(DAR4)	200 μg/mL	人血浆	Dxd	

[3155] 溶液配制:用PBS将B7H3-ADC-07(DAR8)及B7H3-C1-ADC-21(DAR4)原液稀释至浓度2mg/mL的工作溶液。用DMSO配制合适浓度的内标储备液,然后用乙腈或其他试剂配制合适浓度的含内标的沉淀剂。

[3156] 样品孵育:各种属(人、食蟹猴、ICR小鼠)血浆和含1%BSA的PBS中均加入抑菌剂ProClin,ProClin终浓度为0.1%,无菌操作。分别取40μL受试物工作溶液与360μL人血浆混合,制得浓度为200μg/mL的孵育样品。封板封膜,37C5%CO2培养箱中孵育,震荡速度80次/分钟。于0h、4h、24h、2d、3d、7d、10d、14d、17d、21d、28d分别转移20μL血浆样品,加入沉淀剂(含内标)200μL,充分混匀沉淀蛋白。

[3157] 所有样品经蛋白沉淀后,离心取上清液,加水稀释后使用LC-MS/MS进行分析。分析条件为

[3158] 表34.血浆稳定性测试的分析条件

[3159]

分析物	A1.9				Dxd			
检测方法	LC-MS/MS-6500-001				LC-MS/MS-6500-001			
内标	甲苯磺丁脲（Tolbutamide）				甲苯磺丁脲（Tolbutamide）			
质谱条件	正离子, ESI				正离子, ESI			
流动相	A: 0.1%FA in H2O				A: 0.1%FA in H2O			
	B: 0.1%FA in ACN				B: 0.1%FA in ACN			
色谱柱	Waters ,BEH C18，1.7μm，2.1*50mm				Aglient ,ZORBAX XDB-C18，3.5μm，2.1*50mm			
流速	0.5 mL/min				0.5 mL/min			
液相色谱条件	时间 (min)		泵 B (%)		时间 (min)		泵 B (%)	
	0.4		5		0.4		10	
	1.8		95		1.8		95	
	2.2		95		2.2		95	
	2.21		5		2.21		10	
	2.5		终止		2.5		终止	
检测	化合物	m/z	去簇电压(v)	碰撞能量(v)	化合物	m/z	去簇电压(v)	碰撞能量(v)
	甲苯磺丁脲（Tolbutamide）	271.0-172.0	50	30	DXD	494.2-375.1	100	45
	A1.9	451.1-407.2	50	25				

[3160] 获得结果如下表35所示:

[3161] 表35

[3162]

时间（天）	释放比例(%)	
	A1.9	DXD
0	0.14	0.348
0.17	0.10	1.786
1	0.11	2.765
2	0.16	3.603
3	0.14	3.763
7	0.19	4.116
10	0.24	5.126
14	0.35	5.786
17	0.40	6.446
21	0.46	7.494
28	0.82	12.659

[3163] B7H3-ADC-07(DAR8)在人血浆中稳定性好,孵育28天后,释放生物活性分子(A1.9)占总生物活性分子含量的2%以下。而B7H3-C1-ADC-21(DAR4)在人血浆中相中释放Dxd明显更多。

[3164] 实施例6.10抗体药物偶联物在HT 29移植瘤中的中肿瘤组织分布的测试实验

[3165] 6.10.1实验内容

[3166] 步骤一.细胞处理

[3167] 人结肠癌HT29细胞购自ATCC。HT29细胞用15cm^{2}培养皿贴壁培养,培养条件为1640培养基中加10%胎牛血清,于37℃、含5%CO2空气的培养箱中培养。当细胞呈指数生长期时,胰酶消化、收集细胞,计数,接种。

[3168] 步骤二.肿瘤细胞移植

[3169] BALB/c Nude小鼠实验室环境适应2-5天,于右肋部皮下接种HT29细胞,接种细胞量为5×10^6/只,接种体积为0.2ml(含50%Matrigel),待肿瘤生长至200-300mm3左右时,进行实验。

[3170] 步骤三.给药及采样

[3171] 每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见下表。

[3172] 表36

[3173]

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药体积（μL/g）	给药方式	给药周期	采集样本	采样时间点
1	3	生理盐水	/	10	i.v.	单次	肿瘤与血浆	给药后72 h
2	3	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	10	i.v.	单次	肿瘤与血浆	给药后24 h
3	3	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	10	i.v.	单次	肿瘤与血浆	给药后72 h

[3174] 步骤四.肿瘤组织匀浆

[3175] 取肿瘤组织块于冰上剪碎,称重转移至研磨管中,按1:5(w/v)加入生理盐水研磨,制备组织匀浆液;2～8℃,1800×g,离心10min,制备组织匀浆上清液,于-15～-25℃条件下保存备用。使用前取出于15～25℃放置,平衡至室温后使用。

[3176] 步骤五.生物样品分析

[3177] A1.9的分析方法参照实施例6.9。

[3178] B7H3-ADC-07(DAR8)的分析方法

[3179] (1)包被:将抗毒素抗体用包被液(0.05M CBS)稀释至1μg/mL,以100μL/孔加入酶标板,覆膜,2～8℃静置过夜(大于12h)。

[3180] (2)洗板:弃去孔内溶液,用0.05％ PBST洗涤3次,300μL/孔,拍干。

[3181] (3)封闭:加入封闭液(2％BSA-1×PBST),300μL/孔,覆膜,37℃孵育2h±20min。

[3182] (4)洗板:弃去孔内溶液,用0.05％ PBST洗涤3次,300μL/孔,拍干。

[3183] (5)加样:向酶标板中加入基质溶液、标准曲线样本、质控样本及待测样本,100μL/孔,覆膜,37℃孵育2h±5min。每个样品均做两个重复。

[3184] (6)洗板:弃去孔内溶液,用0.05％PBST洗涤3次,300μL/孔,拍干。

[3185] (7)加二抗:将Goat Anti-Human IgG Fc-HRP用稀释液(2％BSA-1×PBST)稀释40000倍(16ng/ml),100μL/孔,覆膜,37℃孵育1h±5min。

[3186] (8)洗板:弃去孔内溶液,用0.05％PBST洗涤3次,300μL/孔,拍干。

[3187] (9)显色:加入TMB底物显色液,100μL/孔,覆膜,15～25℃避光显色2～15min。

[3188] (10)终止:加入终止液(0.5M H2SO4),100μL/孔,终止反应。

[3189] (11)检测:用酶标仪于检测波长450nm(参比波长620nm)处读取各孔OD值。

[3190] 实验结果

[3191] A1.9的分布结果如图17所示,A1.9分布于肿瘤相对于血浆具有高达18倍的分配比差异,肿瘤组织中A1.9占绝大多数。

[3192] ADC的分配结果如图18所示,在肿瘤/血清中,ADC分子具有明显的分配比差异,并具有时间依赖性,证明本公开ADC分子或者含有本公开linker的ADC更倾向于分布在肿瘤组织中。从而导致整个ADC分子在相对酸性肿瘤环境中的暴露量,因而具有更好的肿瘤组织靶向性,增加了生物活性分子在瘤内和血液浓度比,降低了ADC分子的机理相关的毒性(或者又叫“on-target安全性“),不同ADC之间on-target相对安全性的计算公式为:

