(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2015 年 8 月 6 日 (06.08.2015)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2015/113476 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/537 (2006.01) *A61K 45/00* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/071289

(22) 国际申请日: 2015 年 1 月 22 日 (22.01.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201410043554.X 2014 年 1 月 29 日 (29.01.2014) CN
201410593726.0 2014 年 10 月 29 日 (29.10.2014) CN

(71) 申请人: **上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。

(72) 发明人: **王亚里 (WANG, Yali)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **张连山 (ZHANG, Lianshan)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **梁金栋 (LIANG, Jindong)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **李昂 (LI, Ang)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **杨方龙 (YANG, Fanglong)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: **北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.)**; 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层, Beijing 100738 (CN)。

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

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

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

WO 2015/113476 A1

(54) Title: LIGAND-CYTOTOXICITY DRUG CONJUGATE, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USES THEREOF

(54) 发明名称 : 配体-细胞毒性药物偶联物、其制备方法及其应用

(57) Abstract: A ligand-cytotoxicity drug conjugate with a general formula of Pc-(X-Y-D)$_n$, a preparation method therefor, and uses of the ligand-cytotoxicity drug conjugate and pharmaceutical compositions comprising the same in the preparation of drugs for treating cancers by receptor regulation.

(57) 摘要: 一种通式为 Pc-(X-Y-D)$_n$的配体-细胞毒性药物偶联物，其制备方法以及该配体-细胞毒性药物偶联物及含有其的药物组合物通过受体调节在制备治疗癌症的药物中的用途。

配体-细胞毒性药物偶联物、其制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及一类全新结构的配体-细胞毒性药物偶联物。具体地说，本发明涉及抗体-细胞毒性药物偶联物，也涉及本发明偶联物的制备方法、包含所述偶联物的药物组合物以及所述偶联物或药物组合物的用途。

背景技术

化疗依然是包括手术、放疗、以及靶向治疗法在内的最重要的抗癌手段之一。尽管高效细胞毒素的种类很多，但是肿瘤细胞和正常细胞之间差别很小，限制了这些抗肿瘤化合物由于毒副作用在临床上的广泛应用。而抗肿瘤单克隆抗体对于肿瘤细胞表面抗原的特异性，抗体药物已成为抗肿瘤治疗的前线药物，但单独使用抗体作为抗肿瘤药物时，疗效经常不尽人意。

抗体药物偶联物（antibody drug conjugate，ADC）把单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连，充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒素的高效性，同时又避免了前者疗效偏低和后者毒副作用过大等缺陷。这也就意味着，与以往传统的化疗药物相比，抗体药物偶联物能精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响（Mullard A, (2013) *Nature Reviews Drug Discovery*, 12:329–332; DiJoseph JF, Armellino DC, (2004) *Blood*, 103:1807-1814）。

早期的 ADC 药物主要使用鼠源的单抗，因为人类的免疫反应造成一部分药物难以到达标靶。其次，早期使用的包括阿霉素（doxorubicin）在内的效应分子的生物活性较低，限制了第一代抗体药物偶联物的疗效。除此之外，抗体的来源、接头连接的方式和数目也未得到优化。

2000 年第一个抗体药物偶联物 Mylotarg®（吉妥珠单抗奥唑米星（gemtuzumab ozogamicin），惠氏制药有限公司）被美国 FDA 批准上市，用于治疗急性髓细胞白血病（*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686；US4970198；US 5079233；US 5585089；US 5606040；US 5693762；US 5739116；US 5767285；US 5773001）。Mylotarg® 是一种人源 CD33 抗体-卡利奇霉素偶联物，后来由于疗效有限和毒副作用较高，辉瑞公司主动在 2010 年将 Mylotarg®撤市。

2011 年 8 月，Adcetris®（brentuximab vedotin，西雅图基因遗传公司）通过美国 FDA 快速审评通道，用于治疗霍奇金淋巴瘤以及复发性间变性大细胞淋巴瘤（*Nat. Biotechnol* (2003) 21(7):778-784；WO2004010957；WO2005001038；US7090843A；US7659241；WO2008025020）。Adcetris®是一种新型靶向 ADC 药物，能使药物直接作用于淋巴瘤细胞上的靶点 CD30 后发生内吞作用从而诱导肿瘤细胞的凋亡。

2013 年 2 月，Kadcyla®（ado-trastuzumab emtansine，T-DM1）获得美国 FDA 批准，用于治疗 HER2 阳性同时对曲妥珠单抗（Tratuzumab，商品名：Herceptin®和紫杉醇有抗药性的晚期或转移性乳腺癌患者（WO2005037992；US8088387）。Mylotarg®和 Adcetris®都是针对血液肿瘤进行靶向治疗，和固体肿瘤相比组织结构相对简单。Kadcyla®是美国 FDA 批准的治疗固体肿瘤的第一个 ADC 药物。

Kadcyla®采用 ImmunoGen 的技术将高活性的有丝分裂抑制剂 DM1 用一个稳定的硫醚健接头连到罗氏公司的曲妥珠单抗上，平均一个曲妥珠单抗结合大约 3.5 个 DM1，曲妥珠单抗在病人体内特异性结合乳腺癌细胞，被细胞内吞后在细胞内断裂释放出 DM1，DM1 在细胞内的聚集浓度足以导致细胞因有丝分裂障碍而死亡，肿瘤灶随之消退（不同于 Herceptin®单抗单药治疗时经常发生的肿瘤生长迟缓）。T-DM1 既保留了 Herceptin®的抗体依赖性的细胞增殖抑制作用，同时又增加了潜在的细胞毒素药物的效应。而且因为其毒素靶向在肿瘤细胞内释放，药物毒副作用并没有随着疗效的增加而同步增大。

帕妥珠单抗（Pertuzumab，也被称作 2C4，商品名 Perjeta）是一种重组人源化单克隆抗体，它是第一个被称作“HER 二聚化抑制剂”的单克隆抗体。通过结合 HER2 阻滞了 HER2 与其它 HER 受体的二聚化作用（ Agus DB, (2002)Cancer Cell (2):127-137; Schaefer G, (1997)Oncogene(15):1385-1394; Mendoza N , (2002) Cancer Res (62):5485-5488; Takai N, (2005)Cancer (104):2701-2708; Jackson JG, (2004) Cancer Res(64):2601-2609）。帕妥珠单抗已经被证实在 HER2 高表达及低表达的前列腺癌模型上均有抑制肿瘤生长的作用（Craft N, (1999)Nat Med (5):280-285; Oxley JD, (2002)J Clin Pathol(55):118-120; Reese DM, (2001) Am J Clin Pathol(116):234-239; Agus DB, (2002)Cancer Cell (2):127-137）。

与曲妥珠单抗（Trastuzumab,商品名 Herceptin）结合位点位于 HER2 胞外区的近膜区 IV 亚域上抑制下游信号通路不同，帕妥珠单抗则是通过结合在 II 域（二聚化域）有效抑制 HER2 的异源二聚化反应。因此，曲妥珠单抗只能对 HER2 过表达的癌症患者尤其是乳腺癌患者有一定疗效，而帕妥珠单抗虽然和曲妥珠单抗作用同一靶点，且二者有同样的内吞特点，但因其作用机理不同，在抑制二聚化后可以切断由 ErbB 家族受体介导的信号通路，可能会有比单独阻断 HER2 信号通路更广泛的应用范围（Franklin MC, (2001) *Cancer Cell*(5):317-328）。

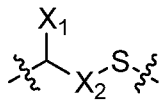
目前 ADC 药物的偶联技术主要有两种：T-DM1 采用的是将细胞毒性药物与抗体的自由氨基随机偶联（WO2005037992）；而 Adcetris®采用的是将细胞毒性药物和抗体铰链区还原后的自由巯基偶联(WO2004010957)。两种偶联方法都产出了载药量数不一致的混合物。如 T-DM1 虽然平均载药量是 3.5，但载药量的分布可从 0~8。过低的载药量影响了 ADC 的药效，而过高的载药量则更容易因对抗体的过分修饰而导致 ADC 药物被组织的巨噬细胞体系识别并破坏。这不仅减低了

ADC 的半衰期也因为毒素在非靶点组织的积累而增加毒性副作用；而 Adcetris®用还原剂将抗体铰链区的二硫键进行还原，对抗体本身的稳定性产生一定影响。

发明内容

为了改进配体，特别是抗体和药物的偶联效果，本发明提供了一种改进的用于配体和药物偶联的连接单元。

本发明公开了一种具有连接单元 X 的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述连接单元 X 具有以下结构：



（X）

X_1 选自 H、烷基、环烷基、杂环基、芳基或-杂芳基，其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代，

X_2 选自烷基、环烷基、烷基-环烷基、环烷基-烷基、烷基-环烷基-烷基、杂环基、烷基-杂环基、杂环基-烷基、烷基-杂环基-烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基、烷基-芳基-烷基、杂芳基、烷基-杂芳基、杂芳基-烷基、烷基-杂芳基-烷基、$(CH_2)_p(OCH_2CH_2)_p$、$(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_p$，各个 p 独立地选自 1-10 的整数，其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代，

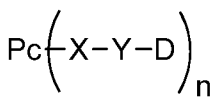
或当 X_1 不为 H 时，X_1 可与 X_2 以及与 X_1、X_2 相连的 C 原子形成-环烷基-结构，其中环烷基独立地可任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代，

S 为硫原子。

在本发明的一个优选实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中 X_1 为 H 或烷基，优选为 H。

在本发明的另一个优选实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中 X_2 为烷基或环烷基，优选为烷基，更优选为直链烷基。

在本发明的另一个优选实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其具有以下式（I）的结构：



（I）

其中：

Pc 为配体；

X 如上所定义；

Y 为间隔单元；

D 为细胞毒性药物；

n 为载药量，n 选自 1-8。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中连接单元 X 与 Pc 的多肽链 N 端氨基或赖氨酸残基的ε-氨基相连，n 选自 1-4。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述配体为抗体。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述抗体的抗原为增生性疾病靶细胞和/或组织上表达的细胞表面抗原；所述增生性疾病优选癌症；所述细胞表面抗原优选为细胞表面受体。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述的细胞表面受体选自：

(1) HER2(ErbB2)，

(2) HER3(ErbB3)，

(3) HER4(ErbB4)，

(4) CD20，

(5) CD22，

(6) CD30，

(7) CD33，

(8) CD44，

(9) Lewis Y，

(10) CD56，

(11) CD105，

(12) VEGFR，或

(13) GPNMB。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述的细胞表面受体选自：

(1) HER2(ErbB2)，

(2) CD22，

(3) CD30

(4) CD33，

(5) CD44

(6) CD56，

(7) Lewis Y，或

(8) GPNMB。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述的抗体选自：

(1) Trastuzumab（曲妥珠单抗）(HER2)，

(2) Inotuzumab（奥英妥珠单抗）(CD22)，

(3) Pinatuzumab（帕尼妥珠单抗）(CD22)，

(4) Brentuximab(CD30)，

(5) Gemtuzumab（吉妥珠单抗）(CD33)，

(6) Bivatuzumab（比伐珠单抗）(CD44)，

(7) Lorvotuzumab(CD56)，

(8) cBR96(Lewis Y)，

(9) Glematumamab(GPNMB) 或

(10) Pertuzumab（帕妥珠单抗）。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述抗体为能够结合至 HER2 蛋白的抗体，所述的抗体：

1) 含有至少一个选自三个根据 Kabat 编号系统所定义的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的轻链，其中

i) CDR-L1 为序列 SEQ ID No.1 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.1 具有至少 80%同源性的序列；

ii) CDR-L2 为序列 SEQ ID No.2 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.2 具有至少 80%同源性的序列；

iii) CDR-L3 为序列 SEQ ID No.3 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.3 具有至少 80%同源性的序列；

2) 含有至少一个选自三个根据 Kabat 编号系统所定义的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的轻链，其中

iv) CDR-H1 为序列 SEQ ID No.4 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.4 具有至少 80%同源性的序列；

v) CDR-H2 为序列 SEQ ID No.5 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.5 具有至少 80%同源性的序列；

vi) CDR-H3 为序列 SEQ ID No.6 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.6 具有至少 80%同源性的序列。

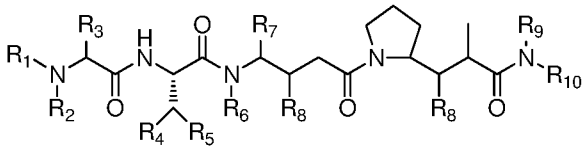
在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述的能够结合至 HER2 蛋白的抗体含有轻链和/或重链，所述轻链具有含有氨基酸序列 SEQ ID No.7 的序列，所述重链具有含有氨基酸序列 SEQ ID No.8 的序列。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述细胞毒性药物选自：微管蛋白抑制剂、DNA 烷化剂、酪氨酸激酶抑制剂、拓扑异构酶抑制剂或 DNA 合成抑制剂，优选微管蛋白抑制剂。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱、伊立替康、放线菌素、阿霉素、多柔比星、柔红霉素、表柔比星；所述 DNA 合成抑制剂选自氟尿嘧啶、阿糖胞苷、阿扎胞苷、安西他滨、吉西他滨、卡培他滨、甲氨蝶呤、博来霉素、金属铂配合物；所述 DNA 烷化剂选自氮芥类（环磷酰胺）、亚乙基亚胺类（塞替派、丝裂霉素）、甲磺酸酯类（白消安）、多元醇类（二溴甘露醇）、亚硝基脲类（卡莫司汀）、三氮烯咪唑类（达卡巴嗪）和肼类（丙卡巴肼）；所述酪氨酸激酶抑制剂选自伊马替尼、吉非替尼、厄洛替尼、舒尼替尼、索拉非尼、拉帕替尼、达沙替尼、尼洛替尼。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述细胞毒性药物微管蛋白抑制剂选自美登素类、卡利奇霉素、紫杉烷类、长春新碱、秋水仙碱、Dolastatins/Auristatins，优选美登素类或 Dolastatins/ Auristatins。

在本发明的又一个实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物，其中所述 D 选自 Dolastatins/Auristatins，其结构式如通式（D_1）所示；



（D_1）

其中：

R_1 选自键、H、烷基或环烷基；优选为健；当 R_1 选自 H、烷基或环烷基时，D 在通式（I）通过 R_{10} 与 Y 连接；优选 R_1 为健，D 在通式（I）通过 R_{10} 与 Y 连接；

R_2 选自 H 或烷基；

或 R_1 和 R_2 与相连的 N 原子形成杂环基，其中所述杂环基任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代；或形成具有-$(CR_aR_b)_e$-的结构，R_a 和 R_b 独立地选自-H、-烷基或-

杂环基，e 选自 2-6 之间的整数，

R_3 选自 H、烷基、环烷基、芳基、烷基-芳基、烷基-环烷基、杂环基或烷基-杂环基；

R_4 选自 H、烷基、环烷基、芳基、烷基-芳基、烷基-环烷基、杂环基或烷基-杂环基；

R_5 选自 H 或甲基；

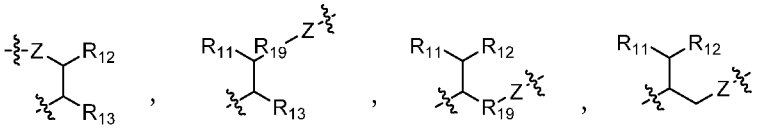
R_6 选自 H 或烷基；

R_7 选自 H、烷基、环烷基、芳基、烷基-芳基、烷基-环烷基、杂环基或烷基-杂环基；

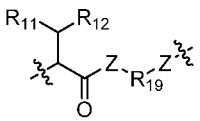
R_8 选自 H、羟基、烷基、环烷基、烷氧基；

R_9 选自 H 或烷基；

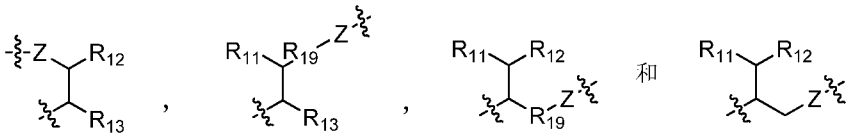
当 R_1 选自烷基或环烷基，或 R_1 和 R_2 与相连的 N 原子形成杂环基，其中所述杂环基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代时，R_{10} 选自下列结构：



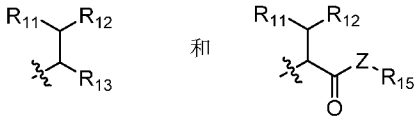
和



当 R_1 选自 H 时，R_{10} 选自下列结构：



当 R_1 选自键时，其与间隔单元 Y 相连，其中 R_{10} 选自下列结构：



Z 选自 O，S、NH 或 $N(R_{14})$；

R_{11} 选自 H、羟基、氨基、$-NHR_{14}$、$-N(R_{14})_2$、烷氧基、烷基、环烷基、芳基、杂环基、烷基-芳基、烷基-环烷基、烷基-杂环基；或 R_{11} 为 O 时，可取代与其相连的碳原子上的 H 并与此碳原子形成羰基(C=O)；

R_{12} 选自芳基或杂环基，所述芳基或杂环基任选进一步被一个或多个选自羟基、烷氧基、烷基或卤素的取代基所取代；

R_{13} 选自 H、羟基、氨基、NHR_{14}、$N(R_{14})_2$、$COOR_{14}$、烷氧基、烷基、环烷基、芳基、杂环基、烷基-芳基、烷基-环烷基、烷基-杂环基或烷氧基-烷氧基-烷氧基；

R_{14}选自H、烷基；

R_{15}选自H、烷基、芳基、杂环基、$(R_{16}O)_m$-R_{14}或$(R_{16}O)_m$-$CH(R_{17})_2$；

m选自1-1000之间的整数；

R_{16}是C_2-C_8烷基；

R_{17}选自H、羧基、-$(CH_2)_t$-$N(R_{18})_2$、-$(CH_2)_t$-SO_3R_{14}；

R_{18}选自H、烷基或-$(CH_2)_t$-COOH；

t选自0-6之间的整数；

R_{19}选自芳基、环烷基或杂环基。

在本发明的又一个优选实施方案中，一种含有通式（D_1）的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，

其中：

R_1选自键或烷基；

R_2选自H或烷基；

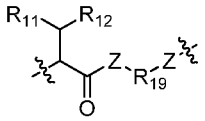
R_3选自H、烷基或环烷基；

R_4、R_5、R_6、R_7各自独立地任选H、烷基、环烷基或杂环基；

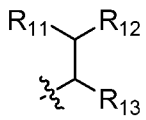
R_8选自H、烷基、环烷基或烷氧基；

R_9选自H或烷基；

当R_1选自-烷基时，R_{10}选自下列结构：



当R_1选自键时，其与间隔单元Y相连，其中R_{10}选自下列结构：



Z选自NH；

R_{11}选自H、羟基或烷基；

R_{12}选自芳基，所述芳基任选进一步被一个或多个选自羟基、烷氧基、烷基或卤素的取代基所取代；

R_{13}选自H、烷基或$COOR_{14}$；

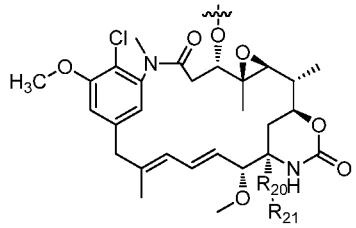
R_{14}选自H、烷基，所述烷基任选进一步被烷氧基或烷氧基-烷氧基-烷氧基取代；

R_{19}选自芳基。

在本发明的又一个优选实施方案中，通式（D_1）中R_3选自H或异丙基。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或

其可药用盐或溶剂合物，其中所述 D 选自美登素类，其结构式如通式（D_M）所示：



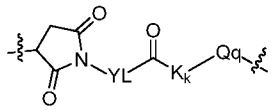
（D_M）

其中：

R_{20} 选自 O 或 S；

R_{21} 选自 H、烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基，其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、硝基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种 D 为 D_1 的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中间隔单元 Y 具有以下通式结构：



（Y）

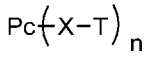
其中：

YL 选自烷基、环烷基、O-烷基、O-烷氧基、芳基、烷基-环烷基、环烷基-烷基、烷基-芳基、烷基-环烷基-烷基、杂环基、烷基-杂环基、杂环基-烷基、烷基-杂环基-烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基、烷基-芳基-烷基、杂芳基、烷基-杂芳基、杂芳基-烷基、烷基-杂芳基-烷基、$CH_2(OCH_2CH_2)_t$、$(CH_2CH_2O)_tCH_2$ 、$(CH_2CH_2O)_t$，t 是选自 1-10 的整数，优选为烷基，进一步优选为 C_2-C_8 直链烷基；

K_k 是氨基酸单元，其中 K 为氨基酸，k 选自 0-10 的整数，k 优选为 2，K_k 优选为缬氨酸-瓜氨酸；

Qq 是延伸单元，其中 q 是 0、1 或 2。

本发明还涉及一种具有以下结构式（II）的化合物：



（II）

其用作制备如结构式（III）所示的化合物的中间体，

其中：

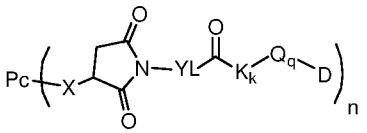
Pc 如结构式（I）所定义；

X 如连接单元 X 所定义；

T 选自 H、叔丁基、乙酰基、正丙酰基、异丙酰基，三苯基甲基、甲氧基甲基、2-(三甲硅烷基)乙氧甲基，优选为-H 或-乙酰基；

n 选自 1-4。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其具有以下结构式（III）：



（III）

其中：

Pc 为抗体；

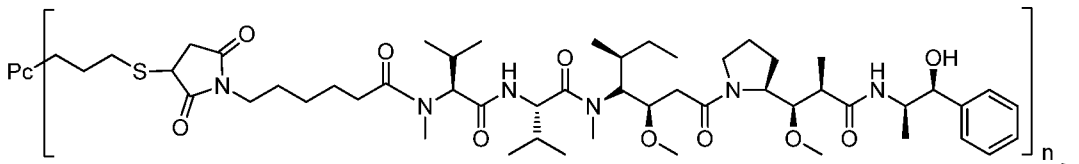
X 如连接单元 X 所定义；

YL、K_k、Q_q 如通式（Y）中所定义；

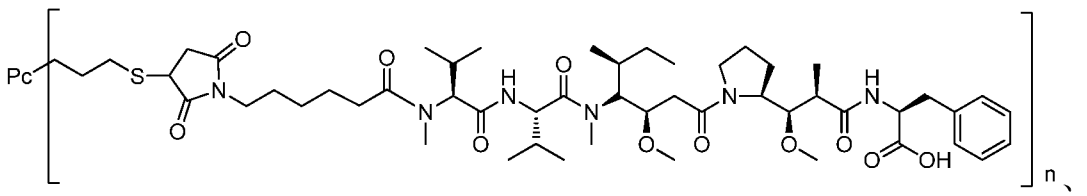
n 选自 1-4；

D 为细胞毒性药物。

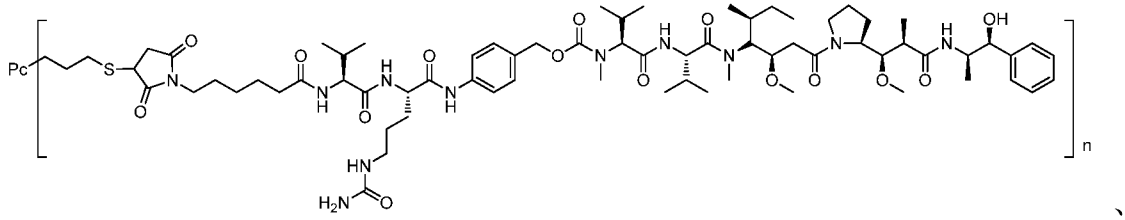
在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其具有以下任意一种结构：



