



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117295524 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 26

(21) 申请号 202280032877.1

(22) 申请日 2022.06.01

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/098024 2021.06.02 CN

202110651300.6 2021.06.10 CN

202111198590.X 2021.10.14 CN

202111595515.7 2021.12.23 CN

202111602429.4 2021.12.24 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/096690 2022.06.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/253284 ZH 2022.12.08

(71) 申请人 百奥泰生物制药股份有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城开源大道11号A6栋第五
层

(72) 发明人 汤伟佳 周鑫 梅星星 严辉

李硕旭 范建军 齐学康 俞金泉

李胜峰

(51) Int.Cl.

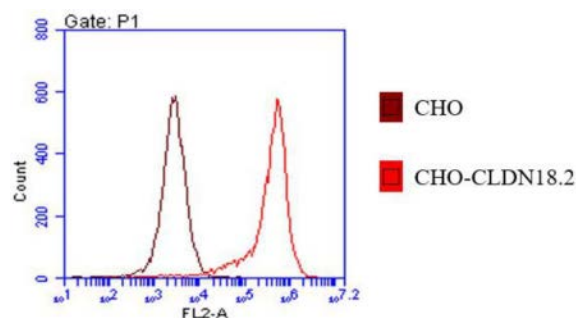
A61K 47/60 (2006.01)

(54) 发明名称

药物偶联物及其用途

(57) 摘要

一种药物偶联物如抗体药物偶联物及其用途,属于生物医药领域。在一些实施方案中,所述药物偶联物为式I的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物,所述药物偶联物可用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。



(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

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



(10) 国际公布号
WO 2022/253284 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 47/60 (2017.01) *C07K 16/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/096690
- (22) 国际申请日: 2022 年 6 月 1 日 (01.06.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
PCT/CN2021/098024
2021 年 6 月 2 日 (02.06.2021) CN
202110651300.6 2021 年 6 月 10 日 (10.06.2021) CN
202111198590.X 2021 年 10 月 14 日 (14.10.2021) CN
202111595515.7 2021 年 12 月 23 日 (23.12.2021) CN
202111602429.4 2021 年 12 月 24 日 (24.12.2021) CN
- (71) 申请人: 百奥泰生物制药股份有限公司 (BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.) [CN/CN]; 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。
- (72) 发明人: 汤伟佳 (TANG, Weijia); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。周鑫 (ZHOU, Xin); 中国广东省广州市高新技术

产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。梅星星 (MEI, Xingxing); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。严辉 (YAN, Hui); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。李硕旭 (LI, Shuoxu); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。范建军 (FAN, Jianjun); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。齐学康 (QI, Xuekang); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。俞金泉 (YU, Jin-Chen); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。李胜峰 (LI, Shengfeng); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层刘艳丽, Guangdong 510530 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS,

(54) Title: DRUG CONJUGATE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 药物偶联物及其用途

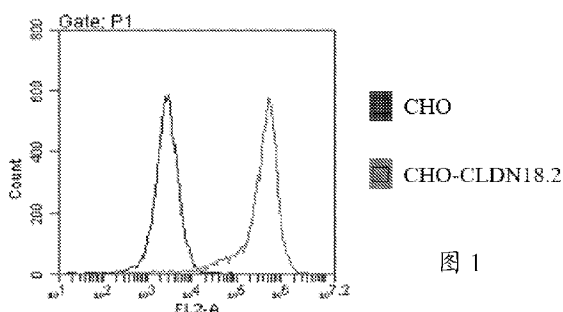


图 1

(57) Abstract: A drug conjugate, such as an antibody drug conjugate, and the use thereof, belonging to the field of biomedicine. In some embodiments, the drug conjugate is a compound of formula I or a pharmaceutically acceptable salt or a solvate thereof, and can be used for treating cancers, autoimmune diseases, inflammatory diseases or infectious diseases.

(57) 摘要: 一种药物偶联物如抗体药物偶联物及其用途, 属于生物医药领域。在一些实施方案中, 所述药物偶联物为式 I 的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 所述药物偶联物可用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

WO 2022/253284 A1

IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

药物偶联物及其用途

技术领域

本发明涉及药物偶联物如抗体药物偶联物，制备该药物偶联物的连接子和中间体，以及该药物偶联物的用途。

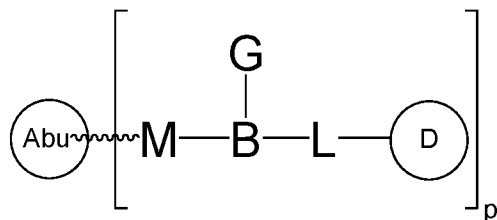
背景技术

靶向治疗癌症、免疫缺陷和感染性疾病等是目前精准医疗关注的核心。多年来许多文献报道了利用细胞表面受体结合分子作为药物输送工具与细胞毒素分子形成偶联物(共轭体),进行靶向输送细胞毒素分子进攻各类致病细胞(Allen, T.M. and Cullis, P.R., 2004 Science, 303(5665), 1818-22, Hu, Q.Y., et al.(2016), Chem Soc Rev 45(6):1691-1719.)。

抗体药物偶联物由三部分组成: 抗体, 细胞毒素分子和连接二者之间的连接体(Thomas, A., et al. (2016), Lancet Oncol 17(6):e254-e262)。三者之间各具有独特的功能: 抗体需要对肿瘤细胞特异性结合, 细胞毒素分子需要对肿瘤细胞足够的活性和广谱性, 连接体需要独特的功能性, 在血液循环中稳定, 到达肿瘤细胞后有效释放细胞毒素分子 (Chari, R.V. (2008), Acc Chem Res 41(1):98-107), 三者合理构建才能取得良好的临床效果(Singh, S.K., et al. (2015), Pharm Res 32(11): 3541-3571; Hamilton, G.S. (2015), Biologicals 43(5):318-332)。

发明内容

本发明的一个或多个实施方式提供了药物偶联物, 其具有式 I 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物:

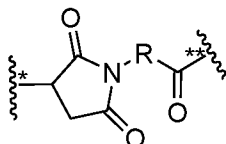


式 I

其中

Abu 为多肽, 如抗体或其抗原结合单元;

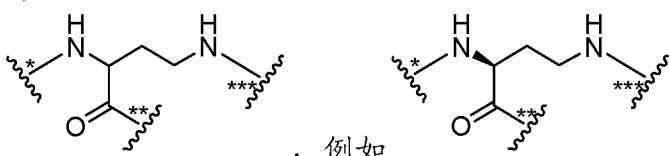
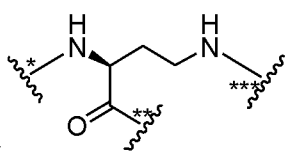
D 为药物, 如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物;



M 为

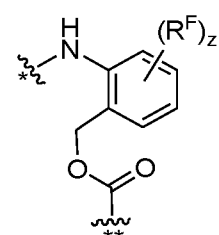
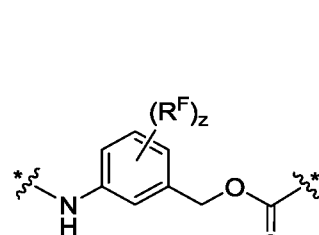
, 其中*连接 Abu, **连接 B, R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基-、-亚芳基- $(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8$ 碳环基)- $(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8$ 杂环基)- $(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为

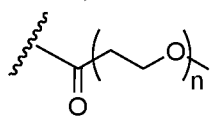
H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基；并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

B 为 ，例如 ；其中*连接 M，**连接 L，***连接 G；

L 为 $-(AA)_i-(FF)_f-$ ，其中，AA 为氨基酸或多肽，i 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、

11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20；各 FF 独立为

或 ，其中各 R^F 独立为 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、 $-NO_2$ 或卤素；z 为 0、1、2、3 或 4；f 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；其中*连接 AA，**连接 D；

G 为 ，其中 n 为 1-24 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24；

p 为 1-10，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一个或多个实施方式中，D 为抗癌药物。

在一个或多个实施方式中，D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中，所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、美登素(maytansine)类。

在一个或多个实施方式中，D 为奥瑞他汀(auristatin)类，例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 损伤剂，例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

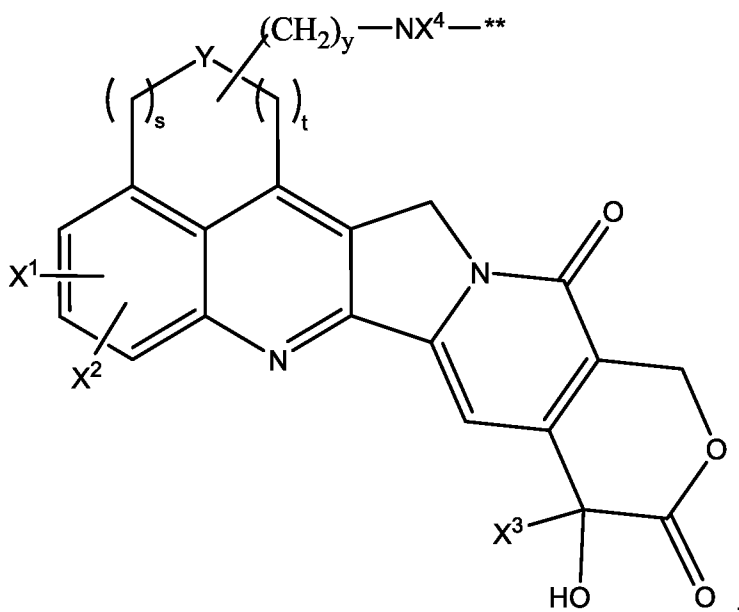
在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐，例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、依喜替康衍生物，硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡嗪-

5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中，所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康，或其盐。

在一个或多个实施方式中，D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycin 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤，长春新碱，长春碱，柔红霉素，丝裂霉素 C，马法兰或苯丁酸氮芥衍生物。

在一个或多个实施方式中，D 具有氨基或被一个烷基取代氨基，其与 FF 通过酰胺键连接。



在一个或多个实施方式中，D 为其中

X¹ 和 X² 各自独立地为：

H，

羟基，

C1-C6 烷基，

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基，

C2-C6 烯基，

C2-C6 炔基，

C1-C6 烷氧基，

C1-C6 氨基烷氧基，

卤素，

硝基，

氰基，

巯基，

烷硫基，

氨基，被氨基保护基取代的氨基，在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基，

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基，

连接至杂环的 C1-C6 烷基, 所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代,

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基, 所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代, 所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代,

氨基取代的杂环基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代,

杂环氨基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代, 任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基,

吗啉-1-基, 或

哌啶-1-基;

X^3 为 C1-C6 烷基;

X^4 为 H、 $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CHR^n)_q-CH_3$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_q-CH_3$ 、亚芳基- CH_3 、 $-(CH_2)_q$ -亚芳基- CH_3 、-亚芳基- $(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 碳环基)- CH_3 、-(C3-C8 碳环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 杂环基)- CH_3 、-(C3-C8 杂环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 或 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$; 其中各 R^n 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 q 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

**与 L 连接;

y 为 0、1 或 2;

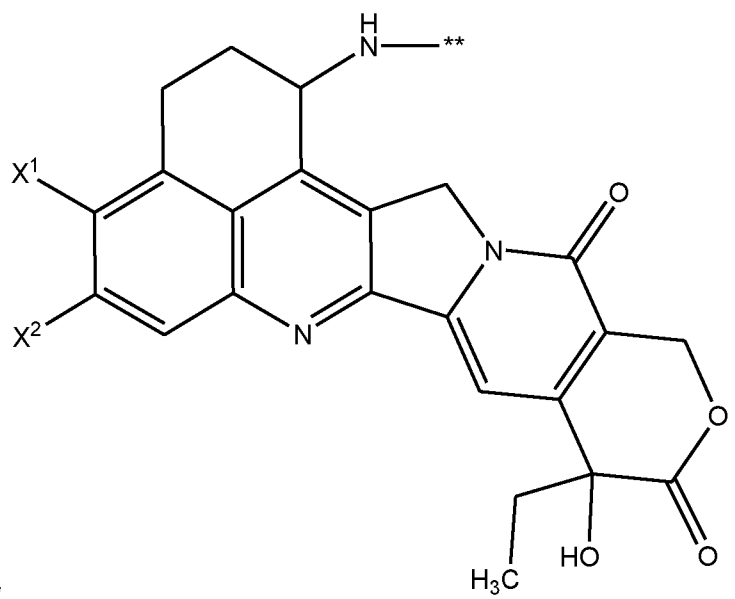
Y 为 O、S 或 CR^1R^2 , 其中 R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或 C1-C6 烷基;

s 和 t 各自独立为 0、1 或 2, 但不同时为 0。

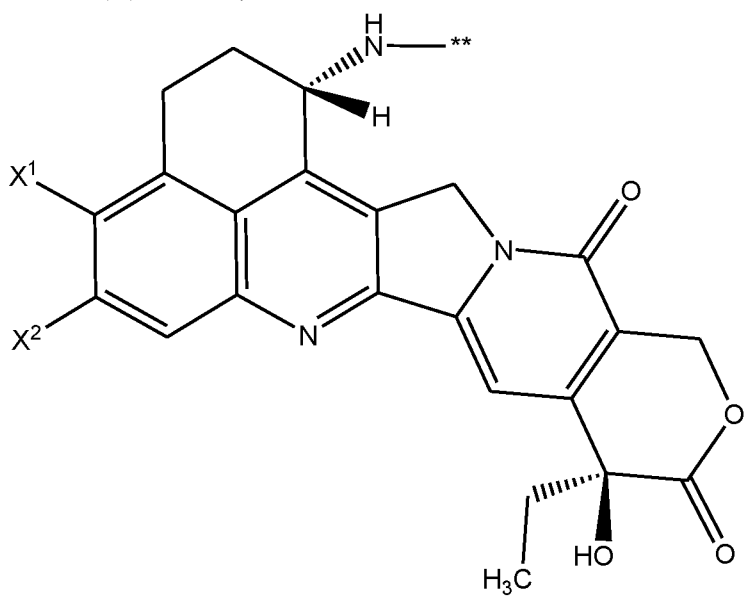
在一个或多个实施方式中, X^4 为 H 或 C1-C6 烷基。

在一个或多个实施方式中, 所述杂环为氮杂环丁烷、乙醛嗪 (niverazine)、吗啉、吡咯烷、哌啶、咪唑、噻唑、噁唑或吡啶。

在一个或多个实施方式中, 所述氨基保护基为甲酰基、乙酰基、三苯甲基、叔丁氧基羰基、苄基或对甲氧基苄氧基羰基。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; **与 L 连接。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; **与 L 连接。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 $-CH_3$ 。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F 或 Cl。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 $-CH_3$ 、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 $-CH_3$ 。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 $-CH_3$ 及 X^2 为 F。

在一个或多个实施方式中, R 为 $-(CH_2)_r$ 。

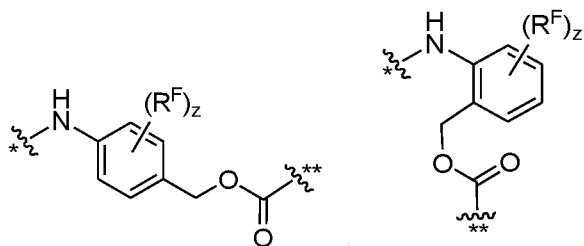
在一个或多个实施方式中, R 为 $-(CH_2)_r$, r 为 1 或 5。

在一个或多个实施方式中, 各 AA 独立选自以下的氨基酸或肽序列: Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-Phe-Lys、

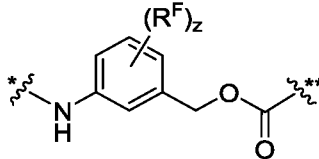
D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu 和 Gly-Phe-Leu-Gly。

在一个或多个实施方式中，i 为 1。

在一个或多个实施方式中，AA 为 Val-Cit，i 为 1。



在一个或多个实施方式中，各 FF 独立为

，其中*连接 AA，**连接 D，其中各 R^F 独立为 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、 $-\text{NO}_2$ 或卤素。

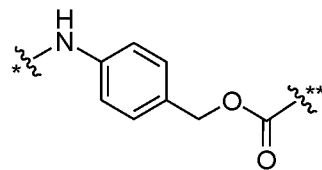
在一个或多个实施方式中，卤素为 F。

在一个或多个实施方式中，各 R^F 独立为 $-\text{CH}_3$ 、F、 $-\text{NO}_2$ 或 $-\text{OCH}_3$ 。

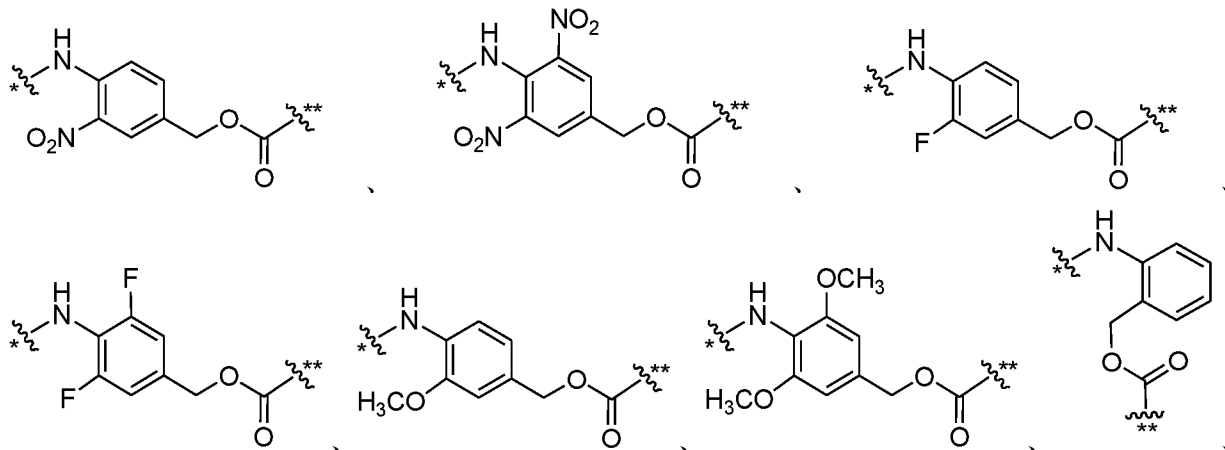
在一个或多个实施方式中，z 为 0。

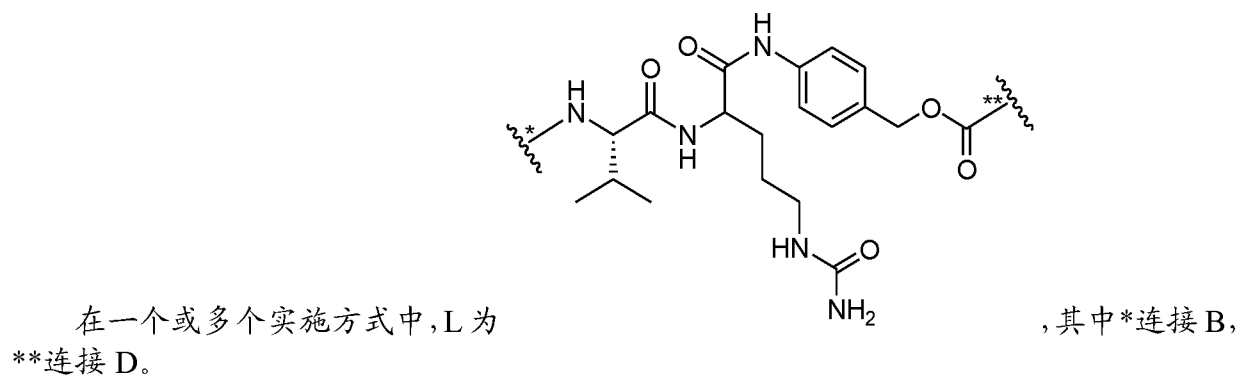
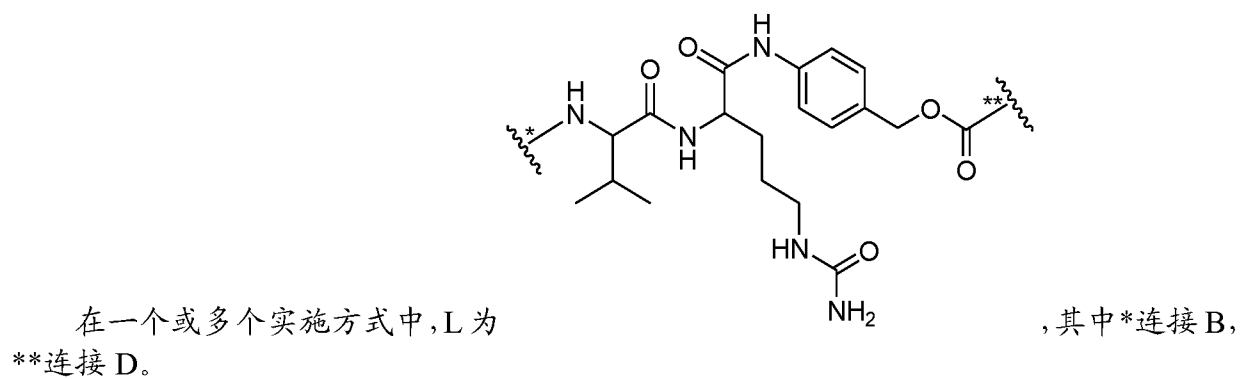
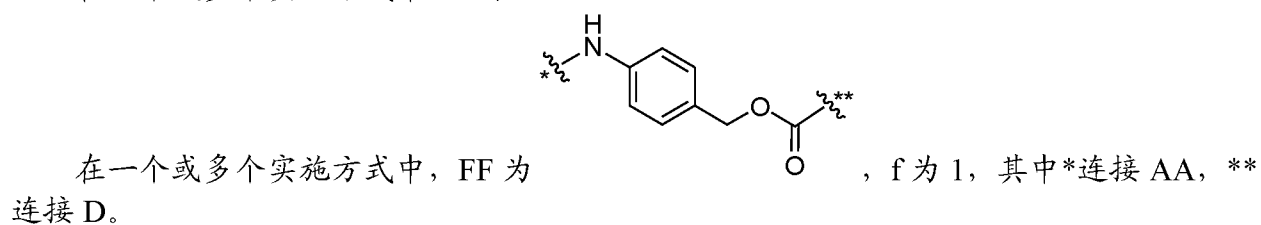
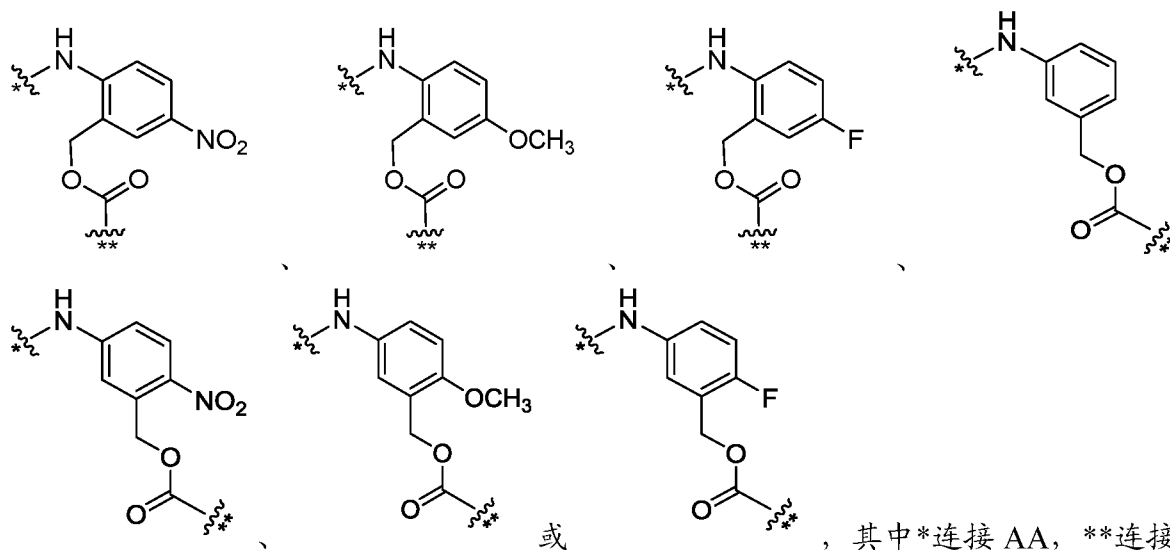
在一个或多个实施方式中，z 为 1 或 2。

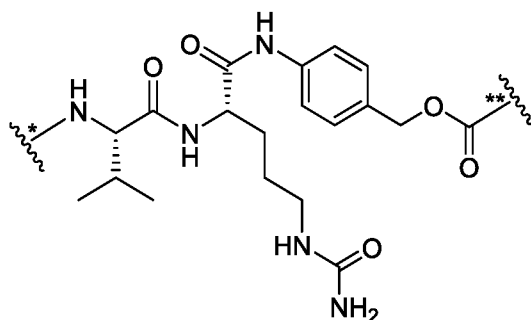
在一个或多个实施方式中，f 为 1。

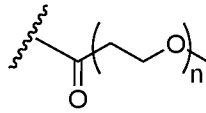


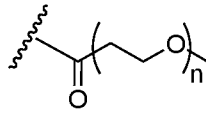
在一个或多个实施方式中，各 FF 独立为







在一个或多个实施方式中, L 为 , 其中*连接 B, **连接 D。

在一个或多个实施方式中, G 为 , n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

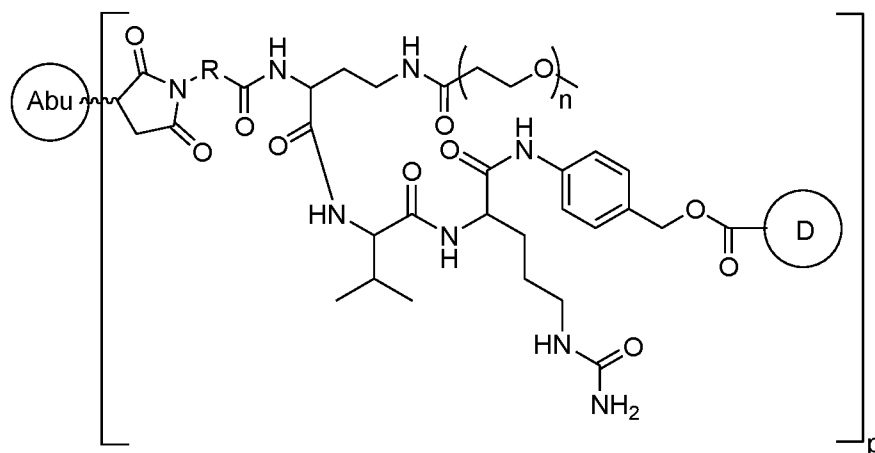
在一个或多个实施方式中, p 为 2-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 4-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 6-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 7-8。

在一个或多个实施方式中, 所述式 I 为:



式 I-1

其中

Abu 为多肽, 如抗体或其抗原结合单元;

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8 碳环基)-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8 杂环基)-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

D 为药物, 如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎药物或治疗传染性疾病的药物;

n 为 1-24 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24;

p 为 1-10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一个或多个实施方式中, D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中, 所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类及美登素(maytansine)类。

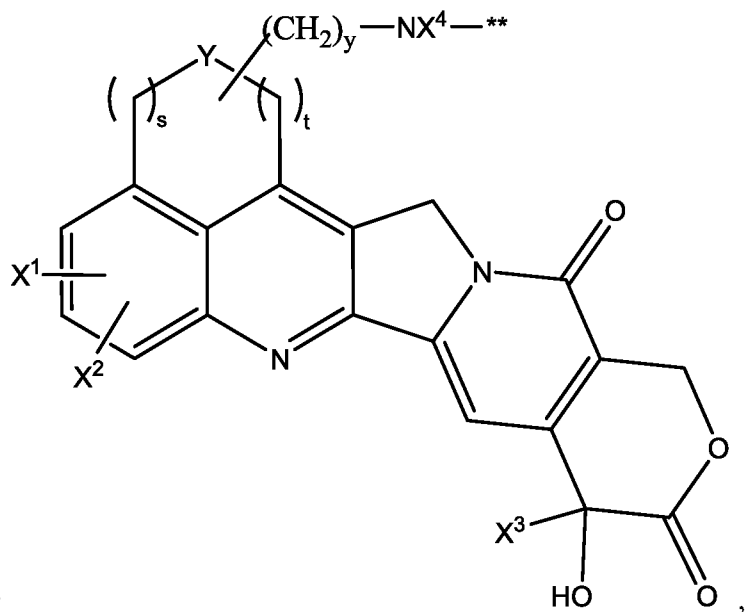
在一个或多个实施方式中, D 为奥瑞他汀(auristatin)类, 例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中, D 为 DNA 损伤剂, 例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

在一个或多个实施方式中, D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐, 例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]呋唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中, 所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康, 或其盐。

在一个或多个实施方式中, D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycine 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤, 长春新碱, 长春碱, 柔红霉素, 丝裂霉素 C, 马法兰, 或苯丁酸氮芥衍生物。



在一个或多个实施方式中, D 为其中

X¹ 和 X² 各自独立地为:

H,

羟基,

C1-C6 烷基,

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基,

C2-C6 烯基,

C2-C6 炔基,

C1-C6 烷氧基,

C1-C6 氨基烷氧基,

卤素,

硝基,

氰基,

巯基,

烷硫基,

氨基, 被氨基保护基取代的氨基, 在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷氧基,

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基,

连接至杂环的 C1-C6 烷基, 所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代,

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基, 所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代, 所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代,

氨基取代的杂环基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代,

杂环氨基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代,

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基,

吗啉-1-基, 或

哌啶-1-基;

X³ 为 C1-C6 烷基;

X⁴ 为 H、-(CH₂)_q-CH₃、-(CHRⁿ)_q-CH₃、C3-C8 碳环基、-O-(CH₂)_q-CH₃、亚芳基-CH₃、-(CH₂)_q-亚芳基-CH₃、-亚芳基-(CH₂)_q-CH₃、-(CH₂)_q-(C3-C8 碳环基)-CH₃、-(C3-C8 碳环基)-(CH₂)_q-CH₃、C3-C8 杂环基、-(CH₂)_q-(C3-C8 杂环基)-CH₃、-(C3-C8 杂环基)-(CH₂)_q-CH₃、-(CH₂)_qC(O)NRⁿ(CH₂)_q-CH₃、-(CH₂CH₂O)_q-CH₃、-(CH₂CH₂O)_q-CH₂-CH₃、-(CH₂)_qC(O)NRⁿ(CH₂CH₂O)_q-CH₃、-(CH₂)_qC(O)NRⁿ(CH₂CH₂O)_q-CH₂-CH₃、-(CH₂CH₂O)_qC(O)NRⁿ(CH₂CH₂O)_q-CH₃、-(CH₂CH₂O)_qC(O)NRⁿ(CH₂CH₂O)_q-CH₂-CH₃、或-(CH₂CH₂O)_qC(O)NRⁿ(CH₂)_q-CH₃; 其中各 Rⁿ 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 q 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

**为连接点;

y 为 0、1 或 2;

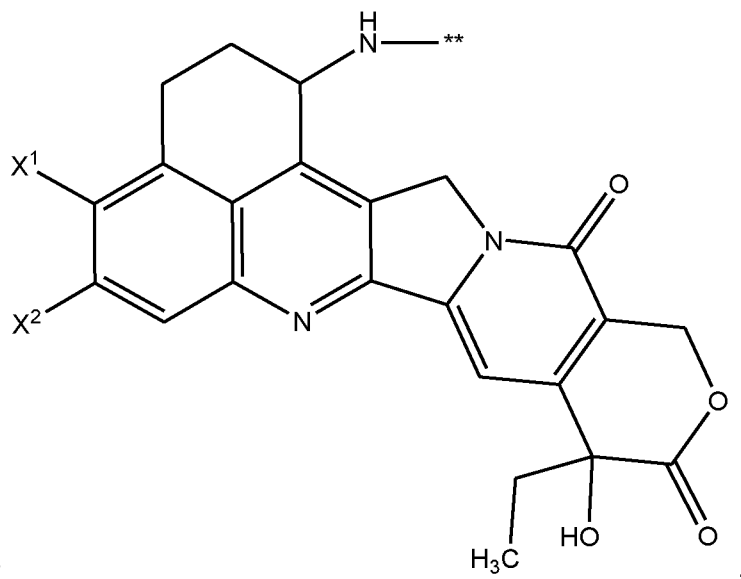
Y 为 O、S 或 CR¹R², 其中 R¹ 和 R² 各自独立地为 H 或 C1-C6 烷基;

s 和 t 各自独立为 0、1 或 2, 但不同时为 0。

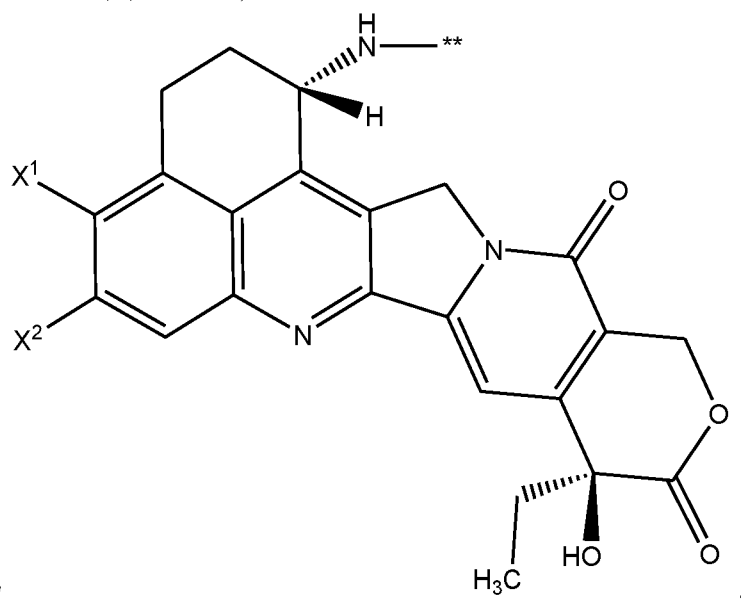
在一个或多个实施方式中, X⁴ 为 H 或 C1-C6 烷基。

在一个或多个实施方式中, 所述杂环为氮杂环丁烷、乙醛嗪、吗啉、吡咯烷、哌啶、咪唑、噻唑、噁唑或吡啶。

在一个或多个实施方式中, 所述氨基保护基为甲酰基、乙酰基、三苯甲基、叔丁氧基羰基、苄基或对甲氧基苄氧基羰基。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; **为连接点。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; **为连接点。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 -CH₃、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 -CH₃ 及 X^2 为 F。

在一个或多个实施方式中, R 为 -(CH₂)_r。

在一个或多个实施方式中, R 为 -(CH₂)_r, r 为 1 或 5。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

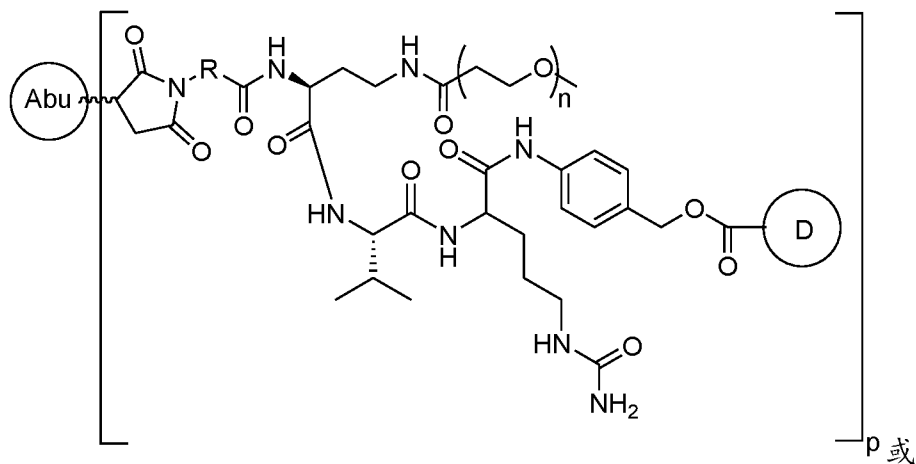
在一个或多个实施方式中, p 为 2-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 4-8。

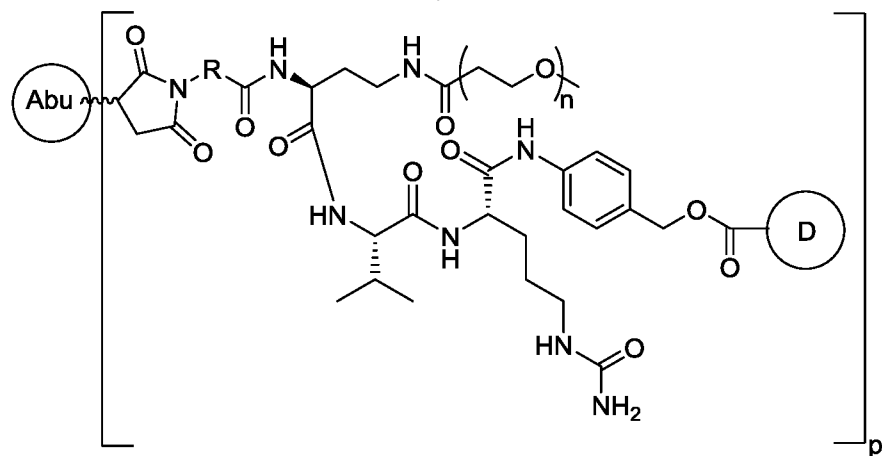
在一个或多个实施方式中, p 为 6-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 7-8。

在一个或多个实施方式中, 所述式 I 为:



式 I-2



式 I-2-1

其中

Abu 为多肽, 如抗体或其抗原结合单元;

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8 碳环基)-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8 杂环基)-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

D 为药物, 如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎药物或治疗传染性疾病的药物;

n 为 1-24 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24;

p 为 1-10, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一个或多个实施方式中, D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中, 所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、及美登素(maytansine)类。

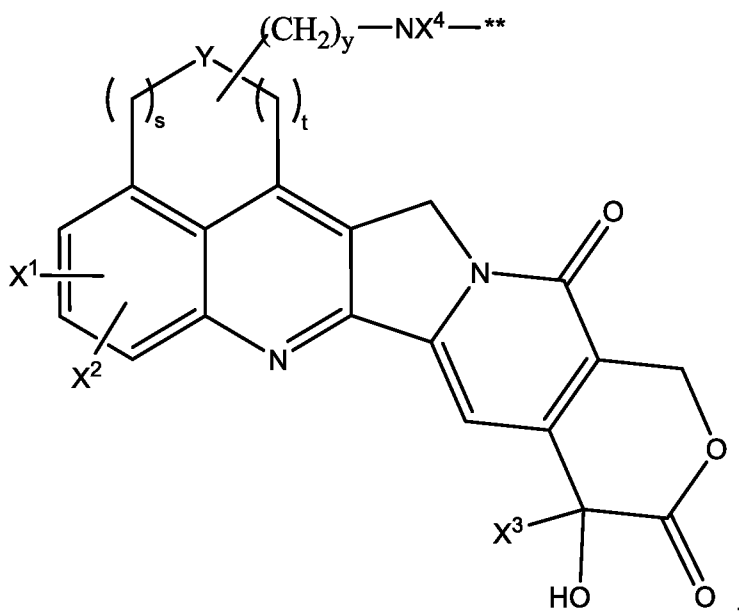
在一个或多个实施方式中, D 为奥瑞他汀(auristatin)类, 例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中, D 为 DNA 损伤剂, 例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

在一个或多个实施方式中, D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐, 例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]呋唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中, 所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康, 或其盐。

在一个或多个实施方式中, D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycine 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤, 长春新碱, 长春碱, 柔红霉素, 丝裂霉素 C, 马法兰, 或苯丁酸氮芥衍生物。



在一个或多个实施方式中, D 为其中

X^1 和 X^2 各自独立地为:

H,

羟基,

C1-C6 烷基,

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基,

C2-C6 烯基,

C2-C6 炔基,

C1-C6 烷氧基,

C1-C6 氨基烷氧基,

卤素,

硝基,

氰基,

巯基,

烷巯基,

氨基, 被氨基保护基取代的氨基, 在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基,

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基,

连接至杂环的 C1-C6 烷基, 所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代,

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基, 所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代, 所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代,

氨基取代的杂环基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代,

杂环氨基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代,

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基,

吗啉-1-基, 或

哌啶-1-基;

X^3 为 C1-C6 烷基;

X^4 为 H、 $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CHR^n)_q-CH_3$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_q-CH_3$ 、亚芳基- CH_3 、 $-(CH_2)_q$ -亚芳基- CH_3 、-亚芳基- $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 碳环基)- CH_3 、 $-(C3-C8$ 碳环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 杂环基)- CH_3 、 $-(C3-C8$ 杂环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、或 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$; 其中各 R^n 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 q 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

**为连接点;

y 为 0、1 或 2;

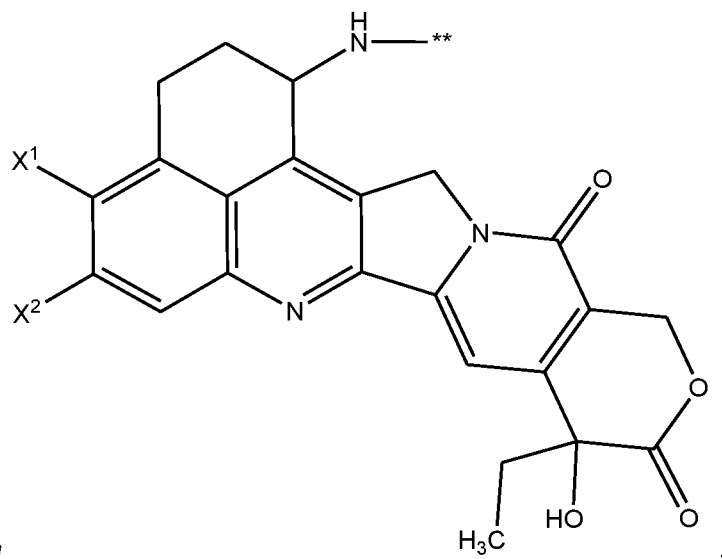
Y 为 O、S 或 CR^1R^2 , 其中 R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或 C1-C6 烷基;

s 和 t 各自独立为 0、1 或 2, 但不同时为 0。

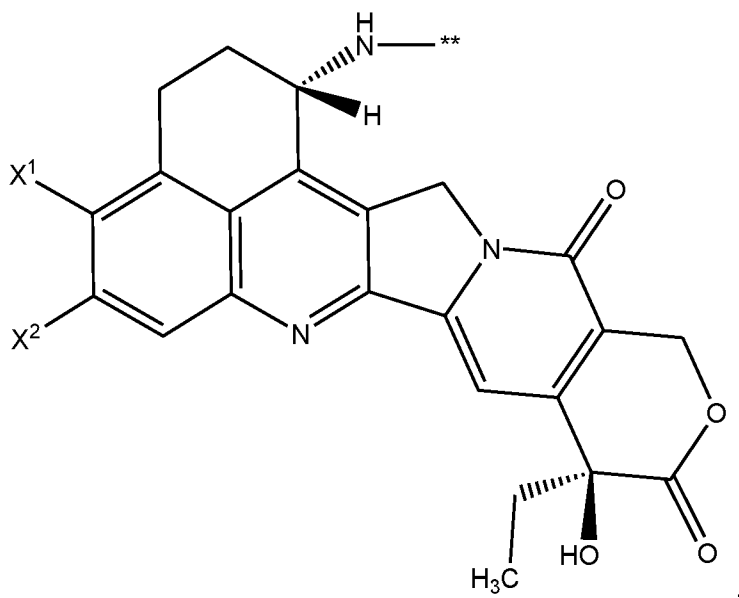
在一个或多个实施方式中, X^4 为 H 或 C1-C6 烷基。

在一个或多个实施方式中, 所述杂环为氮杂环丁烷、乙醛嗪、吗啉、吡咯烷、哌啶、咪唑、噻唑、噁唑或吡啶。

在一个或多个实施方式中, 所述氨基保护基为甲酰基、乙酰基、三苯甲基、叔丁氧基羰基、苄基或对甲氧基苄氧基羰基。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 为连接点。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 为连接点。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 -CH₃、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 -CH₃ 及 X^2 为 F。

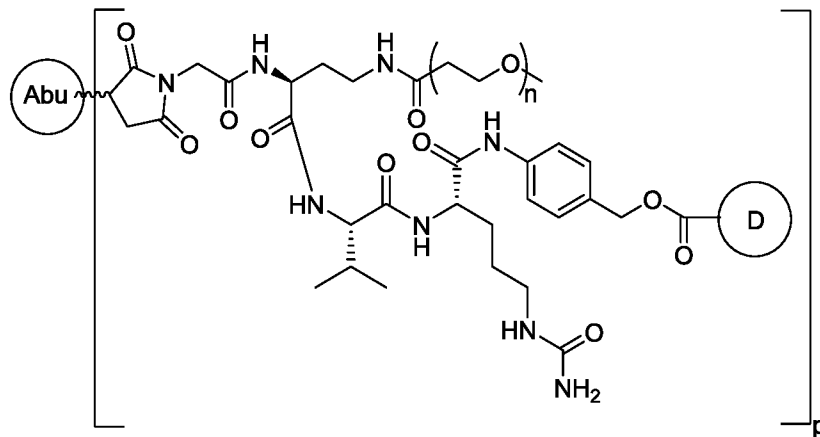
在一个或多个实施方式中, R 为 -(CH₂)_r。

在一个或多个实施方式中, R 为 -(CH₂)_r, r 为 1 或 5。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

在一个或多个实施方式中, n 为 4。



式 I-4-1

其中

Abu 为多肽，如抗体或其抗原结合单元；

D 为药物，如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎药物或治疗传染性疾病的药物；

n 为 1-24 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24；

p 为 1-10，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一个或多个实施方式中，D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中，所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、及美登素(maytansine)类。

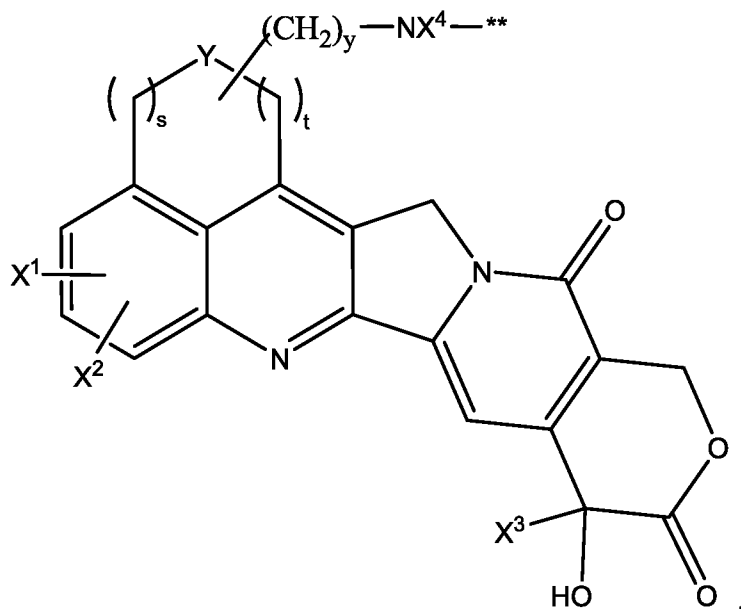
在一个或多个实施方式中，D 为奥瑞他汀(auristatin)类，例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 损伤剂，例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)、DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐，例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氟基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氟基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡咯并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]呋唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中，所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康，或其盐。

在一个或多个实施方式中，D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycine 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤，长春新碱，长春碱，柔红霉素，丝裂霉素 C，马法兰，或苯丁酸氮芥衍生物。



在一个或多个实施方式中，D 为其中

X¹ 和 X² 各自独立地为：

H，

羟基，

C1-C6 烷基，

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基，

C2-C6 烯基，

C2-C6 炔基，

C1-C6 烷氧基，

C1-C6 氨基烷氧基，

卤素，

硝基，

氰基，

巯基，

烷硫基，

氨基，被氨基保护基取代的氨基，在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基，

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基，

连接至杂环的 C1-C6 烷基，所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代，

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基，所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代，所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代，

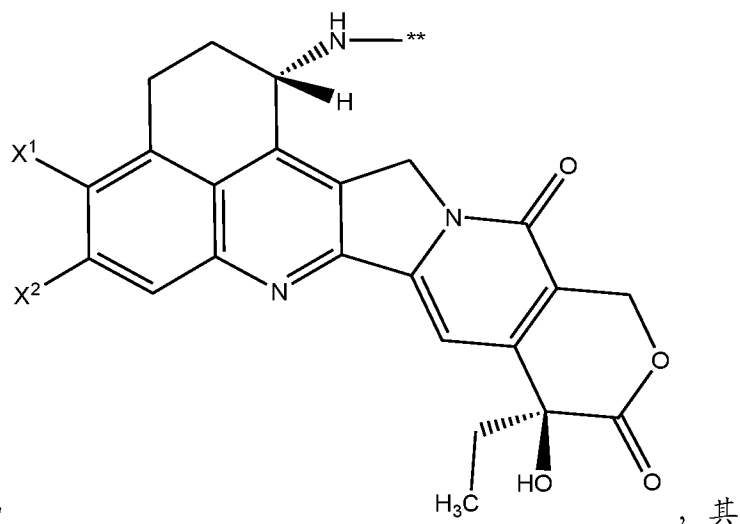
氨基取代的杂环基，其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代，

杂环氨基，其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代，

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基，

吗啉-1-基，或

哌啶-1-基；



在一个或多个实施方式中, D 为
中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; **为连接点。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 -CH₃、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 -CH₃ 及 X^2 为 F。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

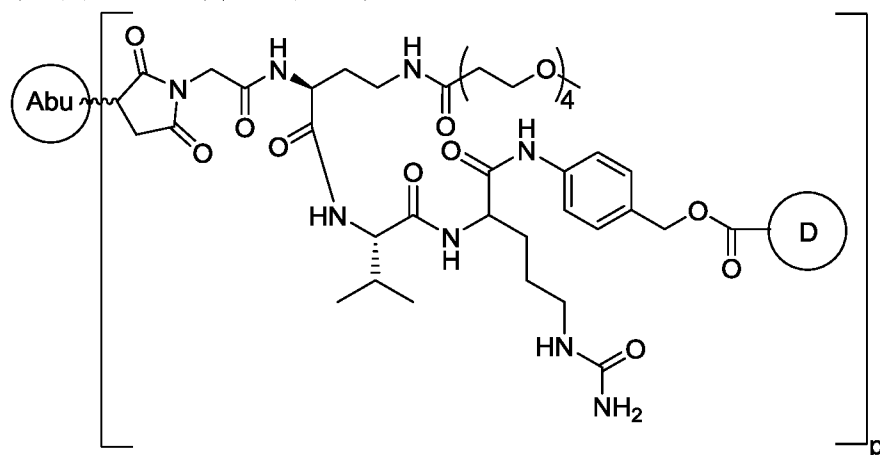
在一个或多个实施方式中, p 为 2-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 4-8。

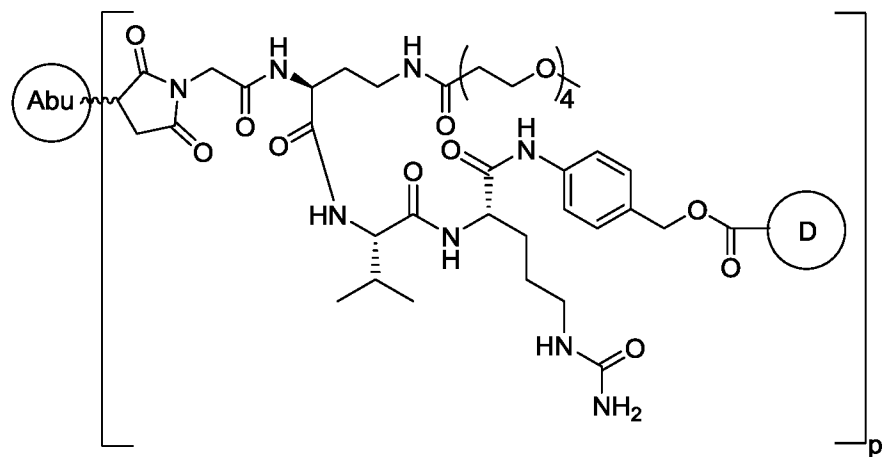
在一个或多个实施方式中, p 为 6-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 7-8。

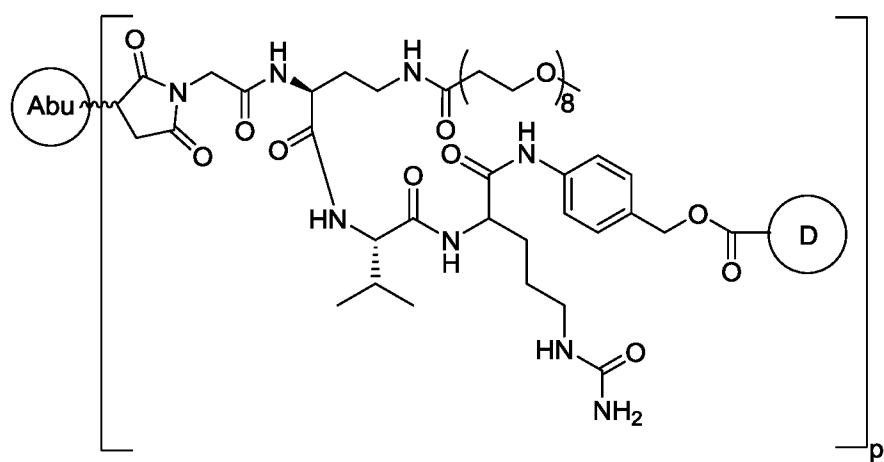
在一个或多个实施方式中, 所述式 I 为:



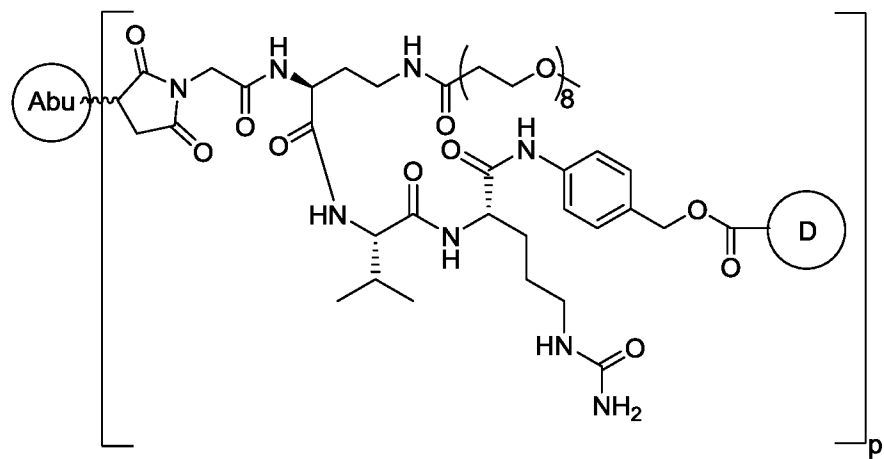
式 I-5



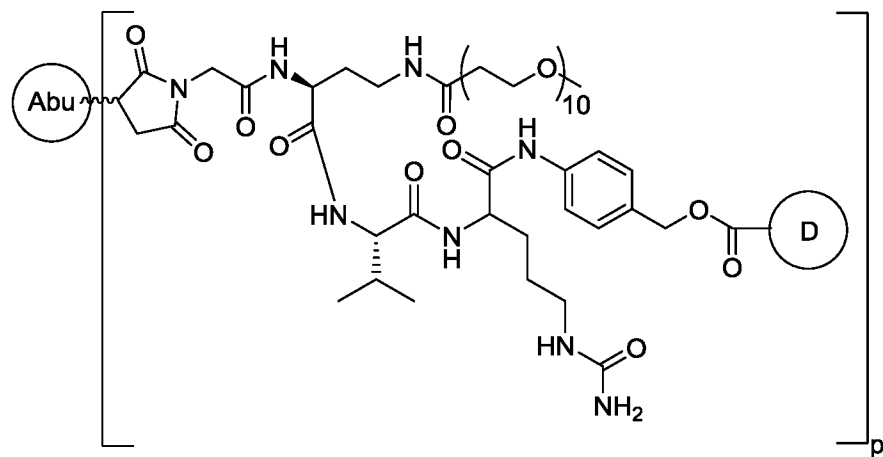
式 I-5-1



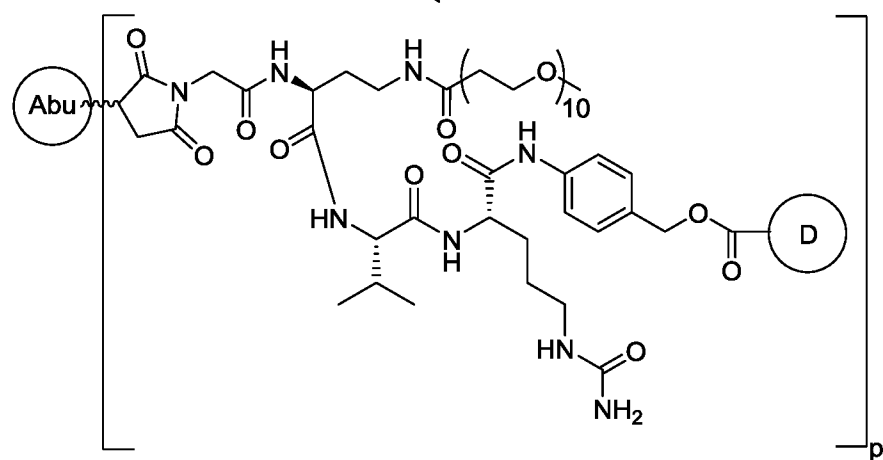
式 I-6



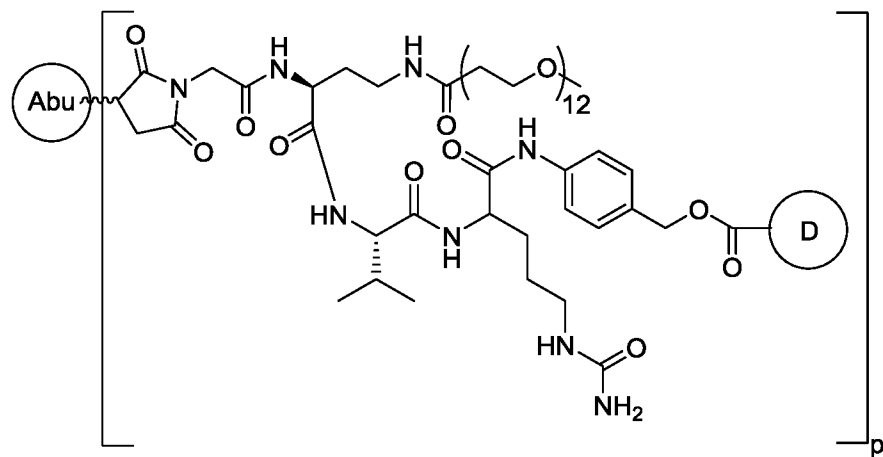
式 I-6-1



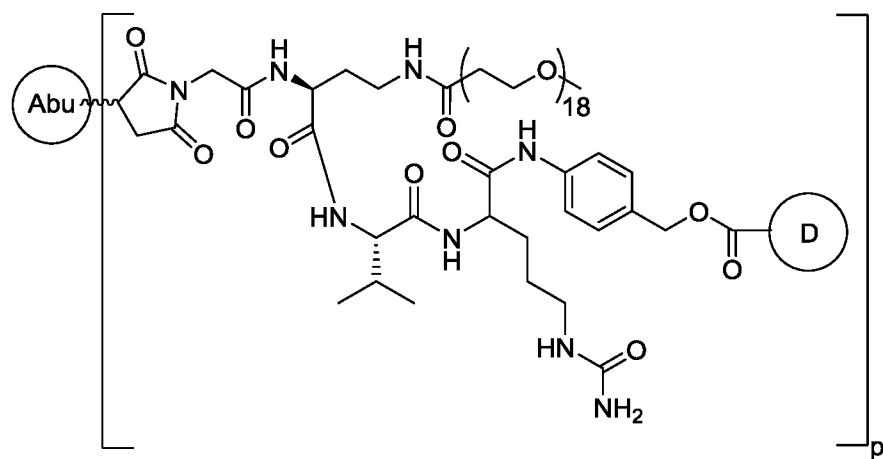
式 I-7



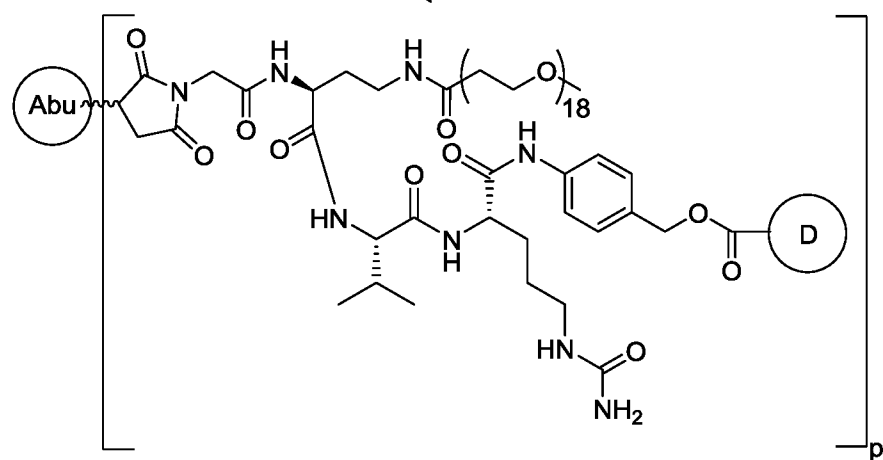
式 I-7-1



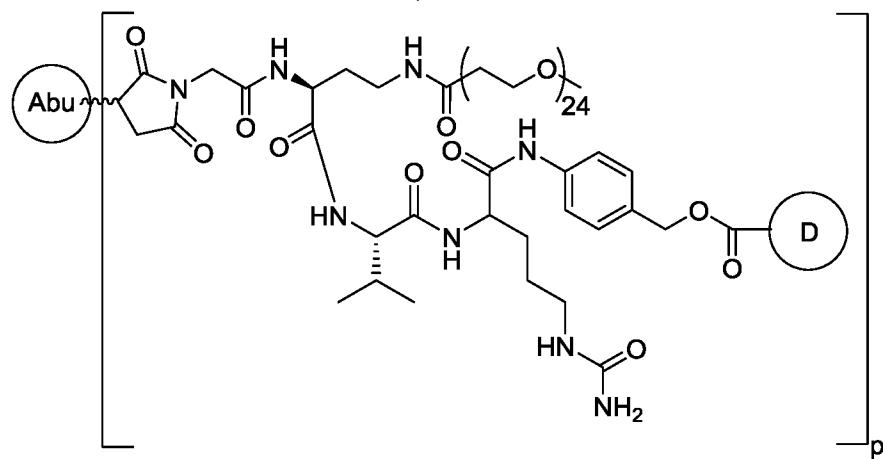
式 I-8



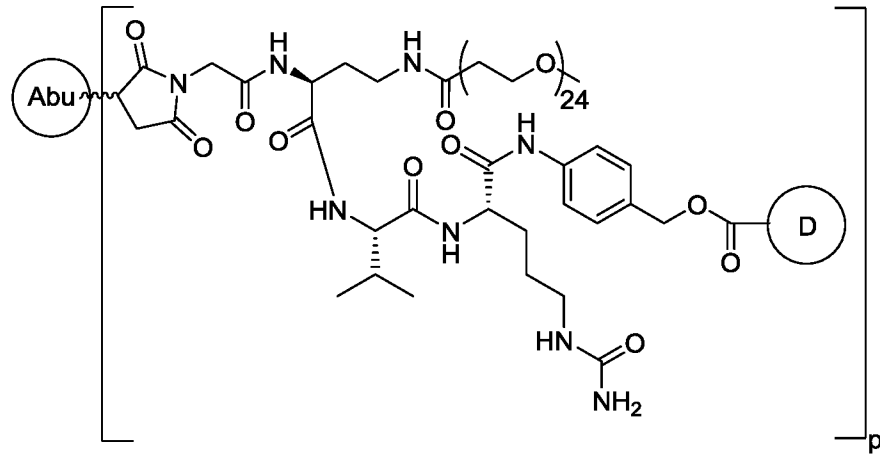
式 I-10



式 I-10-1



式 I-11



式 I-11-1

其中

Abu 为多肽，如抗体或其抗原结合单元；

D 为药物，如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物；

p 为 1-10，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一个或多个实施方式中，D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中，所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、及美登素(maytansine)类。

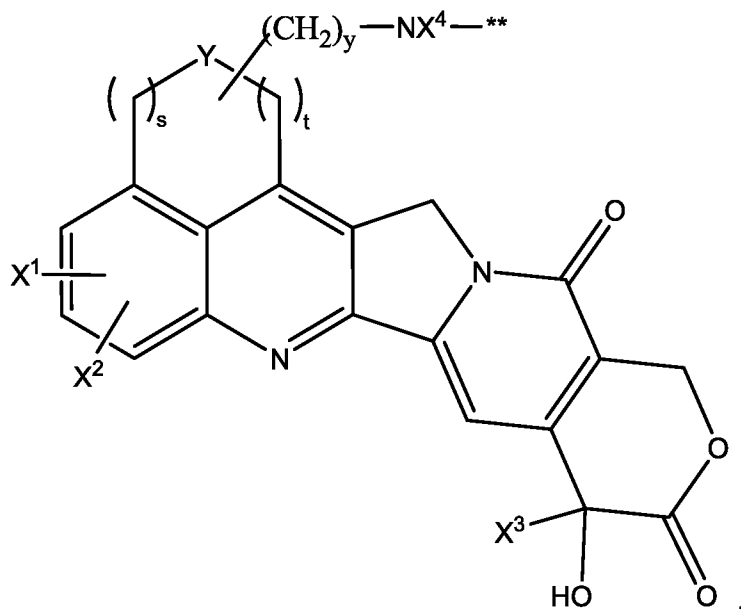
在一个或多个实施方式中，D 为奥瑞他汀(auristatin)类，例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 损伤剂，例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐，例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡咯并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中，所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康，或其盐。

在一个或多个实施方式中，D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycin 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤，长春新碱，长春碱，柔红霉素，丝裂霉素 C，马法兰，或苯丁酸氮芥衍生物。



在一个或多个实施方式中，D 为其中

X¹ 和 X² 各自独立地为：

H，

羟基，

C1-C6 烷基，

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基，

C2-C6 烯基，

C2-C6 炔基，

C1-C6 烷氧基，

C1-C6 氨基烷氧基，

卤素，

硝基，

氰基，

巯基，

烷硫基，

氨基，被氨基保护基取代的氨基，在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基，

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基，

连接至杂环的 C1-C6 烷基，所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代，

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基，所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代，所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代，

氨基取代的杂环基，其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代，

杂环氨基，其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代，

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基，

吗啉-1-基，或

哌啶-1-基；

X^3 为 C1-C6 烷基;

X^4 为 H、 $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CHR^n)_q-CH_3$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_q-CH_3$ 、亚芳基- CH_3 、 $-(CH_2)_q$ -亚芳基- CH_3 、-亚芳基- $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 碳环基)- CH_3 、-(C3-C8 碳环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 杂环基)- CH_3 、-(C3-C8 杂环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、或 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$; 其中各 R^n 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 q 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

**为连接点;

y 为 0、1 或 2;

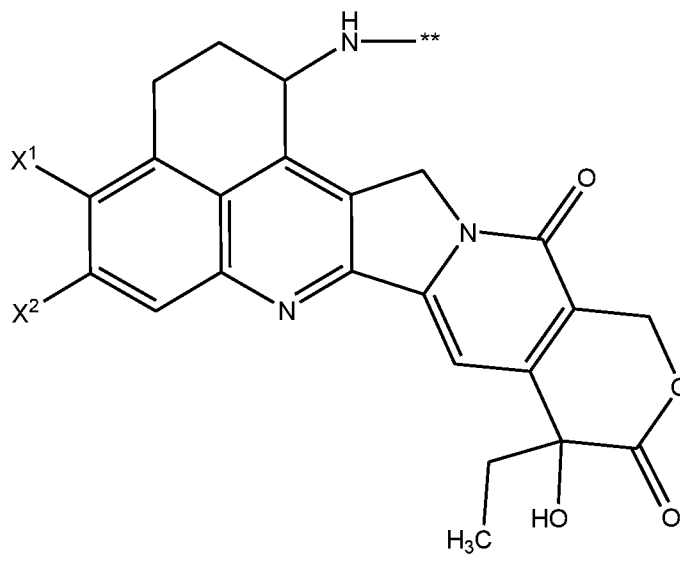
Y 为 O、S 或 CR^1R^2 , 其中 R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或 C1-C6 烷基;

s 和 t 各自独立为 0、1 或 2, 但不同时为 0。

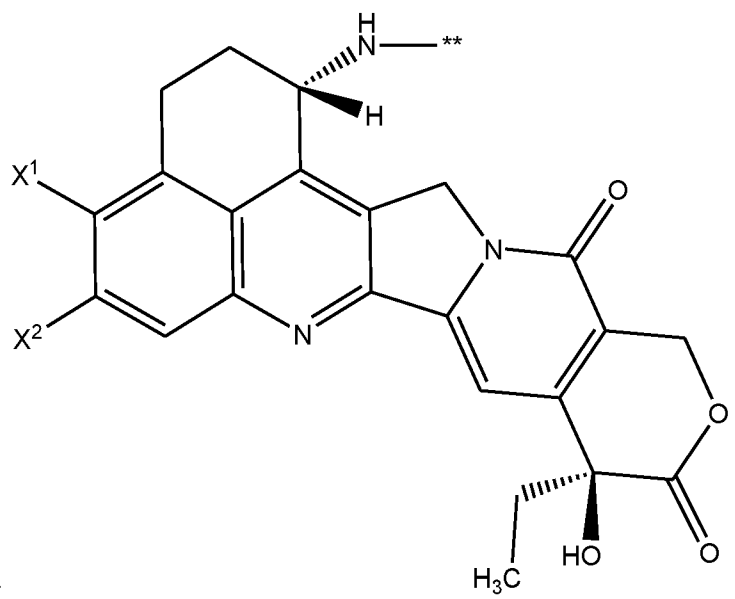
在一个或多个实施方式中, X^4 为 H 或 C1-C6 烷基。

在一个或多个实施方式中, 所述杂环为氮杂环丁烷、乙醛嗪、吗啉、吡咯烷、哌啶、咪唑、噻唑、噁唑或吡啶。

在一个或多个实施方式中, 所述氨基保护基为甲酰基、乙酰基、三苯甲基、叔丁氧基羰基、苄基或对甲氧基苄氧基羰基。



在一个或多个实施方式中, D 为
中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或-OH; **为连接点。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 为连接点。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 -CH₃、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 -CH₃ 及 X^2 为 F。

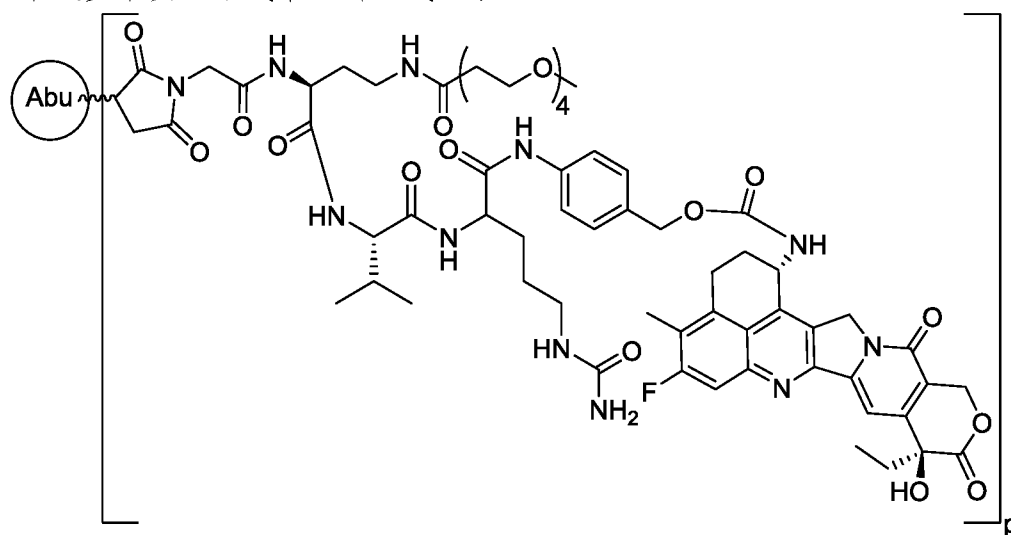
在一个或多个实施方式中, p 为 2-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 4-8。

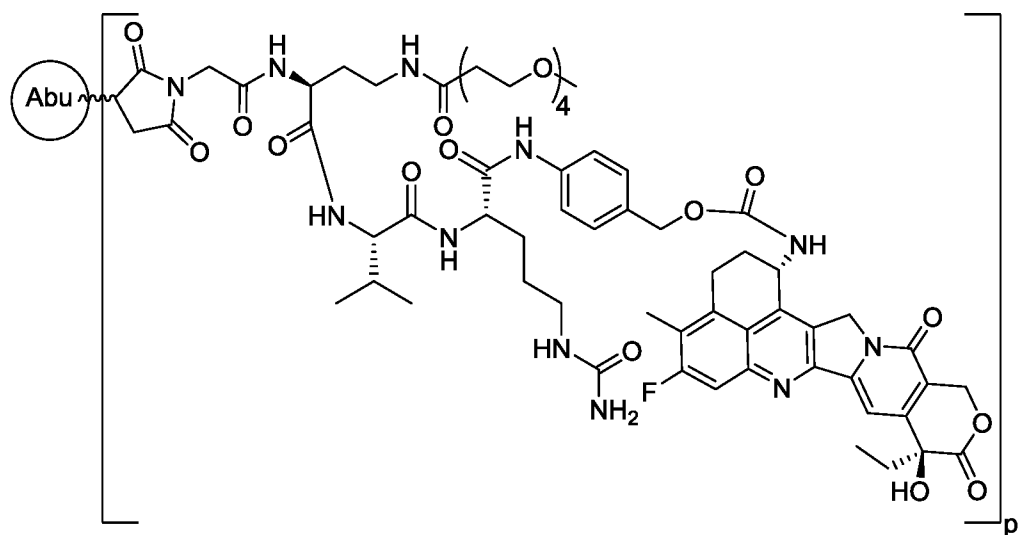
在一个或多个实施方式中, p 为 6-8。

在一个或多个实施方式中, p 为 7-8。

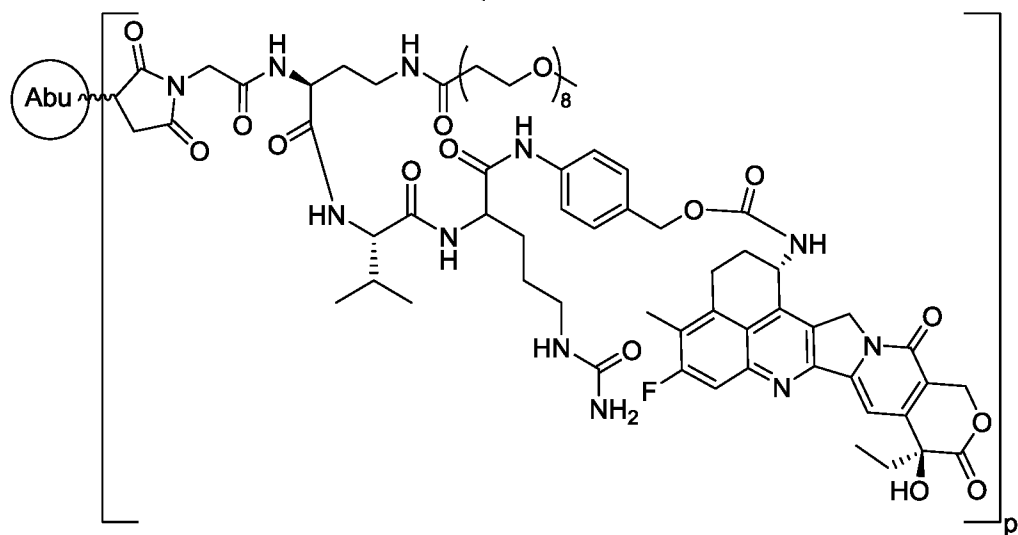
在一个或多个实施方式中, 所述式 I 为:



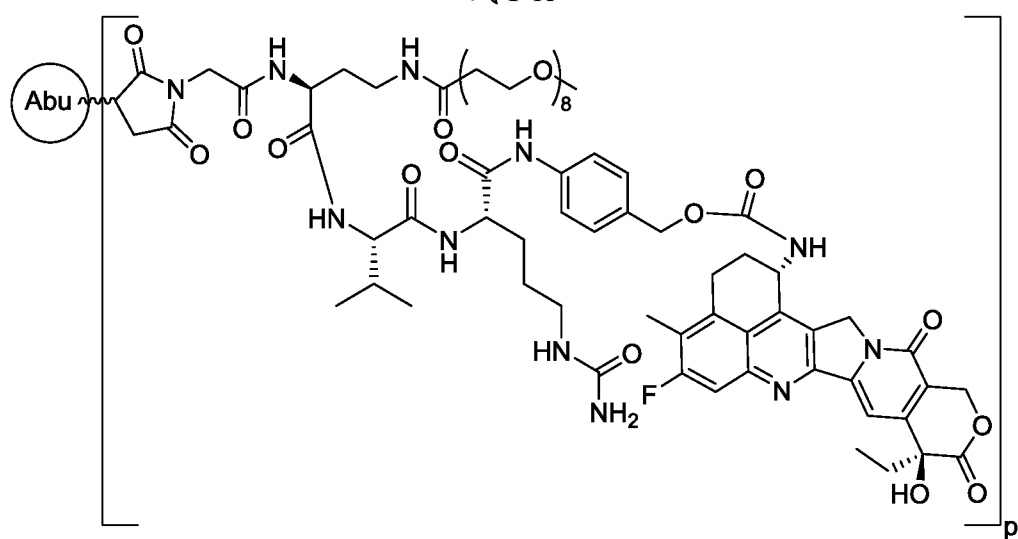
式 I-12



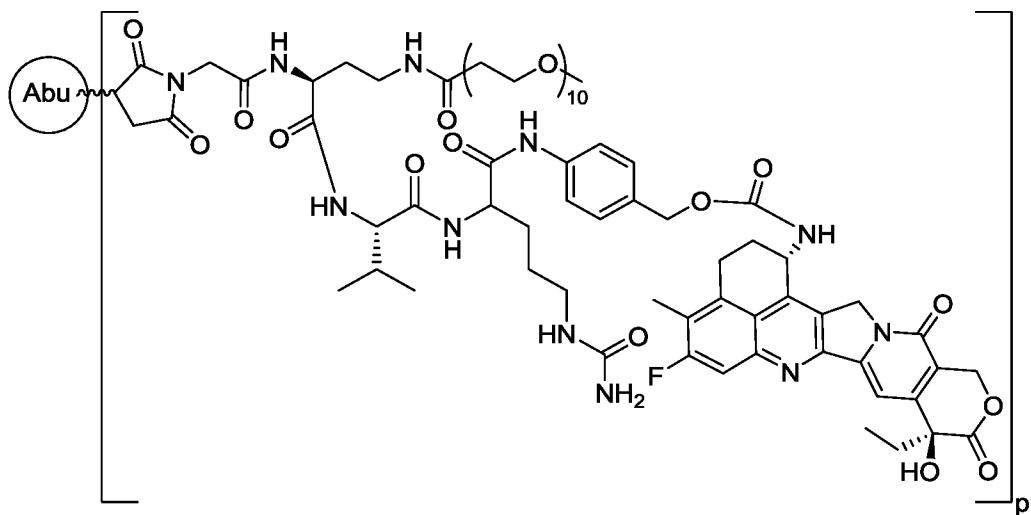
式 I-12-1



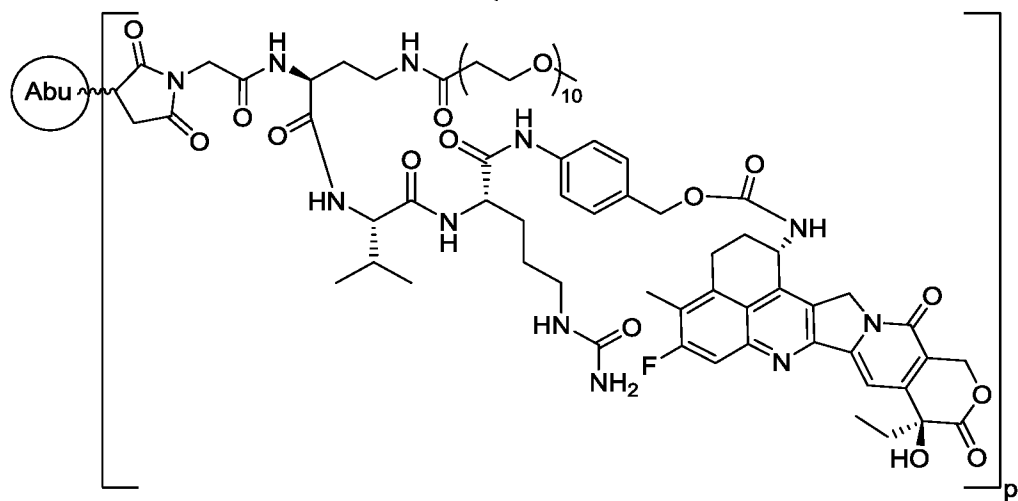
式 I-13



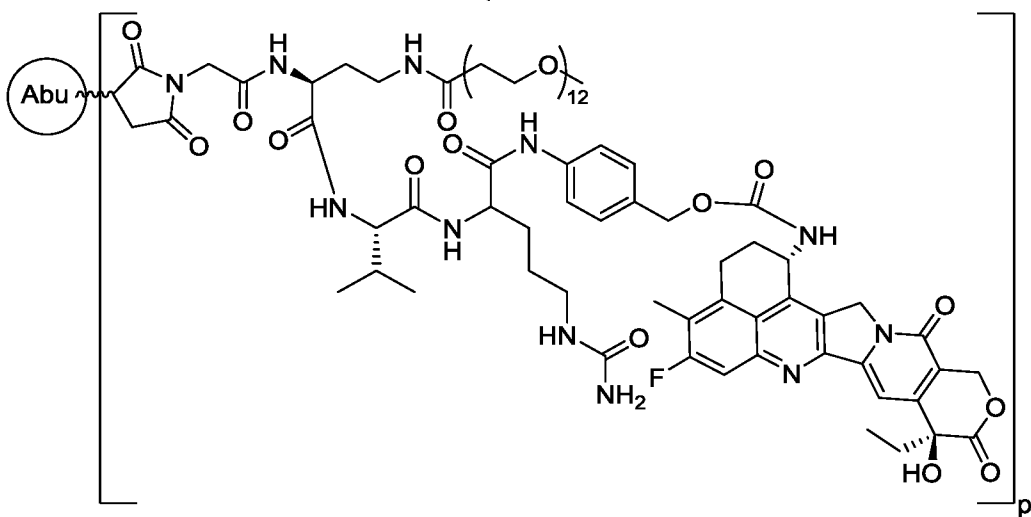
式 I-13-1



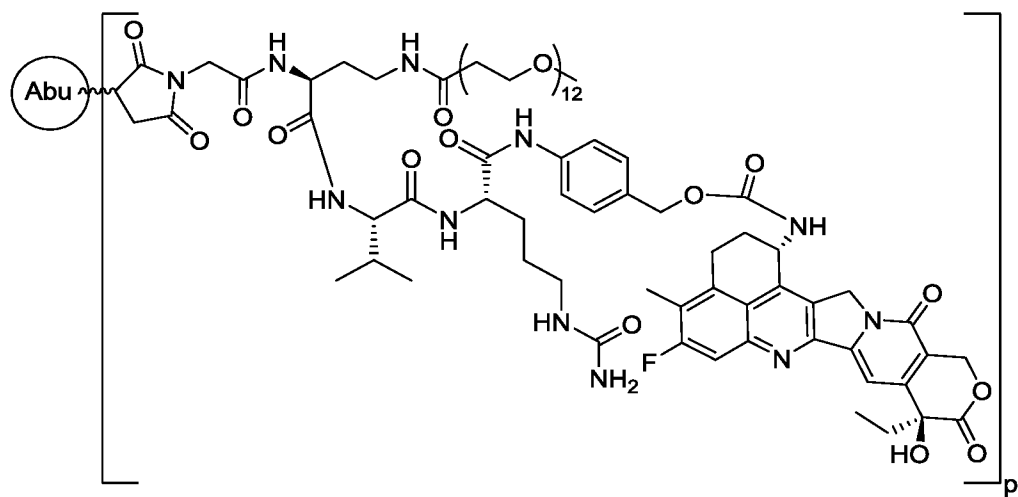
式 I-14



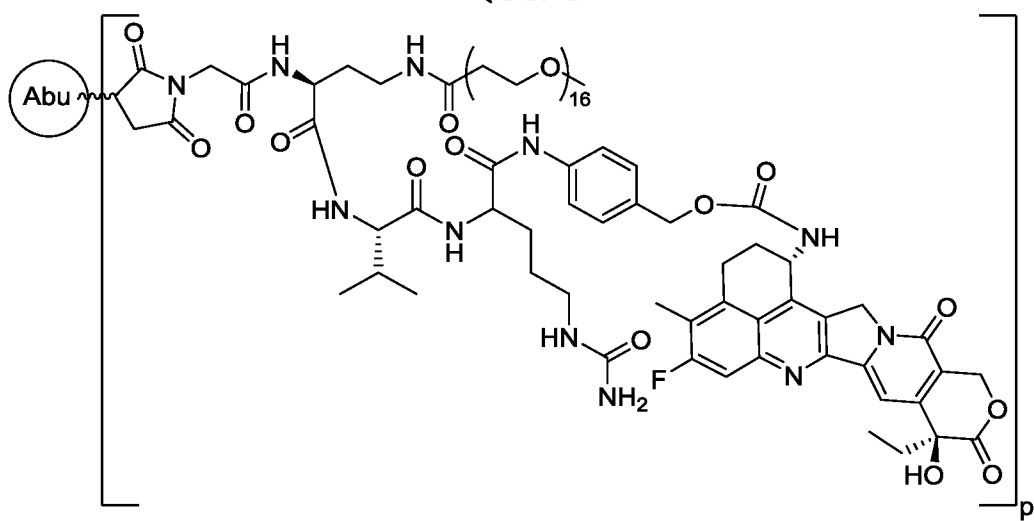
式 I-14-1



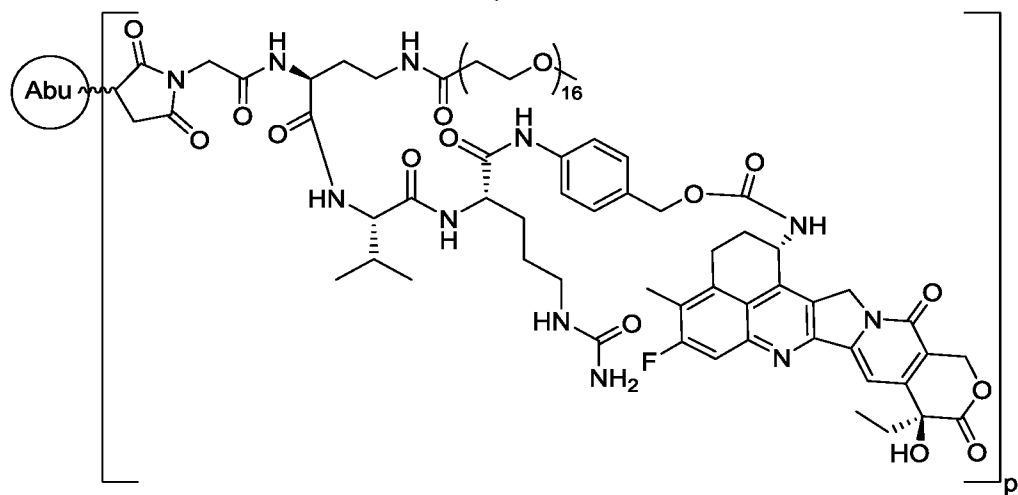
式 I-15



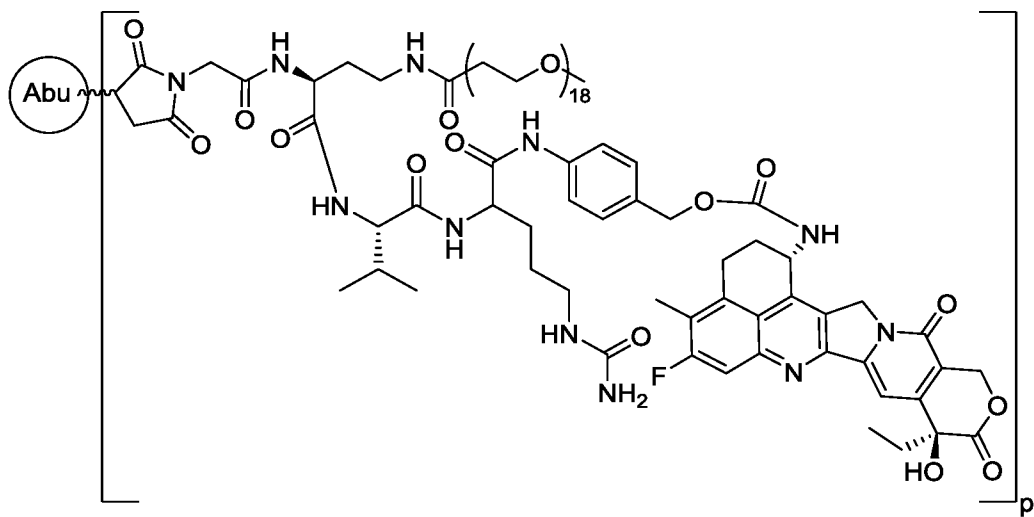
式 I-15-1



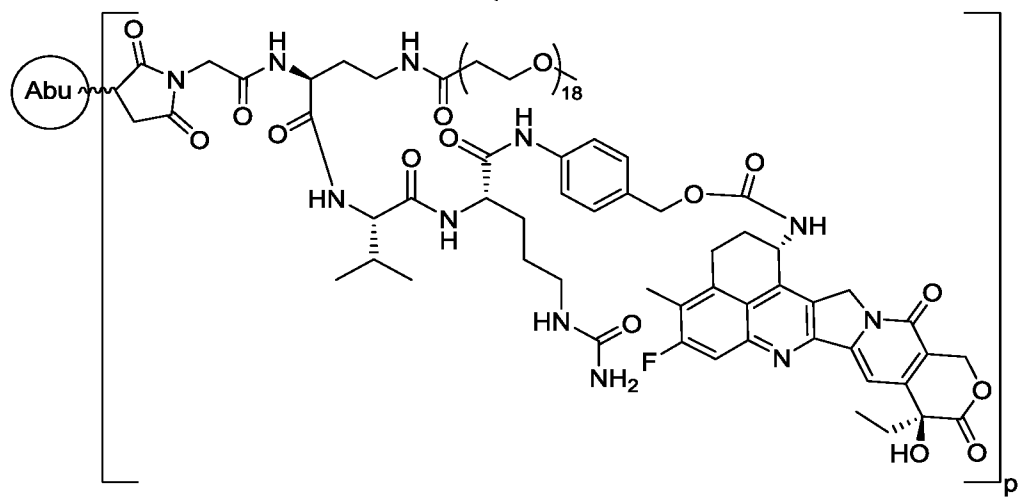
式 I-16



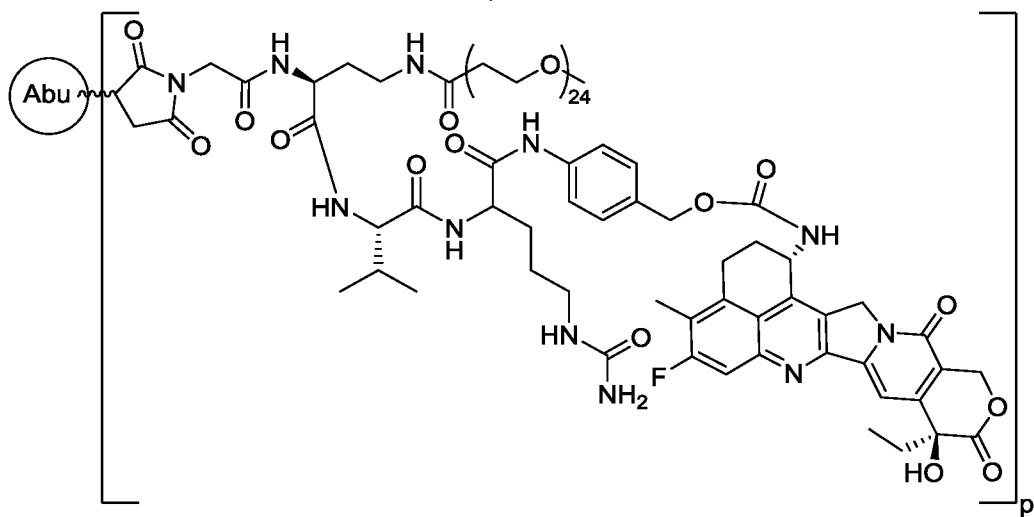
式 I-16-1



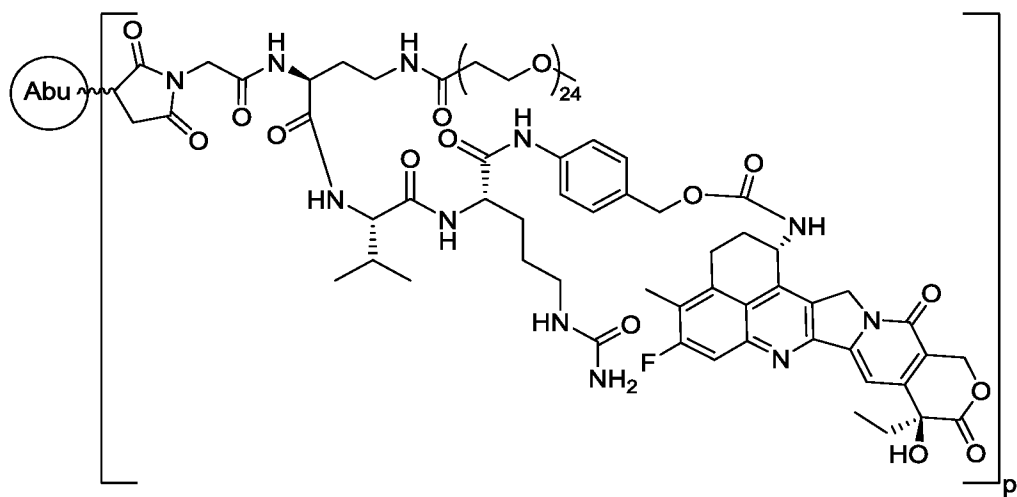
式 I-17



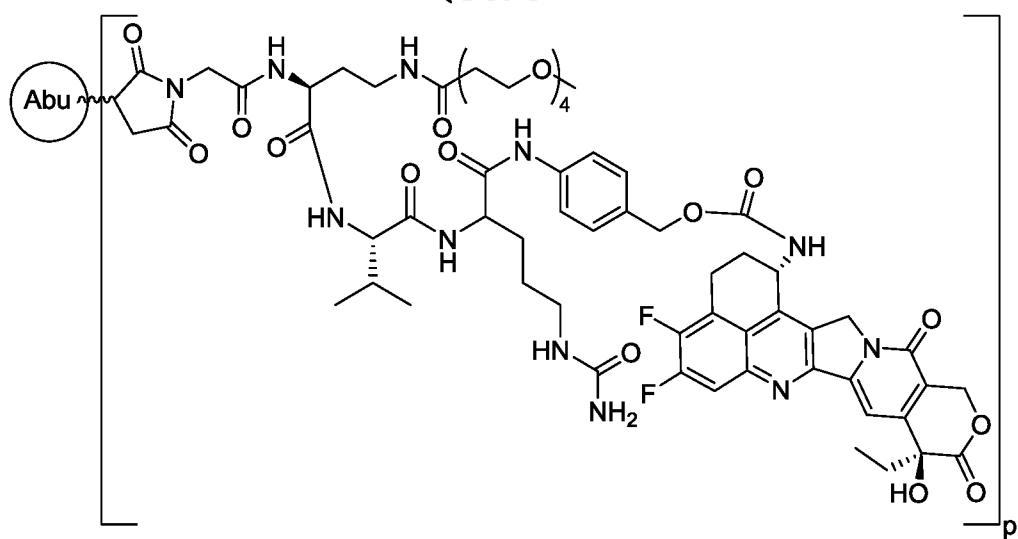
式 I-17-1



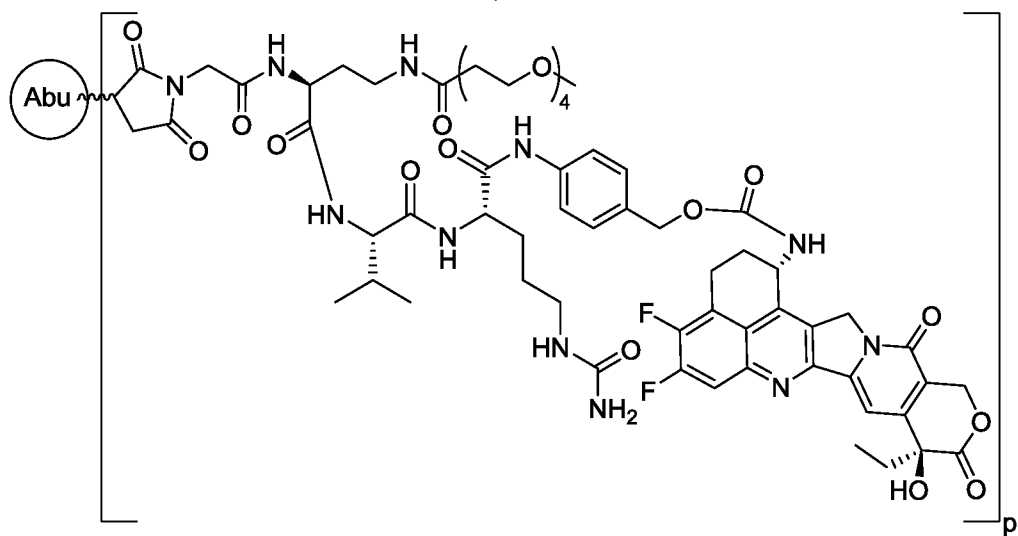
式 I-18



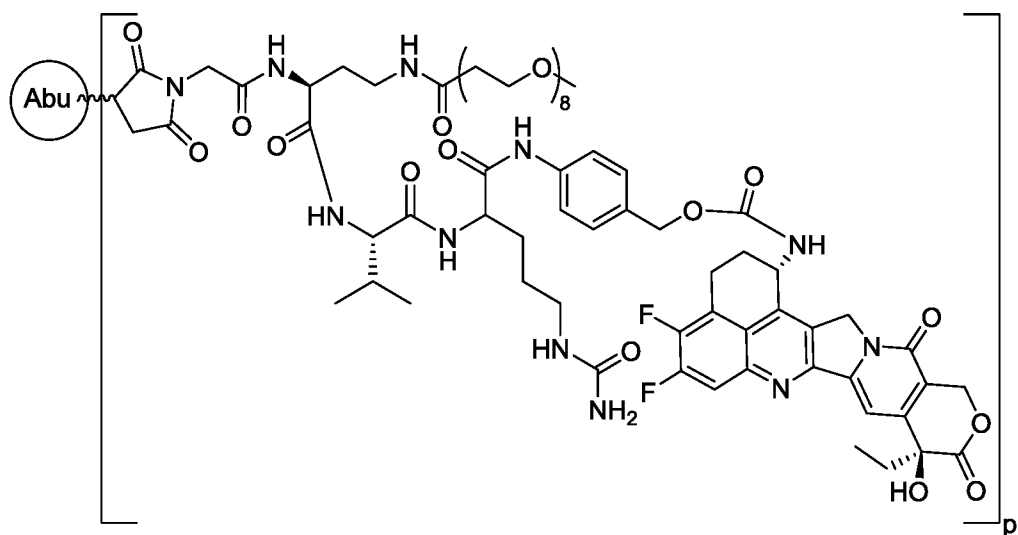
式 I-18-1



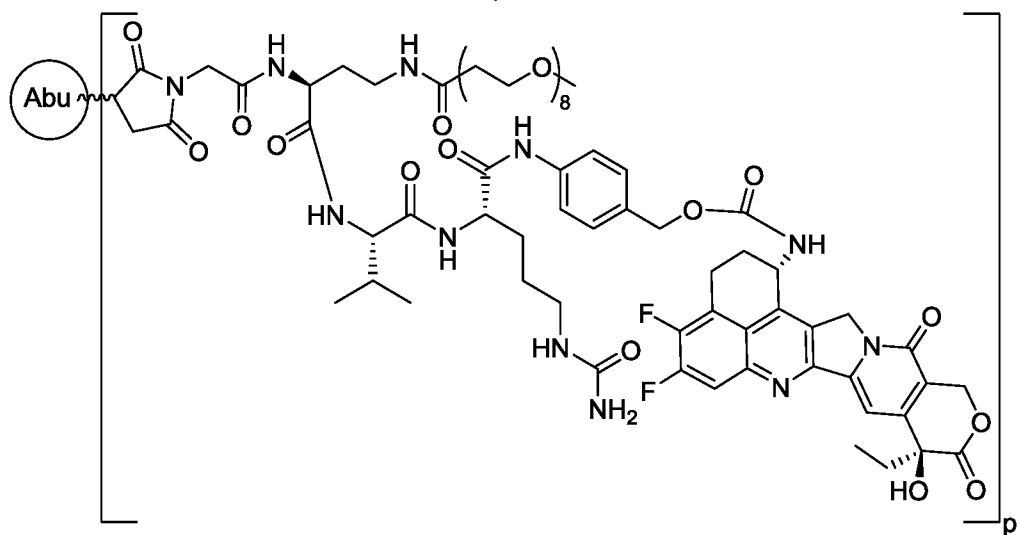
式 I-19



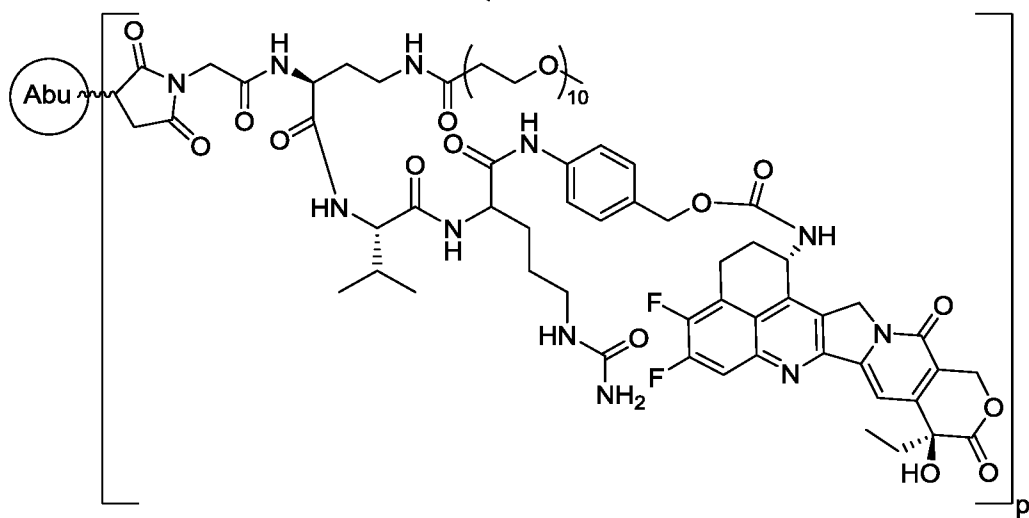
式 I-19-1



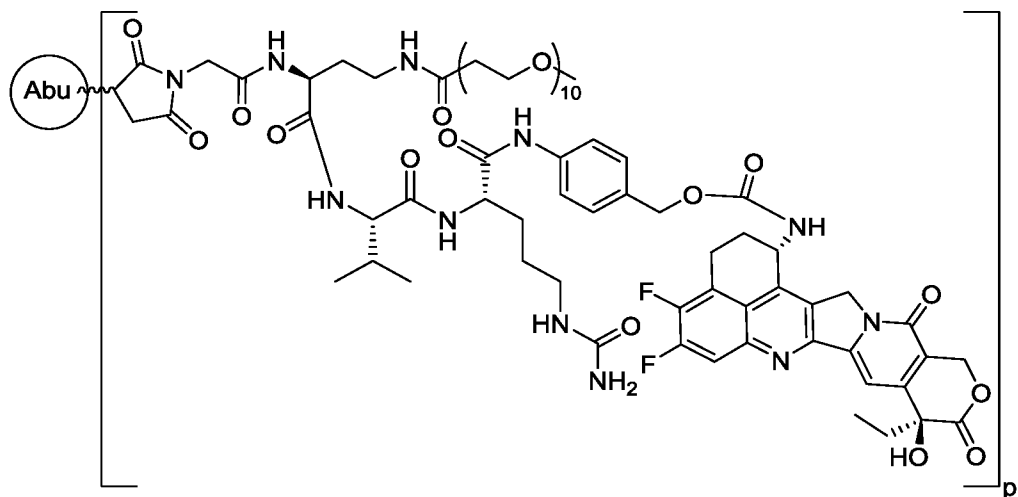
式 I-20



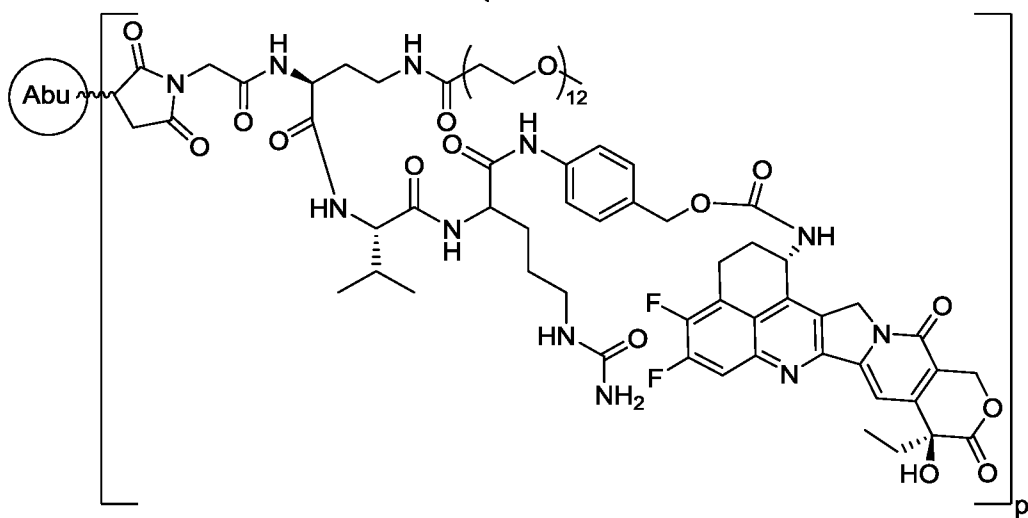
式 I-20-1



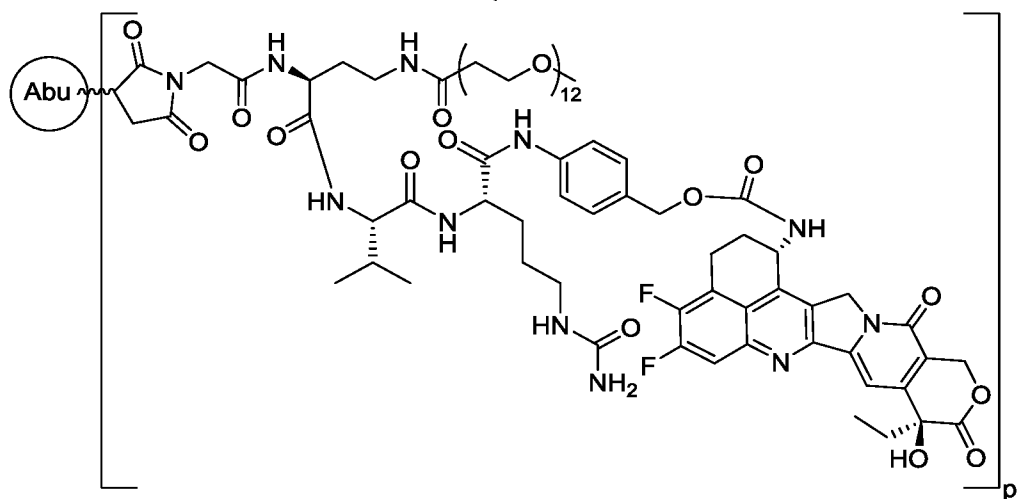
式 I-21



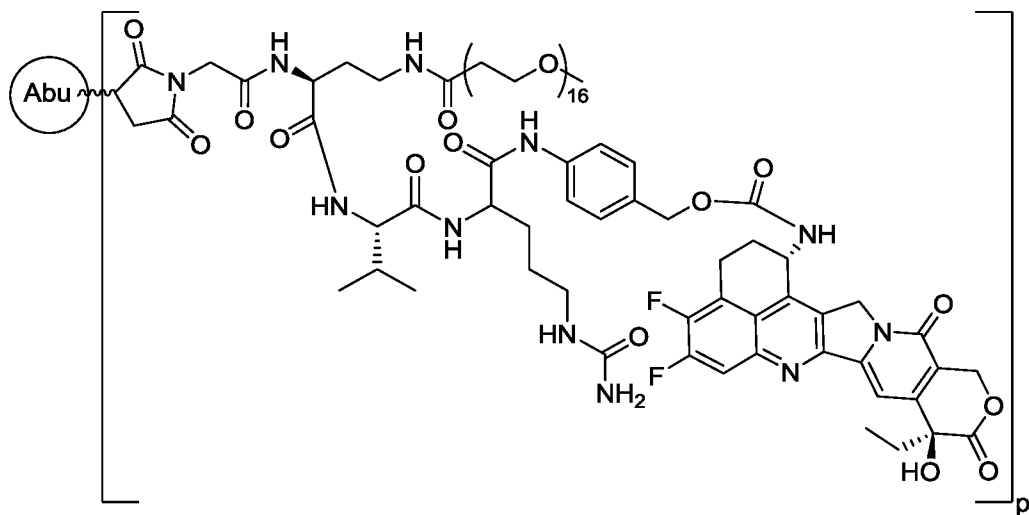
式 I-21-1



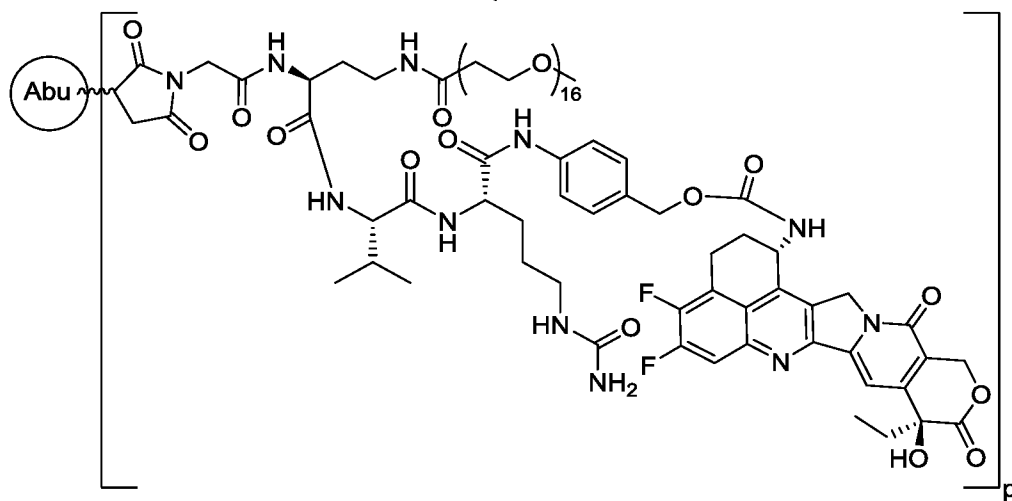
式 I-22



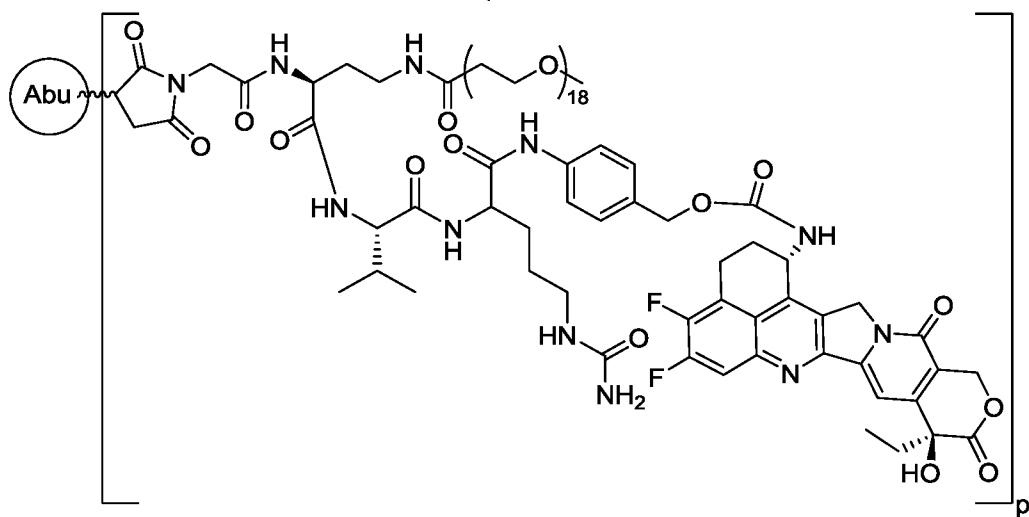
式 I-22-1



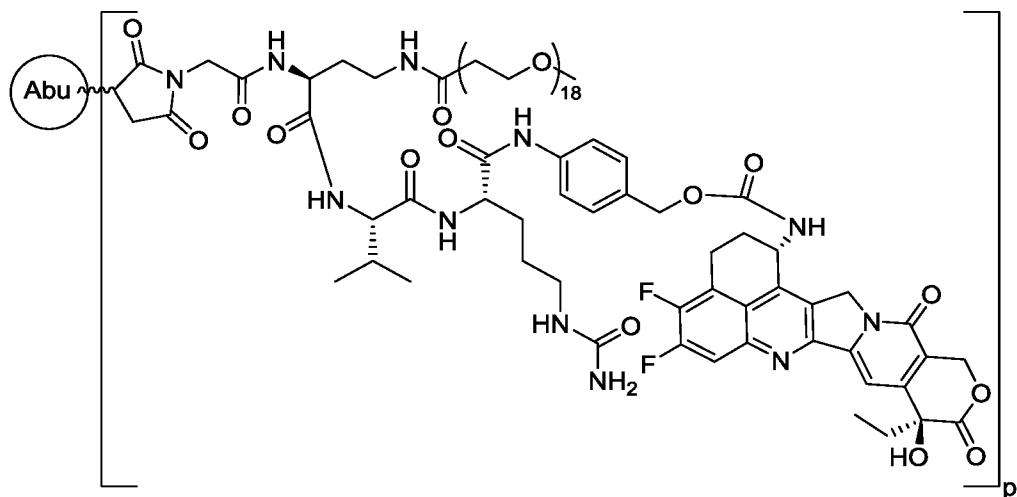
式 I-23



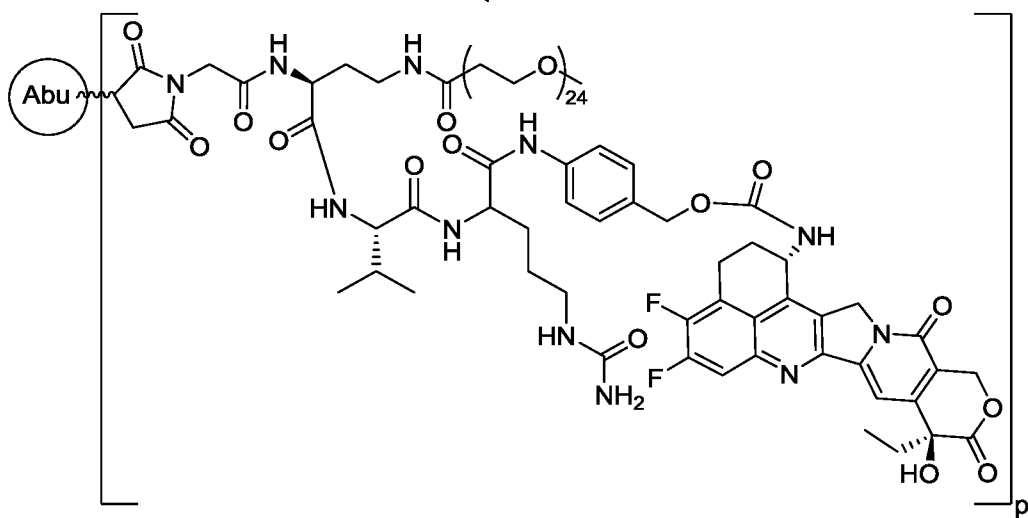
式 I-23-1



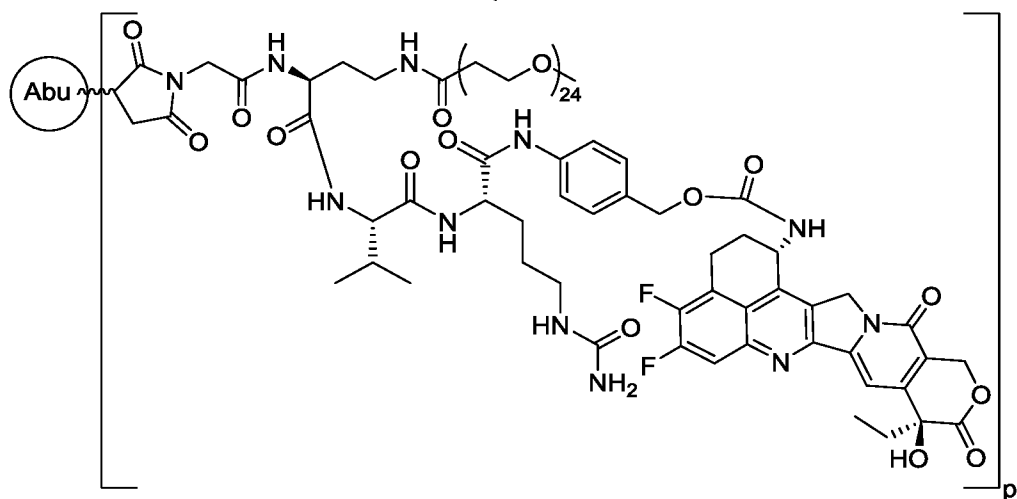
式 I-24



式 I-24-1



式 I-25



式 I-25-1

其中

Abu 为药物，如抗体或其抗原结合单元；

p 为 1-10，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一个或多个实施方式中，Abu 为序列中含有半胱氨酸的多肽，并通过半胱氨酸的硫原子与药物偶联物其他部分（如式 I 的 M）连接。

在一个或多个实施方式中，Abu 为含有 Fc 区的多肽。在一个或多个实施方式中，Abu 通过 Fc 区与药物偶联物其他部分（如式 I 的 M）连接。

在一个或多个实施方式中，Abu 结合的靶点选自：HER2、TROP-2、Nectin-4、B7H3、B7H4、CLDN18、BMPRII、E16、STEAP1、0772P、MPF、Napi3b、Sema5b、PSCA、hlg、ETBR、MSG783、STEAP2、TrpM4、CRIPTO、CD20、CD21、CD22、CD30、FcRH2、NCA、MDP、IL20R α 、短蛋白聚糖(Brevican)、EphB2R、ASLG659、PSCA、GEDA、BAFF-R、CD79a、CD79b、CXCR5、HLA-DOB、P2X5、CD72、LY64、FcRH1、IRTA2、TENB2、PMEL17、TMEFF1、GDNF-Ra1、Ly6E、TMEM46、Ly6G6D、LGR5、RET、LY6K、GPR19、GPR54、ASPHD1、酪氨酸酶、TMEM118、EpCAM、ROR1、GPR172A、Fralpha (FR α)。

在一个或多个实施方式中，Abu 结合的靶点为 HER2、TROP-2、CLDN18.2、B7H3 或 FR α 。

在一个或多个实施方式中，Abu 为抗体或其抗原结合单元，药物偶联物为抗体药物偶联物。

在一个或多个实施方式中，Abu 为含有 Fc 区的抗体或其抗原结合单元。在一个或多个实施方式中，所述 Fc 区为人 IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc 区。

在一个或多个实施方式中，Abu 通过 Fc 区与药物偶联物其他部分（如式 I 的 M）连接。

在一个或多个实施方式中，Abu 为单域抗体。

在一个或多个实施方式中，Abu 为 Fab 片段。

在一个或多个实施方式中，Abu 为单链抗体。

在一个或多个实施方式中，Abu 为全抗。

在一个或多个实施方式中，Abu 为抗 HER2 抗体、抗 Trop2 抗体、抗 CLDN18.2 抗体、抗 B7H3 抗体或抗 FR α 抗体。在一个或多个实施方式中，Abu 为抗 HER2 单克隆抗体、抗 Trop2 单克隆抗体、抗 CLDN18.2 单克隆抗体、抗 B7H3 单克隆抗体或抗 FR α 单克隆抗体。

在一个或多个实施方式中，Abu 为曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、帕妥珠单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗、马妥珠单抗、利妥昔单抗、或西妥昔单抗。

在一个或多个实施方式中，Abu 为抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含 (a) - (f) 中的一个或多个，其中：

(a) VH CDR1，其包含如 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；

(b) VH CDR2，其包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由其组成；

(c) VH CDR3，其包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由其组成；

(d) VL CDR1，其包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由其组成；

(e) VL CDR2，其包含如 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列或由其组成；

(f) VL CDR3，其包含如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一个或多个实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含如下 CDR：

(a) VH CDR1，其包含如 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；

(b) VH CDR2，其包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由其组成；

(c) VH CDR3，其包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由其组成；

(d) VL CDR1，其包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由其组成；

(e) VL CDR2，其包含如 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列或由其组成；

(f) VL CDR3，其包含如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一个或多个实施方式中,所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO:8 所示的 VH CDR2、如 SEQ ID NO:9 所示的 VH CDR3、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR2 和如 SEQ ID NO: 12 所示的 VLCDR3。

在一个或多个实施方式中,所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含重链可变区和轻链可变区;其中所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 13 所示序列,或与 SEQ ID NO: 13 所示序列相比具有至少 90%同一性的序列,或与 SEQ ID NO: 13 所示序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 14 所示序列,或与 SEQ ID NO: 14 所示序列相比具有至少 90%同一性的序列,或与 SEQ ID NO: 14 所示序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中,所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合片段包含重链恒定区,所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO:15 或 16 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中,所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合片段包含轻链恒定区,所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中,所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合片段包含重链恒定区和轻链恒定区,所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列;所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中,所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合片段包含重链恒定区和轻链恒定区,所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列;所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中,所述抗 CLDN18.2 抗体为 H239H-2b-K-6a-1 抗体,其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示,重链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示,轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示,轻链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示。

在一个或多个实施方式中,所述抗体为 H239H-2b-K-6a-2 抗体,其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示,重链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示,轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示,轻链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示。

在一个或多个实施方式中,所述抗体包含与 H239H-2b-K-6a-1 抗体相比具有至少 80% 同一性的序列,或与 H239H-2b-K-6a-1 抗体相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。在一个或多个实施方式中,所述抗体包含与 H239H-2b-K-6a-2 抗体相比具有至少 80% 同一性的序列,或与 H239H-2b-K-6a-2 抗体相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。在一个或多个实施方式中,Abu 为 H239H-2b-K-6a-1 抗体,其中所述抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示,重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示。

在一个或多个实施方式中,Abu 为 H239H-2b-K-6a-2 抗体,其中所述抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示,重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示。

在一个或多个实施方式中,Abu 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合单元。

在一个或多个实施方案中,所述抗 B7H3 抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示,轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示。

在一个或多个实施方式中,Abu 为抗 FR α 抗体或其抗原结合单元。

在一个或多个实施方案中,所述抗 FR α 抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 所示,轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:24 所示。

在一个或多个实施方式中,所述抗体包含与任一上述抗体相比具有至少 80%同一性的

序列，或与任一上述抗体相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

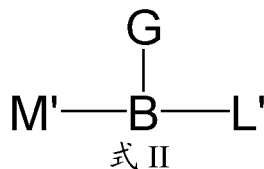
在一个或多个实施方式中，p 为 2-8。

在一个或多个实施方式中，p 为 4-8。

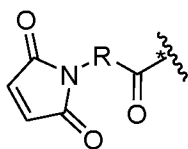
在一个或多个实施方式中，p 为 6-8。

在一个或多个实施方式中，p 为 7-8。

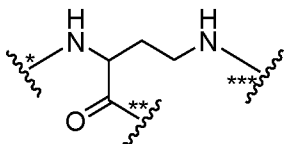
一个或多个实施方式提供了形成药物偶联物，如抗体药物偶联物，的连接子前体，其为式 II 的化合物或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物：



其中

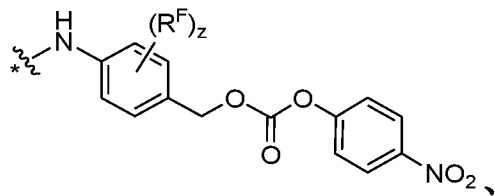


M'为 ，其中*连接B，R选自：-(CH₂)_r-、-(CHR^m)_r-、C3-C8 碳环基、-O-(CH₂)_r-、亚芳基、-(CH₂)_r-、亚芳基-、-亚芳基-(CH₂)_r-、-(CH₂)_r-(C3-C8 碳环基)-、-(C3-C8 碳环基)-(CH₂)_r-、C3-C8 杂环基、-(CH₂)_r-(C3-C8 杂环基)-、-(C3-C8 杂环基)-(CH₂)_r-、-(CH₂)_rC(O)NR^m(CH₂)_r-、-(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-、-(CH₂)_rC(O)NR^m(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂)_rC(O)NR^m(CH₂CH₂O)_r-CH₂-、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^m(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^m(CH₂CH₂O)_r-CH₂-和-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^m(CH₂)_r-；其中各R^m独立为H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基；并且各r独立为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

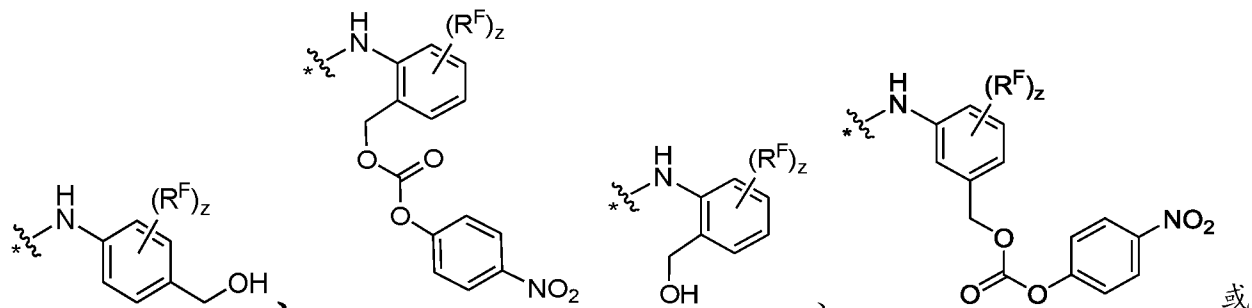


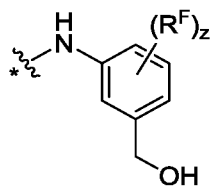
B 为 $\begin{matrix} \text{O} \\ \text{wavy line} \end{matrix}$; 其中*连接 M', **连接 L', ***连接 G;

L'为-(AA)_i-(FF')_f-, 其中, AA为氨基酸或多肽, i是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、

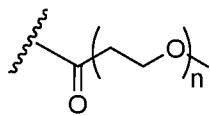


11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20; 各 FF' 独立为





OH, 其中各 R^F 独立为 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、 $-\text{NO}_2$ 或卤素; z 为 0、1、2、3 或 4; f 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10; 其中*连接 AA;



G 为, 其中 n 为 1-24, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

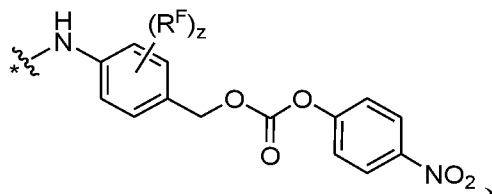
在一个或多个实施方式中, R 为 $-(\text{CH}_2)_r-$ 。

在一个或多个实施方式中, R 为 $-(\text{CH}_2)_r-$, r 为 1 或 5。

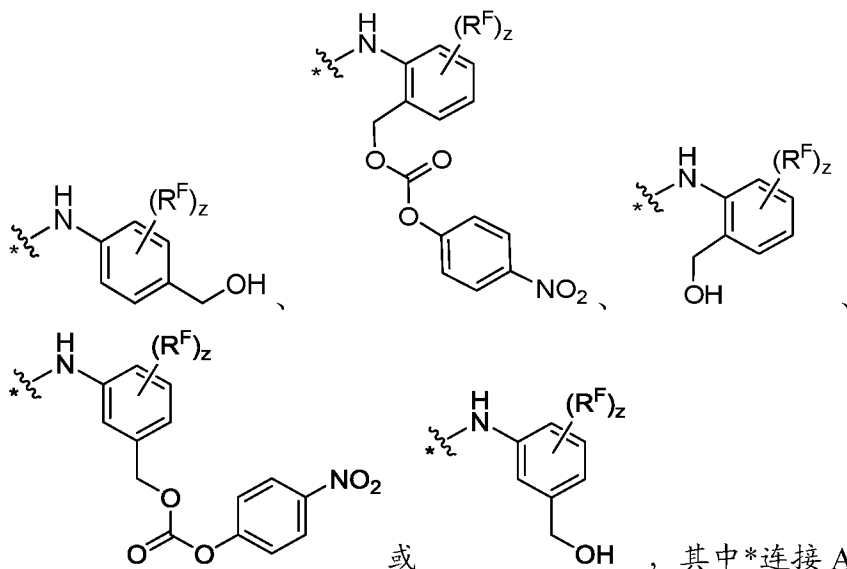
在一个或多个实施方式中, 各 AA 独立选自以下氨基酸或肽序列: Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu 和 Gly-Phe-Leu-Gly。

在一个或多个实施方式中, i 为 1。

在一个或多个实施方式中, AA 为 Val-Cit, i 为 1。



在一个或多个实施方式中, 各 FF' 独立为



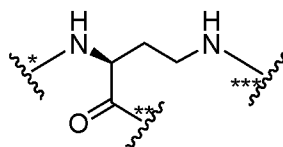
或, 其中*连接 AA; 其中各 R^F 独立为 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、 $-\text{NO}_2$ 或卤素。

在一个或多个实施方式中, R^F 为 F。

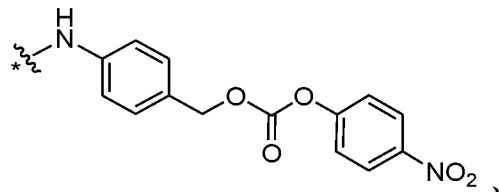
在一个或多个实施方式中, z 为 0。

在一个或多个实施方式中, z 为 1 或 2。

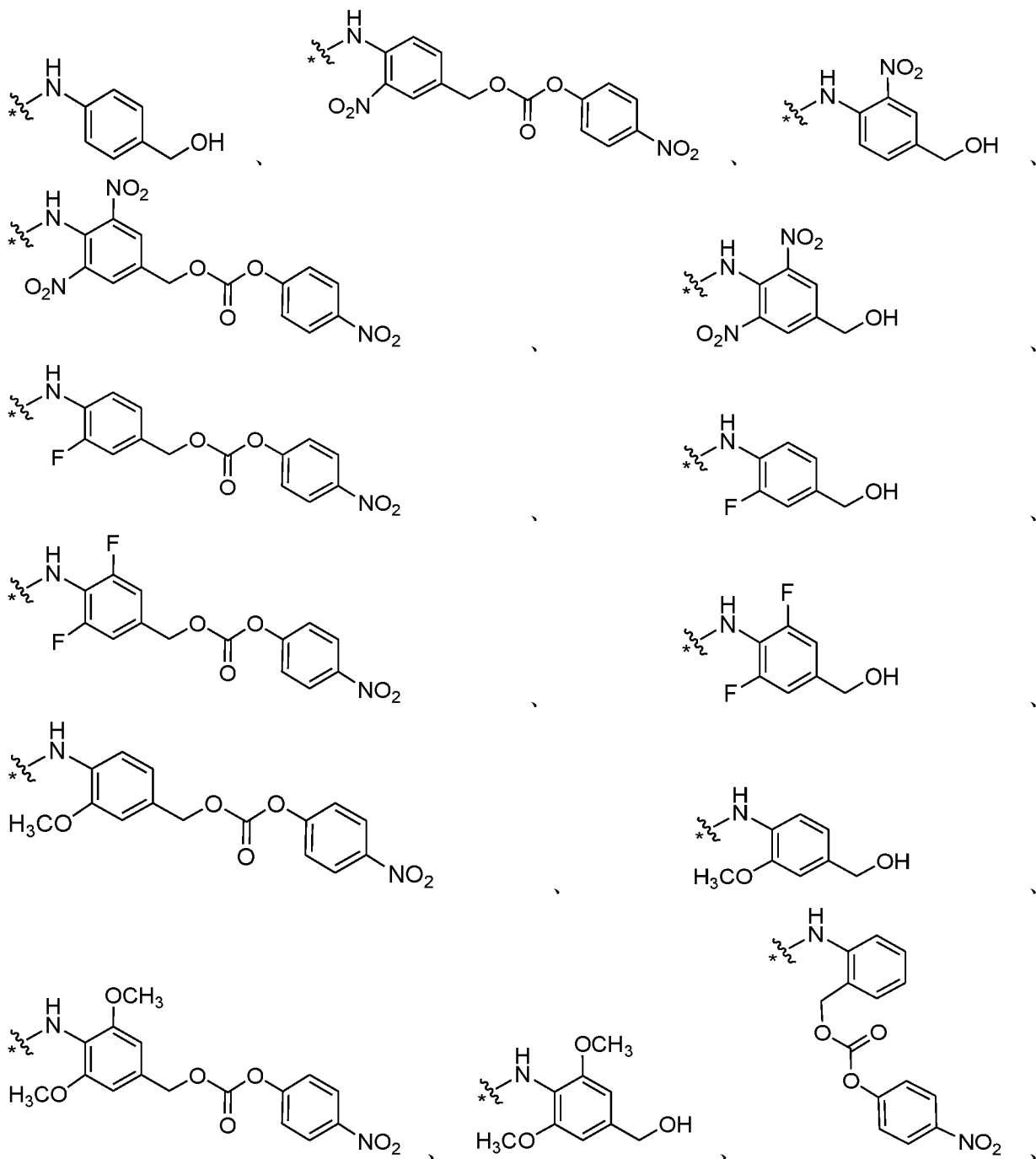
在一个或多个实施方式中, f 为 1。

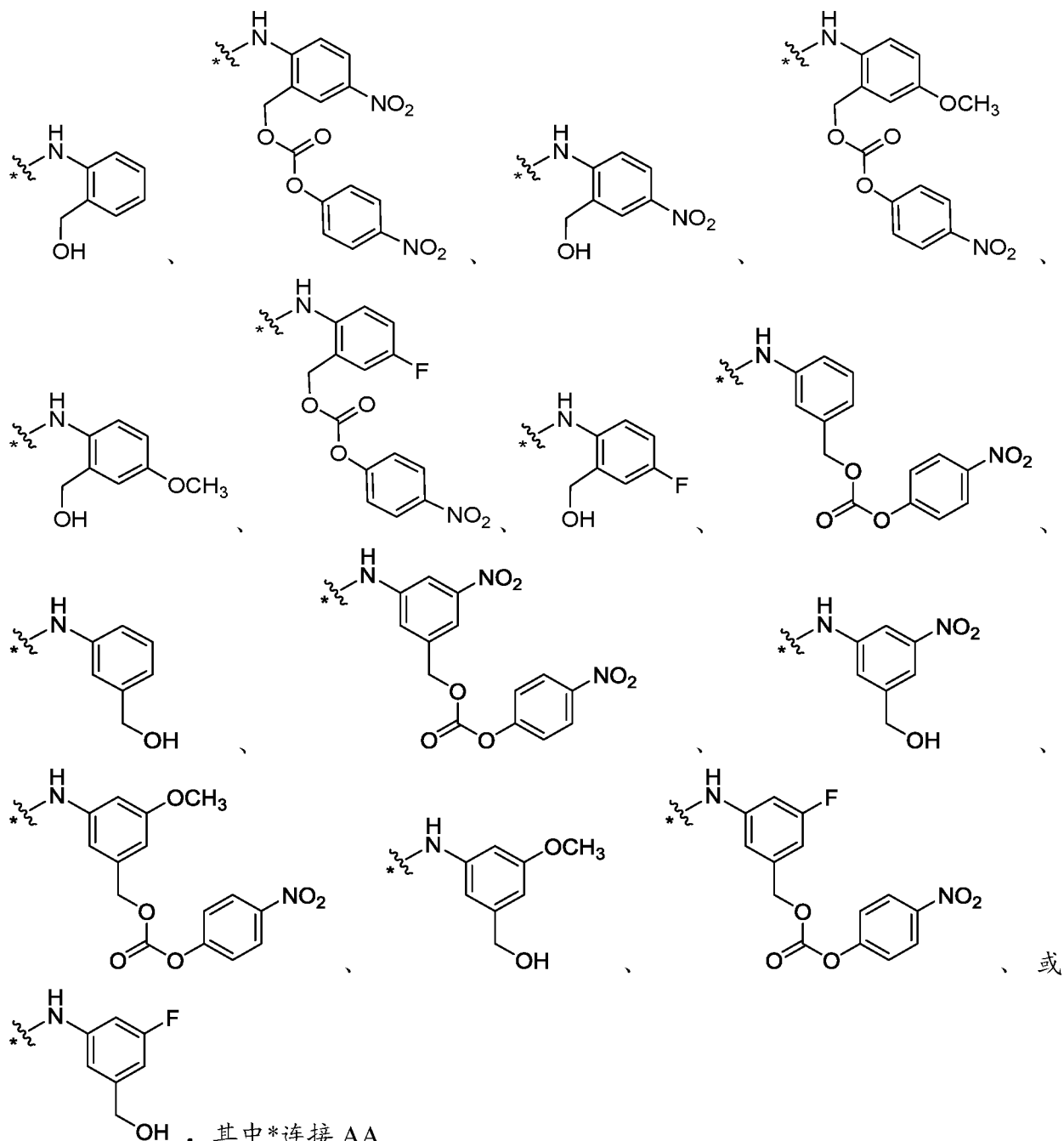


在一个或多个实施方式中，B 为
***连接 G。

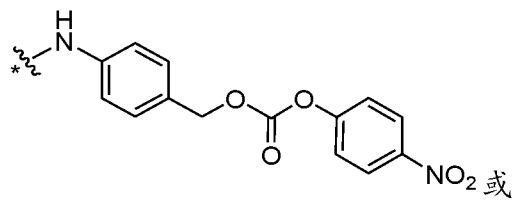


在一个或多个实施方式中，各 FF' 独立为

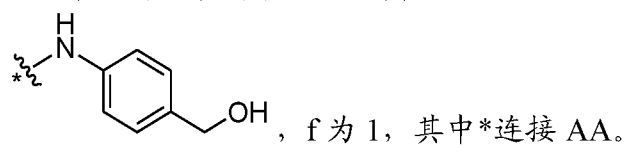


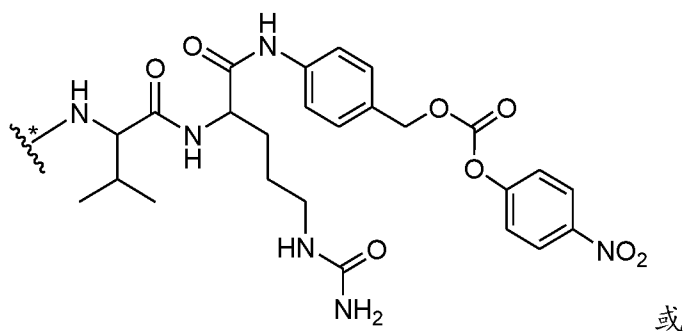


OH，其中*连接 AA。
在一个或多个实施方式中，f 为 1。

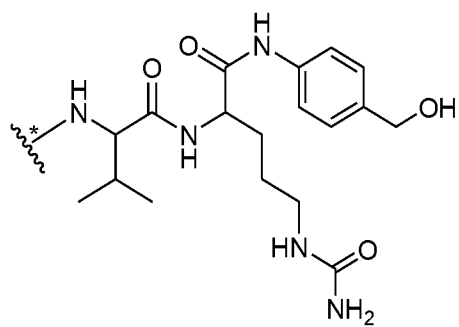


在一个或多个实施方式中，FF'为

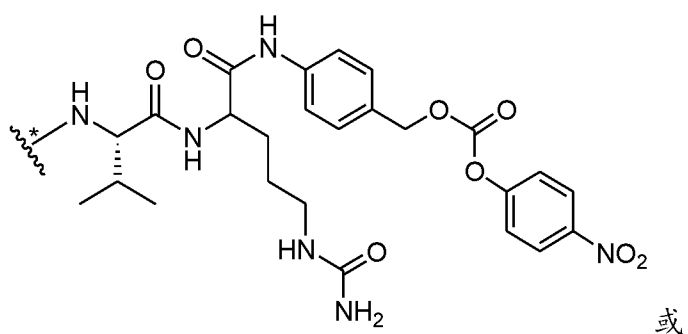




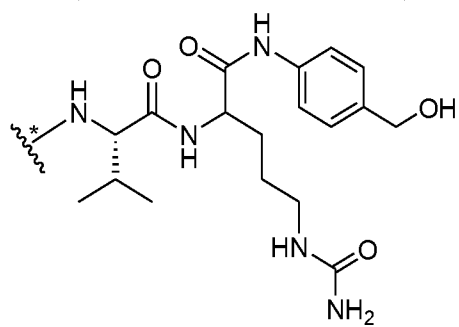
在一个或多个实施方式中，L'为



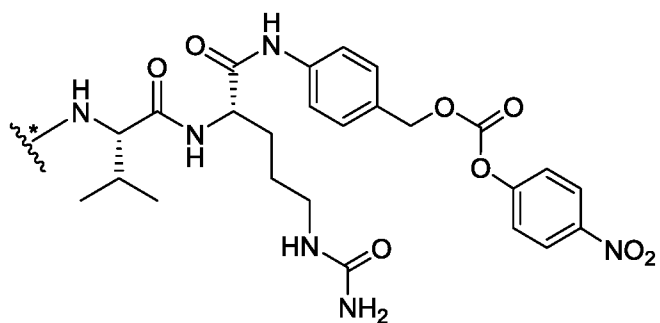
，其中*连接 B。



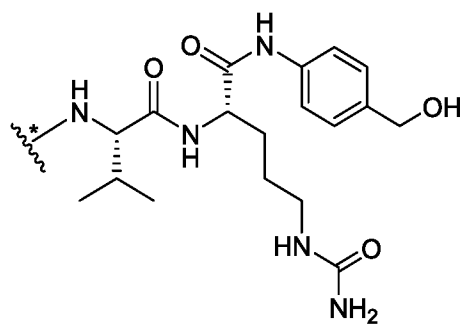
在一个或多个实施方式中，L'为



，其中*连接 B。



在一个或多个实施方式中，L'为



，其中*连接B。

在一个或多个实施方式中，R为 $-(CH_2)_r-$ 。

在一个或多个实施方式中，R为 $-(CH_2)_r-$ ，r为1或5。

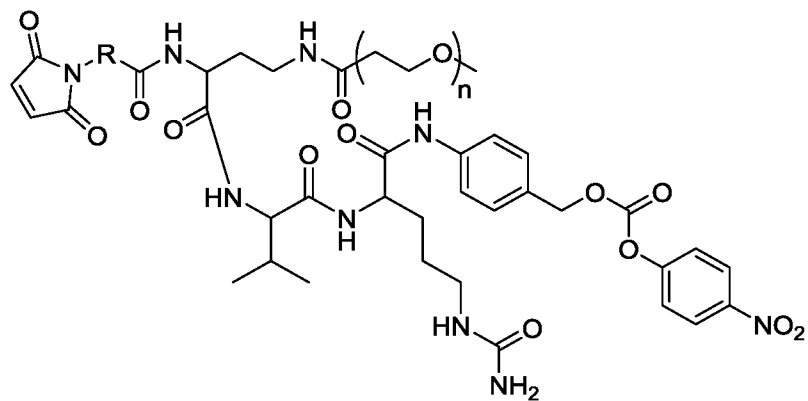
在一个或多个实施方式中，n为4-12。

在一个或多个实施方式中，n为4-8。

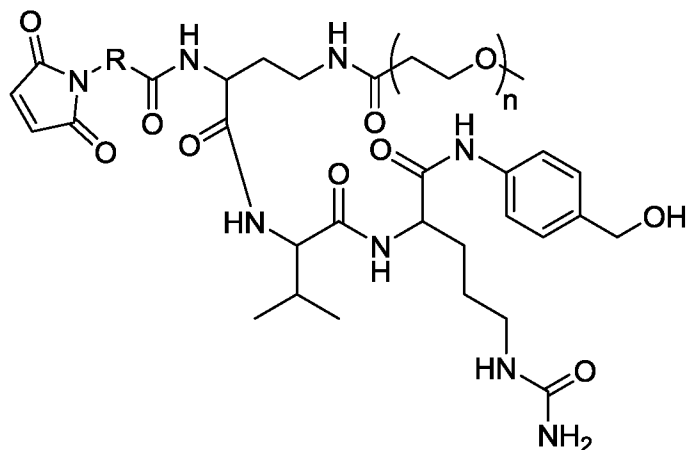
在一个或多个实施方式中，n为4。

在一个或多个实施方式中，n为8。

在一个或多个实施方式中，所述式II为：



式 II-1A



式 II-1B

其中

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8$ 碳环基)- $-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8$ 杂环基)- $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

n 为 1-24 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

在一个或多个实施方式中, R 为 $-(CH_2)_r-$ 。

在一个或多个实施方式中, R 为 $-(CH_2)_r-$, r 为 1 或 5。

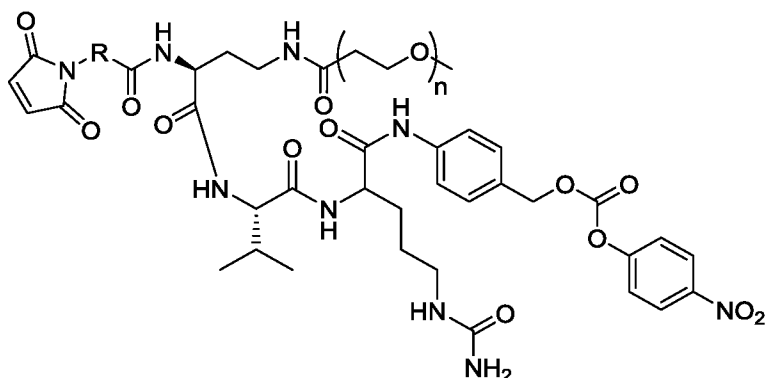
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

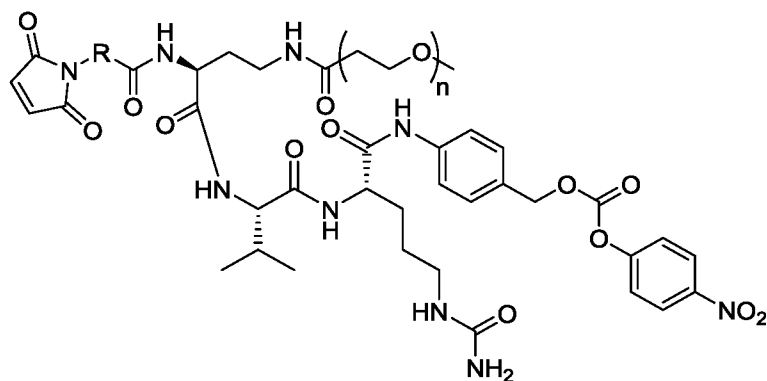
在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

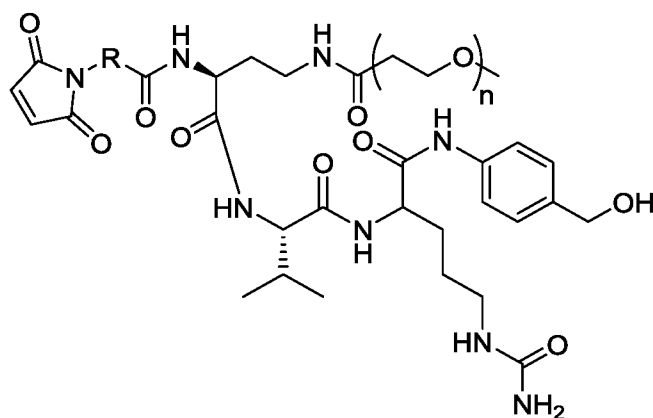
在一个或多个实施方式中, 所述式 II 为:



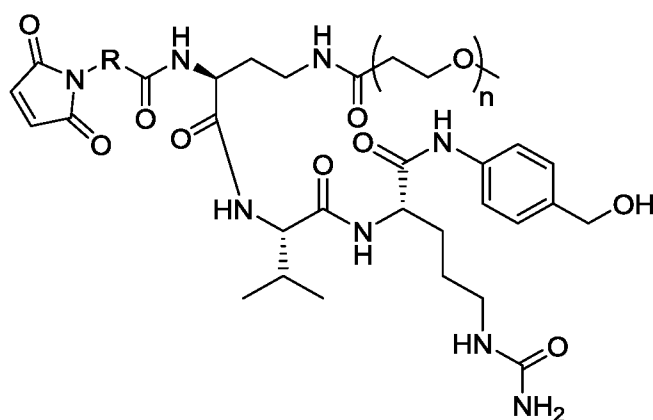
式 II-2A



式 II-2A-1



式 II-2B



式 II-2B-1

其中

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-$ 亚芳基 $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8$ 碳环基) $-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8$ 杂环基) $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

n 为 1-24 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

在一个或多个实施方式中, R 为 $-(CH_2)_r-$ 。

在一个或多个实施方式中, R 为 $-(CH_2)_r-$, r 为 1 或 5。

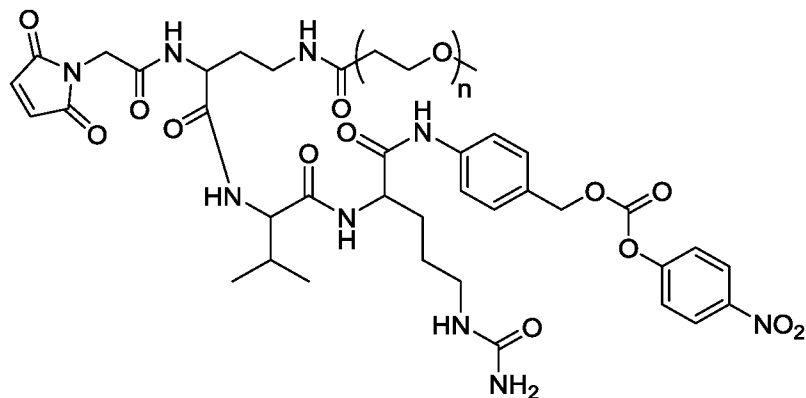
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