[3193] (第一种ADC肿瘤细胞体外EC50抑制浓度/第一种ADC相同肿瘤细胞模型体内给药剂量)/(第二种ADC肿瘤细胞体外EC50抑制浓度/在和第一种ADC体内效果接近情况下第二种ADC相同肿瘤细胞模型体内给药剂量)

[3194] 具体的,结合上述实施例中的数据,图10中B7H3-ADC-07 3mg/kg组和B7H3-ADC-2110mg/kg组的效果接近,B7H3-ADC-07相对于B7H3-ADC-21在HT29的相对on-target安全性为:

[3195] (10433ng/mL/150KDa/3mg/kg)/(7442ng/mL/150KDa/10mg/kg)＝4.66

[3196] 因此B7H3-ADC-07相对于B7H3-ADC-21在HT29的具有4.66倍的相对on-target安全性。换句话说,由于本公开ADC有更好的肿瘤组织靶向性,到达相同体内抑制肿瘤效果的给药剂量更低(例如实施例6.7.2B7H3-ADC-08 3mg/kg组和B7H3-ADC-07 3mg/kg组均与B7H3-ADC-2110mg/kg的TGI接近)。

[3197] 实施例6.11抗体药物偶联物在肿瘤组织匀浆液、肌肉组织匀浆液中的稳定性测试

研究目的:

[3198] 本实验研究的目的是模拟B7H3-ADC-07(DAR8)在肿瘤组织/肿瘤微环境裂解,对B7H3-ADC-07在22RV1 Balb/c nu裸鼠肿瘤组织匀浆液、Balb/c小鼠肌肉组织匀浆液、匀浆液基质生理盐水中的稳定性进行体外考察,在B7H3-ADC-07(DAR8)的孵育体系中测定A1.9。

将肿瘤组织匀浆液结果与血浆稳定性结果进行对比,评估肿瘤组织/肿瘤微环境中毒素分子的释放效率。

[3199] 组别:

[3200] 表37

[3201]

	受试物	孵育浓度	体系	检测物	检测时间点
1	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	22RV1 Balb/c nu 裸鼠肿瘤组织匀浆液	A1.9	0 h、4 h、24 h、48h
2	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	Balb/c 小鼠肌肉组织匀浆液	A1.9	
3	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	匀浆液基质（生理盐水）	A1.9	

[3202] 实验步骤:

[3203] 1、配制生理盐水(0.85%)

[3204] 0.85克氯化钠加上蒸馏水100毫升,即85mg氯化钠加入10ml水

[3205] 2、配制B7H3-ADC-07

[3206] 取100μL的B7H3-ADC-07(DAR8)原液4倍稀释,得到浓度5mg/ml的工作液,即5μg/μl。

[3207] 3、组织匀浆液稀释

[3208] ①原始匀浆为1:4,以生理盐水1:2稀释备用(200μL匀浆+400μL生理盐水)。

[3209] ②再1:9稀释后测蛋白浓度,肌肉匀浆为0.8mg/ml,肿瘤匀浆为1.2mg/ml,这一步仅为检测用,不用于后续实验。

[3210] ③调整肿瘤匀浆的蛋白浓度至与肌肉匀浆相同:将①所得的肿瘤匀浆继续2:1稀释(600μL匀浆+300μL生理盐水),则最终孵育体系中匀浆液的蛋白浓度都为8mg/ml左右,肌肉稀释了15倍,肿瘤稀释了22.5倍。

[3211] 4、孵育体系200μL,

[3212] 表38

[3213]

	受试物	孵育浓度	体系	计算
1	B7H3-ADC-07(DAR8) 5 μg/μl	100 μg/mL	B7H3-ADC-07(DAR8) 工作液 4 μL 加入 196 μL 匀浆液或生理盐水	5 μg/μl × 4 μL ÷ 0.2ml

[3214] 5、37℃孵育,到点取30μL加入300μL沉淀剂,0h、4h、24h、48h。

[3215] 结果与讨论:

[3216] 结果如图19A和图19B所示。从毒素分子A1.9释放来看,B7H3-ADC-07(DAR8)在肿瘤组织匀浆液中可以释放大量的A1.9,而在正常组织匀浆液中A1.9无明显释放。提示B7H3-ADC-07(DAR8)的毒素linker具有肿瘤组织特异性释放毒素分子的特点。

[3217] 从而本公开ADC有更宽的治疗指数和治疗效果。尽管本公开的具体实施方式已经得到详细的描述,但本领域技术人员将理解:根据已经公布的所有教导,可以对细节进行各种修改和变动,并且这些改变均在本公开的保护范围之内。本公开的保护范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

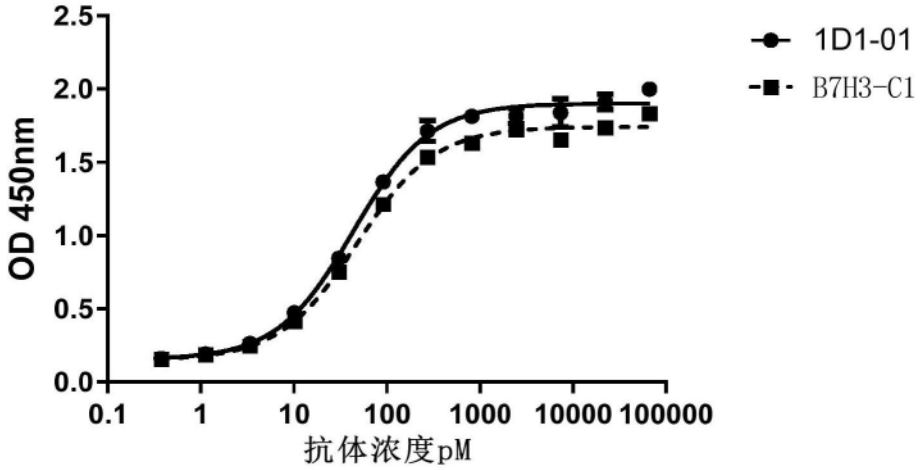

1D1-01
B7H3-C1
OD 450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度pM

图1A

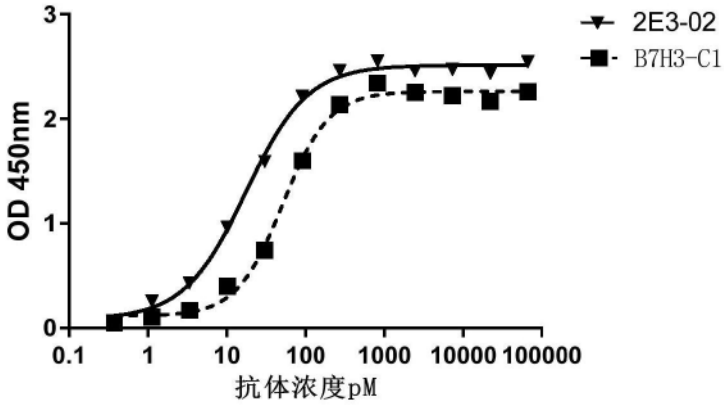

2E3-02
B7H3-C1
OD 450nm
3
2
1
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度pM