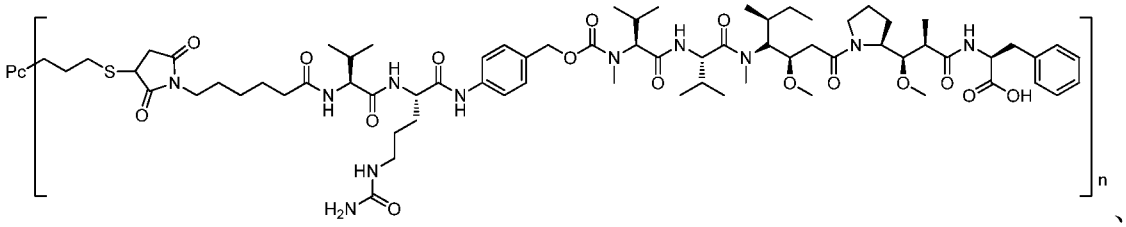
、



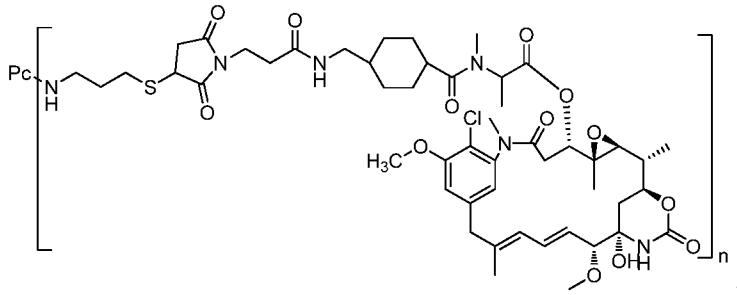
、

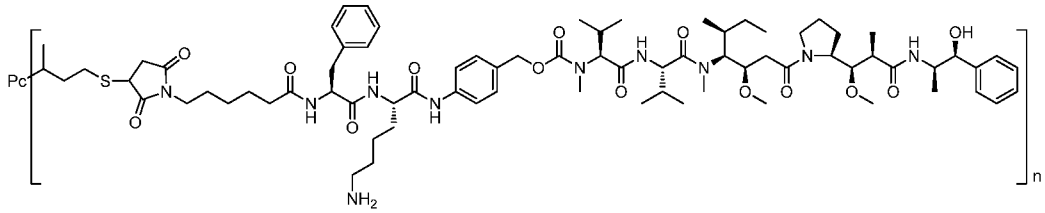


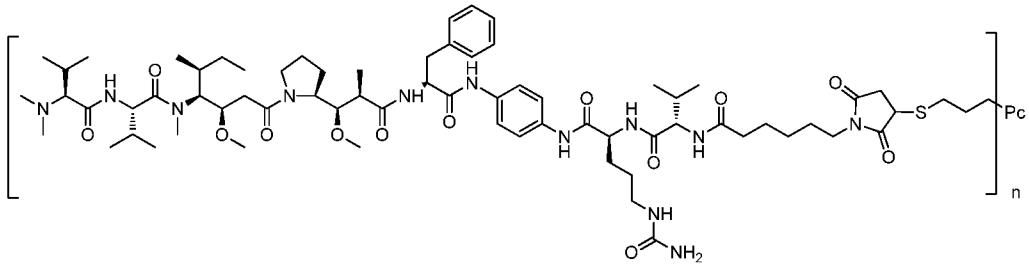
、

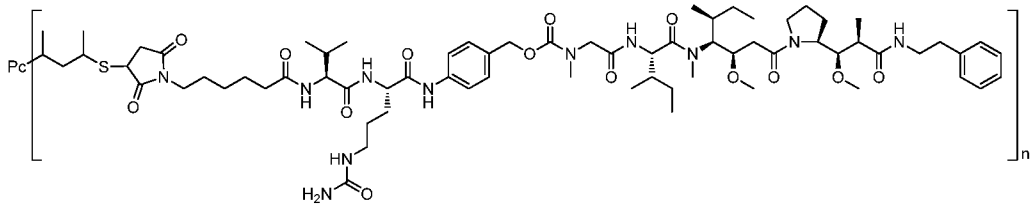


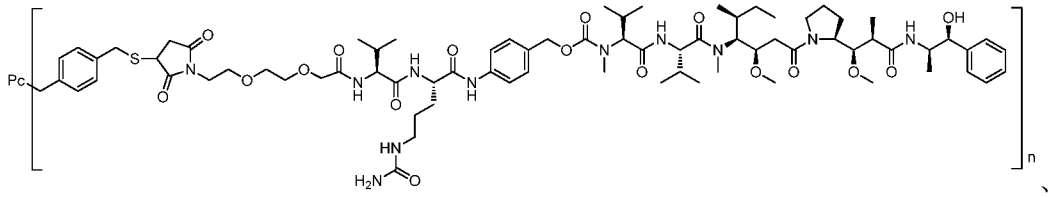
、

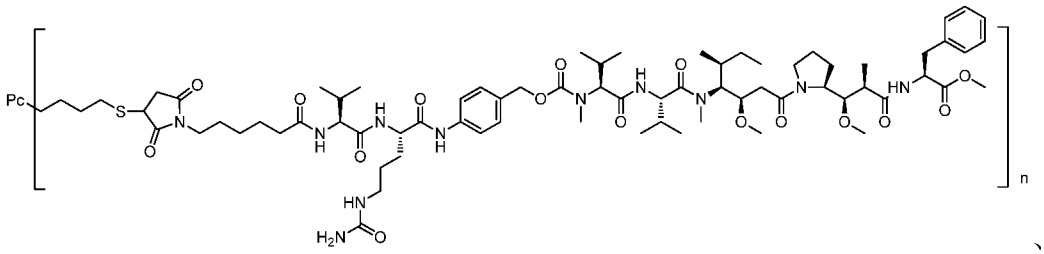


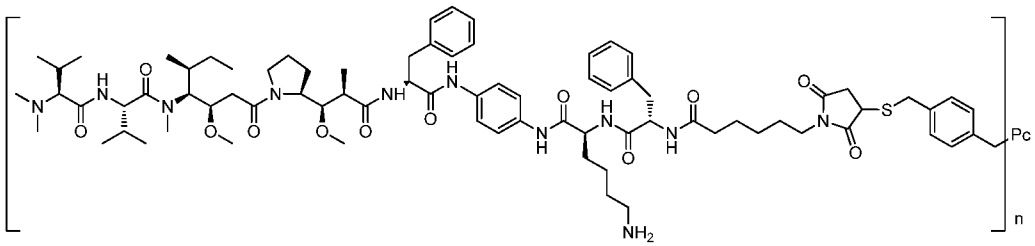


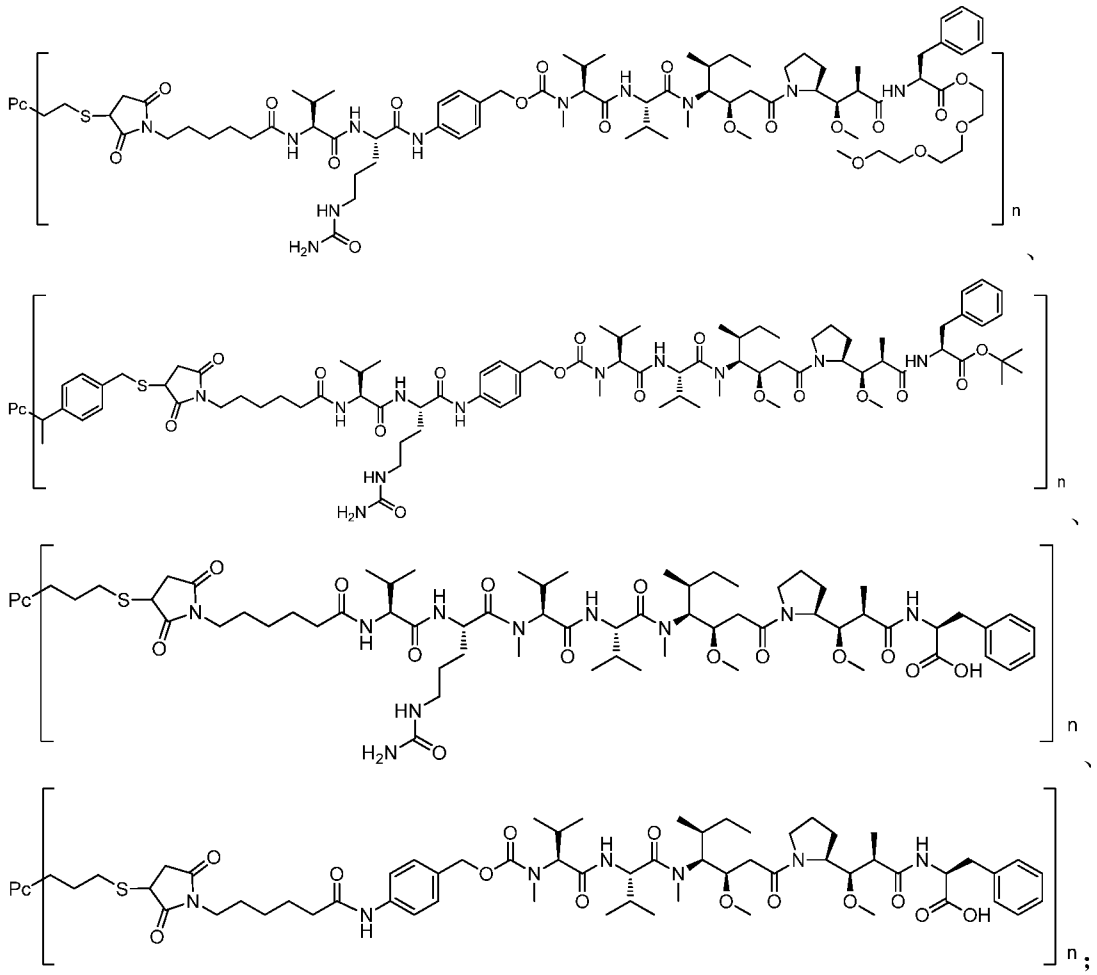








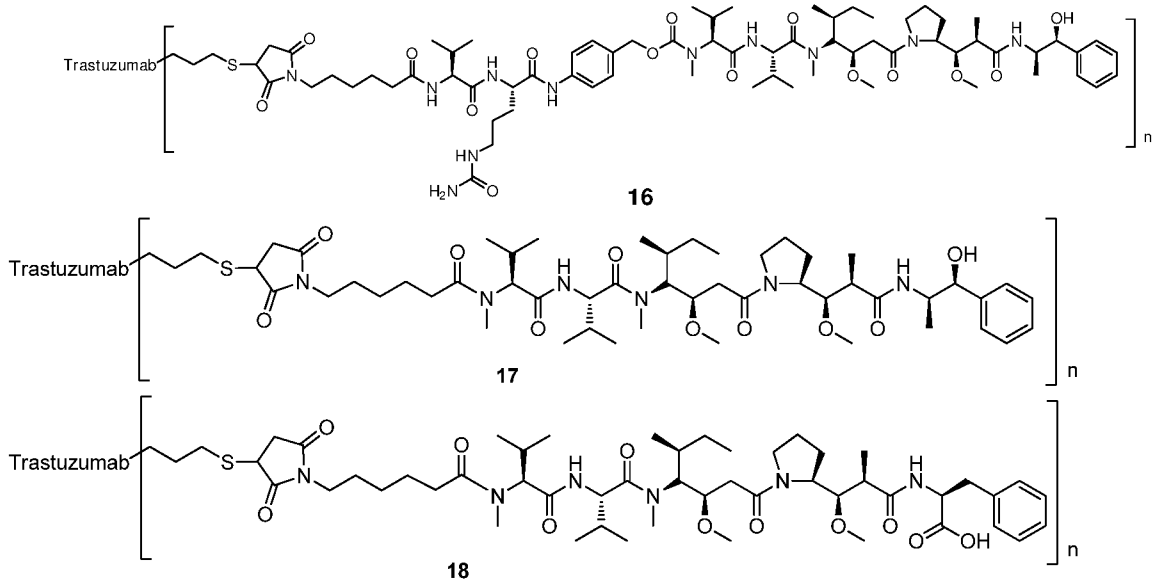




其中配体 Pc 为配体，n 为载药量，且 n 选自 1-8。

在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述 Pc 为 Trastuzumab、Inotuzumab 和 Brentuximab，优选 Trastuzumab 或 Pertuzumab，更优选 Pertuzumab。

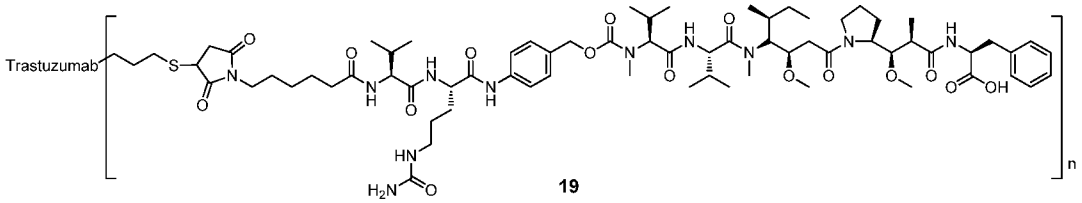
在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其选自：



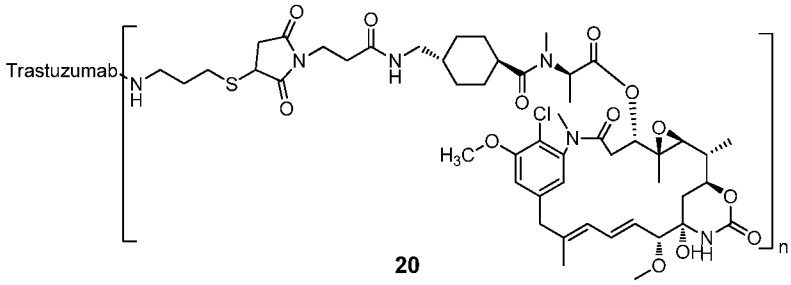
16

17

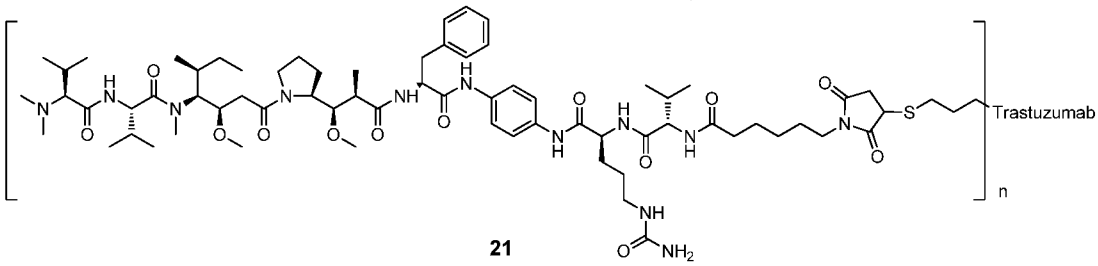
18



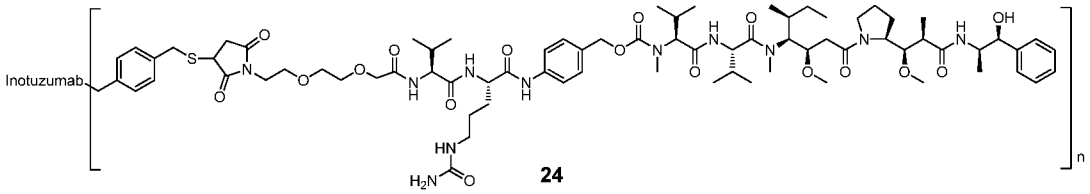
19



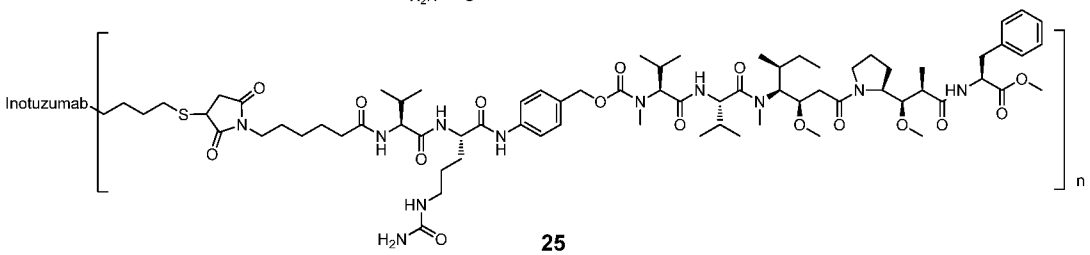
20



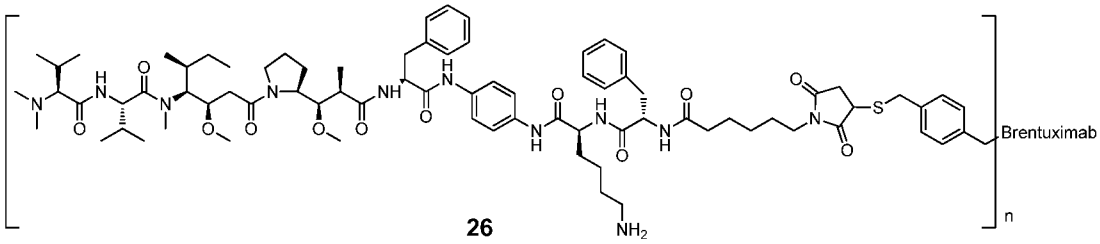
21



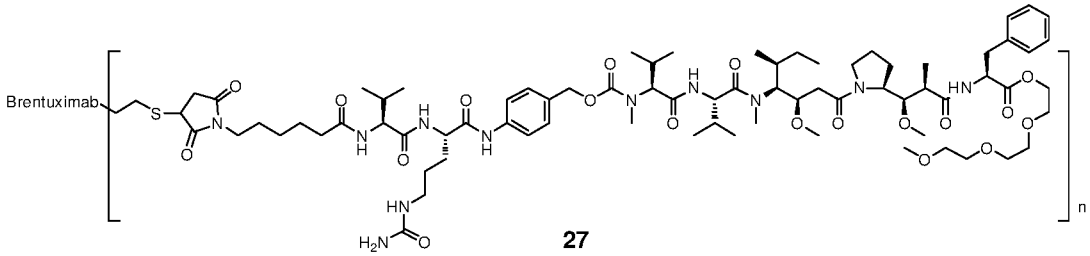
24



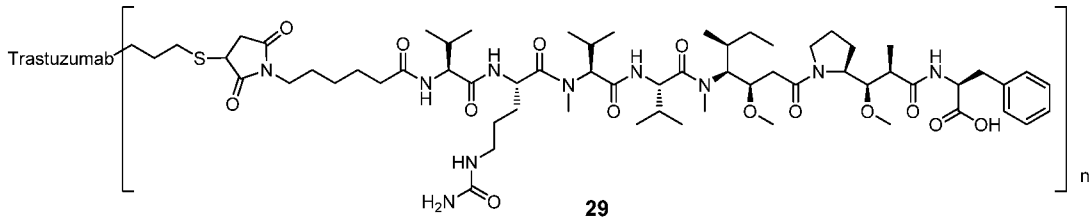
25



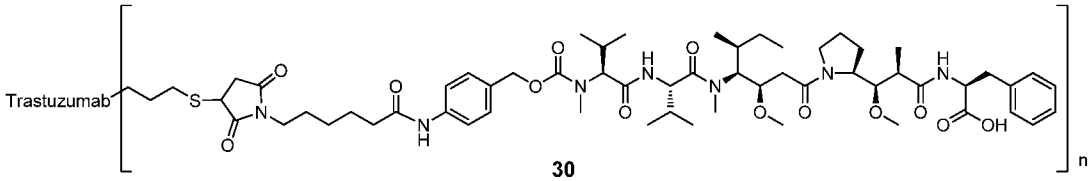
26



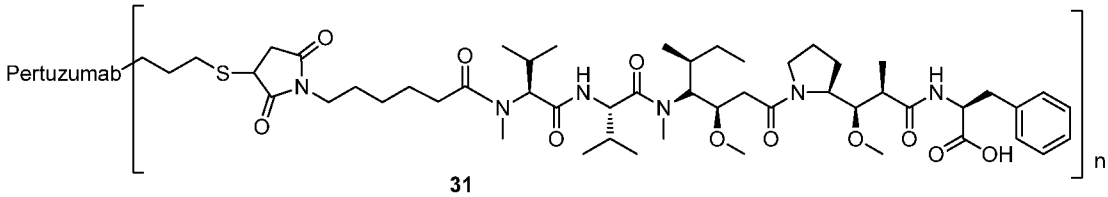
27



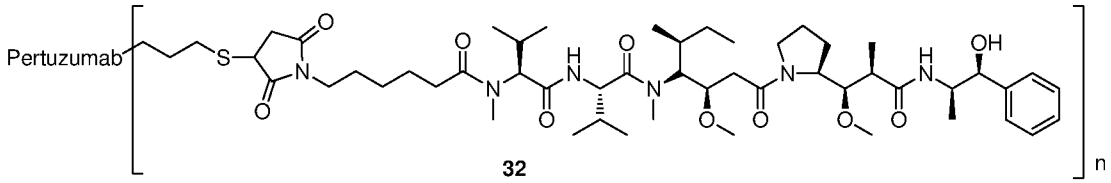
29



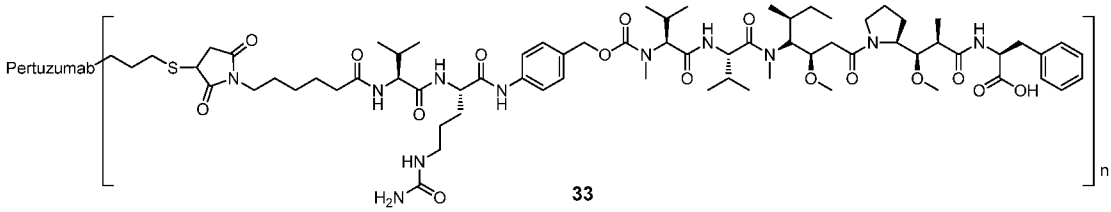
30



31

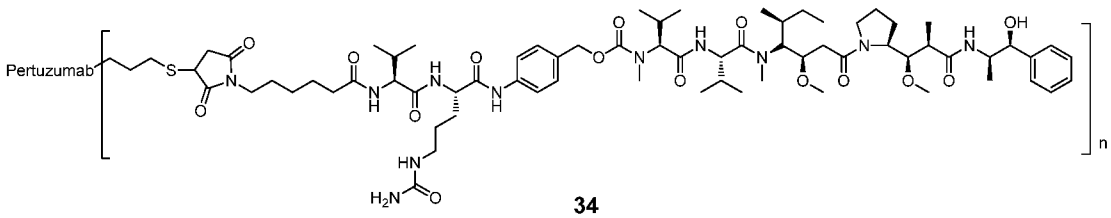


32



33

或

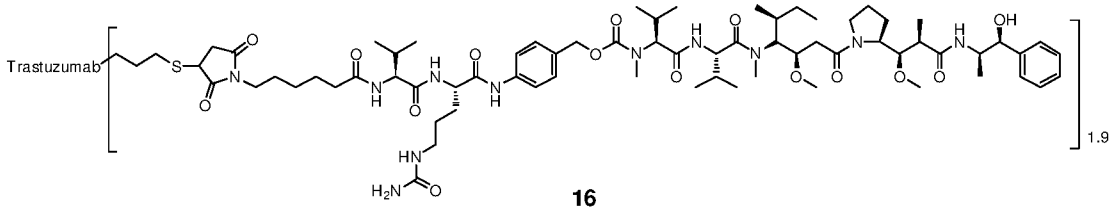


34

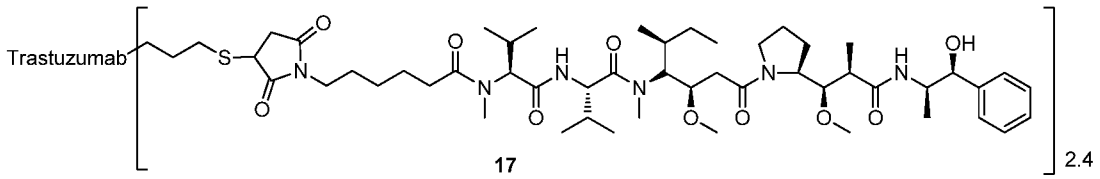
;

n 选自 1-8，优选 1-4。

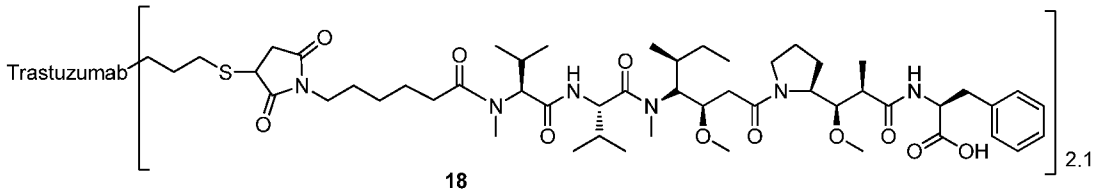
在本发明的另一个具体实施方案中，一种上述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其选自：



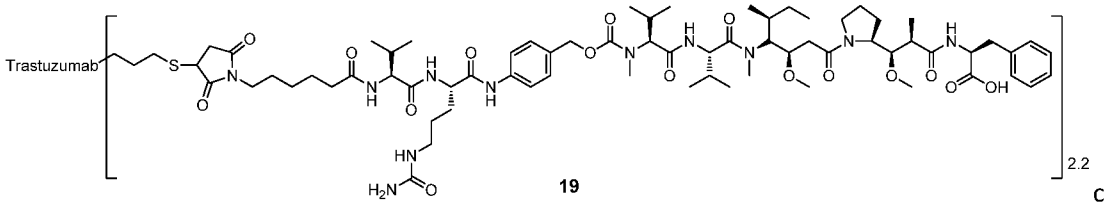
16



17

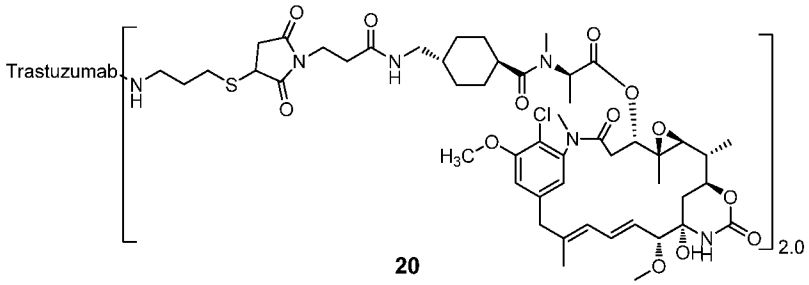


18

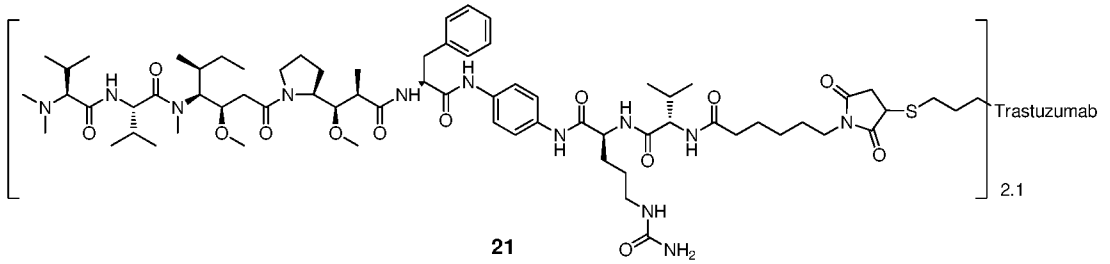


19

C

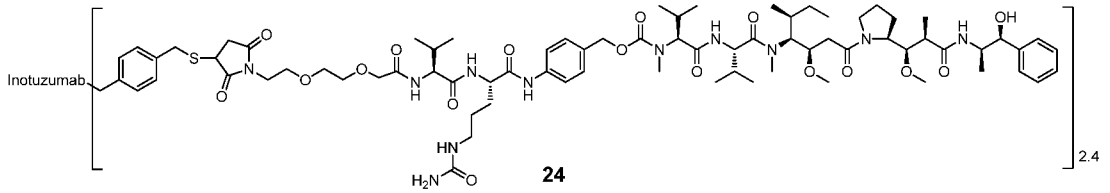


20

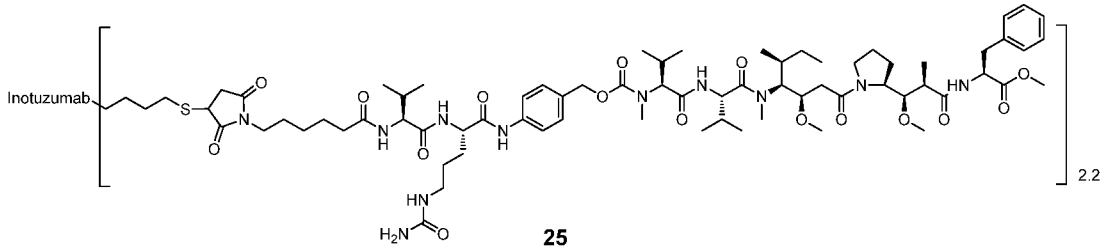


21

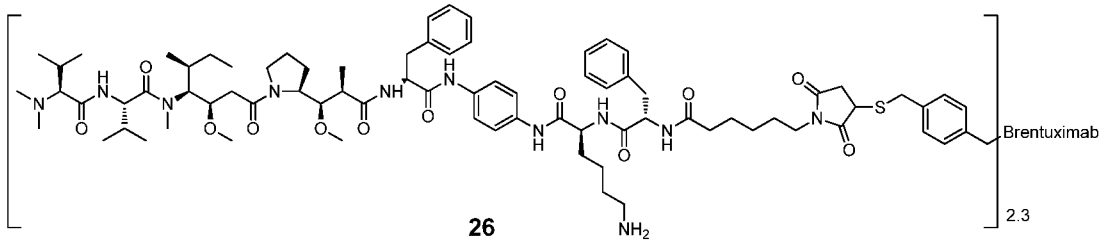
5



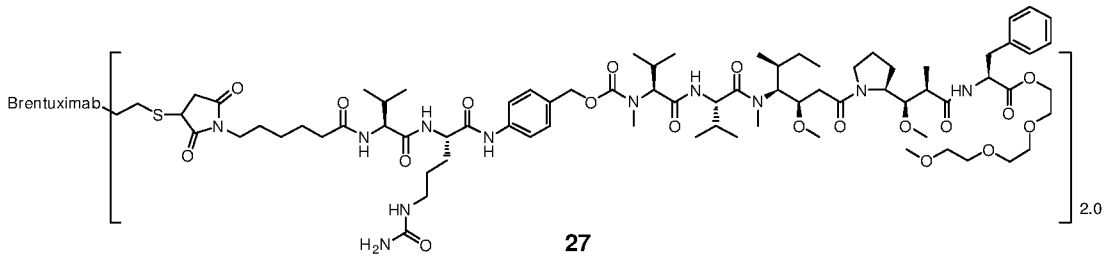
24



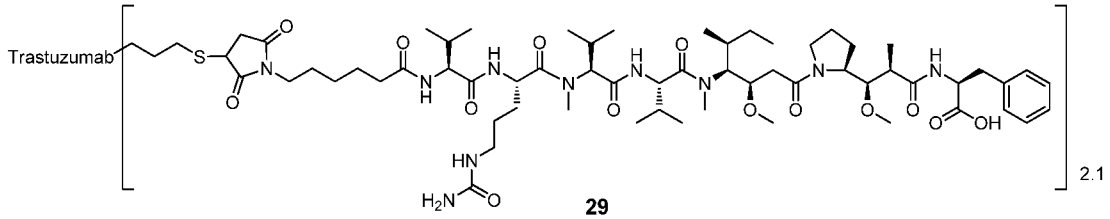
25



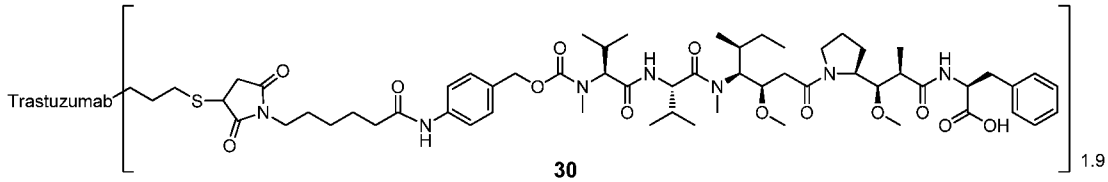
26



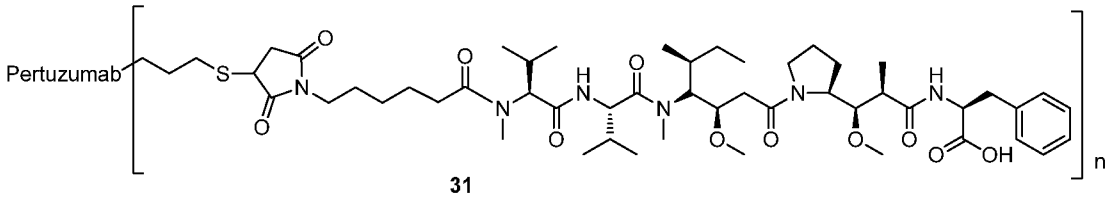
27



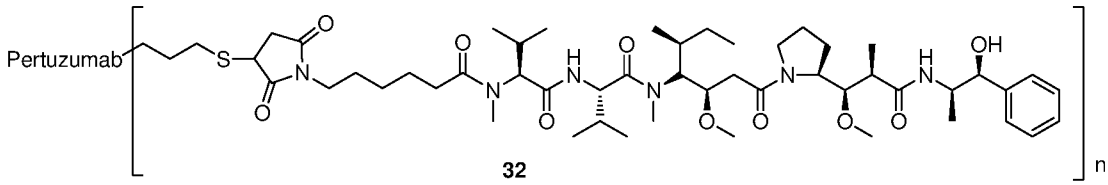
29



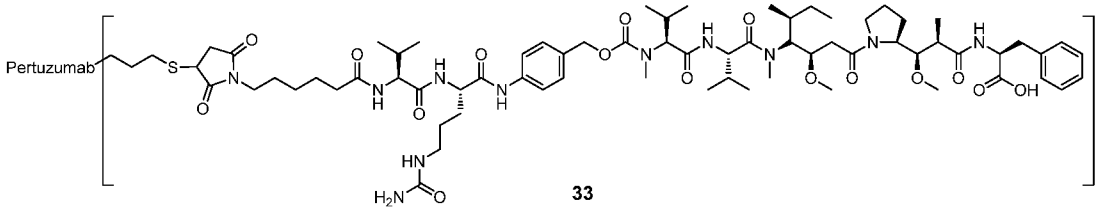
30



31

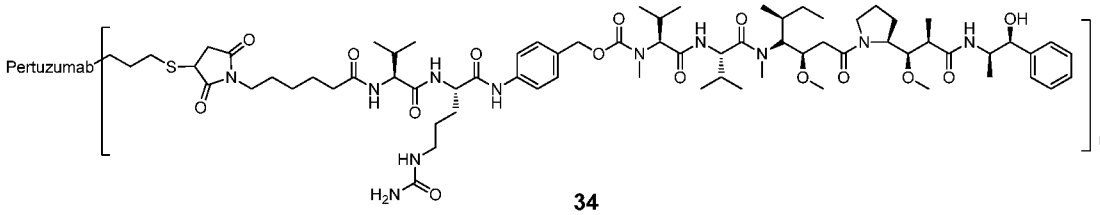


32



33

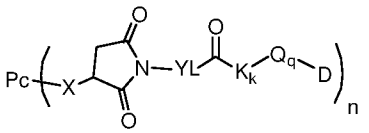
或



34 ;

n 选自 1-8，优选 1-4。

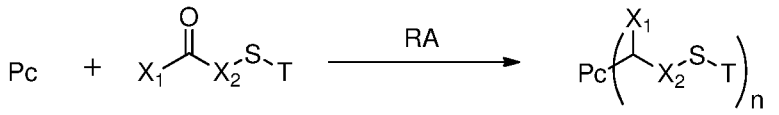
本发明还进一步涉及一种制备如通式（III）所示的抗体-细胞毒性药物偶联物的方法，