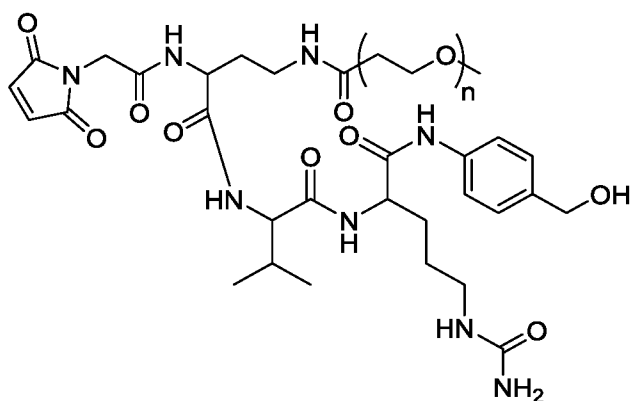
在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

在一个或多个实施方式中, 所述式 II 为:



式 II-3A



式 II-3B

其中 n 为 1-24 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

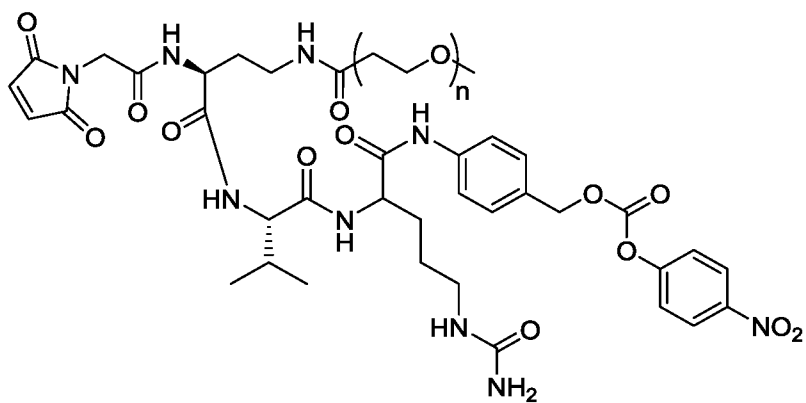
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

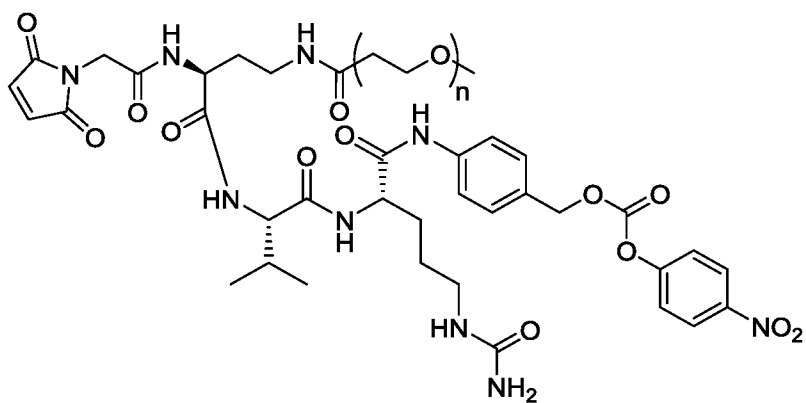
在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

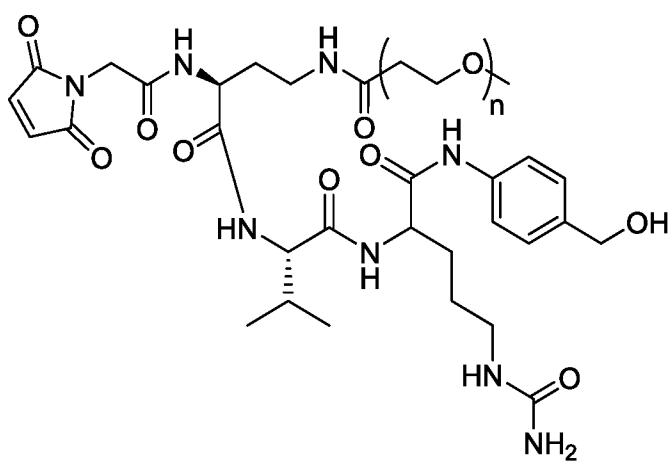
在一个或多个实施方式中, 所述式 II 为:



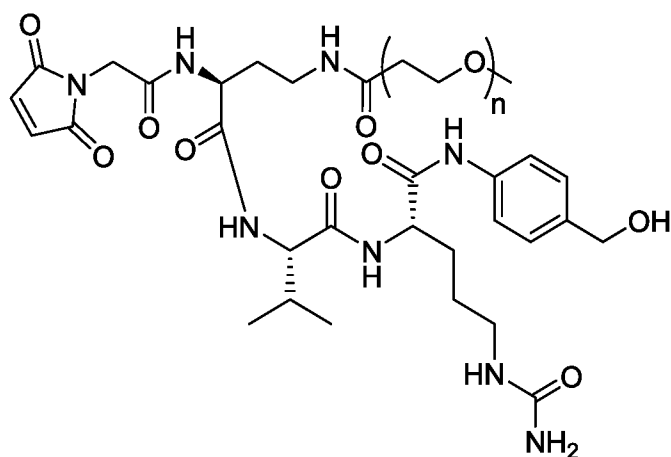
式 II-4A



式 II-4A-1



式 II-4B



式 II-4B-1

其中 n 为 1-24 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

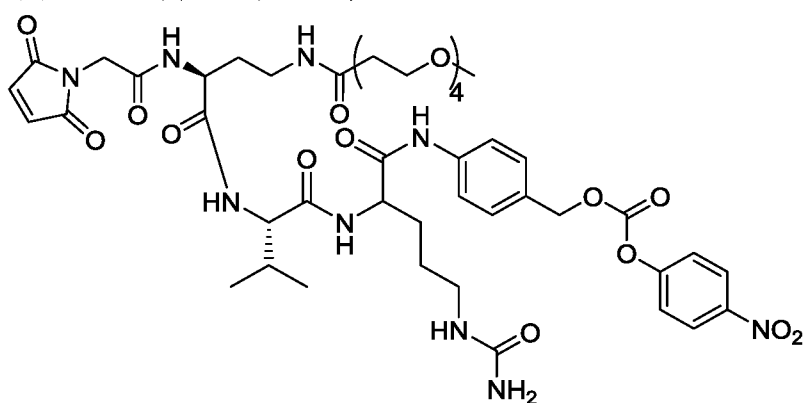
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

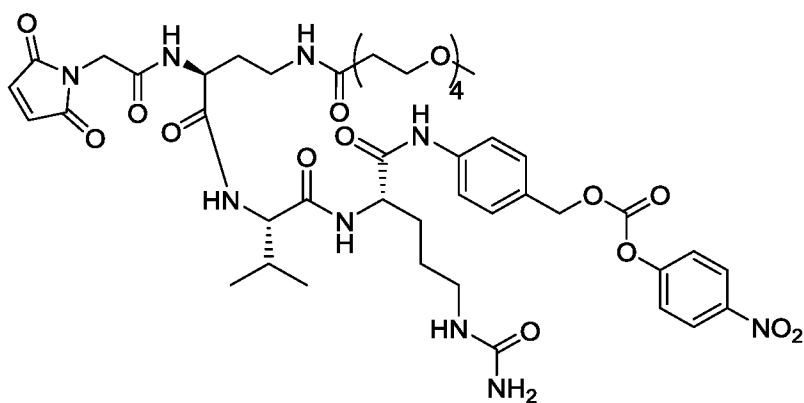
在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

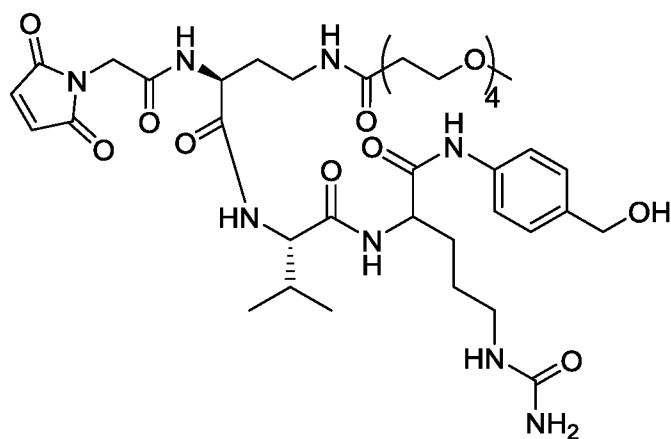
在一个或多个实施方式中, 式 II 具有以下结构:



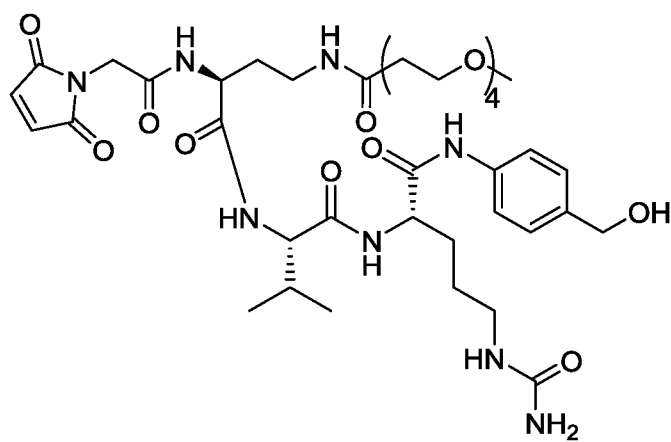
式 II-5A



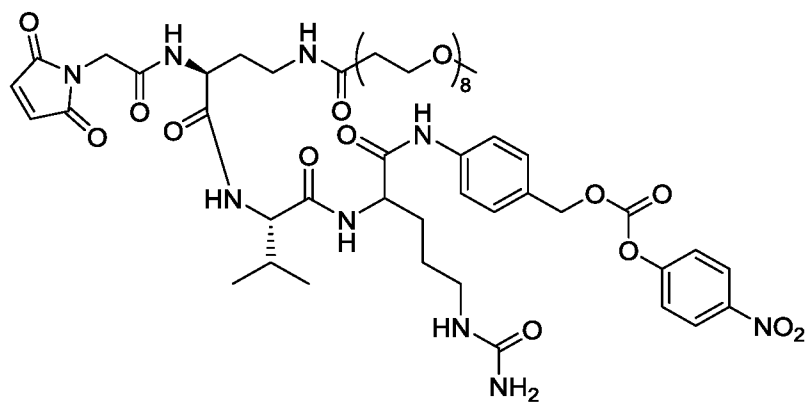
式 II-5A-1



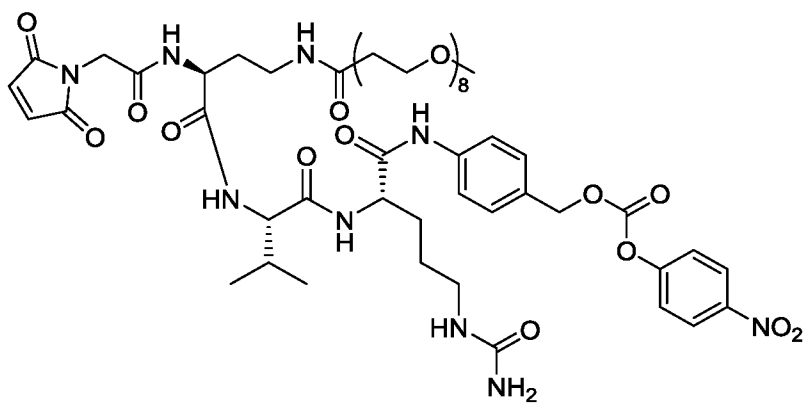
式 II-5B



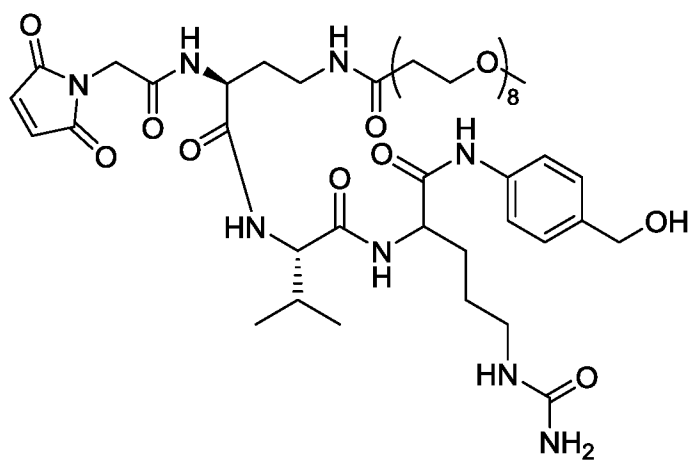
式 II-5B-1



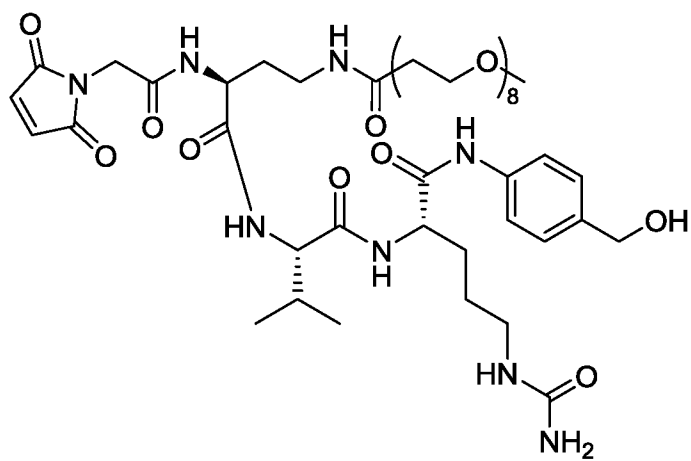
式 II-6A



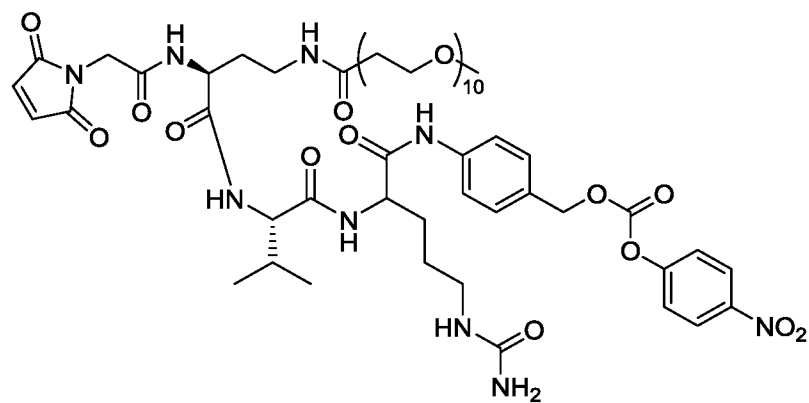
式 II-6A-1



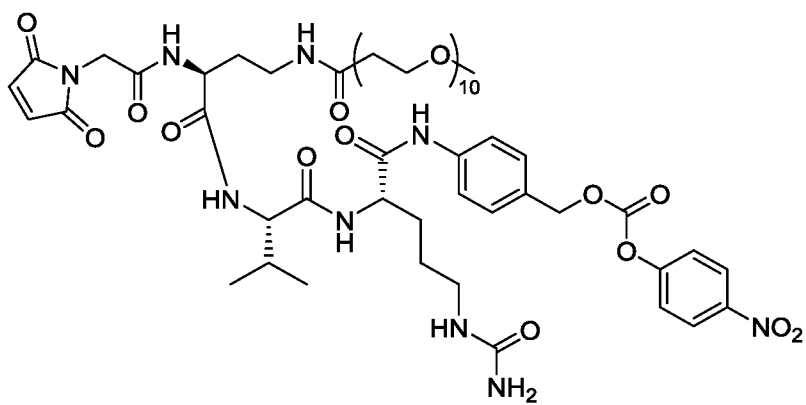
式 II-6B



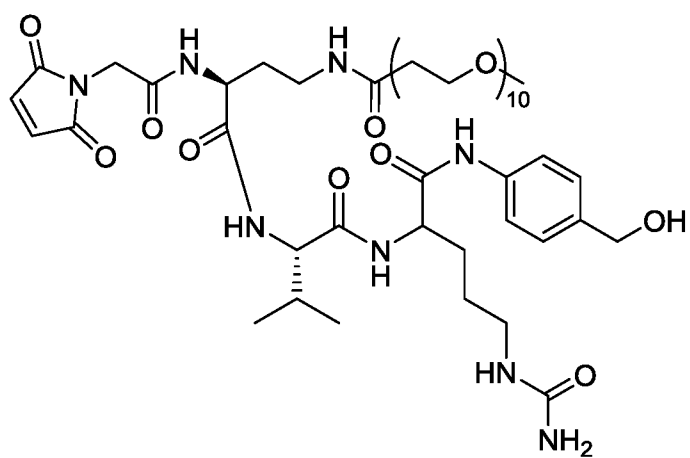
式 II-6B-1



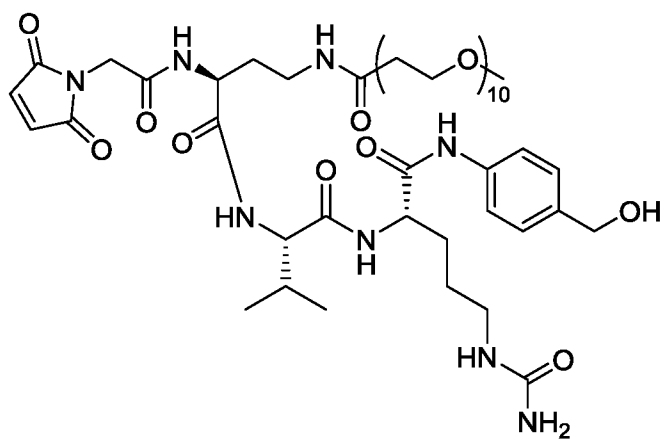
式 II-7A



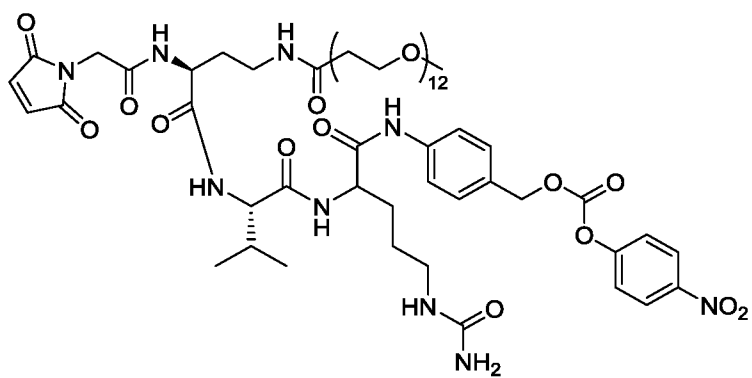
式 II-7A-1



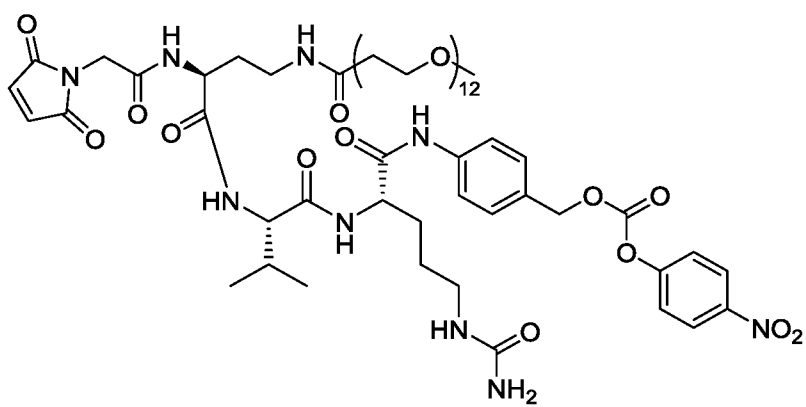
式 II-7B



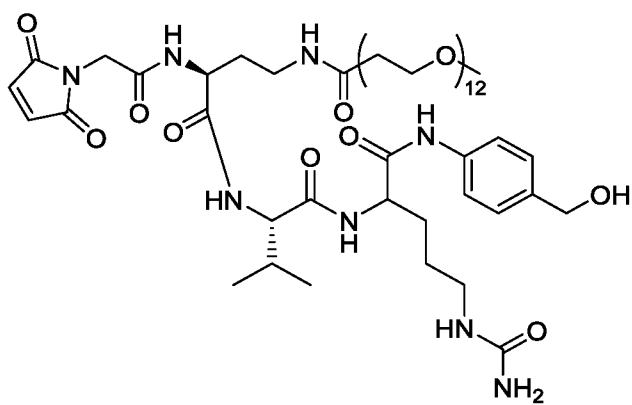
式 II-7B-1



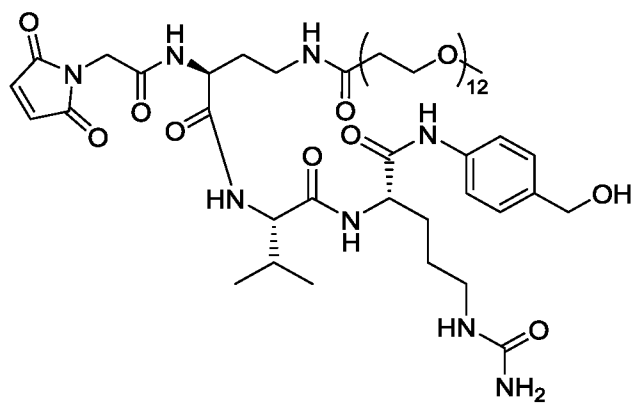
式 II-8A



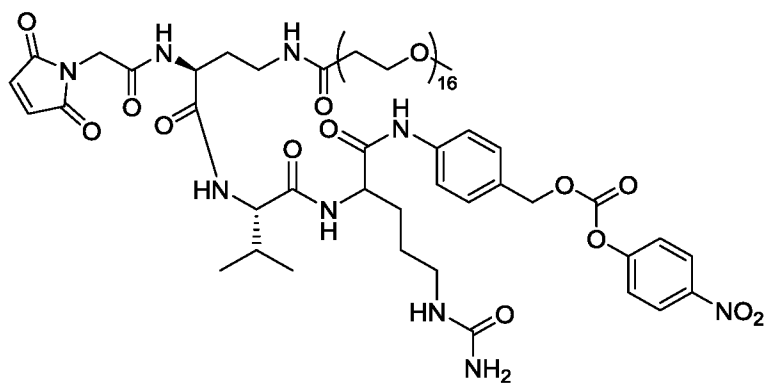
式 II-8A-1



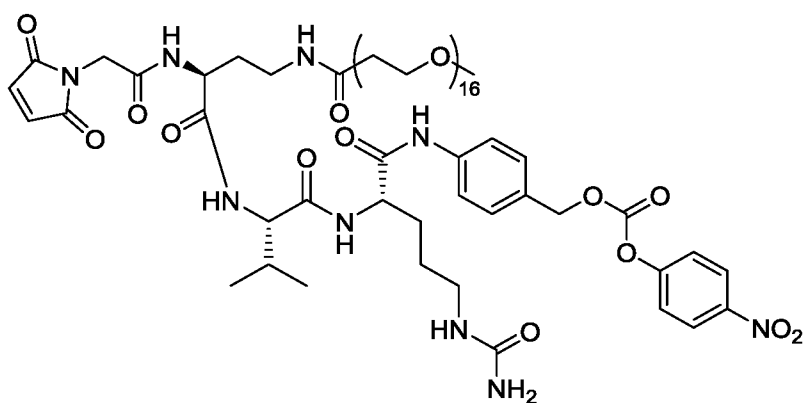
式 II-8B



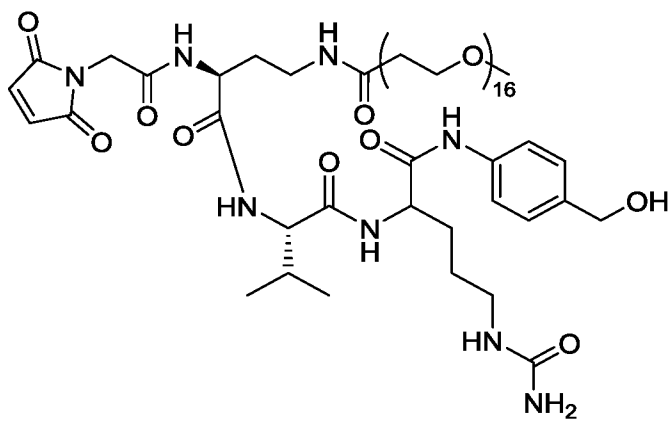
式 II-8B-1



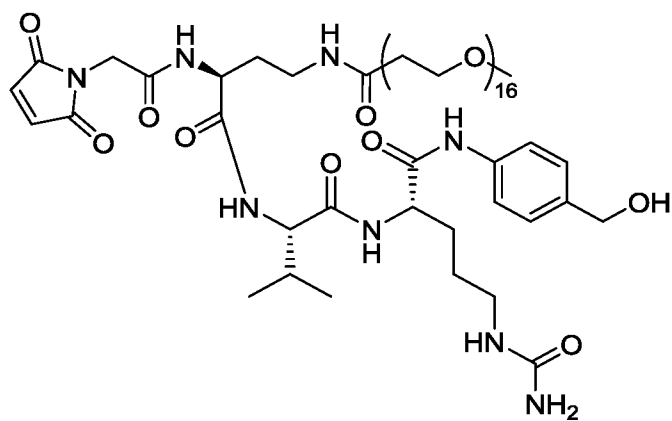
式 II-9A



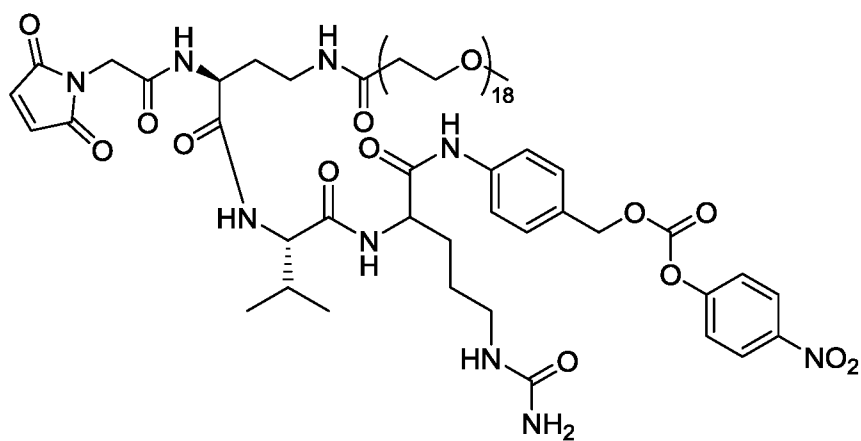
式 II-9A-1



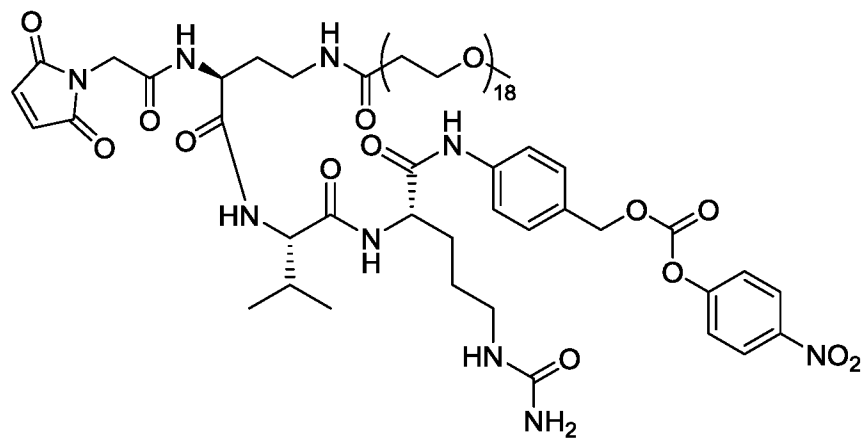
式 II-9B



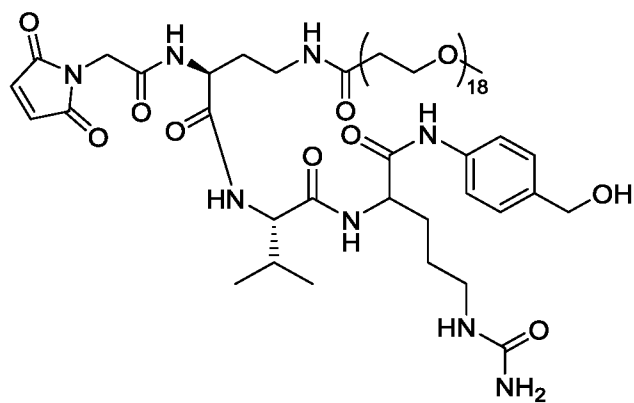
式 II-9B-1



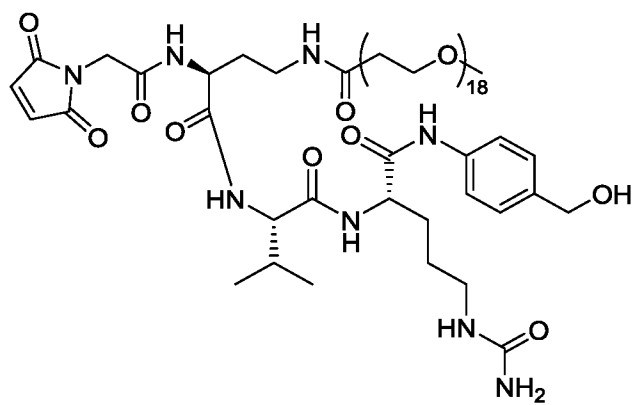
式 II-10A



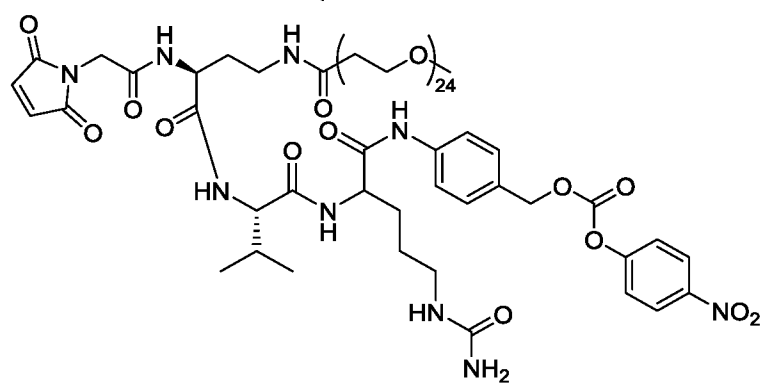
式 II-10A-1



式 II-10B

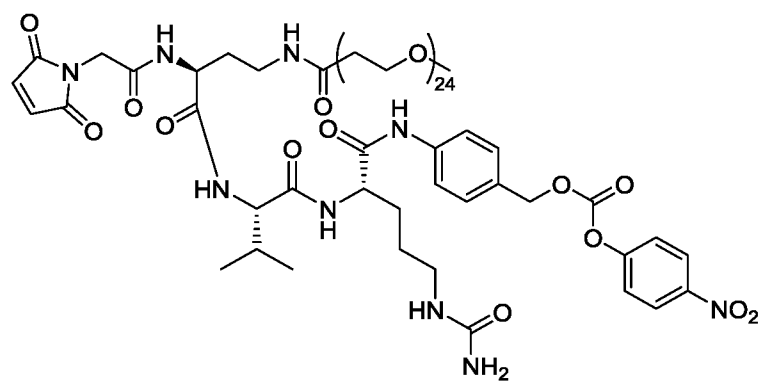


式 II-10B-1

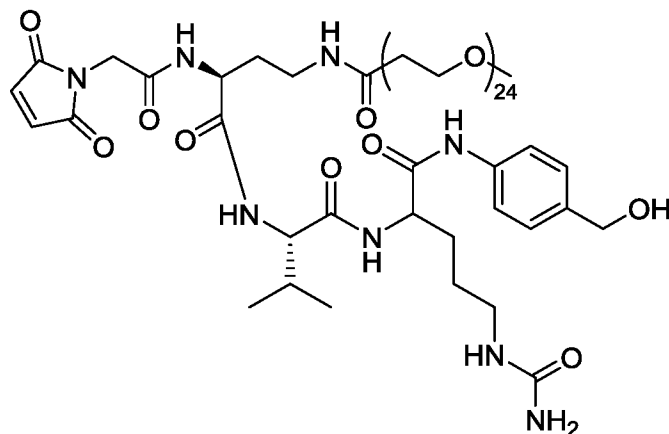


式 II-11A

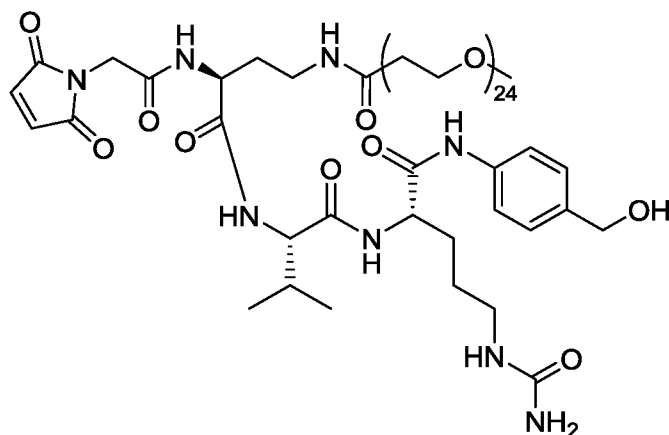
或



式 II-11A-1

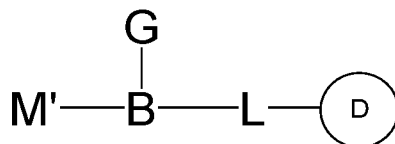


式 II-11B



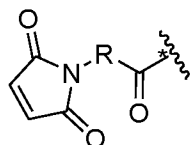
式 II-11B-1

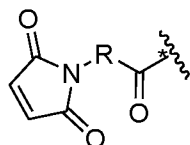
一个或多个实施方式提供了形成药物偶联物，如抗体药物偶联物的中间体，其为式 III 的化合物或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物：

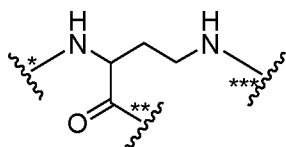


式 III

D 为药物，如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物；

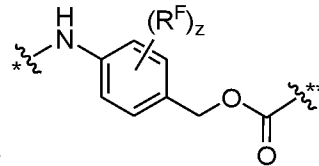


M' 为 ，其中*连接 B，R 选自：-(CH₂)_r-、-(CHR^m)_r-、C3-C8 碳环基、-O-(CH₂)_r-、亚芳基、-(CH₂)_r-、亚芳基-、-亚芳基-(CH₂)_r-、-(CH₂)_r-(C3-C8 碳环基)-、-(C3-C8 碳环基)-(CH₂)_r-、C3-C8 杂环基、-(CH₂)_r-(C3-C8 杂环基)-、-(C3-C8 杂环基)-(CH₂)_r-、-(CH₂)_rC(O)NR^m(CH₂)_r-、-(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-、-(CH₂)_rC(O)NR^m(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^m(CH₂CH₂O)_r-CH₂-、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^m(CH₂CH₂O)_r-CH₂-和-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^m(CH₂)_r-；其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基；并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

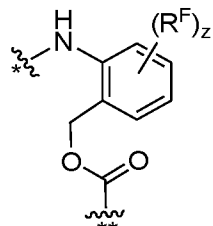


B 为 ，其中*连接 M'，**连接 L，***连接 G；

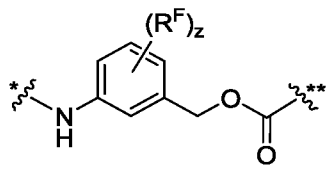
L 为 $-(AA)_i-(FF)_f$ ，其中，AA 为氨基酸或多肽，i 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、



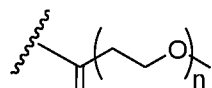
11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20；各 FF 独立为



或



，其中各 R^F 独立为 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、 $-\text{NO}_2$ 或卤素；z 为 0、1、2、3 或 4；f 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；其中*连接 AA，**连接 D；



G 为 ，其中 n 为 1-24，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

在一个或多个实施方式中，D 为抗癌药物。

在一个或多个实施方式中，D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

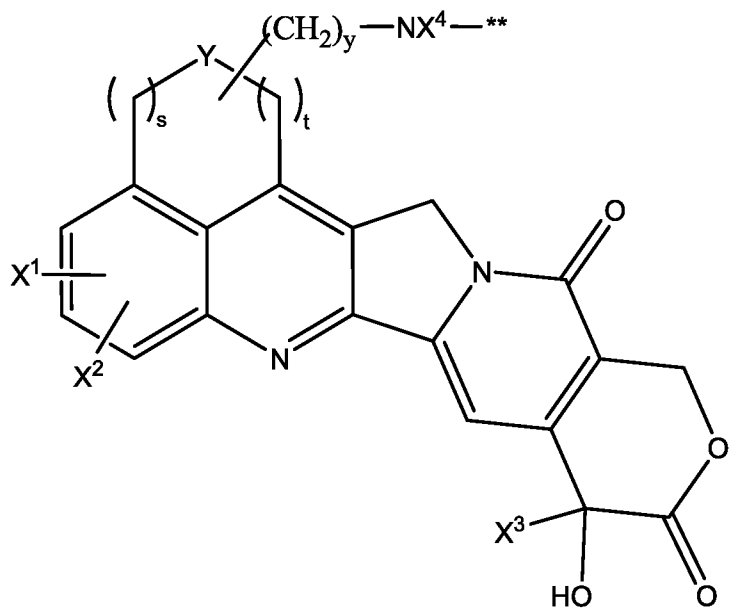
在一个或多个实施方式中，所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、及美登素(maytansine)类。

在一个或多个实施方式中，D 为奥瑞他汀(auristatin)类，选自单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 损伤剂，选自卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐，选自伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氟基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氟基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡啶-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中，所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康，或其盐。



在一个或多个实施方式中，D 为
其中

X¹ 和 X² 各自独立地为：

H，

羟基，

C1-C6 烷基，

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基，

C2-C6 烯基，

C2-C6 炔基，

C1-C6 烷氧基，

C1-C6 氨基烷氧基，

卤素，

硝基，

氰基，

巯基，

烷硫基，

氨基，被氨基保护基取代的氨基，在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基，

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基，

连接至杂环的 C1-C6 烷基，所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代，

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基，所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代，所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代，

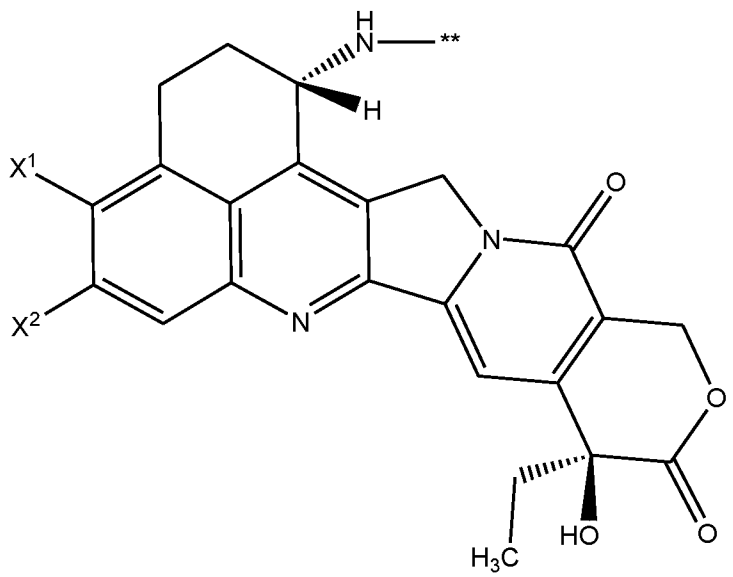
氨基取代的杂环基，其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代，

杂环氨基，其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代，

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基，

吗啉-1-基，或

哌啶-1-基；



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 与 L 连接。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

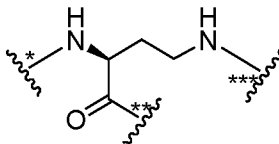
在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 -CH₃、F 或 -OH。

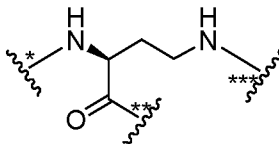
在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 -CH₃ 及 X^2 为 F。

在一个或多个实施方式中, R 为 -(CH₂)_r。

在一个或多个实施方式中, r 为 1 或 5。

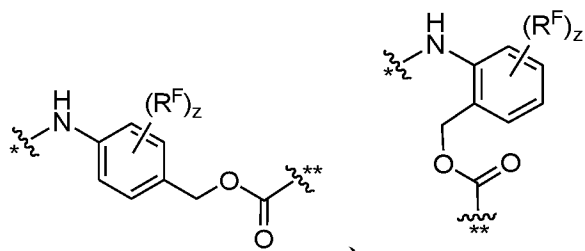


在一个或多个实施方式中, B 为 , 其中 * 连接 M', ** 连接 L, *** 连接 G。

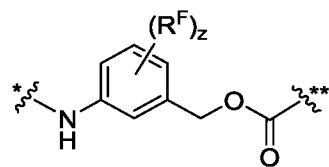
在一个或多个实施方式中, 各 AA 独立选自以下氨基酸或肽序列: Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu 和 Gly-Phe-Leu-Gly。

在一个或多个实施方式中, i 为 1。

在一个或多个实施方式中, AA 为 Val-Cit, i 为 1。



在一个或多个实施方式中, 各 FF 独立为



, 其中*连接 AA, **连接 D, 其中 R^F 为 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧

基、 $-\text{NO}_2$ 或卤素。

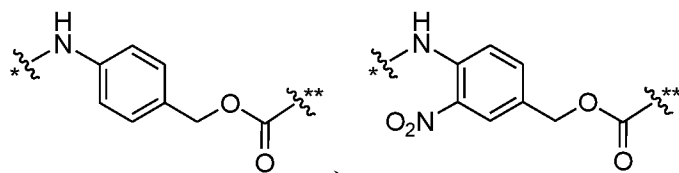
在一个或多个实施方式中, 所述卤素为 F。

在一个或多个实施方式中, 各 R^F 独立为 $-\text{CH}_3$ 、F、 $-\text{NO}_2$ 或 $-\text{OCH}_3$ 。

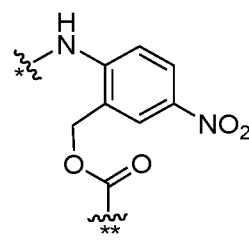
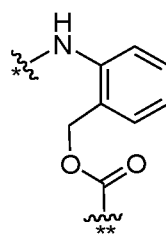
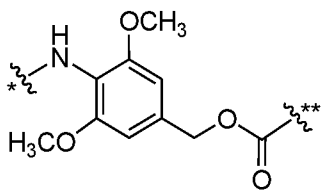
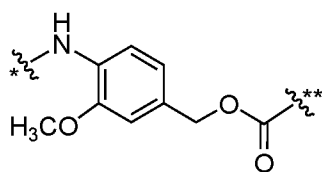
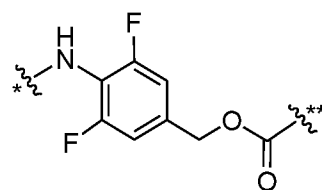
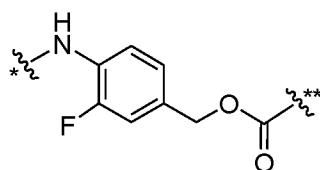
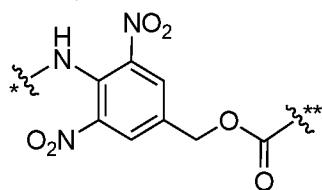
在一个或多个实施方式中, z 为 0。

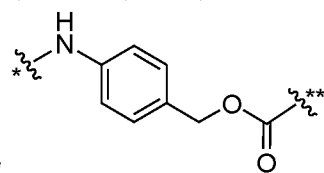
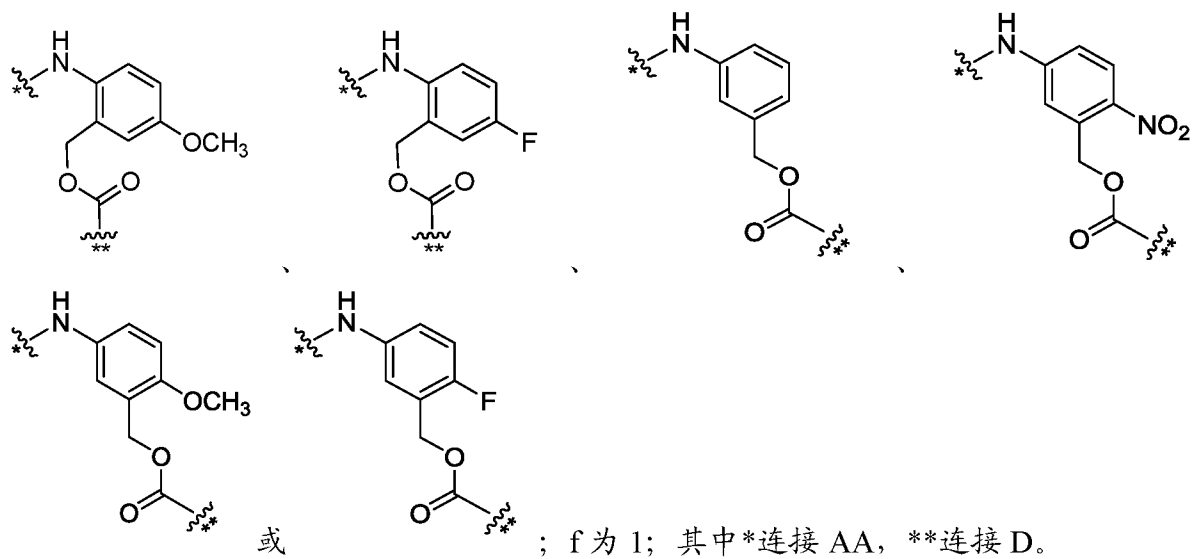
在一个或多个实施方式中, z 为 1 或 2。

在一个或多个实施方式中, f 为 1。

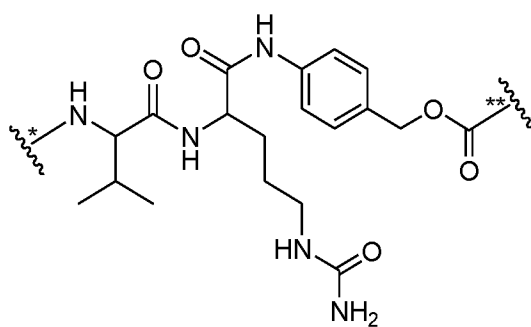


在一个或多个实施方式中, FF 为



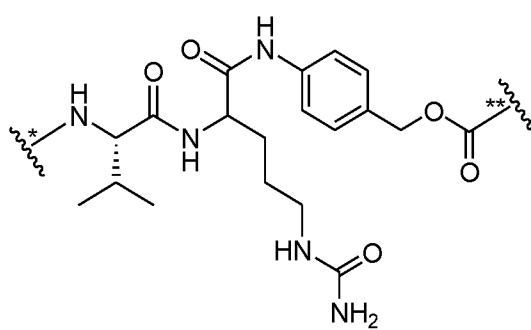


在一个或多个实施方式中, FF 为连接 D。



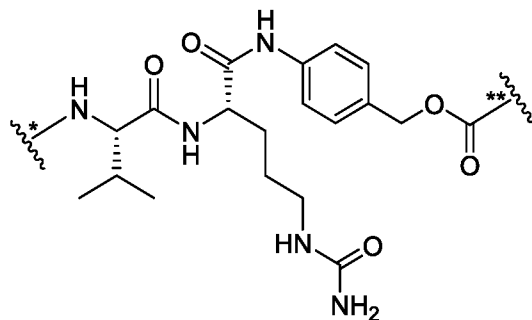
在一个或多个实施方式中, L 为**连接 D。

, 其中*连接 B,



在一个或多个实施方式中, L 为**连接 D。

, 其中*连接 B,



在一个或多个实施方式中, L 为 , 其中*连接 B, **连接 D。

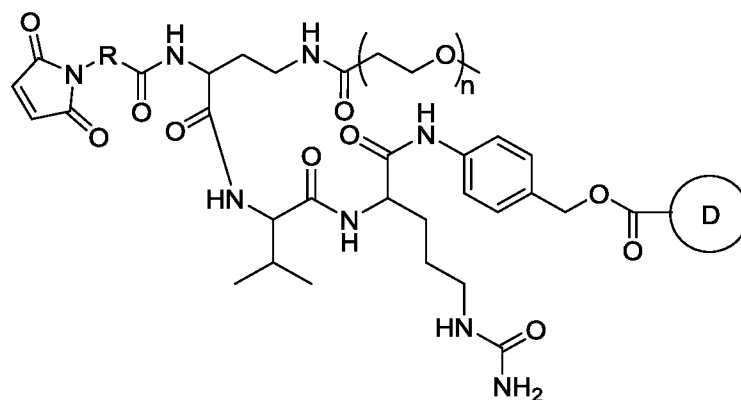
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

在一个或多个实施方式中, 所述式 III 为:



式 III-1

其中

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-$ 亚芳基 $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8$ 碳环基) $-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8$ 杂环基) $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

D 为药物, 如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物;

n 为 1-24 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

在一个或多个实施方式中, D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中, 所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、及美登素(maytansine)类。

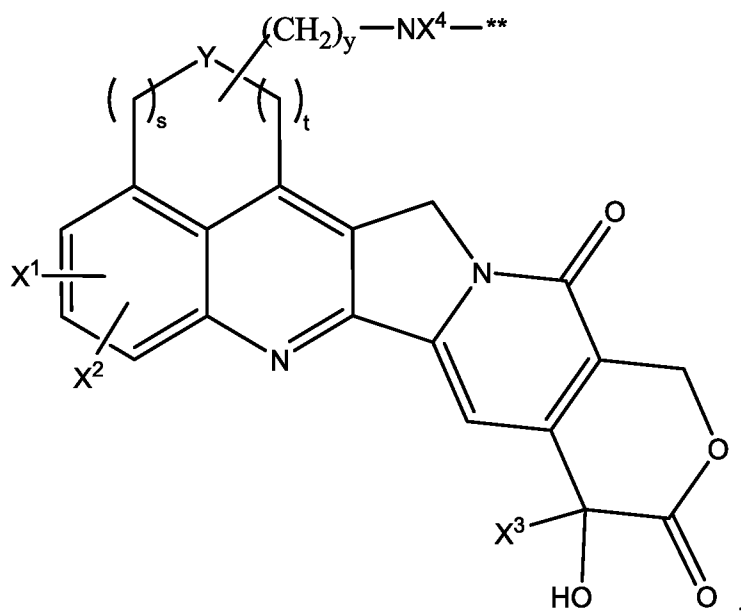
在一个或多个实施方式中，D 为奥瑞他汀(auristatin)类，例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 损伤剂，例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐，例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡啶-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中，所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康，或其盐。

在一个或多个实施方式中，D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycine 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤，长春新碱，长春碱，柔红霉素，丝裂霉素 C，马法兰，或苯丁酸氮芥衍生物。



在一个或多个实施方式中，D 为
其中

X¹ 和 X² 各自独立地为：

H，

羟基，

C1-C6 烷基，

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基，

C2-C6 烯基，

C2-C6 炔基，

C1-C6 烷氧基,

C1-C6 氨基烷氧基,

卤素,

硝基,

氰基,

巯基,

烷硫基,

氨基, 被氨基保护基取代的氨基, 在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基,

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基,

连接至杂环的 C1-C6 烷基, 所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代,

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基, 所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代, 所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代,

氨基取代的杂环基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代,

杂环氨基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代,

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基,

吗啉-1-基, 或

哌啶-1-基;

X^3 为 C1-C6 烷基;

X^4 为 H、 $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CHR^n)_q-CH_3$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_q-CH_3$ 、亚芳基- CH_3 、 $-(CH_2)_q$ -亚芳基- CH_3 、-亚芳基- $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 碳环基)- CH_3 、 $-(C3-C8$ 碳环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 杂环基)- CH_3 、 $-(C3-C8$ 杂环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、或 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$; 其中各 R^n 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 q 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

**为连接点;

y 为 0、1 或 2;

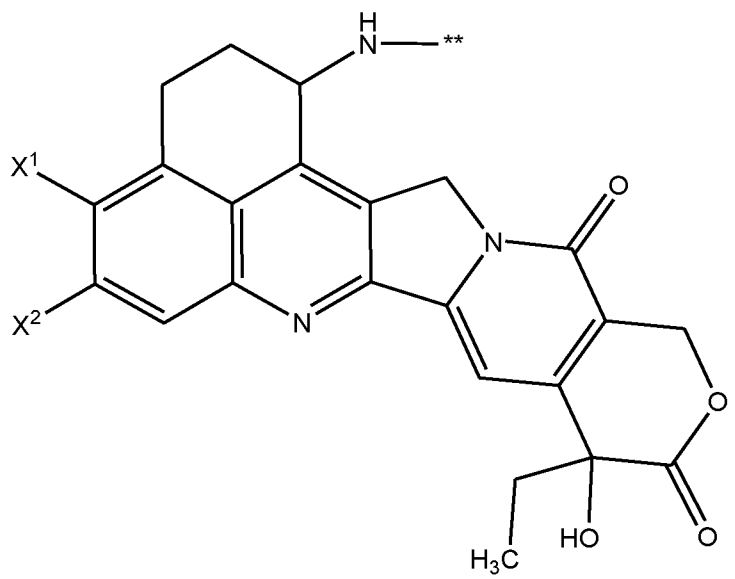
Y 为 O、S 或 CR^1R^2 , 其中 R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或 C1-C6 烷基;

s 和 t 各自独立为 0、1 或 2, 但不同时为 0。

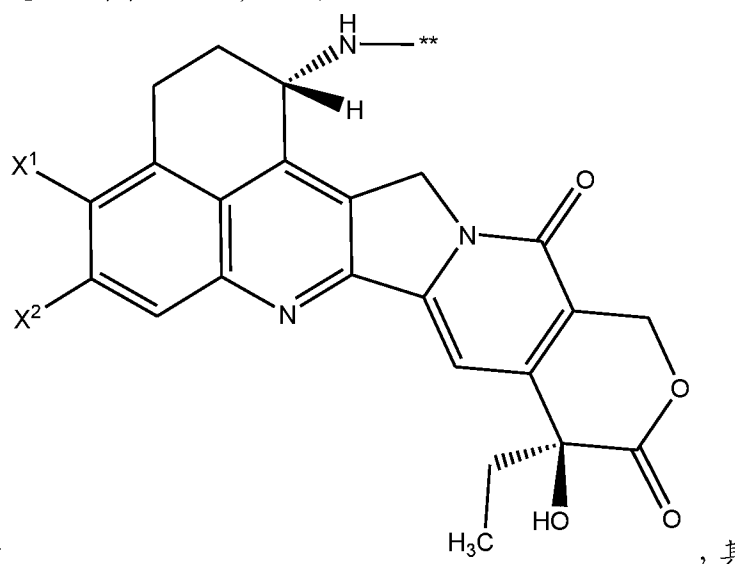
在一个或多个实施方式中, X^4 为 H 或 C1-C6 烷基。

在一个或多个实施方式中, 所述杂环为氮杂环丁烷、乙醛嗪、吗啉、吡咯烷、哌啶、咪唑、噻唑、噁唑或吡啶。

在一个或多个实施方式中, 所述氨基保护基为甲酰基、乙酰基、三苯甲基、叔丁氧基羰基、苄基或对甲氧基苄氧基羰基。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; **为连接点。



在一个或多个实施方式中, D 为
中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; **为连接点。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 -CH₃、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 -CH₃ 及 X^2 为 F。

在一个或多个实施方式中, R 为 -(CH₂)_r。

在一个或多个实施方式中, R 为 -(CH₂)_r, r 为 1 或 5。

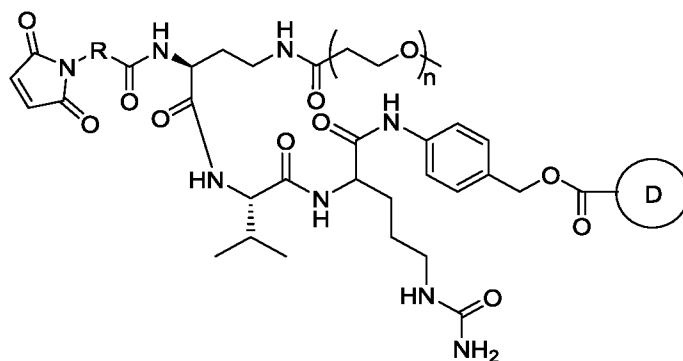
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

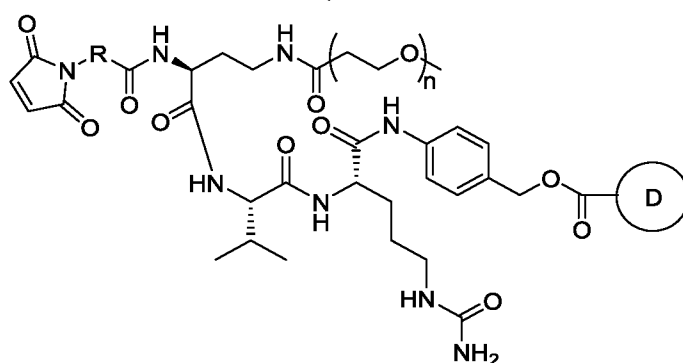
在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

在一个或多个实施方式中, 所述式 III 为:



式 III-2



式 III-2-1

其中

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ 亚芳基、 $-$ 亚芳基 $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ (C3-C8 碳环基) $-$ 、 $-(C3-C8$ 碳环基) $-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ (C3-C8 杂环基) $-$ 、 $-(C3-C8$ 杂环基) $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

D 为药物, 如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物;

n 为 1-24 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

在一个或多个实施方式中, D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中, 所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、及美登素(maytansine)类。

在一个或多个实施方式中, D 为奥瑞他汀(auristatin)类, 例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

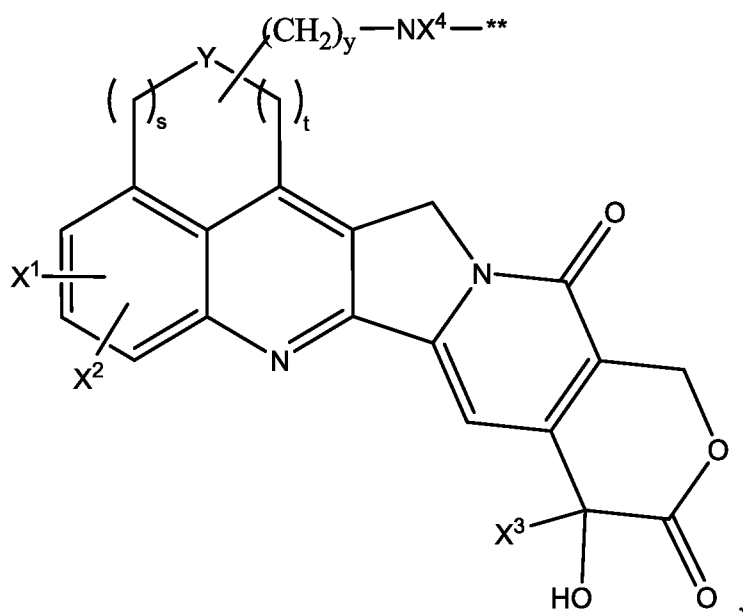
在一个或多个实施方式中, D 为 DNA 损伤剂, 例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

在一个或多个实施方式中, D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐, 例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树

碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡啶-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中，所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康，或其盐。

在一个或多个实施方式中，D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycine 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤，长春新碱，长春碱，柔红霉素，丝裂霉素 C，马法兰或苯丁酸氮芥衍生物。



在一个或多个实施方式中，D 为

其中

X¹ 和 X² 各自独立地为：

H，

羟基，

C1-C6 烷基，

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基，

C2-C6 烯基，

C2-C6 炔基，

C1-C6 烷氧基，

C1-C6 氨基烷氧基，

卤素，

硝基，

氰基，

巯基，

烷硫基，

氨基, 被氨基保护基取代的氨基, 在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基,

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基,

连接至杂环的 C1-C6 烷基, 所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代,

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基, 所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代, 所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代,

氨基取代的杂环基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代,

杂环氨基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代,

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基,

吗啉-1-基, 或

哌啶-1-基;

X^3 为 C1-C6 烷基;

X^4 为 H、 $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CHR^n)_q-CH_3$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_q-CH_3$ 、亚芳基- CH_3 、 $-(CH_2)_q$ -亚芳基- CH_3 、-亚芳基- $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 碳环基)- CH_3 、 $-(C3-C8$ 碳环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 杂环基)- CH_3 、 $-(C3-C8$ 杂环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、或 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$; 其中各 R^n 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 q 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

**为连接点;

y 为 0、1 或 2;

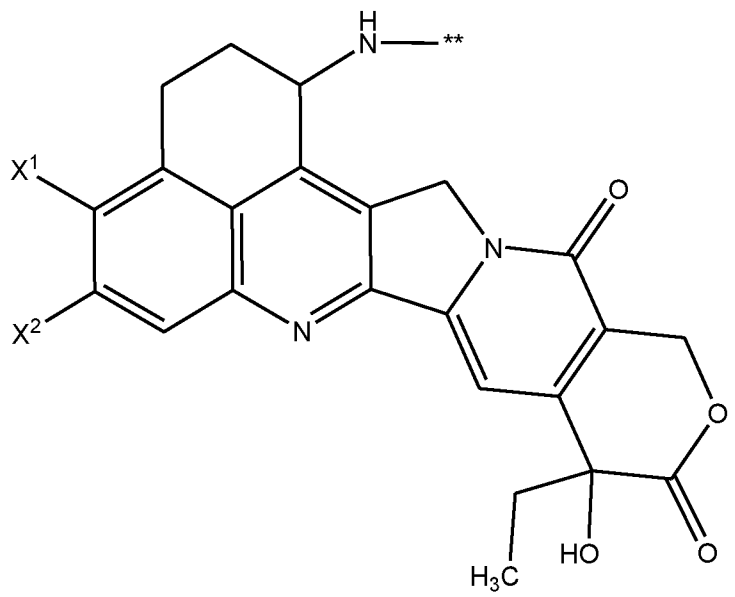
Y 为 O、S 或 CR^1R^2 , 其中 R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或 C1-C6 烷基;

s 和 t 各自独立为 0、1 或 2, 但不同时为 0。

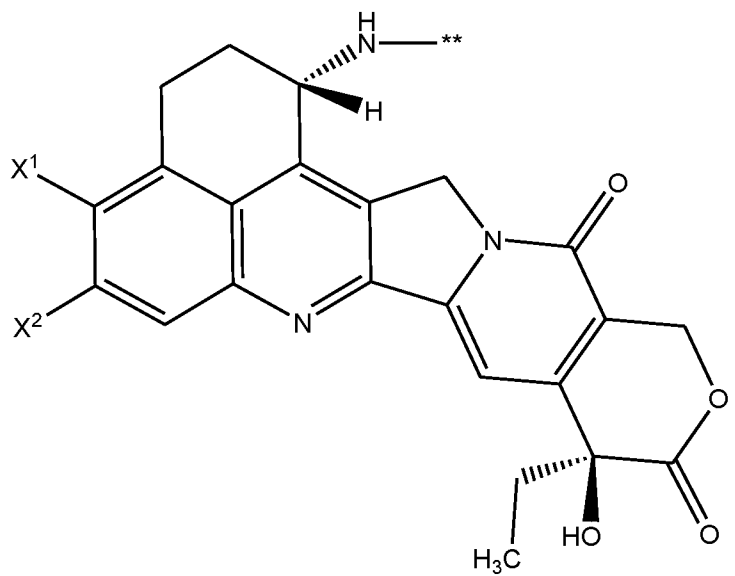
在一个或多个实施方式中, X^4 为 H 或 C1-C6 烷基。

在一个或多个实施方式中, 所述杂环为氮杂环丁烷、乙醛嗪、吗啉、吡咯烷、哌啶、咪唑、噻唑、噁唑或吡啶。

在一个或多个实施方式中, 所述氨基保护基为甲酰基、乙酰基、三苯甲基、叔丁氧基羰基、苄基或对甲氧基苄氧基羰基。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 为连接点。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 为连接点。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 $-CH_3$ 。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 $-CH_3$ 、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 $-CH_3$ 。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 $-CH_3$ 及 X^2 为 F。

在一个或多个实施方式中, R 为 $-(CH_2)_r$ 。

在一个或多个实施方式中, R 为 $-(CH_2)_r$, r 为 1 或 5。

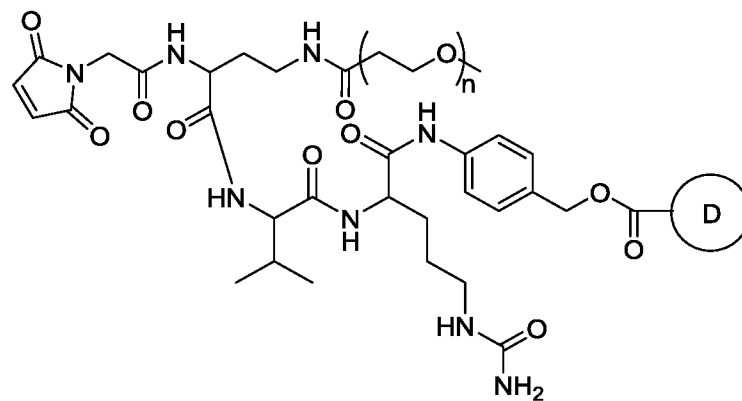
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

在一个或多个实施方式中，所述式 III 为：



式 III-3

其中

D 为药物，如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物；

n 为 1-24 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

在一个或多个实施方式中，D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中，所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、及美登素(maytansine)类。

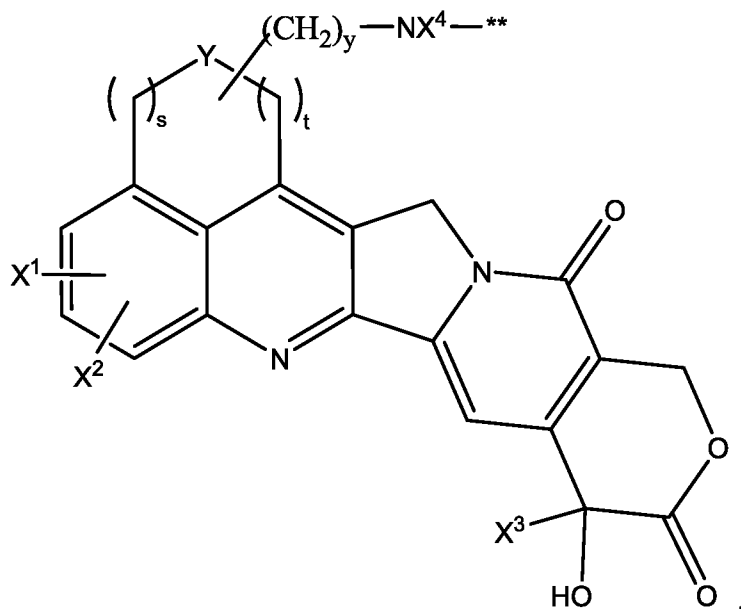
在一个或多个实施方式中，D 为奥瑞他汀(auristatin)类，例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 损伤剂，例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐，例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中，所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康，或其盐。

在一个或多个实施方式中，D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycine 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤，长春新碱，长春碱，柔红霉素，丝裂霉素 C，马法兰，或苯丁酸氮芥衍生物。



在一个或多个实施方式中, D 为

其中

X^1 和 X^2 各自独立地为:

H,

羟基,

C1-C6 烷基,

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基,

C2-C6 烯基,

C2-C6 炔基,

C1-C6 烷氧基,

C1-C6 氨基烷氧基,

卤素,

硝基,

氰基,

巯基,

烷硫基,

氨基, 被氨基保护基取代的氨基, 在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基,

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基,

连接至杂环的 C1-C6 烷基, 所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代,

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基, 所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代, 所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代,

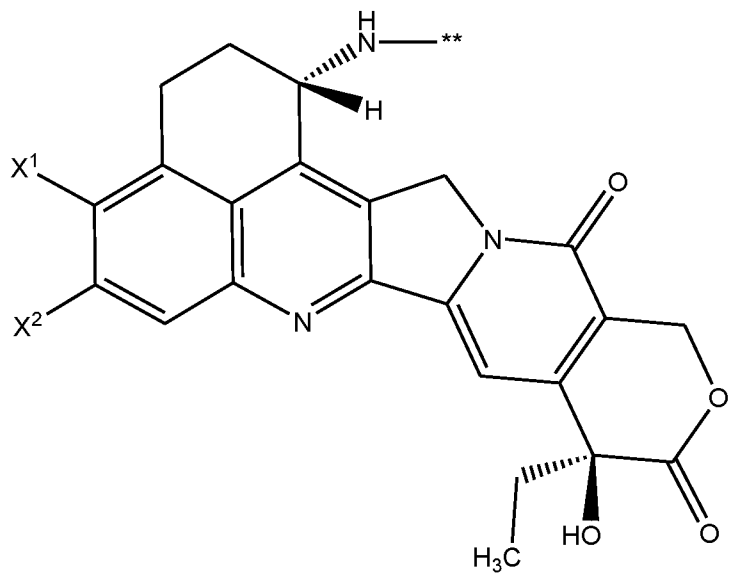
氨基取代的杂环基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代,

杂环氨基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代,

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基,

吗啉-1-基, 或

哌啶-1-基;



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 为连接点。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 -CH₃、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 -CH₃ 及 X^2 为 F。

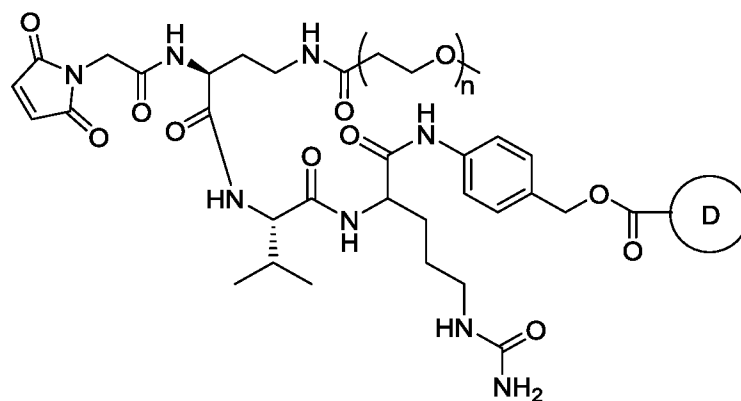
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

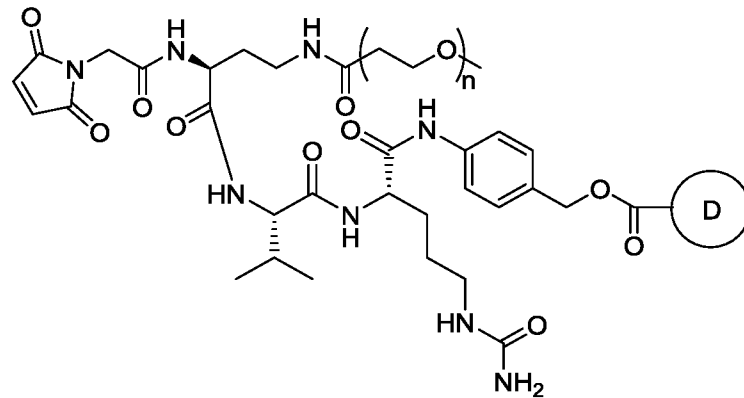
在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

在一个或多个实施方式中, 所述式 III 为:



式 III-4



式 III-4-1

其中

D 为药物，如抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物；

n 为 1-24 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。

在一个或多个实施方式中，D 为微管蛋白抑制剂 DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

在一个或多个实施方式中，所述微管蛋白抑制剂选自海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)类、及美登素(maytansine)类。

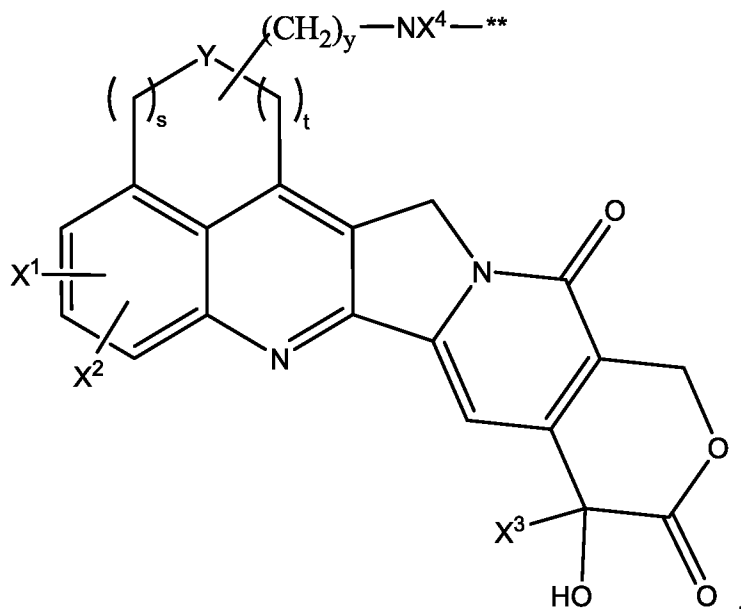
在一个或多个实施方式中，D 为奥瑞他汀(auristatin)类，例如单甲基奥瑞他汀 E(monomethyl auristatin E; MMAE)、单甲基奥瑞他汀 F(monomethyl auristatin F; MMAF)、和奥瑞他汀 F(auristatin F; AF)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 损伤剂，例如卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。

在一个或多个实施方式中，D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂或其盐，例如伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡啶-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。

在一个或多个实施方式中，所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱、10-羟基喜树碱、拓扑替康、贝洛替康、伊立替康、22-羟基早莲木碱或依喜替康，或其盐。

在一个或多个实施方式中，D 为 Tubulysin 类、紫杉类药物衍生物、leptomycine 衍生物、CC-1065 及其类似物、Amatoxin 类、剪接体抑制剂、苯(并)二卓氮(PBD)二聚体类、阿霉素、甲氨蝶呤，长春新碱，长春碱，柔红霉素，丝裂霉素 C，马法兰，或苯丁酸氮芥衍生物。



在一个或多个实施方式中，D 为
其中

X¹ 和 X² 各自独立地为：

H，

羟基，

C1-C6 烷基，

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基，

C2-C6 烯基，

C2-C6 炔基，

C1-C6 烷氧基，

C1-C6 氨基烷氧基，

卤素，

硝基，

氰基，

巯基，

烷硫基，

氨基，被氨基保护基取代的氨基，在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基，

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基，

连接至杂环的 C1-C6 烷基，所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代，

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基，所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代，所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代，

氨基取代的杂环基，其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代，

杂环氨基，其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代，

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基，

吗啉-1-基，或

哌啶-1-基；

X³ 为 C1-C6 烷基;

X⁴ 为 H、-(CH₂)_q-CH₃、-(CHRⁿ)_q-CH₃、C3-C8 碳环基、-O-(CH₂)_q-CH₃、亚芳基-CH₃、-(CH₂)_q-亚芳基-CH₃、-亚芳基-(CH₂)_q-CH₃、-(CH₂)_q-(C3-C8 碳环基)-CH₃、-(C3-C8 碳环基)-(CH₂)_q-CH₃、C3-C8 杂环基、-(CH₂)_q-(C3-C8 杂环基)-CH₃、-(C3-C8 杂环基)-(CH₂)_q-CH₃、-(CH₂)_qC(O)NRⁿ(CH₂)_q-CH₃、-(CH₂CH₂O)_q-CH₃、-(CH₂CH₂O)_q-CH₂-CH₃、-(CH₂)_qC(O)NRⁿ(CH₂CH₂O)_q-CH₃、-(CH₂)_qC(O)NRⁿ(CH₂CH₂O)_q-CH₂-CH₃、-(CH₂CH₂O)_qC(O)NRⁿ(CH₂CH₂O)_q-CH₃、-(CH₂CH₂O)_qC(O)NRⁿ(CH₂CH₂O)_q-CH₂-CH₃、或-(CH₂CH₂O)_qC(O)NRⁿ(CH₂)_q-CH₃；其中各 Rⁿ独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基；并且各 q 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