图1B

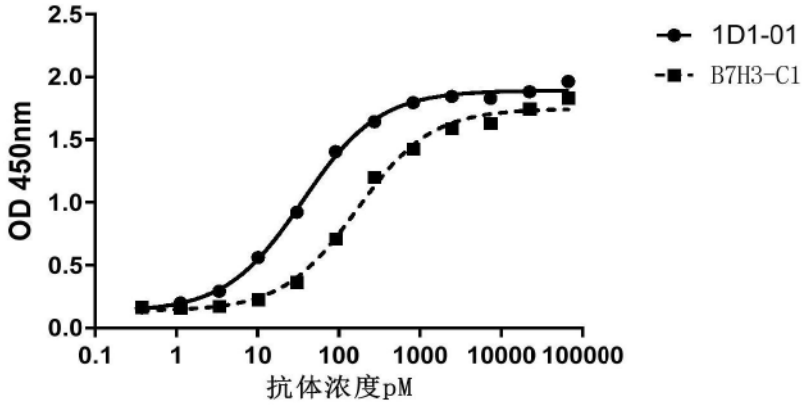

1D1-01
B7H3-C1
OD 450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度pM

图2A

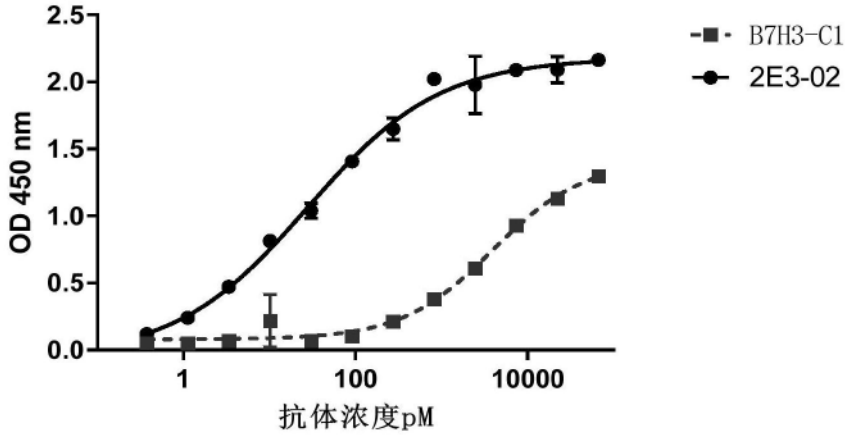

B7H3-C1
2E3-02
OD 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
100
10000
抗体浓度pM

图2B

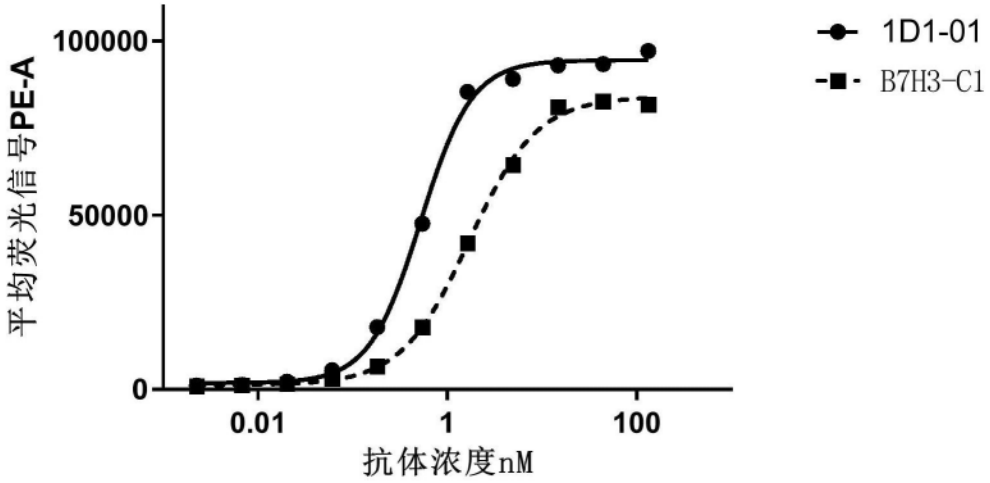

1D1-01
B7H3-C1
平均荧光信号PE-A
100000
50000
0
0.01
1
100
抗体浓度nM

图3A

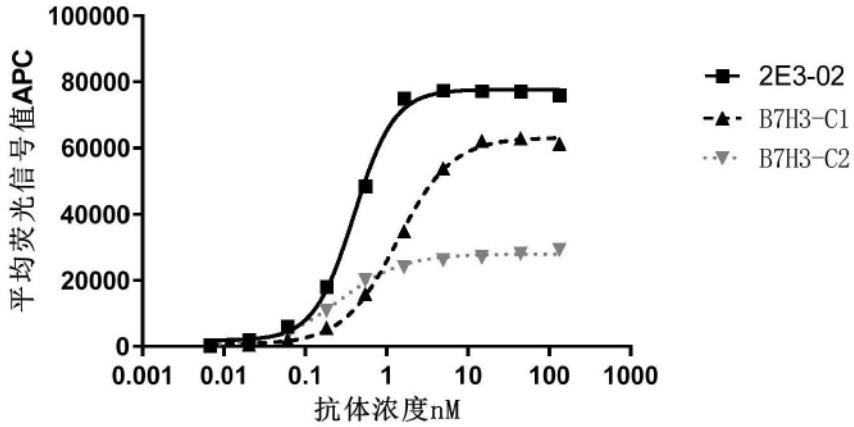

2E3-02
B7H3-C1
B7H3-C2
平均荧光信号值APC
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度nM