（III）

其包括如下步骤：

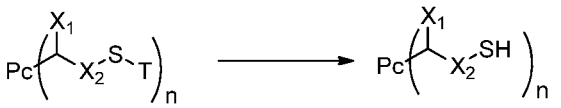
1) 向通式 IA 化合物和通式 IB 化合物中加入还原剂 RA，在反应体系 pH 值为 3-6 和反应温度为 0-40℃的条件下进行反应，得到通式 IC 化合物，



IA IB IC ；

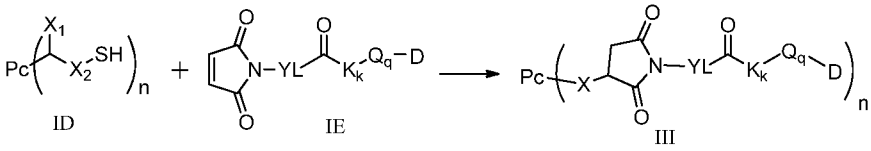
其中 T 选自叔丁基、乙酰基、正丙酰基、异丙酰基、三苯基甲基、甲氧基甲基、2-(三甲硅烷基)乙氧甲基，优选为乙酰基；

2) 在反应温度为 0-40℃的条件下，向通式（IC）化合物中加入脱保护剂脱去巯基保护基 T，得到通式 ID 化合物，



IC ID ；

3) 在反应温度为 0-40℃的条件下，通式 ID 化合物和通式 IE 化合物之间发生迈克尔加成反应，偶联得到通式（III）化合物（问题同权利要求），



ID IE III ；

其中所述反应温度优选为 15-30℃，最优选为 20-25℃；所述脱保护剂优选为盐酸羟胺；所述还原剂 RA 优选为氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠；

其中 X_1、X_2 如通式 X 所定义；P_C 为配体；T，n 如通式（II）所定义；YL、K_k、Q_q 如通式（Y）所定义，D 为细胞毒性药物。

本发明进一步涉及一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有治疗有效量的如上所述的抗体-药物偶联化合物或其可药用盐或溶剂合物以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本发明进一步涉及如上所述的抗体-药物偶联化合物或其可药用盐或溶剂合物或包含其的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途，其中所述癌症选自以下一种或多种肿瘤相关受体(1)-(8)过表达的癌症：

(1) HER2(ErbB2)，

(2) CD22，

(3) CD30

(4) CD33，

(5) CD44

(6) CD56，

(7) Lewis Y，或

(8) GPNMB。

本发明进一步涉及一种体外调节受体的方法，该方法包括对于受测物施用有效剂量的如上所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物或包含其的药物组合物，所述受体选自：

(1) HER2(ErbB2)，

(2) CD22，

(3) CD30，

(4) CD33，

(5) CD44，

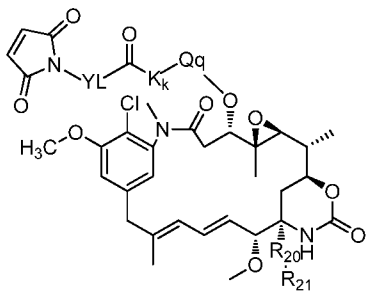
(6) CD56，

(7) Lewis Y，或

(8) GPNMB。

本发明进一步涉及一种治疗哺乳动物癌症的方法，该方法包括对于哺乳动物施用有效剂量的如上所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物或包含其的药物组合物；其中所述哺乳动物优选为人；所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤，优选为乳腺癌、霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤；更优选为 2+或更高水平过表达 HER2 的乳腺癌；最优选为与 HER2 表达相关的乳腺癌。

本发明进一步涉及一种通式为（IV）所示的化合物、互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体及其混合物形式、及可药用的盐在制备治疗癌症的药物中的用途：



（IV）

其中：

YL 选自烷基、环烷基、O-烷基、O-烷氧基、芳基、烷基-环烷基、环烷基-烷基、烷基-芳基、烷基-环烷基-烷基、杂环基、烷基-杂环基、杂环基-烷基、烷基-杂环基-烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基、烷基-芳基-烷基、杂芳基、烷基-杂芳基、杂芳基-烷基、烷基-杂芳基-烷基、$CH_2(OCH_2CH_2)_t$、$(CH_2CH_2O)_tCH_2$、$(CH_2CH_2O)_t$，t 是选自 1-10 的整数，优选为烷基，进一步优选为 C_2-C_8 直链烷基；

K_k 是氨基酸单元，其中 K 为氨基酸，k 选自 0-10 的整数，k 优选为 2，K_k 优选为缬氨酸-瓜氨酸；

Qq 是延伸单元，其中 q 是 0、1 或 2；

R_{20} 选自 O 或 S；

R_{21} 选自 H、烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基，其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、硝基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代。

本发明在抗体的 N 端氨基和/或赖氨酸残基的氨基上连接本发明含有游离巯基的连接单元 X 后，可避免对抗体铰链区进行还原反应，从而减少对抗体自身结构的影响，并且引入的碳-氮键结构稳定，不易在体内循环中分解，进一步通过控制反应条件，可使载药量在 0~5 范围内正态分布。

发明详述

除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本发明，但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本发明时，依据以下定义使用下列术语。

当本发明中使用商品名时，申请人旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

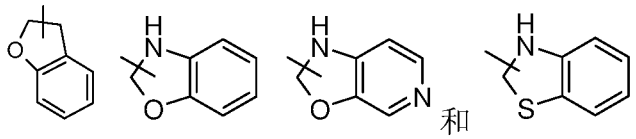
术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、

正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 12 个碳原子，更优选包含 3 至 10 个碳原子，最优选包含 3 至 8 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至 20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$（其中 m 是整数 0 至 2）的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子，其中 1～4 个是杂原子；更优选环烷基环包含 3 至 10 个环原子。单环杂环基的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

所述杂环基环可以稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂环基，其非限制性实例包括：

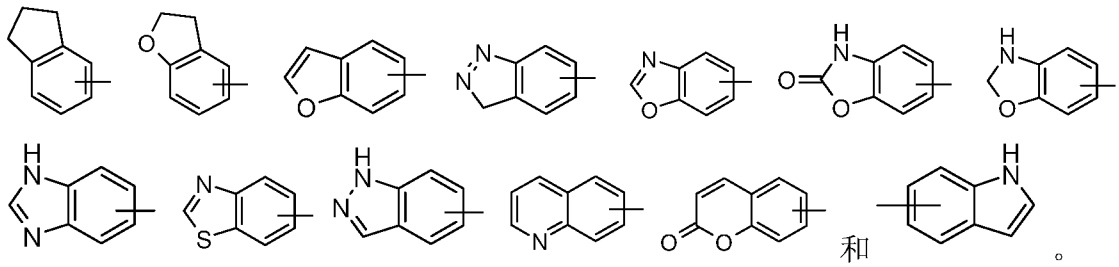

和

等。

杂环基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的 6 至 14 元全碳单环或稠合多环（也就是共享毗邻碳原子对的环）基团，优选为 6 至 10 元，例如苯基和萘基，优选苯

基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性实例包括：

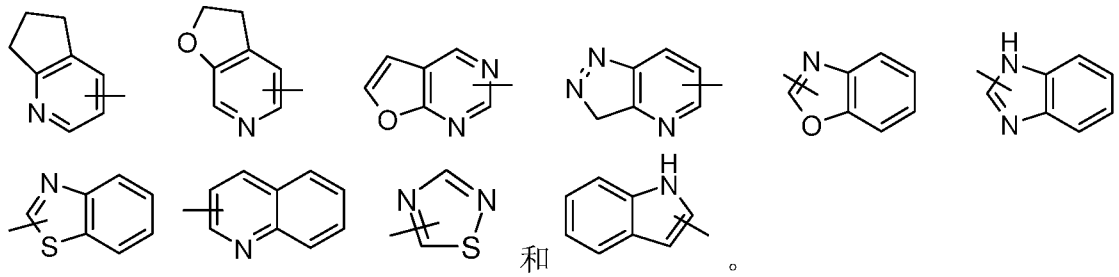


和

。

芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为 5 至 10 元，更优选为 5 元或 6 元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性实例包括：



和

。

杂芳基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基)，其中烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“键”指用“—”表示的共价键。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“氨基”指-NH_2。

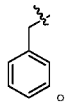
术语“氰基”指-CN。

术语“硝基”指-NO_2。

术语“氧代基”指=O。

术语“羧酸基”指-C(O)OH。

术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)或-C(O)O(环烷基)，其中烷基的定义如上所述。

术语“苄基”指甲基苯：。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多 5 个，更优选为 1～3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻，取代基仅处在它们的可能的化学位置，本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定（通过实验或理论）可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和（如烯属）键的碳原子结合时可能是不稳定的。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“可药用盐”是指本发明配体-细胞毒性药物偶联物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性，本发明抗体-抗体药物偶联化合物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐，可药用盐的非限制性实例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

术语“溶剂合物”指本发明的配体-药物偶联化合物与一种或多种溶剂分子形成可药用的溶剂合物，溶剂分子的非限制性实例包括水、乙醇、乙腈、异丙醇、DMSO、乙酸乙酯。

术语“配体”是能识别和结合目标细胞相关的抗原或受体的大分子化合物。配体的作用是将药物呈递给与配体结合的目标细胞群，这些配体包括但不限于蛋白类激素、凝集素、生长因子、抗体或其他能与细胞结合的分子。在本发明实施方式中，配体表示为 Pc，配体可通过配体上的杂原子与连接单元形成连接键。

术语“抗原或受体”可供配体识别和结合目标细胞。本发明中优选针对在增

生性疾病，例如癌症的靶细胞和/或组织上表达的细胞表面抗原或受体的配体；非限制性细胞表面受体实施例选自 HER2，HER3，HER4，CD20，CD22，CD30，CD33，CD44，Lewis Y，CD56，CD105，VEGFR 或 GPNMB。的细胞表面受体；最优选为选自 HER2，CD22，CD30，CD33，CD44，CD56，Lewis Y 或 GPNMB 的细胞表面受体。具体的优选的非限制性实施例为 Trastuzumab(HER2)，Inotuzumab (CD22)，Pinatuzumab(CD22)，Brentuximab(CD30)，Gemtuzumab(CD33)，Bivatuzumab(CD44)，Lorvotuzumab(CD56)，cBR96(Lewis Y)或 Glematumamab (GPNMB)。

本发明所述的“抗体”是指表现出所需生物学活性的任何形式的抗体。因此，它以最广义使用，具体地说，包括但不限于全长抗体，抗体结合片段或衍生物。抗体的来源包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体（例如双特异性抗体）。

术语“全长抗体”是指包含 4 条多肽链即 2 条重链和 2 条轻链通过二硫键相互交联形成多聚体的免疫球蛋白分子（例如 IgM）。每条重链包含一段重链可变区（简称 VH）和一段重链恒定区，重链恒定区包含 3 个结构域：CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含一段轻链可变区（简称 VL）和一段轻链恒定区，轻链恒定区包含 1 个结构域（CL1）。VH 区和 VL 区可进一步分为高变区，术语为互补决定区（CDRs），各互补决定区之间穿插着更加保守的结构域，称为框架区（FR）。

术语“抗体结合片段或衍生物” 包括任何一种自然发生的，酶催化获得的，合成的，或是通过基因工程得到的可与抗原特异性结合形成复合物的多肽或糖蛋白；通常包括亲本抗体的至少部分抗原结合区或可变区（例如一个或多个 CDR），其保留亲本抗体的至少某些结合特异性。“抗体结合片段或衍生物”可能由抗体衍生而来，例如通过适宜的标准技术包括蛋白水解或重组基因工程技术（包括对表达抗体可变区和部分恒定区的 DNA 进行操作和表达）对抗体全长进行改造而得。“抗体结合片段或衍生物”包括但不限于：(i) Fab 片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段；(iii) Fd 片段；(iv) Fv 片段；(v) 单链 Fv (scFv)；(vi) dAb 片段；和(vii)模拟抗体高变区氨基酸残基的最小识别单元（如一个分离的互补决定区（CDR））。其它工程分子如双价抗体、三价抗体、四价抗体和微抗体也在“抗体结合片段或衍生物”范围内。

“Fab 片段”由一条完整的轻链和重链的 VH 和 CH1 功能区组成。Fab 分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

“Fc”区包含含有抗体的 CH1 与 CH2 结构域的两个重链片段。两个重链片段通过两个以上的二硫键和通过 CH3 结构域的疏水作用保持在一起。

“Fab’片段”包含一条轻链和重链的 VH 和 CH1 功能区，还包含在 CH1 与 CH2 结构域之间的区域，以致于可在两个 Fab’片段的两条重链之间形成链间二硫键，以形成 F(ab’)2 分子。

“F(ab’)2 片段”包含二条轻链和含有 CH1 与 CH2 结构域之间的部分恒定区

的两条重链，以致于在两条重链之间形成链间二硫键。因此，F(ab')2 片段由通过两条重链之间的二硫键保持在一起的两个 Fab'片段组成。

“Fv 片段”包含轻链或/和重链的可变区 VH 功能区。

“Fc 区”相当于 IgG 的 CH2 和 CH3 功能区，无抗原结合活性，是抗体分子与效应分子和细胞相互作用的部位。

“铰链区”用于连接抗体的 Fab 段和 Fc 段。在本发明中可以将双特异性融合蛋白与 Fc 段连接。

本发明所述的抗体优选为针对靶细胞上细胞表面抗原的特异性抗体，非限制性实施例为以下抗体：

针对细胞表面抗原 HER2（多存在于乳腺癌细胞表面）的抗体；针对大多数 B 细胞淋巴瘤上过表达的 CD20 或 CD22 抗原的抗体；针对细胞表面抗原 CD33 的抗体（所述细胞表面抗原在某些人骨髓瘤、尤其是急性髓样白血病中普遍存在）；针对细胞表面抗原 CD30、CD44、Lewis Y、CD56、CD105、VEGFR 或 GPNMB 的抗体；另外一些市售的抗体如曲妥珠单抗（商品名 Herceptin®）也可用作配体。曲妥珠单抗是用于治疗乳腺癌的人源化抗 HER2 抗体，适用于治疗 HER2 过度表达的转移性乳腺癌。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源怀百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

术语“间隔单元”（Y）是一种双功能化合物，可用于连接本发明中所述的配体和细胞毒性药物，以形成配体-间隔单元-药物偶联物，或可用于形成抗肿瘤相关抗原的免疫偶联物。这种免疫偶联物可以将细胞毒性药物选择性递送给肿瘤细胞。

术语“细胞毒性药物”是指在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。在本发明的实施方式中，细胞毒性药物表示为 D，其非限制性实例包括微管蛋白抑制剂、DNA 烷化剂、酪氨酸激酶抑制剂、拓扑异构酶抑制剂或 DNA 合成抑制剂，优选微管蛋白抑制剂。

Auristatins 是全合成药物，化学结构式相对容易改造，以便优化其物理性质和成药特性。用于和抗体偶联的 Auristatins 衍生物主要包括 monomethyl auristatin E（MMAE）和 monomethyl auristatin F（MMAF），前者是又天然微管蛋白聚合酶抑制剂 dolastatin-10 衍生出的合成五肽，在 C-端加上一个 2-氨基-1-苯基丙基-1-醇而

合成。MMAE 对多种人类肿瘤细胞株的抑制活性小于一纳摩尔。为了降低 MMAE 自身细胞毒活性，MMAF 在 dolastatin-10 的 C-端加上一个苯丙氨酸，因为在结构上引入一个羧基，MMAF 的细胞膜通过性较差，因此对细胞的生物活性显著降低，但是和抗体偶联后对细胞的抑制活性大幅度提高（US7750116）。

术语“微管蛋白抑制剂”是指通过一直微管蛋白的聚合或促进微管蛋白的聚合而干扰细胞的有丝分裂过程，从而发挥抗肿瘤作用的一类化合物。其非限制性实例包括：美登素类、卡利奇霉素、紫杉烷类、长春新碱、秋水仙碱、Dolastatins/Auristatins，优选自美登素类或 Dolastatins/Auristatins；更优选自通式 D_1 或 D_M 所示的化合物。

术语“DNA 烷化剂”是指一类在体内能形成碳正离子或其他具有活泼的亲电性基团进而与细胞中的 DNA 中含有丰富电子的基团（如氨基，巯基，羟基，羧基、磷酸基等）发生共价结合，使其 DNA 分子发生结构改变或断裂，从而导致肿瘤细胞死亡的化合物。其非限制性实例包括：氮芥类（环磷酰胺）、亚乙基亚胺类（塞替派、丝裂霉素）、甲磺酸酯类（白消安）、多元醇类（二溴甘露醇）、亚硝基脲类（卡莫司汀）、三氮烯咪唑类（达卡巴嗪）和肼类（丙卡巴肼）。

术语“酪氨酸激酶抑制剂”是一类指可作为三磷酸腺苷（ATP）与酪氨酸激酶结合的竞争性抑制剂，也可作为酪氨酸的类似物，阻断酪氨酸激酶的活性，抑制细胞增殖的化合物。其非限制性实例包括：伊马替尼、吉非替尼、厄洛替尼、舒尼替尼、索拉非尼、拉帕替尼、达沙替尼、尼洛替尼等。

术语“蛋白质合成抑制剂”是指一类可影响靶细胞的蛋白质合成的化合物。蛋白质合成抑制剂可作用于蛋白质合成的各个环节如 DNA 复制、RNA 转录，通过抑制起始因子、延长因子及核糖核蛋白体等发挥作用。其非限制性实例包括：氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类、氯霉素类。

术语“载药量”是指式（I）分子中每个配体上加载的细胞毒性药物平均数量，也可以表示为药物量和抗体量的比值，药物载量的范围可以是每个配体（Pc）连接 1-8 个细胞毒性药物（D），在本发明的实施方式中，载药量表示为 n，可用常规方法如 UV/可见光光谱法，质谱，ELISA 试验和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个 ADC 分子的药物品均数量。

在本发明中，n 可能受连接位点数量的限制，本发明的一个实施方式中，细胞毒性药物通过连接单元偶联在配体的 N 端氨基和/或赖氨酸残基的ε-氨基上，一般地，偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量，包括：

(1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比，

(2) 控制反应时间和温度，

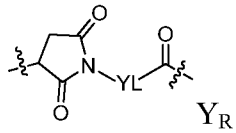
(3) 选择不同的反应试剂。

术语“连接单元”指一端通过碳原子与配体共价连接而另一端通过硫原子与

细胞毒性药物相连的化学结构片段。在本发明中，连接单元如通式（X）所定义。连接单元通过还原胺化的方式与抗体中的氨基反应而连接，优选为抗体 N 端和/或赖氨酸残基上的ε-氨基。

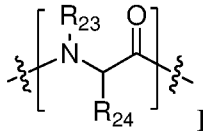
术语“间隔单元”是一种双功能化合结构片段，可用于偶联连接单元和细胞毒性药物最终形成配体-细胞毒性药物偶联物，这种偶联方式可以将细胞毒性药物选择性的连接到连接单元上。在本发明中，优选间隔单元如通式（Y）所示。

术语“氨基酸单元”是指如果存在延伸单元的情况下，可以将以下结构式 Y_R 中的羰基与延伸单元相连，如果没有延伸单元的情况下，可以将 Y_R 直接连接在细胞毒性药物上的氨基酸，在本发明实施方式中，氨基酸单元表示为-K_k-：

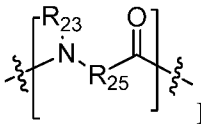


Y_R

-K_k-是二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽或十肽，-K-单元各自独立地具有以下结构式 K_a 或 K_b，k 是 0-10 之间的一个整数：



K_a 或

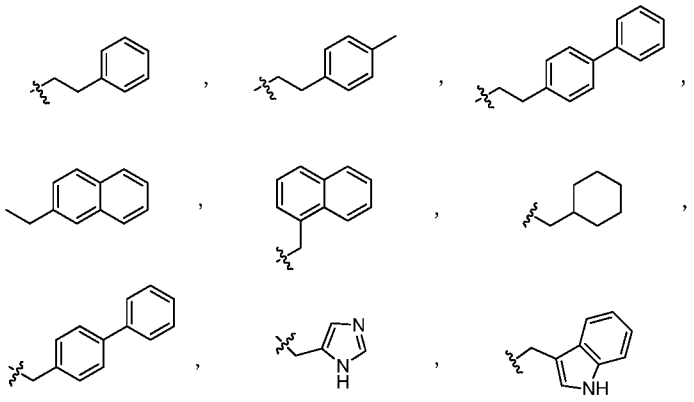


K_b

其中：

R_{23} 为-H 或甲基；

R_{24} 为 H、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、-CH_2OH、-$CH(OH)CH_3$、-$CH_2CH_2SCH_3$、-CH_2CONH_2、-CH_2COOH、-$CH_2CH_2CONH_2$、-CH_2CH_2COOH、-$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、-$(CH_2)_3NH_2$、-$(CH_2)_3NHCOCH_3$、-$(CH_2)_3NHCHO$、-$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、-$(CH_2)_4NH_2$、-$(CH_2)_4NHCOCH_3$、-$(CH_2)_4NHCHO$、-$(CH_2)_3NHCONH_2$、-$(CH_2)_4NHCONH_2$、-$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、环己基，

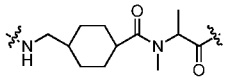
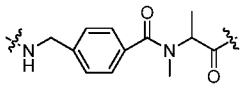


；

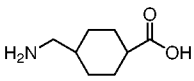
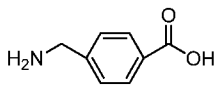
R_{25} 为-芳基-、-烷基-芳基-、-环烷基-、-烷基-环烷基-、-环烷基-烷基-、-烷基-环烷基-烷基-、-杂环基-，-烷基-杂环基-、-杂环基-烷基-、-烷基-杂环基-烷基-、-芳基-、-烷基-芳基-、-芳基-烷基-、-烷基-芳基-烷基-、-杂芳基-、-烷基-杂芳基-、-

杂芳基-烷基-、-烷基-杂芳基-烷基-。

在一个实施方案中，-K_k-为二肽，优选为-缬氨酸-瓜氨酸-、-苯丙氨酸-赖氨酸-或-N-甲基缬氨酸-瓜氨酸-，进一步优选为-缬氨酸-瓜氨酸-。

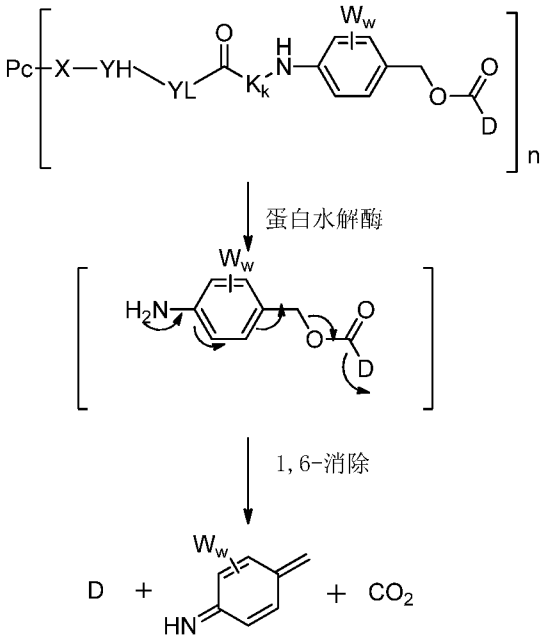
在另一个实施方案中，-K_k-为二肽，优选为和。

术语“氨基酸”是指分子结构中含有氨基和羧基、并且氨基和羧基都直接连接在-CH-结构上的有机化合物。通式是 $H_2NCHRCOOH$。根据氨基连结在羧酸中碳原子的位置，可分为 α、β、γ、δ、ε……-氨基酸。在生物界中，构成天然蛋白质的氨基酸具有其特定的结构特点，即其氨基直接连接在 α-碳原子上，即 α-氨基酸，包括甘氨酸（Glycine）、丙氨酸（Alanine）、缬氨酸（Valine）、亮氨酸（Leucine）、异亮氨酸（Isoleucine）、苯丙氨酸（Phenylalanine）、色氨酸（Tryptophan）、酪氨酸（Tyrosine）、天冬氨酸（Aspartic acid）、组氨酸（Histidine）、天冬酰胺（Asparagine）、谷氨酸（Glutamic acid）、赖氨酸（Lysine）、谷氨酰胺（Glutamine）、甲硫氨酸（Methionine）、精氨酸（Arginine）、丝氨酸（Serine）、苏氨酸（Threonine）、半胱氨酸（Cysteine）、脯氨酸（Proline）等。

在本发明的一个实施方案中，氨基酸选自和。

术语“延伸单元”是指当氨基酸单元存在的情况下，可以将氨基酸单元与细胞毒性药物偶联，或当氨基酸单元不存在时，可通过与 Y_R 上羰基与细胞毒性药物偶联的化学结构。在本发明实施方式中，延伸单元表示为-Q_q-，q 选自 0，1，2。

在一个优选的实施方案中，Q 是对氨基苄基醇结构，在此实施方案中，其在体内可能的释放药物机制见方案 1（Toki BE, Cerveny CG, *J Org. Chem.* 2002 (67) 1866- 1872）：



方案 1

其中：

W 选自 C_1-C_8 烷基、卤素、硝基或氰基；

w 选自 0-4 的整数。

常规的药物组合物的制备见中国药典。

术语“载体”用于本发明的药物，是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的实例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的黏合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入患者的血流中。或者，最好按可保持本发明化合物恒定循环浓度的

方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的实例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液，例如 1,3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的，可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

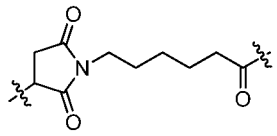
术语“还原剂”是在氧化还原反应里，失去电子或有电子偏离的物质。还原剂本身在广义上说也是抗氧化剂，具有还原性，被氧化，其产物叫氧化产物。在本发明的实施方式中，还原剂表示为 RA，还原剂的非限制性实例包括：H_2、碳(C)、一氧化碳(CO)、还原铁粉(Fe)、锌粉(Zn)、碱金属(常用的有 Li、Na、K)、其他活泼金属(如 Mg、Al、Ca、La 等)、氯化亚锡($SnCl_2$)、草酸、硼氢化钾(KBH_4)、硼氢化钠($NaBH_4$)、氰基硼氢化钠($NaCNBH_3$)、三乙酰氧基硼氢化钠($(CH3COO)_3BHNa$)、氢化铝锂($LiAlH_4$)、次磷酸、次磷酸钠、硫代硫酸钠($Na_2S_2O_3$)，本发明优选的还原剂为氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠。