**为连接点:

y 为 0、1 或 2;

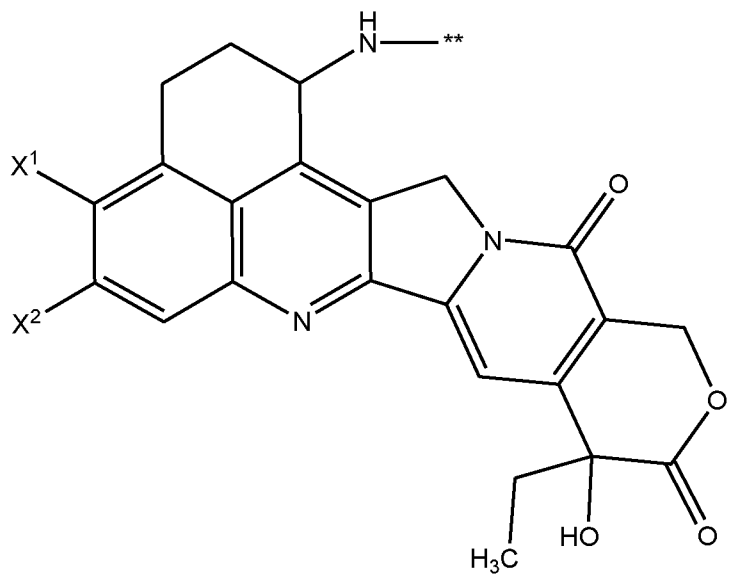
Y 为 O、S 或 CR^1R^2 ，其中 R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或 C1-C6 烷基；

s 和 t 各自独立为 0、1 或 2，但不同时为 0。

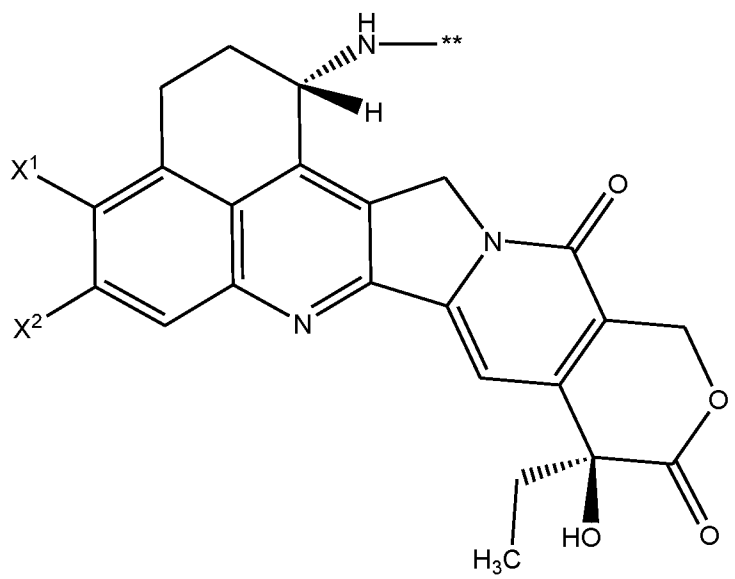
在一个或多个实施方式中，X⁴为H或C1-C6烷基。

在一个或多个实施方式中，所述杂环为氮杂环丁烷、乙醛嗪、吗啉、吡咯烷、哌啶、咪唑、噻唑、噁唑或吡啶。

在一个或多个实施方式中，所述氨基保护基为甲酰基、乙酰基、三苯甲基、叔丁氧羰基、苄基或对甲氧基苄氧羰基。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X¹ 和 X² 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 为连接点。



在一个或多个实施方式中, D 为
其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或 -OH; ** 为连接点。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F、Cl、Br 或 I。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自为 F。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 -CH₃、F 或 -OH。

在一个或多个实施方式中, X^1 和 X^2 各自独立地为 F 或 -CH₃。

在一个或多个实施方式中, X^1 为 -CH₃ 及 X^2 为 F。

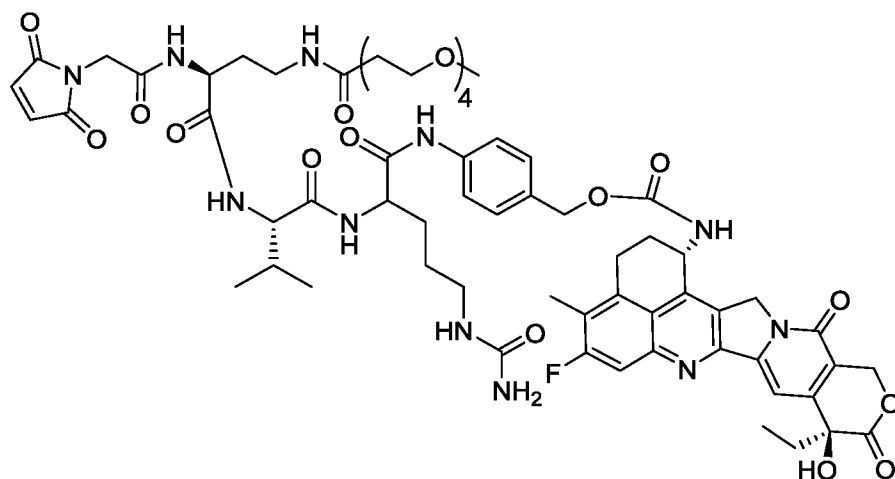
在一个或多个实施方式中, n 为 4-12。

在一个或多个实施方式中, n 为 4-8。

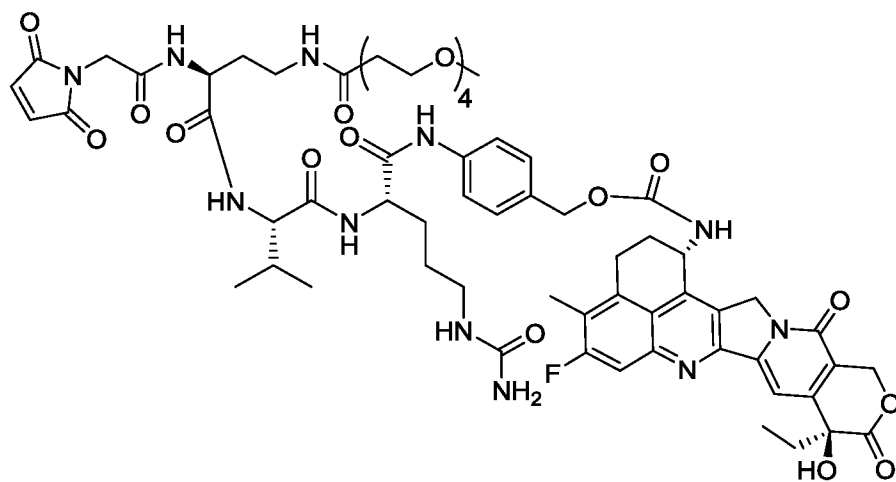
在一个或多个实施方式中, n 为 4。

在一个或多个实施方式中, n 为 8。

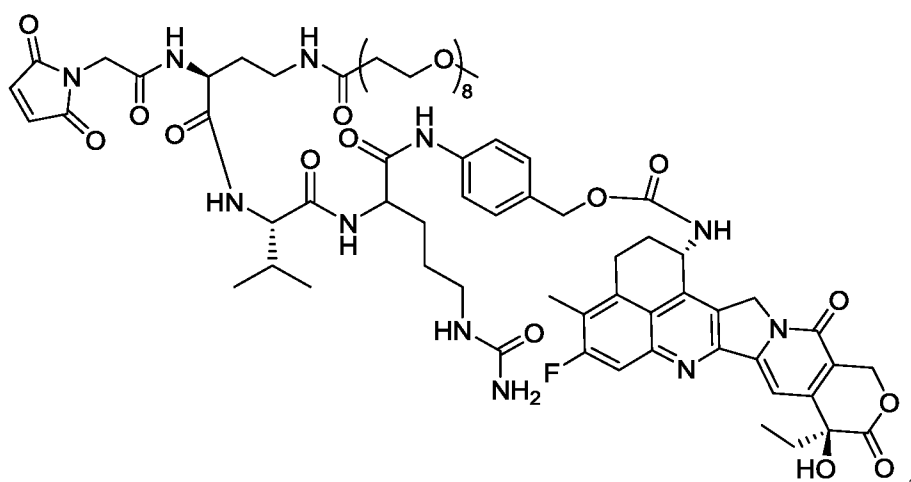
在一个或多个实施方式中, 式 III 选自以下结构:



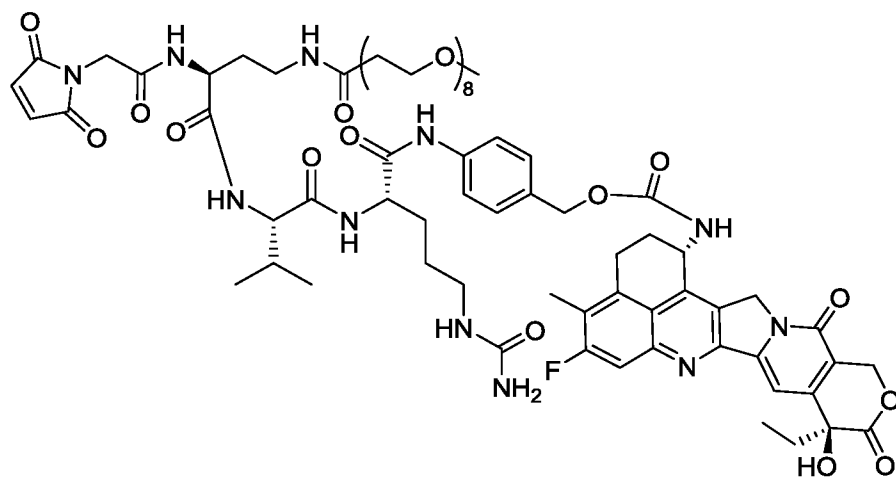
式 III-5



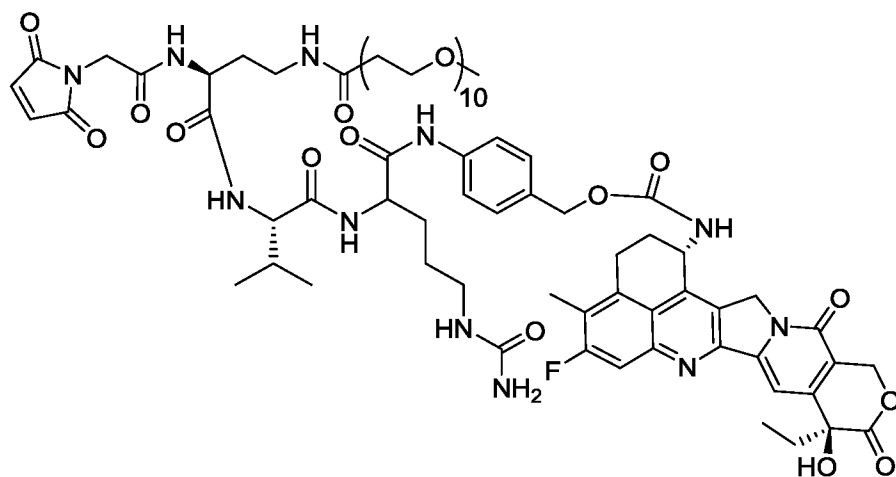
式 III-5-1



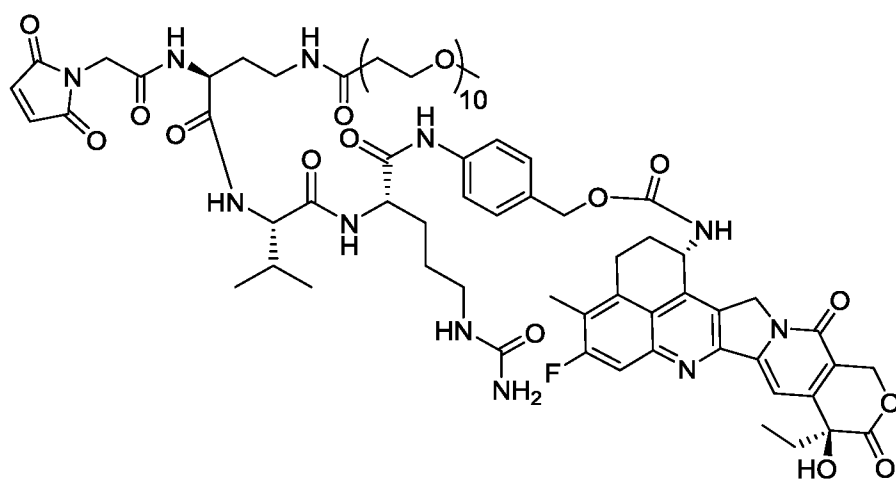
式 III-6



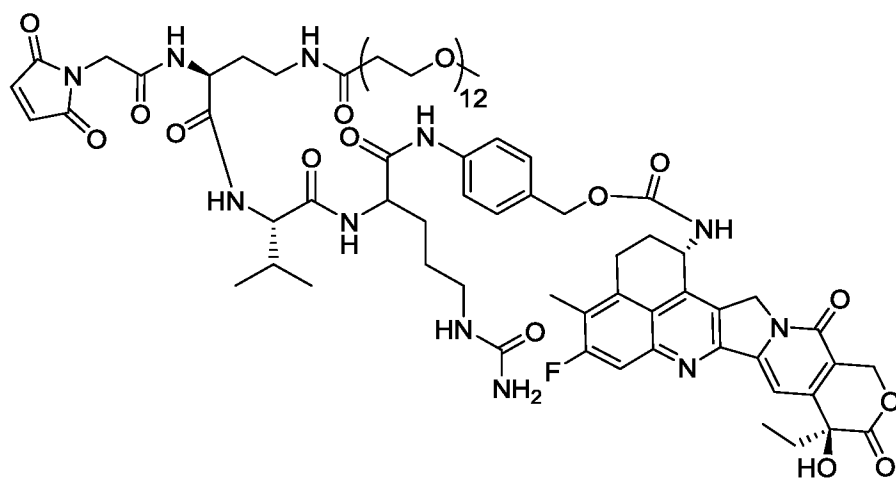
式 III-6-1



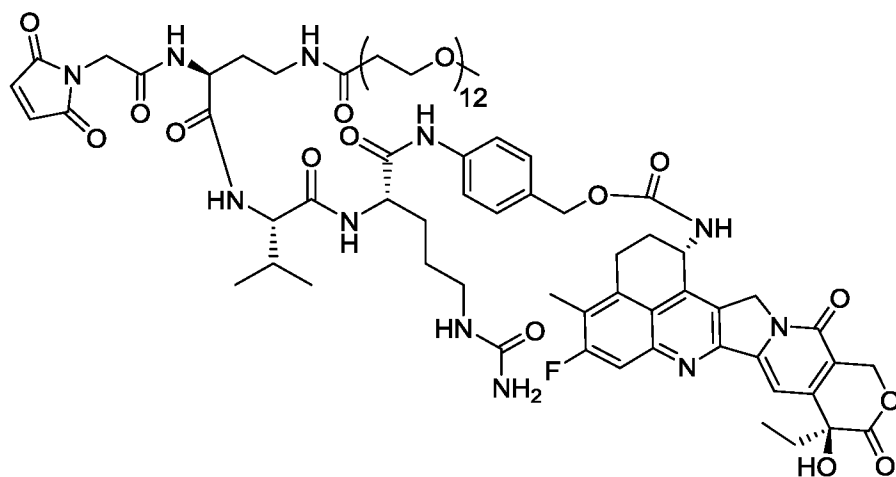
式 III-7



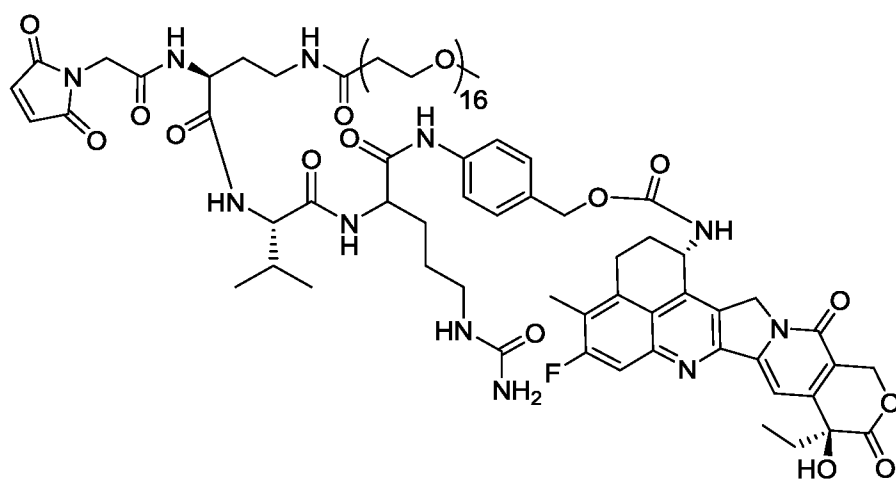
式 III-7-1



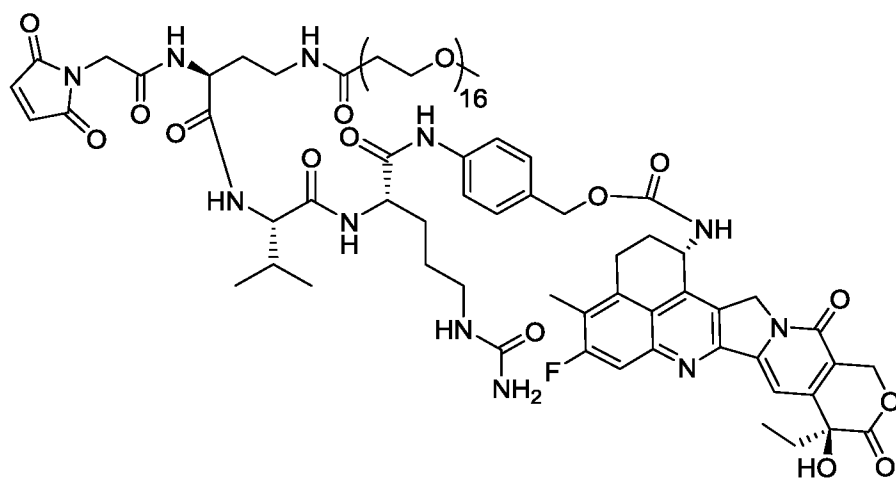
式 III-8



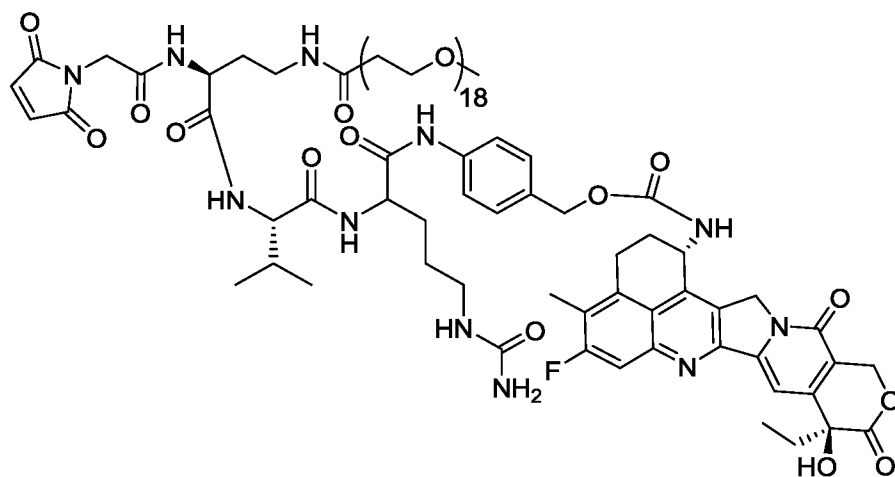
式 III-8-1



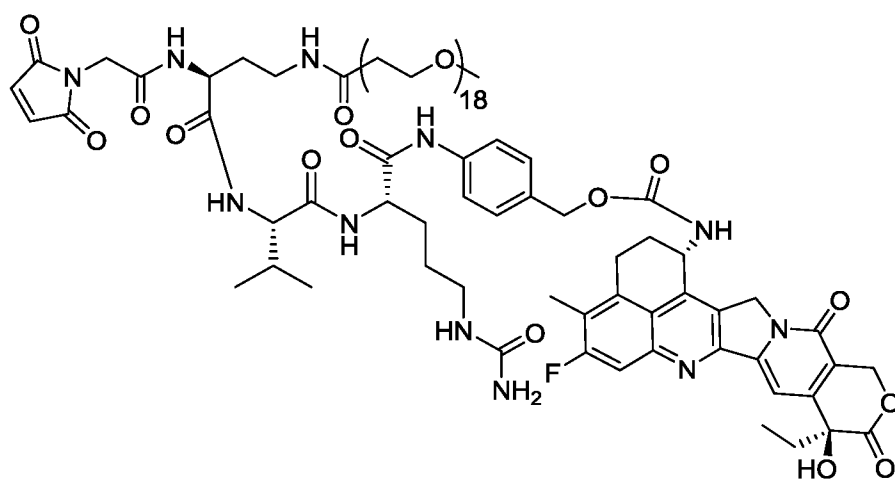
式 III-9



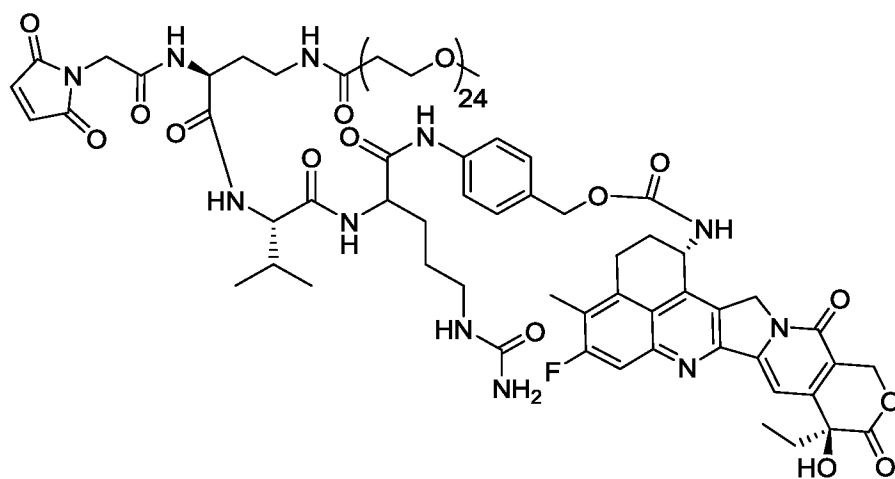
式 III-9-1



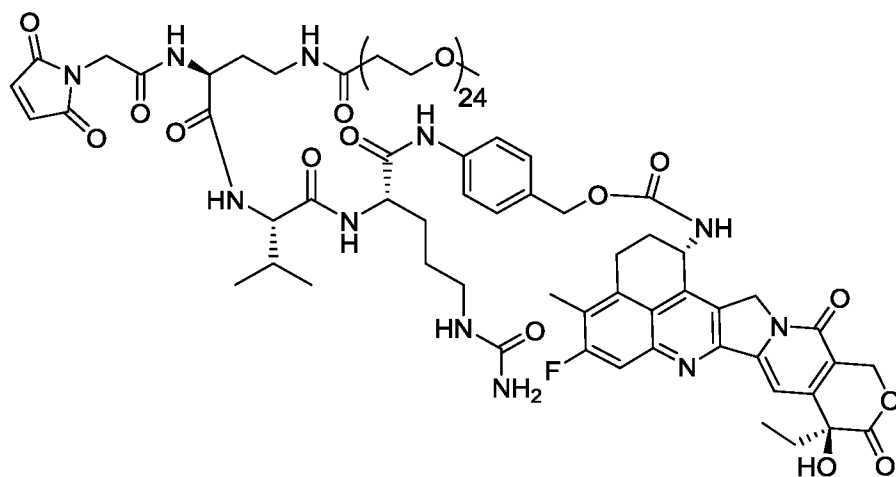
式 III-10



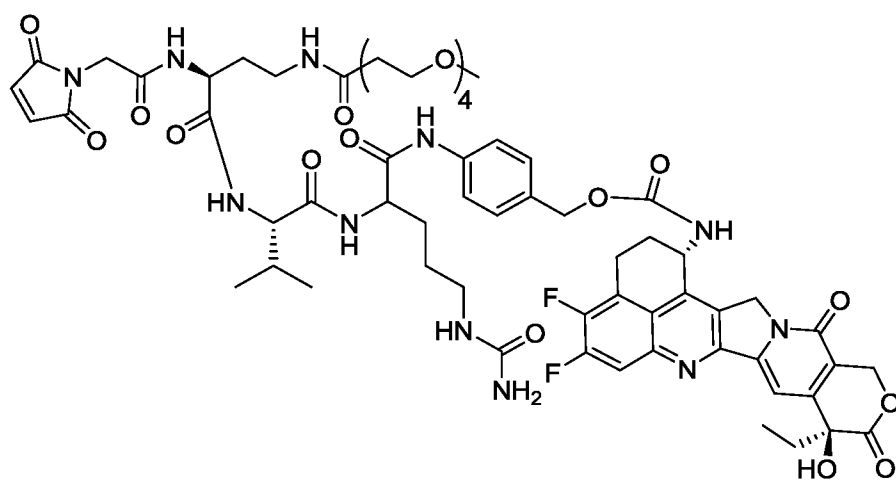
式 III-10-1



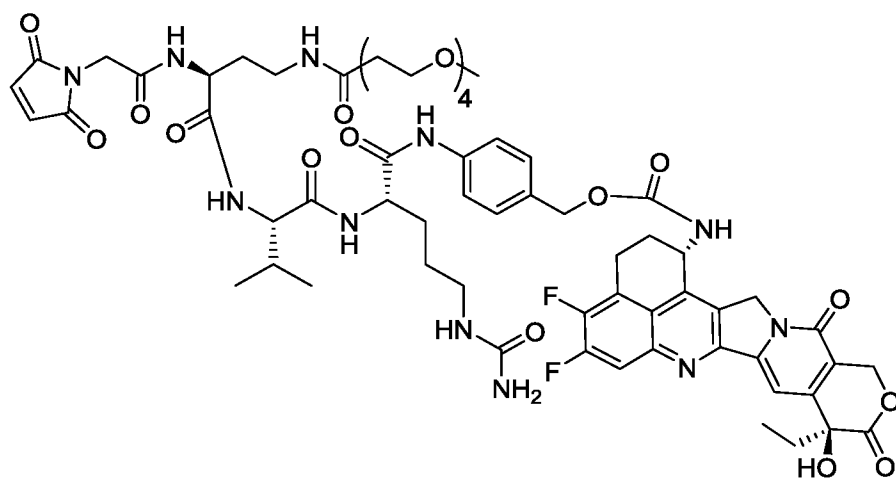
式 III-11



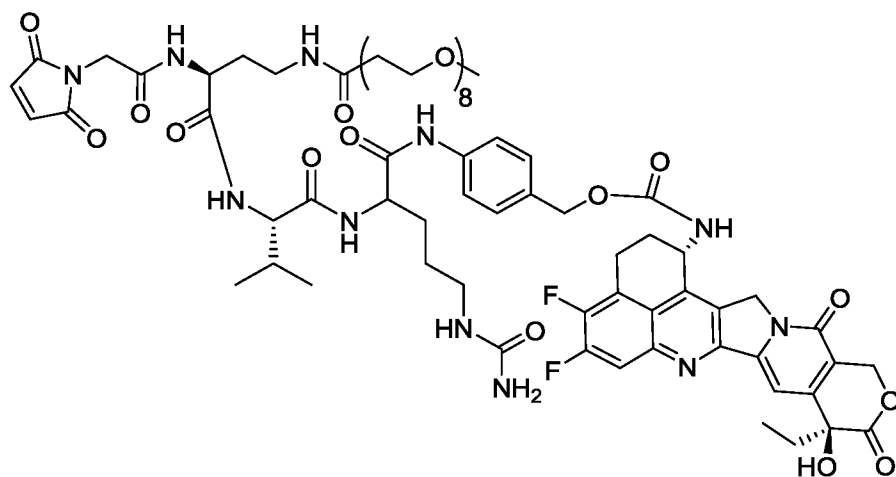
式 III-11-1



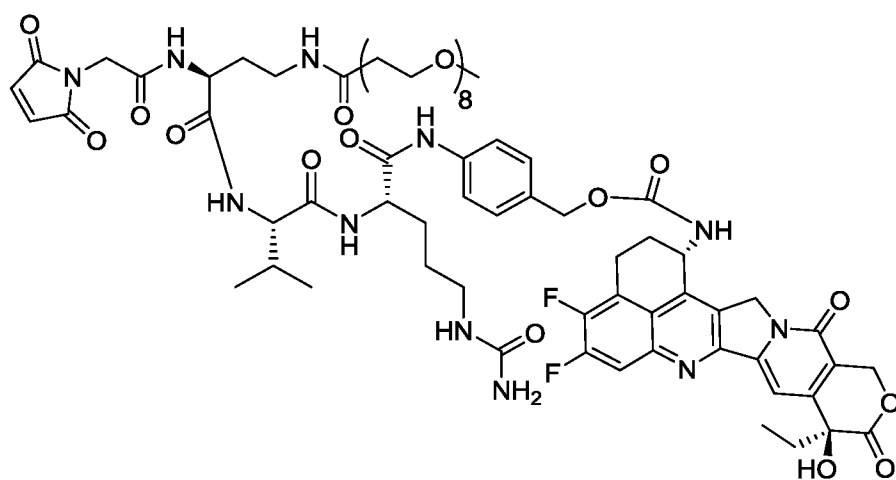
式 III-12



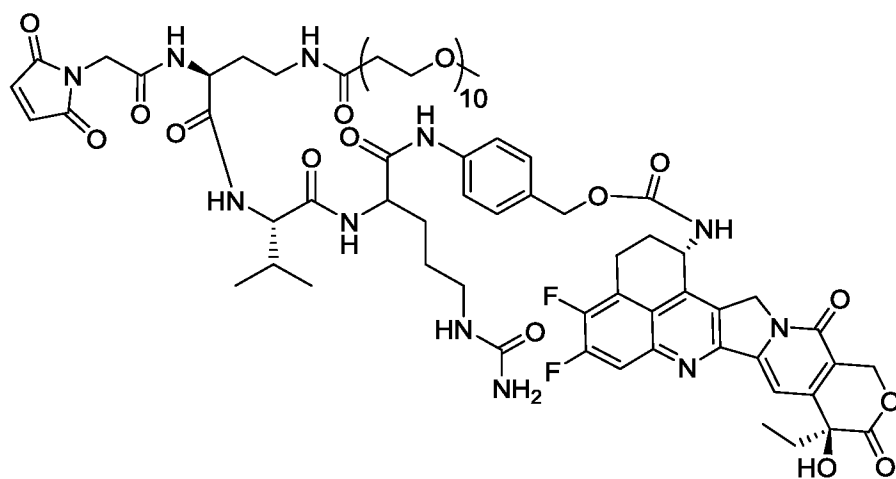
式 III-12-1



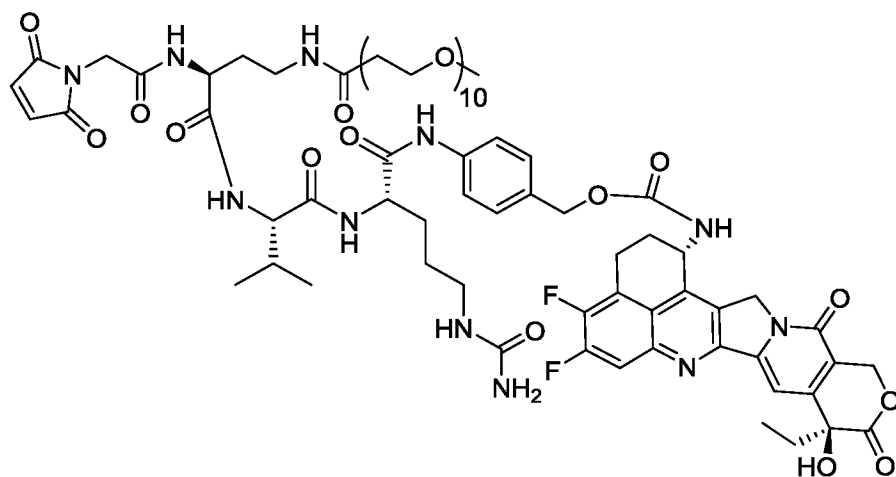
式 III-13



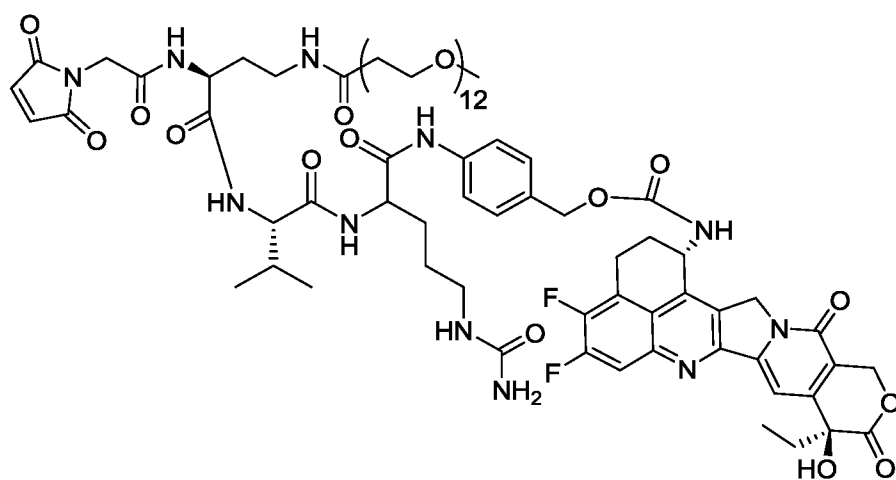
式 III-13-1



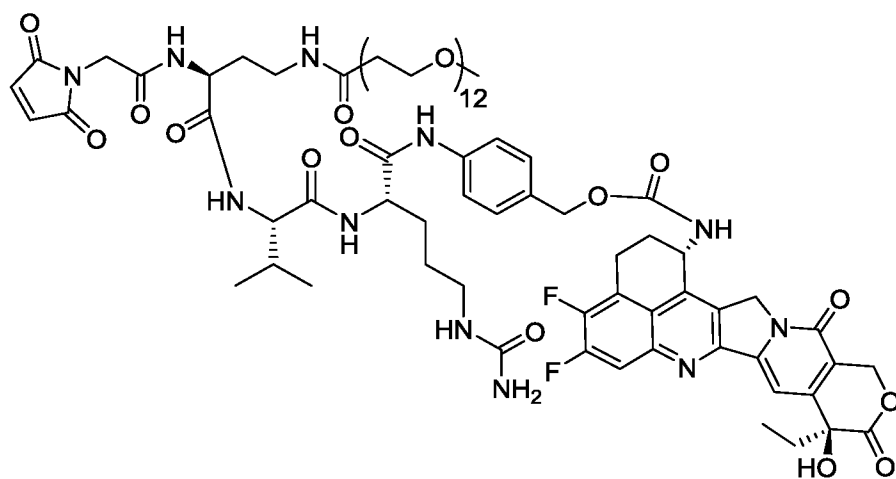
式 III-14



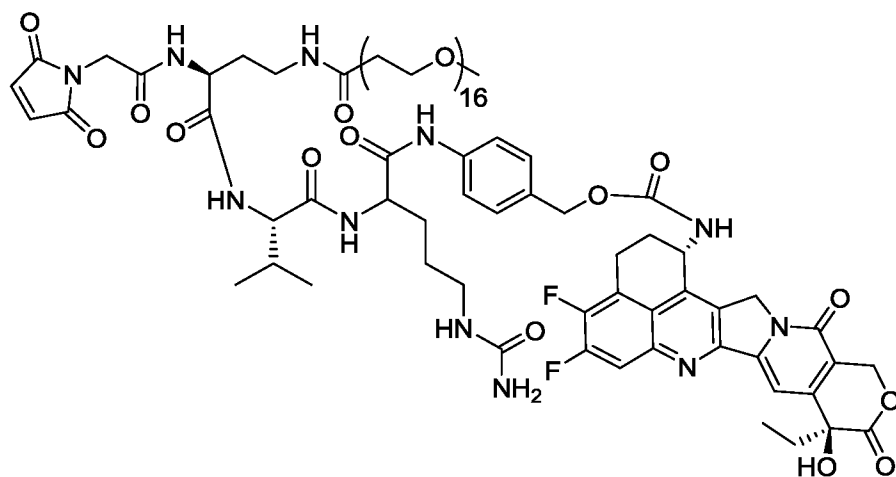
式 III-14-1



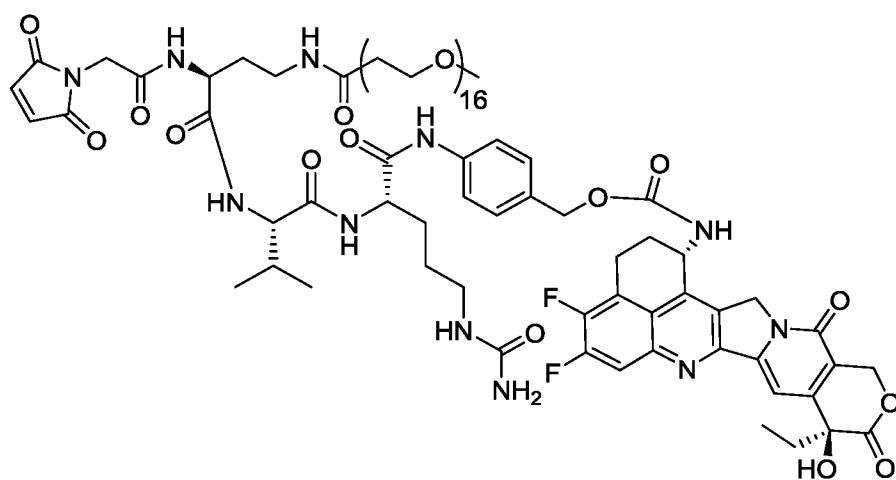
式 III-15



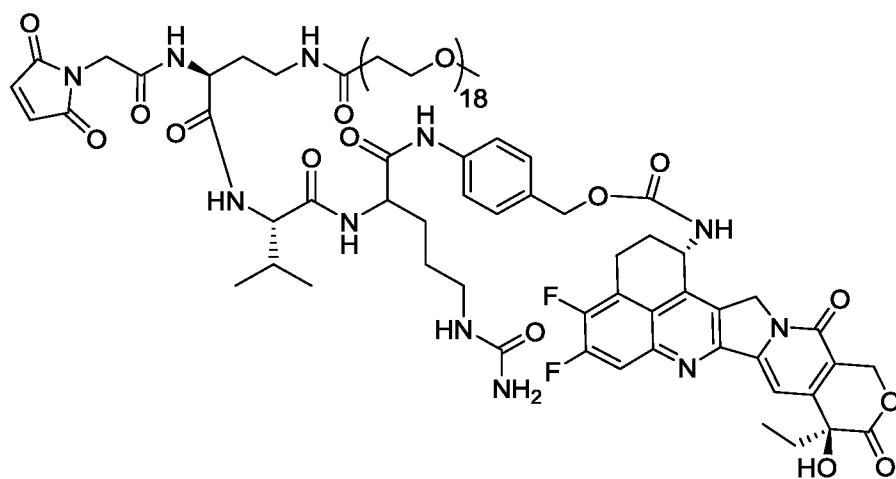
式 III-15-1



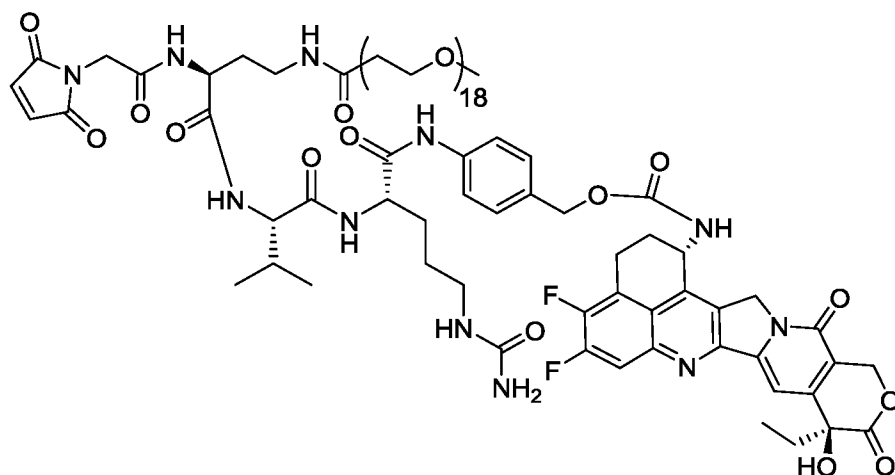
式 III-16



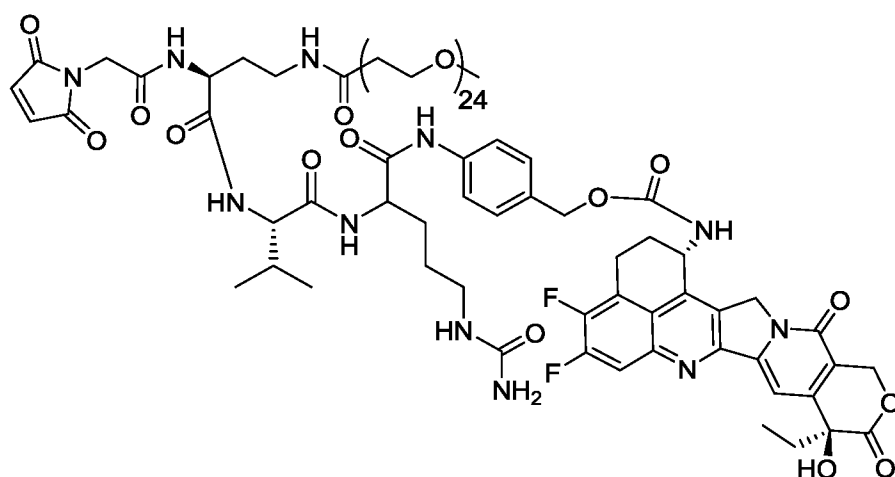
式 III-16-1



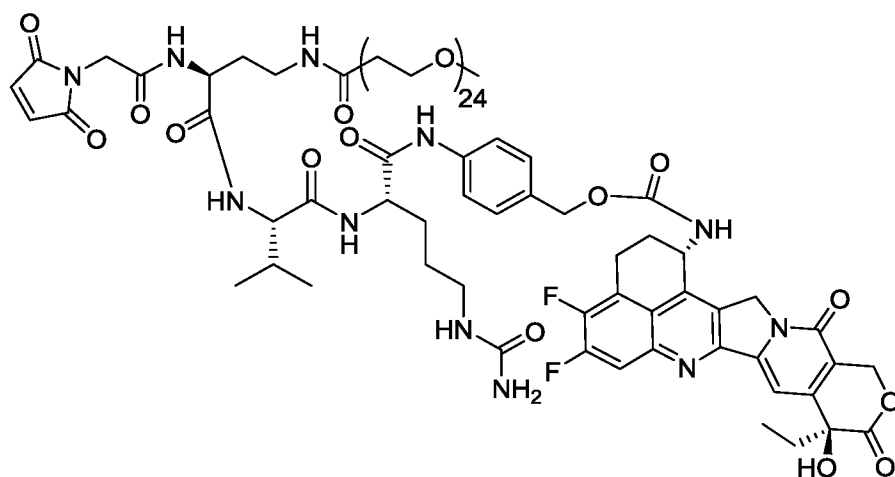
式 III-17



式 III-17-1



式 III-18



式 III-18-1

一个或多个实施方式提供了化合物(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-4,5-二氟-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H 苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13, 或者其药学上可接受的盐或溶剂合物。

一个或多个实施方式提供了药物组合物, 其包含药物偶联物, 如抗体药物偶联物, 或者其药学上可接受的盐或溶剂合物以及药物可接受的载体、赋形剂和/或辅料, 以及任选的

其他抗癌药物。药物组合物可以通过任何方便的途径施用，例如通过输注或推注，通过上皮或皮肤粘膜（例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等）吸收，并且可以与其他生物活性剂共同施用。因此，所述药物组合物可以静脉给药、皮下给药、口服给药、直肠给药、肠胃外给药、脑池内给药、阴道内给药、腹腔内给药、外敷（如通过粉末，软膏，滴剂或透皮贴剂）、口腔给药或通过口服或鼻腔喷雾给药。

在一些实施方案中，术语“药物可接受的载体”通常指是任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂等。

术语“载体”是指可以与活性成分一起施用于患者的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这此类药物载体可以是无菌液体，如水和油，包括石油、动植物或合成来源的油，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物静脉内给药时，水是优选的载体。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体，特别是用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如有需要，组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯、抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠、螯合剂如乙二胺四乙酸，以及调节张力的试剂如氯化钠或右旋葡萄糖也是可以预见的。这些组合物可以采取溶液、悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、散剂、缓释制剂等形式。该组合物可以用传统的粘合剂和载体如甘油三酯配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体，例如药物等级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的实例在 E. W. Martin 的 *Remington's Pharmaceutical Sciences* 中有描述，在此通过引用并入本发明。此类组合物将含有临床有效剂量的抗体或抗原结合片段，优选以纯化后的形式，连同合适数量的载体，以提供适合于患者的给药形式。该制剂应该适用于给药模式。亲本制剂可以封装在安瓿瓶、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

在一些实施方案中，根据常规步骤将组合物配制成适合静脉内注射于人体的药物组合物。用于静脉内给药的组合物通常是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因，从而缓解注射部位的疼痛。一般而言，有效成分以单位剂量形式单独供给或混在一起供给，如以干燥的冻干粉末或无水浓缩物的形式装在可指示活性剂份量的密封容器（如安瓿瓶或小袋）中。在通过输注施用组合物的情况下，可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶来分装组合物。在通过注射施用组合物的情况下，可以使用注射用的无菌水或盐水的安瓿瓶，使得可以在施用之前混合有效成分。

一个或多个实施方式提供了药物偶联物在制备用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的药物中的用途。

在一个或多个实施方式中，所述药物偶联物与其他抗癌药物联合使用。

一个或多个实施方式提供了连接子或中间体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物在制备药物偶联物，如抗体药物偶联物，或者其药学上可接受的盐或溶剂合物中的用途。

药学上可接受的盐包括药物偶联物，如抗体药物偶联物，与该技术领域众所周知的各种各样的有机和无机抗衡离子产生的药学上可接受的盐，仅仅示例性盐包括，当分子含有酸性官能团时，有机或无机盐如钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、铵盐、异丙胺、三甲胺、二乙胺基、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二甲胺基乙醇、2-二乙胺基乙醇、二环己基胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡糖胺、甲葡糖胺、可可碱、嘌呤、嘧啶、N-乙基、吡啶、多胺树脂及四烷基铵盐等；以及当分子含有碱性官能团时，有机或无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、醋酸盐、马来酸盐和草酸盐。酸的其它非限制例子包括硫酸、硝酸、磷酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、丙二酸、

琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸水杨酸等。溶剂合物包括水合物。这些盐通常可以通过常规方法通过使例如适当的酸或碱与本发明 ADC 反应来制备。

一个或多个实施方式提供了治疗癌症的方法，该方法包括对患者施用有效量的抗体药物偶联。所述有效量是指活性化合物或药剂的量，其导致研究人员、兽医、医生或其他临床医生正寻求的组织、系统、动物、个体以及人的生物或药用响应，这包含治疗一种疾病。

通常，合适的剂量范围可以是约 0.1~100 毫克/千克，给药频率可以例如是每月给药一次，每两周给药一次，每三周给药一次，每三周给药两次，每四周给药三次，每周给药一次，每周给药两次等。例如，给药方式可以是静脉输注，静脉推注，也可以是皮下注射、肌肉注射等。

一个或多个实施方式提供了药物偶联物，如抗体药物偶联物，其用作药物。

一个或多个实施方式提供了药物偶联物，如抗体药物偶联物，或包含药物偶联物，如抗体药物偶联物，的药物组合物在制备治疗和/或预防疾病的药物中的应用。

一个或多个实施方式提供了药物偶联物，如抗体药物偶联物，其用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病；所述癌症包括三阴性乳腺癌、胶质母细胞瘤、神经管细胞瘤、尿路上皮癌、乳腺癌、头颈癌、肾癌（透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌）、卵巢癌（如卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤）、胰腺癌、胃癌、卡波西肉瘤、肺癌（如小细胞肺癌和非小细胞肺癌）、宫颈癌、结肠直肠癌、食管癌、口腔鳞状细胞癌、前列腺癌、甲状腺癌、膀胱癌、神经胶质瘤、肝胆管癌、结肠直肠癌、T 细胞淋巴瘤、子宫癌、肝癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经母细胞瘤、肉瘤（如滑膜肉瘤和癌肉瘤）、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病（例如，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）、骨癌、皮肤癌（如基底细胞癌和鳞状细胞癌）、胰癌、恶性黑色素瘤、小肠癌、睾丸胚胎性癌、胎盘绒毛膜癌、睾丸癌、淋巴瘤（例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤）。

一个或多个实施方式提供了制品，其包含药物偶联物或者药物组合物；

容器；和

包装插页、说明书或标签，其指示该化合物或者组合物用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

附图说明

图 1 表示 CHO-CLDN18.2 细胞流式检测结果，图中从左至右依次是 CHO 细胞和 CHO-CLDN18.2 细胞；

图 2 表示 ADC8、ADC10、ADC11 及 ADC12 对 CHO-CLDN18.2 细胞增殖抑制剂量曲线。

图 3 表示 ADC1 旁观者效应。

图 4 表示 ADC4 旁观者效应。

图 5 表示 ADC9、ADC11 及 ADC12 旁观者效应。

图 6 表示 ADC14 的旁观者效应。

图 7 表示 ADC16 的旁观者效应。

图 8 表示 ADC4 大鼠体内血药浓度变化。

图 9 表示 ADC4 抑制肿瘤生长的作用。

图 10 表示 ADC1 和 ADC2 抑制肿瘤生长的作用。

图 11 表示 ADC4 和 ADC6 抑制肿瘤生长的作用。

图 12 表示 ADC9、ADC11 和 ADC12 抑制肿瘤生长的作用。

图 13 表示 ADC9、ADC11、ADC12 和 ADC13 在 GA0006 异种移植模型中各组小鼠肿瘤重量 (平均值 ± 标准误)。

图 14 表示 ADC14 的体内肿瘤抑制活性。

图 15 表示 ADC16 的体内肿瘤抑制作用。

图 16 表示 ADC16 的体内肿瘤抑制作用。

具体实施方式

“烷基”指饱和脂肪族烃基基团，该术语包括直链和支链烷基。例如，C1-C20 烷基，如 C1-C6 烷基。C1-C20 烷基指具有 1 至 20 个碳原子的烷基，例如具有 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子、4 个碳原子、5 个碳原子、6 个碳原子、7 个碳原子、8 个碳原子、9 个碳原子、10 个碳原子、11 个碳原子、12 个碳原子、13 个碳原子、14 个碳原子、15 个碳原子、16 个碳原子、17 个碳原子、18 个碳原子、19 个碳原子或 20 个碳原子的烷基。烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、新戊基、正己基等。所述烷基可以是非取代的或被一个或多个取代基所取代，所述取代基包括但不限于烷基、烷氧基、氰基、羟基、羰基、羧基、芳基、杂芳基、胺基、卤素、磺酰基、亚磺酰基、膦酰基等。

“碳环基”是指仅仅由碳和氢原子组成的稳定的非芳香族的单环或多环的烃自由基，其可包括稠合或桥接环系统，具有 3 至 15 个碳原子，例如具有 3 至 10 个（例如 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）碳原子，并且其是饱和的或不饱和的并且通过单键与分子的剩余部分连接。单环自由基包括，例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。多环自由基包括，例如金刚烷基、降冰片基、十氢萘基等。当在说明书中具体说明时，碳环基可被独立地选自下列中的一种或多种取代基任选取代：烷基、卤素、卤代烷基、氰基、硝基、氧代、芳基、芳烷基、碳环基、碳环基烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基、杂芳基烷基。

“芳基”指具有完全共轭的 π 电子体系的全碳单环或全碳稠合环，通常具有 5-14 个碳原子，例如，6 个、10 个、12 个、14 个碳原子。芳基可以是非取代的，或被一个或多个取代基所取代，所述取代基包括但不限于烷基、烷氧基、氰基、羟基、羧基、芳基、芳烷基、胺基、卤素、磺酰基、亚磺酰基、膦酰基。非取代的芳基实例包括但不限于苯基、萘基和蒽基。

“杂环基”是指稳定的 3 元至 18 元芳香性或非芳香性环取代基，其由 2 至 8 个（例如 2、3、4、5、6、7 或 8 个）碳原子和选自氮、氧和硫中的 1 至 6 个（1、2、3、4、5 或 6 个）杂原子组成。除非在说明书中另外具体说明，杂环基可以是单环、双环、三环或四环环系统，其可以包括稠合或桥接环系统；且杂环基中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化；氮原子任选地被季铵化；且杂环基可以部分或完全饱和。此类杂环基的实例包括但不限于，二氧戊环基、二噁英基、噻吩基[1,3]二噻烷基、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噻唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、噻唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、哌咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、1,2,4-亚噻二唑-5(4H)-基、四氢吡喃基、三氧杂环己基、三噻烷基、三嗪烷基(triazinanyl)、四氢吡喃基、硫代吗啉基、硫代吗啉基(thiamorpholinyl)、1-氧代-硫代吗啉基和 1,1-二氧代-硫代吗啉基。当在说明书中具体说明时，杂环基可以被选自下列中的一个或多个取代基任选取代：烷基、烯基、卤素、卤代烷基、氰基、氧代、硫代(thioxo)、硝基、芳基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、任选取代的杂环基、任选取代的杂环基烷基、

任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳基烷基。

“烷氧基”是指式-O-(烷基)，其中烷基为本文定义的烷基。烷氧基的非限制性列举为甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基(异丙氧基)、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基。烷氧基可为取代的或未取代的。

“卤素”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)、或碘(I)。

“氨基”指-NH₂。

“氰基”，是指-CN。

“硝基”指-NO₂。

“羟基”，是指-OH。

“羧基”，是指-COOH。

“巯基”是指-SH。

“羰基”是指C=O。

“多肽”指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的两个或更多个氨基酸单体构成的分子，可以包括二肽、三肽、四肽、寡肽等。

“氨基酸”是指既含氨基又含羧基的有机化合物，比如 α -氨基酸和 β -氨基酸。氨基酸包括丙氨酸(三字母代码: Ala, 一字母代码: A)、精氨酸(Arg, R)、天冬酰胺(Asn, N)、天冬氨酸(Asp, D)、半胱氨酸(Cys, C)、谷氨酰胺(Gln, Q)、谷氨酸(Glu, E)、甘氨酸(Gly, G)、组氨酸(His, H)、异亮氨酸(Ile, I)、亮氨酸(Leu, L)、赖氨酸(Lys, K)、甲硫氨酸(Met, M)、苯丙氨酸(Phe, F)、脯氨酸(Pro, P)、丝氨酸(Ser, S)、苏氨酸(Thr, T)、色氨酸(Trp, W)、酪氨酸(Tyr, Y)、缬氨酸(Val, V)、肌氨酸(Sar)、茶氨酸(Thea)、 γ -脯氨酸(Hypro)、 γ -赖氨酸(Hylys)、 β -氨基异丁酸(β -AiBA)、瓜氨酸(Cit)和 β -丙氨酸(β -Ala)等。

本领域技术人员理解当氨基酸或多肽作为一个分子(如抗体或ADC)的组成部分时，氨基酸或多肽指氨基酸残基或多肽残基(不论是否写明)，即其在该分子的其他部分结合时，其部分基团(例如其氨基一个氢原子和/或羧基的羟基)因其与分子的其他部分形成共价键(如酰胺键)而失去后的剩余部分。

抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的微小变化都涵盖在本公开之内，条件是氨基酸序列的同一性保持至少75%、如至少80%、90%、95%并又如99%。在一个或多个实施方式中，变化为保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是在其侧链中相关的氨基酸家族内发生的取代。基因编码的氨基酸大致分以下类：(1)酸性氨基酸为天冬氨酸盐、谷氨酸盐；(2)碱性氨基酸为赖氨酸、精氨酸、组氨酸；(3)非极性氨基酸为丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；以及(4)无电荷的极性氨基酸为甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。其它家族的氨基酸包括(i)脂肪族-羟基家族的丝氨酸和苏氨酸；(ii)含酰胺家族的天冬酰胺和谷氨酰胺；(iii)脂肪族家族的丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；以及(iv)芳族家族的苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。在一个或多个实施方式中，保守氨基酸取代组为：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸、以及天冬酰胺-谷氨酰胺。例如，可以合理地预测用异亮氨酸或缬氨酸单独的置换亮氨酸，用谷氨酸盐置换天冬氨酸盐，用丝氨酸置换苏氨酸，或用一个结构相关的氨基酸类似的置换一个氨基酸，且对所得分子的结合或特性不会有重要影响，特别是该置换不涉及结合位点内的氨基酸。氨基酸改变是否产生功能性肽可以容易地通过测定多肽衍生物的比活性来确定。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可由本领域普通技术人员容易地制备。

在一个或多个实施方式中，氨基酸取代具有如下效果：(1)降低对蛋白水解作用的敏感性，(2)降低对氧化作用的敏感性，(3)改变用于形成蛋白复合物的结合亲和力，(4)改变结合亲和力，和(5)赋予或改进此类类似物的其它物理化学或功能特性。类似物可包括序列不同于天然存在的肽序列的各种突变蛋白。例如，可在天然存在的序列（优选在形成分子间接触的结构域之外的多肽部分中）中进行单个或多个氨基酸取代（优选保守氨基酸取代）。保守氨基酸取代不应当显著改变亲本序列的结构特性（例如，置换的氨基酸不应当趋于破坏亲本序列中存在的螺旋结构，或破坏表征亲本序列的其它类型二级结构）。人工识别的多肽的二级和三级结构的示例描述于 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton 编辑, W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C.Branden 和 J.Toose 编辑, Garland Publishing, New York, N.Y.(1991)); 和 Thornton 等人 *Nature* 354:105(1991)。

VL、VH 的保守氨基酸取代的氨基酸数目为约 1 个、约 2 个、约 3 个、约 4 个、约 5 个、约 6 个、约 8 个、约 9 个、约 10 个、约 11 个、约 13 个、约 14 个、约 15 个保守氨基酸取代，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端值）或其中任何值。重链恒定区、轻链恒定区、重链或轻链的保守氨基酸取代的氨基酸数目为约 1 个、约 2 个、约 3 个、约 4 个、约 5 个、约 6 个、约 8 个、约 9 个、约 10 个、约 11 个、约 13 个、约 14 个、约 15 个、约 18 个、约 19 个、约 22 个、约 24 个、约 25 个、约 29 个、约 31 个、约 35 个、约 38 个、约 41 个、约 45 个保守氨基酸取代，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端值）或其中任何值。

术语“重组”涉及多肽或多聚核苷酸，意指天然不存在的多肽或多聚核苷酸的形式，不受限制的实施例可以通过组合产生通常并不存在的多聚核苷酸或多肽。

“同源性”、“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较每个序列中可以比对的位置来确定同源性或同一性。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时，则分子在该位置是同源的或同一的。序列之间的同源程度是由序列共有的匹配或同源位置的数目组成的一个函数。“至少 80%同一性”为约 80%同一性、约 81%同一性、约 82%同一性、约 83%同一性、约 85%同一性、约 86%同一性、约 87%同一性、约 88%同一性、约 90%同一性、约 91%同一性、约 92%同一性、约 94%同一性、约 95%同一性、约 98%同一性、约 99%同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端值）或其中任何值。“至少 90%同一性”为约 90%同一性、约 91%同一性、约 92%同一性、约 93%同一性、约 95%同一性、约 96%同一性、约 97%同一性、约 98%同一性、约 99%同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端值）或其中任何值。

“抗体”、“抗原结合片段”是指特异性识别和结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整的抗体及其任何抗原结合片段或其单链。因此术语“抗体”包括分子中含有具有与抗原结合的生物学活性的免疫球蛋白分子的至少一部分的任何蛋白质或肽。抗体和抗原结合片段包括但不局限重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区（CDR）、重链可变区（VH）、轻链可变区（VL）、重链恒定区（CH）、轻链恒定区（CL）、框架区（FR）或其任何部分，或结合蛋白的至少一部分。CDR 区包括轻链可变区的 CDR 区（VLCDR1-3）和重链可变区的 CDR 区（VHCDR1-3）。抗体或其抗原结合单元可以特异性识别和结合一个或多个（如两个）抗原的多肽或多肽复合物。特异性识别和结合多个（如两个）抗原的抗体或其抗原结合单元可以被称为多特异性（如双特异性）抗体或其抗原结合单元。

术语“抗体片段”或“抗原结合片段”指抗体的一部分，本发明抗体片段的组成形式可类似于单特异性抗体片段中的 F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv 等。不管其结构如

何，抗体片段与被完整抗体识别的同一抗原结合。术语“抗体片段”包括适体、镜像异构体和双价抗体。术语“抗原结合片段”还包括通过与特定抗原结合形成复合物起抗体作用的任何合成或基因工程蛋白质。

术语“抗体”包括可以在生物化学上区分各种广泛种类的多肽。本领域技术人员将会理解，重链的类别包括 gamma、mu、alpha、delta 或 epsilon (γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)，其中还有一些亚类（例如 $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ）。该链的性质决定了抗体的“种类”分别为 IgG、IgM、IgA、IgG 或 IgE。免疫球蛋白亚类（同种型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5 等已被充分表征并且赋予的功能特异性也已知。所有的免疫球蛋白种类都在本发明公开的保护范围内。在一个或多个实施方式中，免疫球蛋白分子为 IgG 种类。两条重链和两条轻链通过二硫键以“Y”构型连接，其中轻链从“Y”口开始并延续通过可变区包围重链。

本发明公开的抗体、抗原结合片段或衍生物包括但不限于多克隆、单克隆、多特异性、全人源、人源化、灵长类化、嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段（例如类 Fab、类 Fab' 和类 F(ab')₂）、类单链 Fvs（scFv）。

轻链可以分为 kappa (κ) 或 lambda (λ)。每个重链可以与 κ 或 λ 轻链结合。一般来说，当由杂交瘤、B 细胞或基因工程宿主细胞生产免疫球蛋白时，其轻链和重链通过共价键结合，两条重链的“尾巴”部分通过共价二硫键或非共价键结合。在重链中，氨基酸序列从 Y 构型的叉状末端的 N 末端延伸至每条链底部的 C 末端。免疫球蛋白 κ 轻链可变区为 V κ ；免疫球蛋白 λ 轻链可变区为 V λ 。

轻链和重链都分成结构和功能同源性的区域。术语“恒定的”和“可变的”根据功能被使用。轻链可变区（VL）和重链可变区（VH）决定了抗原识别和特异性。轻链恒定区（CL）和重链恒定区（CH）赋予重要的生物学性质，如分泌、经胎盘移动、Fc 受体结合、补体结合等。按照惯例，恒定区的编号随着它们变得更远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N 端部分是可变区，C 端部分是恒定区；CH3 和 CL 结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端。

本发明公开的抗体可以来源于任何动物，包括但不限于鱼类、鸟类和哺乳动物。较佳地，抗体是人源、鼠源、驴源、兔源、山羊源、骆驼源、美洲驼源、马源或鸡源抗体。在另一实施方案中，可变区可以是软骨鱼纲（condriothoid）来源（例如来自鲨鱼）。

“重链恒定区”包括 CH1 结构域、铰链（例如上、中和/或下铰链区）结构域、CH2 结构域、CH3 结构域，或变体或片段中的至少一种。抗体的重链恒定区可以来源于不同的免疫球蛋白分子。例如，多肽的重链恒定区可以包括源自 IgG1 分子的 CH1 结构域和源自 IgG3 分子的铰链区。在另一实施方案中，重链恒定区可以包括部分源自 IgG1 分子和部分源自 IgG3 分子的铰链区。在另一实施方案中，部分重链可以包括部分源自 IgG1 分子和部分源自 IgG4 分子的嵌合铰链区。

“轻链恒定区”包括来自抗体轻链的一部分氨基酸序列。较佳地，轻链恒定区包含恒定 κ 结构域或恒定 λ 结构域中的至少一个。“轻链-重链对”是指可通过轻链的 CL 结构域和重链的 CH1 结构域之间的二硫键形成二聚体的轻链和重链的集合。

术语“抗体药物偶联物”或“ADC”是指与一个或多个化学药物连接的结合多肽（如抗体或其抗原结合单元），其可以任选地为治疗剂或细胞毒性剂。在优选的实施例，ADC 包括抗体，药物（例如细胞毒性药物）和能够使药物与抗体附接或偶联的接头。可包含在 ADC 中的药物的非限制性实例是有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、用于基因治疗的载体、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢物、含硼剂、化学保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光活性治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、激酶抑制剂（例

如, TEC-家族激酶抑制剂和丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂)和放射增敏剂。

术语“药物抗体偶联比”或“DAR”是指 ADC 的与抗体附接的药物(例如, 依喜替康)的数量。ADC 的 DAR 可以在 1 到 10 的范围内, 但是取决于抗体上的连接位点的数量, 更高的负载(例如 20)也是可能的。提及负载到单个抗体上的药物的数量时, 或可替代地, 提及一组 ADC 的平均或均值 DAR 时, 可以使用术语 DAR。在一些实施方式中, 其值选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。当考虑小分子药物的平均结合个数时, 即抗体的药物平均结合数, 或称为平均药物抗体偶联比, 其值选自约 0 至约 10, 或约 2 至约 8。在一些实施方式中, 药物抗体偶联比为约 3 至约 6。在另一些实施方式中, 药物抗体偶联比为约 6 至约 8, 或约 7 至约 8。DAR 值在本文可用 p 表示。

ADC 的 DAR 值可利用紫外可见吸收光谱法(UV-Vis)、高效液相色谱-疏水色谱(HPLC-HIC)、高效液相色谱-反相色谱(RP-HPLC)、液相色谱质谱联用(LC-MS)等测定。这些技术在 Ouyang, J. *Methods Mol Biol*, 2013, 1045: p. 275-83 中有记载。

本文中的其它化学术语根据本领域的常规用法使用, 如 *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms*(《麦格劳-希尔化学术语词典》)(Parker, S. 编, 格劳-希尔公司(McGraw-Hill), 旧金山(1985))。

本文中引用的所有出版物, 专利, 和专利申请全部内容通过参考并入本文用于所有目的。

抗体部分

本发明所述的抗体可以是任何一种适用于制备抗体药物偶联物的抗体, 其可以具有完整的抗体结构, 也可包括抗体片段(多克隆抗体和单克隆抗体), 如 Fab、Fab'、F(ab)₂ 和 Fv 等。

抗体能够特异性地结合至抗原, 例如肿瘤特异性抗原等。肿瘤抗原可以用于肿瘤细胞的鉴别, 也可以成为肿瘤治疗的潜在指示指标, 或成为肿瘤治疗的靶点。故特异性抗体的选择主要依据疾病的类型, 以及作为靶点的细胞和组织进行。

本领域熟知的肿瘤抗原的实例包括但不限于 EGFR、HER2、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CEA、VEGF、TROP2、B7H3、FR α (FR α)、Nectin-4、B7H4、CLDN18、BMPRII、E16、STEAP1、0772P、MPF、Napi3b、Sema5b、PSCA α lg、ETBR、MSG783、STEAP2、TrpM4、CRIPTO、CD21、CD22、FcRH2、NCA、MDP、IL20R α 、短蛋白聚糖(Brevican)、EphB2R、ASLG659、PSCA、GEDA、BAFF-R、CD79a、CD79b、CXCR5、HLA-DOB、P2X5、CD72、LY64、FcRH1、IRTA2、TENB2、PMEL17、TMEFF1、GDNF-Ra1、Ly6E、TMEM46、Ly6G6D、LGR5、RET、LY6K、GPR19、GPR54、ASPHD1、酪氨酸酶、TMEM118、EpCAM、ROR1、GPR172A 等。

在一个或多个实施方案中, 抗体可以是人源化单克隆抗体。

在一些实施方案中, 抗体是抗 EGFR 抗体, 包括但不限于: 西妥昔单抗, 其是一种抗 EGFR 的人鼠嵌合单克隆抗体; 帕尼单抗, 其是一种全人源化单克隆抗体; 尼妥珠单抗, 其是一种抗 EGFR 的人源化单克隆抗体。EGFR 过量表达于许多肿瘤组织, 如转移性结直肠癌和头颈部癌症。

一个或多个实施方案中, 抗体为抗 EGFR 抗体, 重链和轻链序列分别为 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2。

各序列编号对应的氨基酸序列如表 1 所示。

表 1

SEQ ID NO:1	QVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLE WIGHIYYSGNTNYPNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYY CVRDRVTGAFDIWGQGTLLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYFCQHFHDL PLAFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

在一个或多个实施方案中，抗体是抗 HER2 抗体，其能特异性地作用于人类表皮生长因子受体 2，如曲妥珠单抗（Trastuzumab）、帕妥珠单抗，Margetuximab，ZW25 等。抗 HER2 抗体可以是修饰的，如一种或多种氨基酸序列改变、增加或减少，以实现相应的目的，如增强抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用。

一个或多个实施方案中，抗 HER2 抗体为曲妥珠单抗（Trastuzumab），重链和轻链序列分别为 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。

各序列编号对应的氨基酸序列如表 2 所示。

表 2

SEQ ID NO:3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

在一个或多个实施方案中，抗体为抗 Trop2 抗体，能特异性的作用于 Trop2 蛋白，其

中 Trop2 蛋白为滋养层细胞表面糖蛋白抗原 2。在一个或多个实施方案中, 抗 Trop2 抗体是全人单克隆抗体, 在一个或多个实施方案中, 抗 Trop2 的抗体是人源化的单克隆抗体抗。

在一个或多个实施方式中, 所述抗 Trop2 抗体为如下专利文件公开的抗体: WO2021147993A1(如 PD3)、CN101264325B(如 RS7、hRS7)、CN105849126B(如 hTINA1-H1L1、hTINA1-H2L1、hTINA1-H2L2、hTINA1-H3L3)、CN110903395A(如 M1、M2、M3)、CN113896796A(如 4D3、7F11)、US20130089872A(如 K5-70、K5-107、K5-116-2-1、T6-16、T5-86)、US5840854A(如 BR110)、US20130122020A(如 3E9、6G11、7E6、15E2、18B1)、US20120237518A(如 77220、KM4097、KM4590)。

在一个或多个实施方式中, 所述抗 Trop2 抗体是可购买的, 其中包括 LS-C126418、LS-C178765、LS-C126416、LS-C126417 (LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA); 10428-MM01、10428-MM02、10428-R001、10428-R030 (Sino Biological Inc., Beijing, China); MR54 (eBioscience, San Diego, CA); sc-376181、sc-376746, Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz, CA); MM0588-49D6 (Novus Biologicals, Littleton, CO); ab79976 和 ab89928 (Cambridge, MA)。

在一个或多个实施方式中, 所述抗 Trop2 抗体为 Lipinski 等人(1981, Proc Natl.Acad Sci USA, 78: 5147-50)公开的抗 Trop-2 抗体 162-25.3 和 162-46.2 或 Ikeda 等人(2015, Biochem Biophys Res Comm 458: 877-82)公开的 Pr1E11 抗 Trop-2 抗体, 其识别 Trop-2 上的独特表位。

在一个或多个实施方案中, 抗体为 hRS9 抗体, 抗体的重链和轻链序列分别为 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6。

各序列编号对应的氨基酸序列如表 3 所示。

表 3

SEQ NO:5	ID	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQIS SLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ NO:6	ID	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIATAVWYQQKPGKAP KLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQ QHYYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPPREKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

在一个或多个实施方式中，所述抗体为抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元具有以下一种或多种特性：a)与 CLDN18.2 特异性结合；b)高亲和力；c)强的 ADCC 活性；d)强的 CDC 活性。

在一个或多个实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

在一个或多个实施方式中，抗 CLDN18.2 抗体的抗原结合片段或抗原结合单元是 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、单结构域抗体或双抗体。在一个或多个实施方式中，抗 CLDN18.2 抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)。

在一个或多个实施方式中，抗 CLDN18.2 抗体可以为单克隆抗体。

在一个或多个实施方式中，抗体包含重链恒定区，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区。在一个或多个实施方式中，抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含选自人 IgG 恒定结构域、人 IgA 恒定结构域、人 IgE 恒定结构域、人 IgM 恒定结构域和人 IgD 恒定结构域的免疫球蛋白重链恒定结构域。在一个或多个实施方式中，抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含 IgG1 重链恒定区、IgG2 重链恒定区、IgG3 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。在一个或多个实施方式中，重链恒定区为 IgG1 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。在一个或多个实施方式中，抗体或其抗原结合单元包含轻链恒定区，例如 κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区。在一个或多个实施方式中，抗体或其抗原结合单元包含 κ 轻链恒定区。

本发明所述抗 CLDN18.2 抗体包括人源化抗体或其抗原结合单元。这些抗体或其抗原结合单元适用于给人施用，而不会造成人对所施用的免疫球蛋白产生有害的免疫应答。在一个或多个实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元选自 WO2020043044、US2021403552、WO2021238831、WO2021160154、WO2021111003 所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元。在一个或多个实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元选自 zolbetuximab、claudiximab、TST001、AB011、M108、或 NBL-015 或其抗原结合单元。

在一个或多个实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含 (a) - (f) 中的一个或多个，其中：

- (a) VH CDR1，其包含如 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；
- (b) VH CDR2，其包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由其组成；
- (c) VH CDR3，其包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由其组成；
- (d) VL CDR1，其包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由其组成；
- (e) VL CDR2，其包含如 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列或由其组成；
- (f) VL CDR3，其包含如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一个或多个实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含如下 CDR 或由其组成：

- (a) VH CDR1，其包含如 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列；
- (b) VH CDR2，其包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列；
- (c) VH CDR3，其包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列；
- (d) VL CDR1，其包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列；
- (e) VL CDR2，其包含如 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列；和
- (f) VL CDR3，其包含如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO:8 所示的 VH CDR2、如 SEQ ID NO:9 所示的 VH CDR3、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR2 和如 SEQ

ID NO: 12 所示的 VLCDR3, 或由其组成。

在一个或多个实施方式中, 所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元为人源化抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元。在一个或多个实施方式中, 所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元的重链可变区包含如 SEQ ID NO: 13 所示序列, 或与 SEQ ID NO: 13 所示序列相比具有至少 90% 同一性的序列, 或与 SEQ ID NO: 13 所示序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列; 和/或

所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元的轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 14 所示序列, 或与 SEQ ID NO: 14 所示序列相比具有至少 90% 同一性的序列, 或与 SEQ ID NO: 14 所示序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中, 所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含重链恒定区, 所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 15 或 16 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中, 所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含重链恒定区和轻链恒定区, 所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列; 所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中, 所述抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合单元包含重链恒定区和轻链恒定区, 所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列; 所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中, 所述人源化抗 CLDN18.2 抗体为 H239H-2b-K-6a-1 抗体, 其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示, 重链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示, 轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 轻链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示。

在一个或多个实施方式中, 所述人源化抗 CLDN18.2 抗体为 H239H-2b-K-6a-2 抗体, 其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示, 重链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示, 轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 轻链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示。

在一个或多个实施方式中, 所述抗体包含与任一上述抗体相比具有至少 80% 同一性的序列, 或与任一上述抗体相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中, 所述 H239H-2b-K-6a-1 抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示, 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示。

在一个或多个实施方式中, 所述 H239H-2b-K-6a-2 抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示, 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示。