图3B

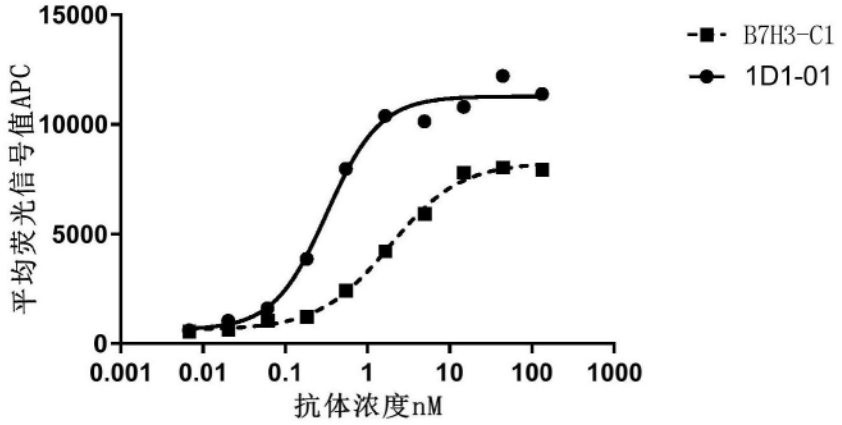

15000
10000
5000
0
平均荧光信号值APC
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度nM
B7H3-C1
1D1-01

图4A

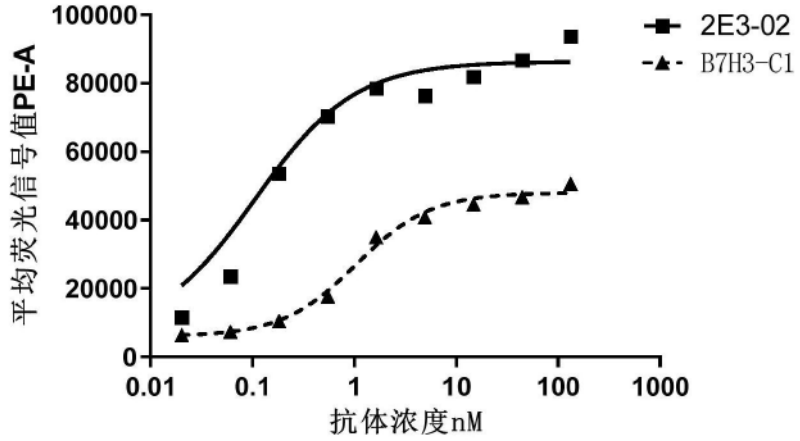

100000
80000
60000
40000
20000
0
平均荧光信号值PE-A
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度nM
2E3-02
B7H3-C1

图4B

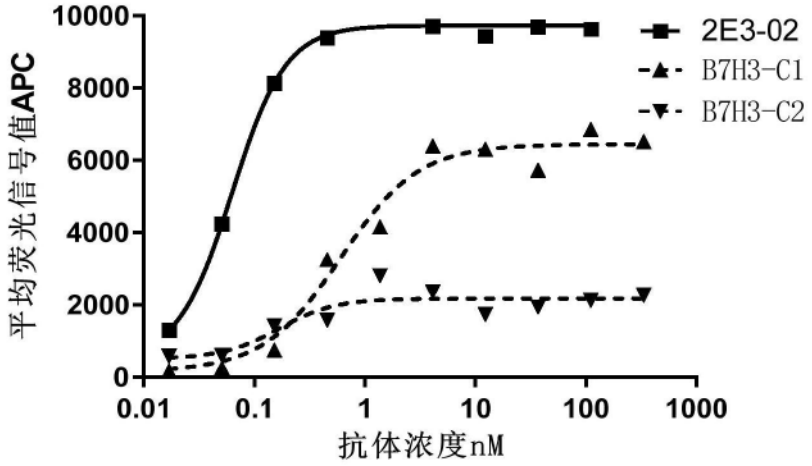

10000
8000
6000
4000
2000
0
平均荧光信号值APC
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度nM
2E3-02
B7H3-C1
B7H3-C2

图5

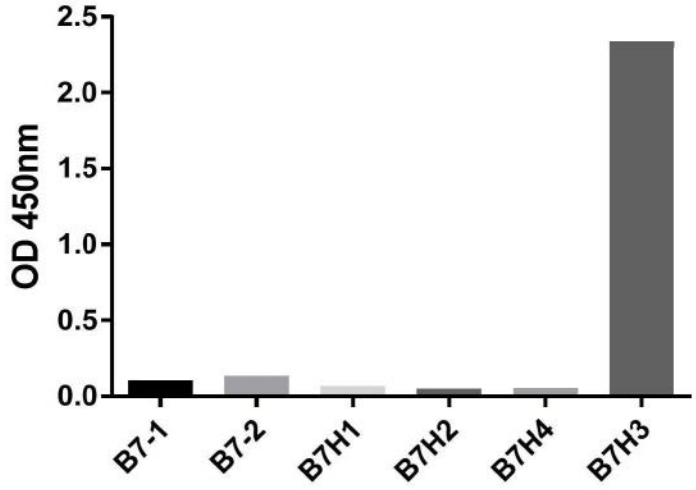

OD 450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
B7-1
B7-2
B7H1
B7H2
B7H4
B7H3

图6A

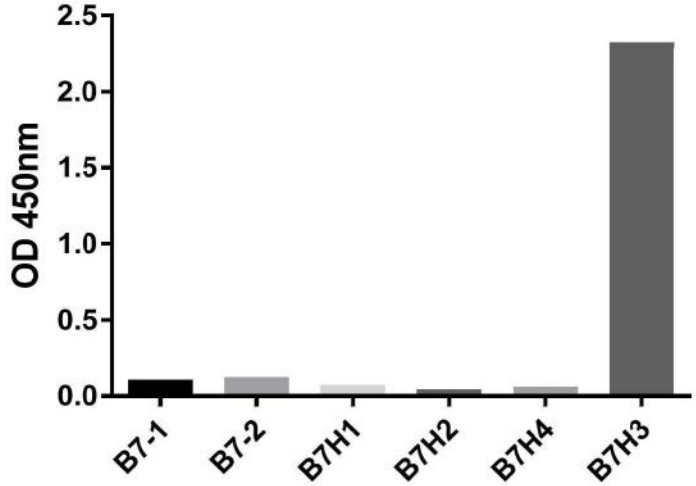

OD 450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
B7-1
B7-2
B7H1
B7H2
B7H4
B7H3