术语“巯基保护基”指当同时含有巯基和其他基团的化学分子参与反应的情况下，为使反应只发生在特定的基团处，而避免巯基遭受影响，将巯基加以保护，当反应完成后脱除的基团，在本发明的实施方式中，巯基保护基表示为 T，巯基保护基的非限制性实例包括：-叔丁基、-乙酰基、-正丙酰基、-异丙酰基、-三苯基甲基、-甲氧基甲基、-2-(三甲硅烷基)乙氧甲基，本发明优选的巯基保护基为乙酰基。

术语“癌症”也被称为恶性肿瘤，是由控制细胞生长增殖机制失常而引起的疾病。癌症根据发生部位不同，病理形态不同，其非限制性实例包括：纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结直肠癌、肾癌、胰腺癌、骨癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、食道癌、胃癌、口腔癌、鼻癌、喉癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、成胶质细胞瘤、星状细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血细胞瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜癌、皮肤癌、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、急性淋巴母细胞白血病“ALL”、急性淋巴细胞 B-细胞白血病、急性淋巴细胞 T-细胞白血病、急性髓母细胞白血病“AML”、急性早幼粒细胞白血病“APL”、急性单核细胞白血病、急性红白血病、急性原巨核细胞白血病、急性骨髓单核细胞白血病、急性非淋巴细胞白血病、急性不分化型白血病、慢性髓细胞白血病“CML”、慢性淋巴细胞白血病“CLL”、毛细胞白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤。

本文使用以下连接片段缩写，它们表示如下相应的结构：

MC 为如式（V） 所示的片段：

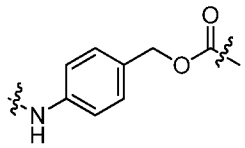


（V）；

Val 为缬氨酸片段；

Cit 为瓜氨酸片段；

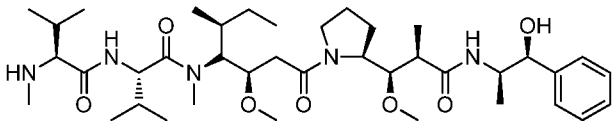
PAB 为 4-亚氨基苄基氨甲酰基片段，其结构如式（VI）所示，连接在 D 上，



（VI）；

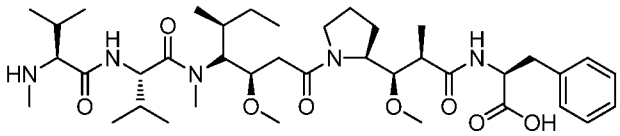
本文使用以下细胞毒性药物缩写，它们具有以下所示的定义：

MMAE 为单甲基-auristatin E（分子量:718），结构如式（VII）所示：



（VII）；

MMAF 为 N-甲基缬氨酸-缬氨酸-dolaisoleuine(Dil)-dolaproine(Dap)-苯丙氨酸（分子量:731.5），结构如式（VIII）所示：



（VIII）。

附图说明

图 1 显示化合物 16、化合物 17、化合物 18、阳性对照化合物 35 对人胃癌 NCI-N87 裸小鼠移植瘤的疗效；

图 2 显示化合物 16、化合物 17、化合物 18、阳性对照化合物 35 对荷瘤裸小鼠体重的影响。

具体实施方式

以下结合实施例进一步描述解释本发明，但这些实施例并非意味着限制本发明的范围。

化合物的结构是通过核磁共振（NMR）或质谱（MS）来确定的。NMR 的测定使用 Bruker AVANCE-400 核磁仪，测定溶剂为氘代二甲基亚砜（*DMSO-d6*）、氘

代氯仿（$CDCl_3$）、氘代甲醇（CD_3OD），内标为四甲基硅烷（TMS），化学位移是以 10^{-6}（ppm）作为单位给出。

MS 的测定使用 FINNIGAN LCQ Ad（ESI）质谱仪（生产商：Thermo，型号：Finnigan LCQ advantage MAX）。

HPLC 的测定使用安捷伦 1200DAD 高压液相色谱仪（Sunfire C18 150×4.6mm 色谱柱）和 Waters 2695-2996 高压液相色谱仪（Gimini C18 150×4.6mm 色谱柱）。

薄层层析硅胶板使用烟台黄海 HSGF254 或青岛 GF254 硅胶板，薄层色谱法（TLC）使用的硅胶板采用的规格是 0.15 mm～0.2 mm，薄层层析分离纯化产品采用的规格是 0.4 mm～0.5 mm 硅胶板。

柱层析一般使用烟台黄海 200~300 目硅胶为配体。

本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，或可购买自 ABCR GmbH & Co.KG，Acros Organnics，Aldrich Chemical Company，韶远化学科技（Accela. ChemBio. Inc.）、达瑞化学品等公司。

实施例中如无特殊说明，反应均在氩气氛或氮气氛下进行。

氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氩气或氮气气球。

实施例中如无特殊说明，反应中的溶液是指水溶液。

实施例中如无特殊说明，反应的温度为室温。

室温为最适宜的反应温度，温度范围是 20℃～30℃。

实施例中的反应进程的监测采用薄层色谱法（TLC），反应所使用的展开剂的体系有：A：二氯甲烷和甲醇体系，B：正己烷和乙酸乙酯体系，C：石油醚和乙酸乙酯体系，D：丙酮，溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节。

纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂的体系包括：A：二氯甲烷和甲醇体系，B：正己烷和乙酸乙酯体系，C：正己烷和丙酮体系，D：正己烷，E：乙酸乙酯，溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节，也可以加入少量的三乙胺和酸性或碱性试剂等进行调节。

本发明化合物的结构是通过 Q-TOF LC/MS 来确定的。Q-TOF LC/MS 使用安捷伦 6530 精确质量数四级杆-飞行时间质谱仪和安捷伦 1290-Infinity 超高效液相色谱仪（安捷伦 Poroshell 300SB-C8 5μm,2.1×75mm 色谱柱）。

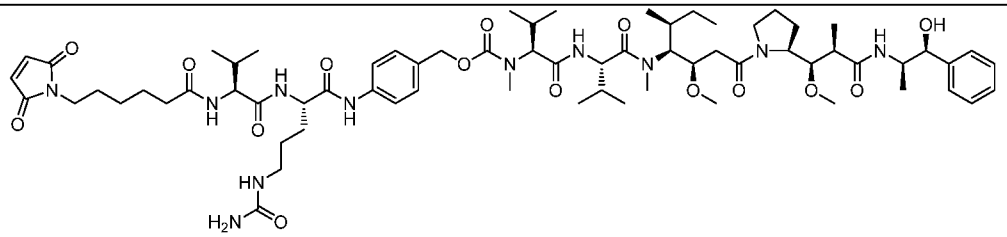
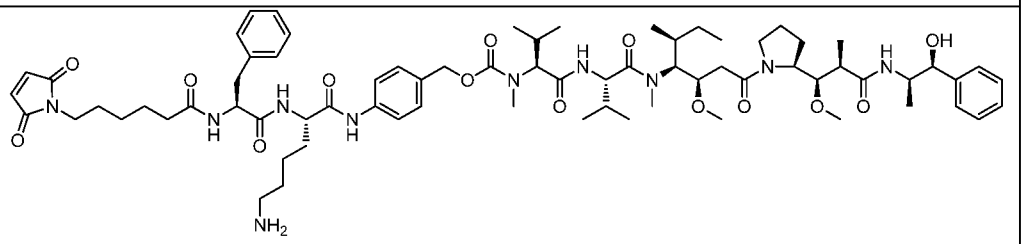
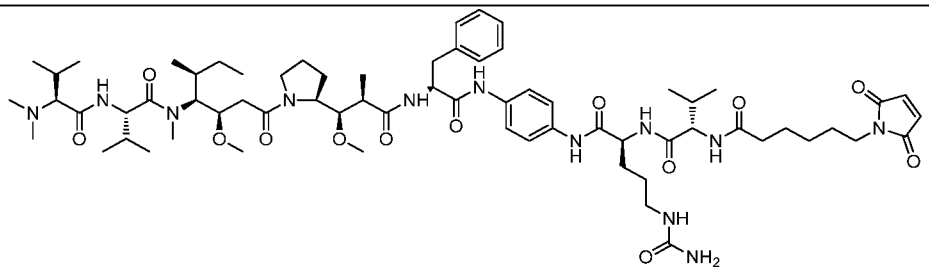
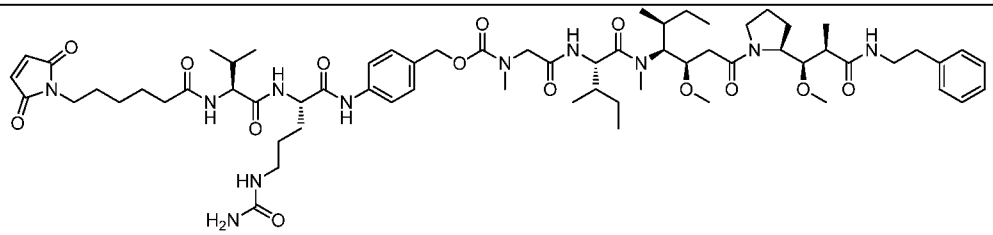
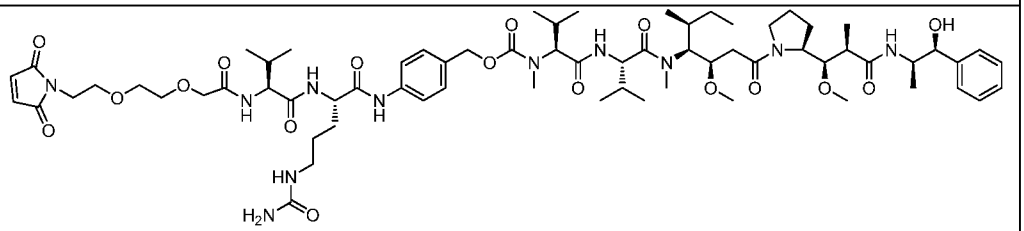
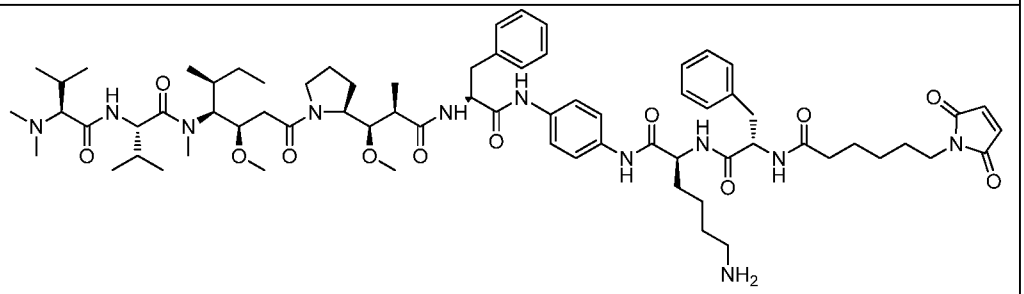
本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1：中间体的制备

一、作为药物的中间体的制备

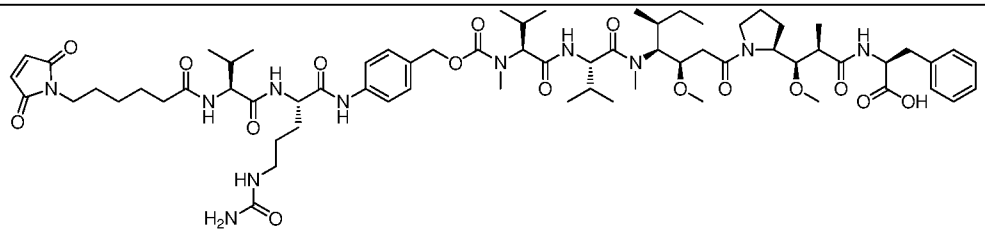
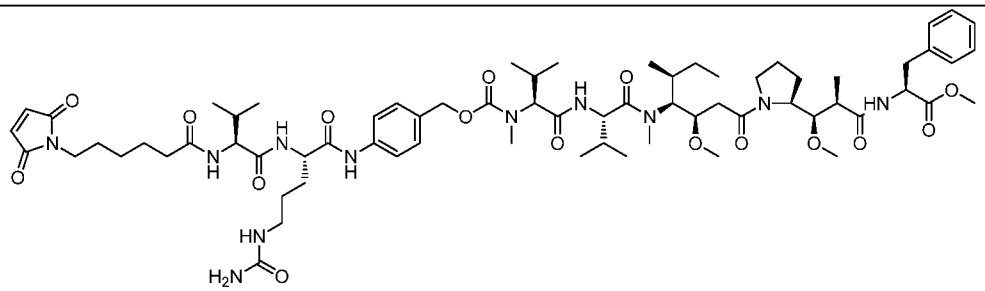
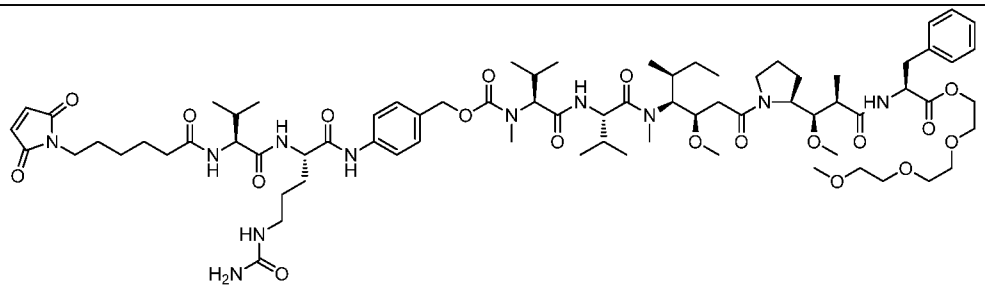
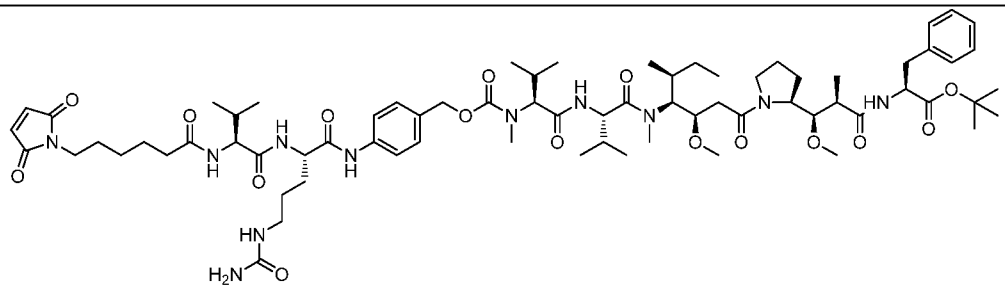
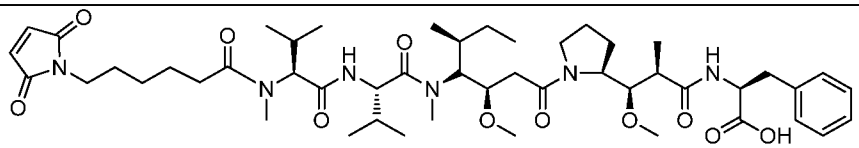
1、以下中间体化合物 1~6 采用专利 WO2004010957 中公开的方法制备

编号	分子结构式

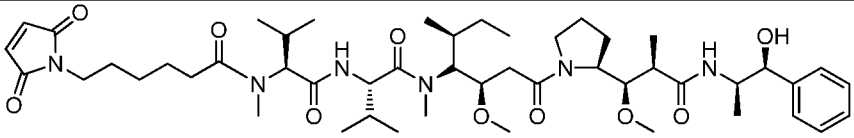
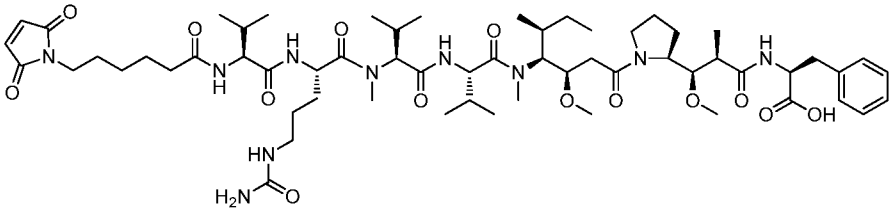
1	
2	
3	
4	
5	
6	

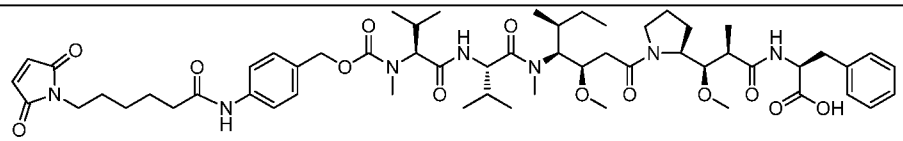
2、以下中间体化合物 7~11 采用专利 WO2005081711 中公开的方法制备

编号	分子结构式

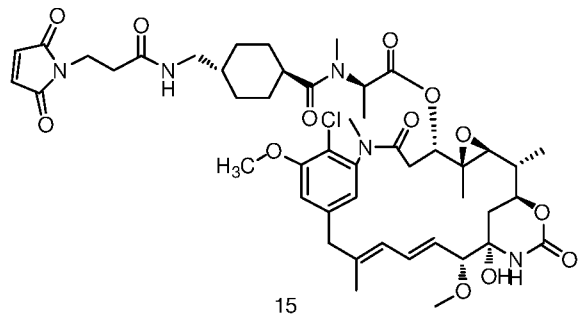
7	
8	
9	
10	
11	 MC-MMAF

3、以下中间体化合物 12~14 采用专利 US7750116 中公开的方法制备

编号	分子结构式
12	 MC-MMAE
13	

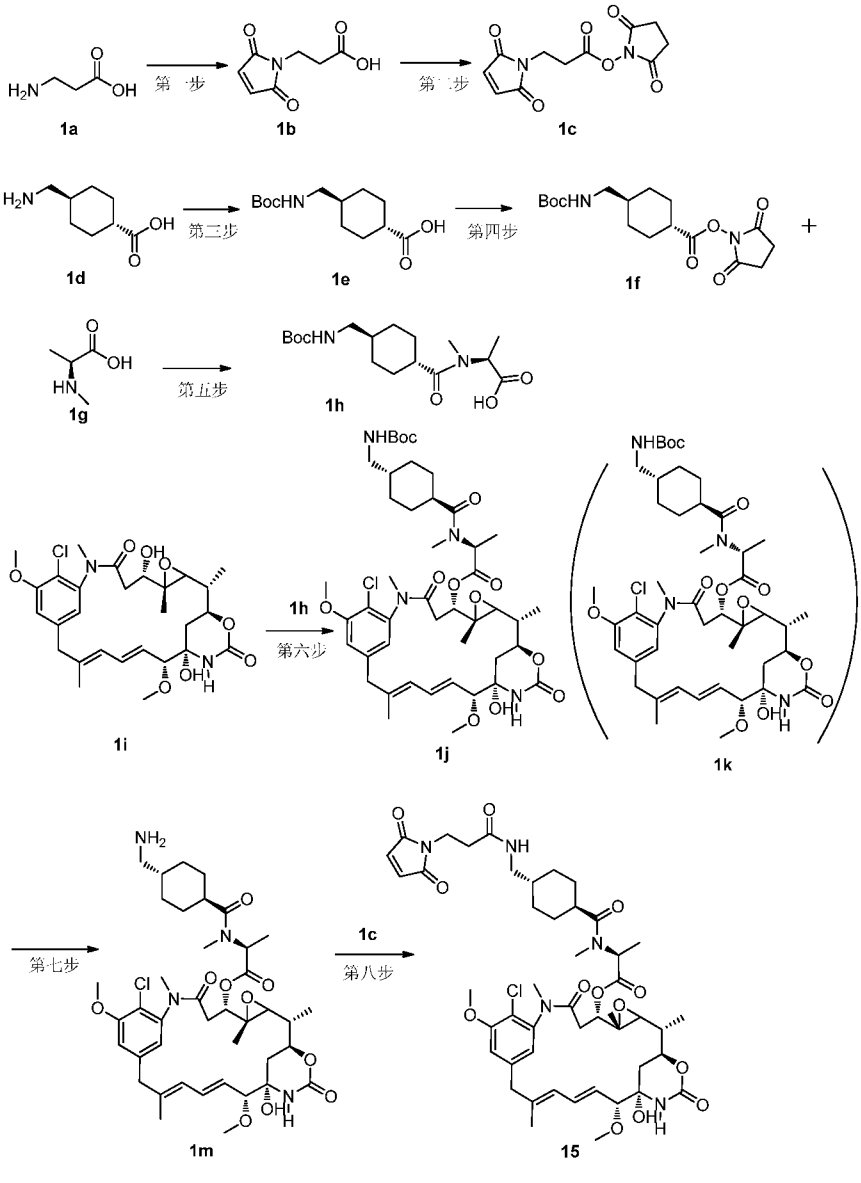
	MC-VC-MMAF
14	 MC-PAB-MMAF

4、中间体化合物 **15** 的制备



15

具体合成路线如下所示：



第一步

3-(顺丁烯二酰亚胺基)丙酸

将β-丙氨酸 **1a** (2.29g，25.8mmol)和顺丁烯二酸酐(2.52g，25.8mmol)溶解于20mL 乙酸中，加热至回流，搅拌反应液 2 小时。反应液减压浓缩，残余物用甲苯共沸除水，加无水硫酸镁干燥后减压浓缩，残余物用乙酸乙酯重结晶，过滤干燥后得标题产物 3-(顺丁烯二酰亚胺基)丙酸 **1b** (2.80g，无色晶体)，产率：64.3%。

MS m/z (ESI):170.04[M+1].

第二步

3-(顺丁烯二酰亚胺基)丙酸丁二酰亚胺酯

将 3-(顺丁烯二酰亚胺基)丙酸 **1b** (2.80g，16.6mmol) 和 N-羟基丁二酰亚胺(2.25g，19.9 mmol)溶解于 30ml DMF 中，冰浴冷却至 0℃，加入 N,N'-二环已基碳二亚胺(6.85g，33.2mmol)搅拌反应 10 分钟后，升温至室温并搅拌反应过夜，过滤后向滤液中加入 80ml 二氯甲烷，用水(60ml×3)、5%碳酸氢钠水溶液(60ml×3)、饱和食盐水(50ml×3)洗涤分别洗涤，有机层加无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得 3-(顺丁烯二酰亚胺基)丙酸丁二酰亚胺酯 **1c** (2.76g，类白色固体)，产率 62.5%。

MS m/z (ESI):267.06[M+1].

第三步

(1*r*,4*r*)-4-(叔丁氧羰基氨基甲基)环已基甲酸

将(1*r*,4*r*)-4-(氨甲基)环已基甲酸 **1d** (4.72g，30.0mmol)、氢氧化钠(1.28g，32.0mmol)溶解于 20ml 水和 44ml 叔丁醇的混合溶剂中，加入二碳酸二叔丁酯(6.99g，32.0mmol)，室温搅拌反应 18 小时，向反应液中加入 100ml 水，用正已烷洗涤(100ml×3)，将水层冷却至 4℃后，用饱和柠檬酸水溶液将体系 pH 调至 3，酸化后的溶液用乙酸乙酯萃取(50ml×3)，合并有机层，加入无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得(1*r*,4*r*)-4-(叔丁氧羰基氨基甲基)环已基甲酸 **1e** (7.33g，无色晶体)，产率 95%。

MS m/z (ESI):258.17[M+1].

第四步

(1*r*,4*r*)-4-((叔丁氧羰基氨基)甲基)环已基甲酸丁二酰亚胺酯

(1*r*,4*r*)-4-(叔丁氧羰基氨基甲基)环已基甲酸 **1e** (7.33g，28.5mmol) 和 N-羟基丁二酰亚胺(3.87g，34.2 mmol)溶解于 35ml DMF 中，冰浴冷却至 0℃，加入 N,N'-二环已基碳二亚胺(11.76g，57.0mmol)搅拌反应 10 分钟后，升温至室温并搅拌反应过夜，过滤后向滤液中加入 90ml 二氯甲烷，分别用水(60ml×3)、5%$NaHCO_3$ 水溶液(60ml×3)、饱和食盐水(50ml×3)洗涤，有机层加无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得(1*r*,4*r*)-4-(叔丁氧羰基氨基甲基)环已基甲酸丁二酰亚胺酯 **1f** (6.75g，类白色固体)，产率 66.8%。

MS m/z (ESI):355.18 [M+1].

第五步

S-2-((1*r*,4*s*)-4-((叔丁氧羰基氨基)甲基)-*N*-甲基-*N*-环己基甲酰基)丙酸

将(1*r*,4*r*)-4-(叔丁氧羰基氨基甲基)环己基甲酸丁二酰亚胺酯 **1f** (6.75g，19.0mmol)和 N-甲基-L-丙氨酸 **1g** (1.96g，19.0mmol)溶解于乙二醇二甲醚/水 1:1 的混合溶剂 90ml 中，加入三乙胺(4.05g，40mmol)，室温条件下反应 6h，减压浓缩，残余物用 100ml 乙酸乙酯溶解，用饱和食盐水(80ml×3)洗涤，有机层加入无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，残余物用薄层色谱法以展开剂二氯甲烷/甲醇(50:1)纯化，得 *S*-2-((1*r*,4*s*)-4-((叔丁氧羰基氨基)甲基)-*N*-甲基-*N*-环己基甲酰基)丙酸 **1h** (4.78g 类白色固体)，产率 73.5%。

MS m/z (ESI):343.22 [M+1].

第六步

美登醇 **1i** (565.5mg，1.0mmol，采用公知的合成方法 Wayne CW, Sharon DW, Emily EC 等人, *J.Med.Chem*, **2006**, 49, 4392-4408 制备而得)和 *S*-2-((1*r*,4*s*)-4-((叔丁氧羰基氨基)甲基)-*N*-甲基-*N*-环己基甲酰基)丙酸 **1h** (2.05g，6.0mmol)溶解于 20ml 二氯甲烷中，将 N,N'-二环己基碳二亚胺(1.30g，6.3mmol)溶解于 5ml 二氯甲烷加上述反应液中，取 1M 的氯化锌的乙醚溶液(1.2ml，1.2mmol)缓慢滴加到反应液中，室温条件下搅拌反应 2 小时，反应结束后 30ml 乙酸乙酯，过滤，滤液分别用饱和碳酸氢钠水溶液(15ml×2)和饱和食盐水(10ml×2)洗涤，有机层加无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，残余物用薄层色谱法以展开剂二氯甲烷/甲醇(50:1) 纯化，得化合物 **1j** (201.8mg，类白色固体)，产率 22.7%。

MS m/z (ESI):889.43 [M+1].

第七步

将化合物 **1j** (88.9mg，0.1mmol)溶解于 8ml 二氯甲烷中，加入三氟乙酸(12.6mg，0.11mmol)，室温下搅拌反应 1 小时，减压浓缩，残余物加 20ml 乙酸乙酯溶解，用 5%的碳酸钠水溶液(6ml×3)洗涤，有机层加无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得化合物 **1m** (76.8mg，类白色固体)，产率 97.3%。

MS m/z (ESI):789.38 [M+1].

第八步

将化合物 **1m**(76.8mg，0.097mmol)和 3-(顺丁烯二酰亚胺基)丙酸丁二酰亚胺酯 **1c**(29.3mg，0.11mmol)溶解于 10.0ml N,N'-二甲基甲酰胺，向反应液中加入三乙胺(30.6mg，0.3mmol) 室温条件下反应 8h，减压浓缩，残余物用 20ml 乙酸乙酯溶解，用饱和食盐水(10ml×3)洗涤，有机层加入无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，残余物用薄层色谱法以展开剂二氯甲烷/甲醇(40:1)纯化，得化合物 **15** (40.6mg，类白色固体)，产率 44.5%。

MS m/z (ESI):940.41 [M+1].