在一个或多个实施方式中, 所述抗体为抗 B7H3 抗体或其抗原结合单元。

在一个或多个实施方案中, 所述抗 B7H3 抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示。

在一个或多个实施方式中, 所述抗体为抗 FR α 抗体或其抗原结合单元。

在一个或多个实施方案中, 所述抗 FR α 抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示。

抗体可以通过使用常规重组 DNA 技术制备。使用本领域技术人员公知的技术可以选择、构建和培养生产抗体的载体及细胞系等。这些技术在各种实验室手册和主要出版物中均有描述, 例如 Recombinant DNA Technology for Production of Protein Therapeutics in Cultured Mammalian Cells, D. L. Hacker, F. M. Wurm, in Reference Module in Life Sciences, 2017, 其全部内容包括补充内容通过引用并入全文。

在一个或多个实施方式中, 可以按常规方法根据本文所述抗体氨基酸序列设计合成编

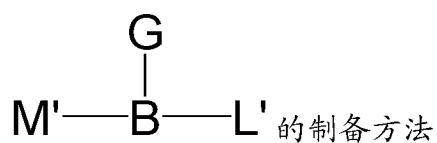
码抗体的 DNA，将其置入表达载体中，然后转染宿主细胞，在培养基中培养被转染的宿主细胞产生单克隆抗体。在一些实施方案中，表达抗体载体包括至少一个启动子元件，抗体编码序列，转录终止信号和 polyA 尾。其他元件包括增强子，Kozak 序列及插入序列两侧 RNA 剪接的供体和受体位点。可以通过 SV40 的前期和后期启动子，来自逆转录病毒的长末端重复序列如 RSV、HTLV1、HIV1 及巨细胞病毒的早期启动子来获得高效的转录，也可应用其它一些细胞的启动子如肌动蛋白启动子。合适的表达载体可包括 pIRES1neo，pRetro-Off，pRetro-On，PLXSN，或者 pLNCX，pcDNA3.1 (+/-)，pcDNA/Zeo(+/-)，pcDNA3.1/Hygro (+/-)，PSVL，PMSG，pRSVcat，pSV2dhfr，pBC12MI 和 pCS2 等。常使用的哺乳动物宿主细胞包括 HEK293 细胞、Cos1 细胞、Cos7 细胞、CV1 细胞、鼠 L 细胞和 CHO 细胞等。

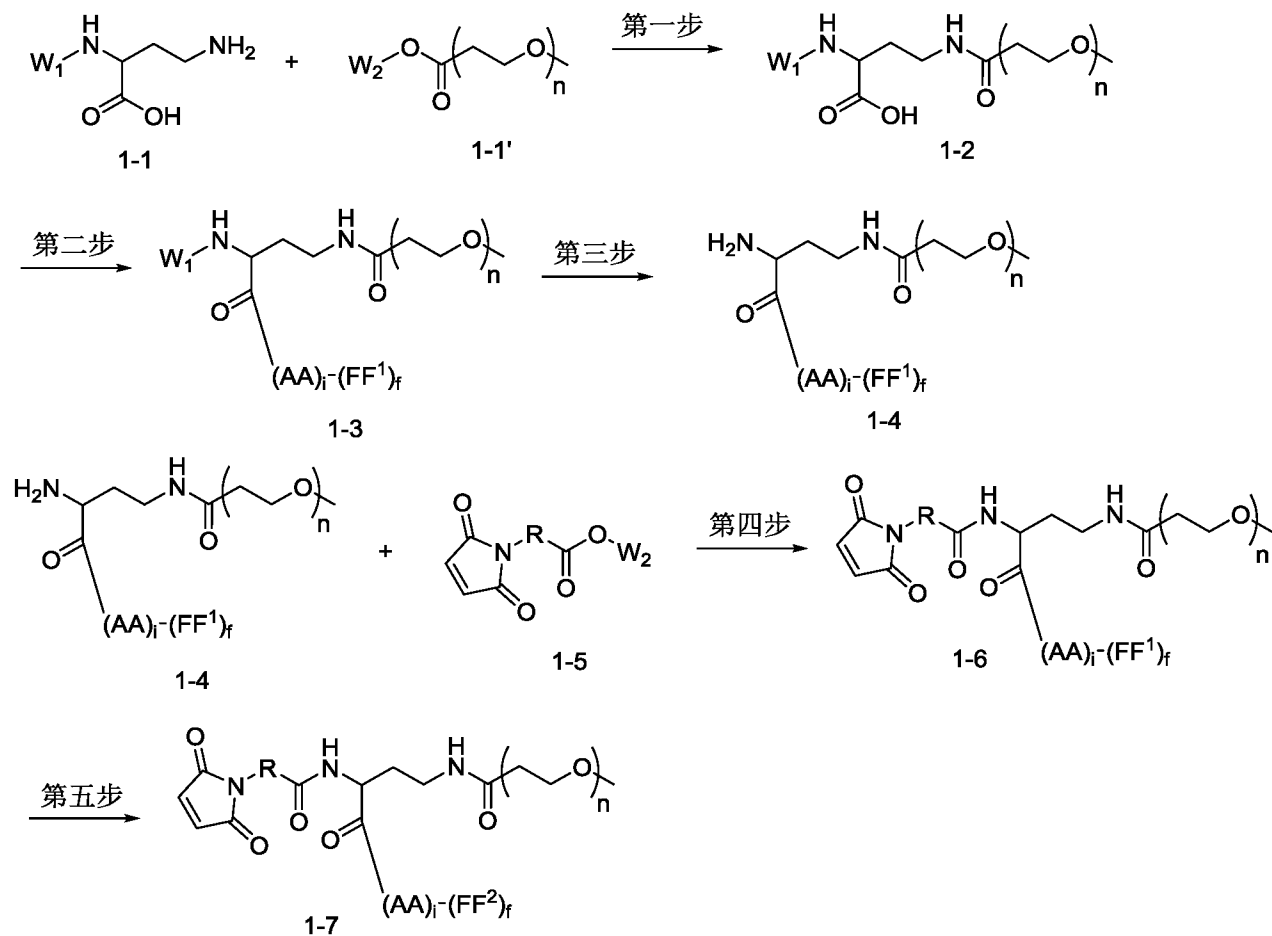
在一个或多个实施方式中，插入基因片段需含有筛选标记，常见的筛选标记包括二氢叶酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、新霉素抗性、潮霉素抗性等筛选基因，以便于转染成功的细胞的筛选分离。将构建好的质粒转染到无上述基因的宿主细胞，经过选择性培养基培养，转染成功的细胞大量生长，产生想要获得的目的蛋白。抗体将通过一个或多个纯化步骤纯化。纯化可以采用常规方法进行，例如先离心细胞悬液并收集上清液，再次离心进一步去除杂质。Protein A 亲和柱和离子交换柱等方法可以用于纯化抗体蛋白。

本发明的一个或多个实施方式中，在抗体药物偶联物中一个抗体与小分子药物的结合个数，即抗体的药物结合数，称为药物抗体偶联比 (DAR)。在一些实施方式中，其值选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。当考虑小分子药物的平均结合个数时，即抗体的药物平均结合数，或称为平均药物抗体偶联比，其值选自约 0 至 10，或 2 至 8。在一些实施方案中，药物抗体偶联比为 3-6，在另一些实施例，药物抗体偶联比为约 6 至约 8，或约 7 至约 8。

合成方法

本发明还提供了药物偶联物，如抗体药物偶联物，及中间体的制备方法。本发明的药物偶联物，如抗体药物偶联物，及中间体可以通过已知制剂和方法制备。在一些实施方式中，制备方法如下所述。





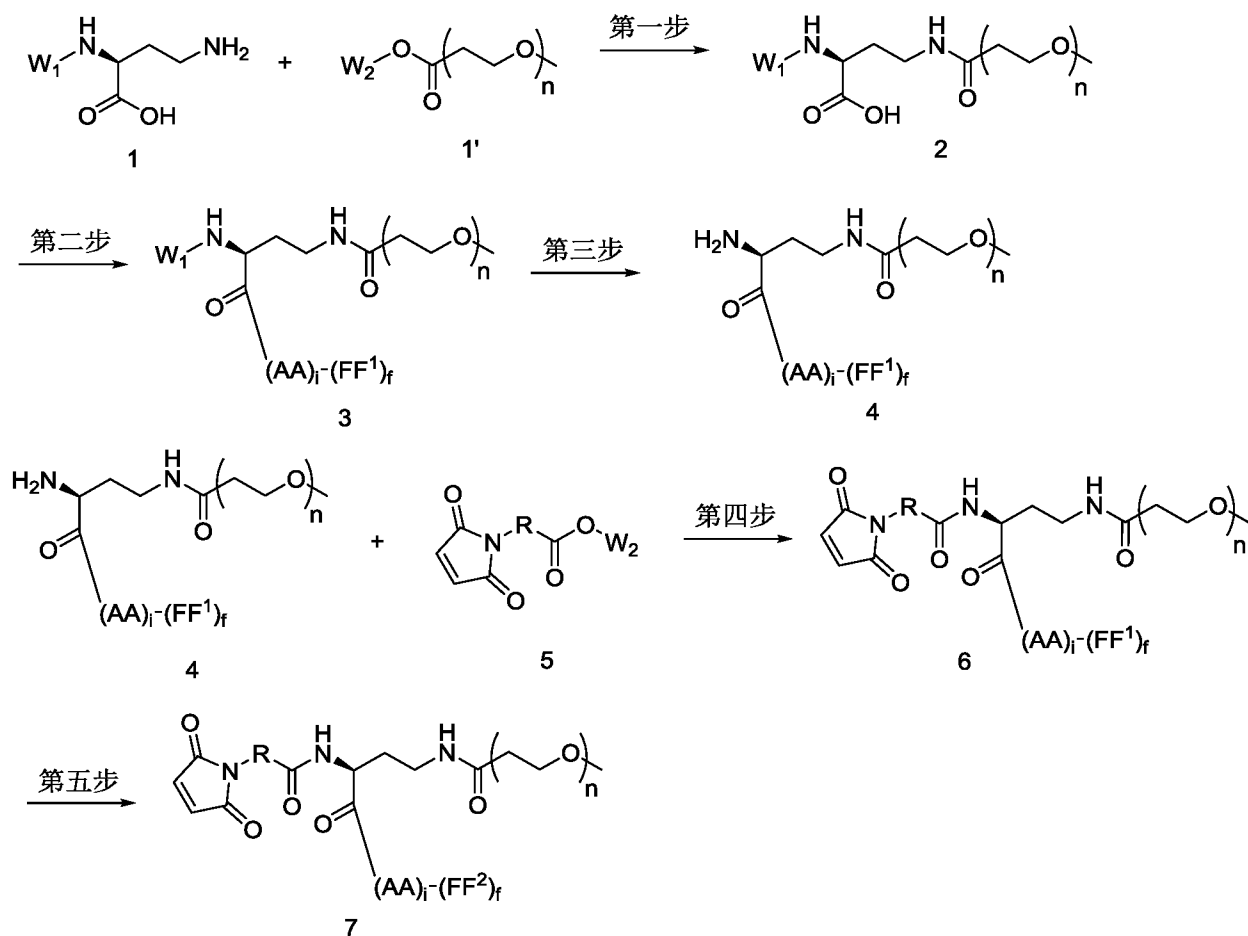
第一步：通式 1-1 化合物和通式 1-1' 化合物在碱性条件下反应得到通式 1-2 化合物；

第二步：通式 1-2 化合物和通式 $(AA)_i-(FF^1)_f$ 在缩合剂存在下、在碱性条件下反应得到通式 1-3 化合物；

第三步：去除通式 1-3 化合物氨基保护基 W_1 得到通式 1-4 化合物；

第四步：通式 1-4 化合物和通式 1-5 化合物在碱性条件下反应得到通式 1-6 化合物；

第五步：通式 1-6 化合物和二(对硝基苯)碳酸酯在碱性条件下反应得到通式 1-7 化合物。



第一步：通式 1 化合物和通式 1' 化合物在碱性条件下反应得到通式 2 化合物；

第二步：通式 2 化合物和通式 (AA)_i-(FF¹)_f 在缩合剂存在下、在碱性条件下反应得到通式 3 化合物；

第三步：去除通式 3 化合物氨基保护基 W₁ 得到通式 4 化合物；

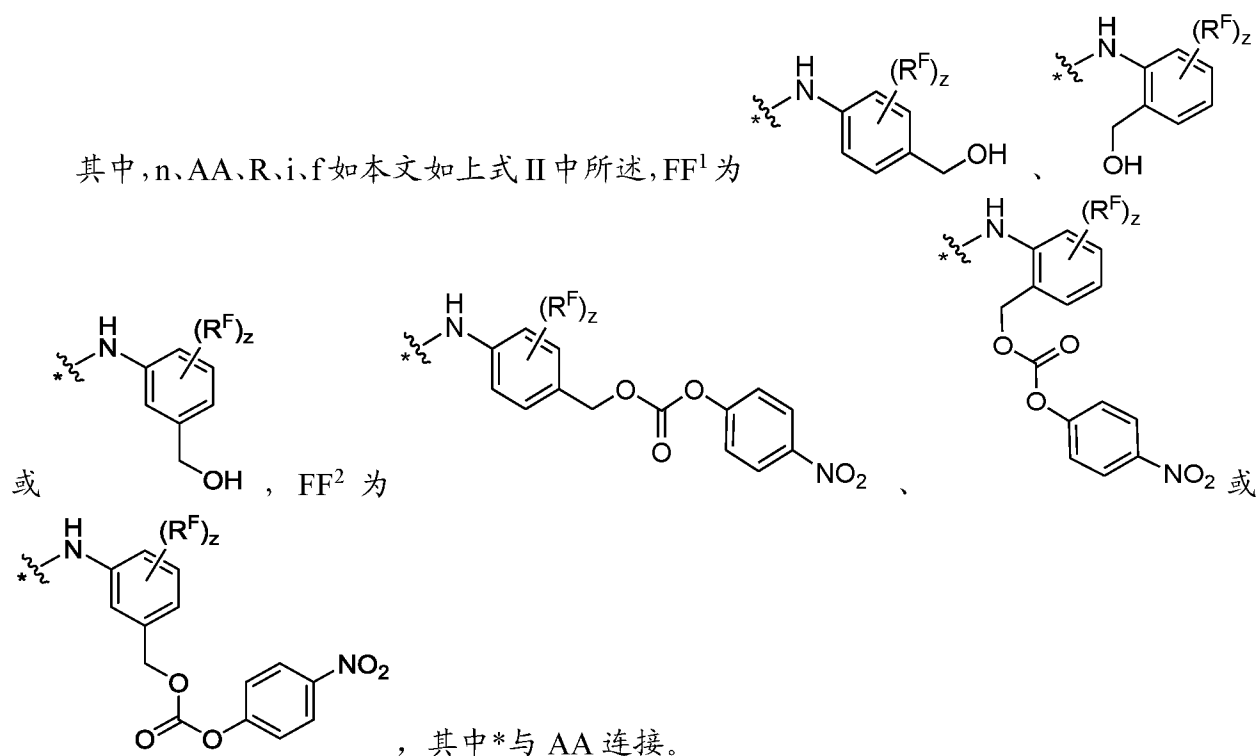
第四步：通式 4 化合物和通式 5 化合物在碱性条件下反应得到通式 6 化合物；

第五步：通式 6 化合物和二(对硝基苯)碳酸酯在碱性条件下反应得到通式 7 化合物。

其中

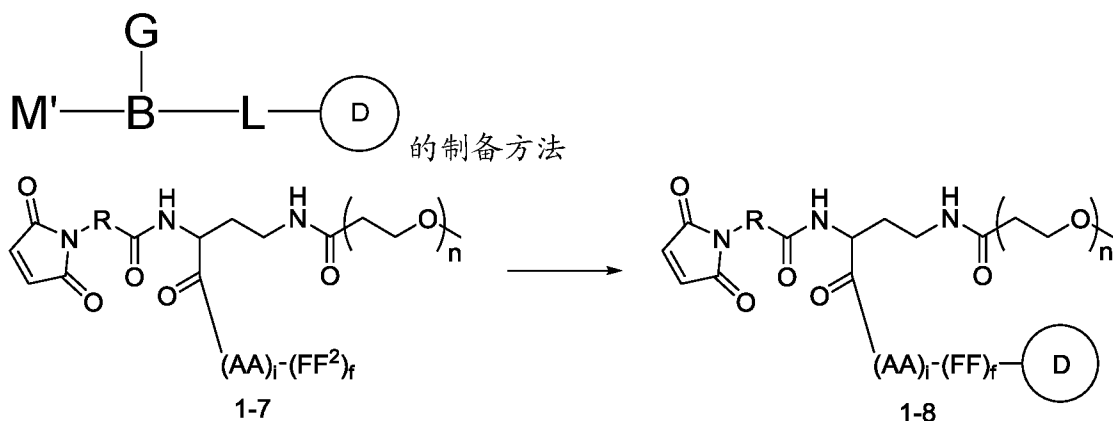
W₁ 为氨基保护基，例如为 9-芴甲氧羰基；W₂ 为羧酸活性酯，例如为琥珀酰亚胺酯。

其中, n、AA、R、i、f 如本文如上式 II 中所述, FF¹ 为

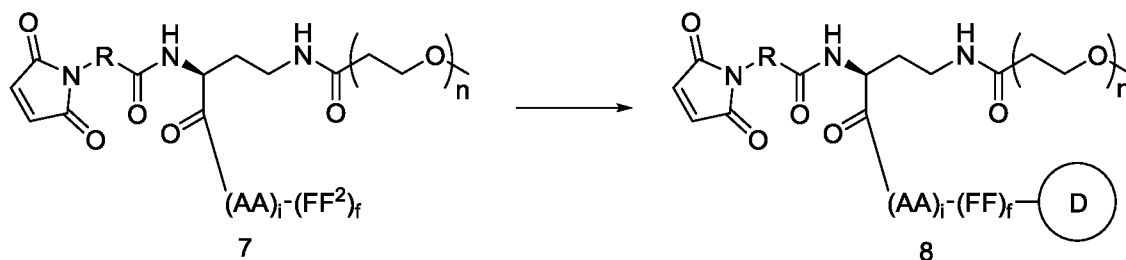


上述碱性条件可以用试剂来提供, 该试剂包括有机碱和无机碱类, 所述有机碱类包括但不限于三乙胺、二乙胺、N-甲基吗啉、吡啶、六氢吡啶、N,N-二异丙基乙胺、正丁基锂、二异丙基氨基锂、醋酸钾、叔丁醇钠或叔丁醇钾, 所述无机碱类包括但不限于氯化钠、磷酸钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、氢氧化钠和氢氧化锂。

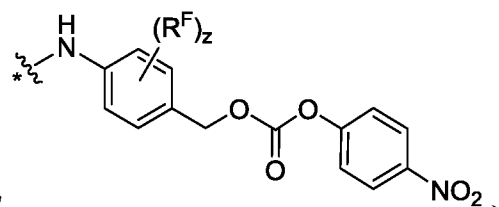
上述缩合剂可以选自 N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)六氟磷酸脲、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐、1-羟基苯并三唑和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N,N'-二环己基碳化二亚胺、N,N'-二异丙基碳二酰亚胺、O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟硼酸酯、1-羟基苯并三唑、1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑、O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲脲六氟磷酸酯、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯、苯并三氮唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷。



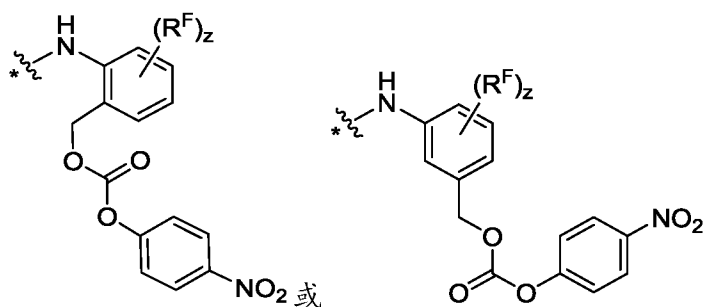
通式 1-7 化合物和 D 在缩合剂存在下、在碱性条件下反应得到通式 1-8 化合物。



通式 7 化合物和 D 在缩合剂存在下、在碱性条件下反应得到通式 8 化合物。



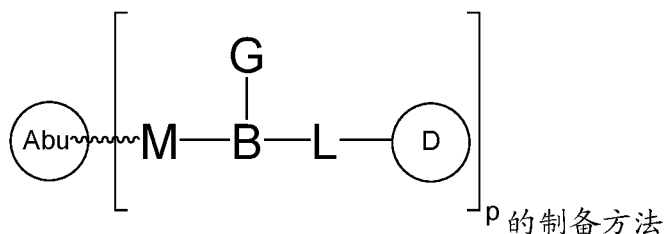
其中, n、AA、R、i、f、FF、D 如式 III 中所述, FF² 为

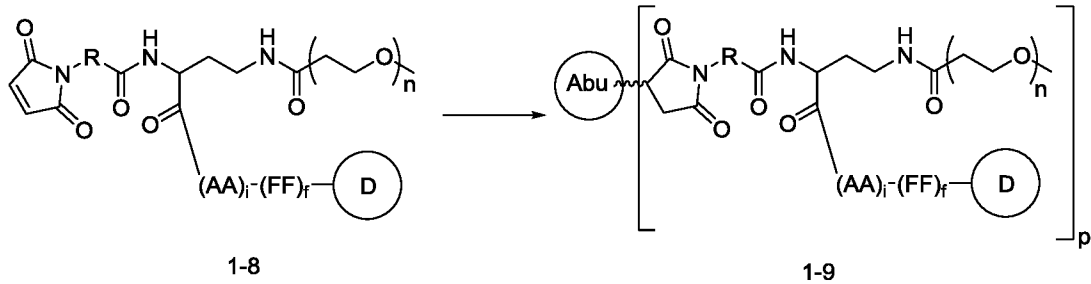


，其中*与 AA 连接。

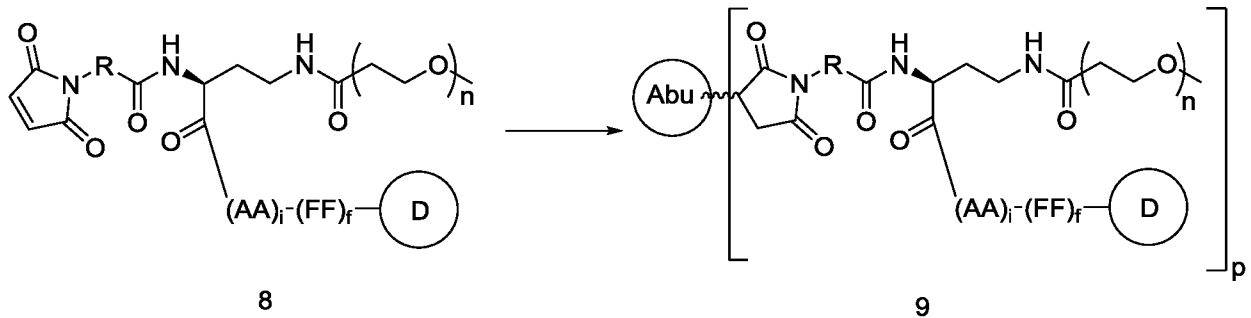
上述碱性条件可以用试剂来提供, 该试剂包括有机碱和无机碱类, 所述有机碱类包括但不限于三乙胺、二乙胺、N-甲基吗啉、吡啶、六氢吡啶、N,N-二异丙基乙胺、正丁基锂、二异丙基氨基锂、醋酸钾、叔丁醇钠或叔丁醇钾, 所述无机碱类包括但不限于氯化钠、磷酸钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、氢氧化钠和氢氧化锂。

上述缩合剂可以选自 N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)六氟磷酸脲、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐、1-羟基苯并三唑和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N,N'-二环己基碳化二亚胺、N,N'-二异丙基碳二酰亚胺、O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯、1-羟基苯并三唑、1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑、O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯、苯并三氮唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷。





通式 1-8 化合物和 Abu 在弱酸性条件下偶联得到通式 1-9 化合物。



通式 8 化合物和 Abu 在弱酸性条件下偶联得到通式 9 化合物。

其中, n、AA、R、i、f、FF、D、Abu 如式 I 中所述。

上述弱酸性条件可以用试剂来提供, 该试剂包括有机酸和无机酸类, 所述有机酸类包括但不限于乙酸、苯甲酸、酒石酸、草酸、苹果酸、柠檬酸、抗坏血酸、柠檬酸、枸橼酸、水杨酸、咖啡酸、山梨酸、奎宁酸、齐墩果酸、丁二酸、绿原酸、甲酸、丙酸, 所述无机酸类包括但不限于碳酸、亚硝酸、乙酸、次氯酸、氢氟酸, 亚硫酸、氢硫酸、硅酸、偏硅酸、磷酸、偏磷酸、碳酸氢钠、亚硫酸氢钠。

药物偶联物可以采用常规方法进行纯化, 例如用制备型高效液相色谱(prepare-HPLC)等方法。

实施例

实施例 1. 抗体制备

以下抗体按常规方法进行制备, 在进行载体构建后, 瞬时转染真核细胞如 HEK293 细胞 (Life Technologies Cat. No. 11625019), 或者稳转 CHO 细胞, 挑选稳定细胞株, 纯化表达。

Trastuzumab 抗体的制备和纯化

参照 Wood et al., J Immunol. 145:3011(1990)等方法, 特异性结合 HER2 胞外区的单克隆抗体抗 HER2 抗体在 CHO 细胞产生。含抗体基因的表达载体 OptiCHO™ Antibody Express System (Invitrogen) 分别用常规的分子生物学方法构建, CHO 细胞作为宿主细胞。

hRS9 抗体的制备和纯化

参照 Wood et al., J Immunol. 145:3011 (1990)等方法, 抗 Trop2 特异性的单克隆抗体在 CHO 细胞产生。含抗体基因的表达载体分别用常规的分子生物学方法构建, 其中重组人源化抗 Trop2 单克隆抗体 hRS9 抗体重链和轻链的氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6。

抗 CLND18.2 抗体的制备和纯化

含抗 CLND18.2 抗体基因的表达载体分别用常规的分子生物学方法构建，转染 HEK293F 细胞，培养并纯化得到抗体。抗 CLDN18.2 抗体的相关序列见表 4 和 5；其中 H239H-2b-K-6a-1 抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示；H239H-2b-K-6a-2 抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示。

表 4 抗 CLDN18.2 抗体的氨基酸序列

名称	序列号	氨基酸序列
VH CDR1	SEQ ID NO:7	DYGMH
VH CDR2	SEQ ID NO:8	YISRGRSTTYSTD TVKG
VH CDR3	SEQ ID NO:9	GSYYGNALDY
VL CDR1	SEQ ID NO:10	KSSQSLLNSGNQRNYLT
VL CDR2	SEQ ID NO:11	WASTRES
VL CDR3	SEQ ID NO:12	QSAYSYPFT
重链可变区	SEQ ID NO:13	EVQLLES GGLVQP GGSRLSCAASGFTFSDYGMHW VRQAPGKGLEWVAYISRGRSTTYSTD TVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSY YGNALDYW GQGT LVT VSS
轻链可变区	SEQ ID NO:14	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQRNY LTWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQSAYSYPFTFGGGTKLEIK
重链恒定区	SEQ ID NO:15	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:16	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
轻链恒定区	SEQ ID NO:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS

		KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
重链	SEQ ID NO:18	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHW VRQAPGKGLEWVAYISRGRSTTYSTDVTKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYYGNALDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
	SEQ ID NO:19	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHW VRQAPGKGLEWVAYISRGRSTTYSTDVTKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYYGNALDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
轻链	SEQ ID NO:20	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQRNY LTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQSAYSYPFTFGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表 5 抗 CLDN18.2 抗体的组成

抗体名称	VH 序列号	CH 序列号	VL 序列号	CL 序列号
H239H-2b-K-6a-1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:17
H239H-2b-K-6a-2	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:17

抗 B7H3 抗体的制备和纯化

含抗 B7H3 抗体 A 基因的表达载体分别用常规的分子生物学方法构建, 转染 HEK293F 细胞, 培养并纯化得到抗体。抗 B7H3 抗体 A 的相关序列见表 6, 其中抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示。

表 6 抗 B7H3 抗体 A 的氨基酸序列

名称	序列号	氨基酸序列
重链	SEQ ID NO:21	EVQLVQSGAEVKKSGESLKISCKASGYTFTDYDINWVRQM PGKGLEWIGWIFPGDDTTKYNEKFKGQVTLSDKSTNTAY MQWSSLKASDTAMYYCARSPSFDYWGQGTLLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
轻链	SEQ ID NO:22	QIVLTQSPGTLSPGERATLSCASSTIGFMYWYQQKPGQ APRRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFA VYYCHQRSSYPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

抗 FR α 抗体的制备和纯化

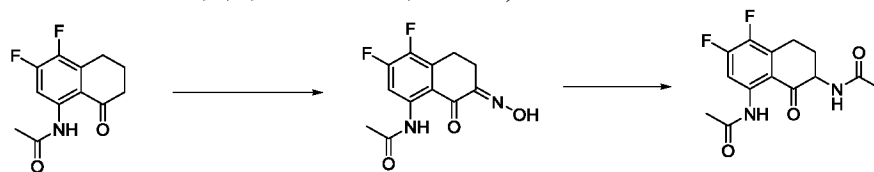
含抗 FR α 抗体 A 基因的表达载体分别用常规的分子生物学方法构建, 转染 HEK293F 细胞, 培养并纯化得到抗体。抗 FR α 抗体 A 的相关序列见表 7, 其中抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:24 所示。

表 7 抗 FR α 抗体 A 的氨基酸序列

名称	序列号	氨基酸序列
重链	SEQ ID NO:23	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYFMNWVR QAPGQGLEWIGRIHPYDGDFTYFNQNFKDATLTVDKSTTT AYMELKSLQFDDTAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTITVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
轻链	SEQ ID NO:24	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVSFAGTSLMHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNL EAGVPARFSGSGSKTDFTLTISLE PEDFAVYYCQQSREYPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

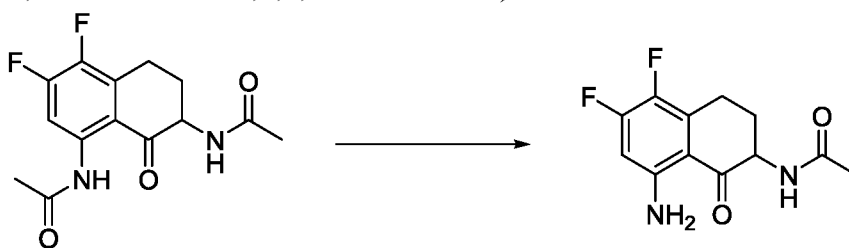
实施例 2. 化合物 (1S,9S)-1-氨基-9-乙基-4,5-二氟-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H 苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮盐酸盐(D-1)的合成步骤

1. N,N'-(3,4-二氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺的合成



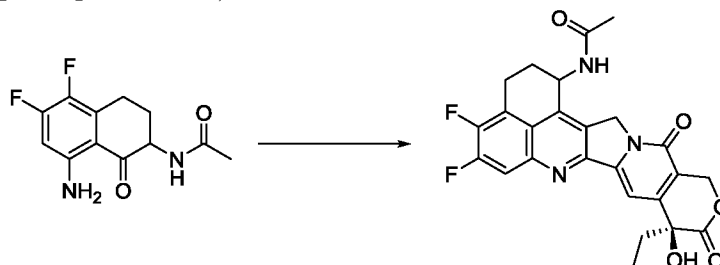
氮气氛围中,将叔丁醇钾四氢呋喃溶液(42ml,1M)加入干燥反应瓶中搅拌,降温至 0-5℃。将溶于四氢呋喃(25ml)的 N-(3,4-二氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(CAS 号:143655-49-6,5g,21mmol),缓慢滴加到反应瓶中,随后滴加亚硝酸叔丁酯(4.32g,2eq)(控温 0-5℃),升温至 15-20℃搅拌 2 小时(h)。反应完全后,降温至 0-5℃,滴加醋酸(25ml)、醋酸酐(25ml)(控温不超过 10℃),滴完搅拌 20 分钟(min)。保持 5-10℃,根据 N-(3,4-二氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺的量加锌粉(8eq),20-25℃ 搅拌 1h。过滤,乙酸乙酯(50ml)漂洗固体,降温至 0-5℃,滴加 15%NaCO₃ 水溶液(50ml) 洗三次,乙酸乙酯(25ml)萃取,合并有机相,饱和 NaCl 水溶液洗涤。加入乙酸乙酯(10ml), 40℃ 搅拌 30min,缓慢降至 0-5℃ 搅拌 2h。过滤,固体用乙酸乙酯/石油醚(1/2,10ml) 洗涤。真空干燥得灰色粉末(2.1g,33.7%)。LC-MS: [M+H]⁺=297。

2. N-(8-氨基-5,6-二氟-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺的合成



将 N,N'-(3,4-二氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺(500mg,1.68mmol)加入 2M 盐酸乙醇溶液(5ml),50℃ 搅拌 4h,检测反应完全后,加水(7.5ml),降温至 0-5℃, 滴加三乙胺(1.03g)搅拌 3h。过滤,分别用 40%冷乙醇水溶液(3ml),水(3ml)洗涤。 真空干燥得灰色粉末(320mg,74.6%)。LC-MS: [M+H]⁺=255。

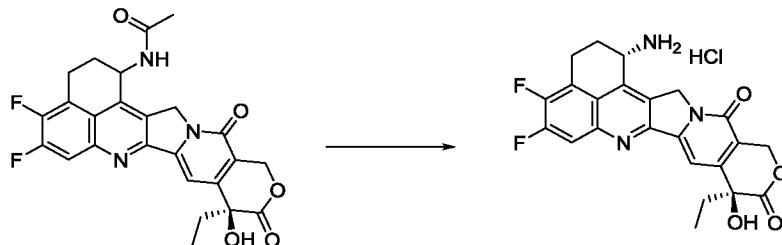
3. N-((9S)-9-乙基-4,5-二氟-9-羟基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H 苯并[de]哌喃 并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)乙酰胺的合成



氮气氛围下将 N-(8-氨基-5,6-二氟-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺(1.1g,1eq)、 (S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-哌喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H)-三酮(1.15g,1eq)及甲苯 (50ml)加入到反应瓶,升温至回流,搅拌 1h 后加入 4-甲基苯磺酸吡啶(100mg),继续

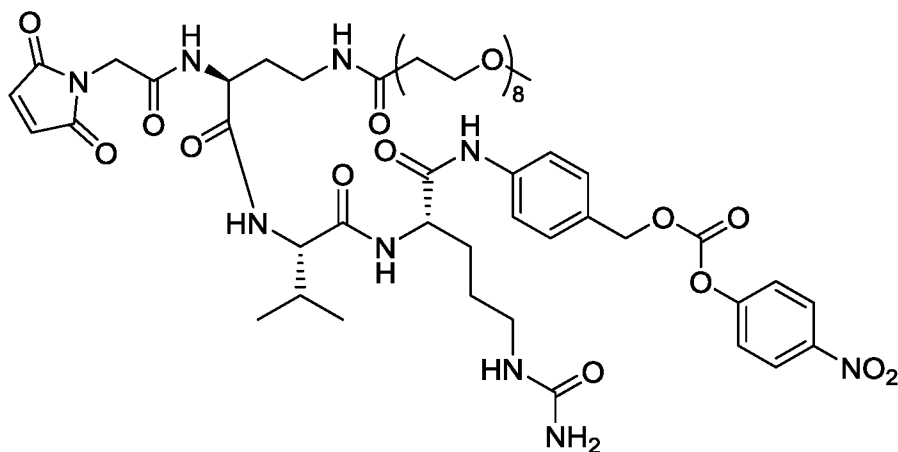
搅拌回流 20h。降至室温搅拌 1h。过滤，固体分别用丙酮（10ml），冷乙醇（5ml）洗涤。真空干燥得灰褐色粉末（1.1g，53%）。LC-MS: $[M+H]^+=482$ 。

4. (1S,9S)-1-氨基-9-乙基-4,5-二氟-9-羟基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H 苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮盐酸盐的合成

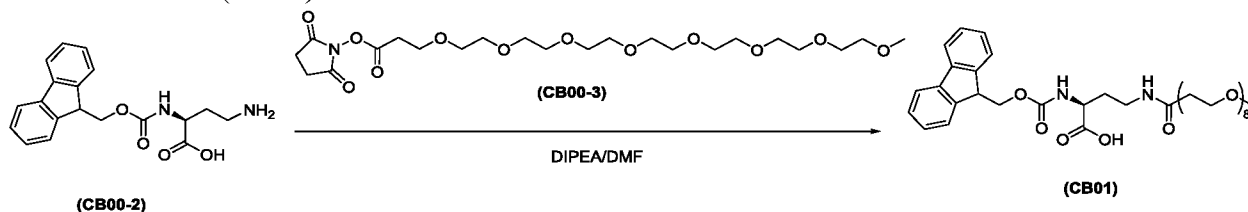


将 N-((9S)-9-乙基-4,5-二氟-9-羟基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H 苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)乙酰胺（1.1g，2.28mmol）、6M 盐酸水溶液（44ml）加入到反应瓶，氮气氛围下回流搅拌 4h。浓缩除去溶剂，HPLC 纯化得到白色粉末（200mg，18%）。LC-MS: $[M+H]^+=440$ 。

实施例 3. 4-((30S,33S)-30-(2-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-33-异丙基-26,31,34-三氧-36-(3-脲丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧-27,32,35-三氮杂三十七烷-37-胺基)苯甲基 (4-硝基苯基) 碳酸酯(CB07)的合成步骤

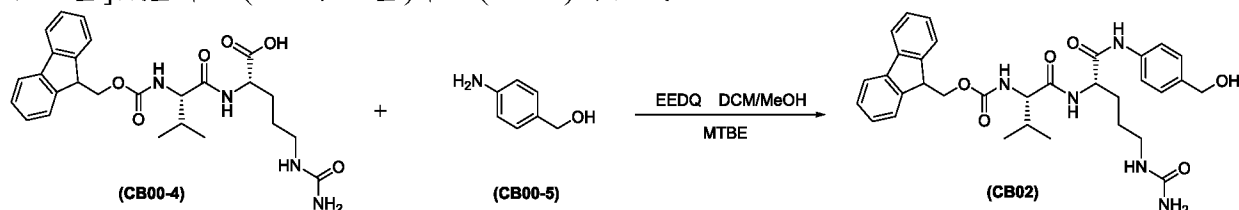


1) (S)-30-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-26-氧-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-27-氮杂-三十一烷-31-酸(CB01)的合成。



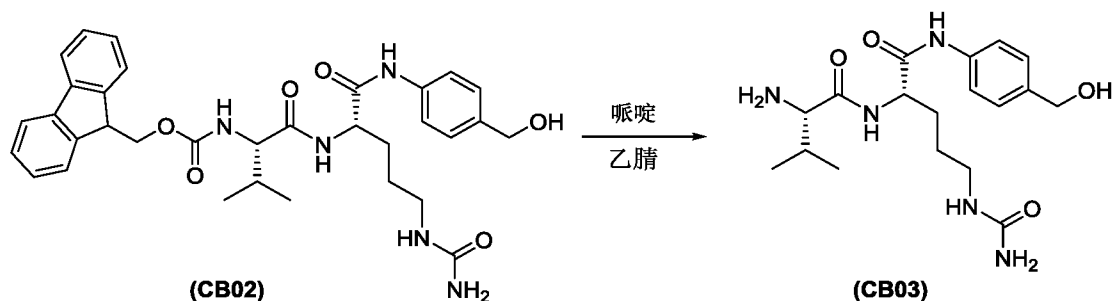
0-5℃氮气保护下，将 8.14g N2-芴甲氧羰基-L-2,4-二氨基丁酸(CB00-2)用 40mL 二甲基甲酰胺(DMF)溶解，加入 10g 4,7,10,13,16,19,22,25-八氧杂二十六烷酸-N-琥珀酰亚胺酯(CB00-3)和 10mL DMF，保持 0-5℃滴加 6.5mL DIPEA，加完 1h 后室温下搅拌反应 4h，反应完成后减压除去 DMF，硅胶柱层析（二氯甲烷和甲醇体积比 20:1 作为洗脱溶剂）得到淡黄色油状液体 14.2g CB01。

2) [(S)-1-[(S)-1-[4-(羟甲基)苯基]氨基]-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基]氨基]-3-甲基-1-氧代丁-2-基]氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(CB02)的合成。



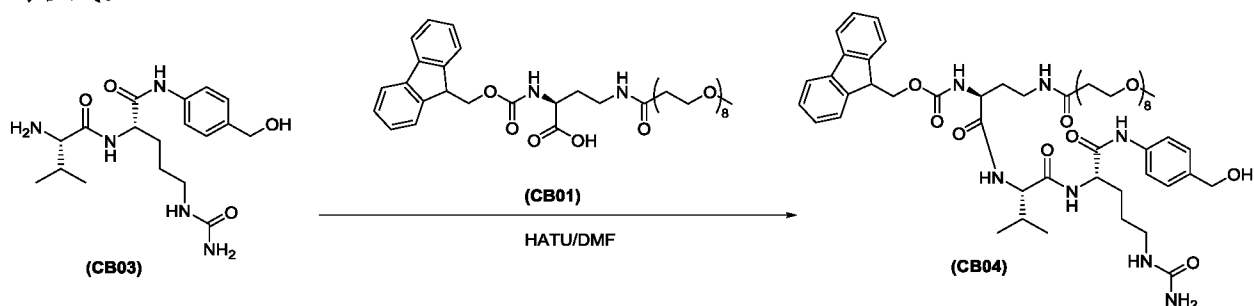
室温氮气保护下, 11g (S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-脲基戊酸(CB00-4)和 5.5g 对氨基苯甲醇(CB00-5)用 400mL 二氯甲烷和 200mL 甲醇溶解, 机械搅拌下, 分批加入 17g 2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ), 避光下反应 15h。反应完成后减压除去溶剂得到糊状固体, 硅胶柱层析(二氯甲烷和甲醇体积比 20:1 作为洗脱溶剂)得到灰白色固体 11.9g。

3) (S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟基甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CB03)的合成。



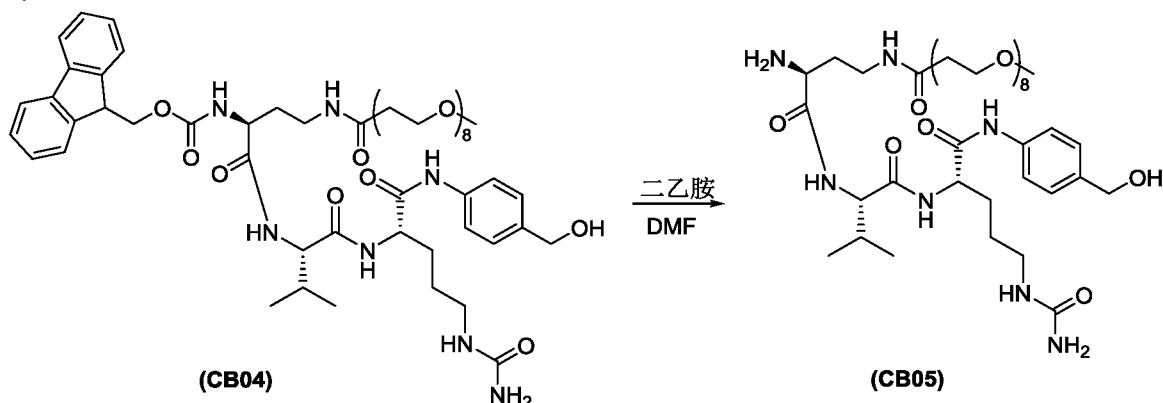
室温氮气保护下, 11.9g[(S)-1-[(S)-1-[4-(羟甲基)苯基]氨基]-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基]氨基]-3-甲基-1-氧代丁-2-基]氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(CB02)中加入 300mL 乙腈, 搅拌下滴加 18mL 哌啶, 滴加完毕后室温下反应 2h。反应完成后减压蒸馏除去溶剂和哌啶, 硅胶柱层析(二氯甲烷和甲醇体积比 20:1 作为洗脱溶剂)得到白色固体 7.5g CB03。

4) (9H-芴-9-基)甲基 ((30S,33S)-41-氨基-36-((4-(羟甲基)苯基)氨基甲酰基)-33-异丙基-26,31,34,41-四氧-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-27,32,35,40-四氮杂-30-基)氨基甲酸酯(CB04)的合成。



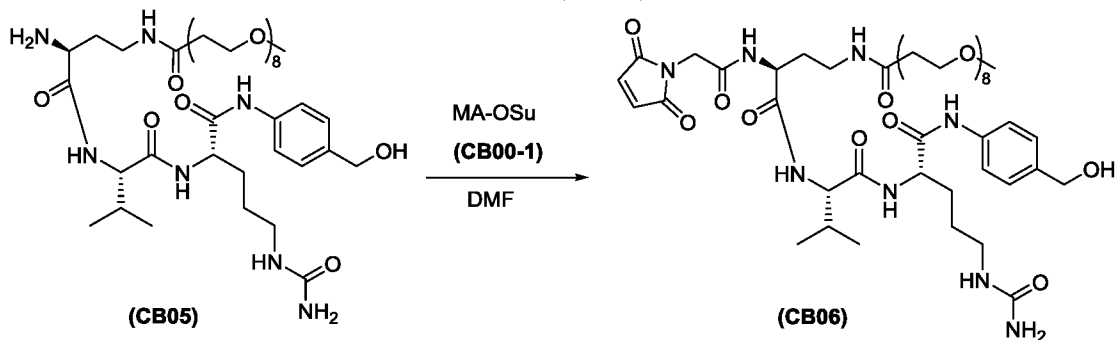
0℃ 氮气氛围下, 将 14.2g (S)-30-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-26-氧-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-27-氮杂-三十一烷-31-酸(CB01)溶解于 100mL DMF 中, 分批加入 11g N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)六氟磷酸脲(HATU), 搅拌反应 30min 后, 加入 7.5g 的(S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟基甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CB03), 保持 0℃ 下反应 2.5h。反应完成后减压蒸馏除去溶剂, 硅胶柱层析(二氯甲烷和甲醇体积比 10:1 作为洗脱溶剂)得到固体 9.66gCB04。

5) N-((3S)-3-氨基-4-(((2S)-1-((1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧丁烷-2-基)氨基)-4-氧基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(CB05)的合成。



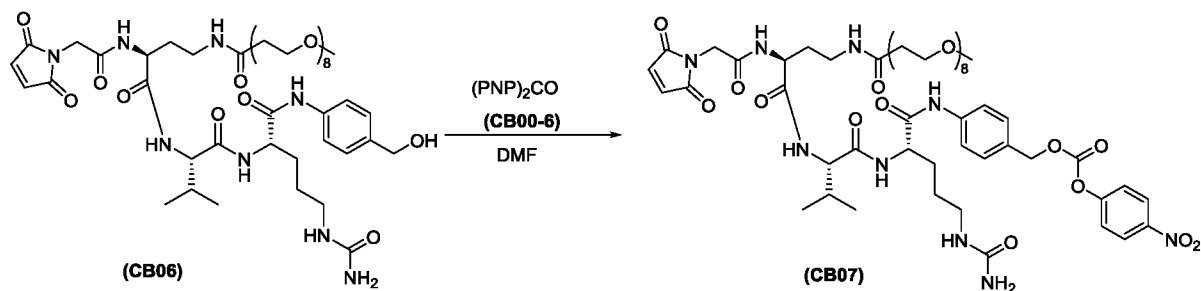
室温氮气保护下, 9.66g 的(9H-芴-9-基)甲基((30S,33S)-41-氨基-36-((4-(羟甲基)苯基)氨基甲酰基)-33-异丙基-26,31,34,41-四氧-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-27,32,35,40-四氮杂-30-基)氨基甲酸酯(CB04)溶解于 50mL DMF, 加入 12mL 二乙胺, 搅拌反应 1.5h。反应完成后减压蒸馏除去溶剂, 硅胶柱层析(二氯甲烷和甲醇体积比 7.5:1 作为洗脱溶剂)得到淡黄色固体 7.7gCB05。

6) N-((3S)-3-(2-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-4-(((2S)-1-((1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-丁酮-2-基)氨基)-4-氧代)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(CB06)的合成。



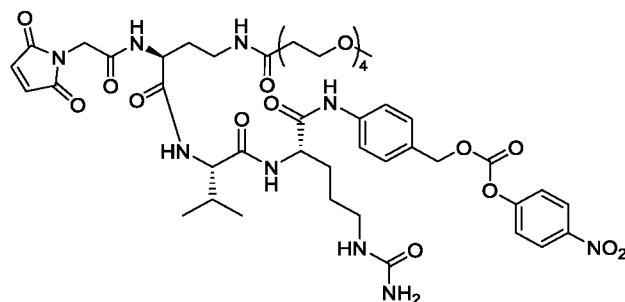
7.7g N-((3S)-3-氨基-4-(((2S)-1-((1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧丁烷-2-基)氨基)-4-氧基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(CB05)溶于 40mL DMF 中, 0-5℃ 氮气氛围下, 分批加入马来酰亚胺基乙酸琥珀酰亚胺酯(CB00-1), 保持 0-5℃ 下反应 4h。反应完成后减压蒸馏除去溶剂, 硅胶柱层析(二氯甲烷和甲醇体积比 10:1 作为洗脱溶剂)得到淡黄色固体 9.5gCB06。

7) 4-((30S,33S)-30-(2-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-33-异丙基-26,31,34-三氧-36-(3-脲丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧-27,32,35-三氮杂三十七烷-37-胺基)苯甲基 (4-硝基苯基) 碳酸酯(CB07)的合成。



9.5gN-((3S)-3-(2-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-4-(((2S)-1-((1-(4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧-5-脲基戊烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-丁酮-2-基)氨基)-4-氧代)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(CB06)溶于 50mL DMF 中, 0℃ 氮气氛围下, 加入 14.0g 二(对硝基苯)碳酸酯((PNP)₂CO), 溶解后再加入 8.2mL N,N-二异丙基乙胺(DIPEA), 保持 0℃ 反应 4h。反应完成后减压蒸馏除去溶剂, 硅胶柱层析(二氯甲烷和甲醇体积比 8:1 作为洗脱溶剂)得到白色固体 2.6gCB07。

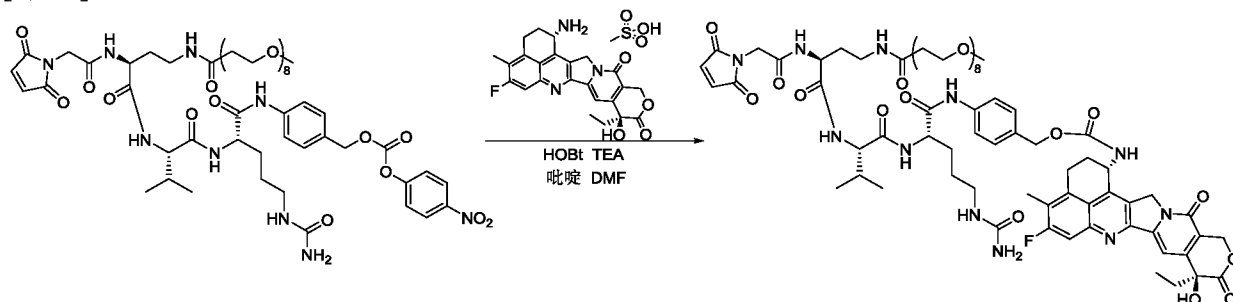
实施例 4. 4-((18S,21S)-18-(2-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺基)-21-异丙基-14,19,22-三氧-24-(3-脲丙基)-2,5,8,11-四氧-15,20,23-三氮杂二十五烷-25-氨基)苯甲基(4-硝基苯基)碳酸酯(CB14)的合成



CB14 的制备参考实施例 3 中 CB07 的合成, 将 4,7,10,13,16,19,22,25-八氧杂二十六烷酸-N-琥珀酰亚胺酯替换为 4,7,10,13-四氧杂十四烷酸-N-琥珀酰亚胺酯。最终得到白色固体 CB14。

实施例 5. 中间体 (CB07-Exatecan) 的合成

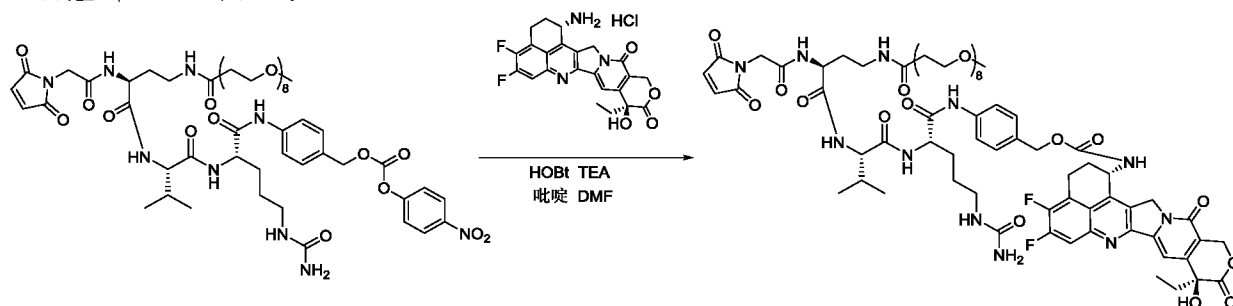
4-(30S,33S)-30-(2-(2,5-二氧六环-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺基)-33-异丙基-26,31,34-三氧-36-(3-脲丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23-三七庚基-37-乌头烷基)-(1s,9s)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吲哚啉[1,2-b]喹啉-1-氨基甲酸酯的合成。



将 4-((30S,33S)-30-(2-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-33-异丙基-26,31,34-三氧-36-(3-脲丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧-27,32,35-三氮杂三十七烷-37-胺基)苯甲基 (4-硝基苯基) 碳酸酯(CB07) (2.6g, 2.21mmol)与 N,N-二甲基甲酰胺(23ml)加入反应瓶 R1, 氮气保护下搅拌降温至 0-5℃。同时取(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H, 13H-苯并[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-10,13-二酮甲磺酸盐(依喜替康甲磺酸盐, 0.98g, 1.84mmol, Advanced ChemBlocks 公司)与 N,N-二甲基甲酰胺(5ml)加入到另一个反应瓶 R2, 0-5℃滴加三乙胺(230mg, 2.27mmol), 搅拌至全溶后。将反应瓶 R2 中溶液滴加到反应瓶 R1 中, 然后用 N,N-二甲基甲酰胺(2ml)洗涤反应瓶 R2 后, 洗涤液加入到反应瓶 R1 中。再称取 1-羟基苯并三唑(497mg, 3.68mmol)、吡啶(1.45g, 18.4mmol)加入到反应瓶 R1。0-5℃搅拌 10min, 升至室温搅拌 5.5h 反应完全后, 35℃减压浓缩除去溶剂。用制备型高效液相色谱(prepare-HPLC)纯化, 冻干, 得到白色粉末(1.6g, 59%)。LC-MS: $[1/2M+H]^+=737$ 。

实施例 6. 中间体 (CB07-D-1) 的合成

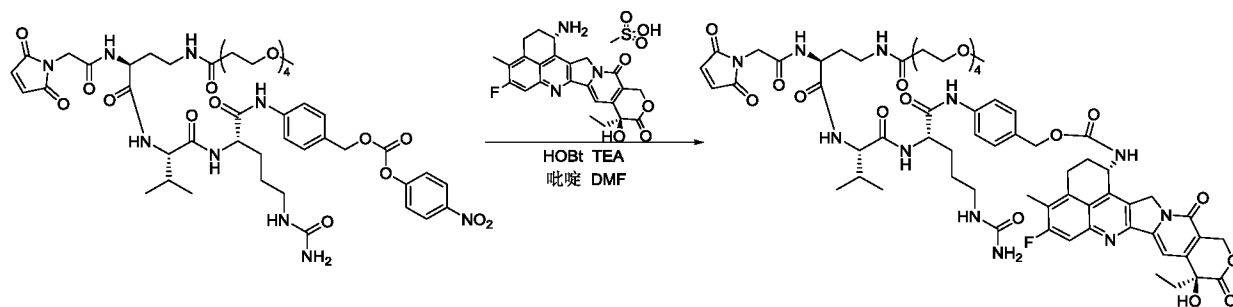
4-(30S,33S)-30-(2-(2,5-二氧六环-2,5-二氢-1h-吡咯-1-基)乙酰氨基)-33-异丙基-26,31,34-三氧代-36-(3-脲基丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23-三七庚基-37-乌头烷基)-(1S,9S)-9-乙基-4,5-二氟-9-羟基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-1-氨基甲酸酯的合成



将 4-((30S,33S)-30-(2-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-33-异丙基-26,31,34-三氧-36-(3-脲丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧-27,32,35-三氮杂三十七烷-37-胺基)苯甲基 (4-硝基苯基) 碳酸酯(CB07) (220mg, 0.189mmol)与 N,N-二甲基甲酰胺(5ml)加入反应瓶 R1, 氮气保护下搅拌降温至 0-5℃。同时取(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-4,5-二氟-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H 苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮盐酸盐 (D-1) (90mg, 0.189mmol)与 N,N-二甲基甲酰胺(5ml)加入到另一个反应瓶 R2, 0-5℃滴加三乙胺 3 滴, 搅拌至全溶后。将反应瓶 R2 中溶液滴加到反应瓶 R1 中, 再称取 1-羟基苯并三唑(60mg, 0.44mmol)、吡啶(0.5ml)加入到反应瓶 R1。0-5℃搅拌 10min, 升至室温搅拌 3h 反应完全后, 减压浓缩除去溶剂。用制备型高效液相色谱(prepare-HPLC)纯化, 冻干, 得到白色粉末(55mg, 20%)。LC-MS: $[1/2M+H]^+=739$ 。

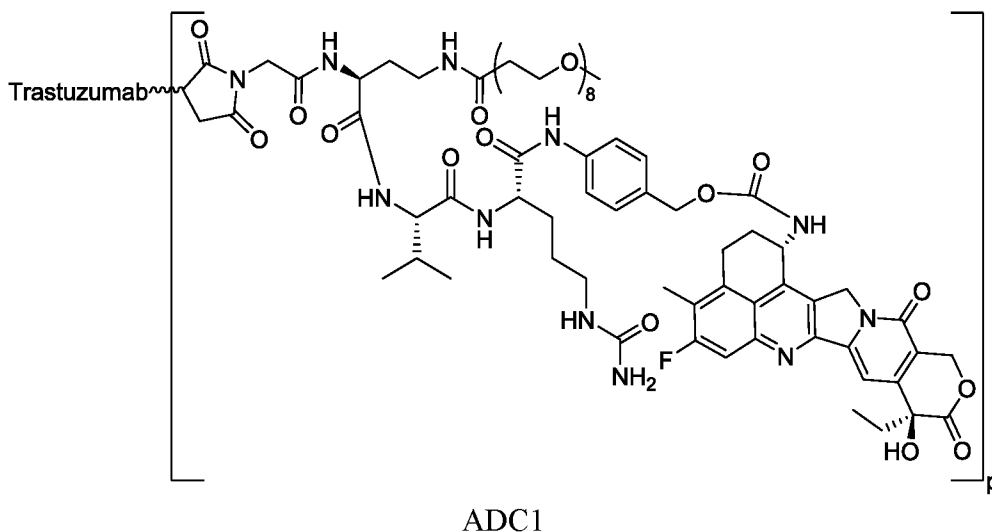
实施例 7. 中间体 (CB14-Exatecan) 的合成

4-(18S,21S)-18-(2-(2,5-二氧六环-2,5-二氢-1h-吡咯-1-基)乙酰氨基)-21-异丙基-14,19,22-三氧代-24-(3-脲基丙基)-2,5,8,11-四氧-15,20,23-三氮杂二十五烷-25-胺基)-(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-1-氨基甲酸酯的合成



类似地, 将 4-((18S,21S)-18-(2-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰氨基)-21-异丙基-14,19,22-三氧-24-(3-脲丙基)-2,5,8,11-四氧-15,20,23-三氮杂二十五烷-25-氨基)苯甲基(4-硝基苯基)碳酸酯(190 mg, 0.19 mmol)与 N,N-二甲基甲酰胺(23ml)加入反应瓶 R1, 氮气保护下搅拌降温至 0-5℃。同时取(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-1,2,3,9,12,15-六氢-10h,13h-苯并[3',4':6,7]吡啶[1,2-b]喹啉-10,13-二酮甲磺酸盐(依喜替康甲磺酸盐; 101 mg, 0.19 mmol; Advanced ChemBlocks 公司)与 N,N-二甲基甲酰胺(5 mL)加入到另一个反应瓶 R2, 0-5℃滴加三乙胺(3 滴), 搅拌至全溶后。将反应瓶 R2 中溶液滴加到反应瓶 R1 中, 然后用 N,N-二甲基甲酰胺(1 mL)洗涤反应瓶 R2 后, 洗涤液加入到反应瓶 R1 中。再称取 1-羟基苯并三唑(60 mg, 0.44 mmol)、吡啶(0.5 mL)加入到反应瓶 R1。0-5℃搅拌 10min, 升至室温搅拌 5.5h 反应完全后, 35℃减压浓缩除去溶剂。用制备型高效液相色谱(pre-HPLC)纯化, 冻干, 得到白色粉末。

实施例 8. ADC1 的合成

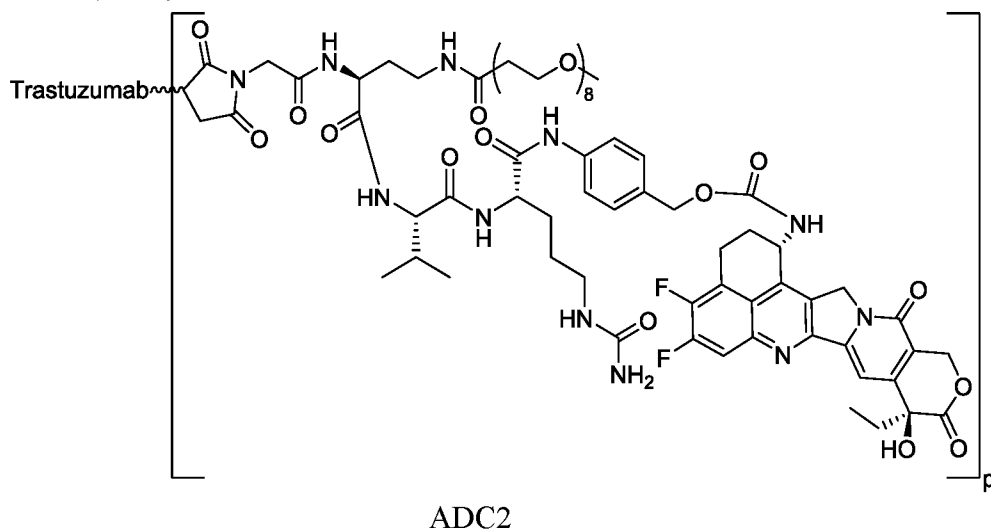


根据抗体的物质的量, 向 Trastuzumab 加入 4.5 摩尔当量 TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine), 然后用 1M Tris 碱将体系 pH 调至 8。25℃孵育 1.5 小时还原。用 10mM 琥珀酸超滤换液去除 TCEP。巯基抗体值通过测定吸光度确定, 通过巯基与 DTNB (5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸), Aldrich 公司)的反应物, 然后测定 412nm 处的吸收值来确定巯基的浓度。

偶联反应时, 根据抗体的物质的量, 加入 12 摩尔当量的 CB07-Exatecan, 25℃搅拌 1 小时后, 加入 0.1M N-乙酰半胱氨酸至终浓度为 2mM, 继续搅拌 15 分钟终止反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后, 用 10mM 琥珀酸经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

最终获得 ADC1 的浓度为 7.5mg/mL, 通过反相色谱测得的 DAR 即 p 为 8。

实施例 9. ADC2 的合成

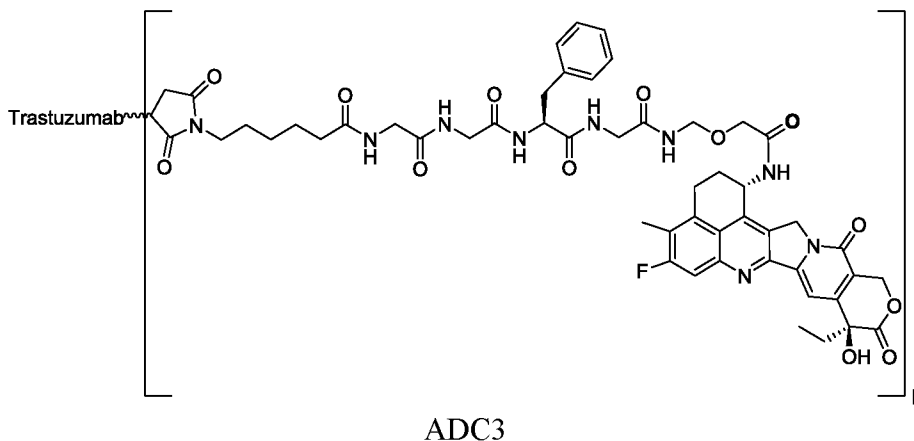


根据抗体的物质的量，向 Trastuzumab 中加入 4.5 摩尔当量 TCEP，然后用 1M Tris 碱将体系 pH 调至 8。25℃ 孵育 1.5 小时还原。用 10mM 琥珀酸超滤换液去除 TCEP。巯基抗体值通过测定吸光度确定，通过巯基与 DTNB（5,5'-二硫代双（2-硝基苯甲酸），Aldrich 公司）的反应物，然后测定 412nm 处的吸收值来确定巯基的浓度。

偶联反应时，根据抗体的物质的量，加入 12 摩尔当量的 CB07-D-1，25℃ 搅拌 2 小时后，加入 0.1M N-乙酰半胱氨酸至终浓度为 2mM，继续搅拌 15 分钟终止反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后，用 10mM 琥珀酸经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

ADC2 浓度为 3.61mg/mL，DAR 即 p 通过反相色谱测定为 7.4。

实施例 10. ADC3 的合成（对照药物）

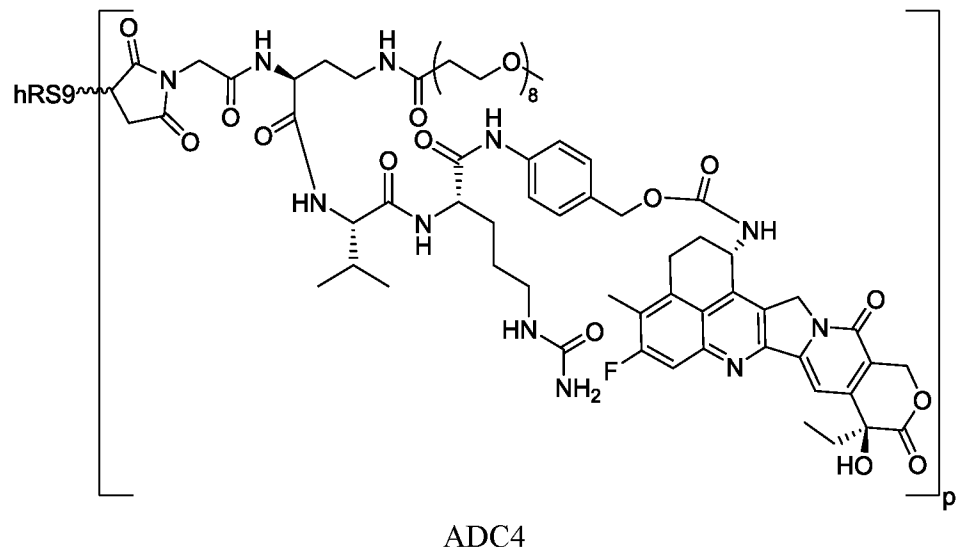


根据抗体的物质的量，向 Trastuzumab 中加入 4.5 摩尔当量 TCEP，然后用 1M Tris 碱将体系 pH 调至 8。25℃ 孵育 1.5 小时还原。用 10mM 琥珀酸超滤换液去除 TCEP。巯基抗体值通过测定吸光度确定，通过巯基与 DTNB（5,5'-二硫代双（2-硝基苯甲酸），Aldrich 公司）的反应物，然后测定 412nm 处的吸收值来确定巯基的浓度。

偶联反应时，根据抗体的物质的量，加入 12 摩尔当量的 Deuxtcan, (MCE, Cat.#HY-13631E)，25℃ 搅拌 2 小时后，加入 0.1M N-乙酰半胱氨酸至终浓度为 2mM，继续搅拌 15 分钟终止反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后，用 10mM 琥珀酸经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

ADC3 浓度为 4.19 g/L, DAR 即 p 通过 RP-HPLC 测定为 7.6。

实施例 11. ADC4 的合成

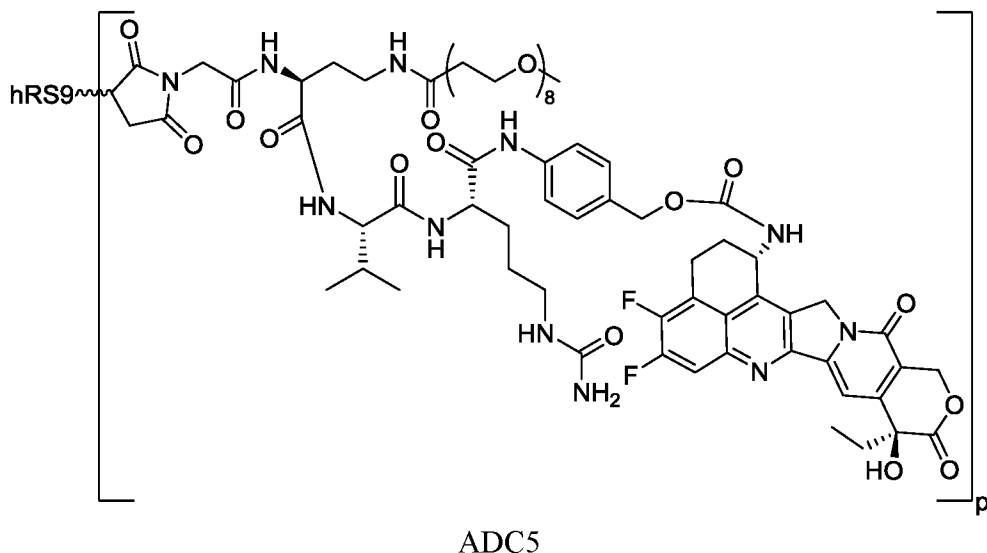


根据抗体的物质的量, 向 hRS9 抗体中加入 2.7 摩尔当量 TCEP, 然后用 1M Tris 碱将体系 pH 调至 7。25℃ 孵育 2 小时还原。用 10mM 琥珀酸超滤换液去除 TCEP。巯基抗体值通过测定吸光度确定, 通过巯基与 DTNB (5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸), Aldrich 公司) 的反应物, 然后测定 412nm 处的吸收值来确定巯基的浓度。

偶联反应时, 根据抗体的物质的量, 加入 6 摩尔当量的 CB07-Exatecan, 25℃ 搅拌 2 小时后, 加入 0.1M N-乙酰半胱氨酸至终浓度为 2mM, 继续搅拌 15 分钟终止反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后, 用 10mM 琥珀酸经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

ADC4 的蛋白浓度为 8.46 mg/mL, DAR 即 p 通过 RP-HPLC 检测为 4.2。

实施例 12. ADC5 的合成



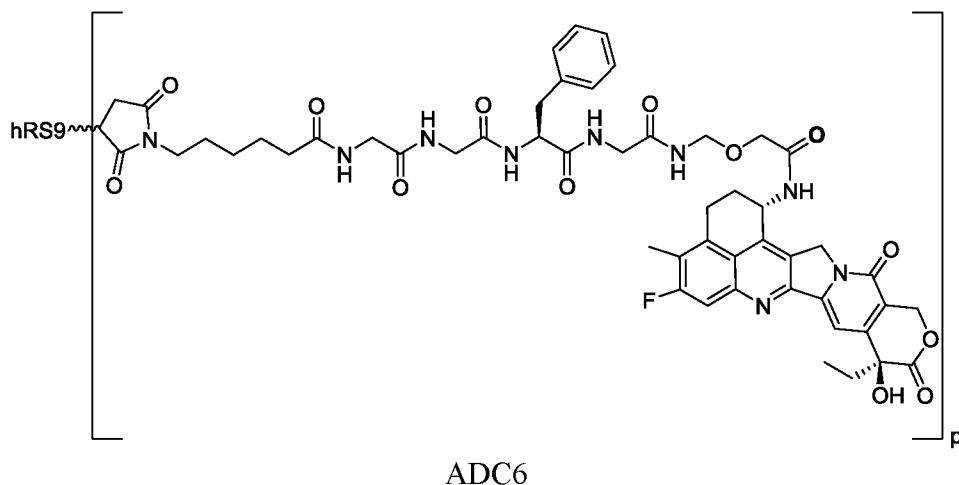
根据抗体的物质的量, 向 hRS9 抗体中加入 2.7 摩尔当量 TCEP, 然后用 1M Tris 碱将体系 pH 调至 7。25℃ 孵育 2 小时还原。用 10mM 琥珀酸超滤换液去除 TCEP。巯基抗体值

通过测定吸光度确定,通过巯基与 DTNB (5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸), Aldrich 公司) 的反应物, 然后测定 412nm 处的吸收值来确定巯基的浓度。

偶联反应时, 根据抗体的物质的量, 加入 6 摩尔当量的 CB07- D-1, 25℃ 搅拌 2 小时后, 加入 0.1M N-乙酰半胱氨酸至终浓度为 2mM, 继续搅拌 15 分钟终止反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后, 用 10mM 琥珀酸经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

ADC5 的蛋白浓度为 6.5 mg/mL, DAR 即 p 通过 RP-HPLC 检测为 4.8。

实施例 13. ADC6 的合成

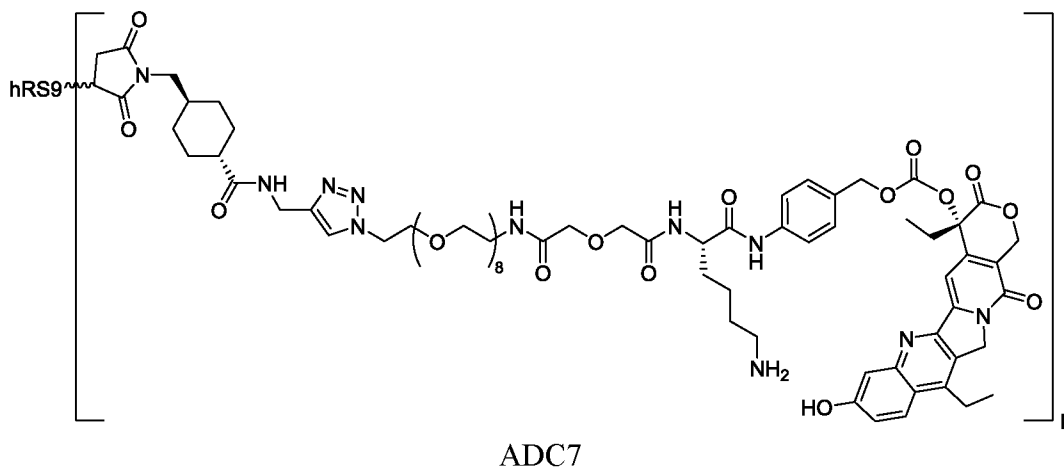


根据抗体的物质的量, 向 hRS9 抗体中加入 2.7 摩尔当量 TCEP, 然后用 1M Tris 碱将体系 pH 调至 7。25℃ 孵育 2 小时还原。用 10mM 琥珀酸超滤换液去除 TCEP。巯基抗体值通过测定吸光度确定, 通过巯基与 DTNB (5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸), Aldrich 公司) 的反应物, 然后测定 412nm 处的吸收值来确定巯基的浓度。

偶联反应时, 根据抗体的物质的量, 加入 6 摩尔当量的 MC-GGFG-Dxd (Deruxtecan, MCE, Cat.#HY-13631E/CS-0045125), 25℃ 搅拌 2 小时后, 加入 0.1M N-乙酰半胱氨酸至终浓度为 2mM, 继续搅拌 15 分钟终止反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后, 用 10mM 琥珀酸经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