图6B

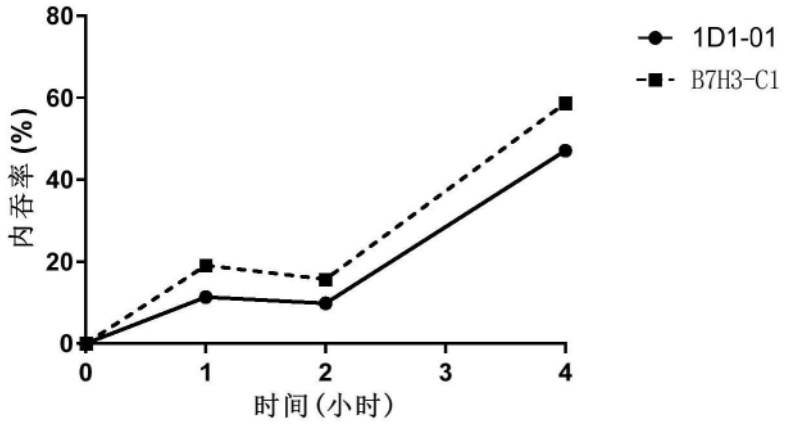

内吞率(%)
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
时间(小时)
1D1-01
B7H3-C1

图7A

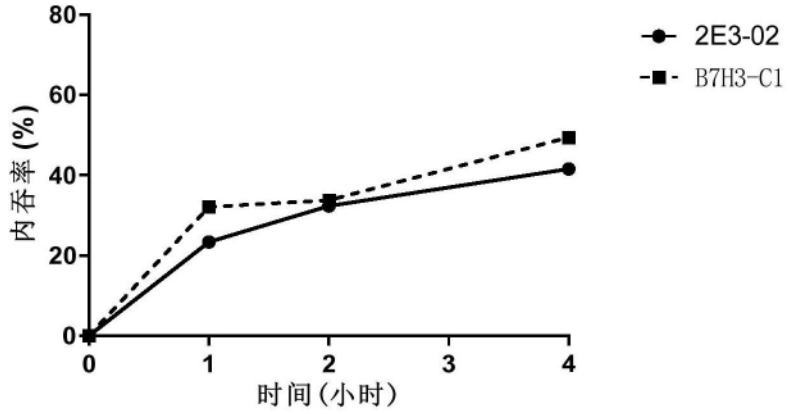

80
60
40
20
0
内吞率(%)
0
1
2
3
4
时间(小时)
2E3-02
B7H3-C1

图7B

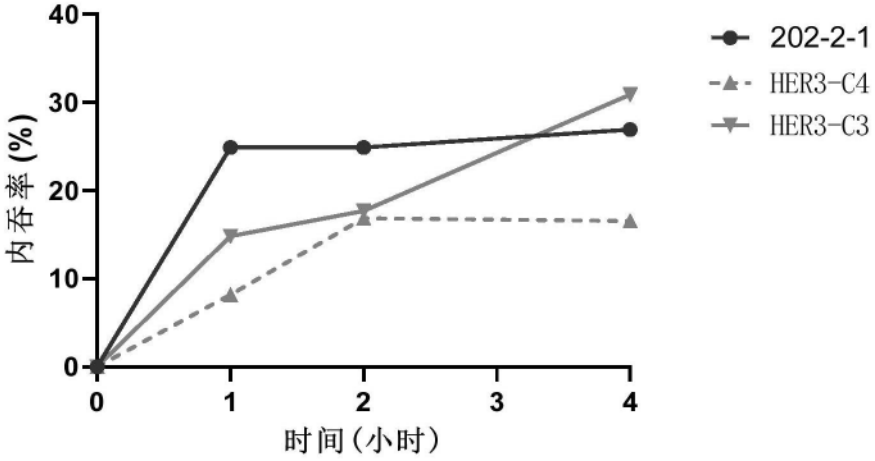

40
30
20
10
0
内吞率(%)
0
1
2
3
4
时间(小时)
202-2-1
HER3-C4
HER3-C3

图7C

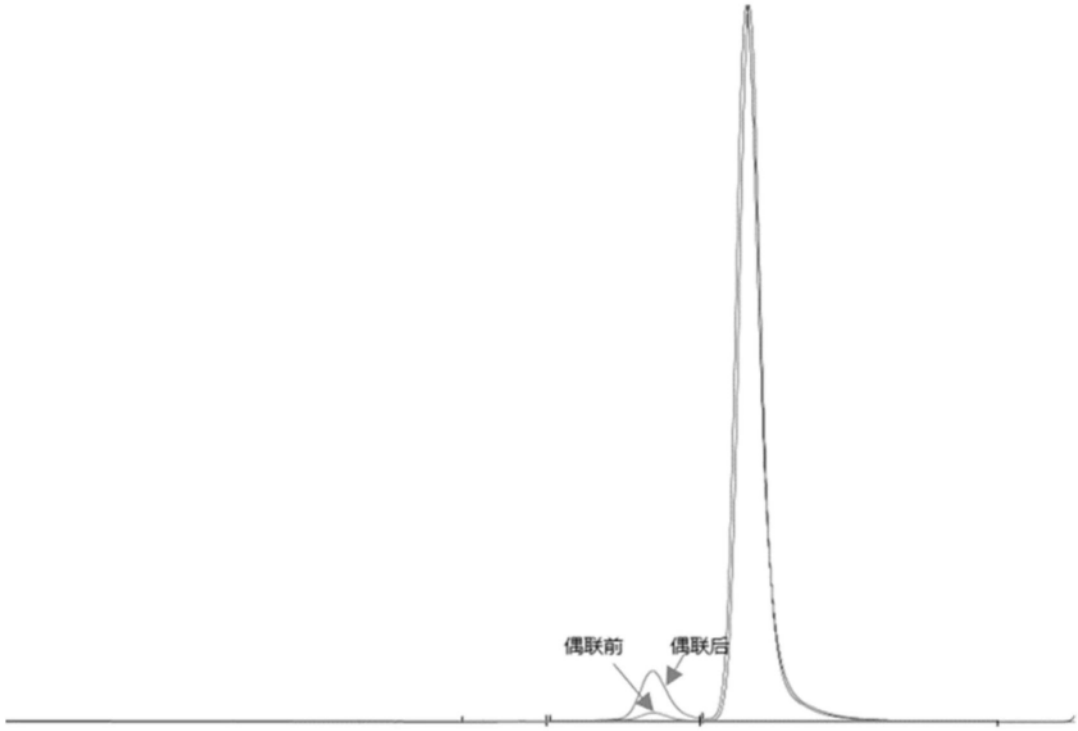

偶联前
偶联后

图8

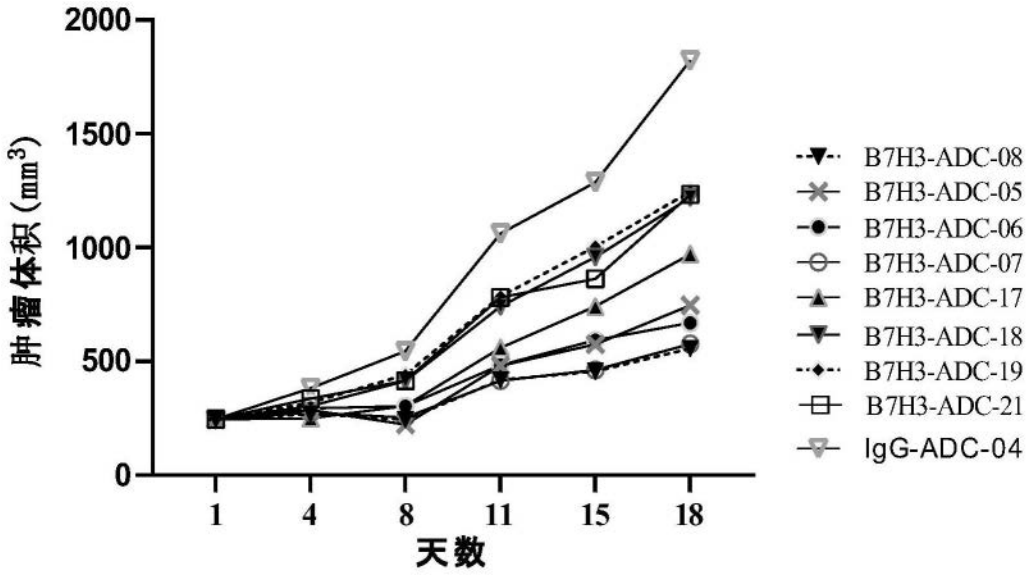

2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积(mm3)
1
4
8
11
15
18
天数
B7H3-ADC-08
B7H3-ADC-05
B7H3-ADC-06
B7H3-ADC-07
B7H3-ADC-17
B7H3-ADC-18
B7H3-ADC-19
B7H3-ADC-21
IgG-ADC-04

图9