二、作为抗体的中间体的制备

以下抗体按抗体常规方法进行制备：如可进行载体构建后，转染 HEK293 细

胞（Life Technologies Cat. No. 11625019），纯化表达。

1、抗体序列

（1）曲妥珠单抗（Trastuzumab），可以和 HER2 靶标特异性结合：

轻链序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL
YSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO：1

重链序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：2

（2）抗体 Inotuzumab，可以和 CD22 靶标特异性结合：

轻链序列：

DVQVTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLANSYGNTFLSWYLHKPGKAPQLLIY
GISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGTHQPYTFGQGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEQ ID NO：3

重链序列：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGGIN
PGNNYATYRRKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTREGYGNYG
AWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO：4

（3）抗体 Brentuximab，可以和 CD30 靶标特异性结合

轻链序列：

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQPPKVLIYA
ASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C SEQ ID NO：5

重链序列：

QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPG
SGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSEDTAVYFCANYGNYWFAYW
GQGTQVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGSLSLSPGK SEQ ID NO：6

（4）抗体 Pertuzumab，可以和 HER2 靶标特异性结合

轻链 CDR-L1 序列：KASQDVSIGVA SEQ ID NO.7

轻链 CDR-L2 序列：SASYRYT SEQ ID NO.8

轻链 CDR-L3 序列：QQYYIYPYT SEQ ID NO.9

重链 CDR-H1 序列：DYTMD SEQ ID NO.10

重链 CDR-H2 序列：DVNPNSGGSIYNQRFKG SEQ ID NO.11

重链 CDR-H3 序列：NLGPSFYFDY SEQ ID NO.12

轻链序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
YRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO.13

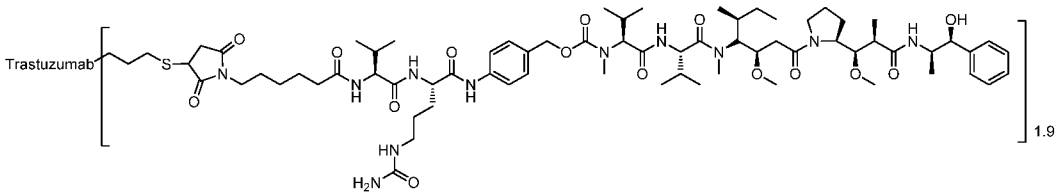
重链序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVN
PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYF
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO.14

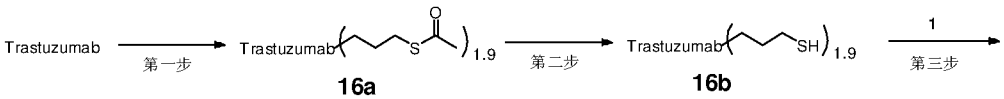
实施例 2

抗体药物偶联物化合物 **16** 的制备

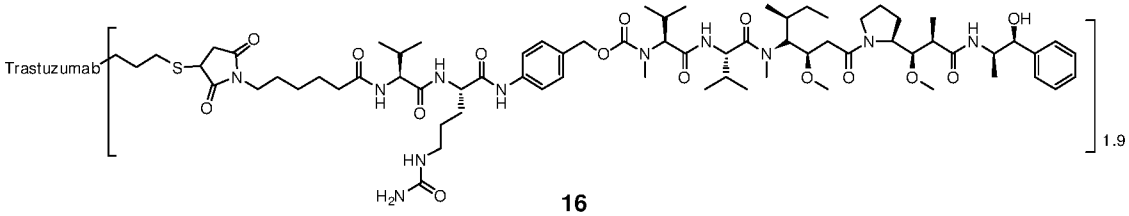


16

其合成路线如下所示：



16a **16b**



16

第一步

曲妥珠单抗-丙硫醇乙酯

取曲妥珠单抗（Trastuzumab）原液(6.9mg/ml，pH=6.3 的 PBS 溶液) 32.0ml(1.49μmol)，等体积置换为 0.1M 的 pH 为 5.0 的乙酸/乙酸钠缓冲液，将 3-乙酰巯基丙醛(0.79mg，5.98μmol)，溶解于 3.0ml 乙腈后滴加入上述缓冲液中，将氰基硼氢化钠(0.92mg, 14.6μmol)溶于 1.0ml 水中滴加入上述反应液中，25℃下搅拌反应 3 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.2 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 45.1ml 曲妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**16a**)溶液，浓度为 4.8mg/ml。

第二步

曲妥珠单抗-丙硫醇

向曲妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**16a**)溶液(第一步制得)加入 2M 盐酸羟胺 73μL，25℃下搅拌反应 1 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.2 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 71.3ml 曲妥珠单抗-丙硫醇(**16b**)溶液，浓度 3.0mg/ml。

第三步

曲妥珠单抗-丙基-1-硫-MC-Val-Cit-PAB-MMAE(化合物 **16**)

取化合物 **1**(MC-Val-Cit-PAB-MMAE，19.1mg，14.5μmol)溶解于 7ml 乙腈中，加入曲妥珠单抗-丙硫醇(**16b**)溶液(第二步制得)中，25℃下搅拌反应 4 小时后

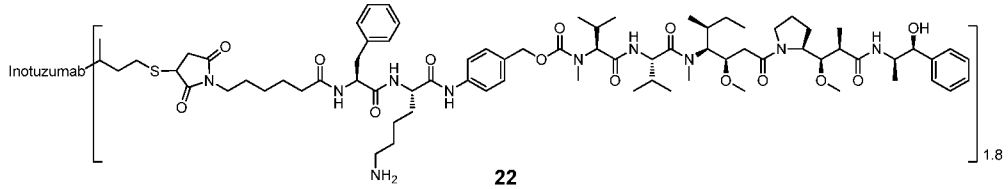
将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.2 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2μm 滤器过滤后得 101.0ml 曲妥珠单抗-丙基-1-硫-MC-Val-Cit-PAB- MMAE(**16**)溶液，浓度为 2.03mg/ml，在无菌条件下通过 0.2μm 滤器过滤后-20℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 148381.5(M_{Ab}+0D) 、 149613.2(M_{Ab}+1D) 、 151169.8(M_{Ab}+2D)、152587.7(M_{Ab}+3D)、153868.1(M_{Ab}+4D)、155484.4(M_{Ab}+5D)。

n=1.9。

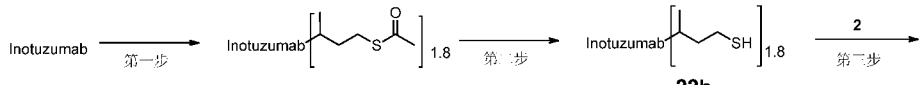
实施例 3

抗体药物偶联物化合物 **22** 的制备

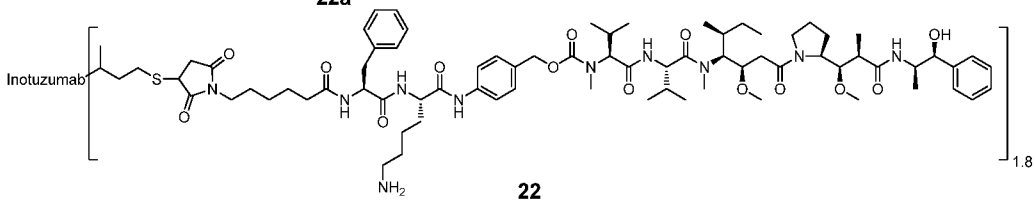


22

其合成路线如下所示：（如上面的描述相一致）



22a **22b**



22

第一步

Inotuzumab-1-甲基丙硫醇乙酯

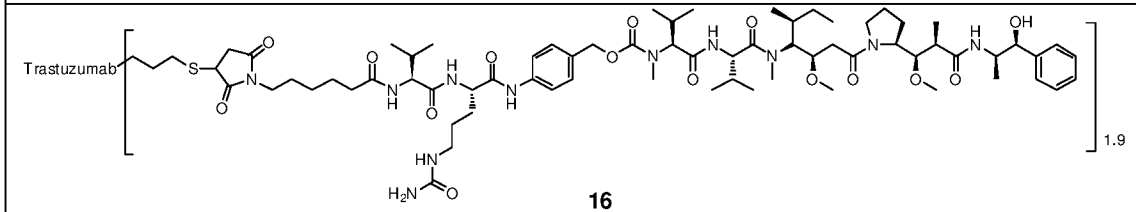
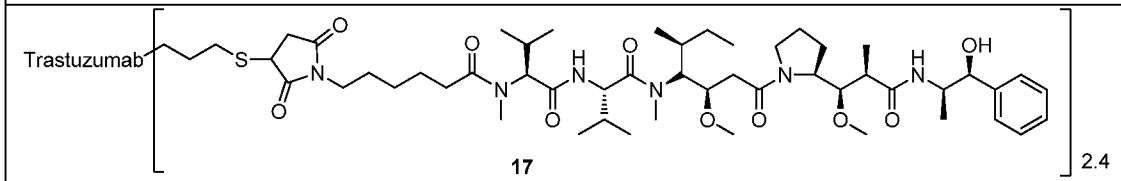
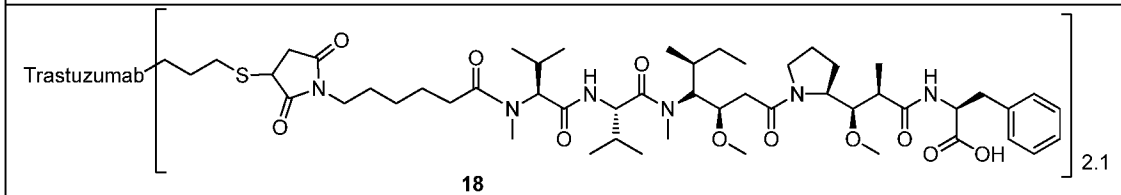
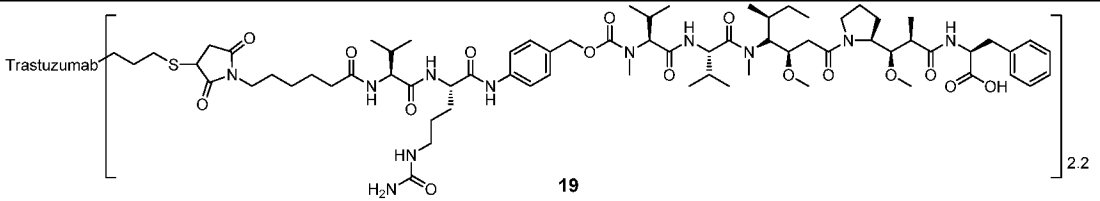
取 Inotuzumab 原液(8.1mg/ml，pH=6.0 的 PBS 溶液) 20.0ml(1.08μmol)，将 S-(3-氧代丁基)硫代乙酸乙酯(0.70mg，4.32μmol)，溶解于 3.0ml 乙腈后滴加入上述溶液中，将三甲氧基硼氢化钠(2.29mg, 10.8μmol)溶于 2.0ml 水中滴加入上述反应液中，30℃下搅拌反应 48 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.2 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 29.2ml Inotuzumab-1-甲基丙硫醇乙酯(**22a**)溶液，浓度为 5.4mg/ml。

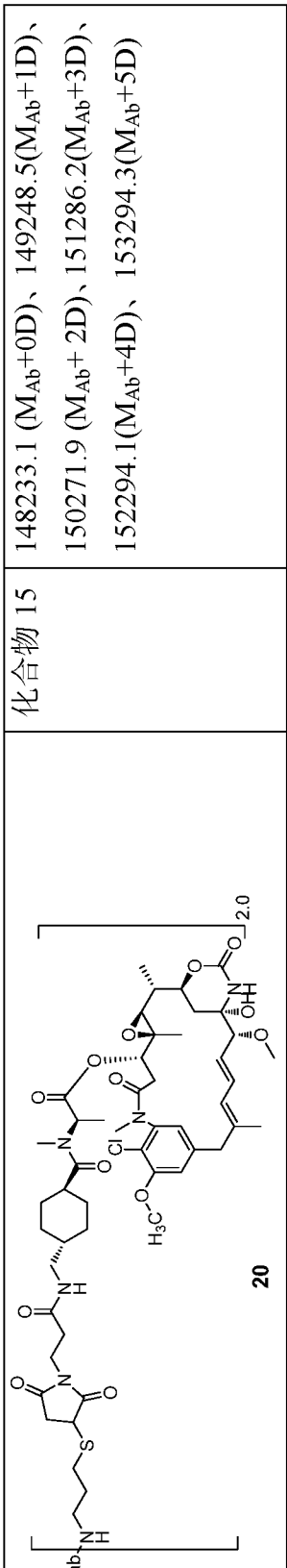
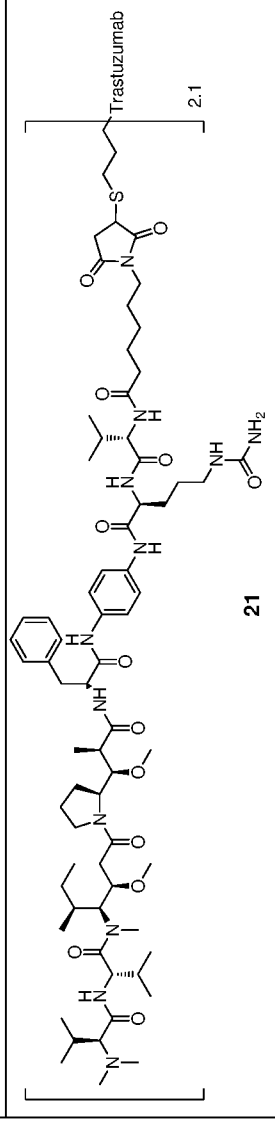
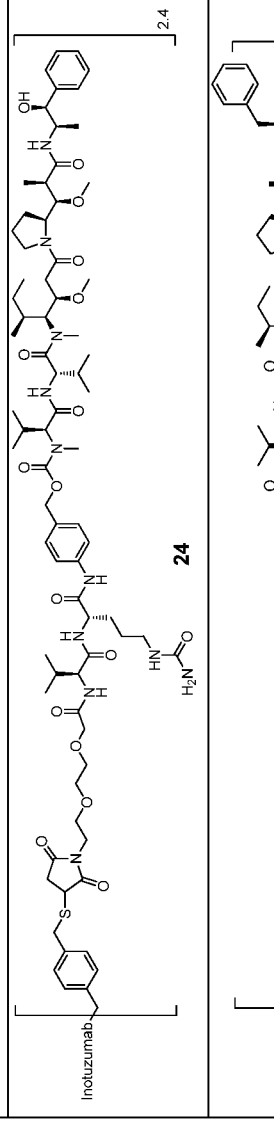
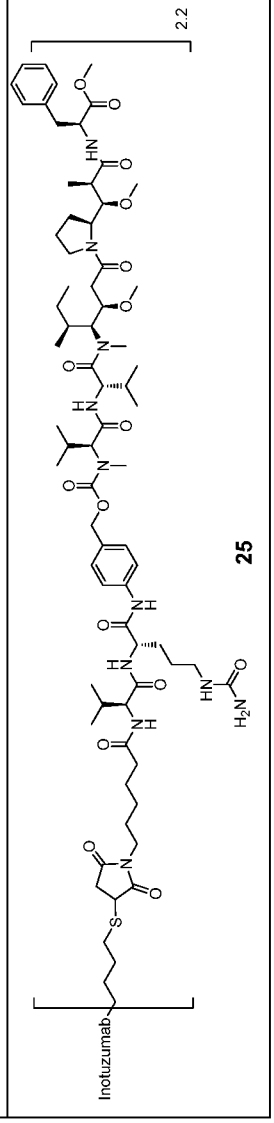
参照实施例 **2** 的操作步骤第二步、第三步并且第三步采用化合物 **2** 制备得化合物 **22**。

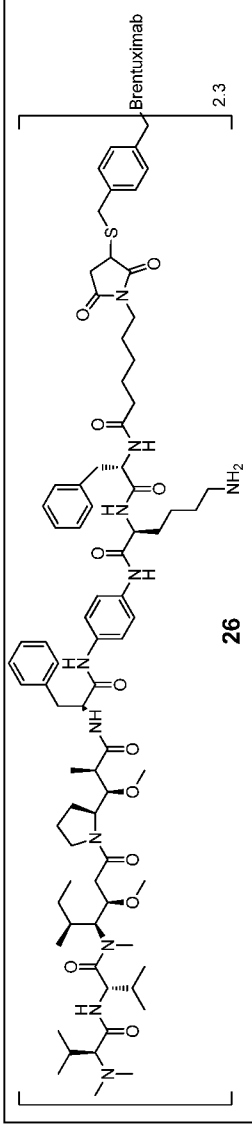
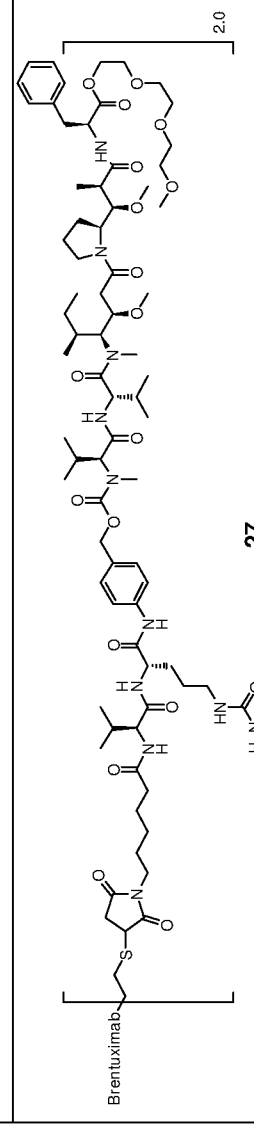
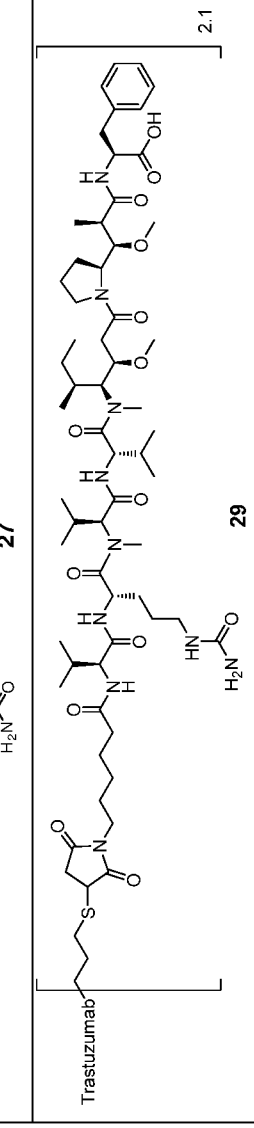
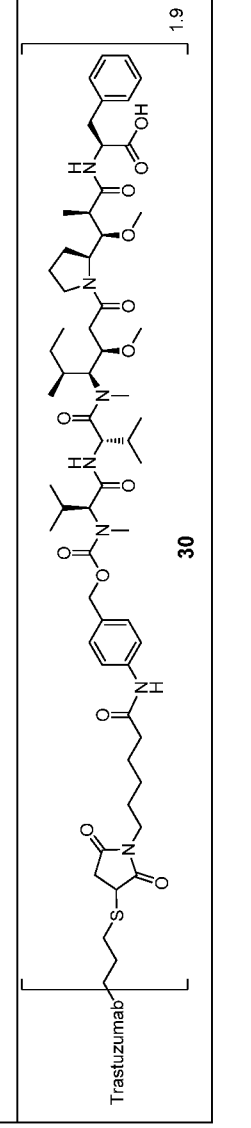
Q-TOF LC/MS: 149611.1(M_{Ab}+0D) 、 151039.9(M_{Ab}+1D) 、 152470.6(M_{Ab}+2D)、153904.4(M_{Ab}+3D)、155317.0(M_{Ab}+4D)、156757.9(M_{Ab}+5D)。

n=1.8。

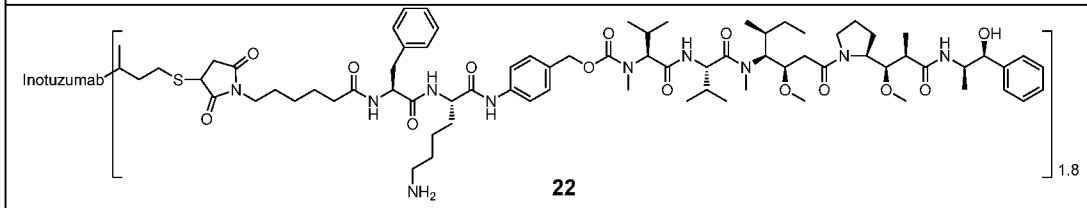
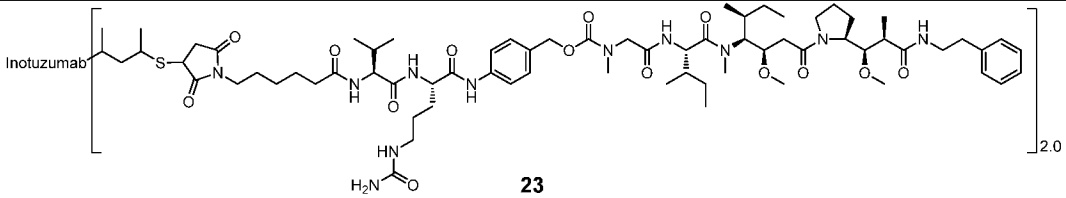
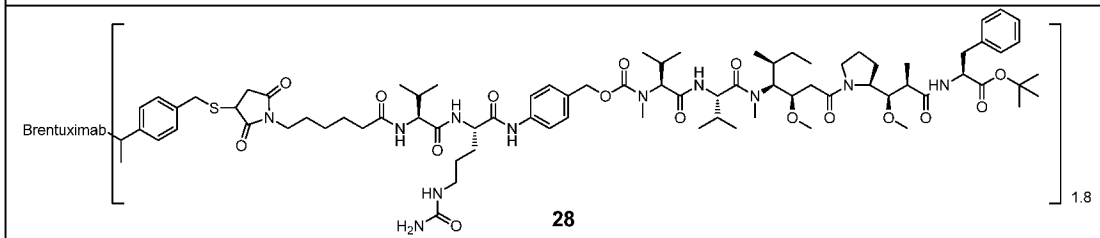
参照实施例 **2** 制备抗体药物偶联物 16 的操作步骤，用相应的抗体（Trastuzumab、Inotuzumab、Brentuximab），相应的药物化合物，制备抗体药物偶联物 17-21，24-27，29，30。

抗体药物偶联物	间隔单元-细胞毒性药物	Q-TOF LC/MS
 **16**	化合物 1	148381.5(M_{Ab}+0D)、149613.2(M_{Ab}+1D)、151169.8 (M_{Ab}+ 2D)、152587.7(M_{Ab}+3D)、153868.1(M_{Ab}+4D)、155484.4(M_{Ab}+5D)
 **17**	化合物 12	148220.4(M_{Ab}+0D)、149212.0(M_{Ab}+1D)、150212.8 (M_{Ab}+ 2D)、151272.8(M_{Ab}+3D)、152205.0(M_{Ab}+4D)、153236.5(M_{Ab}+5D)
 **18**	化合物 11	148223.9(M_{Ab}+0D)、149227.6(M_{Ab}+1D)、150264.5 (M_{Ab}+ 2D)、151302.8(M_{Ab}+3D)、152363.8(M_{Ab}+4D)、153412.8(M_{Ab}+5D)
 **19**	化合物 7	148229.9(M_{Ab}+0D)、149639.7(M_{Ab}+1D)、151050.5 (M_{Ab}+ 2D)、152449.3(M_{Ab}+3D)、153900.1(M_{Ab}+4D)、155317.2(M_{Ab}+5D)。

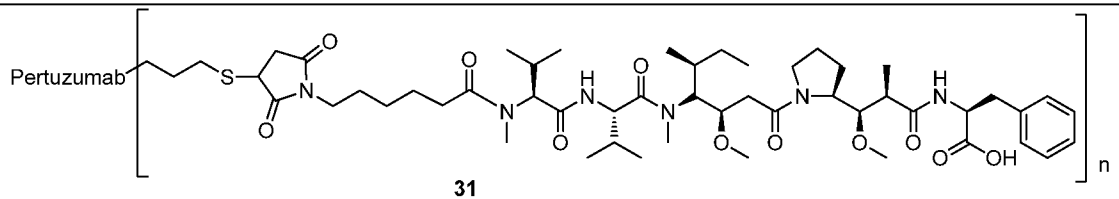
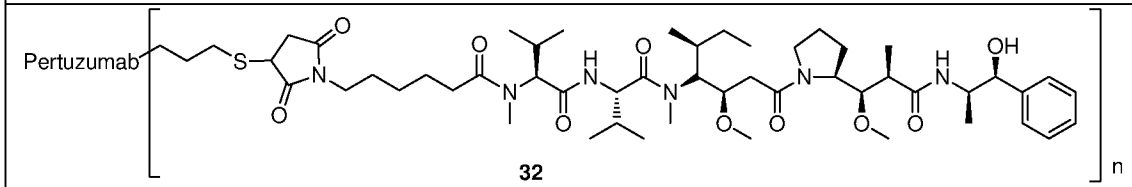
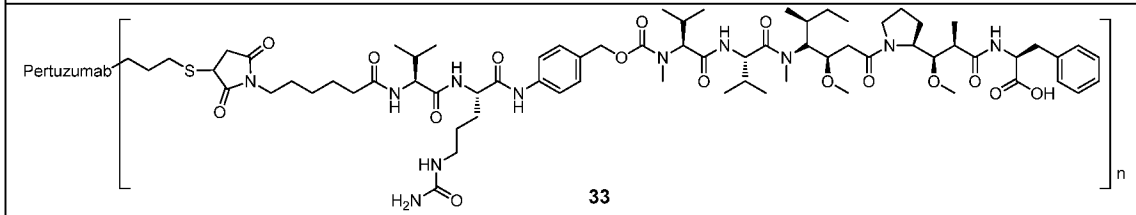
 20	化合物 15	148233.1 (M_{Ab}+0D)、149248.5(M_{Ab}+1D)、150271.9 (M_{Ab}+ 2D)、151286.2(M_{Ab}+3D)、152294.1(M_{Ab}+4D)、 153294.3(M_{Ab}+5D)
 21	化合物 3	148241.8 (M_{Ab}+0D)、149605.6(M_{Ab}+1D)、150972.4 (M_{Ab}+ 2D)、152323.1(M_{Ab}+3D)、153693.6(M_{Ab}+4D)、 155059.8(M_{Ab}+5D)
 24	化合物 5	149617.8(M_{Ab}+0D)、151106.6(M_{Ab}+1D)、152599.5(M_{Ab}+ 2D)、154098.6(M_{Ab}+3D)、155577.1(M_{Ab}+4D)、157051.7(M_{Ab}+5D)
 25	化合物 8	149623.1(M_{Ab}+0D)、151056.9(M_{Ab}+1D)、152479.8(M_{Ab}+2D)、153901.1(M_{Ab}+3D)、155343.2(M_{Ab}+4D)、156787.4(M_{Ab}+5D)

	化合物 6	148268.0(M_{Ab}+0D)、149718.1(M_{Ab}+1D)、151151.3(M_{Ab}+2D)、152595.5(M_{Ab}+3D)、154042.4(M_{Ab}+4D)、155501.0(M_{Ab}+5D)
	化合物 9	148240.7(M_{Ab}+0D)、149771.5(M_{Ab}+1D)、151316.2(M_{Ab}+2D)、152852.4(M_{Ab}+3D)、154403.2(M_{Ab}+4D)、155964.3(M_{Ab}+5D)
	化合物 13	148230.2 (M_{Ab}+0D)、149485.9(M_{Ab}+1D)、150754.2(M_{Ab}+2D)、152009.5(M_{Ab}+3D)、153276.2(M_{Ab}+4D)、154536.9(M_{Ab}+5D)
	化合物 14	148210.1 (M_{Ab}+0D)、149360.3(M_{Ab}+1D)、150515.5 (M_{Ab}+ 2D)、151677.0(M_{Ab}+3D)、152821.9(M_{Ab}+4D)、153980.7(M_{Ab}+5D)

参照实施例 3 制备抗体-药物偶联物 **22** 的操作步骤，用相应的抗体（Inotuzumab、Brentuximab），相应的药物化合物，制备抗体药物偶联物 23，28。

抗体药物偶联物	药物	Q-TOF LC/MS
 **22**	化合物 2	149611.1 (M_{Ab}+0D)、151039.9(M_{Ab}+1D)、152470.6(M_{Ab}+ 2D)、153904.4(M_{Ab}+3D)、155317.0(M_{Ab}+4D)、156757.9(M_{Ab}+5D)
 **23**	化合物 4	149607.2(M_{Ab}+0D)、150971.0(M_{Ab}+1D)、152340.4(M_{Ab}+ 2D)、153712.0(M_{Ab}+3D)、155067.2(M_{Ab}+4D)、156414.5(M_{Ab}+5D)
 **28**	化合物 10	148255.2(M_{Ab}+0D)、149786.1(M_{Ab}+1D)、151315.0(M_{Ab}+2D)、152870.4(M_{Ab}+3D)、154431.3(M_{Ab}+4D)、155954.1(M_{Ab}+5D)