ADC6 的蛋白浓度为 2.83 mg/mL, DAR 即 p 通过 RP-HPLC 检测为 4.6。

实施例 14. ADC7 的合成

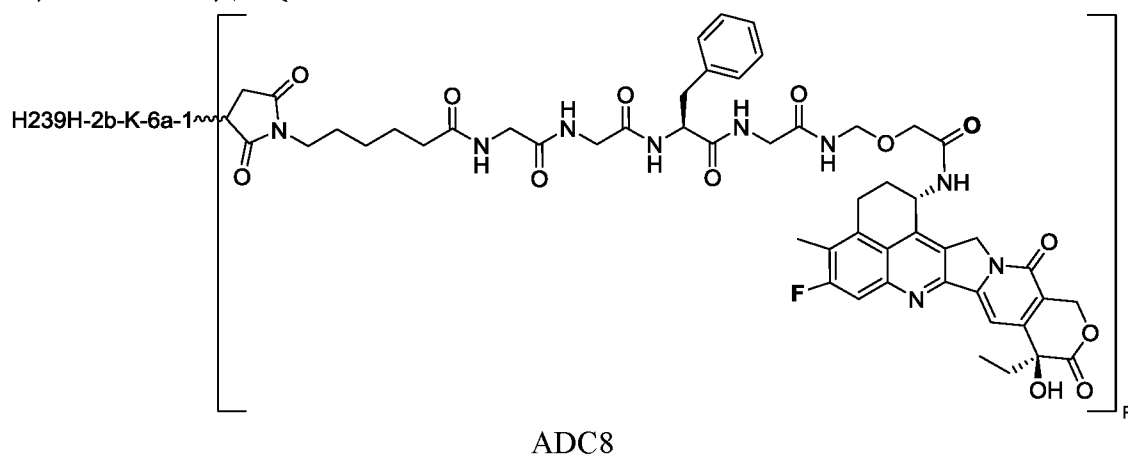


根据抗体的物质的量，向 hRS9 抗体中加入 4.5 摩尔当量 TCEP，然后用 1M Tris 碱将体系 pH 调至 8。25℃ 孵育 2 小时还原。用 10mM 琥珀酸超滤换液去除 TCEP。巯基抗体值通过测定吸光度确定，通过巯基与 DTNB (5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)，Aldrich 公司) 的反应物，然后测定 412nm 处的吸收值来确定巯基的浓度。

偶联反应时，根据抗体的物质的量，加入 12 摩尔当量的 CL2A-SN38(具体可参考专利 US2018161440A1)，25℃ 搅拌 2 小时后，加入 0.1M N-乙酰半胱氨酸至终浓度为 2mM，继续搅拌 15 分钟终止反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后，用 10mM 琥珀酸经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

ADC7 的蛋白浓度为 6.79 mg/mL，DAR 即 p 通过 RP-HPLC 检测约为 8.3。

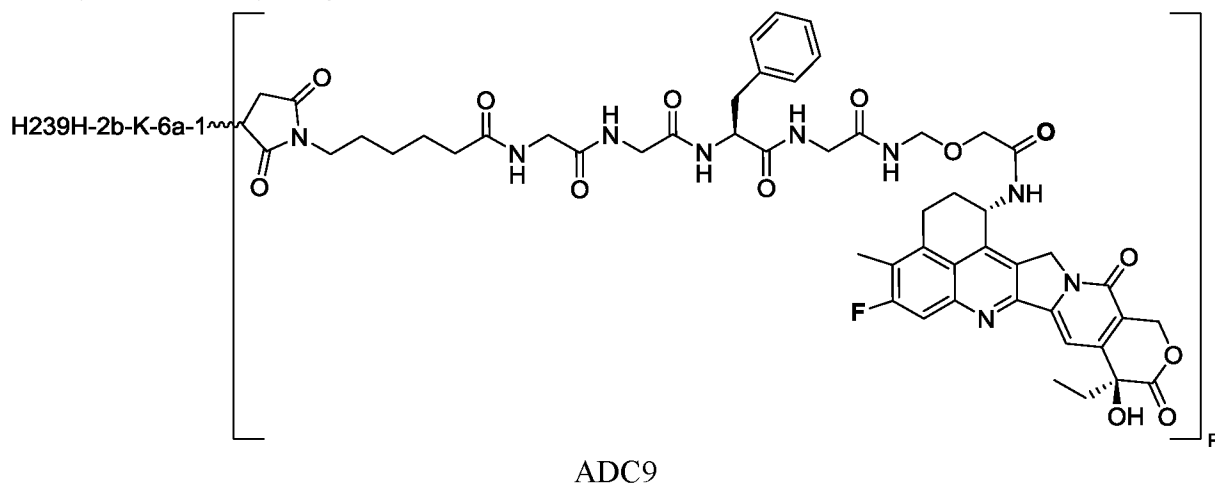
实施例 15. ADC8 的合成



取 5ml 的 11.5mg/ml 的 H239H-2b-K-6a-1 抗体，加入 100μL 的 0.1M EDTA 水溶液，根据抗体的物质的量，加入 2.7 摩尔当量的 10mM TCEP 水溶液，25℃ 恒温箱反应 2h，超滤换液，去除体系中的还原剂 TCEP。随后，根据抗体的物质的量加入 6 摩尔当量的 10mM MC-GGFG-DXD(Deruxtecan, MCE, Cat.#HY-13631E/CS-0045125)的二甲基乙酰胺 (DMA) 溶液进行偶联，加入有机溶剂 DMA 至其体积占偶联体系的 20%，25℃ 恒温箱反应 2h，加入 0.1M NAC (N-乙酰半胱氨酸) 水溶液至其终浓度为 1.5mM，反应 15 分钟后终止反应。

纯化后 ADC8 的 DAR 即 p 通过 RP-UPLC 检测约为 3.43。

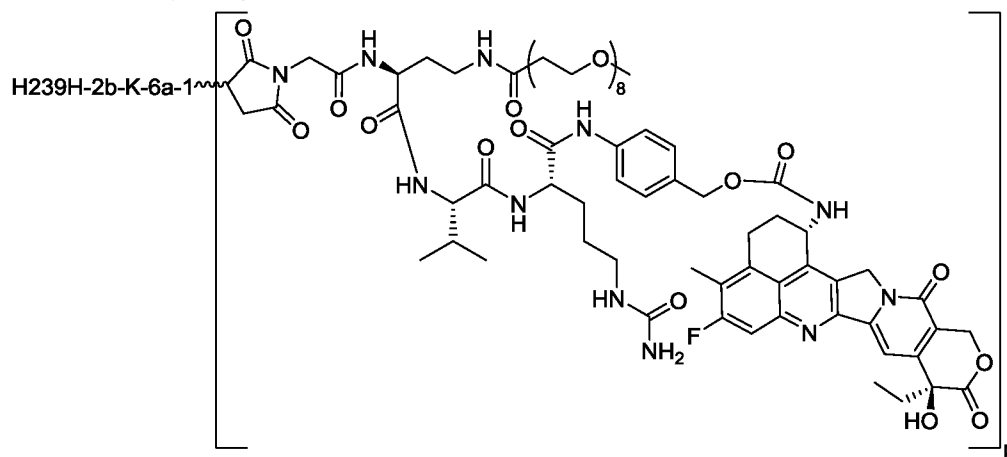
实施例 16. ADC9 的合成



取 5ml 的 11.5mg/ml 的 H239H-2b-K-6a-1 抗体，加入 100 μ L 的 0.1M EDTA 水溶液，根据抗体的物质的量，加入 7 摩尔当量的 10mM TCEP 水溶液，25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2h，超滤换液，去除体系中的还原剂 TCEP。随后，根据抗体的物质的量加入 12 摩尔当量的 10mM MC-GGFG-DXD(Deruxtecan, MCE, Cat.#HY-13631E/CS-0045125)的二甲基乙酰胺(DMA)溶液进行偶联，加入有机溶剂 DMA 至其体积占偶联体系的 20%，25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2h，加入 0.1M NAC (N-乙酰半胱氨酸) 水溶液至其终浓度为 2mM，反应 15 分钟后终止反应。

纯化后 ADC9 的 DAR 即 p 通过 RP-UPLC 检测约为 7.67。

实施例 17. ADC10 的合成

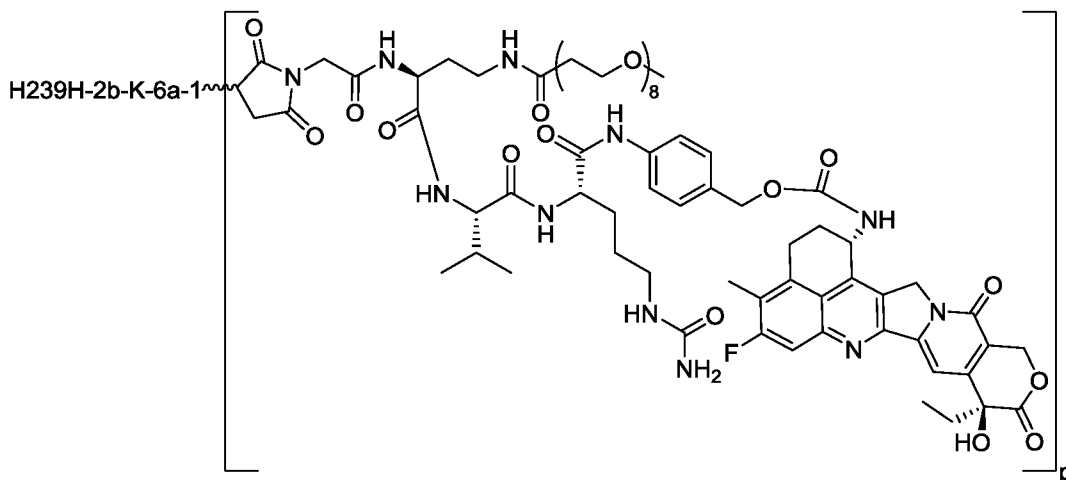


ADC10

取 5ml 的 11.5mg/ml 的 H239H-2b-K-6a-1 抗体，加入 100 μ L 的 0.1M EDTA 水溶液，根据抗体的物质的量，加入 2.7 摩尔当量的 10mM TCEP 水溶液，25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2h，超滤换液，去除体系中的还原剂 TCEP。随后，根据抗体的物质的量加入 6 摩尔当量的 10mM CB07-Exatecan 的二甲基乙酰胺(DMA)溶液进行偶联，加入有机溶剂 DMA 至其体积占偶联体系的 20%，25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2 h15min，加入 0.1M NAC (N-乙酰半胱氨酸) 水溶液至其终浓度为 1.5mM，反应 15 分钟后终止反应。

纯化后 ADC10 的 DAR 即 p 通过 RP-UPLC 检测约为 4.05。

实施例 18. ADC11 的合成

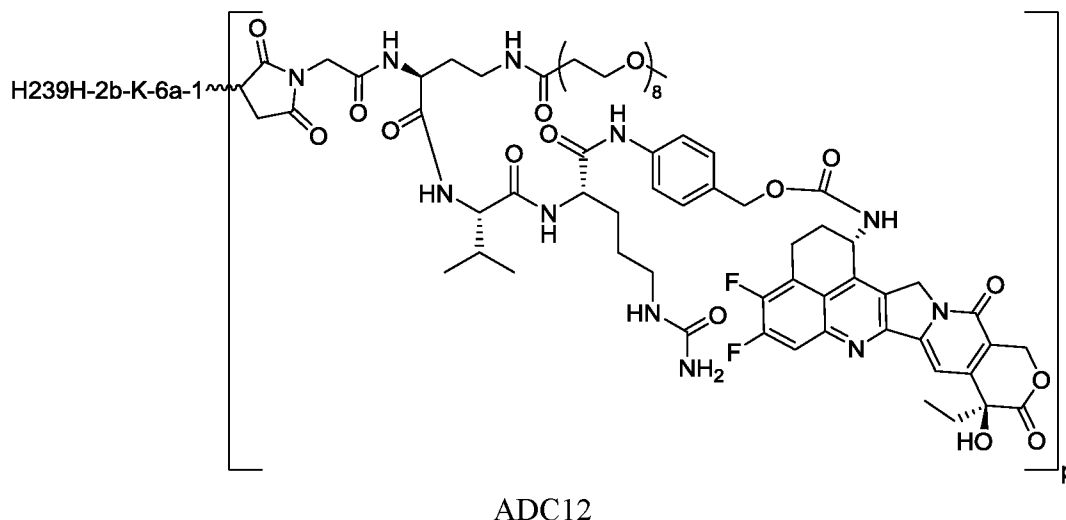


ADC11

取 15.2ml 的 11.5mg/ml 的 H239H-2b-K-6a-1 抗体, 加入 326 μ L 的 0.1M EDTA 水溶液, 根据抗体的物质的量, 加入 7 摩尔当量的 10mM TCEP 水溶液, 25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2h, 超滤换液, 去除体系中的还原剂 TCEP。随后, 根据抗体的物质的量加入 12 摩尔当量的 10mM CB07-Exatecan 的二甲基乙酰胺 (DMA) 溶液进行偶联, 加入有机溶剂 DMA 至其体积占偶联体系的 20%, 25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2.5 h, 加入 0.1M NAC (N-乙酰半胱氨酸) 水溶液至其终浓度为 2mM, 反应 15 分钟后终止反应。

纯化后 ADC11 的 DAR 即 p 通过 RP-UPLC 检测约为 7.49。

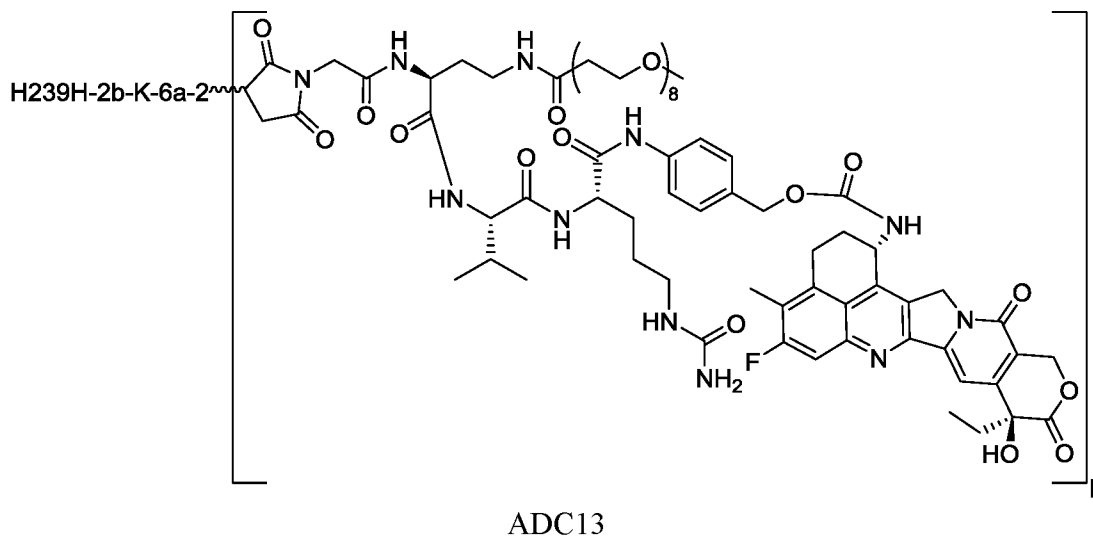
实施例 19. ADC12 的合成



取 2.5ml 的 11.5mg/ml 的 H239H-2b-K-6a-1 抗体, 加入 50 μ L 的 0.1M EDTA 水溶液, 根据抗体的物质的量, 加入 6 摩尔当量的 15mM TCEP 水溶液, 25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2h, 超滤换液, 去除体系中的还原剂 TCEP。随后, 根据抗体的物质的量加入 12 摩尔当量的 10mM CB07-D-1 的二甲基乙酰胺 (DMA) 溶液进行偶联, 加入有机溶剂 DMA 至其体积占偶联体系的 20%, 25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2.5 h, 加入 0.1M NAC (N-乙酰半胱氨酸) 水溶液至其终浓度为 2mM, 反应 15 分钟后终止反应。

纯化后 ADC12 的 DAR 即 p 通过 RP-UPLC 检测约为 7.65。

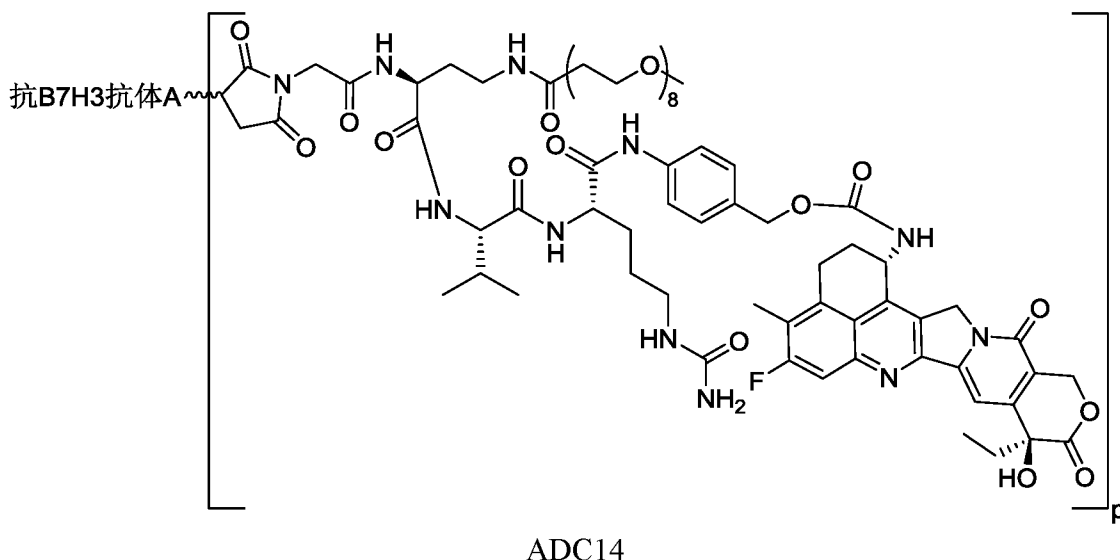
实施例 20. ADC13 的合成



取 3ml 的 7.89mg/ml 的 H239H-2b-K-6a-2 抗体, 加入 60 μ L 的 0.1M EDTA 水溶液, 根据抗体的物质的量, 加入 7 摩尔当量的 10mM TCEP 水溶液, 25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2h, 超滤换液, 去除体系中的还原剂 TCEP。随后, 根据抗体的物质的量加入 15 摩尔当量的 100mM CB07-Exatecan 的二甲基乙酰胺 (DMA) 溶液进行偶联, 25 $^{\circ}$ C 恒温箱反应 2h, 加入 0.1M NAC (N-乙酰半胱氨酸) 水溶液至其终浓度为 2mM, 反应 15 分钟后终止反应。

纯化后 ADC13 的 DAR 即 p 通过 RP-UPLC 检测约为 7.19。

实施例 21. ADC14 的合成



取 7.0 L 23.9 g/L 抗 B7H3 抗体 A 溶液, 用 10 mM 琥珀酸水溶液将抗体 V3 浓度调整至 18 g/L 得到抗体溶液, 加入 0.1 M EDTA 水溶液至 EDTA 终浓度为 2 mM, 调 pH 至 7, 根据抗体物质的量, 加入 5.4 摩尔当量 0.2 M TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) 水溶液 (体积 30.2 mL), 25 $^{\circ}$ C 180 rpm 搅拌反应 2 h; 用 10 mM 琥珀酸水溶液、使用截留分子量为 30 KD 的超滤膜包超滤换液 10 个体积去除 TCEP。

偶联反应时, 根据抗体物质的量, 加入 15 倍摩尔当量的 100 mM CB07-Exatecan 的二甲基乙酰胺 (DMA) 溶液, 25 $^{\circ}$ C 180 rpm 搅拌反应 2 小时, 加入 0.4 M N-乙酰半胱氨酸水溶液至其终浓度为 2 mM, 继续搅拌 15 分钟终止偶联反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后, 用 10 mM 琥珀酸水溶液经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

最终获得 ADC14 的浓度为 18.8 mg/mL, 通过反相色谱测得的 DAR 即 p 为 8.0。

实施例 22. ADC15 的合成 (对照药物)

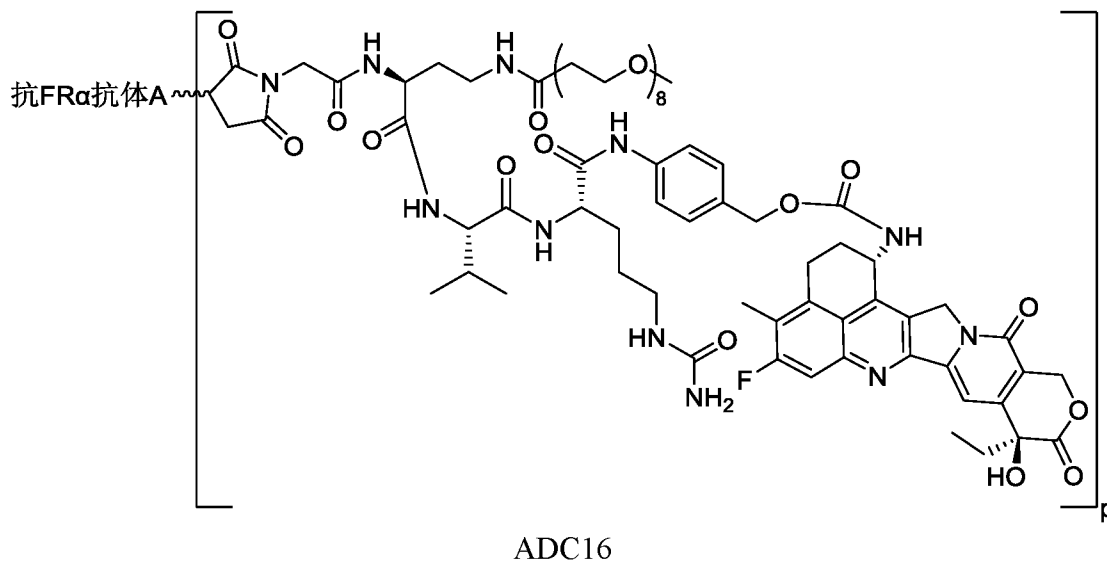
取 5 mL 3.08 g/L 的抗 B7H3 抗体 A 溶液, 加入 0.1 M EDTA 水溶液至 EDTA 终浓度为 2 mM, 根据抗体物质的量, 加入 2.7 摩尔当量 10 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) 水溶液 (体积 27.7 μ L), 调 pH 至 7, 25 $^{\circ}$ C 摇床振荡反应 2 h; 用 10 mM 琥珀酸水溶液、使用截留分子量为 30 KD 的超滤膜包超滤换液 10 个体积去除 TCEP。

偶联反应时, 根据抗体物质的量, 加入 6 倍摩尔当量的 MC-GGFG-DXD (MedChem Express, Lot#41557, CAS: 1599440-13-7, 产品名称: Deruxtecan), 25 $^{\circ}$ C 摇床振荡反应 2 小时, 加入 0.1 M N-乙酰半胱氨酸水溶液至其终浓度为 1.5 mM, 继续振荡 15 分钟

终止偶联反应。反应混合物用 0.22 微米的滤器过滤后，用 10 mM 琥珀酸水溶液经 Sephadex G-25 树脂洗脱交换。

最终获得 ADC15 的浓度为 6.3 mg/mL，通过反相色谱测得的 DAR 即 p 为 3.7。

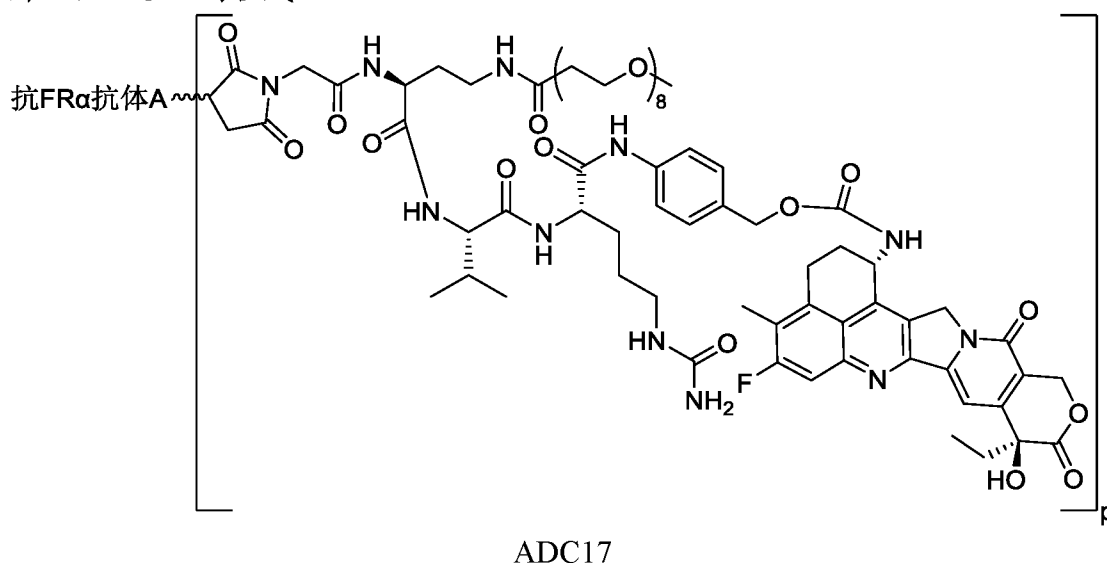
实施例 23. ADC16 的合成



使用偶联缓冲液（10 mM 琥珀酸水溶液）将抗 FR α 抗体 A 浓度调整至 18 g/L，加入 0.1 M EDTA 水溶液至 EDTA 终浓度为 2 mM，根据抗体物质的量加入 5.4 摩尔当量 0.2 M TCEP 水溶液，调 pH 至 7，25°C 180 rpm 搅拌反应 2 h，使抗体链间二硫键被还原为游离巯基。使用 30 KD 的超滤膜包超滤换液 10 个体积，去除体系中的还原剂 TCEP。

根据抗体物质的量，加入 15 倍摩尔当量的 100 mM CB07-Exatecan 的二甲基乙酰胺（DMA）溶液，25°C 180 rpm 搅拌反应 2 h。最后加入 0.2 M 的 N-乙酰半胱氨酸水溶液至其终浓度为 2 mM，继续反应 15 min 终止偶联反应，反应混合物经纯化、超滤后获得浓度为 23.56 mg/mL 的 ADC16，通过反向色谱测得的 DAR 即 p 为 8。

实施例 24. ADC17 的合成



使用偶联缓冲液（10 mM 琥珀酸水溶液）将抗 FR α 抗体 A 浓度调整至约 18 g/L，加入 0.1 M EDTA 水溶液至 EDTA 终浓度为 2 mM，根据抗体物质的量加入 2.5 摩尔当量 10 mM TCEP 水溶液，调 pH 至 7，25℃ 摇床振荡反应 2 h，使抗体链间二硫键被还原为游离巯基。超滤换液 10 个体积，去除体系中的还原剂 TCEP。

根据抗体物质的量，加入 6 倍摩尔当量的 100 mM CB07-Exatecan 的二甲基乙酰胺（DMA）溶液，25℃ 摇床振荡反应 1 小时。最后加入 0.1 M 的 N-乙酰半胱氨酸水溶液至其终浓度为 1.5 mM，继续反应 15 min 终止偶联反应，反应混合物经纯化后获得浓度为 1.34 mg/mL 的 ADC17，通过反向色谱测得的 DAR 即 p 为 4。

活性实施例

实施例 1

ADC1 的体外生物学活性

我们使用 HER2 阳性乳腺癌肿瘤细胞系 NCI-N87、MDA-MB-453、SK-BR-3、BT474 和 HER2 阴性细胞系 MDA-MB-468（购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心）评价了 ADC1 抗体对肿瘤细胞的生长抑制。简言之，细胞生长至对数生长期后，胰蛋白酶消化，使细胞剥离，然后悬浮于 100 μ L 完全培养基，4000-8000 个细胞接种于 96 孔板进行培养，37℃ 贴壁生长 3-5h 或者过夜，然后加入 100 μ L 含有不同浓度的抗 ADC1 的培养基，120 小时后，除去培养皿中的培养基，用细胞计数试剂盒-8（CCK-8，日本同仁化学）试剂进行相对细胞增殖分析。结果表明，ADC1 对 HER2 阳性的细胞均有生长抑制作用，对阴性细胞 MDA-MB-468 生长抑制作用 EC₅₀ > 10000ng/mL。

细胞系	EC ₅₀ (ng/mL) ADC1
NCI-N87	82
MDA-MB-453	36
SK-BR-3	43
BT474	62
MDA-MB-468	> 10000

实施例 2

ADC4 的体外生物学活性

我们使用 Trop2 阳性乳腺癌肿瘤细胞系 MDA-MB-453、MDA-MB-468 和 MX-1 以及 Trop2 阴性细胞系 HGC27（购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心）评价了 ADC4 抗体对肿瘤细胞的生长抑制。简言之，细胞生长至对数生长期后，胰蛋白酶消化，使细胞剥离，然后悬浮于 100 μ L 完全培养基，4000-8000 个细胞接种于 96 孔板进行培养，37℃ 贴壁生长 3-5h 或者过夜，然后加入 100 μ L 含有不同浓度的抗 ADC4 的培养基，120 小时后，除去培养皿中的培养基，用细胞计数试剂盒-8（CCK-8，日本同仁化学）试剂进行相对细胞增殖分析。结果表明，ADC4 对 Trop2 阳性的细胞均有生长抑制作用，对阴性细胞 HGC27 生长抑制作用 EC₅₀ > 15000ng/mL。

细胞系	EC ₅₀ (ng/mL) ADC4
MX-1	233
MDA-MB-468	157.8
MDA-MB-453	640
HGC27	> 15000

实施例 3

1、CHO-CLDN18.2 稳定细胞系构建

人 CLDN18.2 全长氨基酸序列, (来自 NCBI, NM_001002026.3):

MAVTACQGLGFVVSILIGIAGIIAATCMDQWSTQDLNNPVTAVFNYQGLWRSCVR
ESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAKAN
MTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFGA
ALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTG
FGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 25)。

对应的核酸序列如下:

atggccgtgactgctgtcagggcttgggttcgtggttactgattgggattcgggcatcattgctgccacctgcatggaccagtggag
cacccaagactgtacaacaacccgtaacagctgtttcaactaccaggggctgtggcgctcctgtgtccgagagagctctggttcaccg
agtgcggggctacttcaccctgtggggctgccagccatgtgcaggcagtgcgagccctgatgatcgtaggcatcgtcctgggtgcca
ttggcctcctggtatccatctttccctgaaatgcacccgattggcagcatggaggactctgccaaagccaacatgacactgacctccggg
atcatgttcattgtctcaggtctttgtcaattgctggagtgtctgtgttgcacatgctggtgactaactctggatgtccacagctaacatgt
acaccggcatgggtgggatggtgcagactgttcagaccaggtacacattggtgcggctgtgtcgtgggtggttcgtggagcctcac
actaattgggggtgtgatgatgtgcacgcctgccggggcctggcaccagaagaaaccaactacaaagccgtttcttatcatgcctcaggcc
acagtgttgctacaagcctggaggttcaaggccagcactggcttgggtccaacacacaaaaacaagaagatatcatgatggaggtgcc
gcacagaggacgaggtacaatcttatcctccaagcagcactatgtg (SEQ ID NO: 26)。

合成上述人 CLDN18.2 对应的核酸序列, 并在序列两端添加酶切位点 HindIII 和 EcoRI 的序列, 然后构建到 pcDNA3.1 表达载体 (Invitrogen, 货号为 V79020) 上, 接着通过电转的方法转染到 CHO 细胞 (Life technologies, 货号: A13696-01) 中, 电转条件为: 电压 300V, 时间 17 毫秒, 4mm 电转杯, 48h 后加入 50 μ M 的 MSX (蛋氨酸亚氨基代砒) 筛选压, 2 周后, 筛选阳性细胞。利用 FACS 检测, 筛选高表达的细胞株。收集细胞, 用 PBS (磷酸缓冲液, 1L PBS 含 NaCl 8.0g, Na₂HPO₄ 0.9g, KH₂PO₄ 0.156g, KCl 0.125 g, pH 7.2-7.4) 洗一遍后, 加入 3 μ g/ml 抗 CLDN18.2 抗体 (IMAB362, 其序列与专利 US20090169547 中杂交瘤细胞 175D10 表达的抗体的序列是相同的), 4 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, 用 PBS 洗 2 遍, 加入 100 μ l 1:500 稀释的羊抗人 IgG-Fc PE 荧光二抗 (货号: 12-4998-82, eBioscience), 4 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, 用 PBS 洗 2 遍, C6 流式细胞仪 (BD, 型号: C6 Flow cytometer) 分析。将最终得到的细胞命名为 CHO-CLDN18.2 细胞, FACS 检测结果如图 1 所示。

2、ADC8、ADC10、ADC11 及 ADC12 的增殖抑制实验

我们使用 CHO-CLDN18.2 细胞评价抗 CLDN18.2 ADC 对细胞的生长抑制。收集对数生长期的 CHO-CLDN18.2 细胞, 800rpm, 离心 5min, 去上清, 用 CD-CHO-AGT (货号: 12490; life technologies) 培养基洗一遍, 800rpm, 离心 5min, 去上清。用 0.5%FBS (货号: FSP500; Excell Bio) CD-CHO-AGT 培养基重悬细胞, 调整细胞密度为 5 $\times$ 10⁴ 个/ml, 100 μ l/孔铺于 96 孔细胞培养板中 (货号: 3599; costar)。加入用 0.5%FBS CD-CHO-AGT 梯度稀释好的 ADC, 100 μ l/孔, ADC8、ADC10、ADC11、ADC12 终浓度为: 500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.813、3.9、1.95nM。置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中, 培养 5 天后, 每孔加入 20 μ l CCK-8 (货号: CK04, DojinDo), 37 $^{\circ}$ C 放置 1h, 于酶标仪 (型号: SpectraMax M3, Molecular Devices) 读取 OD450nm 吸光值, 计算细胞抑制率。抑制率%=(1-样品孔吸光值/对照孔吸光值) $\times$ 100。

由图 2 显示, ADC8、ADC10、ADC11 及 ADC12 对 CHO-CLDN18.2 细胞有明显的增殖抑制作用。

实施例 4

ADC1 和 ADC2 旁观者效应

将 HER2 阳性细胞 SK-BR-3 和 HER2 阴性细胞 MDA-MB-468 按照密度(7.5 万/孔: 20 万/孔)的比例接种至 6 孔板中, 培养 3-5h 后, 加入终浓度为 0.1nM、0.5nM 和 5nM 的 ADC1 和对照药物 ADC3, 加入 0.3nM、2nM 和 20nM 的 ADC2, 37℃继续培养 120h 后, 用胰酶消化细胞, 终止后 PBS 洗一遍, 对细胞进行计数, 随后 4℃使用标记 FITC 的抗 HER2 抗体(与 Trastuzumab 结合表位不同)标记细胞 30min-1h, 流式细胞仪检测不同细胞的比例, 计算出不同处理后培养皿中的各个细胞比例, 由图 3 可知。ADC1、ADC2 和 ADC3 均可见旁观者效应, 其中 ADC1 旁观者效应强于 ADC2 和对照药物 ADC3。

实施例 5

ADC4 和 ADC5 旁观者效应

将 Trop2 阳性细胞 MDA-MB-468 和 Trop2 阴性细胞 HGC27 按照 3:1 的密度(15 万+5 万)的比例接种至 6 孔板中, 培养 3-5h 后, 加入终浓度为分别为 0.1nM、5nM 和 50nM 的 ADC4 和 ADC5 和对照药物 ADC6, 37℃继续培养 120h 后, 用胰酶消化细胞, 终止后 PBS 洗一遍, 对细胞进行计数, 随后 4℃使用标记 FITC 的抗 HER2 抗体标记细胞 30min-1h, 流式细胞仪检测不同细胞的比例, 计算出不同处理后培养皿中的各个细胞比例, 由图 4 可知。ADC4、ADC5 和 ADC6 均可见旁观者效应, 其中 ADC4 旁观者效应强于 ADC5 和对照药物 ADC6。

实施例 6

ADC9、ADC11 及 ADC12 旁观者效应

在体外共培养 CLDN18.2 阳性细胞 KATO3 和阴性细胞 HGC-27 的条件下, 观察不同 ADC 对这两个细胞的杀伤情况。收集对数生长期的 KATO3(CLDN18.2 阳性细胞)和 HGC-27(CLDN18.2 阴性细胞), 用 2%FBS RPMI 1640 重悬细胞, 铺于 6 孔板(货号: 3516; costar)中, KATO3 每孔 12 万个细胞, HGC-27 每孔 8 万个细胞。置于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养过夜, 第二天加入 3ml ADC9、ADC11、ADC12, ADC 终浓度为 10nM、1 nM、0.1 nM, 并以不加 ADC 孔作为阴性对照。置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱, 培养 5 天, 用胰蛋白酶(货号: 25200-072; gibco)消化收集细胞, 计算活细胞总数。

按蛋白质: FITC=1mg: 150 μg 的比例将溶解于 DMSO(D2650, sigma)中的 FITC(3326-32-7, sigma)缓慢加入到 1mg/ml 的 hRS9 抗体溶液中, 边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀, 暗处 4℃反应 8 小时。加入 5M 的 NH₄Cl(A501569, 生工生物)至终浓度 50mM, 4℃终止反应 2 小时, 将交联物在 PBS(B548117-0500, 生工生物)中透析四次以上, 至透析液清亮, 得到 hRS9-FITC 抗体。

为了确定总存活细胞中 KATO3 和 HGC-27 的比例, 将细胞使用 hRS9-FITC 抗体染色(KATO3 是 Trop2 阳性细胞)并在冰上孵育 30min, 洗涤后, 使用 CytoFLEX 流式细胞仪(型号: AOO-1-1102, 贝克曼)测量染色细胞的荧光信号。根据每个处理孔中 KATO3 阳性和 HGC-27 阴性细胞的数量和比例, 计算 KATO3 和 HGC-27 细胞的数量, 结果见图 5。

由图 5 可知, ADC9、ADC11 及 ADC12 对阳性细胞和阴性细胞都有杀伤作用, 其中 ADC11 对阴性细胞的旁观者效应最强。

实施例 7

1、ADC14 的体外细胞毒性

使用 B7-H3 阳性细胞 Calu-6 和 CHO-K1-B7-H3 和 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1 评价 ADC14 对肿瘤细胞的体外细胞毒性。简而言之，对于 Calu-6，将细胞重悬于 2%胎牛血清的 DMEM 培养基中，按照 100 μ L/孔（5000 个细胞）接种于 96 孔板，37℃，5%CO₂ 培养箱贴壁过夜，加入 100 μ L 不同浓度的 ADC（初始浓度为 200 μ g/mL，4 倍梯度稀释，溶媒为含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，继续培养 7 天；

对于 CHO-K1 或 CHO-K1-B7-H3，将细胞重悬于含有 2%胎牛血清的 CD CHO AGT 培养基（gibco，货号 12490-003）中，按照 100 μ L/孔（4000 个细胞）接种于 96 孔板，37℃，5%CO₂ 培养箱贴壁过夜，加入 100 μ L 不同浓度的 ADC（初始浓度为 200 μ g/mL，4 倍梯度稀释，溶媒为含有 2%胎牛血清的 CD CHO AGT 培养基（gibco，货号 12490-003）），继续培养 6 天，加入 100 μ L CCK8 溶液（细胞计数试剂盒-8(购买公司 DOJINDO 及货号 CK04)），37℃，5%CO₂ 培养箱孵育 30 分钟，使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度，计算 IC₅₀ 值。

表 8 ADC14 对肿瘤细胞的体外细胞毒性

细胞系	ADC14 IC ₅₀ (nM)	ADC15 IC ₅₀ (nM)
Calu-6	16.32	68.75
CHO-K1-B7-H3	0.35	0.77
CHO-K1	-	-

注：“-”代表杀伤作用不显著

结果见表 8，ADC14 对 B7-H3 阳性细胞 Calu-6 和 CHO-K1-B7-H3 呈现出较强的体外细胞毒性，ADC14 对 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1 杀伤作用不显著。

2、ADC14 的旁观者效应

使用 B7-H3 阳性细胞 CHO-K1-B7-H3 和 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1-FR α 评价 ADC14 的旁观者效应。简而言之，将 B7-H3 阳性细胞 CHO-K1-B7-H3 或 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1-FR α 重悬于含有 2%胎牛血清的 CD CHO AGT 培养基（gibco，货号 12490-003）中，按照 100 μ L/孔（10000 个细胞）接种于 96 孔板，37℃，5%CO₂ 培养箱贴壁过夜，加入 100 μ L 不同浓度的 ADC14（初始浓度为 6.25 μ g/mL，4 倍梯度稀释，溶媒为含有 2%胎牛血清的 CD CHO AGT 培养基（gibco，货号 12490-003）），37℃，5%CO₂ 培养箱孵育 3 d；ADC14 处理结束前一天，将 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1-FR α 重悬于含有 2%胎牛血清的 CD CHO AGT 培养基（gibco，货号 12490-003）中，按照 100 μ L/孔（6000 个细胞）接种于 96 孔板，37℃，5%CO₂ 培养箱孵育过夜；将不同浓度的 ADC14 处理的 B7-H3 阳性细胞 CHO-K1-B7-H3 或 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1-FR α 培养上清液直接加入前一天铺板的 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1-FR α 的孔中，继续培养 4 d，弃培养上清液，加入 100 μ L CCK8 溶液（细胞计数试剂盒-8(购买公司 DOJINDO 及货号 CK04)），37℃，5%CO₂ 培养箱孵育 30 分钟，使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

结果如图 6 所示，ADC14 处理的 B7-H3 阳性细胞 CHO-K1-B7-H3 培养上清液对 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1-FR α 有显著的杀伤作用，而 ADC14 处理的 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1-FR α 培养上清液对 B7-H3 阴性细胞 CHO-K1-FR α 没有显著的杀伤作用。

实施例 8

1、ADC16 体外细胞毒性

以 FR α 阳性细胞株 JEG-3、MCF-7 评价 ADC16 介导的体外细胞毒性。通过胰蛋白酶收获细胞，用梯度稀释的 ADC16 培养，然后在 37℃ 孵育。使用 CCK-8 在 5 天后测定生存能力。在 SpectraMax Gemini (美谷分子) 上读取和分析，以确定 IC₅₀ (半最大抑制浓度) 值。

实验过程：

1) JEG-3 细胞用 DMEM+10%FBS 调整细胞密度为 6 万个细胞/mL，并以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板 (厂家: Corning, 货号: 3599) 中，放在 Series II Water Jacketed CO₂ Incubator 中 37℃，5%CO₂ 条件下静置 3 h。

MCF-7 细胞用 DMEM+2%FBS 调整细胞密度为 4 万个细胞/mL，并以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板 (厂家: Corning, 货号: 3599) 中，放在 Series II Water Jacketed CO₂ Incubator 中 37℃，5%CO₂ 条件下静置 2 h。

2) 用对应细胞的培养基稀释 ADC16。

JEG-3 细胞: ADC16 浓度从 1000 nM 开始 4 倍稀释，共 8 个浓度梯度，再以每孔 100 μ L 的体积加入到细胞中。

MCF-7 细胞: ADC16 浓度从 250 nM 开始 4 倍稀释，共 8 个浓度梯度，再以每孔 100 μ L 的体积加入到细胞中。

致死对照选用 3000 nM Exatecan。空白对照为对应细胞的培养基。

每个浓度设置 3 个复孔。

3) 放在 Series II Water Jacketed CO₂ Incubator 中培养 5 天，条件为 37℃，5%CO₂。

4) 5 天后弃培养上清，加入含 10% CCK-8 的 RPMI 基础培养基 1640 (1 $\times$)，放在 Series II Water Jacketed CO₂ Incubator 中 37℃，5%CO₂ 条件下静置 1 h 左右。

5) 在酶标仪 SpectraMax M3 进行读数，吸收光波长为 450 nm。

6) 数据分析整理: 以 Exatecan 处理孔数据为完全杀伤对照，以空白对照为零杀伤对照。计算细胞活率公式如下:

$$\text{细胞活率}(\%) = (\text{实验组} - \text{致死对照组}) / (\text{空白对照组} - \text{致死对照组}) \times 100$$

7) 用 GraphPad Prism 处理数据和分析数据。

结果如表 9 所示。结果表明，ADC16 对 FR α 阳性细胞株具有很高的体外细胞毒性。

表 9 ADC16 对 FR α 阳性细胞株的体外细胞毒性

细胞系	IC ₅₀ (nM)
JEG-3	3.611
MCF-7	0.645

2、ADC16 旁观者效应

为了证实 ADC16 诱导的旁观者效应，进行了体外共培养细胞杀伤试验和条件培养基 (CM) 细胞毒性试验。

选择了 FR α 阳性的 JEG-3 细胞以及 FR α 阴性的 A549 细胞 (ADC16 对 A549 细胞基本没有杀伤作用。) 进行实验。分别用 ADC16 处理 JEG-3 细胞 2、3、4 天。然后将 CM 转移到 A549 细胞，监测细胞活力的变化，可以发现 A549 细胞的活力显著下降。

实验过程:

1) JEG-3 用 DMEM+10%FBS 调整细胞密度为 10 万个细胞/mL, 并以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板(厂家: Corning, 货号: 3599)中, 放在 Series II Water Jacketed CO₂ Incubator 中 37℃, 5%CO₂ 条件下静置 2 h。

2) 用 DMEM+10%FBS 培养基稀释 ADC16, 浓度从 2000 nM 开始 4 倍稀释, 10 个浓度梯度, 再以每孔 100 μ L 的体积加入到细胞中。

3) 在第二天和第三天重复步骤 1) 和 2)。

4) 在第五天用 DMEM+2%FBS 培养基调整 A549 细胞密度为 4 万个细胞/mL, 并以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 放在 Series II Water Jacketed CO₂ Incubator 中 37℃, 5%CO₂ 条件下静置 2 h。并加入步骤 1)、2)、3) 的培养上清, 每孔 100 μ L。在列 1 中加入 100 μ L 3000 nM Exatecan 作为致死对照, 在列 12 中加入 100 μ L DMEM+2%FBS 培养基作为空白对照。

5) 放在 Series II Water Jacketed CO₂ Incubator 中培养 3 天。培养条件为 37℃、5%CO₂。

6) 弃培养液, 加入含 10%CKK-8 的 DMEM 培养基。放在 Series II Water Jacketed CO₂ Incubator 中, 37℃避光显色 1 h。随后在酶标仪 SpectraMax M3 进行读数, 吸收光波长为 450 nm。

7) 整理数据。细胞活力计算公式如下:

$$\text{细胞活力}(\%) = (\text{实验孔} - \text{致死孔}) / (\text{空白孔} - \text{致死孔}) * 100$$

8) 用 GraphPad Prism 进行数据分析。

结果如图 7 所示, ADC16 与 FR α 阳性的 JEG-3 细胞体外共培养的培养上清对 A549 细胞有显著的杀伤作用。

实施例 9

大鼠体内药代动力学检测

取一只 6-8 周健康成年的 Sprague Dawley 大鼠, 尾静脉推注 ADC4 约 1 min $\pm$ 10 s, 给药体积为 5 mL/kg, 给药浓度为 20 mg/kg, 分别在给药结束后 0.083 h、1 h、2 h、8 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 和 168 h 采集血液, 于 30-120 分钟之内离心分离血清。通过常规的 ELISA 方法检测血样中总抗体 (Tab) 和 ADC 的浓度。

总抗体的检测方法简述如下, 4℃包被 Trop2-His 过夜, 浓度 0.75 μ g/mL, 37℃5%的脱脂奶粉封闭 2 h, 加入标曲和质控点孵育 2 h, 标曲检测范围为 64 ng/mL-0.5 ng/mL, 64 ng/mL 起始, 2 倍梯度稀释, 质控浓度点设置为 60 ng/mL, 6 ng/mL, 0.6 ng/mL, 质控点回收率需要在 80%-120%之间, 随后加入 1:8000 稀释加入山羊中生产的抗人 κ 轻链过氧化物酶抗体, (厂家: sigma, 货号: A7164-1ML) 二抗, 孵育 1 h, PBST 洗 8 遍后, 加入 TMB 显色, 0.1 M 硫酸终止, OD450 酶标仪读板, 使用酶标检测仪分析软件 SoftMax Pro, 计算不同时间点血样浓度。

ADC 的检测方法简述如下, 4℃包被 Trop2-His 过夜, 浓度 0.75 μ g/mL, 37℃5%的脱脂奶粉封闭 2 h, 加入标曲和质控点孵育 2 h, 标曲检测范围为 64 ng/mL-0.5 ng/mL, 64 ng/mL 起始, 2 倍梯度稀释, 质控浓度点设置为 60 ng/mL, 6 ng/mL, 0.6 ng/mL, 质控点回收率需要在 80%-120%之间, 随后加入兔多抗小分子的 (金斯瑞免疫获得) 二抗 (1:5000 稀释), 孵育 1 h, 1:8000 稀释加入 Fc 片段特异的过氧化物酶亲和纯山羊抗兔 IgG (Jackson immunoresearch, 111-035-008), 孵育 1 h, PBST 洗 8 遍, 加入 100 μ L 的单组分 TMB 显色液 (湖州英创, TMB-S-001) 显色, 0.1 M 硫酸终止, OD450 酶标仪读板, 使用酶标检测仪分析软件 SoftMax Pro, 计算不同时间点血样浓度, 使用 ELISA 绘制出血液中药物浓度变化曲线, 见图 8, ADC 浓度与总抗体浓度基本重合, 脱落极低, 在血液中很稳定。

实施例 10

ADC4 在 Capan-1 体内药效

本试验评价 ADC4 在人源胰腺癌 Capan-1 细胞株皮下异种移植雌性 BALB/c 裸鼠动物模型中的药效学研究。每组 10 只小鼠，试验设计方案如下，试验药物为 ADC4，对照药物为 ADC6 和 ADC7。

表 10 人源胰腺癌 Capan-1 皮下异种移植模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	10	溶媒对照	--	i.v.	QW×2 周
2	10	ADC6	5	i.v.	单次给药
3	10	ADC7	5	i.v.	QW×2 周
4	10	ADC4	5	i.v.	单次给药

注：1. 分组当天定义为第 0 天，给药从第 0 天开始。

所有药物均用 PBS 稀释配置至给定浓度后给药，试验动物为 7-9 周 BALB/c nude 雌性小鼠（北京安凯毅博生物技术有限公司）。

Capan-1 细胞培养在含 20%胎牛血清的 IMDM 培养液中。收集指数生长期的 Capan-1 细胞，PBS 重悬至适合浓度用于裸鼠皮下肿瘤接种。实验小鼠于右前肩胛处皮下接种 5×10^6 Capan-1 细胞，细胞重悬在与基质胶 1:1 混合的 PBS 中（0.1mL/只），定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积 159.77 mm^3 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药。分组当天设定为第 0 天，给药开始于第 0 天。

肿瘤接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低（体重每周测量 2 次）情况，眼睛、被毛及其它异常情况。实验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积（ mm^3 ）= $1/2 \times (a \times b^2)$ （其中 a 表示长径，b 表示短径）。实验中使用 StudyDirector™（版本号 3.1.399.19，Studylog System, Inc., S. San Francisco, CA, USA）软件收集数据。

表 11. Capan-1 异种移植模型中各组药效分析表

实验组	平均肿瘤体积 (第 0 天) ^a	平均肿瘤体积 (第 25 天) ^a	TGI (%) ^b	P 值 (相较于对照组) ^c
溶媒, 0 mg/kg,	159.77±4.49	525.58±46.30	-	-
ADC6, 5 mg/kg	159.78±4.69	153.57±21.09	101.70	2.09e-06***
ADC7, 5 mg/kg,	159.75±4.31	601.83±118.59	-20.85	1.00e+00 ^{ns}
ADC4, 5 mg/kg	159.77±4.34	107.08±18.05	114.40	4.09e-09***

注：a. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

b. $\text{TGI}\% = [1 - (\text{Ti} - \text{T0}) / (\text{Ci} - \text{C0})] \times 100$ 其中 T0 及 C0 分别是给药组及溶媒对照组分组当天(第 0 天)的平均肿瘤体积，Ti 及 Ci 分别是给药组及溶媒对照组第 25 天时的平均肿瘤体积；

c. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 及 *** $P < 0.001$ 与溶媒对照组肿瘤体积相比。

如图 9 所示, 在 5mg/kg 给药量时, ADC4 的药效显著强于对照药物 ADC7,并强于 ADC6, ADC7 在 5mg/kg 浓度时, 对该模型基本无抑制肿瘤生长的作用, ADC4 单次给药后在第 25 天对肿瘤的 TGI 高达 114%。

实施例 11

药物 ADC1, ADC2, ADC3 在人卵巢癌 SK-OV-3 细胞株皮下异种移植雌性 BALB/c 裸小鼠动物模型中的药效学研究

测试药物: ADC1 (5mg/kg)
ADC2 (5mg/kg)
ADC3 (5mg/kg)

配置方法: 均用 PBS 稀释

试验动物: BALB/c nude, 每组 6 只 (江苏集萃药康生物技术有限公司)。

试验方法: SK-OV-3 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5a 培养液中。收集指数生长期的 SK-OV-3 细胞, PBS 重悬至适合浓度用于小鼠皮下肿瘤接种。实验小鼠于右侧背部皮下前肩胛骨处接种 1×10^7 SK-OV-3 细胞, 细胞重悬在 1: 1 的 PBS 与基质胶中 (0.1 mL/只) 定期观察肿瘤生长情况, 待肿瘤生长至平均体积 129.98 mm³ 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药。分组当天设定为第 0 天, 给药开始于第 0 天。采用静脉注射给药, 单次给药, 每周测量 2 次瘤体积和体重, 记录数据。

试验结果: 肿瘤体积变化见表 12 和图 10, 试验结果显示, ADC1 和 ADC2 单次给药药效显著强于对照药物 ADC3。实验期间各组小鼠无明显异常或体重降低。

表 12

实验组	平均肿瘤体积 (第 0 天) ^a	平均肿瘤体积 (第 13 天) ^a	TGI (%) ^b	P 值 (相较于对照组) ^c
溶媒, 0 mg/kg	130.12±10.29	2224.22±358.85	-	-
ADC3, 5 mg/kg	129.89±8.09	903.31±227.77	63.07	3.14e-01 ^{ns}
ADC2, 5 mg/kg	129.99±9.92	160.77±93.32	98.53	2.05e-05***
ADC1, 5 mg/kg	129.89±7.59	8.53±5.96	105.80	7.92e-09***

注: a. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示;

b. $TGI\% = [1 - (Ti - T0) / (Ci - C0)] \times 100$ 其中 T0 及 C0 分别是给药组及溶媒对照组分组当天(第 0 天)的平均肿瘤体积, Ti 及 Ci 分别是给药组及溶媒对照组第 28 天时的平均肿瘤体积;

c. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 及 *** $P < 0.001$ 与溶媒对照组肿瘤体积相比。

实施例 12

ADC4 和 ADC6 在人三阴性乳腺癌 MX-1 细胞株皮下异种移植雌性 BALB/c 裸小鼠动物模型中的药效学

测试药物: ADC4 (2.5mg/kg 和 5mg/kg)
ADC6 (2.5mg/kg 和 5mg/kg)

配置方法: 均用 PBS 稀释

试验动物: BALB/c nude, 每组 6 只 (北京安凯毅博生物技术有限公司)。

试验方法: MX-1 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPM1640 培养液中。收集指数生长期的 MX-1 细胞, PBS 重悬至适合浓度用于裸鼠皮下肿瘤接种。实验小鼠于右侧背部皮下接种 5×10^6 MX-1 细胞, 细胞重悬在 PBS 中 (0.1 mL/只), 定期观察肿瘤生长情况, 待肿

瘤生长至平均体积 149.03 mm^3 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药。分组当天设定为第 0 天, 给药开始于第 0 天。

肿瘤接种后, 常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响。

试验结果: 肿瘤体积变化见表 13 和图 11, 试验结果显示, ADC4 和 ADC6 单次给药药效接近, 5 mg/kg 的给药浓度 TGI 分别为 109.48% 和 108.84%。实验期间各组小鼠无明显异常或体重降低。

表 13

实验组	平均肿瘤体积 (第 0 天) ^a	平均肿瘤体积 (第 21 天) ^a	TGI (%) ^b	P 值 (相较于对照组) ^c
溶媒, 0 mg/kg	149.15 ± 10.37	1646.06 ± 422.20	-	-
ADC4, 2.5 mg/kg	148.93 ± 10.42	351.33 ± 74.53	86.48	$3.66\text{e-}03^{**}$
ADC4, 5 mg/kg	149.09 ± 10.58	7.14 ± 1.82	109.48	$9.65\text{e-}11^{***}$
ADC6, 2.5 mg/kg	149.08 ± 10.20	279.24 ± 84.24	91.30	$7.72\text{e-}05^{***}$
ADC6, 5 mg/kg	149.01 ± 10.31	16.69 ± 12.80	108.84	$5.53\text{e-}11^{***}$

注: a. 数据以“平均值 $\pm$ 标准误差”表示;

b. $\text{TGI}\% = [1 - (\text{Ti} - \text{T}_0) / (\text{Ci} - \text{C}_0)] \times 100$ 其中 T_0 及 C_0 分别是给药组及溶媒对照组分组当天(第 0 天)的平均肿瘤体积, Ti 及 Ci 分别是给药组及溶媒对照组第 21 天时的平均肿瘤体积;

c. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 及 $^{***}P < 0.001$ 与溶媒对照组肿瘤体积相比。

实施例 13

ADC9、ADC11、ADC12 和 ADC13 在 HuPrime[®]胃癌 GA0006 异种移植雌性 BALB/c 裸小鼠动物模型中的抗肿瘤作用

将直径为 2-3 mm 的瘤块接种于 BALB/c 裸小鼠右前肩胛处皮下。当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约 139.15 mm^3 时, 将小鼠随机分组。分组当天设定为第 0 天, 给药开始于第 0 天, 单次给药。监测小鼠的体重和肿瘤的生长情况。GA0006 异种移植模型各治疗组和对照组肿瘤生长情况见图 12。

肿瘤体积计算公式: 肿瘤体积 (mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径, b 表示短径)。 $\text{TGI}_{\text{TV}}\% = [1 - (\text{Ti} - \text{T}_0) / (\text{Ci} - \text{C}_0)] \times 100$ 其中 T_0 及 C_0 分别是给药组及溶媒对照组分组当天(第 0 天)的平均肿瘤体积, Ti 及 Ci 分别是给药组及溶媒对照组第 14 天时的平均肿瘤体积。^{ns} $P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 及 $^{***}P < 0.001$ 与溶媒对照组肿瘤体积相比。

该模型的对照组(第 1 组)在给药 14 天后平均瘤体积达到 628.62 mm^3 。

10 mg/kg 和 5 mg/kg ADC11 (即第 2 组和第 3 组) 给药 14 天后, 平均肿瘤体积分别为 78.17 mm^3 和 91.47 mm^3 , 相对肿瘤抑制率分别 TGI 为 112.45% ($P = 3.43\text{e-}09^{***}$) 和 109.75% ($P = 6.53\text{e-}08^{***}$)。

10 mg/kg 和 5 mg/kg ADC13 (即第 4 组和第 5 组) 给药 14 天后, 平均肿瘤体积分别为 25.77 mm^3 和 78.07 mm^3 , 相对肿瘤抑制率分别 TGI 为 123.17% ($P = 7.58\text{e-}12^{***}$) 和 112.48% ($P = 1.23\text{e-}08^{***}$)。

10 mg/kg 和 5 mg/kg ADC12 (即第 6 组和第 7 组) 给药 14 天后, 平均肿瘤体积分别为 185.69 mm^3 和 284.02 mm^3 , 相对肿瘤抑制率分别 TGI 为 90.50% ($P = 5.92\text{e-}04^{***}$) 和 70.40% ($P = 3.51\text{e-}01^{\text{ns}}$)。

5 mg/kg ADC9 (即第 8 组) 给药 14 天后, 平均肿瘤体积为 296.86 mm^3 , 相对肿瘤抑制率 TGI 为 67.79% ($P=3.51\text{e-}0^{\text{ns}}$)。

与瘤体数据趋势一致, 以肿瘤重量变化为指标, 各治疗组同样展示了不同程度的抗肿瘤药效, 见图 13。

实施例 14

ADC14 的体内肿瘤抑制活性

ADC14 在人源肝癌 Hep 3B 细胞株皮下异种移植 BALB/c 裸鼠模型中的药效学评价。每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见表 14。

表 14 人源肝癌 Hep 3B 细胞株皮下异种移植 BALB/c 裸鼠模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	10	溶媒 (生理盐水) 对照	--	<i>i.v.</i>	单次给药
2	10	Exatecan	0.136	<i>i.v.</i>	单次给药
3	10	ADC15	5	<i>i.v.</i>	单次给药
4	10	ADC14	2.5	<i>i.v.</i>	单次给药
5	10	ADC14	5	<i>i.v.</i>	单次给药

注: 分组当天定义为第 0 天; 分组当天给药; *i.v.*: 静脉注射

Hep 3B 细胞培养在含 10% FBS 和 1% NEAA (GIBCO, 货号 11140050) 的 MEM 培养基 (Hyclone, 货号 SH30024.01) 中。收集指数生长期的 Hep 3B 细胞, 细胞重悬在与基质胶 1:1 混合的 PBS 中。选用 6-8 周雄性 BALB/c nude 小鼠, 每组 10 只。实验小鼠于右前肩胛处皮下接种 5×10^6 个 Hep 3B 细胞 (0.1 mL/只), 定期观察肿瘤生长情况, 待肿瘤生长至平均体积 150 mm^3 ($100\text{-}200 \text{ mm}^3$) 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药。分组当天设定为 Day 0, 给药开始于 Day 0。

肿瘤细胞接种后, 常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响, 具体内容有实验动物的活动性, 摄食和饮水情况, 体重增加或降低情况, 眼睛、被毛及其它异常情况。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式: 肿瘤体积 (mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示肿瘤长径, b 表示肿瘤短径)。接种后 Day 25 计算相对肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下: $\text{TGI}\% = (1 - \text{给药组平均相对肿瘤体积} / \text{溶媒对照组平均相对肿瘤体积}) \times 100\%$ 。

表 15 Day 25 的肿瘤体积和肿瘤抑制率

组别	平均肿瘤体积 $\pm$ SEM (mm^3)	肿瘤体积 P-value	TGI (%)
1	2258 $\pm$ 208	--	--
2	2237 $\pm$ 225	0.679	0.94%
3	858 $\pm$ 112	0.011	62.02%
4	139 $\pm$ 58	0.002	93.86%

5	30±10	0.001	98.66%
---	-------	-------	--------

肿瘤抑制结果如表 15 和图 14 所示, ADC14 对 Hep 3B 肿瘤有着剂量依赖的非常强的生长抑制作用; 相同小分子量的情况下, ADC14 对肿瘤生长抑制作用显著强于 ADC15 (第 5 组对比第 3 组)。

实施例 15

1、试验药物在 HuPrime®卵巢癌 OV3756 皮下异种移植 BALB/c nude 雌性小鼠模型中的药效学评价。分组及给药方案见表 16。

表 16 分组及给药方案

组别	动物数	给药组	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药周期
1	8	溶媒对照 (生理盐水)	--	i.v.	单次给药
2	8	ADC17	5	i.v.	单次给药
3	8	ADC16	2.5	i.v.	单次给药

从 HuPrime®卵巢癌异种移植模型 OV3756 荷瘤小鼠收取肿瘤组织, 切成直径为 2-3 mm 的瘤块接种于 6-7 周龄雌性 BALB/c nude 小鼠右前肩胛处皮下。

当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约 137.55 mm³ 时, 将小鼠随机分组给药。分组当天设定为第 0 天, 给药开始于第 0 天。

肿瘤接种后, 常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响, 具体内容有实验动物的活动性, 摄食和饮水情况, 体重增加或降低 (体重每周测量 2 次) 情况, 眼睛、被毛及其它异常情况。肿瘤体积计算公式: 肿瘤体积 (mm³) = 1/2 × (a × b²) (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

表 17 OV3756 异种移植模型中各组药效分析表

组别	平均肿瘤体积 (Day 0) ^a	平均肿瘤体积 (Day 28) ^a	TGI (%) ^b	P Value (相较于对照组) ^c
1	137.46±9.66	1198.78±115.80	-	-
2	137.46±9.84	439.00±149.55	71.59	1.15e-04***
3	137.62±11.18	277.59±68.82	86.81	3.59e-06***

注: a. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示;

b. $TGI\% = [1 - (T_i - T_0) / (C_i - C_0)] \times 100$ 其中 T₁ 及 C₁ 分别是给药组及溶媒对照组分组当天 (Day 0) 平均肿瘤体积, T_i 及 C_i 分别是给药组及溶媒对照组 Day 25 时的平均肿瘤体积;

c. *P<0.05, **P<0.01 及 ***P<0.001 与溶媒对照组肿瘤体积相比。

OV3756 异种移植模型各治疗组和对照组肿瘤生长情况见表 17 和图 15。从表 17 和图 15 可以看出, ADC16 和 ADC17 可显著抑制 OV3756 异种移植模型肿瘤生长。

2、实验药物在 Balb/c 裸鼠 JEG-3 皮下模型体内抗肿瘤疗效研究, 目的是考察 ADC16 在 JeG-3 模型的体内药效。分组及给药方案见表 18。

表 18 分组及给药方案

组别	给药组	给药体积 ($\mu\text{L/g}$)	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药周期	动物数	治疗 时间
1	空白对照 (生理盐水)	10 $\mu\text{L/g}$	-	i.v.	单次给药	8	28 天
2	Exatecan Mesylate	10 $\mu\text{L/g}$	0.136	i.v.	单次给药	8	28 天
3	ADC16	10 $\mu\text{L/g}$	2.5	i.v.	单次给药	8	28 天
4	ADC16	10 $\mu\text{L/g}$	5	i.v.	单次给药	8	28 天

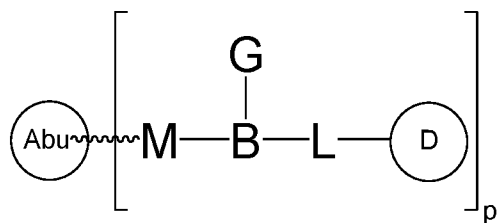
选用 6-8 周雌性 Balb/c nude 小鼠，将 1×10^6 个 JEG-3 细胞悬浮于含 50% 基质胶的 100 μL EMEM 培养基中，于小鼠右侧皮下接种。当平均肿瘤体积达到约 118 mm^3 时，根据动物体重和肿瘤体积随机分组给药，每组 8 只。

开始给药后，每周测量两次肿瘤体积。肿瘤体积计算公式为：肿瘤体积 (mm^3) = $0.5a \times b^2$ (其中 a 表示肿瘤长径，b 表示肿瘤短径)。

结果如图 16 所示，与对照组相比，用 ADC16 治疗具有显著肿瘤抑制作用，且呈剂量依赖性 ($p < 0.001$)。至给药后第 8 天，TGI 分别为 98.98% (2.5 mg/kg) 和 100.00% (5 mg/kg)。值得注意的是，ADC16 使肿瘤完全消退并维持到实验结束。

权 利 要 求 书

1. 一种药物偶联物，其具有如式 I 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物：

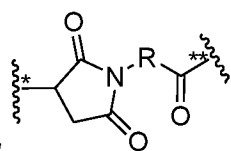


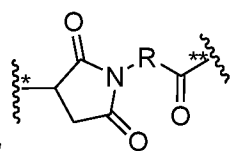
式 I

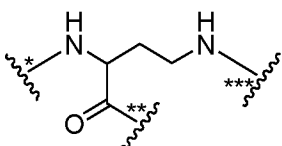
其中

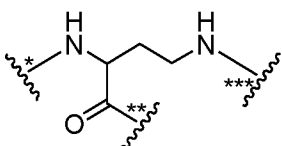
Abu 为多肽；

D 为药物；

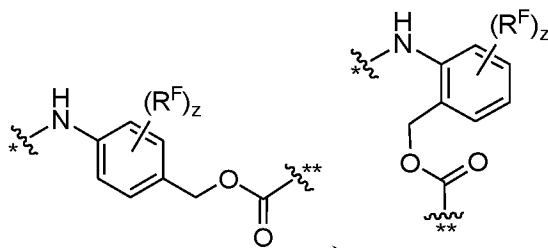


M 为 ，其中*连接 Abu，**连接 B，R 选自： $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基-、-亚芳基- $(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 碳环基})-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 杂环基})-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ ；其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基；并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

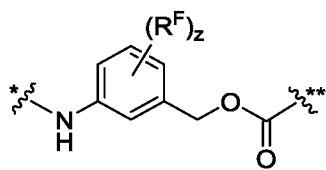


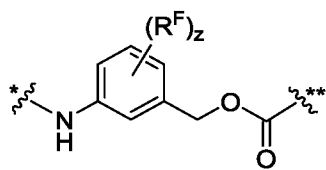
B 为 ，其中*连接 M，**连接 L，***连接 G；

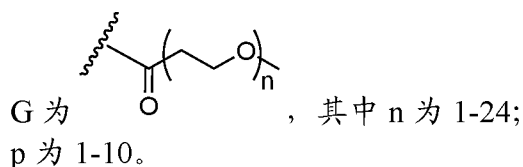
L 为 $-(AA)_i-(FF)_f-$ ，其中，AA 为氨基酸或多肽，i 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、



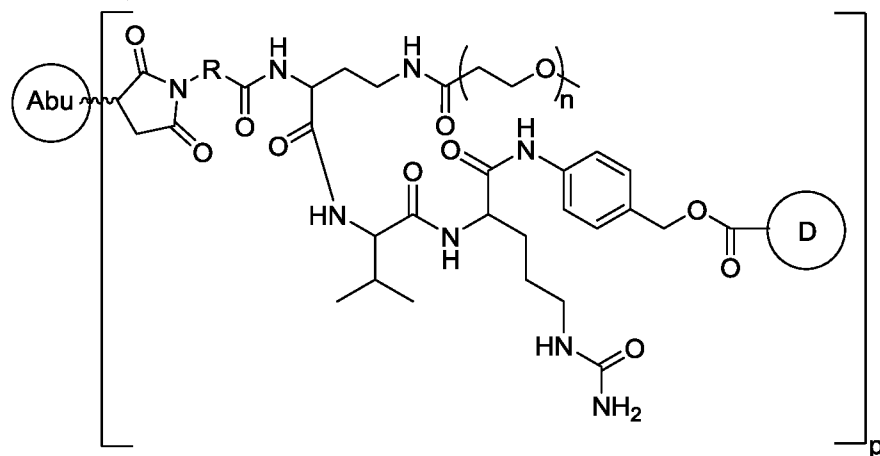
11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20；各 FF 独立为



或 ，其中各 R^F 独立为 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、 $-NO_2$ 或卤素，其中*连接 AA，**连接 D；z 为 0、1、2、3 或 4；f 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；



2. 一种药物偶联物, 其具有如式 I-1 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中所述式 I-1 为:



式 I-1

其中

Abu 为多肽;

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-$ 亚芳基 $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8$ 碳环基) $-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8$ 杂环基) $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

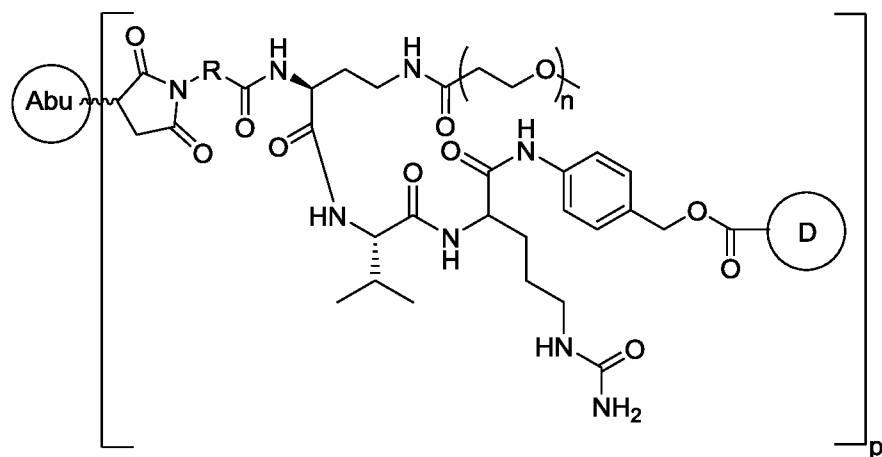
D 为药物;

n 为 1-24 的整数;

p 为 1-10。

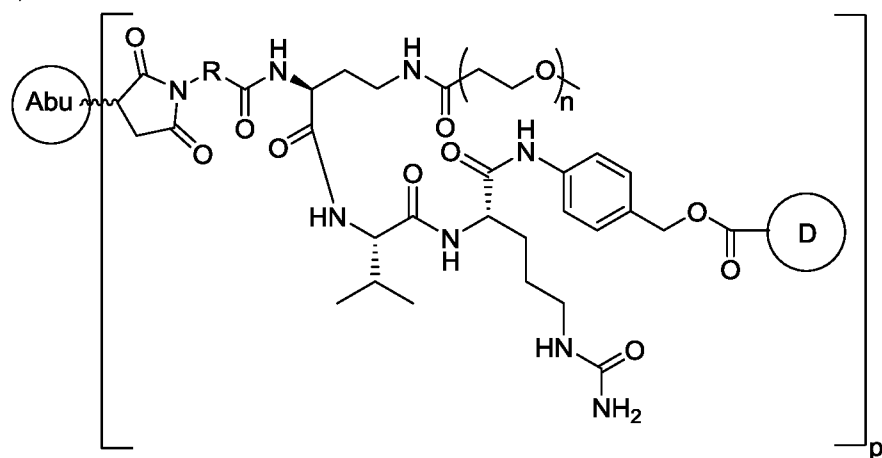
3. 一种药物偶联物, 其具有如式 I-2 或式 I-2-1 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中

所述式 I-2 为:



式 I-2

式 I-2-1 为:



式 I-2-1

其中

Abu 为多肽;

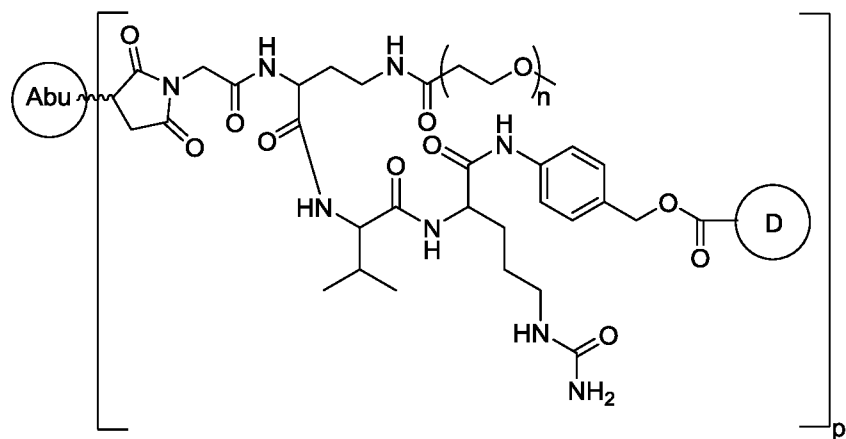
R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-\text{亚芳基}-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 碳环基})-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 杂环基})-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

D 为药物;

n 为 1-24 的整数;

p 为 1-10。

4. 一种药物偶联物, 其具有如式 I-3 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中所述式 I-3 为:



式 I-3

其中

Abu 为多肽;