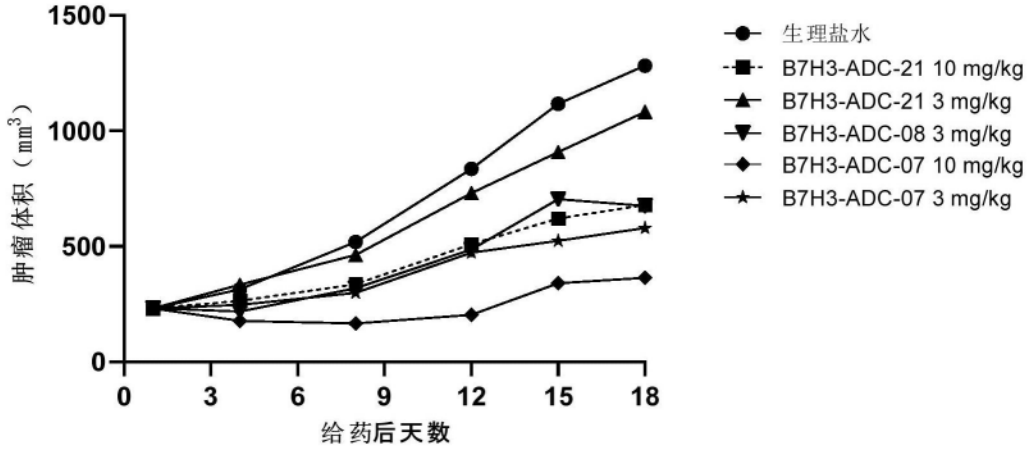

1500
1000
500
0
肿瘤体积（mm3）
0
3
6
9
12
15
18
给药后天数
生理盐水
B7H3-ADC-21 10 mg/kg
B7H3-ADC-21 3 mg/kg
B7H3-ADC-08 3 mg/kg
B7H3-ADC-07 10 mg/kg
B7H3-ADC-07 3 mg/kg

图10

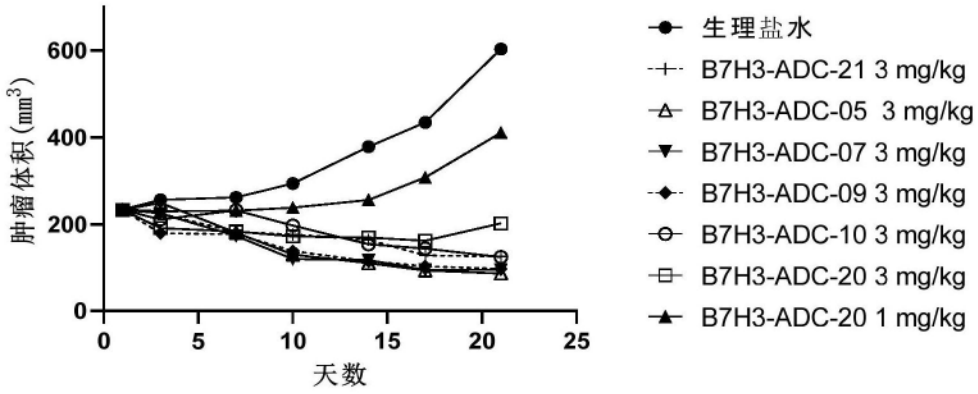

600
400
200
0
肿瘤体积(mm3)
0
5
10
15
20
25
天数
生理盐水
B7H3-ADC-21 3 mg/kg
B7H3-ADC-05 3 mg/kg
B7H3-ADC-07 3 mg/kg
B7H3-ADC-09 3 mg/kg
B7H3-ADC-10 3 mg/kg
B7H3-ADC-20 3 mg/kg
B7H3-ADC-20 1 mg/kg

图11

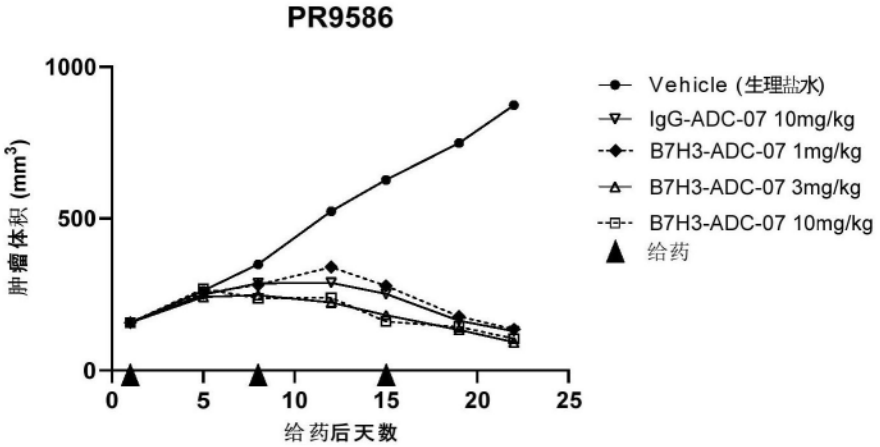

PR9586
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
0
5
10
15
20
25
给药后天数
Vehicle (生理盐水)
IgG-ADC-07 10mg/kg
B7H3-ADC-07 1mg/kg
B7H3-ADC-07 3mg/kg
B7H3-ADC-07 10mg/kg
给药