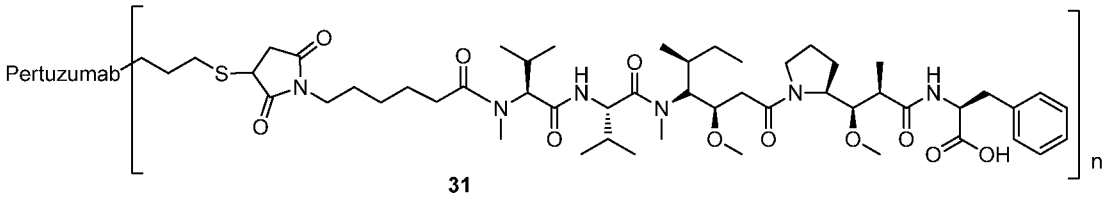
根据实施例 4、实施例 5、实施例 6、实施例 7，用抗体 pertuzuman 和相应的药物化合物，制备抗体药物偶联物 31、32、33、34。

抗体药物偶联物	药物	Q-TOF LC/MS
 31	化合物 12	148096.2 (M_{Ab}+0D)、149096.1(M_{Ab}+1D)、150095.7(M_{Ab}+ 2D)、151096.5(M_{Ab}+3D)、152097.0(M_{Ab}+4D)、153097.1(M_{Ab}+5D)
 32	化合物 11	148094.6 (M_{Ab}+0D)、149081.2(M_{Ab}+1D)、150066.9(M_{Ab}+ 2D)、151053.3(M_{Ab}+3D)、152040.0(M_{Ab}+4D)、153025.7(M_{Ab}+5D)
 33	化合物 7	148094.8M_{Ab}+0D)、149501.3(M_{Ab}+1D)、150908.5(M_{Ab}+ 2D)、152315.0(M_{Ab}+3D)、153721.4M_{Ab}+4D)、155128.1(M_{Ab}+5D)

34	化合物 1	148095.3 (M_{Ab}+0D)、 149488.2(M_{Ab}+1D)、 150880.7(M_{Ab}+ 2D)、 152273.6(M_{Ab}+3D)、 153666.2(M_{Ab}+4D)、 155059.1(M_{Ab}+5D)

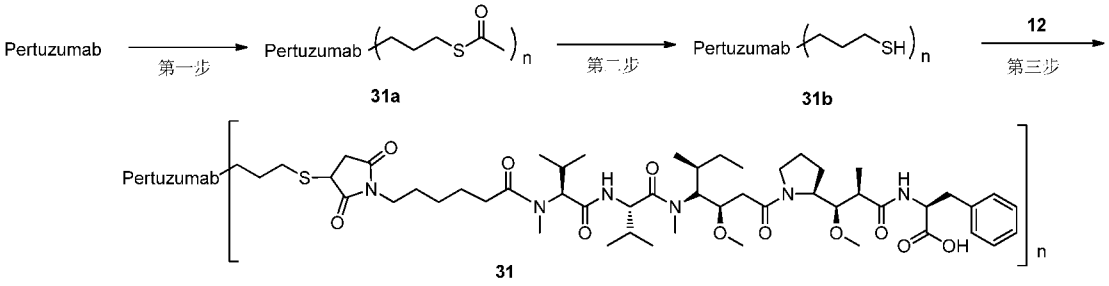
实施例 4

抗体药物偶联物化合物 **31** 的制备



31

其合成路线如下所示：



31

第一步

帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯

取帕妥珠单抗(Pertuzumab)原液（在 PH=5.7 的 20mM L-组氨酸醋酸，120mM 蔗糖缓冲体系中保存），用 G-25 排阻柱进行换液到 PH=4.3-4.5 的 100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液中，并浓缩至浓度为 10.0mg/ml 左右，得 P-mAb 的醋酸-醋酸钠缓冲液 200ml（13.5mmol），将 3-乙酰巯基丙醛(14.3mg，0.108mmol)，溶解于 20ml 乙腈后滴加入上述缓冲液中，将氰基硼氢化钠(173mg, 2.7mmol)溶于 10ml 水中滴加入上述反应液中，25℃下搅拌反应 3 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 300ml 帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**31a**)溶液，浓度为 6.5mg/ml。

第二步

帕妥珠单抗-丙硫醇

向帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**31a**)溶液(第一步制得)加入 2M 盐酸羟胺 6.0mL，25℃下搅拌反应 1 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 450ml 帕妥珠单抗-丙硫醇(**31b**)溶液，浓度 4.3mg/ml。

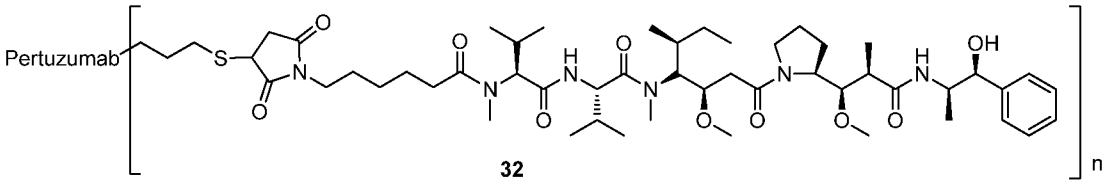
第三步

帕妥珠单抗-丙基-1-硫-MC- MMAF

取化合物 **12**(MC-MMAF，125mg，13.5mmol)溶解于 45ml 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇(**31b**)溶液(第二步制得)中，25℃下搅拌反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)，浓缩后在无菌条件下通过 0.2μm 滤器过滤后得 240ml 帕妥珠单抗-丙基-1-硫-MC- MMAF (化合物 **31**) 溶液，浓度为 8.02mg/ml，然后-20℃冷冻储存。

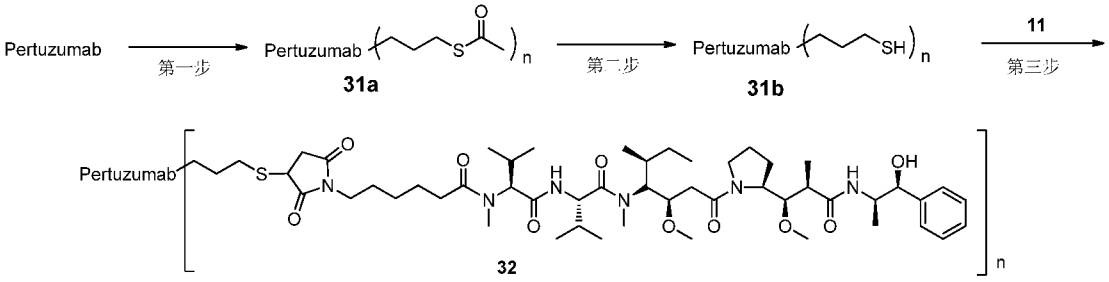
实施例 5

抗体药物偶联物化合物 **32** 的制备



32

其合成路线如下所示：



32

第一步

帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯

取帕妥珠单抗(Pertuzumab)原液（在 PH=5.7 的 20mM L-组氨酸醋酸，120mM 蔗糖缓冲体系中保存），用 G-25 排阻柱进行换液到 PH=4.3-4.5 的 100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液中，并浓缩至浓度为 10.0mg/ml 左右，得 P-mAb 的醋酸-醋酸钠缓冲液 2. 0ml（0.135mmol），将 3-乙酰巯基丙醛(0.15mg，1.1umol)，溶解于 0.2ml 乙腈后滴加入上述缓冲液中，将氰基硼氢化钠(173mg, 2.7mmol)溶于 0.2ml 水中滴加入上述反应液中，25℃下搅拌反应 3 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 3.0ml 帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**31a**)溶液，浓度为 6.5mg/ml。

第二步

帕妥珠单抗-丙硫醇

向帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**31a**)溶液(第一步制得)加入 2M 盐酸羟胺 0.06mL，25℃下搅拌反应 1 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 5.0ml 帕妥珠单抗-丙硫醇(**31b**)溶液，浓度 3.8mg/ml。

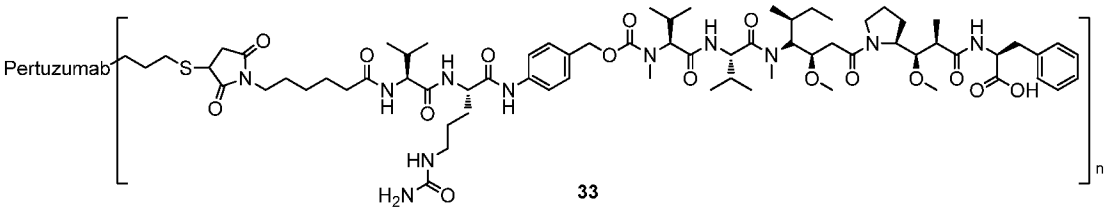
第三步

帕妥珠单抗-丙基-1-硫-MC- MMAE

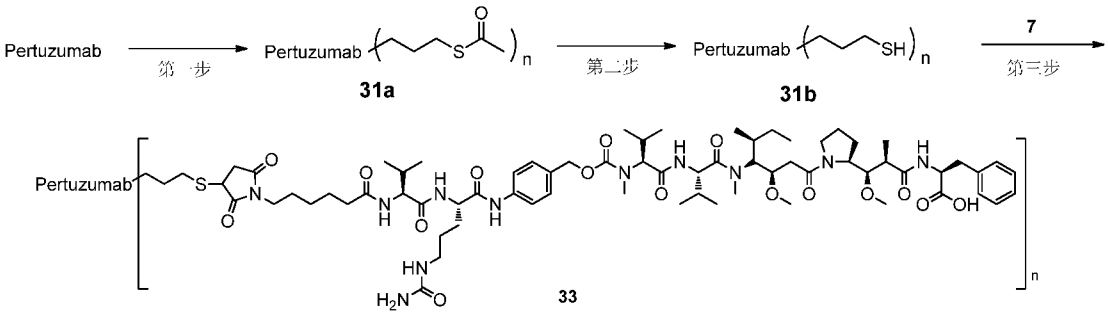
取化合物 **11**(MC-MMAE，1.3mg，1.4ummol)溶解于 0.55ml 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇(**31b**)溶液(第二步制得)中，25℃下搅拌反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2μm 滤器过滤后得 8.0ml 帕妥珠单抗-丙基-1-硫-MC-MMAE (化合物 **32**) 溶液，浓度为 2.4mg/ml，然后-20℃冷冻储存。

实施例 6

抗体药物偶联物化合物 **33** 的制备



其合成路线如下所示：



第一步

帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯

取帕妥珠单抗(Pertuzumab)原液（在 PH=5.7 的 20mM L-组氨酸醋酸，120mM 蔗糖缓冲体系中保存），用 G-25 排阻柱进行换液到 PH=4.3-4.5 的 100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液中，并浓缩至浓度为 10.0mg/ml 左右，得 P-mAb 的醋酸-醋酸钠缓冲液 200ml（13.5mmol），将 3-乙酰巯基丙醛(14.3mg，0.108mmol)，溶解于 20ml 乙腈后滴加入上述缓冲液中，将氰基硼氢化钠(173mg, 2.7mmol)溶于 10ml 水中滴加入上述反应液中，25℃下搅拌反应 3 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 300ml 帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**31a**)溶液，浓度为 6.5mg/ml。

第二步

帕妥珠单抗-丙硫醇

向帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**31a**)溶液(第一步制得)加入 2M 盐酸羟胺 6.0mL，25℃下搅拌反应 1 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 450ml 帕妥珠单抗-丙硫醇(**31b**)溶液，浓度 4.3mg/ml。

第三步

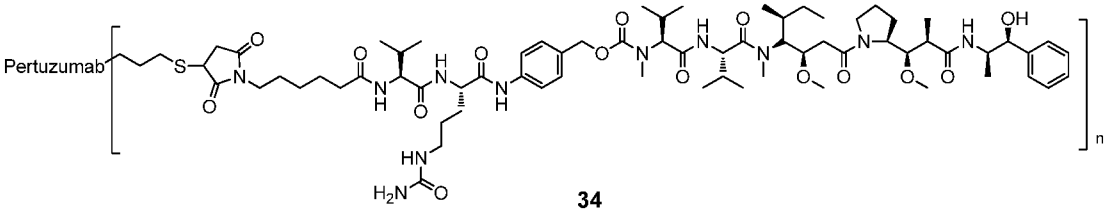
帕妥珠单抗-丙基-1-硫-MC-VC-PAB- MMAF

取化合物 **7**(MC-VC-PAB- MMAF，180mg，13.5mmol)溶解于 45ml 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇(**31b**)溶液(第二步制得)中，25℃下搅拌反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)，浓缩后在无菌条件下通过 0.2μm 滤器过滤后得 240ml 帕妥珠单抗-

丙基-1-硫- MC-VC-PAB- MMAF (化合物 **33**) 溶液，浓度为 8.0mg/ml，然后-20℃冷冻储存。

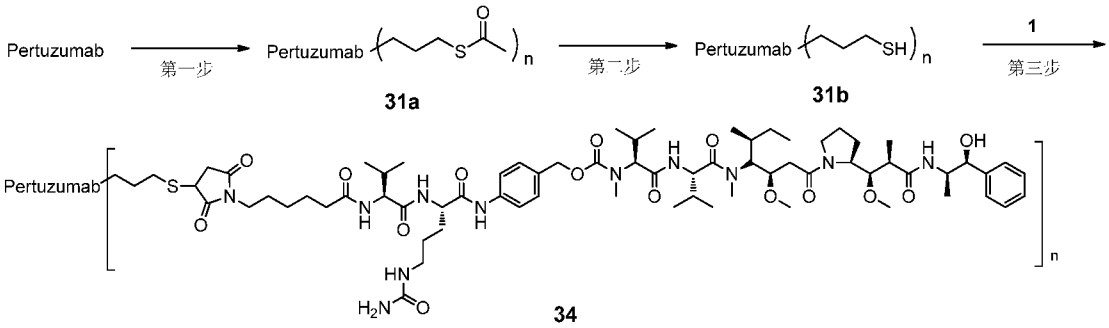
实施例 7

抗体药物偶联物化合物 **34** 的制备



34

其合成路线如下所示：



31a **31b** **34**

第一步

帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯

取帕妥珠单抗(Pertuzumab)原液（在 PH=5.7 的 20mM L-组氨酸醋酸，120mM 蔗糖缓冲体系中保存），用 G-25 排阻柱进行换液到 PH=4.3-4.5 的 100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液中，并浓缩至浓度为 10.0mg/ml 左右，得 P-mAb 的醋酸-醋酸钠缓冲液 2. 0ml（0.135mmol），将 3-乙酰巯基丙醛(0.15mg，1.1umol)，溶解于 0.2ml 乙腈后滴加入上述缓冲液中，将氰基硼氢化钠(173mg, 2.7mmol)溶于 0.2ml 水中滴加入上述反应液中，25℃下搅拌反应 3 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 3.0ml 帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**31a**)溶液，浓度为 6.5mg/ml。

第二步

帕妥珠单抗-丙硫醇

向帕妥珠单抗-丙硫醇乙酯(**31a**)溶液(第一步制得)加入 2M 盐酸羟胺 0.06mL，25℃下搅拌反应 1 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得 5.0ml 帕妥珠单抗-丙硫醇(**31b**)溶液，浓度 3.8mg/ml。

第三步

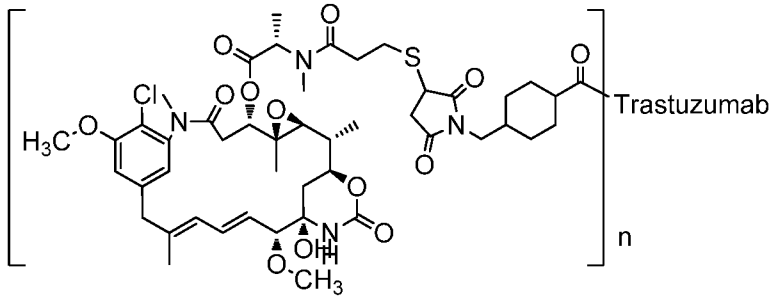
帕妥珠单抗-丙基-1-硫-MC-VC-PAB- MMAE

取化合物 **1**(MC-VC-PAB-MMAE，1.7mg，1.4ummol)溶解于 0.55ml 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇(**31b**)溶液(第二步制得)中，25℃下搅拌反应 4 小时后将反

应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.3 的含 2mM EDTA 的 0.05M 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2μm 滤器过滤后得 8.0ml 帕妥珠单抗-丙基-1-硫- MC-VC-PAB-MMAE (化合物 **34**) 溶液，浓度为 2.4mg/ml，然后-20℃冷冻储存。

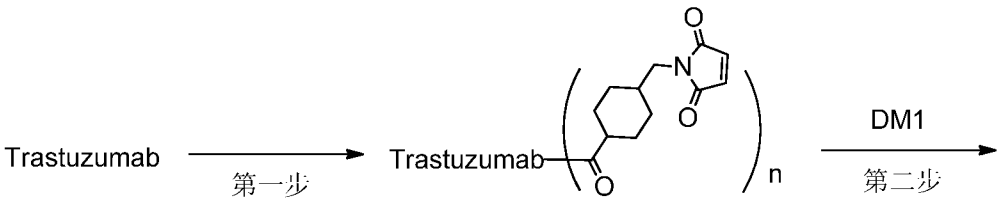
实施例 8

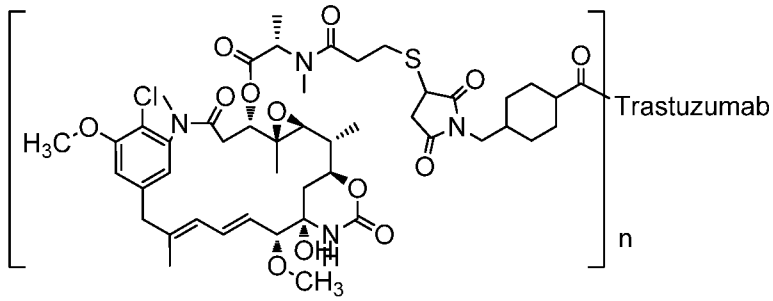
阳性对照抗体药物偶联物化合物 **35** 的制备



35

其合成路线如下所示：





35

抗体药物偶联物化合物 **35** 的制备可以参考专利 US20050169933。

以下结合测试例进一步描述解释本发明，但这些实施例并非意味着限制本发明的范围。

生物学评价

测试例 1：BT474 细胞增殖实验

一、试验目的：

检测本发明样品对 BT474 细胞增殖的抑制作用。

二、试验材料：

本发明样品：抗体药物偶联物化合物 16（以下简称化合物）、化合物 17、化合物 18、化合物 31-34

阳性对照药：化合物 35；

BT474 细胞：购于中科院细胞库，货号：TCHu143；

CCK-8：Cell Counting Kit-8，购于 Dojindo，货号：CK04；

FBS：Fetal Bovine Serum，购于 Gibco，货号：10099-141；

RPMI1640：购于 Hyclone，货号：SH30809.01B；

NOVOSTAR 多功能酶标仪(BMG) 。

三、试验方法：

1. 96 孔板中，每孔加入 100μl 含 15000 个 BT474 细胞的 10%FBS 的 RPMI1640 培养基，培养板放在 37℃、5%CO_2 培养箱中培养。

2. 将样品用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基进行两倍梯度稀释，共稀释 9 个点，起始稀释浓度为 5ug/ml。

3. 将稀释好的药物转移至铺好的 BT474 细胞的 96 孔细胞培养板中，50μl/孔。每个浓度设置三个复孔，同时要设置不加任何药物的对照孔。在 37℃、5% CO_2 条件下连续培养细胞。

4. 96 小时后，每孔加入加入 10μl CCK-8 溶液显色，放入 37℃、5% CO_2 培养箱中。显色 4 小时，在酶标仪上读取 OD_{450}，经 Graphpad Prism 5 软件处理后即可得 IC_{50}。

四、试验结果：

本发明化合物的生物活性由上述分析所得，计算所得的 IC_{50} 值列于下表 1：

表 1. 本发明化合物对 BT474 细胞的增殖抑制的 IC_{50}

化合物编号	IC_{50}(BT474)/nM
35	1.867
16	0.358
17	3.38
18	0.152
19	0.124

结论：本发明优选化合物均对 BT474 细胞具有明显的增殖抑制活性。

测试例 2：Daudi 细胞增殖实验

一、试验目的：

检测本发明样品对 Daudi 细胞增殖的抑制作用。

二、试验材料与仪器：

本发明样品：化合物 22、化合物 23、化合物 24、化合物 25；

RPMI1640：购于 Hyclone，货号：SH30809.01B；

Pen Strep (P/S)，购于 Gibco，货号 15140；

CCK-8：Cell Counting Kit-8，购于 Dojindo，货号：CK04；

75cm TC-Treated Culture Flask，购于 Corning Incorporated，货号：430641；

PBS：购于 Gibco，货号：20012-027；

Daudi 人 Burkitt's 淋巴瘤细胞，购于中科院细胞库，货号： TcHu140；

NOVOSTAR 多功能酶标仪(BMG)；

抗体 Inotuzumab：阳性对照。

三、试验方法：

1. 将 Daudi 人 Burkitt's 淋巴瘤细胞培养在含有 10%FBS 和 1% P/S 的 RPMI-1640 培养基中。实验时，将细胞密度调整为 5×10^4 个/ml ，在 96 孔板中每孔加入 90ul 培养基；

2. 将样品用 PBS 进行四倍梯度稀释，共稀释 9 个点，起始稀释浓度为 2.5ug/ml；

3. 将稀释好的药物转移到铺好 Daudi 人 Burkitt's 淋巴瘤细胞的 96 孔细胞培养板中，10μl/孔，对照孔加入 10μl PBS。在 5% CO_2 的 37℃培养箱中连续培养；

4. 72 小时后，每孔加入加入 10μl CCK-8 溶液显色，放入 37℃、5% CO_2 培养箱中。显色 4 小时，在酶标仪上读取 OD_{450}，经 Graphpad Prism 5 软件处理后即可得 IC_{50}。

表 2. 本发明化合物对 Daudi 人 Burkitt's 淋巴瘤细胞的增殖抑制的 IC_{50}

化合物编号	IC_{50}(BT474)/nM
Inotuzumab	95.6
22	1.43
23	22.71
24	0.511
25	5.94

结论：本发明优选化合物均对 Daudi 人 Burkitt's 淋巴瘤细胞具有明显的增殖抑制活性。

测试例 3：NCI-N87 抑瘤率实验

一、试验目的

评价并比较本发明抗体细胞毒素偶联物对人胃癌 NCI-N87 细胞（ATCC，CRL-5822）裸小鼠移植瘤的疗效。

二、受试药物

本发明样品：化合物 16；化合物 17；化合物 18;化合物 31。

阳性对照药：化合物 35；

配制方法：均用生理盐水配制。

三．试验动物

BALB/cA-nude 裸小鼠，6-7 周，雌性，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。合格证号：SCXK（沪）2012-0002。饲养环境：SPF 级。

四、试验步骤

裸小鼠皮下接种人胃癌 NCI-N87 细胞，待肿瘤生长至 100-200mm^3 后，将动物随机分组(D0)。给药剂量和给药方案见表 1。每周测 2-3 次瘤体积，称鼠重，记录数据。肿瘤体积（V）计算公式为：

$V=1/2\times a\times b^2$

其中：a、b 分别表示长、宽。

$T/C(\%)=(T-T_0)/(C-C_0)\times 100\%$ 其中 T、C 为实验结束时的肿瘤体积；T_0、C_0 为实验开始时的肿瘤体积。

表 3. 化合物(16、17、18、35)对人胃癌 NCI-N87 裸小鼠移植瘤的疗效

化合物			平均肿瘤体积（mm^3）		平均肿瘤体积（mm^3）		%T/C	%抑瘤率	P 值	部分消退	每组动物数
分组	给药	途径	D0	SD	D17	SD	D17	D17	D17		
溶剂	D0,7,14	IV	135.4	±11.5	1054.8	±170.9	-	-	-	0	10
16（3mg/kg）	D0,7,14	IV	136.1	±9.8	273.3	±183.5	15	85	0.000	1	6
16（10mg/kg）	D0,7,14	IV	134.3	±9.8	59.7	±8.7	-56	156	0.000	6	6
17（3mg/kg）	D0,7,14	IV	128.4	±9.5	888.3	±169.3	83	17	0.085	0	6
17（10mg/kg）	D0,7,14	IV	139.6	±12.4	602.7	±130.3	50	50	0.000	0	6
18（3mg/kg）	D0,7,14	IV	131.6	±13.5	366.7	±100.3	26	74	0.000	0	6
18（10mg/kg）	D0,7,14	IV	133.4	±17.2	66.3	±8.3	-50	150	0.000	6	6
35 3mg/kg	D0,7,14	IV	137.1	±10.5	446.9	±69.6	34	66	0.000	0	6
35 10mg/kg	D0,7,14	IV	136.2	±5.2	74.5	±18.2	-45	145	0.000	6	6

D0: 第一次给药时间。P 值指与对照相比，实验开始时的小鼠数目：对照组 n=10，治疗组 n=6。

表 4.化合物（31、35）对人胃癌 NCI-N87 裸小鼠移植瘤的疗效

分组		给药	途径	平均肿瘤体积(mm3) D0	SEM	平均肿瘤体积(mm3) D21	SEM	% T/C D21	% 抑瘤率 D21	P值 D21		部分消退	完全消退	实验结束每组动物数
溶剂		D0,7	IV	117.3	± 3.2	1247.9	± 144.8	-	-	-		0	0	10
31	1 mg/kg	D0,7	IV	116.0	± 5.4	708.2	± 77.3	52	48	0.017		0	0	6
31	3 mg/kg	D0,7	IV	120.3	± 6.1	99.3	± 11.4	-18	118	0.000	**	4	0	6
31	10 mg/kg	D0,7	IV	116.4	± 3.3	0.0	± 0.0	-100	200	0.000		0	6	6
35	3 mg/kg	D0,7	IV	115.3	± 5.5	277.1	± 45.2	14	86	0.000		0	0	6
35	10 mg/kg	D0,7	IV	109.8	± 4.3	23.9	± 15.1	-78	178	0.000		2	4	6

D0: 第一次给药时间；P 值指与溶剂相比；**P<0.01，与化合物 35 3 mg/kg 组比较；均采用 Student's t 检验。实验开始时小鼠数目：对照组 n=10，治疗组 n=6。

五、试验结果

在第一组试验中，化合物 16(3、10 mg/kg，IV，D0、7、14)显著抑制 HER2 高表达胃癌 NCI-N87 裸小鼠皮下移植瘤的生长，抑瘤率分别为 85%和 156%，并分别引起 1/6 和 6/6 小鼠肿瘤部分消退；化合物 18 相同剂量和方案对 NCI-N87 的抑瘤率分别为 74%和 150%，其中高剂量引起 6/6 小鼠肿瘤部分消退；参比药物化合物 35 对 NCI-N87 的抑瘤率分别为 66%和 145%，其中高剂量引起 6/6 小鼠肿瘤部分消退；化合物 17 对 NCI-N87 的抑瘤率分别为 17%和 50%。荷瘤小鼠

对以上药物均能较好耐受。受试药物对肿瘤生长的抑制作用如表 1 和图 1 所示。给药过程中没有出现小鼠死亡，各组小鼠给药期间体重没有明显下降如图 2 所示，提示目前给药剂量没有明显的毒副作用。

在第二组试验中，化合物 31(1、3、10 mg/kg, IV, 每周 1 次，共 2 次)剂量依赖性地抑制高表达 HER2 人胃癌 NCI-N87 裸小鼠皮下移植瘤的生长，抑瘤率分别为 48%、118%和 200%；3 mg/kg 组有 4/6 肿瘤部分消退，10 mg/kg 组有 6/6 肿瘤完全消退；参比药物化合物 35(3、10 mg/kg, IV, 每周 1 次，共 2 次)对 NCI-N87 的抑瘤率分别为 86%和 178%；10 mg/kg 组有 2/6 肿瘤部分消退，4/6 肿瘤完全消退。荷瘤小鼠对以上药物均能很好耐受。相比较，化合物 31 对 NCI-N87 的疗效强于阳性对照化合物 35($P<0.01$, 3 mg/kg 组比较)，见表 4。

测试例 4 SK-BR-3 细胞增殖实验

一、 试验目的：

采用 CCK 法测试样品对 SK-BR-3 细胞增殖活性的抑制作用，根据 IC50 大小评价样品的体外活性。

二、 试验材料：

SK-BR-3 细胞：ATCC，货号 HTB-30；

McCoy's 5A 培养基：Gibco，货号 16600-108；

CCK-8：Cell Counting Kit-8，购于 Dojindo，货号：CK04；

PBS：购于 Gibco，货号：20012-027；

三、 试验方法：

1. SK-BR-3 细胞培养在含 10%FBS 的 McCoy's 5A 培养基中，一周传代 2~3 次，传代比列 1:3 或 1:6。传代时，吸掉培养基，用 5ml 0.25%的胰酶冲洗细胞层，然后吸掉胰酶，将细胞放在培养箱中消化 3~5 分钟，加入新鲜培养基重悬细胞。