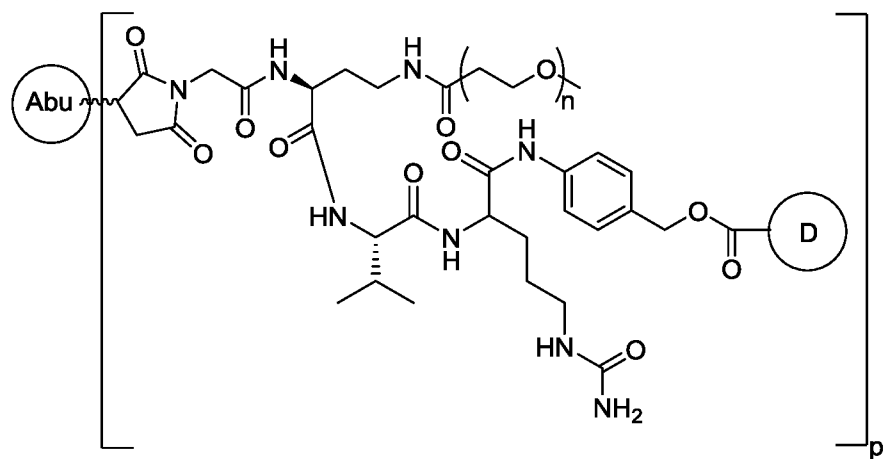
D 为药物;

n 为 1-24 的整数;

p 为 1-10。

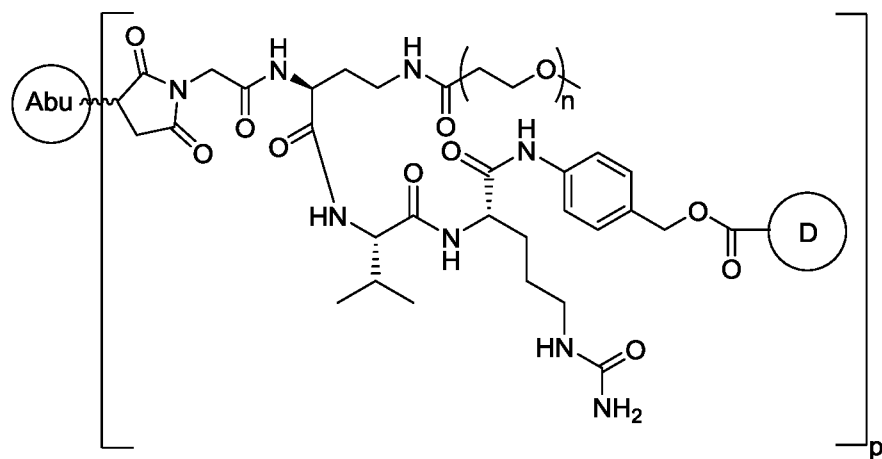
5. 一种药物偶联物, 其具有如式 I-4 或式 I-4-1 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中

所述式 I-4 为:



式 I-4

所述式 I-4-1 为:



式 I-4-1

其中

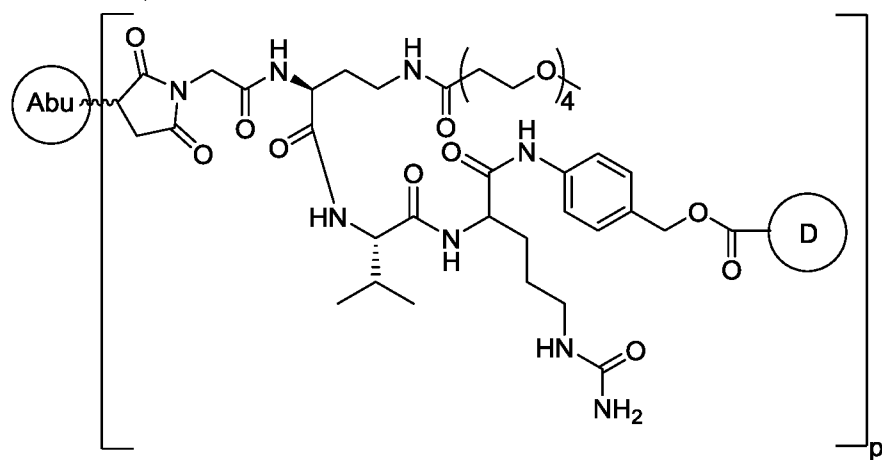
Abu 为多肽;

D 为药物;

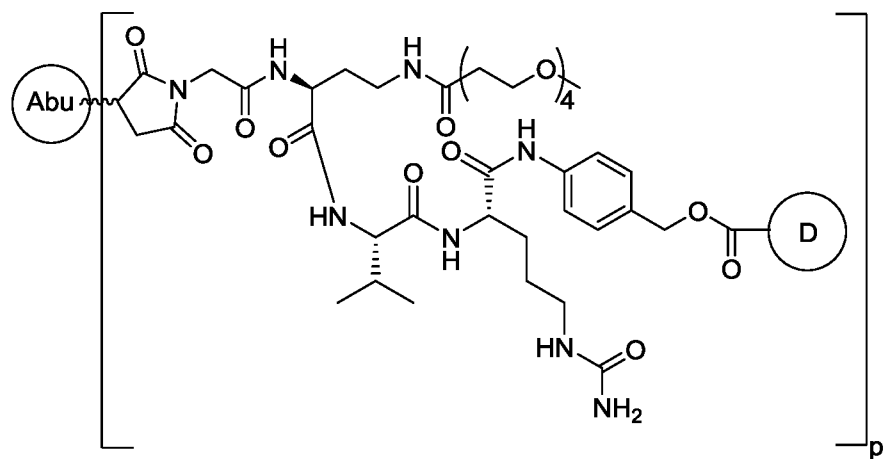
n 为 1-24 的整数;

p 为 1-10。

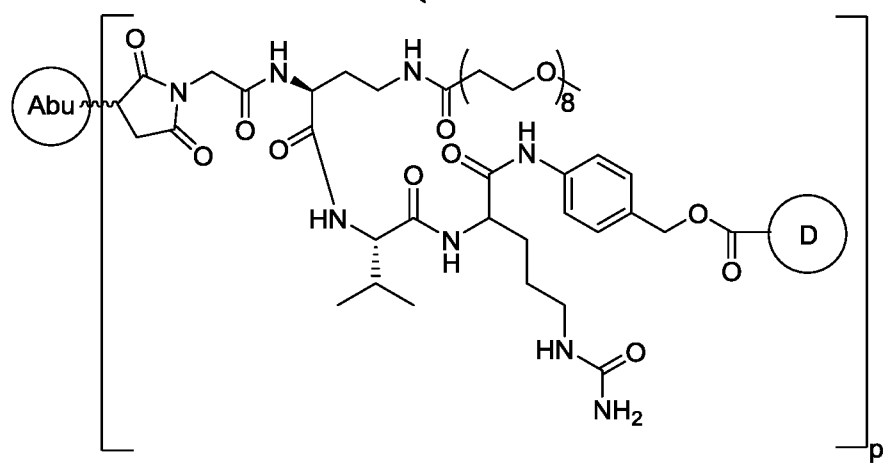
6. 一种药物偶联物, 其具有如式 I-5、I-5-1、I-6、I-6-1、I-7、I-7-1、I-8、I-8-1、I-9、I-9-1、I-10、I-10-1、I-11 或 I-11-1 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中所述式 I-5、I-5-1、I-6、I-6-1、I-7、I-7-1、I-8、I-8-1、I-9、I-9-1、I-10、I-10-1、I-11、I-11-1 为:



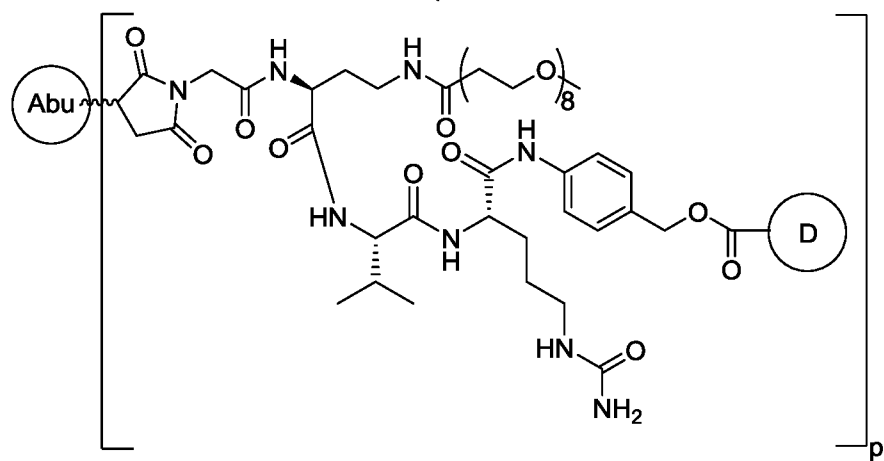
式 I-5



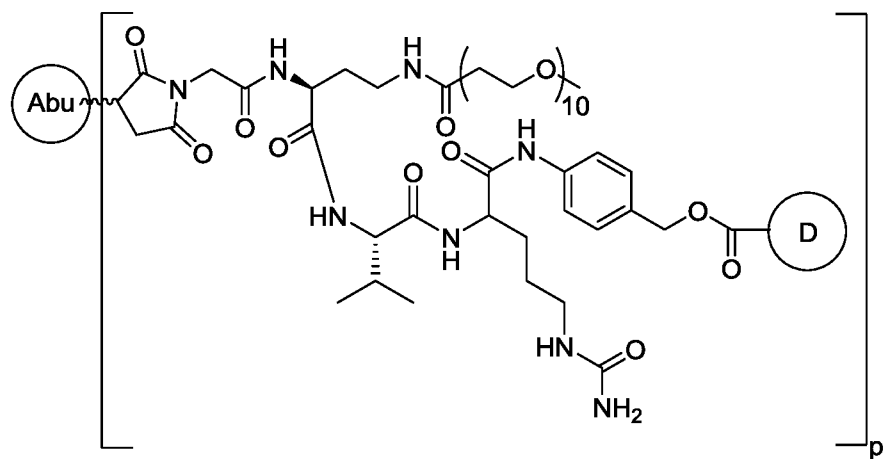
式 I-5-1



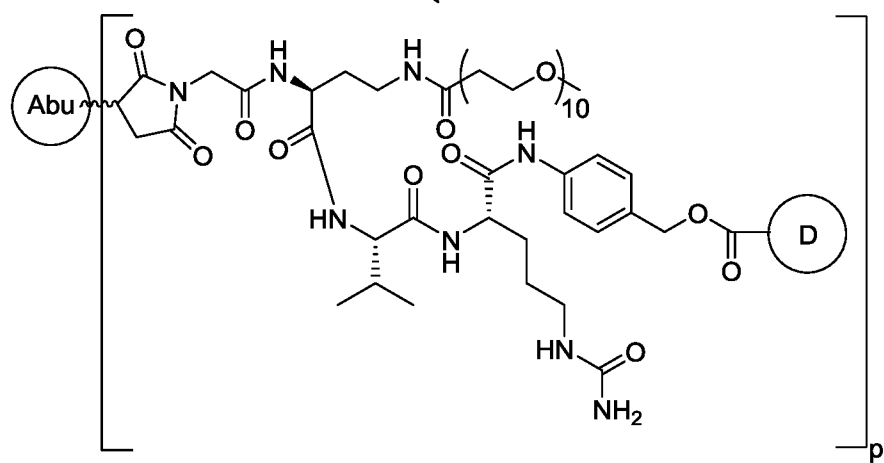
式 I-6



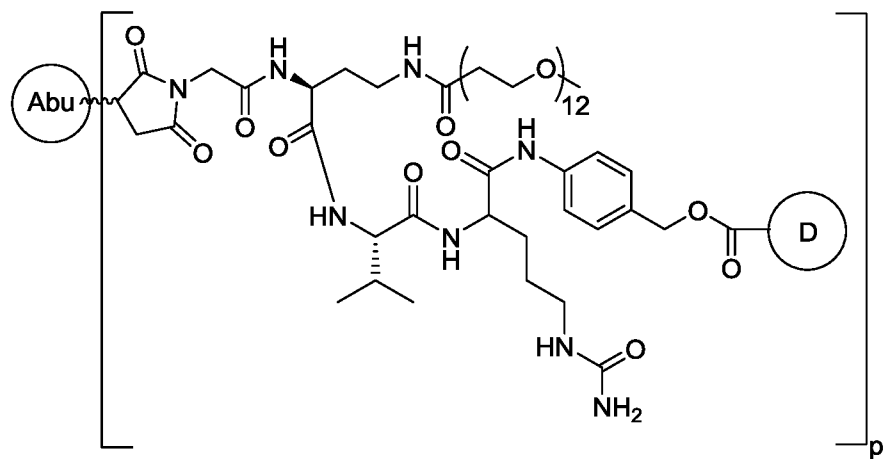
式 I-6-1



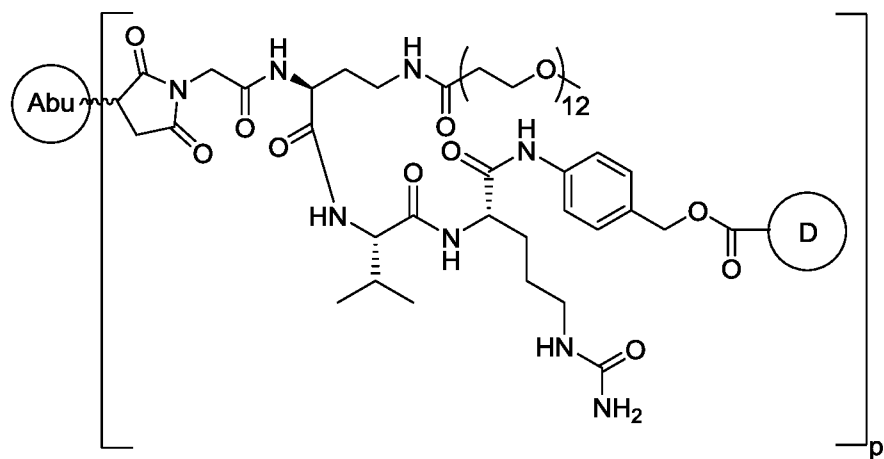
式 I-7



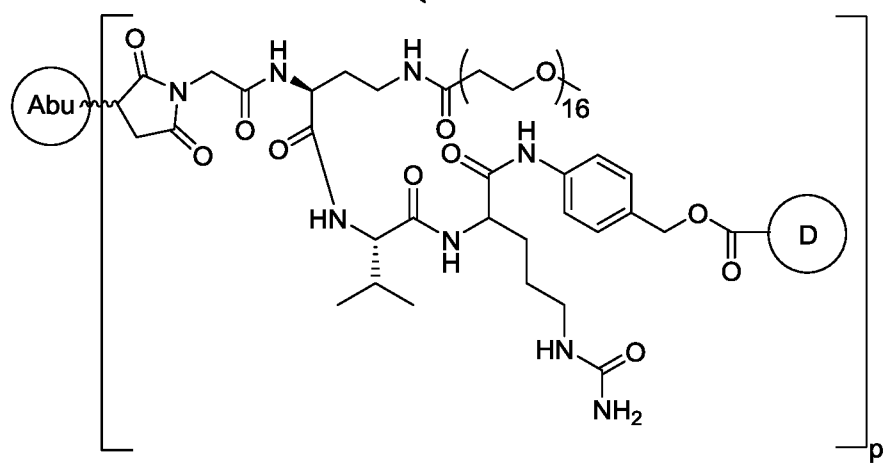
式 I-7-1



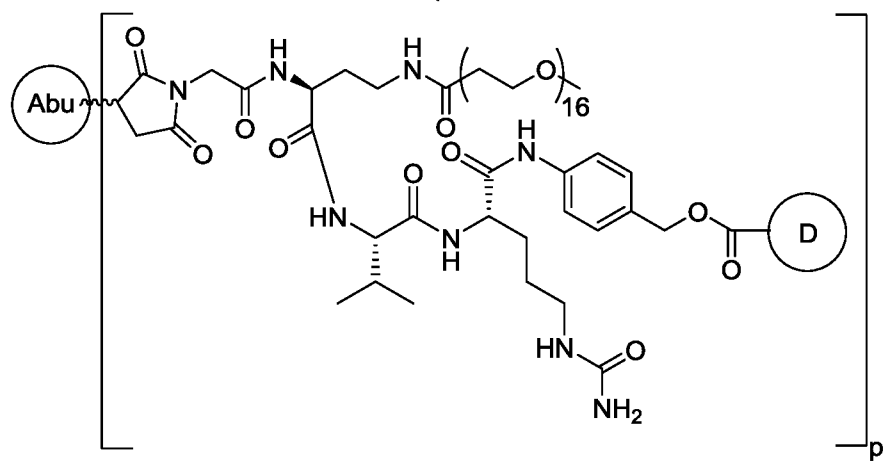
式 I-8



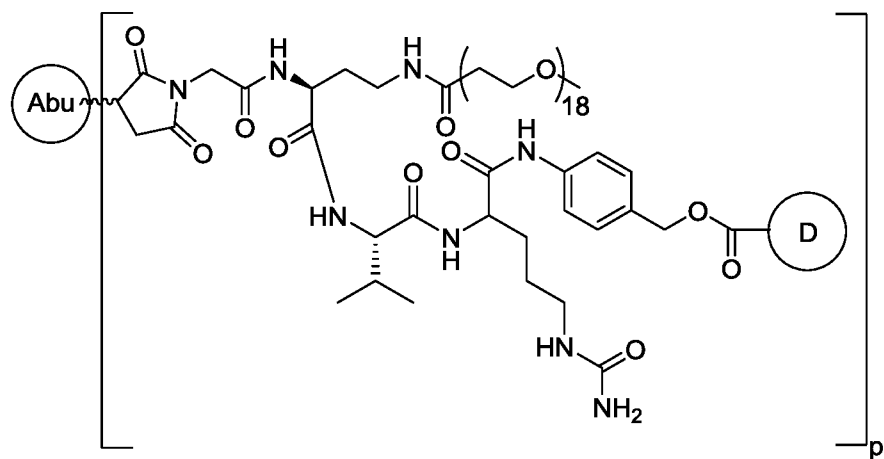
式 I-8-1



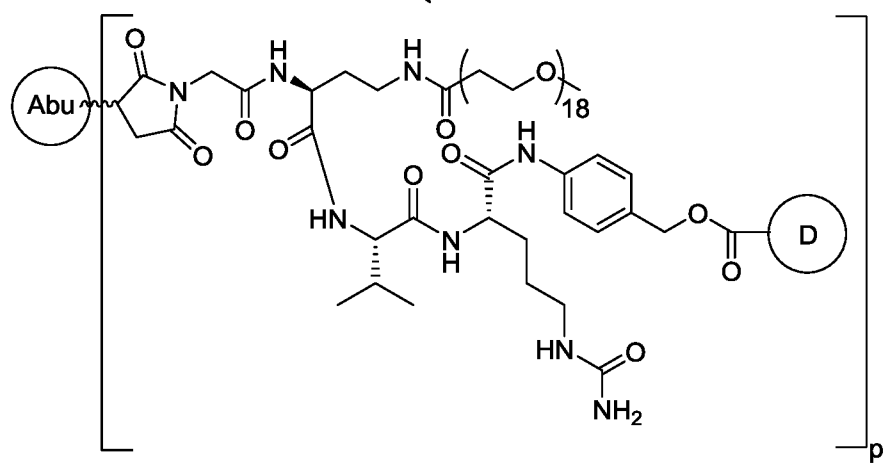
式 I-9



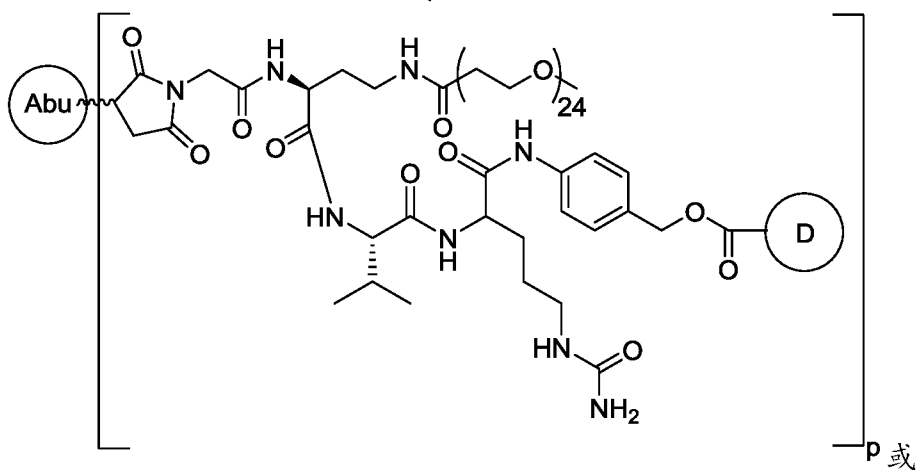
式 I-9-1



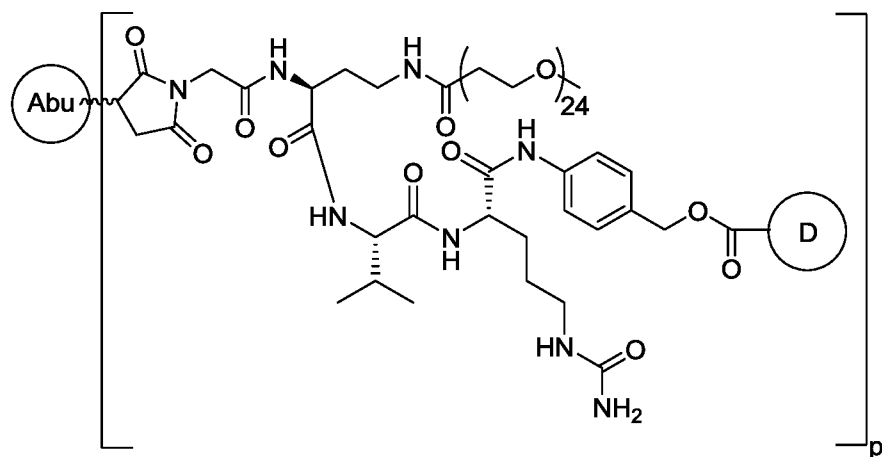
式 I-10



式 I-10-1



式 I-11



式 I-11-1

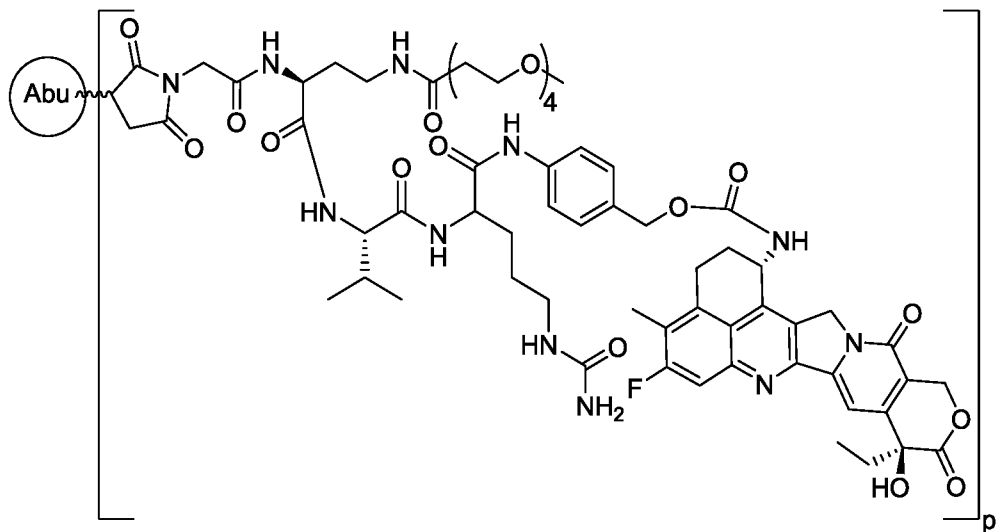
其中

Abu 为多肽;

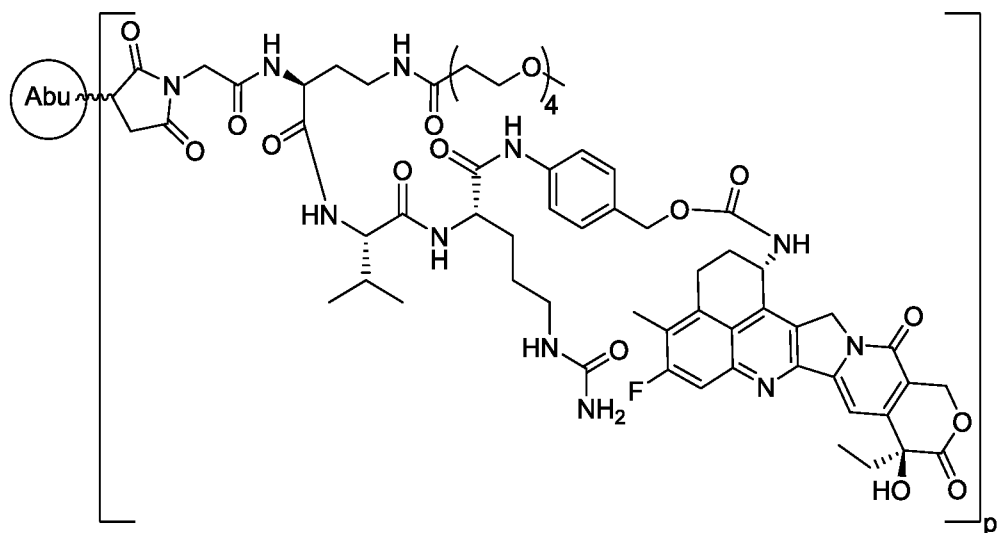
D 为药物;

p 为 1-10。

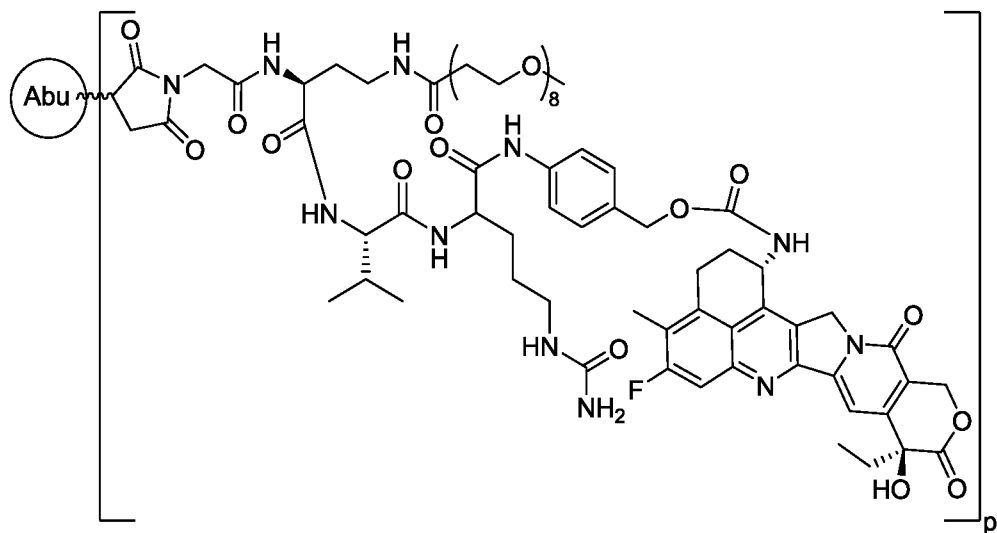
7. 一种药物偶联物, 其具有如式 I-12、I-12-1、I-13、I-13-1、I-14、I-14-1、I-15、I-15-1、I-16、I-16-1、I-17、I-17-1、I-18、I-18-1、I-19、I-19-1、I-20、I-20-1、I-21、I-21-1、I-22、I-22-1、I-23、I-23-1、I-24、I-24-1、I-25 或 I-25-1 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中所述式 I-12、I-12-1、I-13、I-13-1、I-14、I-14-1、I-15、I-15-1、I-16、I-16-1、I-17、I-17-1、I-18、I-18-1、I-19、I-19-1、I-20、I-20-1、I-21、I-21-1、I-22、I-22-1、I-23、I-23-1、I-24、I-24-1、I-25 或 I-25-1 为:



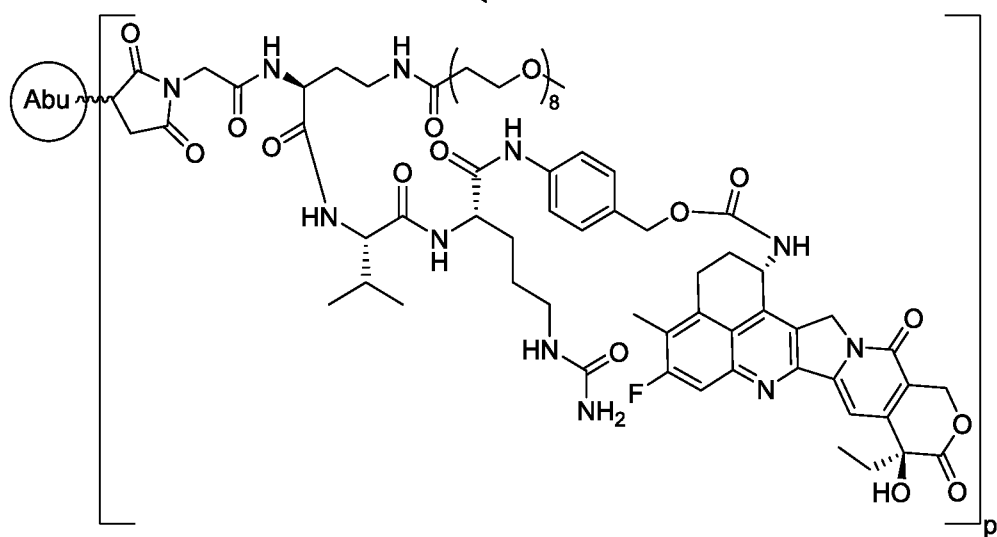
式 I-12



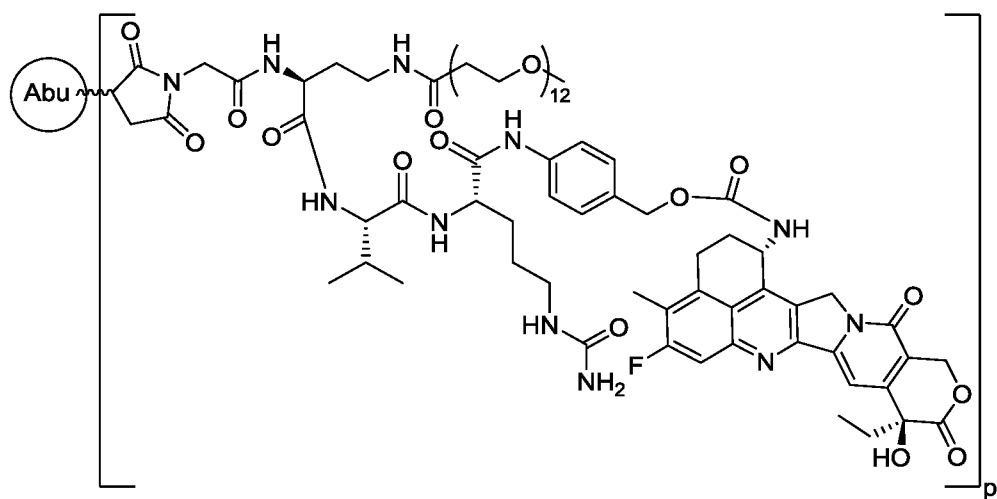
式 I-12-1



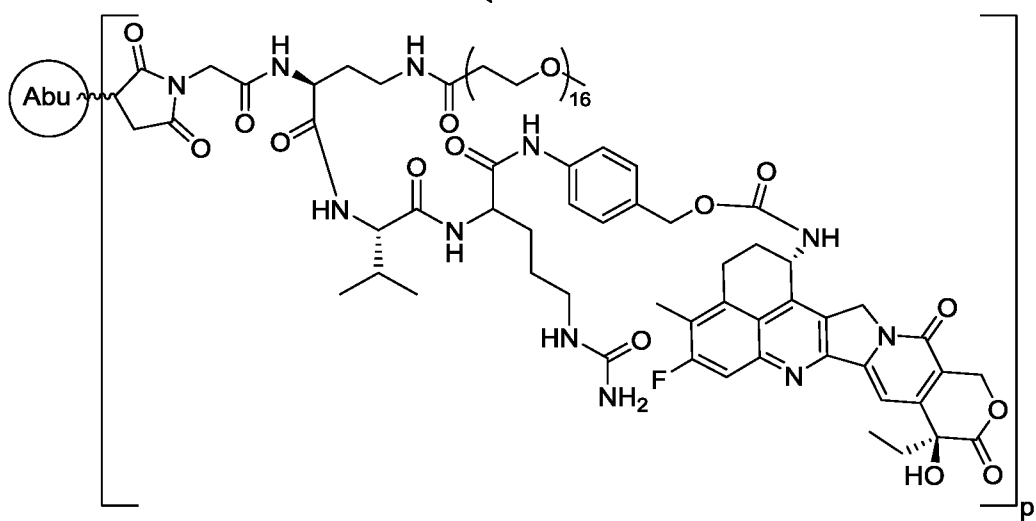
式 I-13



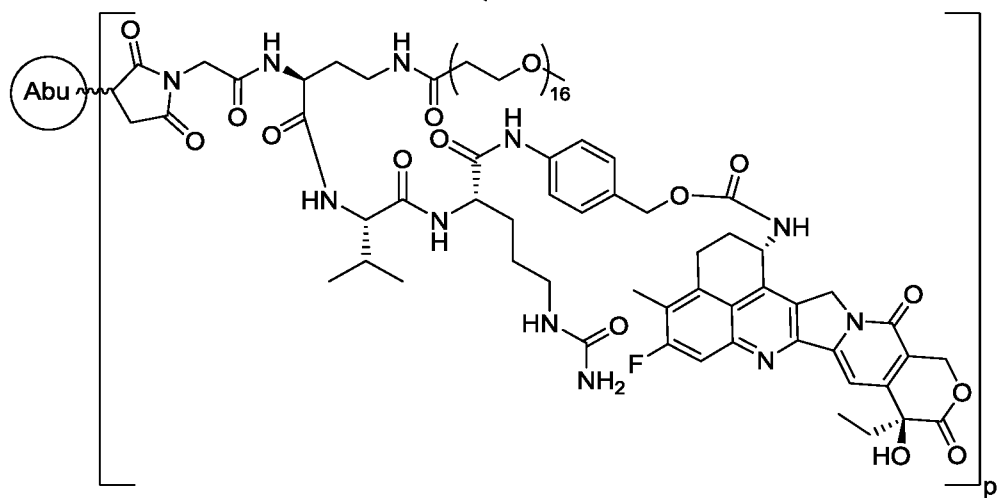
式 I-13-1



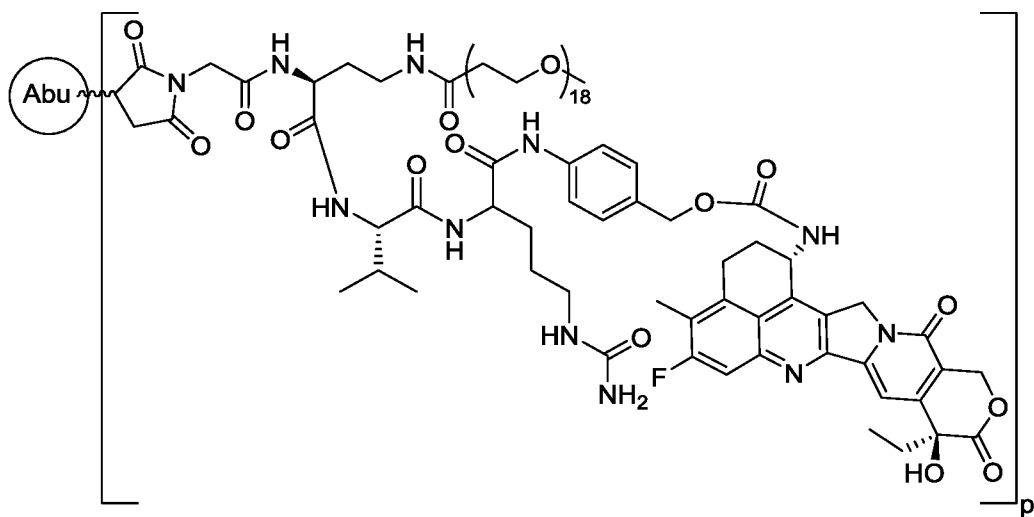
式 I-15-1



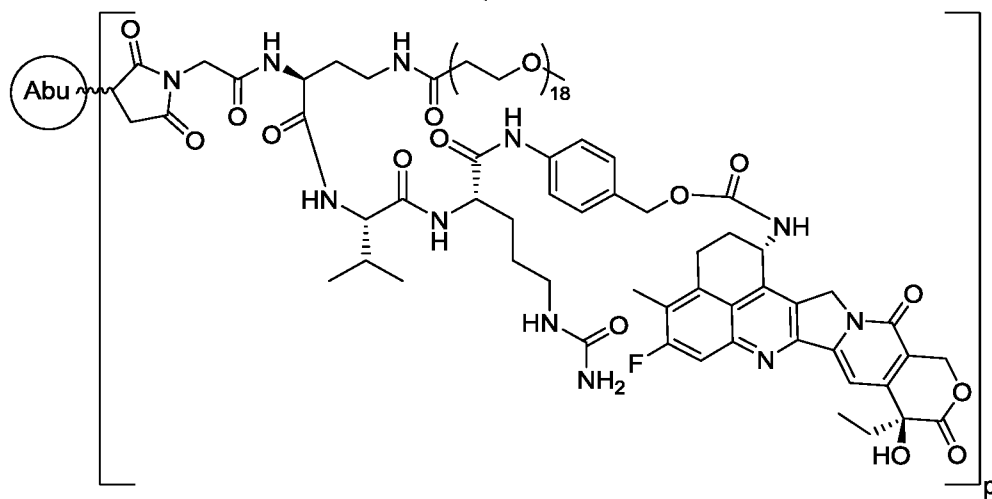
式 I-16



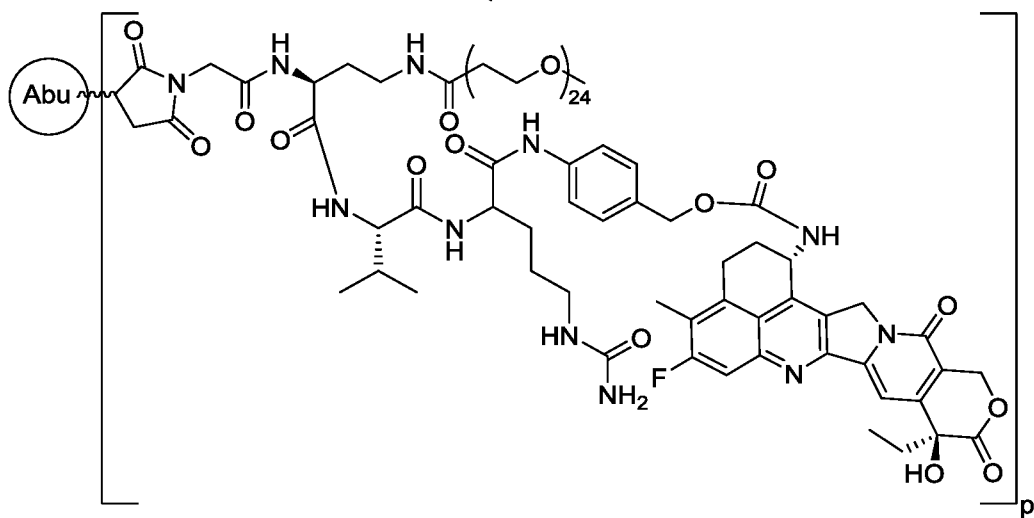
式 I-16-1



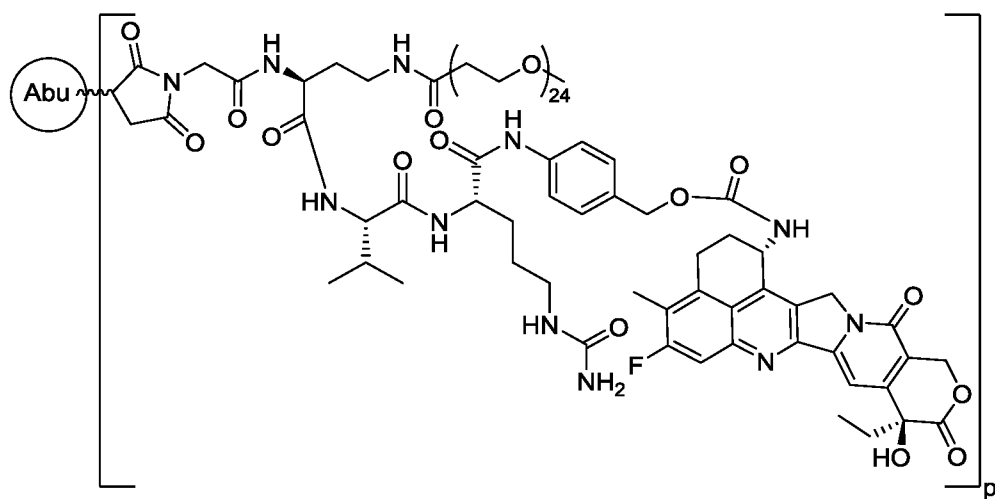
式 I-17



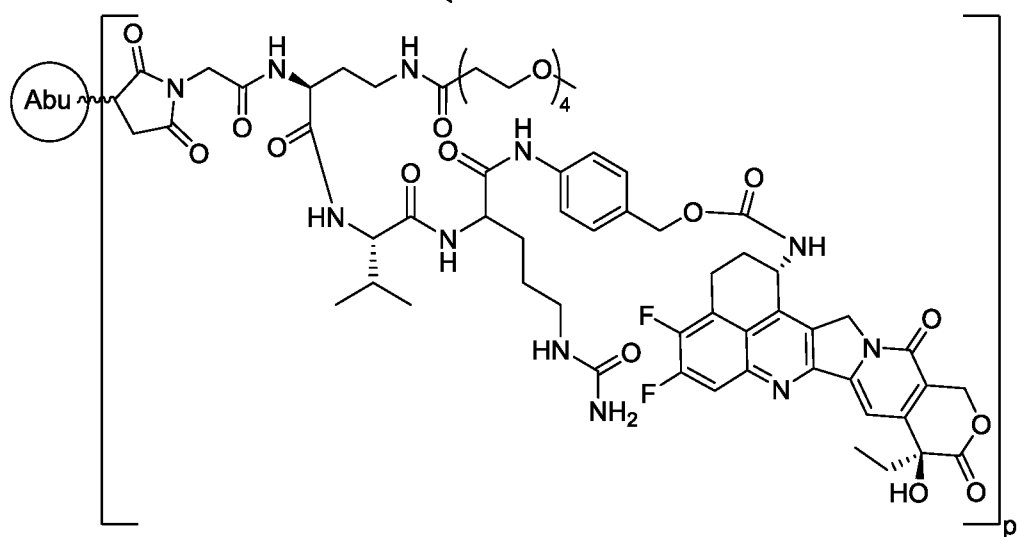
式 I-17-1



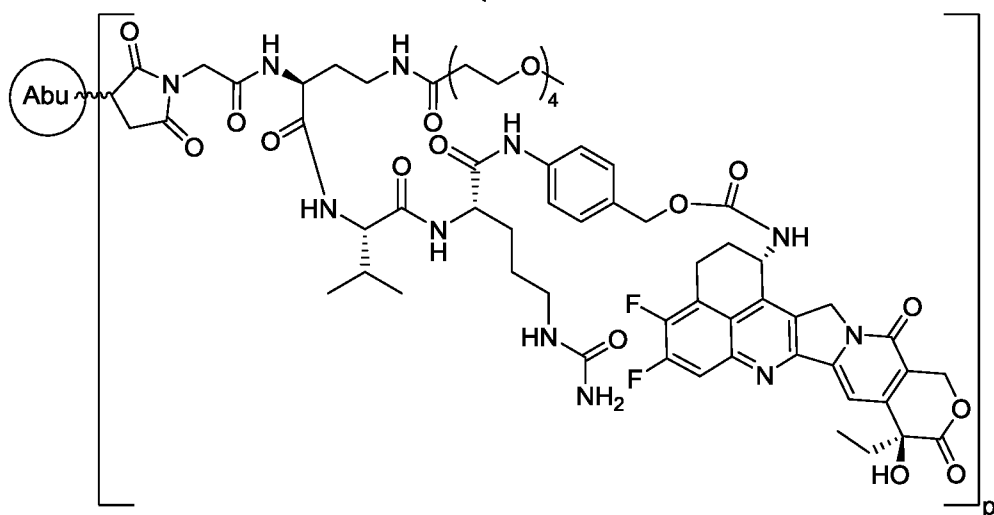
式 I-18



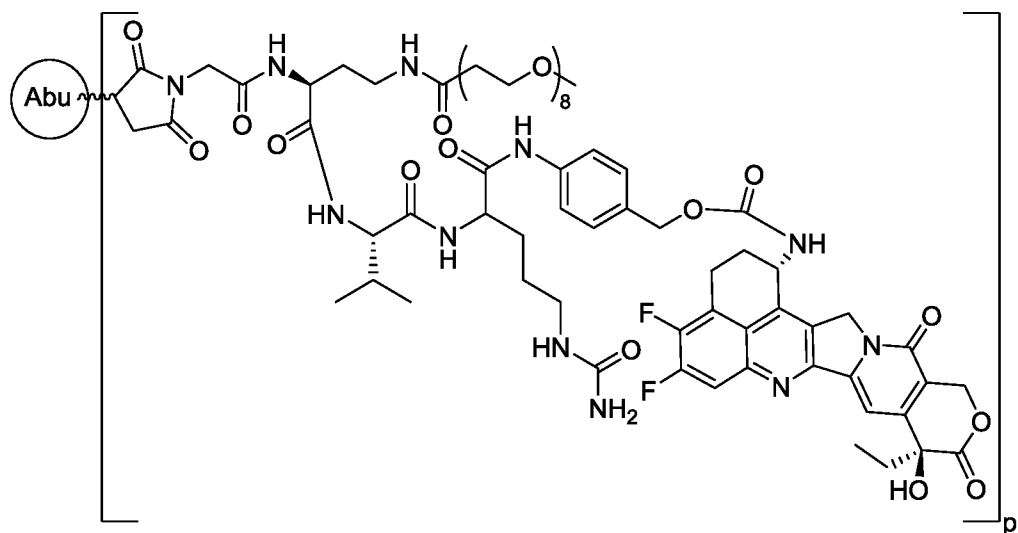
式 I-18-1



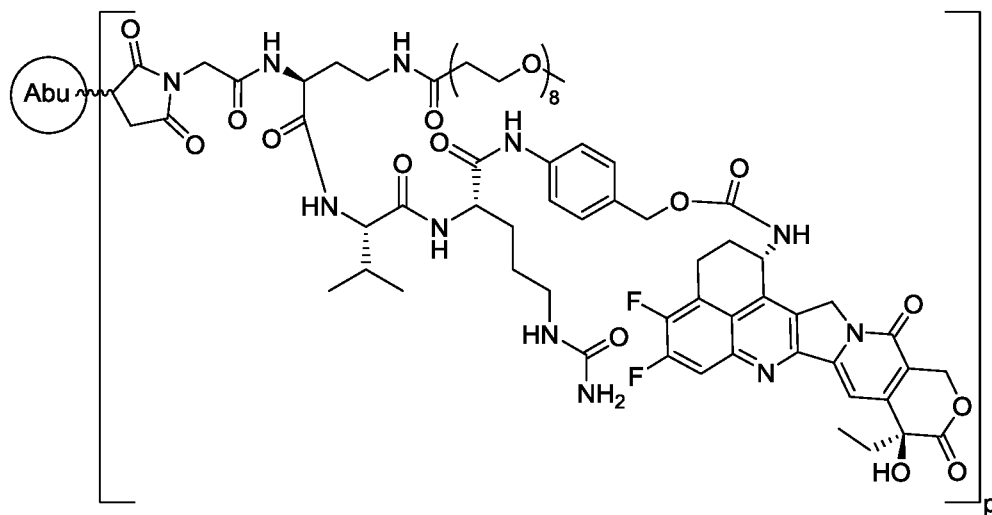
式 I-19



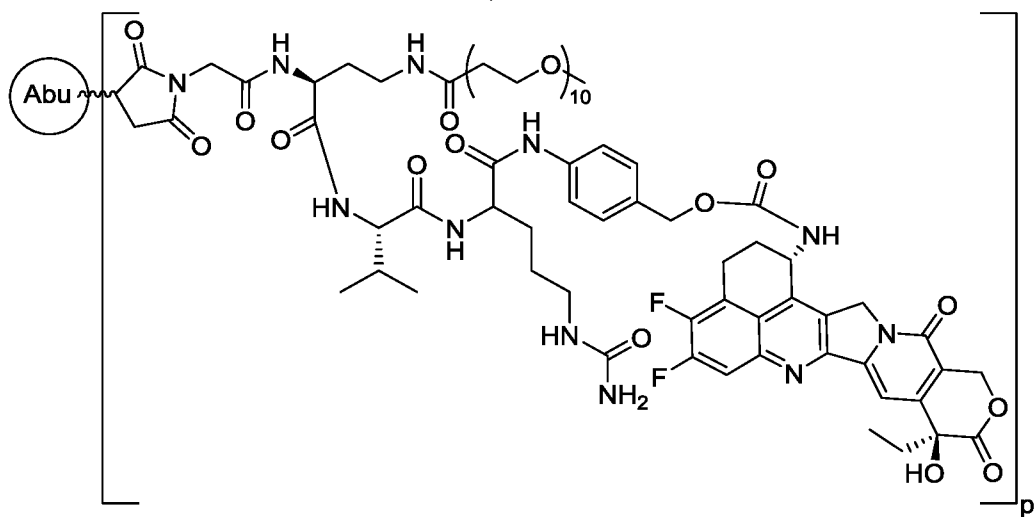
式 I-19-1



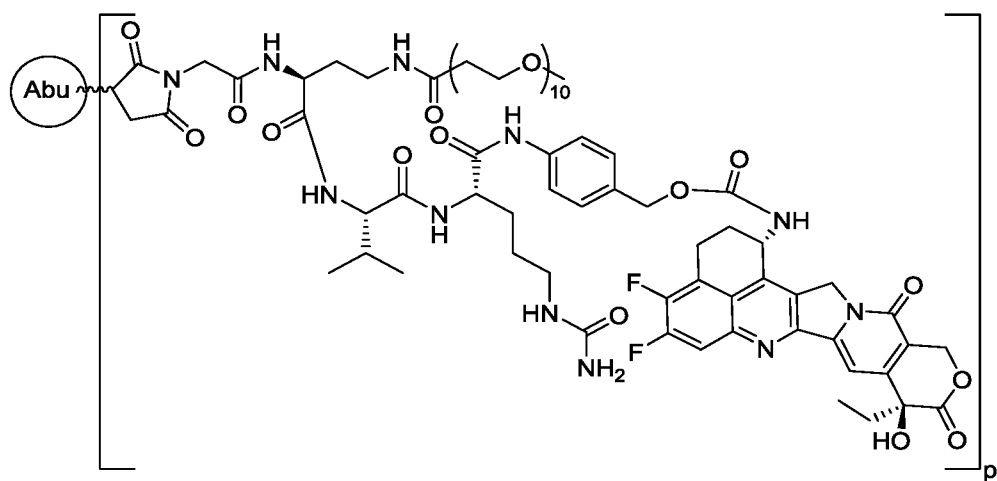
式 I-20



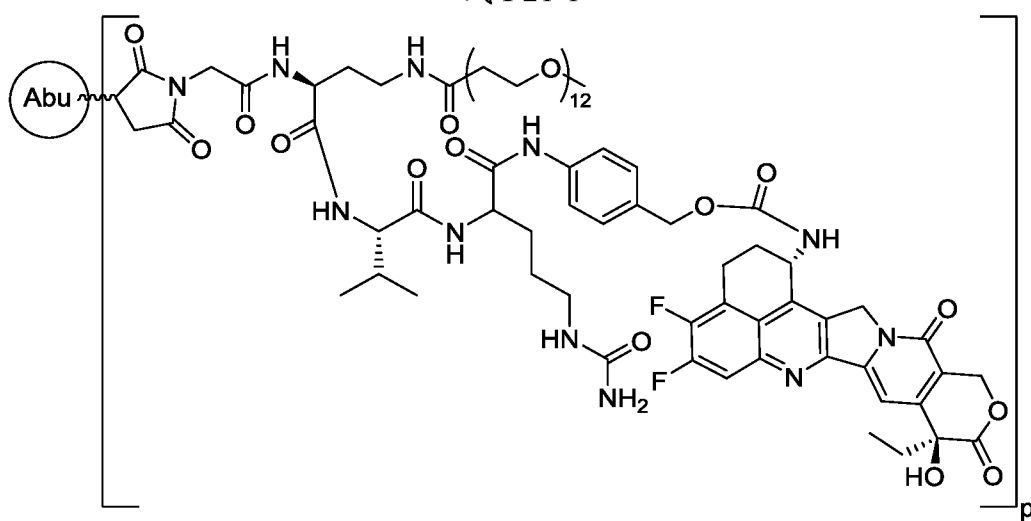
式 I-20-1



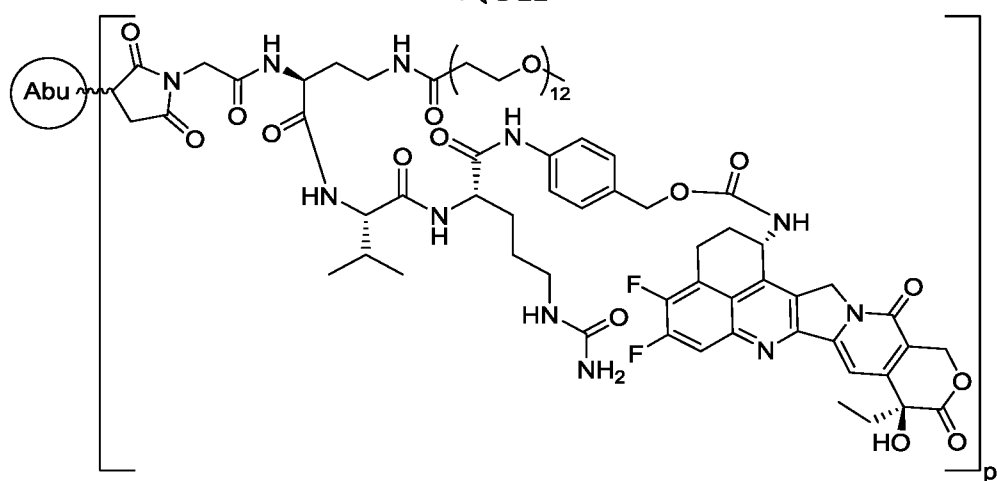
式 I-21



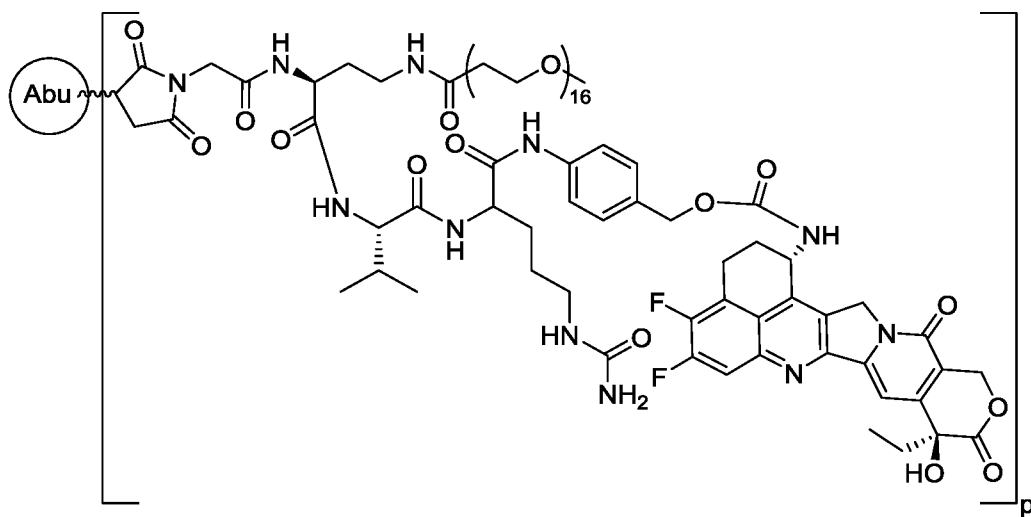
式 I-21-1



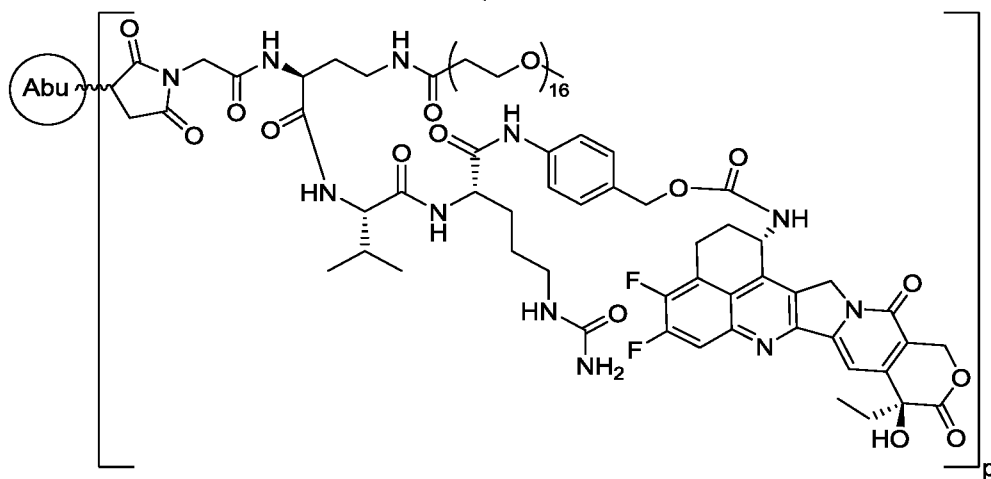
式 I-22



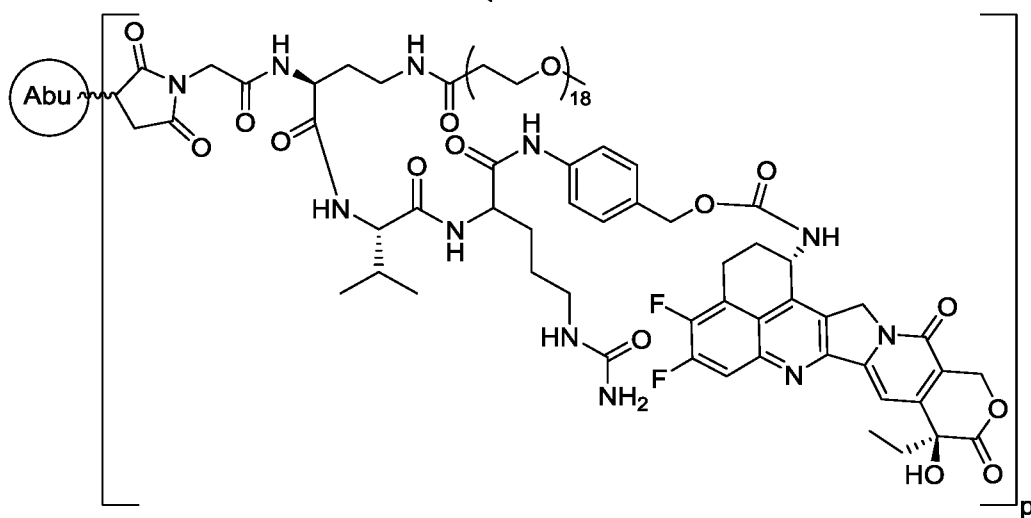
式 I-22-1



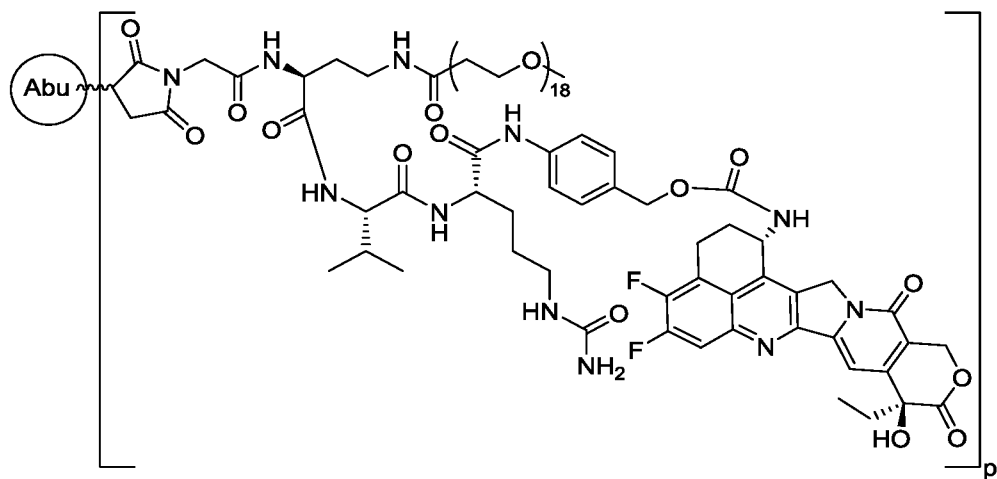
式 I-23



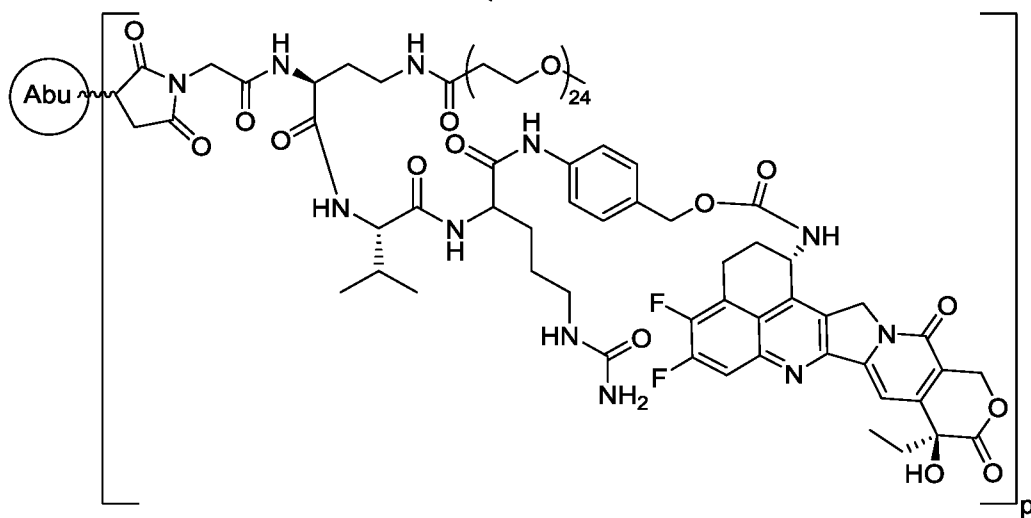
式 I-23-1



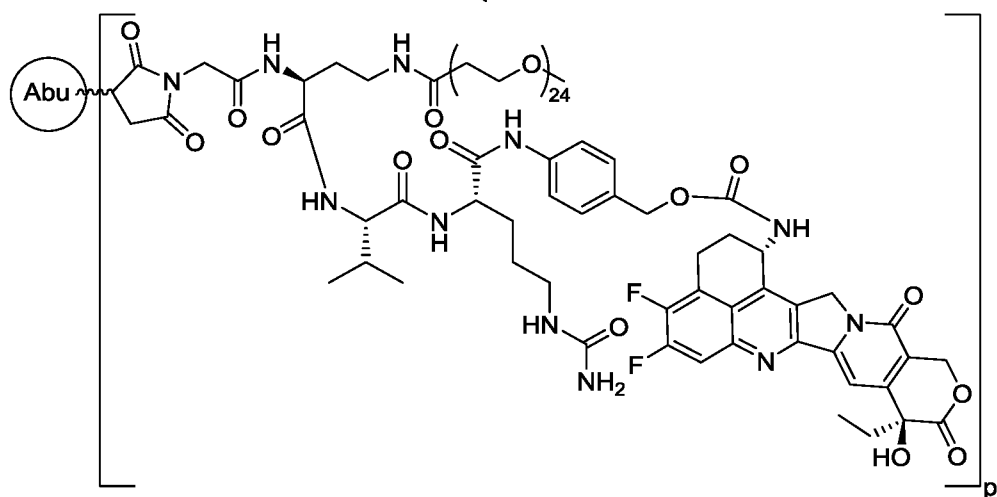
式 I-24



式 I-24-1



式 I-25



式 I-25-1

其中

Abu 为多肽;

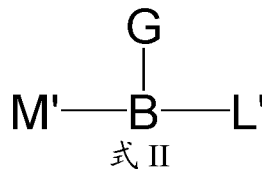
p 为 1-10。

8. 权利要求 1-7 中任一项所述的药物偶联物, 其中 Abu 的氨基酸序列包含一个或多个半胱氨酸, 并通过半胱氨酸的硫原子与药物偶联物其他部分连接。

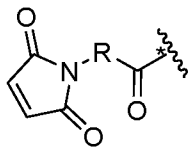
9. 如权利要求 8 所述的药物偶联物, 其为抗体药物偶联物, 其中 Abu 为抗体或抗原结合单元。

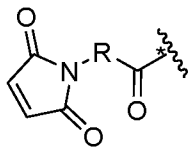
10. 如权利要求 9 所述的药物偶联物, 其中 Abu 结合的靶点选自: HER2、TROP-2、Nectin-4、B7H3、B7H4、CLDN18、BMPRII、E16、STEAP1、0772P、MPF、Napi3b、Sema5b、PSCA、ETBR、MSG783、STEAP2、TrpM4、CRIPTO、CD20、CD21、CD22、CD30、FcRH2、NCA、MDP、IL20R α 、短蛋白聚糖(Brevican)、EphB2R、ASLG659、PSCA、GEDA、BAFF-R、CD79a、CD79b、CXCR5、HLA-DOB、P2X5、CD72、LY64、FcRH1、IRTA2、TENB2、PMEL17、TMEFF1、GDNF-Ra1、Ly6E、TMEM46、Ly6G6D、LGR5、RET、LY6K、GPR19、GPR54、ASPHD1、酪氨酸酶、TMEM118、EpCAM、ROR1、GPR172A、FR α 。

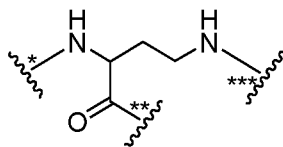
11. 一种化合物, 其具有如式 II 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物:

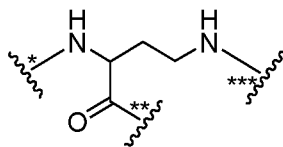


其中

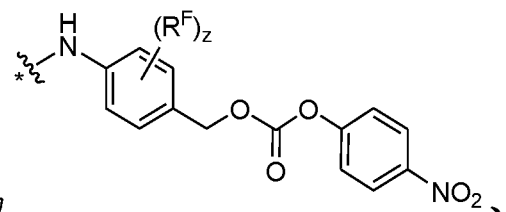


M' 为 , 其中*连接 B, R 选自: $-(\text{CH}_2)_r-$ 、 $-(\text{CHR}^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(\text{CH}_2)_r$ -亚芳基-、-亚芳基- $-(\text{CH}_2)_r-$ 、 $-(\text{CH}_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(\text{C3-C8 碳环基})-(\text{CH}_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(\text{CH}_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(\text{C3-C8 杂环基})-(\text{CH}_2)_r-$ 、 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2)_r-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2-$ 和 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

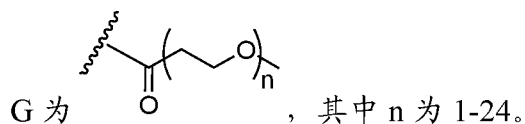
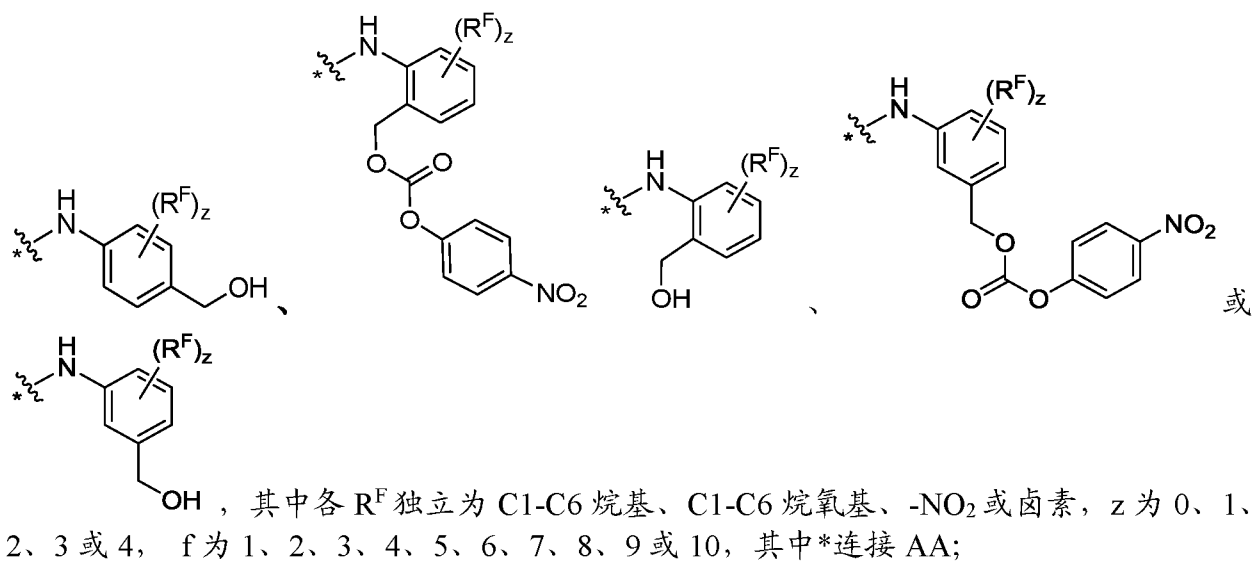


B 为 , 其中*连接 M', **连接 L', ***连接 G;

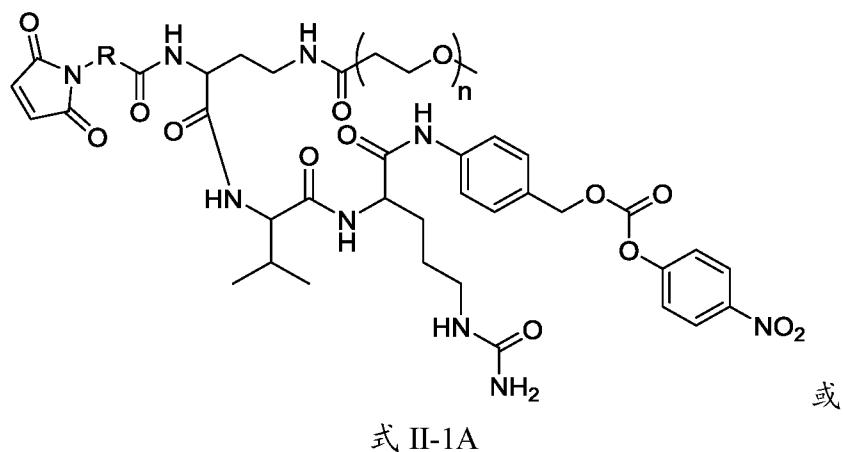
L' 为 $-(\text{AA})_i-(\text{FF}')_r-$, 其中, AA 为氨基酸或多肽, i 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、



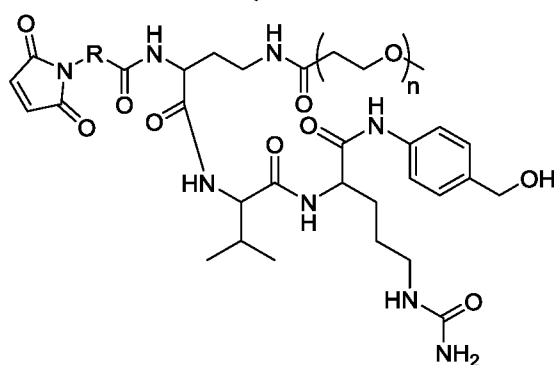
11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20; 各 FF' 独立为



12. 一个化合物, 所述化合物具有如式 II-1A 或式 II-1B 所示的结构或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物:



式 II-1A



式 II-1B

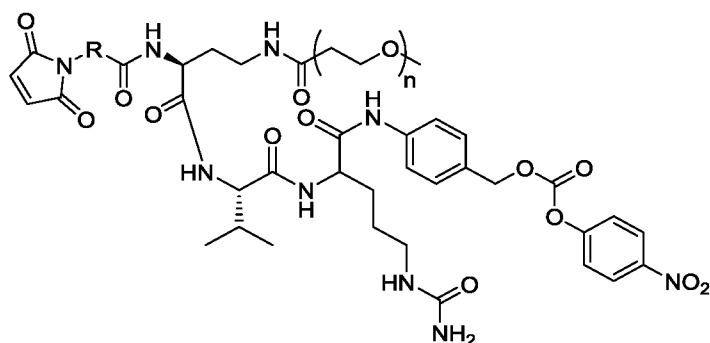
其中

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-$ 亚芳基- $(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 碳环基})-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-$

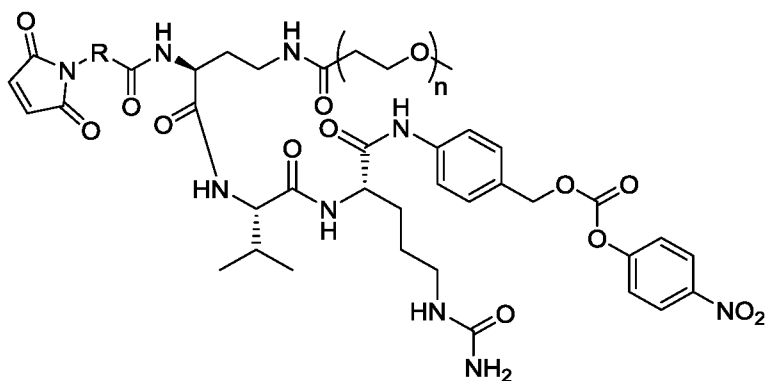
$(\text{CH}_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、-(C3-C8 杂环基)- $(\text{CH}_2)_r$ -、 $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2)_r$ -、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2$ -、 $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、 $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2$ -、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2$ -和 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^m(\text{CH}_2)_r$ ；其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基；并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

n 为 1-24。

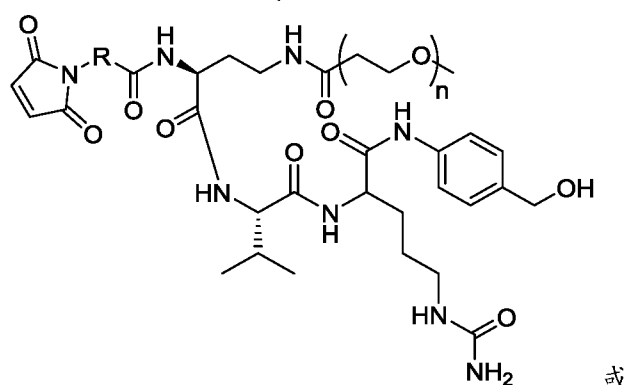
13. 一个化合物或其立体异构体或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中所述化合物为：