图12

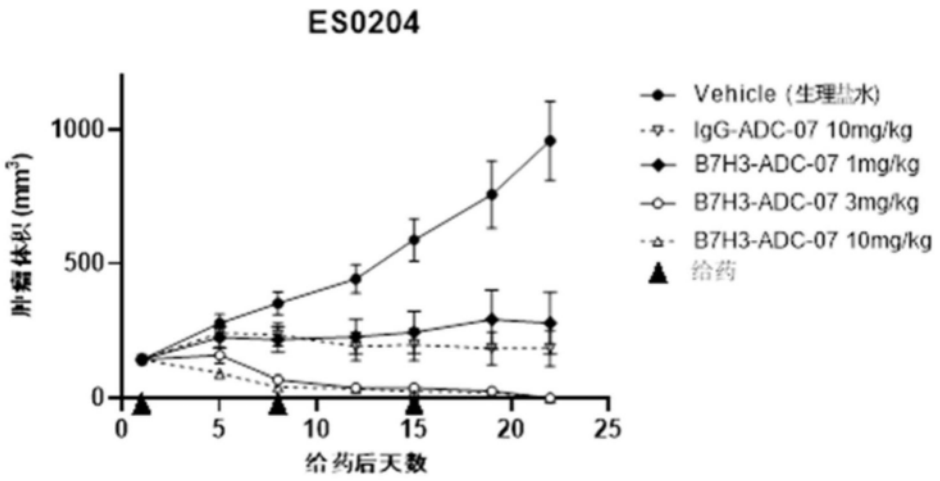

ES0204
肿瘤体积(mm³)
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
给药后天数
Vehicle (生理盐水)
IgG-ADC-07 10mg/kg
B7H3-ADC-07 1mg/kg
B7H3-ADC-07 3mg/kg
B7H3-ADC-07 10mg/kg
给药

图13

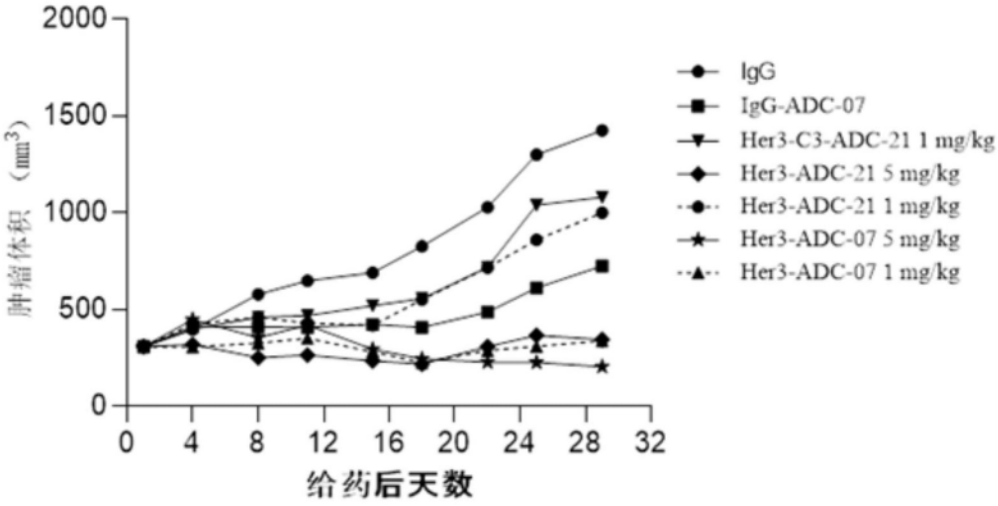

肿瘤体积 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
给药后天数
IgG
IgG-ADC-07
Her3-C3-ADC-21 1 mg/kg
Her3-ADC-21 5 mg/kg
Her3-ADC-21 1 mg/kg
Her3-ADC-07 5 mg/kg
Her3-ADC-07 1 mg/kg

图14

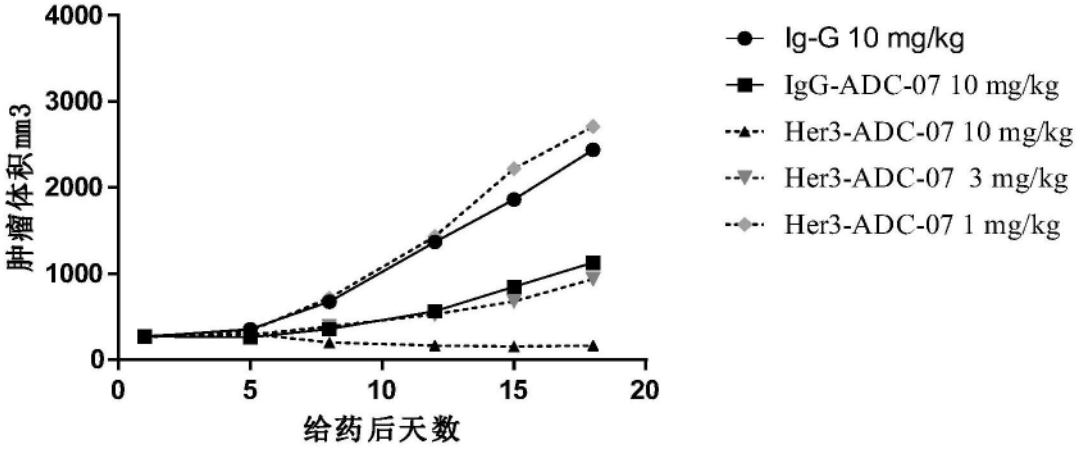

肿瘤体积mm3
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
给药后天数
Ig-G 10 mg/kg
IgG-ADC-07 10 mg/kg
Her3-ADC-07 10 mg/kg
Her3-ADC-07 3 mg/kg
Her3-ADC-07 1 mg/kg