2. 在 96 孔细胞培养板中加入 100μL 的细胞悬液，密度为 5×10^4 细胞/ml，培养基为 10%FBS 的 McCoy's 5A，96 孔板外围只加入 100ul 10%FBS 的 McCoy's 5A 培养基。

3. 24 小时细胞贴壁后，去掉培养基，每孔加入 90ul 2%FBS 的 McCoy's 5A 培养基。

4. 样品用 PBS 稀释成不同浓度梯度，96 孔板中每孔加入 10μL 配置的不同浓度的待测样品，每个样品两复孔。

5. 将培养板在培养箱中孵育 3 天（37℃，5% CO_2）。

6. 向每孔加入 10μL CCK-8 溶液(注意不要在孔中生成气泡，它们会影响 OD 值的读数）。

7. 将培养板在培养箱内孵育 3 小时。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

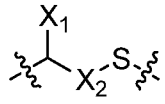
四、试验结果：

化合物编号	SK-BR-3 IC50(ng/ml)
31	5.94
35	54.75

结论：本发明优选化合物均对 SK-BR-3 细胞具有明显的增殖抑制活性。

权利要求书：

1、一种配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述配体-细胞毒性药物偶联物具有以下结构的连接单元 X：



X

X_1 选自 H、烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基，其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代，

X_2 选自烷基、环烷基、烷基-环烷基、环烷基-烷基、烷基-环烷基-烷基、杂环基、烷基-杂环基、杂环基-烷基、烷基-杂环基-烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基、烷基-芳基-烷基、杂芳基、烷基-杂芳基、杂芳基-烷基、烷基-杂芳基-烷基、$(CH_2)_p(OCH_2CH_2)_p$、$(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_p$，各个 p 独立地选自 1-10 的整数，其中所述的烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代，

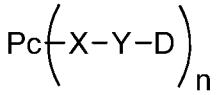
或当 X_1 不为 H 时，X_1 与 X_2 以及与 X_1、X_2 相连的 C 原子形成-环烷基-结构，其中环烷基独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代；

S 为硫原子。

2、根据权利要求 1 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中 X_1 为 H 或烷基，优选为 H。

3、根据权利要求 1 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中 X_2 为烷基或芳基，优选为烷基，更优选为直链-烷基。

4、根据权利要求 1 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其具有以下式（I）的结构：



（I）

其中：

Pc 为配体；

X 如权利要求 1 所定义；

Y 为间隔单元；

D 为细胞毒性药物；

n 为载药量，n 选自 1-8，优选 1-4。

5、根据权利要求 4 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中连接单元 X 与 Pc 的多肽链 N 端氨基和/或赖氨酸残基的ε-氨基相连，n 选自 1-4。

6、根据权利要求 4 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述配体为抗体，优选单克隆抗体。

7、根据权利要求 6 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述抗体的抗原为增生性疾病靶细胞和/或组织上表达的细胞表面抗原；所述增生性疾病优选癌症；所述细胞表面抗原优选为细胞表面受体。

8、根据权利要求 7 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其特征在于，所述细胞表面受体选自：

1) HER2(ErbB2)，

2) HER3(ErbB3)，

3) HER4(ErbB4)，

4) CD20，

5) CD22，

6) CD30，

7) CD33，

8) CD44，

9) Lewis Y，

10) CD56，

11) CD105，

12) VEGFR，或

13) GPNMB。

9、根据权利要求 8 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其特征在于，所述细胞表面受体选自：

1) HER2(ErbB2)，

2) CD22，

3) CD30

4) CD33，

5) CD44

6) CD56，

7) Lewis Y，或

8) GPNMB。

10、根据权利要求 6 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其特征在于，所述抗体选自：

1) Trastuzumab (HER2)，

2) Inotuzumab(CD22)，

3) Pinatuzumab(CD22)，

4) Brentuximab(CD30)，

5) Gemtuzumab(CD33)，

6) Bivatuzumab(CD44)，

7) Lorvotuzumab(CD56)，

8) cBR96(Lewis Y)，

9) Glematumamab(GPNMB) 或

10) Pertuzumab。

11、根据权利要求 10 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述的抗体为能够结合至 HER2 蛋白的抗体，其特征在于其：

1） 含有至少一个选自三个根据 Kabat 编号系统所定义的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的轻链，其中

i) CDR-L1 为序列 SEQ ID No.1 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.1 具有至少 80%同源性的序列；

ii) CDR-L2 为序列 SEQ ID No.2 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.2 具有至少 80%同源性的序列；

iii) CDR-L3 为序列 SEQ ID No.3 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.3 具有至少 80%同源性的序列；

2） 含有至少一个选自三个根据 Kabat 编号系统所定义的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的轻链，其中

iv) CDR-H1 为序列 SEQ ID No.4 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.4 具有至少 80%同源性的序列；

v) CDR-H2 为序列 SEQ ID No.5 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.5 具有至少 80%同源性的序列；

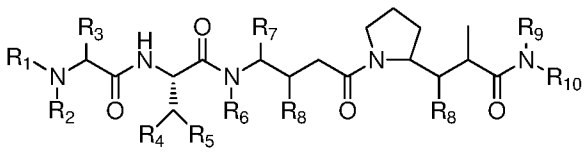
vi) CDR-H3 为序列 SEQ ID No.6 的 CDR，或至少一个在最佳比对后与序列 SEQ-No.6 具有至少 80%同源性的序列。

12、根据权利要求 11 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其特征在于，所述能够结合至 HER2 蛋白的抗体含有轻链和/或重链，所述轻链具有含有氨基酸序列 SEQ ID No.7 的序列，所述重链具有含有氨基酸序列 SEQ ID No.8 的序列。

13、根据权利要求 1 至 4 任一项所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述细胞毒性药物选自：微管蛋白抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、DNA 烷化剂、酪氨酸激酶抑制剂或 DNA 合成抑制剂，优选微管蛋白抑制剂。

14、根据权利要求 13 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述细胞毒性药物微管蛋白抑制剂选自美登素类、卡利奇霉素、紫杉烷类、长春新碱、秋水仙碱、Dolastatins/Auristatins，优选自美登素类或 Dolastatins/Auristatins。

15、根据权利要求 4 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述 D 选自 Dolastatins/Auristatins，其结构式如通式（D_1）所示：



（D_1）

其中：

R_1 选自键、H、烷基或环烷基，优选为键；

R_2 选自 H 或烷基；

或 R_1 和 R_2 与相连接的 N 原子形成杂环基，其中所述杂环基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代；或形成具有-$(CR_aR_b)_e$-的结构，R_a 和 R_b 独立地选自 H、烷基或杂环基，e 选自 2-6 之间的整数；

R_3 选自 H、烷基、环烷基、芳基、烷基-芳基、烷基-环烷基、杂环基或烷基-杂环基；

R_4 选自 H、烷基、环烷基、芳基、烷基-芳基、烷基-环烷基、杂环基或烷基-杂环基；

R_5 选自 H 或甲基；

R_6 选自 H 或烷基；

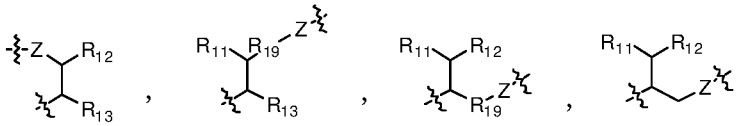
R_7 选自 H、烷基、环烷基、芳基、烷基-芳基、烷基-环烷基、杂环基或烷基-杂环基；

R_8 选自 H、羟基、烷基、环烷基、烷氧基；

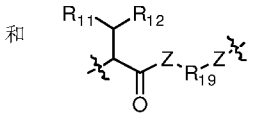
R_9选自H或烷基；

当R_1选自烷基或环烷基，或R_1和R_2与相连的N原子形成杂环基，其中所述杂环基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代时 ，

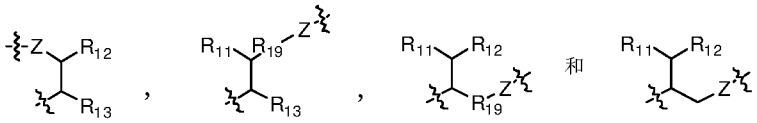
R_{10}选自下列结构：



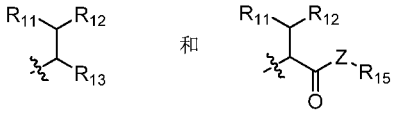
和



当R_1选自H时，R_{10}选自下列结构：



当R_1选自键时，其与间隔单元Y相连，其中R_{10}选自下列结构：



Z选自O，S、NH和N(R_{14})；

R_{11}选自H、羟基、氨基、NHR_{14}、$N(R_{14})_2$、烷氧基、烷基、环烷基、芳基、杂环基、烷基-芳基、烷基-环烷基、烷基-杂环基；或R_{11}为O时，可取代与其相连的碳原子上的H并与此碳原子形成羰基(C=O)；

R_{12}选自芳基和杂环基，所述芳基或杂环基任选进一步被一个或多个选自羟基、烷氧基、烷基或卤素的取代基所取代；

R_{13}选自H、羟基、氨基、NHR_{14}、$N(R_{14})_2$、$COOR_{14}$、烷氧基、烷基、环烷基、芳基、杂环基、烷基-芳基、烷基-环烷基、烷基-杂环基或烷氧基-烷氧基-烷氧基；

R_{14}选自H或烷基；

R_{15}选自H、烷基、芳基、杂环基、$(R_{16}O)_m$-R_{14}或$(R_{16}O)_m$-$CH(R_{17})_2$；

m选自1-1000之间的整数；

R_{16}是C_2-C_8烷基；

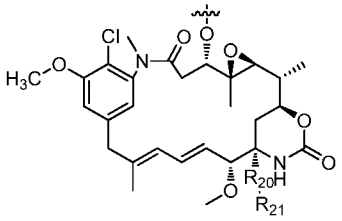
R_{17}选自H、羧基、-$(CH_2)_t$-$N(R_{18})_2$或-$(CH_2)_t$-SO_3R_{14}；

R_{18}选自H、烷基或-$(CH_2)_t$-COOH；

t选自0-6之间的整数；

R_{19}选自芳基、环烷基或杂环基。

16、根据权利要求 4 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述 D 选自美登素类，其结构式如通式（D_M）所示：



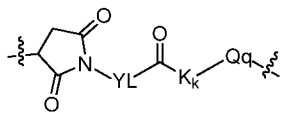
（D_M）

其中：

R_{20} 选自 O 或 S；

R_{21} 选自 H、烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基，其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、硝基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代。

17、根据权利要求 4 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中间隔单元-Y-具有以下通式结构：



（-Y-）

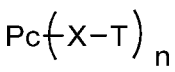
其中：

YL 选自烷基、环烷基、O-烷基、O-烷氧基、芳基、烷基-环烷基、环烷基-烷基、烷基-芳基、烷基-环烷基-烷基、杂环基、烷基-杂环基、杂环基-烷基、烷基-杂环基-烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基、烷基-芳基-烷基、杂芳基、烷基-杂芳基、杂芳基-烷基、烷基-杂芳基-烷基、$CH_2(OCH_2CH_2)_t$、$(CH_2CH_2O)_tCH_2$ 、$(CH_2CH_2O)_t$，t 是选自 1-10 的整数，优选为烷基，进一步优选为 C_2-C_8 直链烷基；

K_k 是氨基酸单元，其中 K 为氨基酸，k 选自 0-10 的整数，k 优选为 2，K_k 优选为缬氨酸-瓜氨酸；

Qq 是延伸单元，其中 q 是 0、1 或 2。

18、一种具有以下结构式（II）的化合物：



（II）

其中：

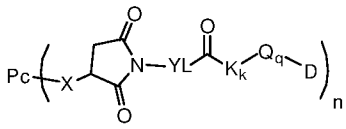
Pc 如权利要求 4 所定义；

X 如权利要求 1 所定义；

T 选自 H、叔丁基、乙酰基、正丙酰基、异丙酰基、三苯基甲基、甲氧基甲基、2-(三甲硅烷基)乙氧甲基，优选为 H 或乙酰基；

n 选自 1-8，优选 1-4。

19、根据权利要求 1 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其具有以下式（III）的结构：



（III）

其中：

Pc 为抗体，优选单克隆抗体；

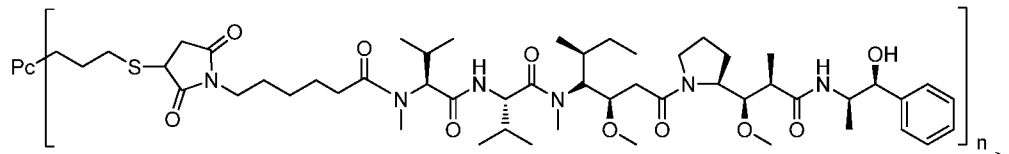
X 如权利要求 1 所定义；

YL、K_k、Q_q 如权利要求 17 所定义；

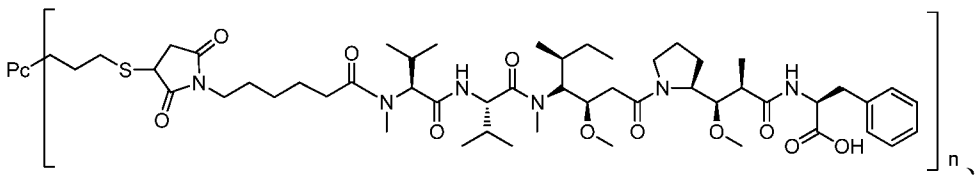
n 选自 1-4；

D 如权利要求 4 所定义。

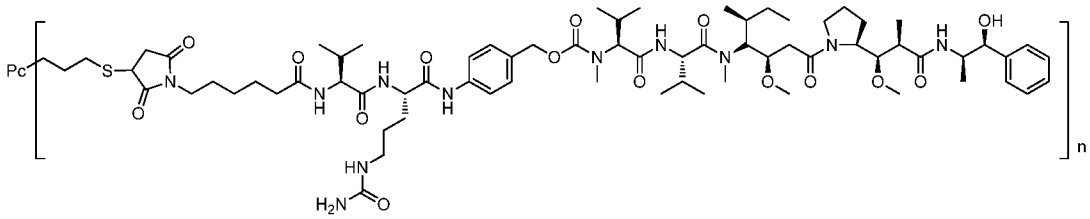
20、根据权利要求 4 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其具有以下任意一种结构：



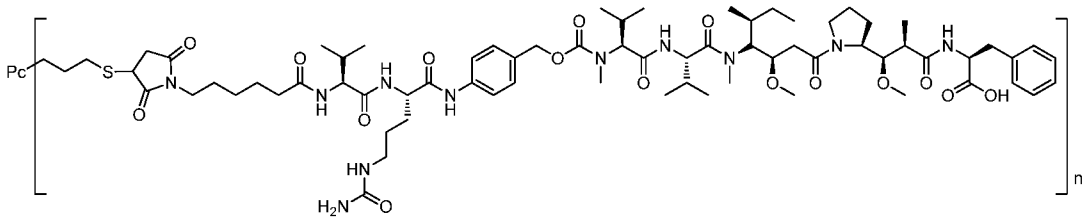
、



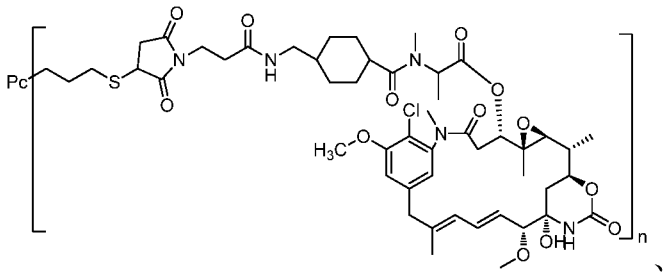
、



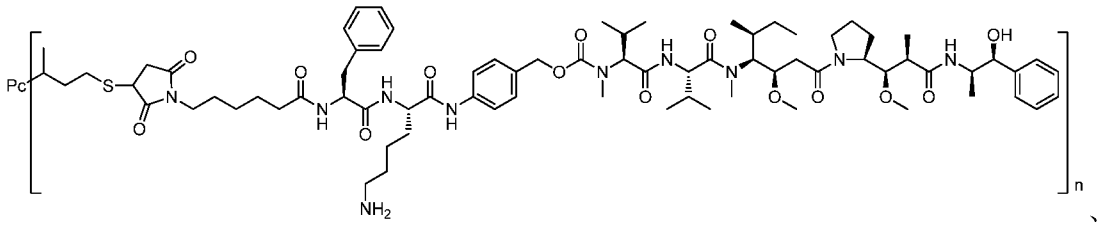
、



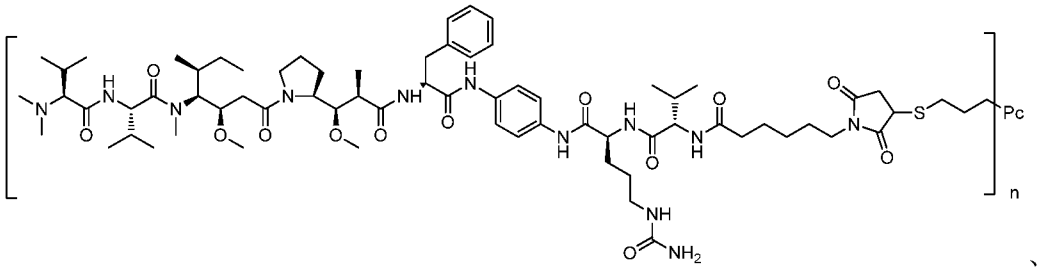
、



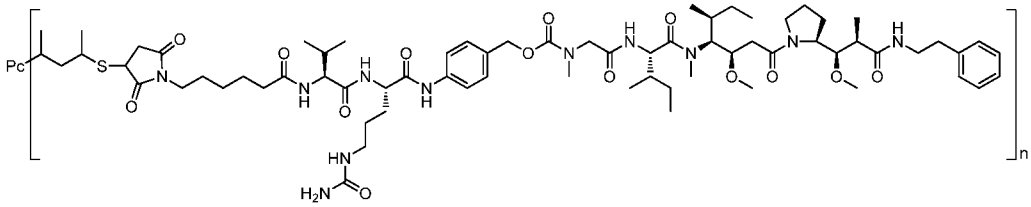
、



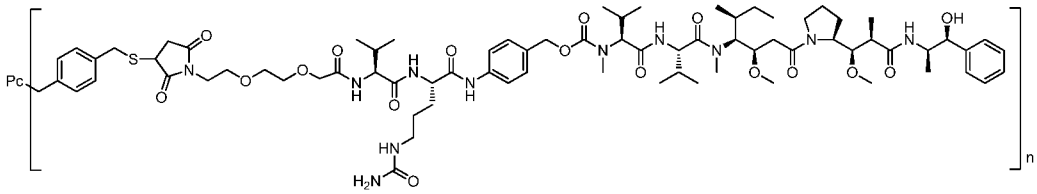
、



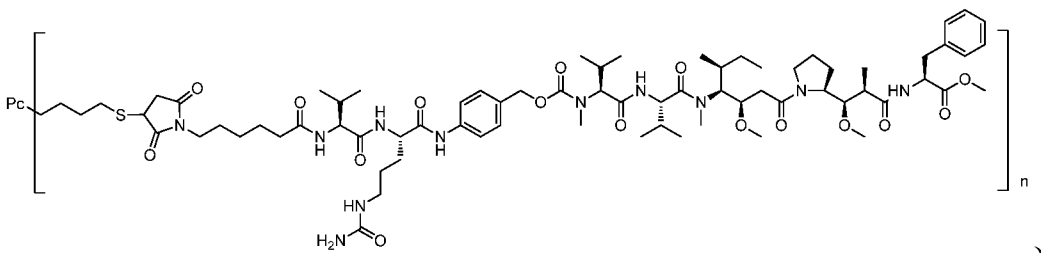
、



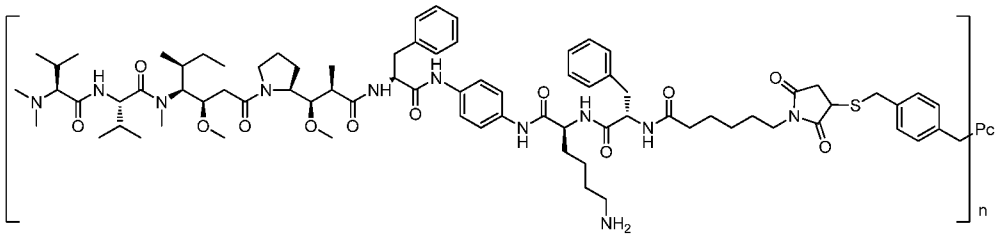
、



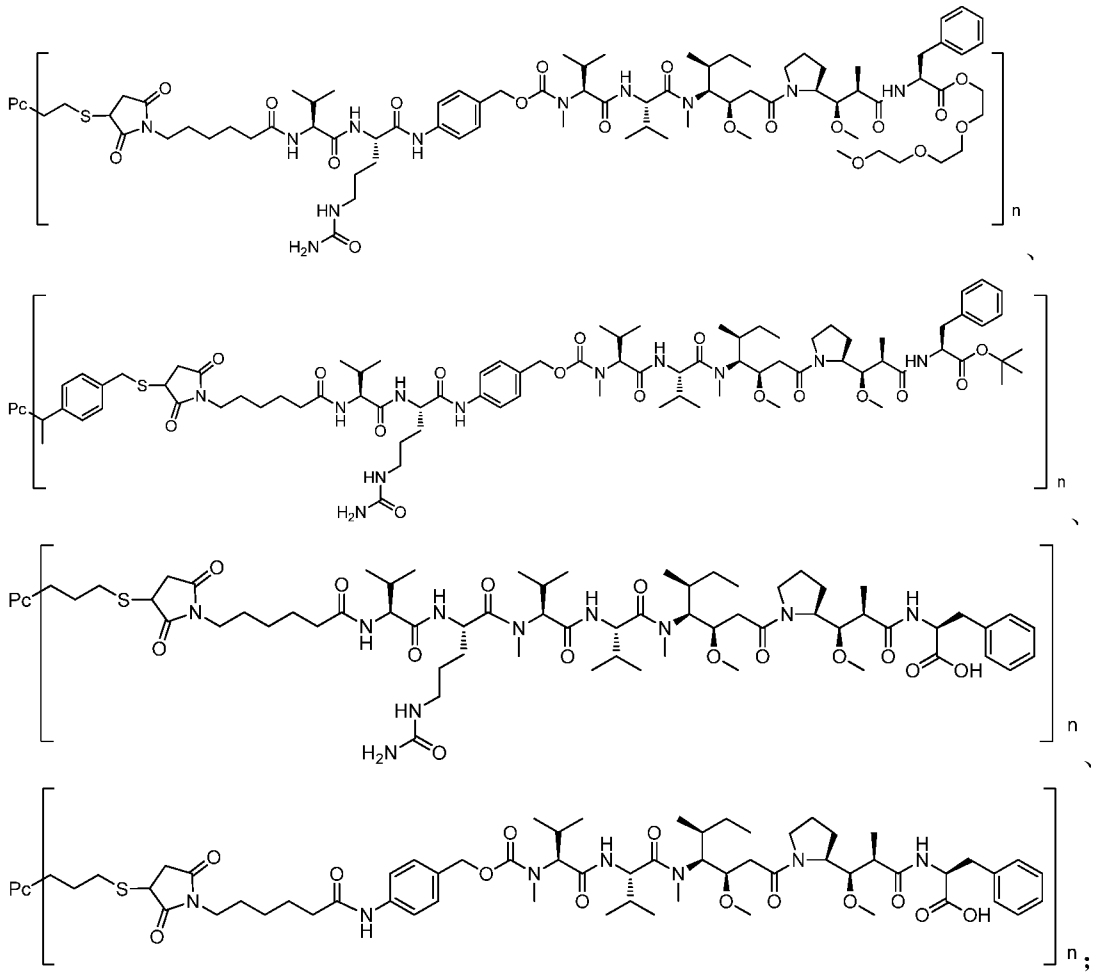
、



、



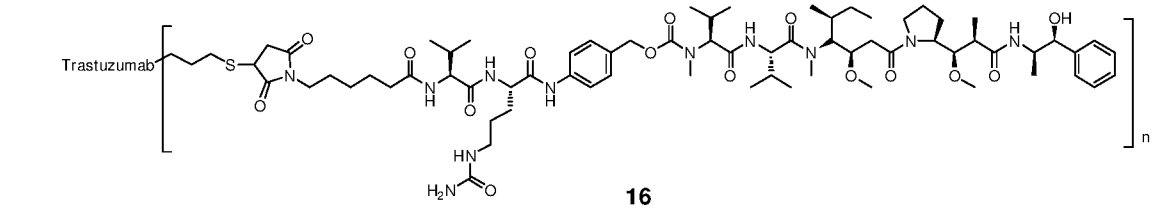
、



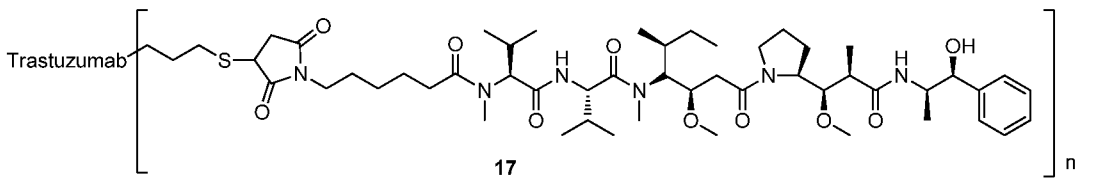
其中配体 Pc、n 如权利要求 4 所定义。

21、根据权利要求 20 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其中所述 Pc 选自 Trastuzumab、Inotuzumab 和 Brentuximab，优选 Trastuzumab 或 Pertuzumab，更优选 Pertuzumab。

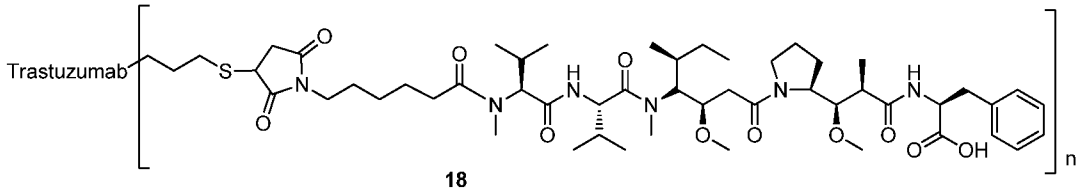
22、根据权利要求 4 所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，其选自：



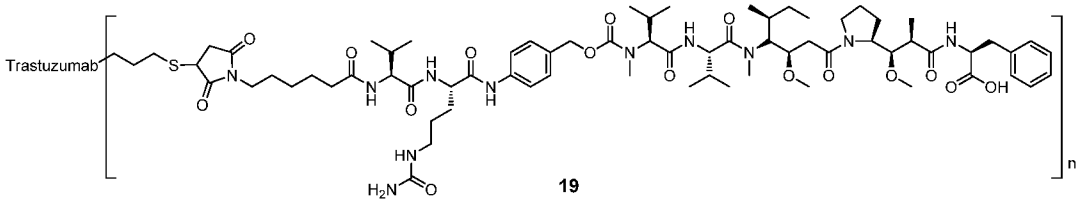
16



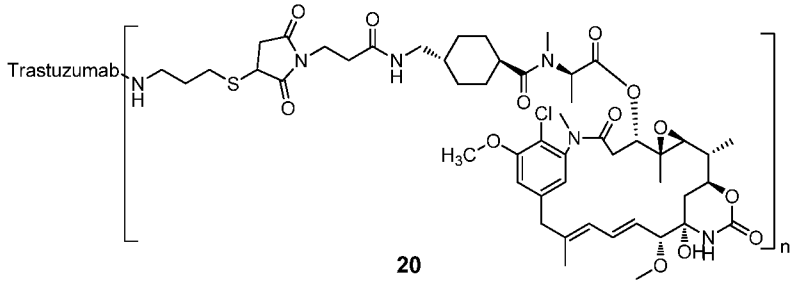
17



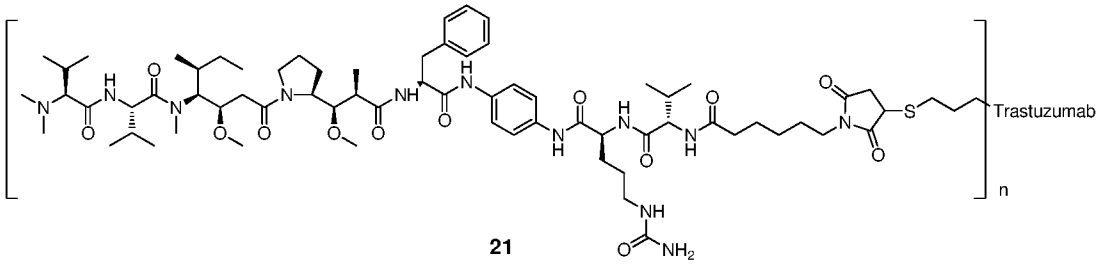
18



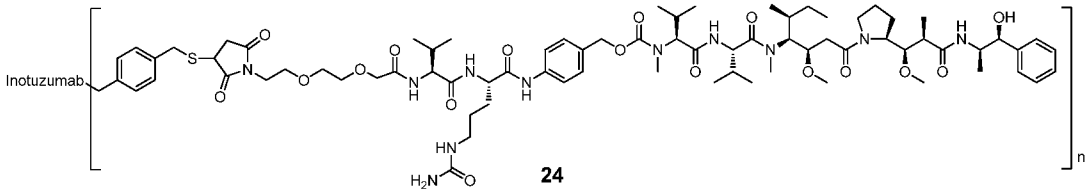
19



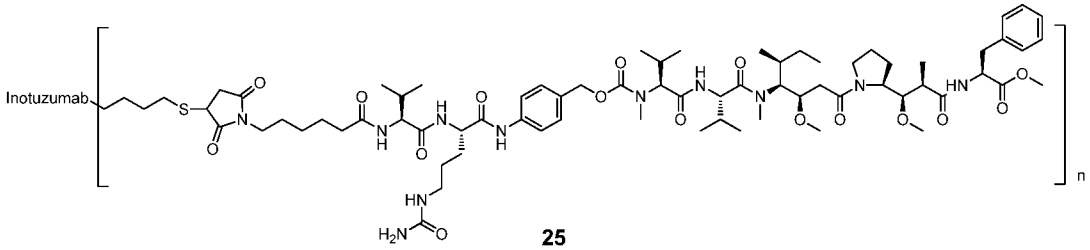
20



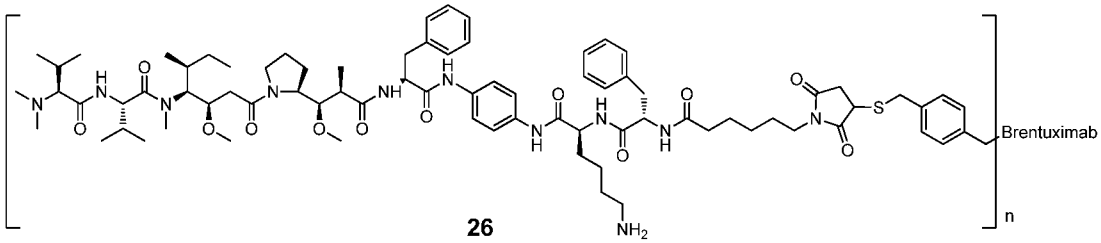
21



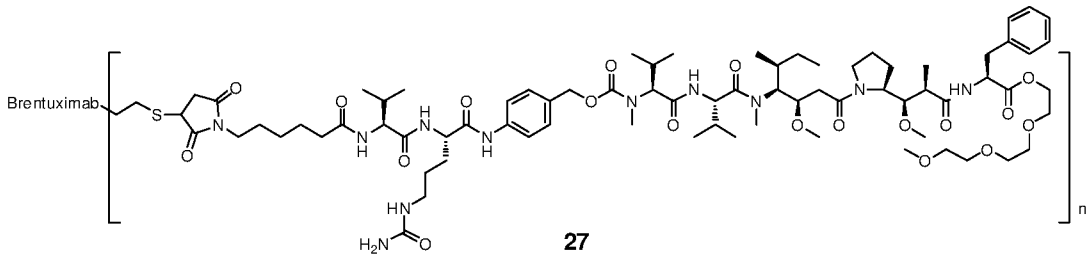
24



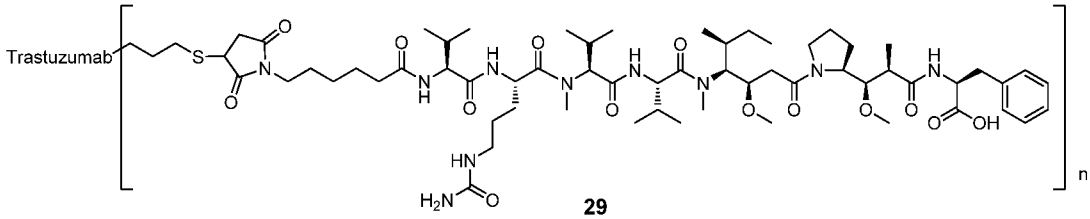
25



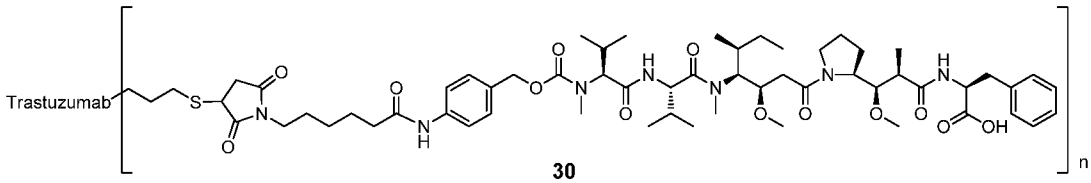
26



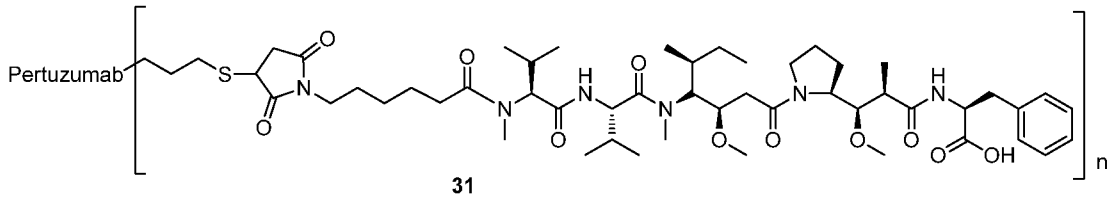
27



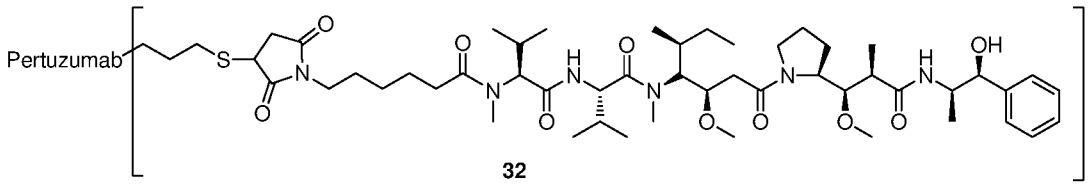
29



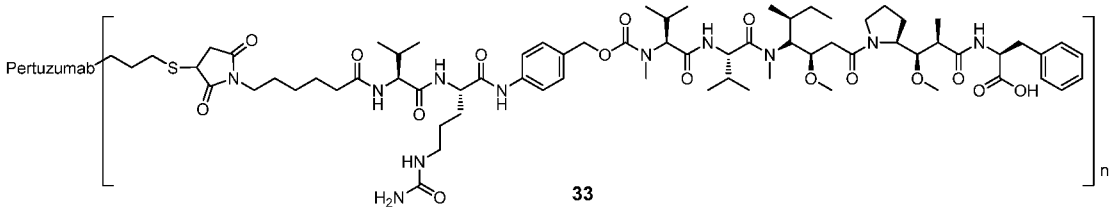
30



31

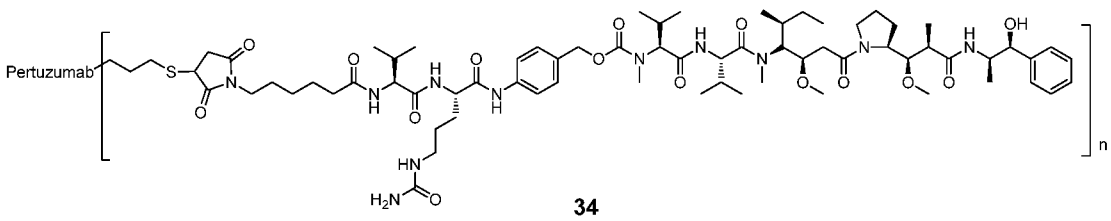


32



33

或

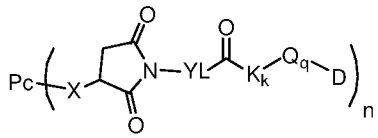


34

;

n 选自 1-8，优选 1-4。

23、一种制备如通式（III）所示的抗体-细胞毒性药物偶联物的方法，



（III）

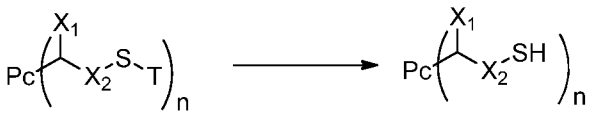
其包括如下步骤：

1) 向通式 IA 化合物和通式 IB 化合物中加入还原剂 RA，进行反应，得到通式 IC 化合物；优选反应体系 pH 值为 3-6，反应温度为 0-40℃；



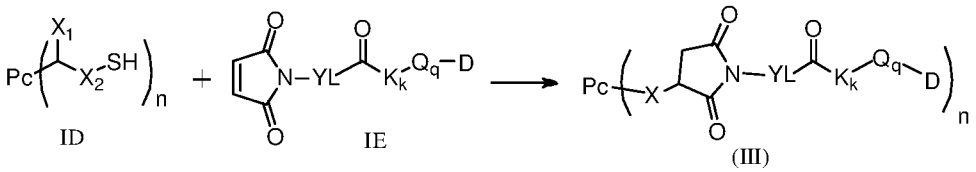
IA IB IC ；

2)向通式 IC 化合物中加入脱保护剂脱去巯基保护基 T，得到通式 ID 化合物，优选反应温度为 0-40℃；



IC ID ；

3)通式 ID 化合物和通式 IE 化合物之间发生迈克尔加成反应，偶联得到通式（III）化合物，优选反应温度为 0-40℃；



ID IE (III) ；

其中所述反应温度更优选为 15-30℃，最优选为 20-25℃；所述脱保护剂优选为盐酸羟胺；所述还原剂 RA 优选为氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠；

其中 X_1、X_2 如权利要求 1 所定义；P_C 如权利要求 4 所定义；T、n 如权利要求 18 所定义；YL、K_k、Q_q 如权利要求 17 所定义，D 如权利要求 15 或 16 所定义。

24、一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有治疗有效量的根据权利要求 1-17 及 19-22 中任意一项所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

25、根据权利要求 1-17 及 19-22 中任意一项所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物或根据权利要求 24 所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途，其中所述癌症选自以下一种或多种肿瘤相关受体(1)-(8)过表达的癌症：

1) HER2(ErbB2)，

2) CD22，

3) CD30

4) CD33，

5) CD44

6) CD56，

7) Lewis Y，或

8) GPNMB。

26、一种体外调节受体的方法，该方法包括对于受测物施用有效剂量的根据权利要求 1-17 及 19-22 中任意一项所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物或根据权利要求 24 所述的药物组合物，所述受体选自：

1) HER2(ErbB2)，

2) CD22，

3) CD30

4) CD33，

5) CD44

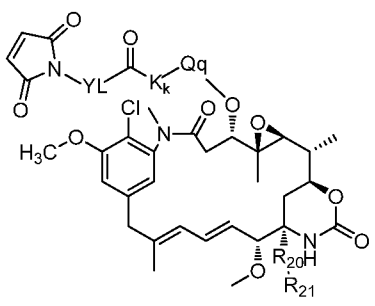
6) CD56，

7) Lewis Y，或

8) GPNMB。

27、一种治疗哺乳动物癌症的方法，该方法包括对于哺乳动物施用有效剂量的根据权利要求 1-17 及 19-22 中任意一项所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物或根据权利要求 24 所述的药物组合物，其中所述哺乳动物为人，所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤，优选乳腺癌症、霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤；更优选为与 HER2 表达相关的乳腺癌。

28、一种如通式（IV）所示的化合物、互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体及其混合物形式、及可药用的盐在制备治疗癌症的药物中的用途：



（IV）

其中：

YL 选自烷基、环烷基、O-烷基、O-烷氧基、芳基、烷基-环烷基、环烷基-烷基、烷基-芳基、烷基-环烷基-烷基、杂环基、烷基-杂环基、杂环基-烷基、烷基-杂环基-烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基、烷基-芳基-烷基、杂芳基、烷基-杂芳基、杂芳基-烷基、烷基-杂芳基-烷基、$CH_2(OCH_2CH_2)_t$、$(CH_2CH_2O)_tCH_2$ 、$(CH_2CH_2O)_t$，t 是选自 1-10 的整数，优选为烷基，进一步优选为 C_2-C_8 直链烷基；

K_k 是氨基酸单元，其中 K 为氨基酸，k 选自 0-10 的整数，k 优选为 2，K_k 优选为缬氨酸-瓜氨酸；

Qq 是延伸单元，其中 q 是 0、1 或 2；

R_{20} 选自-O-或-S-；

R_{21} 选自 H、烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基，其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自独立地任选进一步被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、硝基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基的取代基所取代。

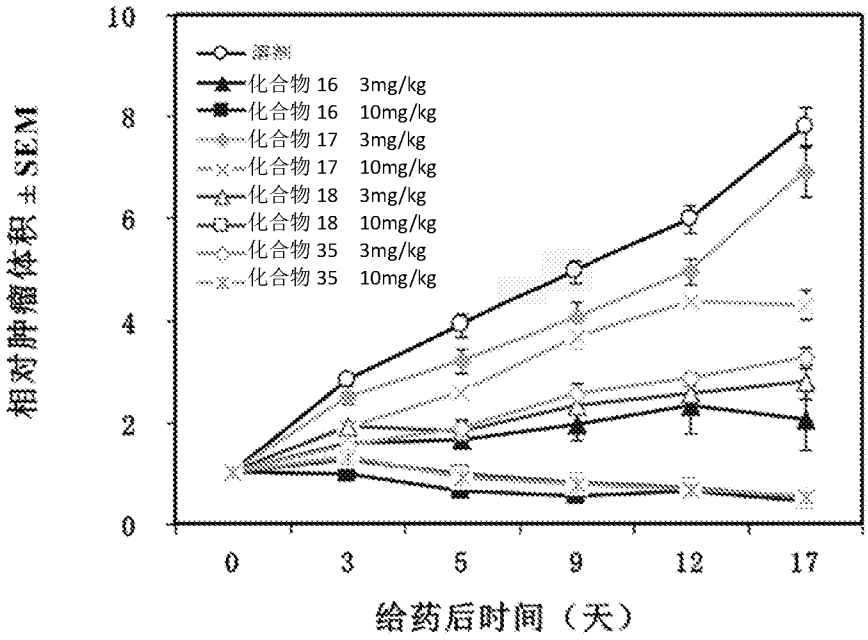

相对肿瘤体积 ±SEM
10
8
6
4
2
0
溶剂
化合物 16 3mg/kg
化合物 16 10mg/kg
化合物 17 3mg/kg
化合物 17 10mg/kg
化合物 18 3mg/kg
化合物 18 10mg/kg
化合物 35 3mg/kg
化合物 35 10mg/kg
0 3 5 9 12 17
给药后时间（天）

图 1

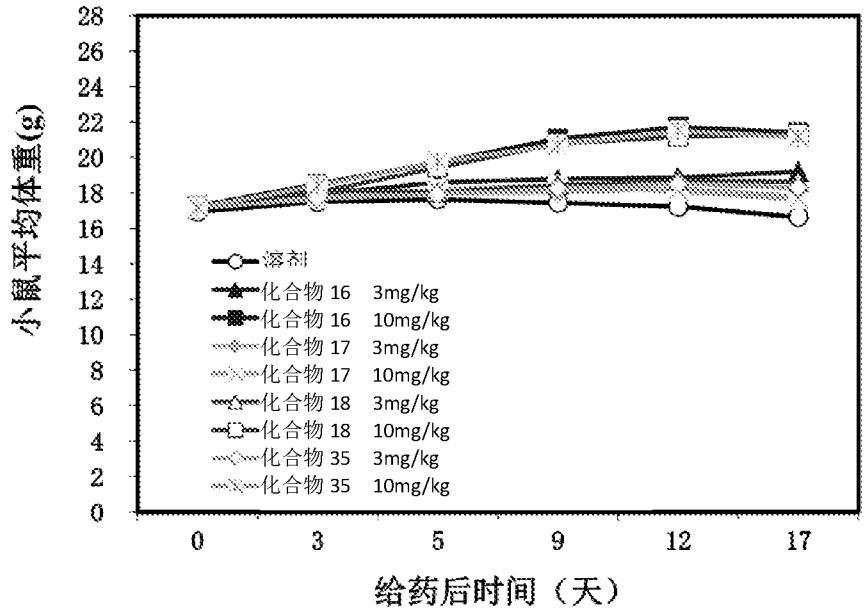

小鼠平均体重(g)
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
溶剂
化合物 16 3mg/kg
化合物 16 10mg/kg
化合物 17 3mg/kg
化合物 17 10mg/kg
化合物 18 3mg/kg
化合物 18 10mg/kg
化合物 35 3mg/kg
化合物 35 10mg/kg
0 3 5 9 12 17
给药后时间（天）

图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/071289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/537 (2006.01) i; A61K 47/48 (2006.01) i; A61K 45/00 (2006.01) i; A61K 35/00 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

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

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

Database: WPI, EPODOC, CNPAT, CNABS, CPRSABS, MOABS, HKABS, TWABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, JPABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, CA, EMBASE, MEDLINE, STN

Keywords: coupling, sulphur, linking bond, ligand, receptor, acceptor, antibody, S, auristatin, maytansine, STN structural search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102973947 A (GENENTECH, INC.), 20 March 2013 (20.03.2013), description, paragraphs 14-16, 104-113, 121, 125-126, 217-218, and 377-385	1-10, 13-14, 16, 17, 24, 25
Y	CN 102973947 A (GENENTECH, INC.), 20 March 2013 (20.03.2013), description, paragraphs 14-16, 104-113, 121, 125-126, 217-218, and 377-385	11, 12, 20-22
X	CN 1938046 A (SEATTLE GENETICS INC.), 28 March 2007 (28.03.2007), claims 170-174	1-10, 13, 15, 24, 25
Y	CN 1938046 A (SEATTLE GENETICS INC.), 28 March 2007 (28.03.2007), claims 170-174	11, 12, 20-22

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 April 2015 (19.04.2015)	**04 May 2015 (04.05.2015)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **LI, Fengyun** Telephone No.: (86-10) **62089164**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/071289

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/071289

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 26, 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] The subject matter of claims 26 and 27 falls within the methods for treating diseases, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39.1(iv).

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

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1] Based on the searching, the connecting unit structure of the compound in claim 1 lacks novelty and does not involve an inventive step; therefore, the claimed structural formula (II) of claim 18, the claimed structural formula (III) of claim 19 and the claimed method for preparing the structural formula (III) of claim 23, and the claimed structural formula (IV) of claim 28 do not share a same or corresponding specific technical feature with the claimed compound of claim 1, and therefore claim 1, claim 18, claims 19 and 23 and claim 28 do not meet the requirement of unity of invention as provided for in PCT Rule 13.1.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-17, 20-22, 24, and 25

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/071289

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102973947 A	20 March 2013	JP 5234734 B2	10 July 2013
		WO 2005117986 A2	15 December 2005
		AU 2005249490 B2	29 July 2010
		US 2005276812 A1	15 December 2005
		NZ 551180 A	30 October 2009
		US 2014128580 A1	08 May 2014
		CA 2567520 A1	15 December 2005
		KR 101200133 B1	13 November 2012
		EP 2286844 A3	22 August 2012
		EP 1753463 A2	21 February 2007
		NO 20066075 A	28 February 2007
		EP 2286844 A2	23 February 2011
		US 2009202536 A1	13 August 2009
		IL 179140 D0	08 March 2007
		MX PA06014065 A	31 January 2007
		KR 20120064120 A	18 June 2012
		KR 20070037575 A	05 April 2007
		BR PI0510883 A	26 December 2007
		JP 2008501029 A	17 January 2008
		AU 2005249490 A1	15 December 2005
		RU 2404810 C2	27 November 2010
		US 8652479 B2	18 February 2014
		RU 2006147264 A	20 July 2008
		NZ 579482 A	25 February 2011
		US 8142784 B2	27 March 2012
		JP 2012036202 A	23 February 2012
		US 2008171040 A1	17 July 2008
		WO 2005117986 A3	15 June 2006
CN 1938046 A	28 March 2007	CN 1938046 B	19 March 2014
		US 2012003248 A1	05 January 2012
		EP 2478912 A1	25 July 2012
		ES 2456325 T3	22 April 2014
		KR 20140015148 A	06 February 2014
		IL 175247 A	30 April 2013
		AU 2004316290 A2	09 September 2005
		KR 101438983 B1	05 September 2014
		JP 5551661 B2	16 July 2014
		SI 1725249 T1	30 April 2014
		CA 2841741 A1	09 September 2005
		AU 2004316290 C1	02 February 2012
		KR 20060111473 A	27 October 2006
		JP 2011231131 A	17 November 2011
		DK 1725249 T3	17 March 2014
		EP 1725249 B1	08 January 2014
		US 8703714 B2	22 April 2014
		EP 2486933 A1	15 August 2012
		BR PI0416028 A	02 January 2007
		EP 2489364 A1	22 August 2012
		US 2012141510 A1	07 June 2012
		NZ 547633 A	27 August 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/071289

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		EP 2260858 A2	15 December 2010
		CA 2543888 A1	09 September 2005
		US 2012141508 A1	07 June 2012
		EP 2260858 A3	07 December 2011
		WO 2005081711 A3	23 November 2006
		US 2012027784 A1	02 February 2012
		US 7745394 B2	29 June 2010
		US 2012141509 A1	07 June 2012
		KR 20130119004 A	30 October 2013
		US 2012148610 A1	14 June 2012
		US 2005238649 A1	27 October 2005
		JP 2007514652 A	07 June 2007
		SG 195524 A1	30 December 2013
		SG 149815 A1	27 February 2009
		US 2012027783 A1	02 February 2012
		US 2014220047 A1	07 August 2014
		WO 2005081711 A2	09 September 2005
		US 2008248051 A1	09 October 2008
		US 2012148608 A1	14 June 2012
		AU 2004316290 B2	18 August 2011
		IL 215981 D0	31 January 2012
		US 7964566 B2	21 June 2011
		US 2012034247 A1	09 February 2012
		US 7994135 B2	09 August 2011
		US 7964567 B2	21 June 2011
		US 2008248053 A1	09 October 2008
		JP 5470288 B2	16 April 2014
		US 2012034246 A1	09 February 2012

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2015/071289

A. 主题的分类

A61K 31/537(2006.01)i；A61K 47/48(2006.01)i；A61K 45/00(2006.01)i；A61K 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

数据库：WPI,EPODOC,CNPAT,CNABS,CPRSABS,MOABS,HKABS,TWABS,DWPI,SIPOABS,CPEA,JPABS, CNTXT,EPTXT,USTXT, WOTXT,CNKI,CA,EMBASE,MEDLINE,STN； 关键词：配体，受体，抗体，偶联，耳他汀，美登素，硫，连接键，ligand，receptor，acceptor，antibody，S，auristatin，maytansine，STN结构式检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102973947 A (健泰科生物技术公司) 2013年 3月 20日 (2013-03-20) 说明书第14-16、104-113、121、125-126、217-218、377-385段	1-10、13-14、16、17、24、25
Y	CN 102973947 A (健泰科生物技术公司) 2013年 3月 20日 (2013-03-20) 说明书第14-16、104-113、121、125-126、217-218、377-385段	11、12、20-22
X	CN 1938046 A (西雅图基因公司) 2007年 3月 28日 (2007-03-28) 权利要求170-174	1-10、13、15、24、25
Y	CN 1938046 A (西雅图基因公司) 2007年 3月 28日 (2007-03-28) 权利要求170-174	11、12、20-22

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2015年 4月 19日	2015年 5月 4日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	李凤云 电话号码 (86-10)62089164

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/071289

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☑ 电子形式

b. (提交时间)

☐ 含在申请提交时的国际申请中

☑ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

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

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/071289

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 26、27
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求26、27的主题属于疾病的治疗方法，属于PCT条约实施细则39.1(iv)规定的不进行检索的主题。

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

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

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 根据检索，权利要求1的化合物的连接单元构不具备新颖性和创造性，因此权利要求18要求保护的结构式（II）、权利要求19要求保护的结构式（III）以及权利要求23要求保护的结构式（III）的制备方法、权利要求28要求保护的结构式（IV）与权利要求1要求保护的化合物之间不具有相同或相应的特定技术特征，所以权利要求1，权利要求18，权利要求19、23和权利要求28之间不具有单一性，不符合PCT条约实施细则13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：

4. ☑ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 1-17、20-22、24、25

对异议的意见
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/071289

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102973947	A	2013年 3月 20日	JP	5234734	B2	2013年 7月 10日
				WO	2005117986	A2	2005年 12月 15日
				AU	2005249490	B2	2010年 7月 29日
				US	2005276812	A1	2005年 12月 15日
				NZ	551180	A	2009年 10月 30日
				US	2014128580	A1	2014年 5月 8日
				CA	2567520	A1	2005年 12月 15日
				KR	101200133	B1	2012年 11月 13日
				EP	2286844	A3	2012年 8月 22日
				EP	1753463	A2	2007年 2月 21日
				NO	20066075	A	2007年 2月 28日
				EP	2286844	A2	2011年 2月 23日
				US	2009202536	A1	2009年 8月 13日
				IL	179140	D0	2007年 3月 8日
				MX	PA06014065	A	2007年 1月 31日
				KR	20120064120	A	2012年 6月 18日
				KR	20070037575	A	2007年 4月 5日
				BR	PI0510883	A	2007年 12月 26日
				JP	2008501029	A	2008年 1月 17日
				AU	2005249490	A1	2005年 12月 15日
				RU	2404810	C2	2010年 11月 27日
				US	8652479	B2	2014年 2月 18日
				RU	2006147264	A	2008年 7月 20日
				NZ	579482	A	2011年 2月 25日
				US	8142784	B2	2012年 3月 27日
				JP	2012036202	A	2012年 2月 23日
				US	2008171040	A1	2008年 7月 17日
				WO	2005117986	A3	2006年 6月 15日
CN	1938046	A	2007年 3月 28日	CN	1938046	B	2014年 3月 19日
				US	2012003248	A1	2012年 1月 5日
				EP	2478912	A1	2012年 7月 25日
				ES	2456325	T3	2014年 4月 22日
				KR	20140015148	A	2014年 2月 6日
				IL	175247	A	2013年 4月 30日
				AU	2004316290	A2	2005年 9月 9日
				KR	101438983	B1	2014年 9月 5日
				JP	5551661	B2	2014年 7月 16日
				SI	1725249	T1	2014年 4月 30日
				CA	2841741	A1	2005年 9月 9日
				AU	2004316290	C1	2012年 2月 2日
				KR	20060111473	A	2006年 10月 27日
				JP	2011231131	A	2011年 11月 17日
				DK	1725249	T3	2014年 3月 17日
				EP	1725249	B1	2014年 1月 8日
				US	8703714	B2	2014年 4月 22日
				EP	2486933	A1	2012年 8月 15日
				BR	PI0416028	A	2007年 1月 2日
				EP	2489364	A1	2012年 8月 22日
				US	2012141510	A1	2012年 6月 7日
				NZ	547633	A	2010年 8月 27日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/071289

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		EP	2260858	A2	2010年 12月 15日
		CA	2543888	A1	2005年 9月 9日
		US	2012141508	A1	2012年 6月 7日
		EP	2260858	A3	2011年 12月 7日
		WO	2005081711	A3	2006年 11月 23日
		US	2012027784	A1	2012年 2月 2日
		US	7745394	B2	2010年 6月 29日
		US	2012141509	A1	2012年 6月 7日
		KR	20130119004	A	2013年 10月 30日
		US	2012148610	A1	2012年 6月 14日
		US	2005238649	A1	2005年 10月 27日
		JP	2007514652	A	2007年 6月 7日
		SG	195524	A1	2013年 12月 30日
		SG	149815	A1	2009年 2月 27日
		US	2012027783	A1	2012年 2月 2日
		US	2014220047	A1	2014年 8月 7日
		WO	2005081711	A2	2005年 9月 9日
		US	2008248051	A1	2008年 10月 9日
		US	2012148608	A1	2012年 6月 14日
		AU	2004316290	B2	2011年 8月 18日
		IL	215981	D0	2012年 1月 31日
		US	7964566	B2	2011年 6月 21日
		US	2012034247	A1	2012年 2月 9日
		US	7994135	B2	2011年 8月 9日
		US	7964567	B2	2011年 6月 21日
		US	2008248053	A1	2008年 10月 9日
		JP	5470288	B2	2014年 4月 16日
		US	2012034246	A1	2012年 2月 9日