图15

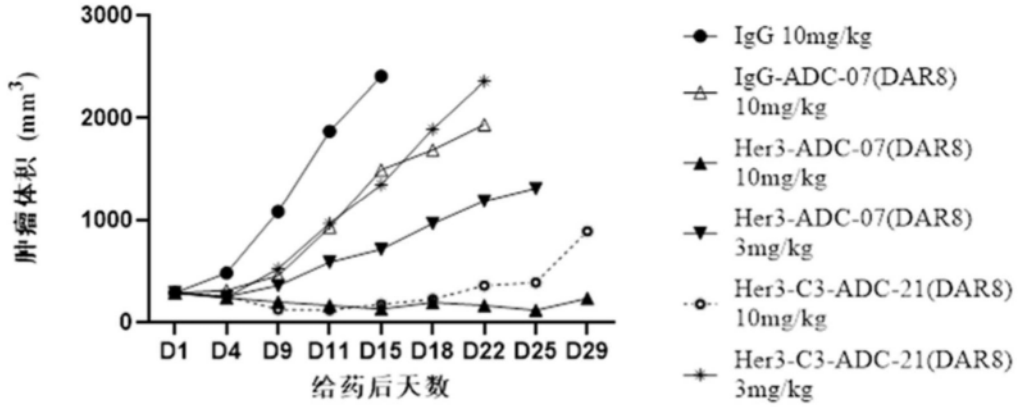

3000
2000
1000
0
肿瘤体积 (mm³)
D1 D4 D9 D11 D15 D18 D22 D25 D29
给药后天数
IgG 10mg/kg
IgG-ADC-07(DAR8) 10mg/kg
Her3-ADC-07(DAR8) 10mg/kg
Her3-ADC-07(DAR8) 3mg/kg
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10mg/kg
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3mg/kg

图16

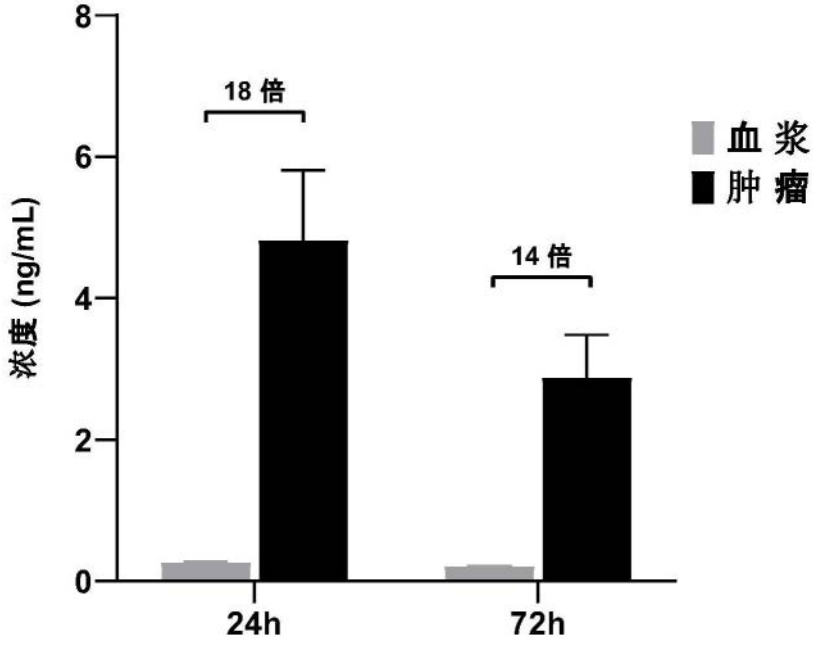

8
6
4
2
0
浓度 (ng/mL)
18 倍
14 倍
血 浆
肿 瘤
24h
72h

图17

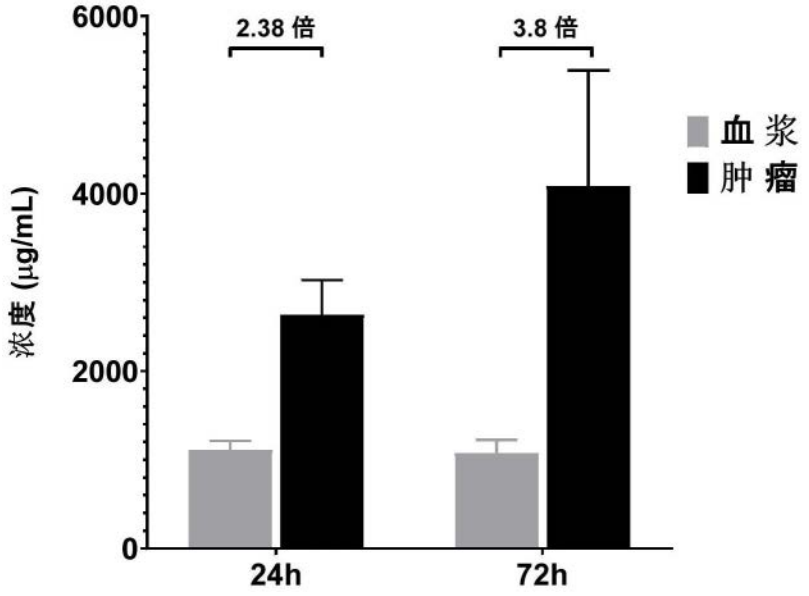

6000
4000
2000
0
浓度 (μg/mL)
2.38 倍
3.8 倍
血 浆
肿 瘤
24h
72h

图18

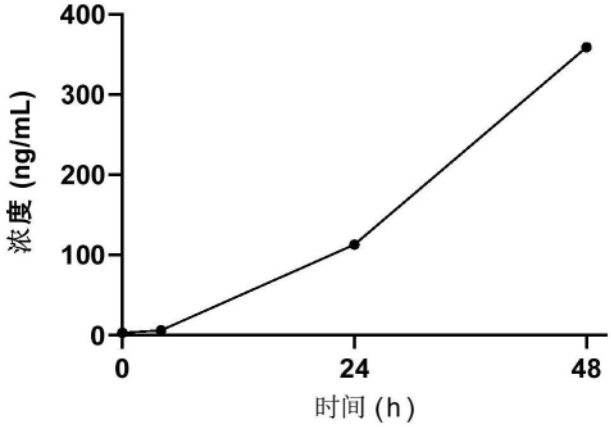

400
300
200
100
0
浓度 (ng/mL)
0
24
48
时间 (h)

图19A

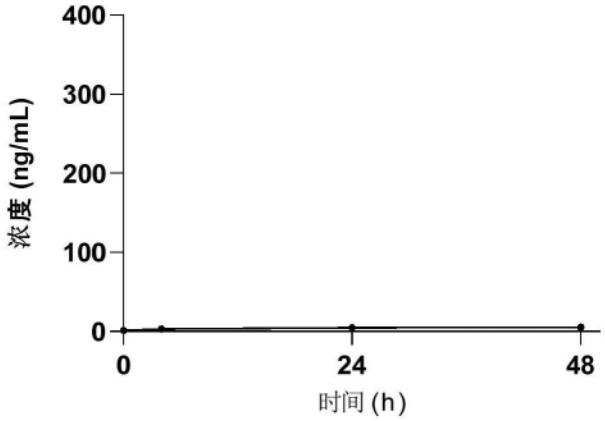


图19B