式 II-2A

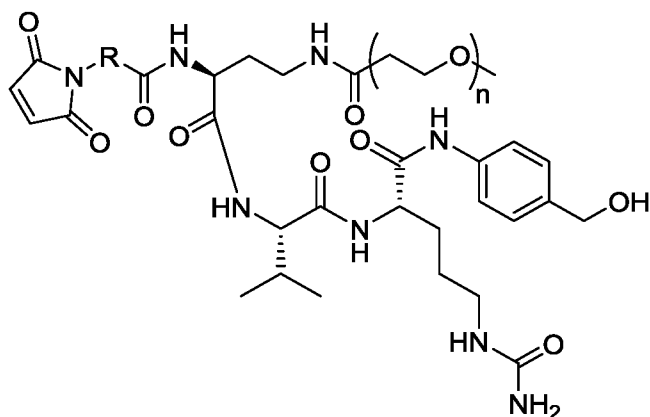


式 II-2A-1



式 II-2B

或



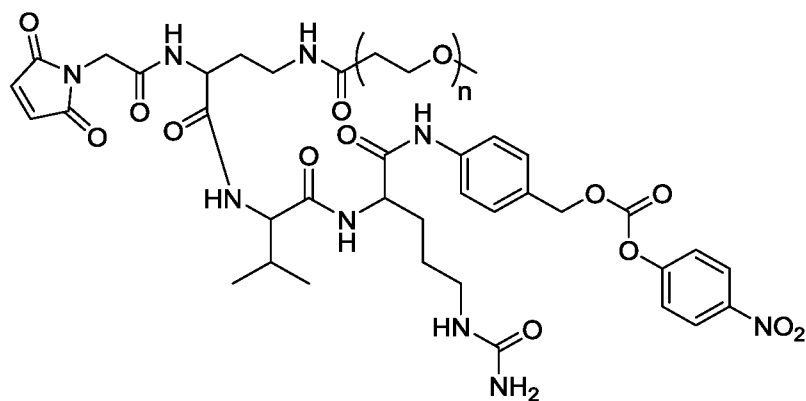
式 II-2B-1

其中

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -C3-C8 杂环基、 $-(C3-C8 \text{ 碳环基})-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -C3-C8 杂环基、 $-(C3-C8 \text{ 杂环基})-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

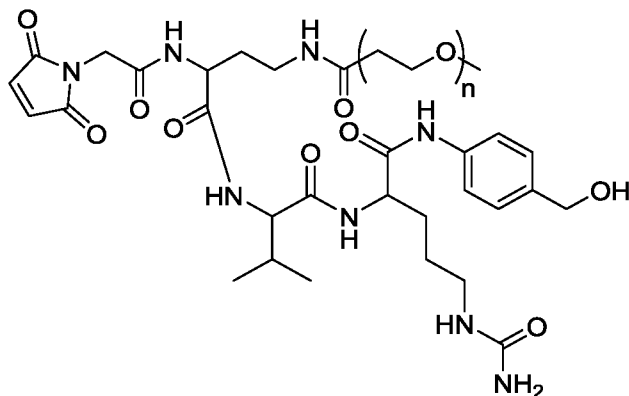
n 为 1-24。

14. 一个化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中所述化合物为:



或

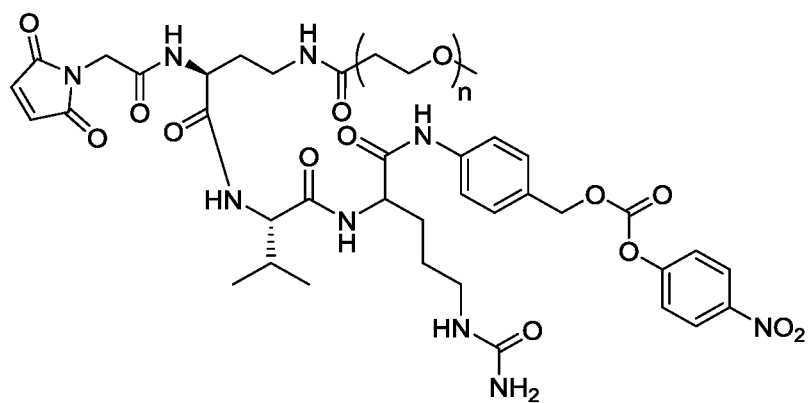
式 II-3A



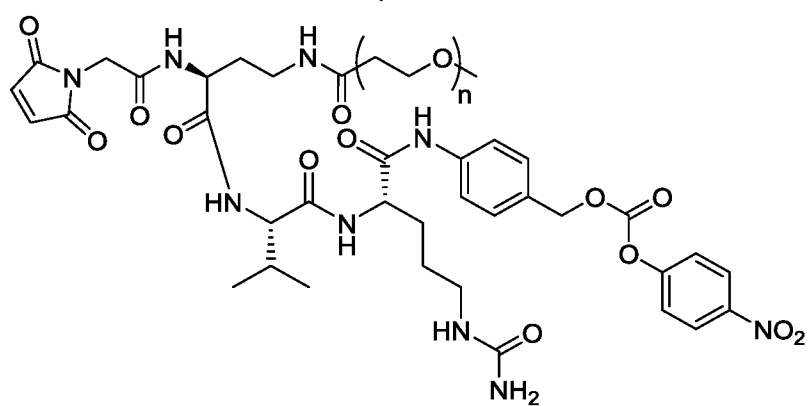
式 II-3B

其中 n 为 1-24。

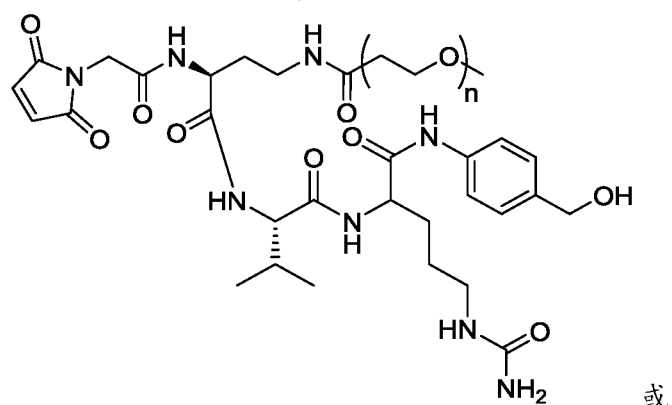
15. 一个化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中所述化合物为：



式 II-4A

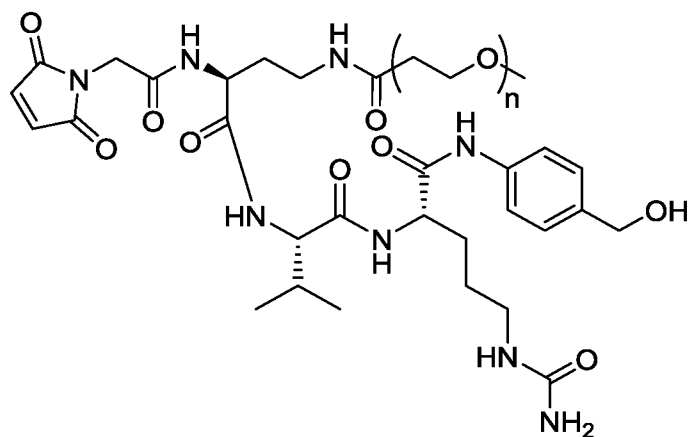


式 II-4A-1



式 II-4B

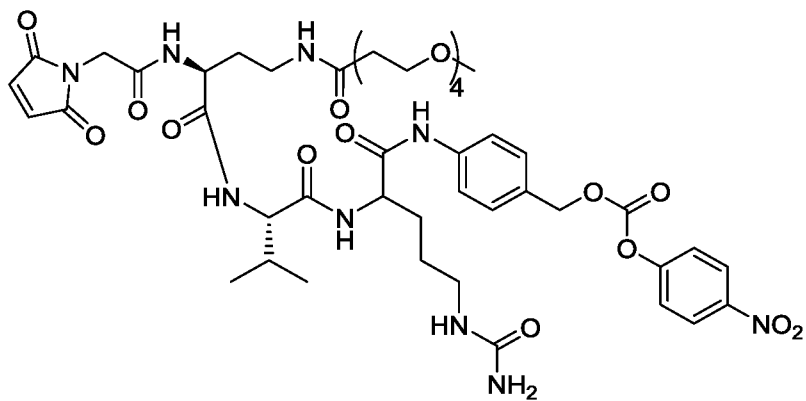
或



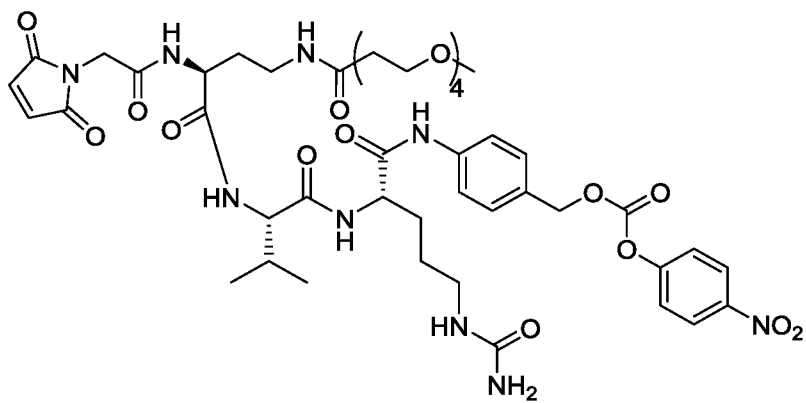
式 II-4B-1

其中 n 为 1-24。

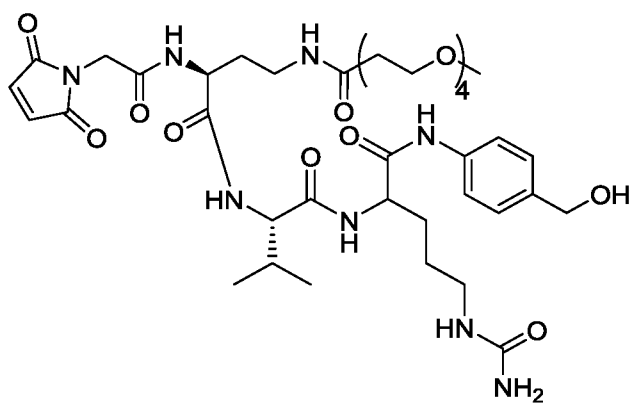
16. 一个化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中所述化合物为：



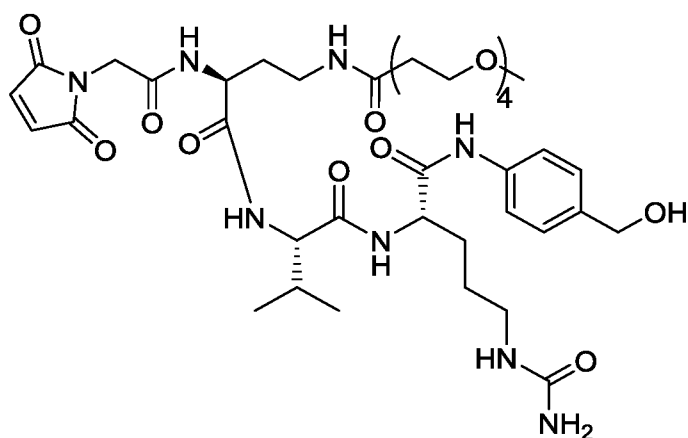
式 II-5A



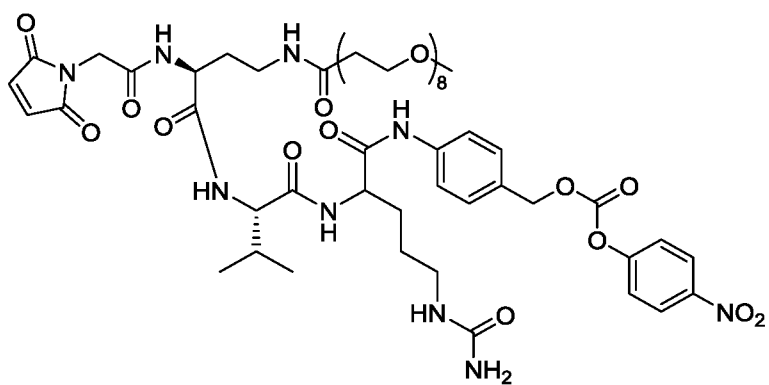
式 II-5A-1



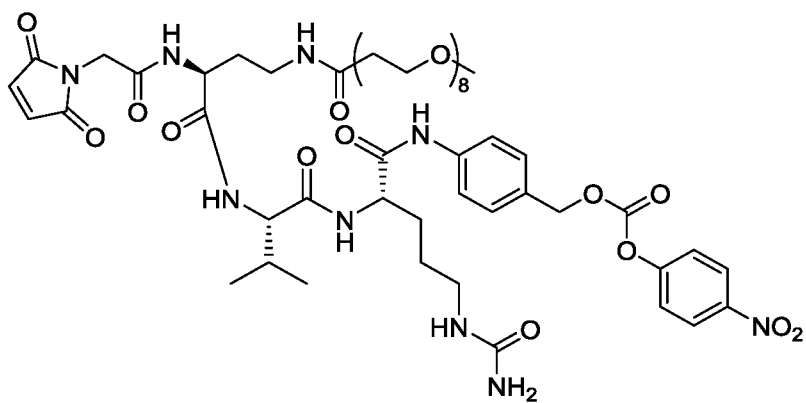
式 II-5B



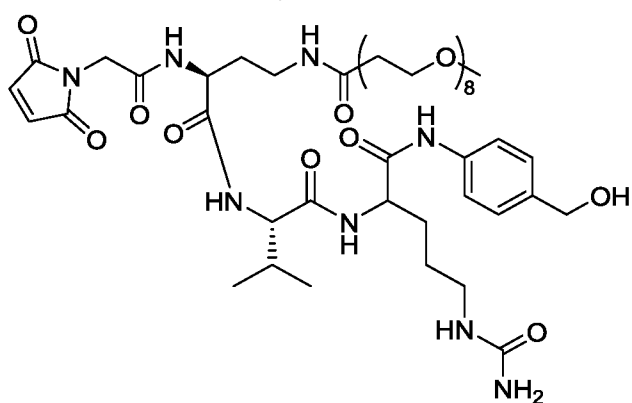
式 II-5B-1



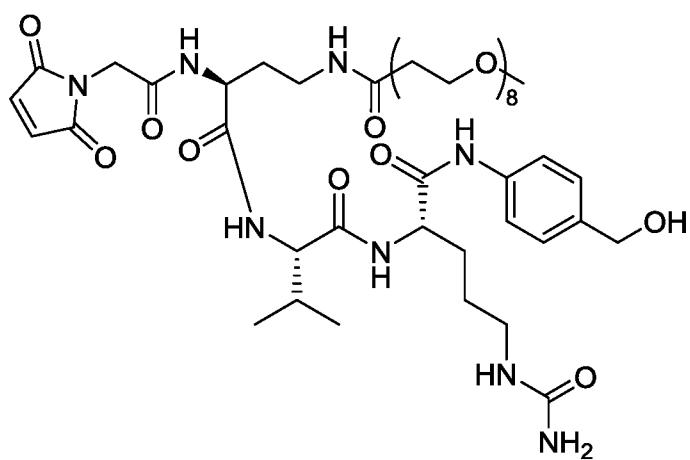
式 II-6A



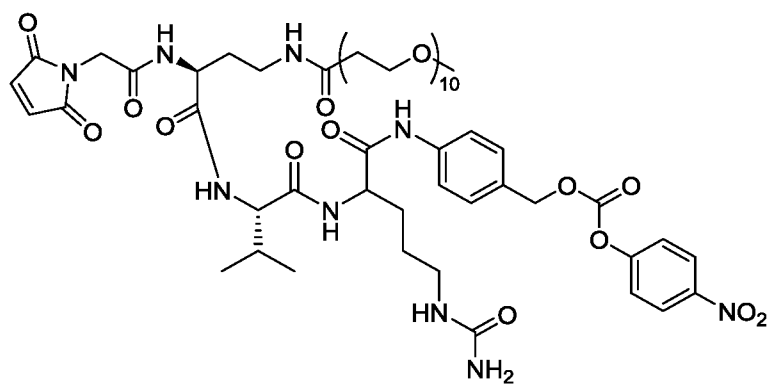
式 II-6A-1



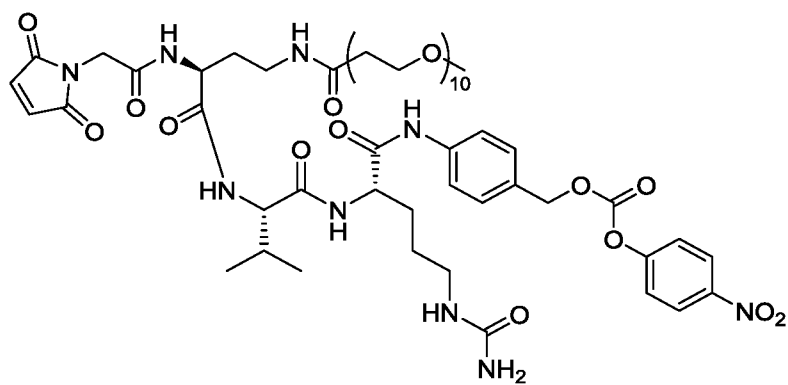
式 II-6B



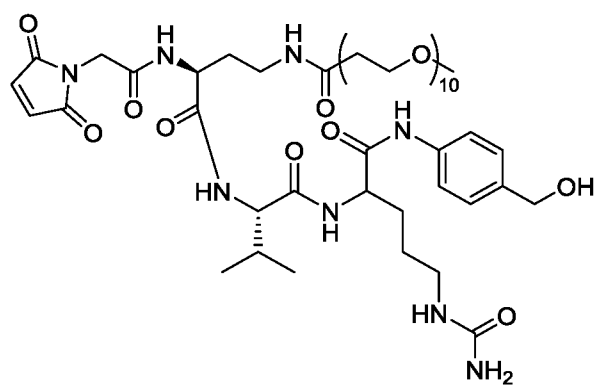
式 II-6B-1



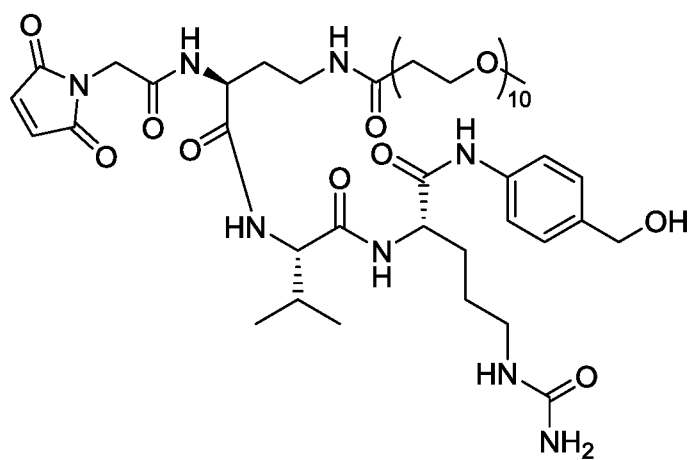
式 II-7A



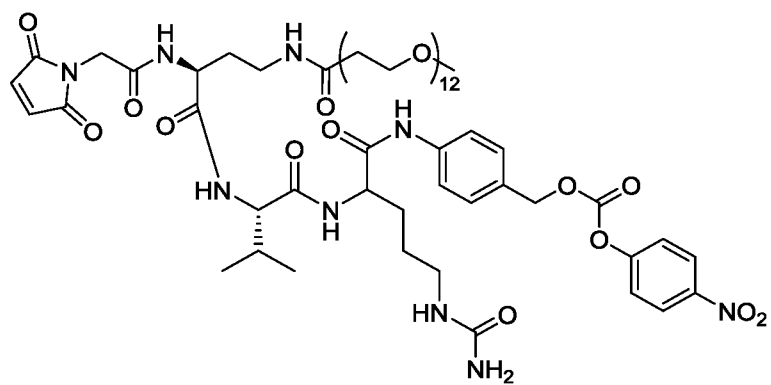
式 II-7A-1



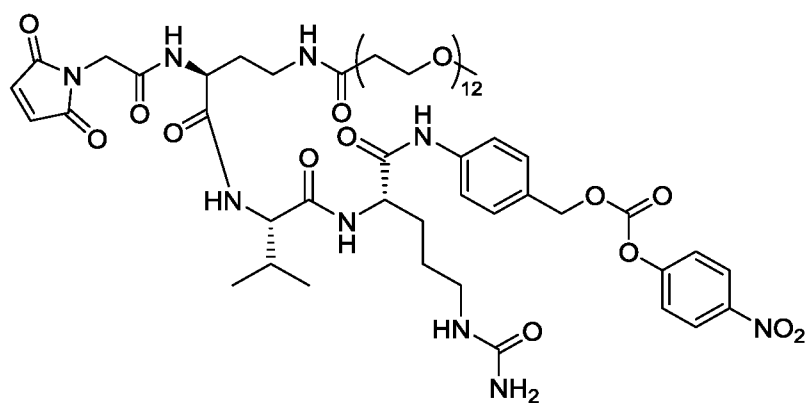
式 II-7B



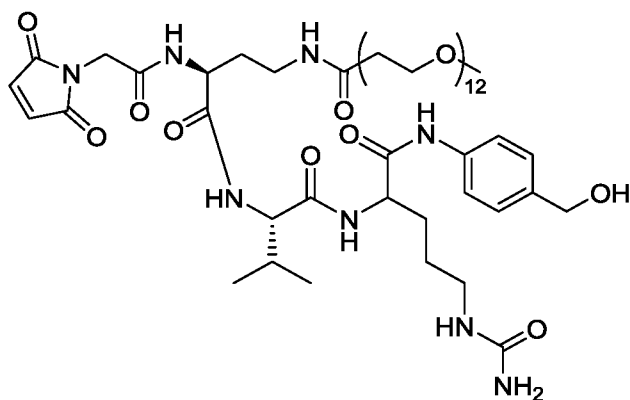
式 II-7B-1



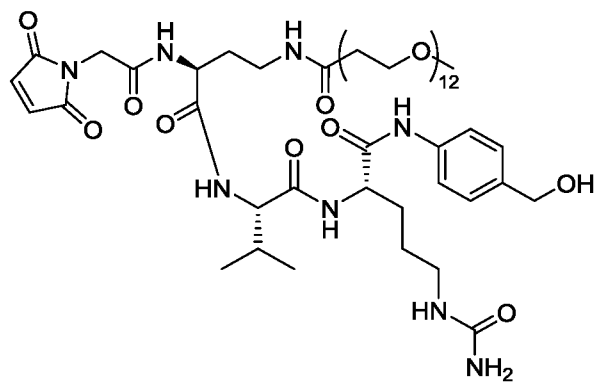
式 II-8A



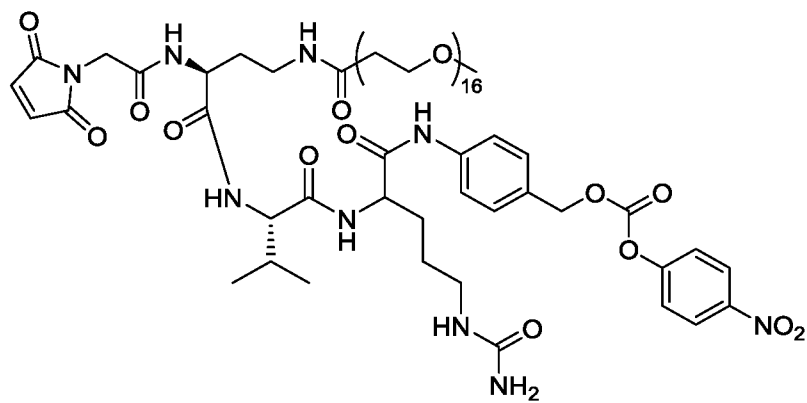
式 II-8A-1



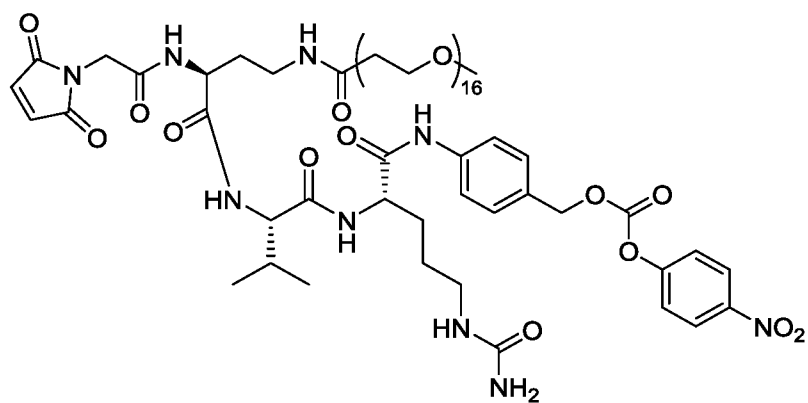
式 II-8B



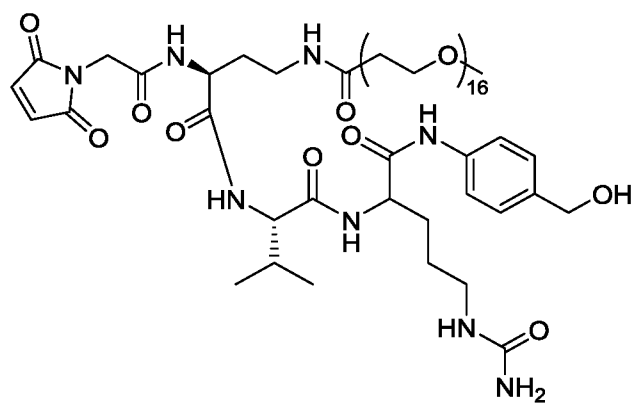
式 II-8B-1



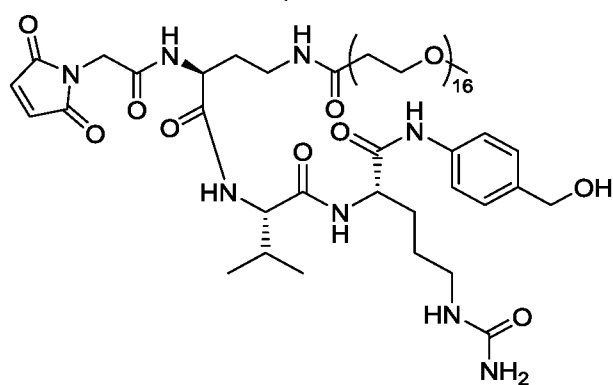
式 II-9A



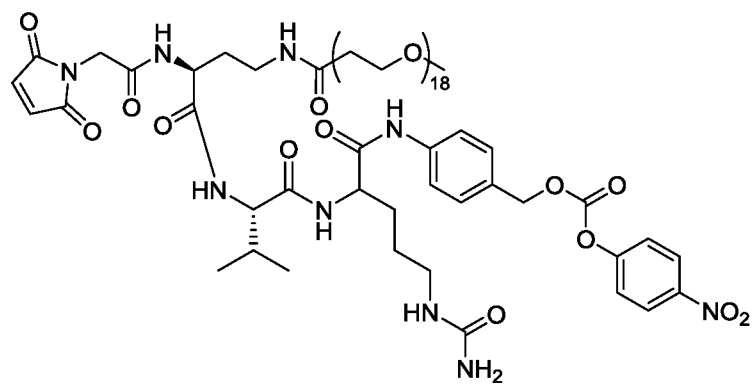
式 II-9A-1



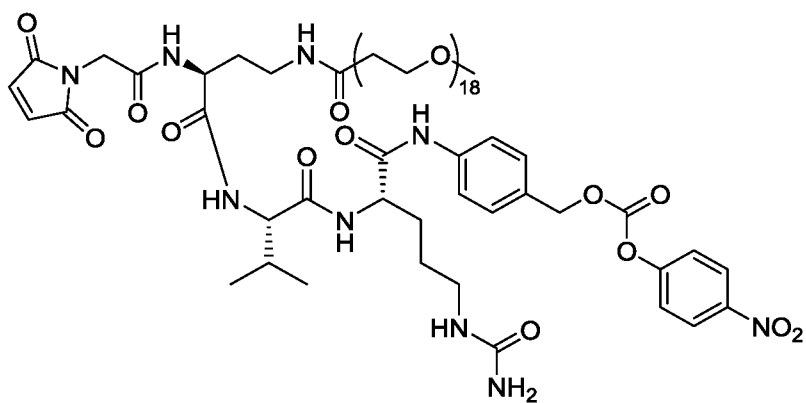
式 II-9B



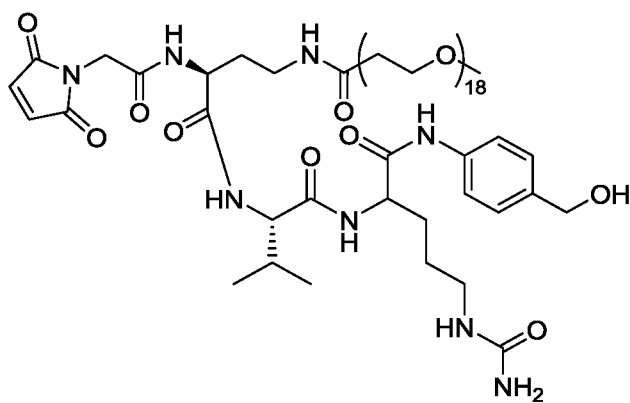
式 II-9B-1



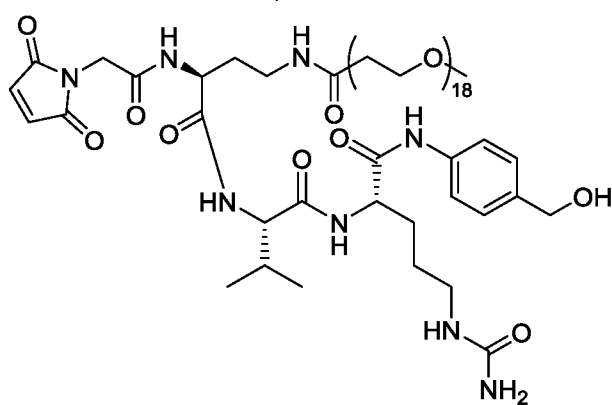
式 II-10A



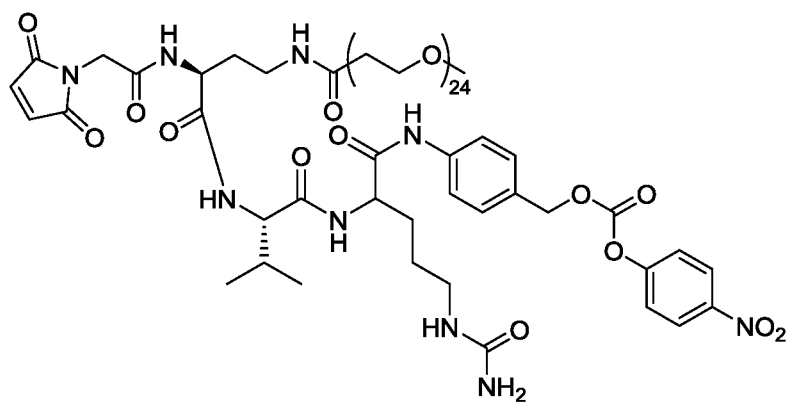
式 II-10A-1



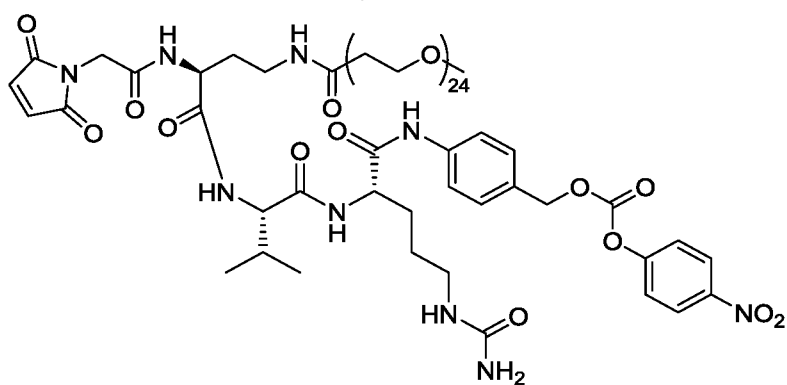
式 II-10B



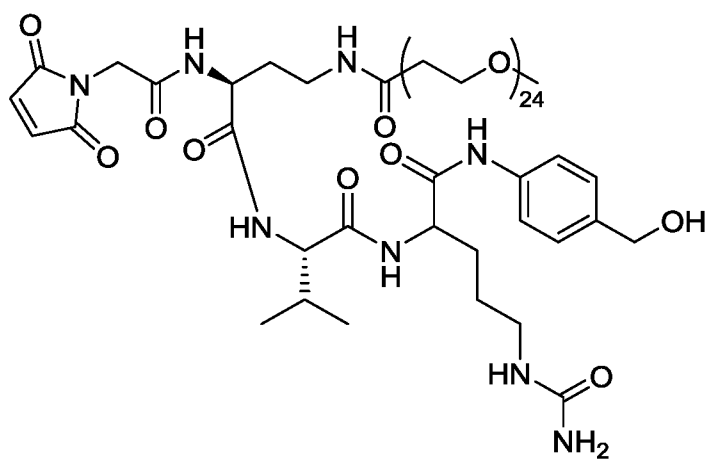
式 II-10B-1



式 II-11A

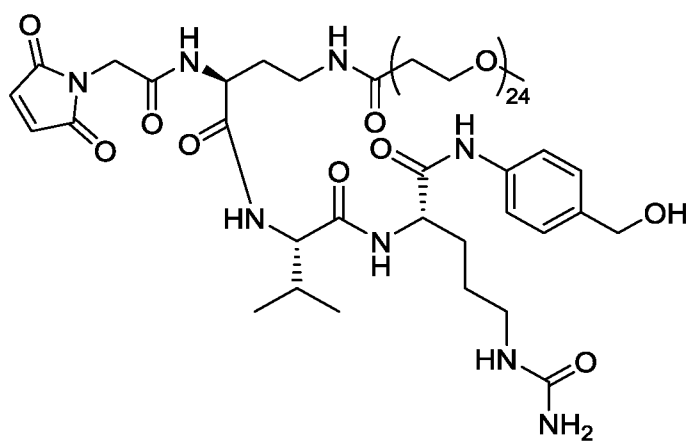


式 II-11A-1



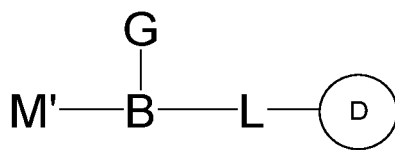
或

式 II-11B



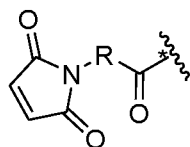
式 II-11B-1

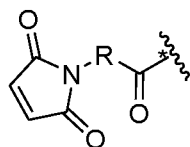
17. 式 III 的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物:

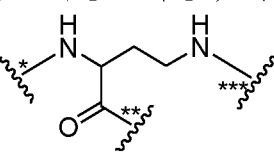
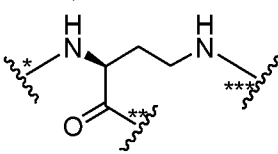


式 III

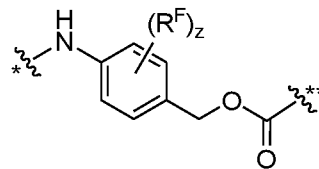
D 为药物;



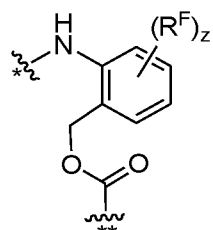
M'为 ，其中*连接B，R选自： $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基-、-亚芳基- $(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8$ 碳环基)- $(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8$ 杂环基)- $(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ ；其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基；并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

B 为 ，或为 ；其中*连接M'，**连接L，***连接G；

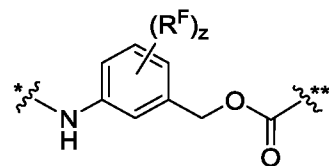
L 为 $-(AA)_i-(FF)_f-$ ，其中，AA 为氨基酸或多肽， i 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、



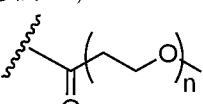
11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20；各 FF 独立为



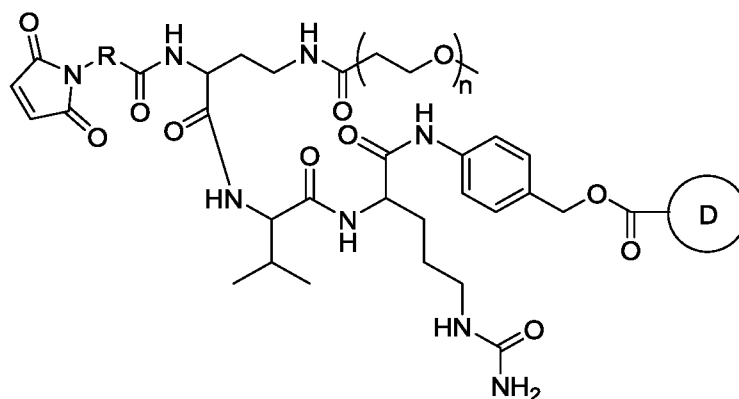
或



，其中各 R^F 独立为 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、 $-NO_2$ 或卤素， z 为 0、1、2、3 或 4； f 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；其中*连接 AA，**连接 D；

G 为 ，其中 n 为 1-24；或 n 为 4-12。

18. 式 III-1 的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中所述式 III-1 为：



式 III-1

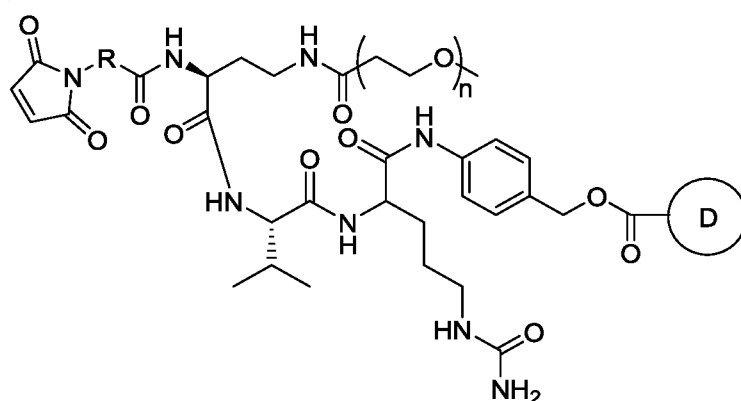
其中

D 为药物;

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基-、 $-\text{亚芳基}-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 碳环基})-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 杂环基})-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

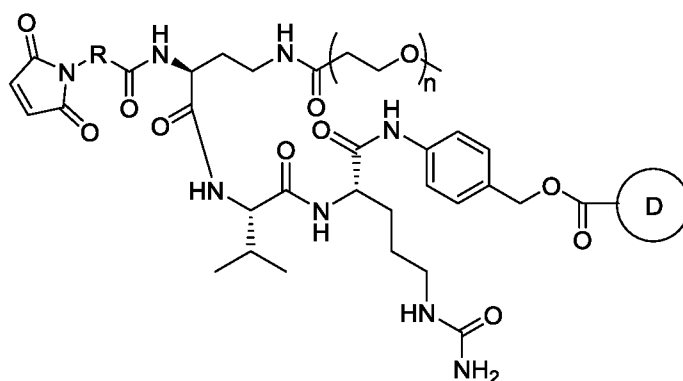
n 为 1-24。

19. 式 III-2 和 III-2-1 的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中所述式 III-2 为:



式 III-2

所述式 III-2-1 为:



式 III-2-1

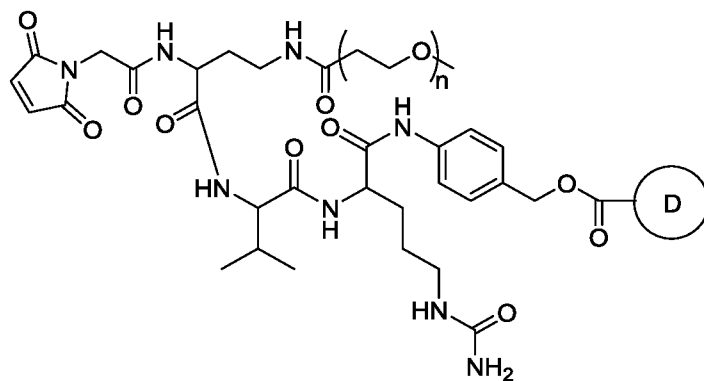
其中

D 为药物;

R 选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CHR^m)_r-$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_r-$ 、亚芳基、 $-(CH_2)_r$ -亚芳基-、 $-\text{亚芳基}-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 碳环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 碳环基})-(CH_2)_r-$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_r$ -(C3-C8 杂环基)-、 $-(C3-C8 \text{ 杂环基})-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^m(CH_2)_r-$; 其中各 R^m 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 r 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

n 为 1-24。

20. 式 III-3 的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中所述式 III-3 为：



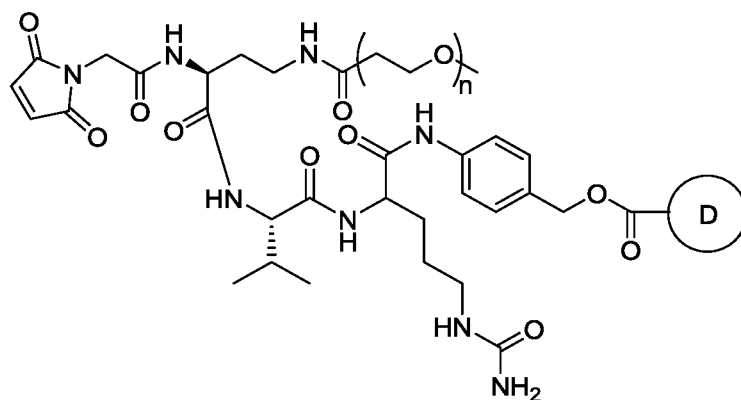
式 III-3

其中

D 为药物；

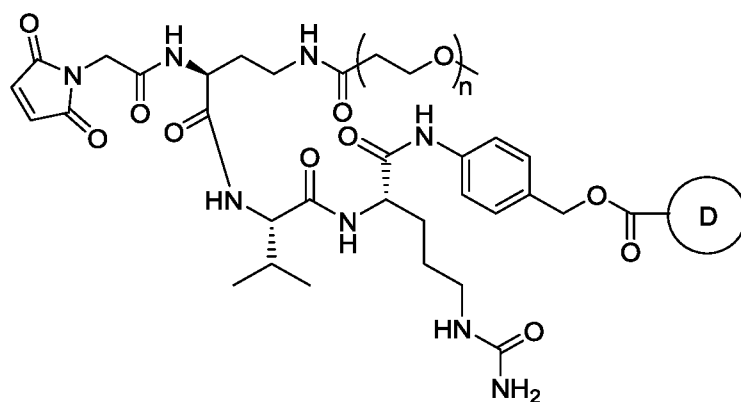
n 为 1-24。

21. 式 III-4 和式 III-4-1 所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中所述式 III-4 为：



式 III-4

所述式 III-4-1 为：



式 III-4-1

其中

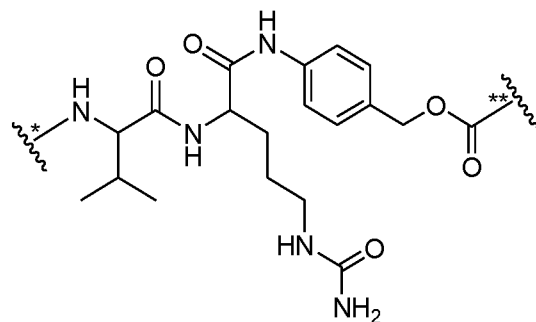
D 为药物；

n 为 1-24。

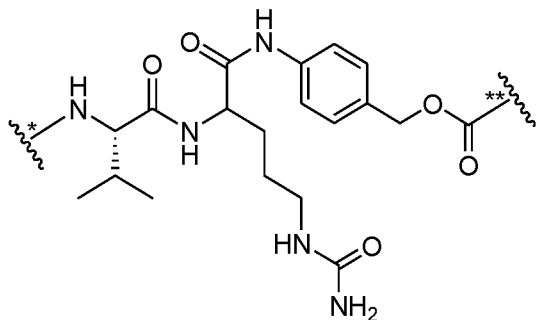
22. 权利要求 1 所述的药物偶联物、权利要求 11、17 所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中各 AA 独立选自 Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu 和 Gly-Phe-Leu-Gly。

23. 权利要求 1 所述的药物偶联物、权利要求 11、17 所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中 AA 为 Val-Cit，i 是 1。

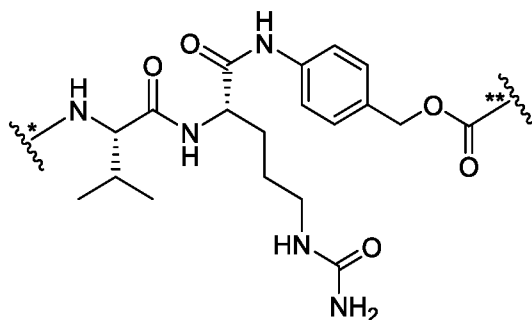
24. 权利要求 1 所述的药物偶联物或权利要求 17 所述的化合物或者其药学上可接受



的盐或溶剂合物，其中 L 为



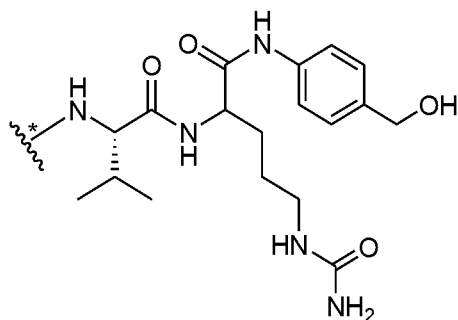
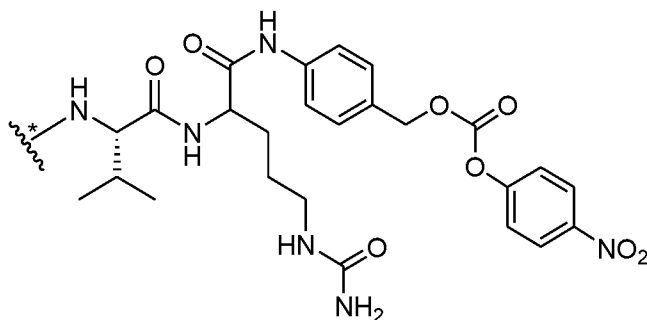
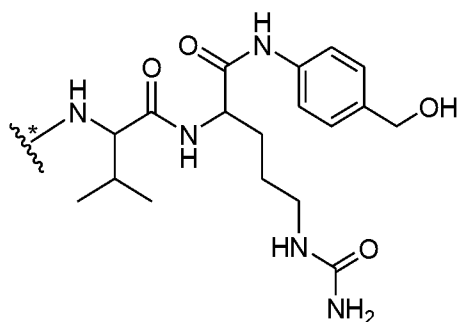
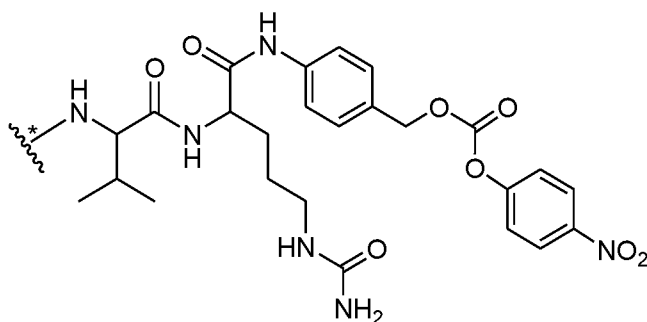
，或

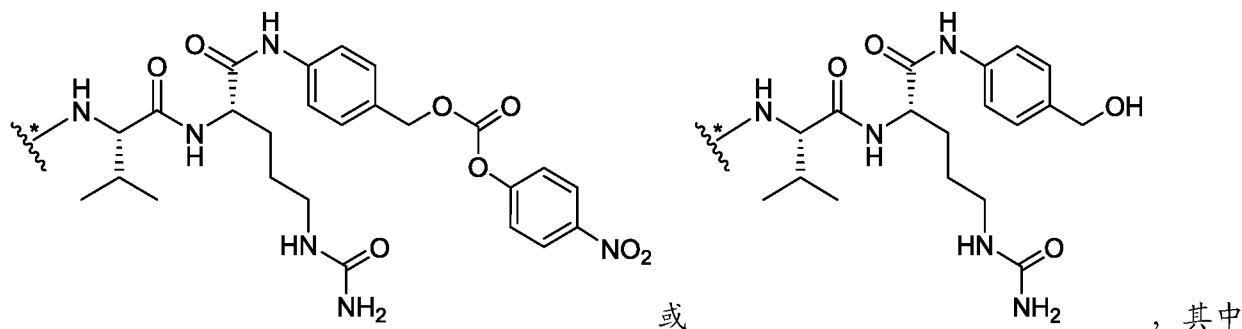


，其中*

连接 B，**连接 D。

25. 权利要求 11 所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中 L' 为





*连接 B

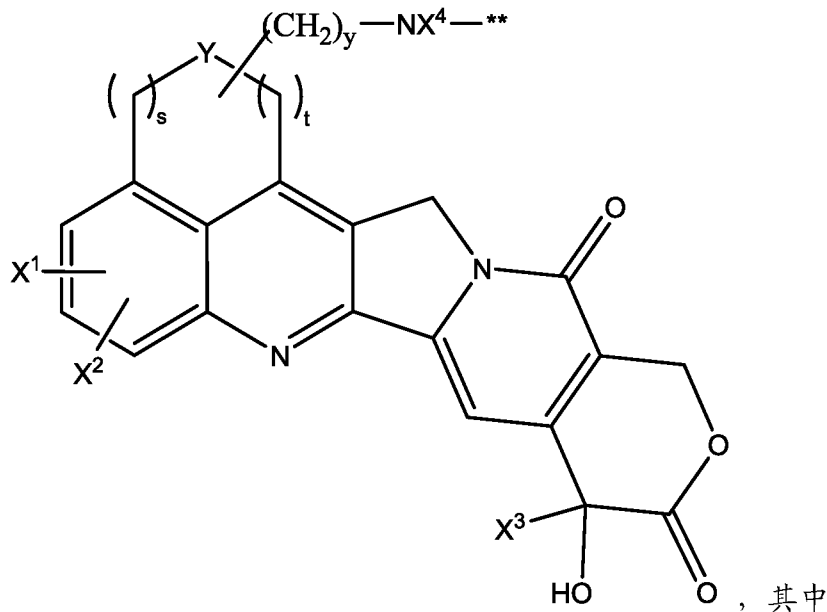
26. 权利要求 1-6、22-24 中任一项所述的药物偶联物或权利要求 17-24 中任一项所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中 D 为抗癌药物、细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物。

27. 权利要求 1-6、22-24 中任一项所述的药物偶联物或权利要求 17-24 中任一项所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中 D 为抗癌药物。

28. 权利要求 1-6、22-24 中任一项所述的药物偶联物或权利要求 17-24 中任一项所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中 D 为微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

29. 权利要求 1-6、22-24 中任一项所述的药物偶联物或权利要求 17-24 中任一项所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中 D 选自 MMAE、MMAF、AF、卡奇霉素 (calicheamicin) 类、倍癌霉素 (duocarmycin) 类、安曲霉素类衍生物 PBD (pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)、伊立替康、依喜替康衍生物, 喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、喜树碱类衍生物 SN-38、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱 (homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]呋唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺, 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

30. 权利要求 1-6、22-24 中任一项所述的药物偶联物或权利要求 17-24 中任一项所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中 D 为



X¹ 和 X² 各自独立地为:

H,

羟基,

C1-C6 烷基,

被一个或多个羟基、卤素、硝基或氰基取代的 C1-C6 烷基,

C2-C6 烯基,

C2-C6 炔基,

C1-C6 烷氧基,

C1-C6 氨基烷氧基,

卤素,

硝基,

氰基,

巯基,

烷硫基,

氨基, 被氨基保护基取代的氨基, 在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基,

在氨基部分任选被氨基保护基或 C1-C6 烷基取代的 C1-C6 氨基烷基氨基,

连接至杂环的 C1-C6 烷基, 所述杂环任选被一个或多个 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、氨基、卤素、硝基或氰基取代,

连接至杂环的 C1-C6 烷基氨基, 所述杂环任选被 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基取代, 所述氨基任选被氨基保护基、卤素、硝基、氰基或保护基取代,

氨基取代的杂环基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或一个或多个 C1-C6 烷基取代,

杂环氨基, 其在杂环部分的氮原子或氨基部分任选被保护基或 C1-C6 烷基取代,

任选被氨基甲酰基保护基或 C1-C6 烷基取代的氨基甲酰基,

吗啉-1-基, 或

哌啶-1-基;

X^3 为 C1-C6 烷基;

X^4 为 H、 $-(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CHR^n)_q-CH_3$ 、C3-C8 碳环基、 $-O-(CH_2)_q-CH_3$ 、亚芳基- CH_3 、 $-(CH_2)_q$ -亚芳基- CH_3 、-亚芳基- $(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 碳环基)- CH_3 、-(C3-C8 碳环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、C3-C8 杂环基、 $-(CH_2)_q$ -(C3-C8 杂环基)- CH_3 、-(C3-C8 杂环基)- $(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2CH_2O)_q-CH_2-CH_3$ 、或 $-(CH_2CH_2O)_qC(O)NR^n(CH_2)_q-CH_3$; 其中各 R^n 独立为 H、C1-C6 烷基、C3-C8 碳环基、苯基或苄基; 并且各 q 独立为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

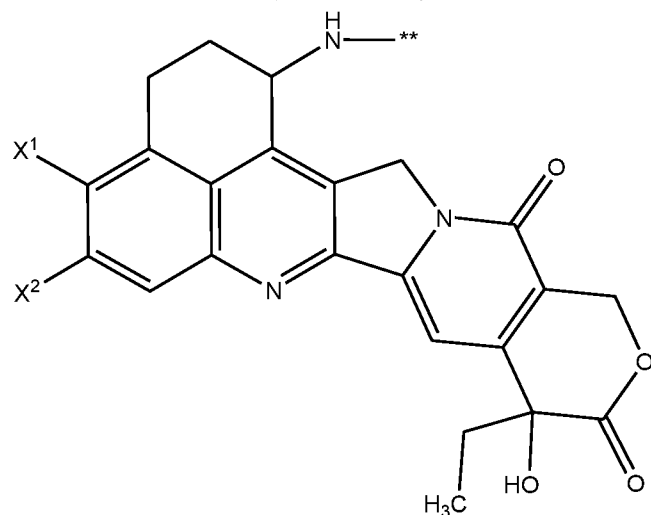
**为连接点;

y 为 0、1 或 2;

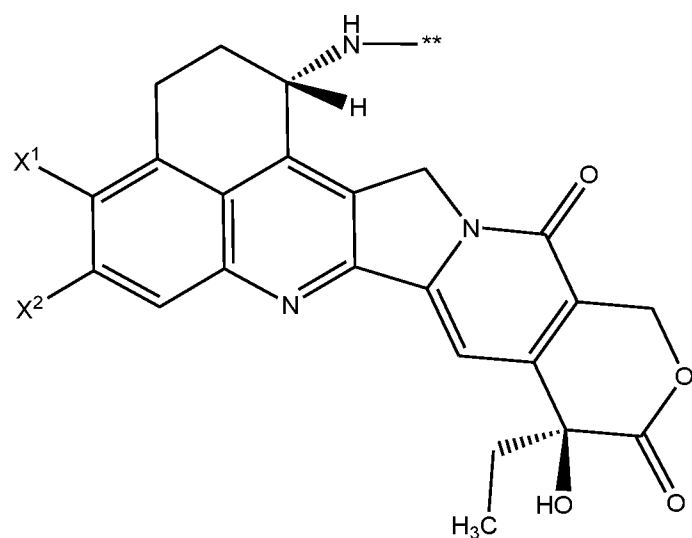
Y 为 O、S 或 CR^1R^2 , 其中 R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或 C1-C6 烷基;

s 和 t 各自独立为 0、1 或 2, 但不同时为 0。

31. 权利要求 1-6、22-24 中任一项所述的药物偶联物或权利要求 17-24 中任一项所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中 D 为

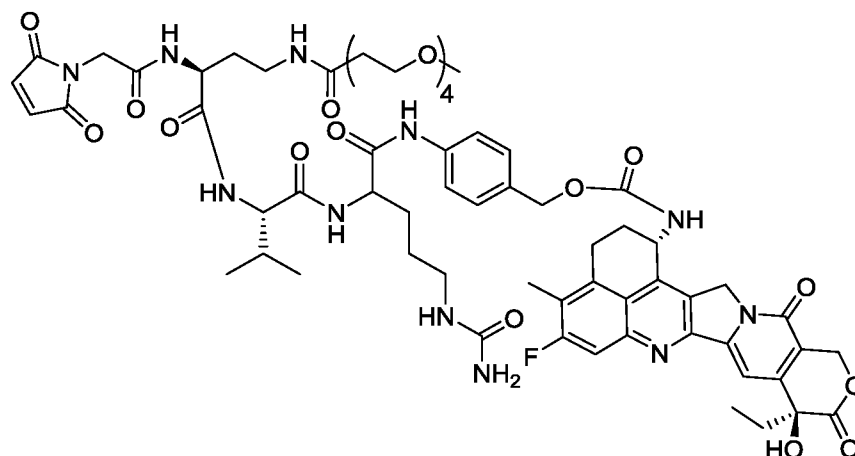


或

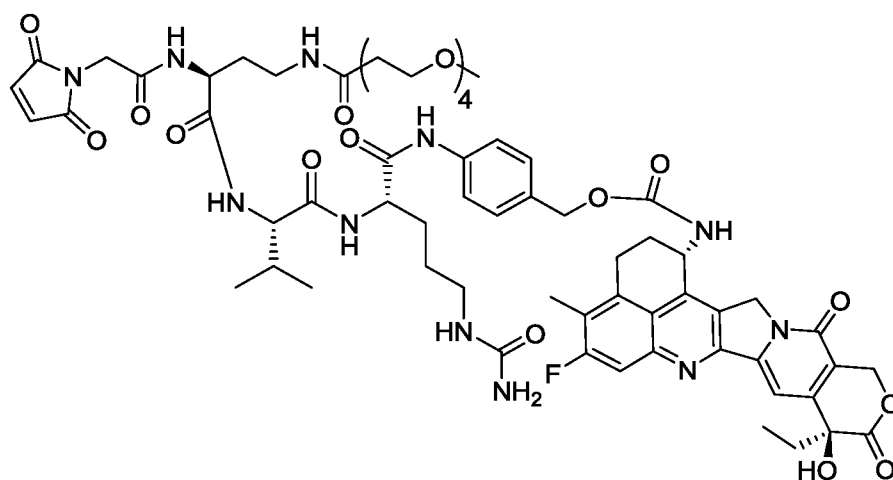


, 其中 X^1 和 X^2 各自独立地为 C1-C6 烷基、卤素或-OH; **为连接点。

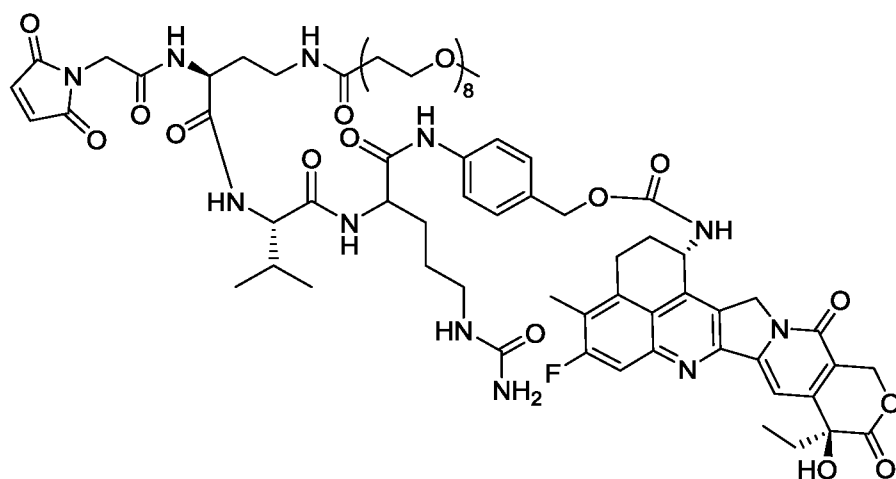
32. 式 III-5、式 III-5-1、式 III-6、式 III-6-1、式 III-7、式 III-7-1、式 III-8、式 III-8-1、式 III-9、式 III-9-1、式 III-10、式 III-10-1、式 III-11、式 III-11-1、式 III-12、式 III-12-1、式 III-13、式 III-13-1、式 III-14、式 III-14-1、式 III-15、式 III-15-1、式 III-16、式 III-16-1、式 III-17、式 III-17-1、式 III-18 或式 III-18-1 的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物, 其中所述式 III-5、式 III-5-1、式 III-6、式 III-6-1、式 III-7、式 III-7-1、式 III-8、式 III-8-1、式 III-9、式 III-9-1、式 III-10、式 III-10-1、式 III-11、式 III-11-1、式 III-12、式 III-12-1、式 III-13、式 III-13-1、式 III-14、式 III-14-1、式 III-15、式 III-15-1、式 III-16、式 III-16-1、式 III-17、式 III-17-1、式 III-18 或式 III-18-1 为:



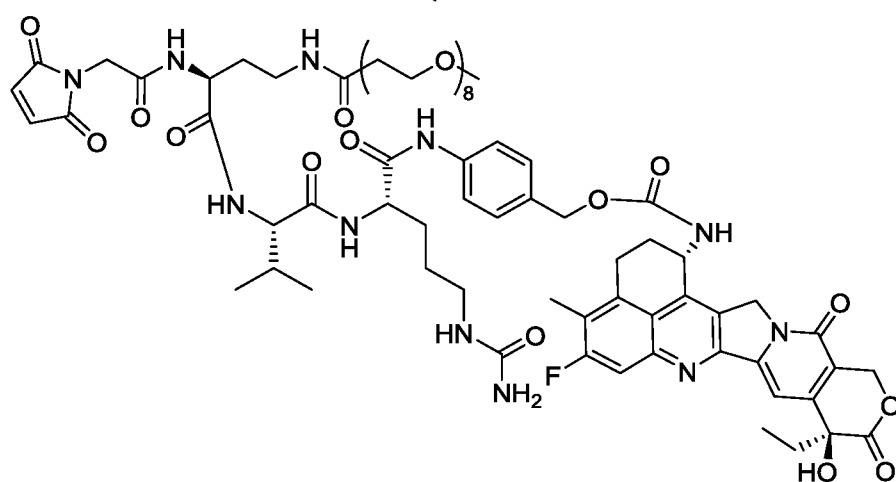
式 III-5



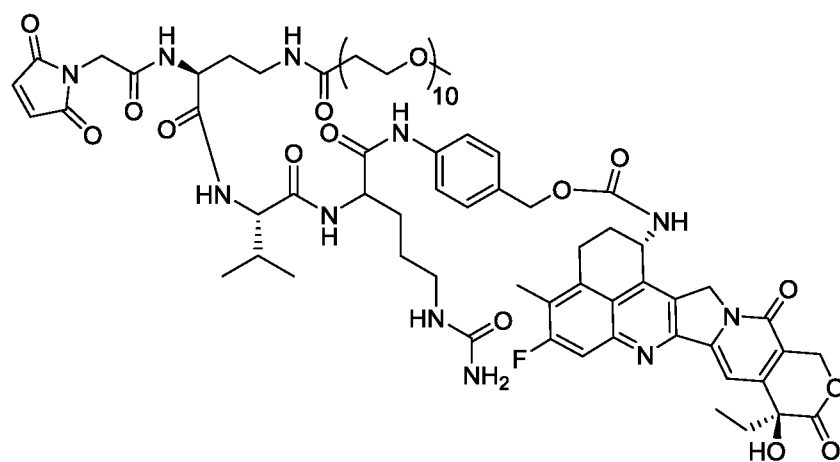
式 III-5-1



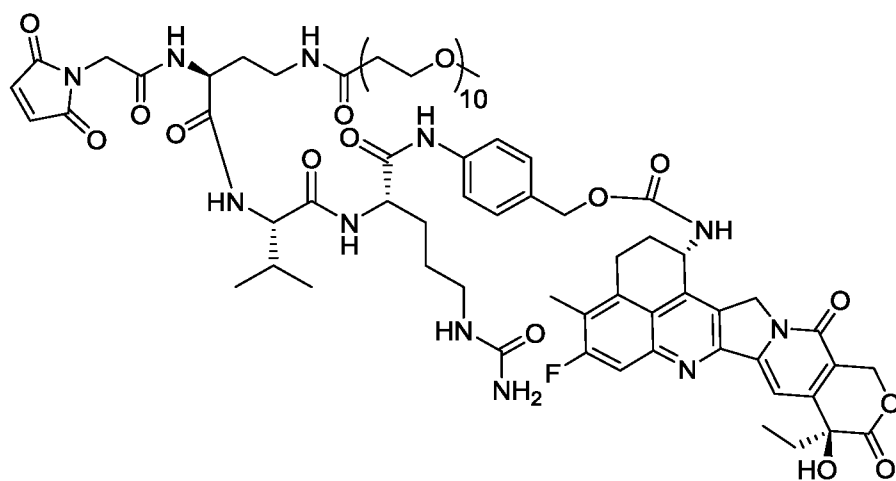
式 III-6



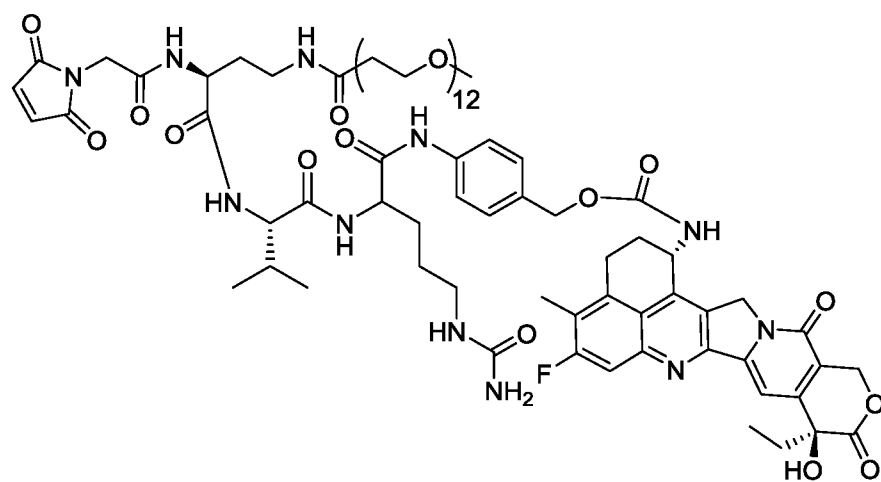
式 III-6-1



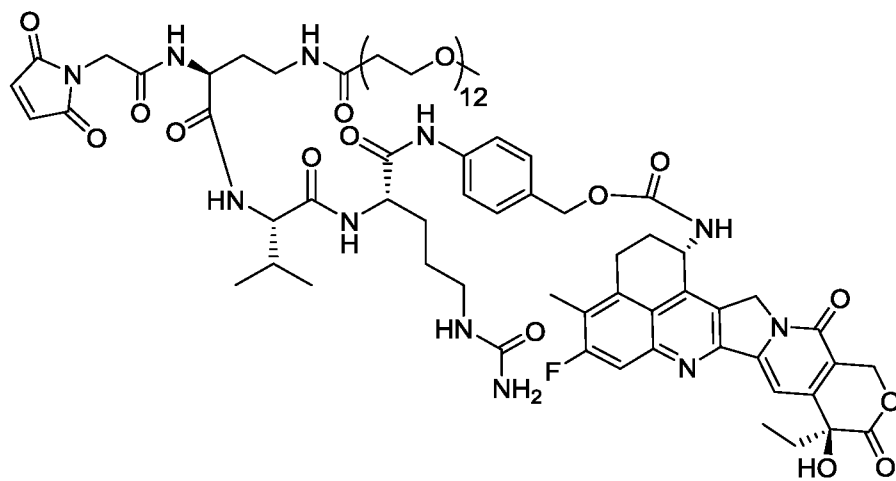
式 III-7



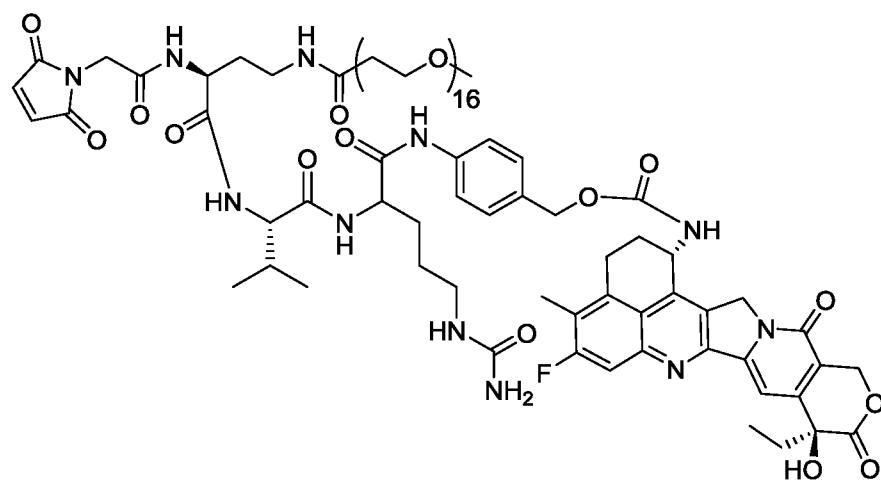
式 III-7-1



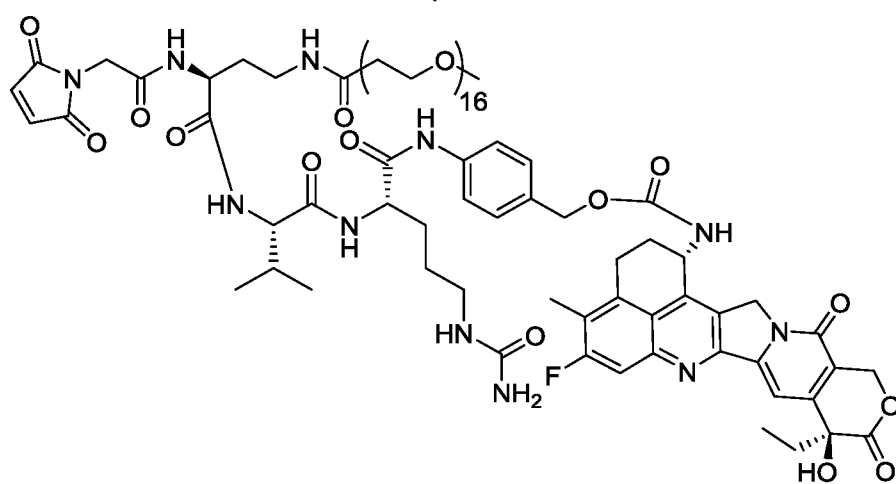
式 III-8



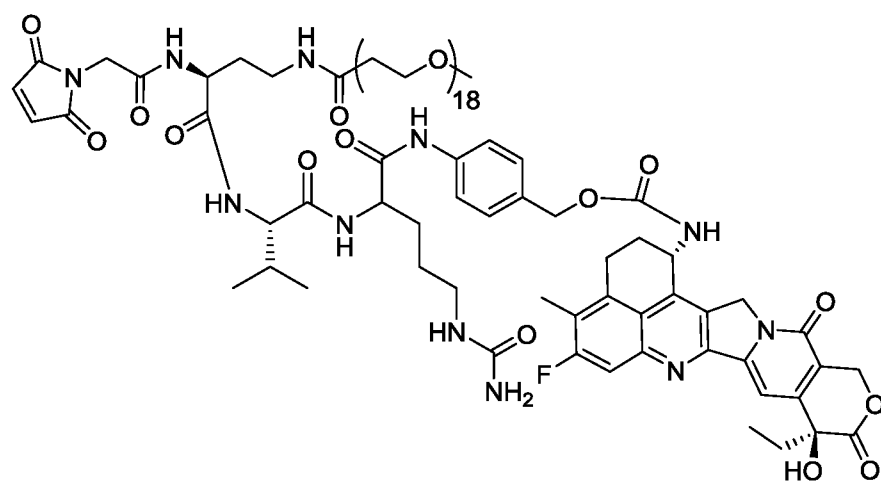
式 III-8-1



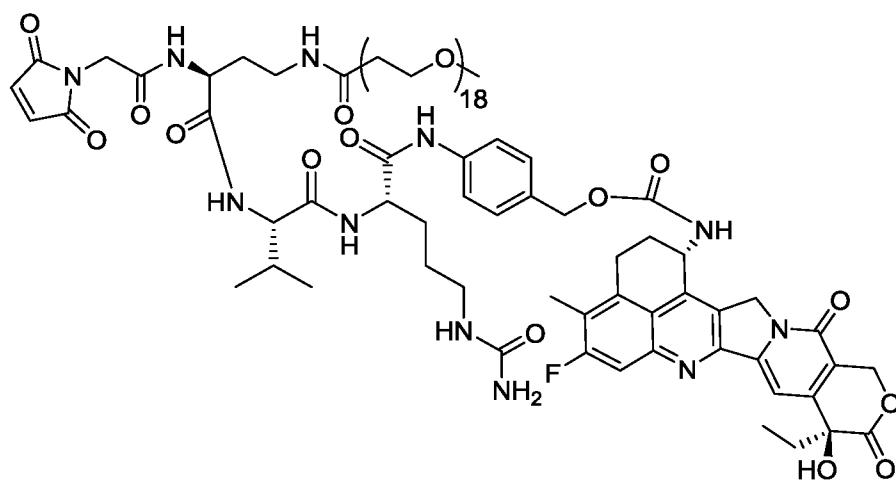
式 III-9



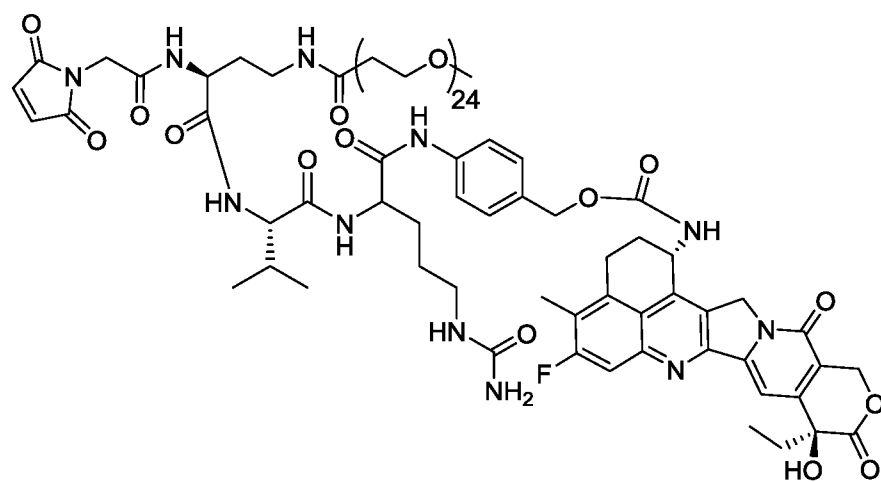
式 III-9-1



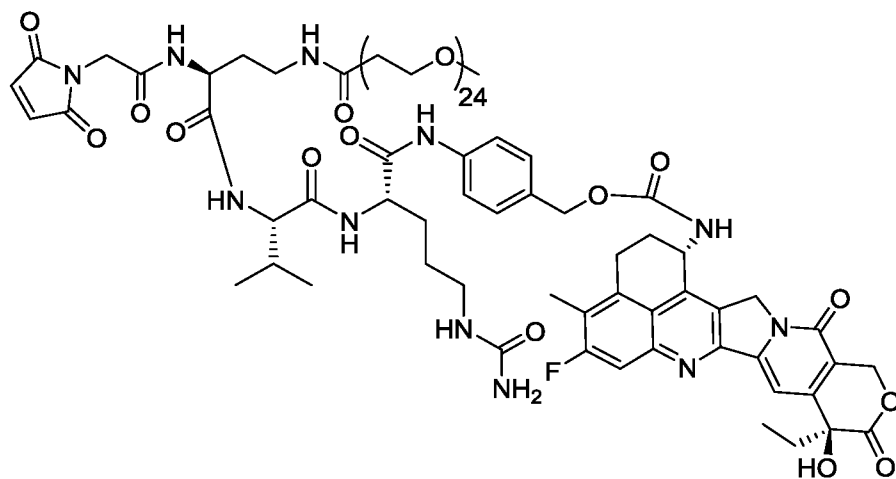
式 III-10



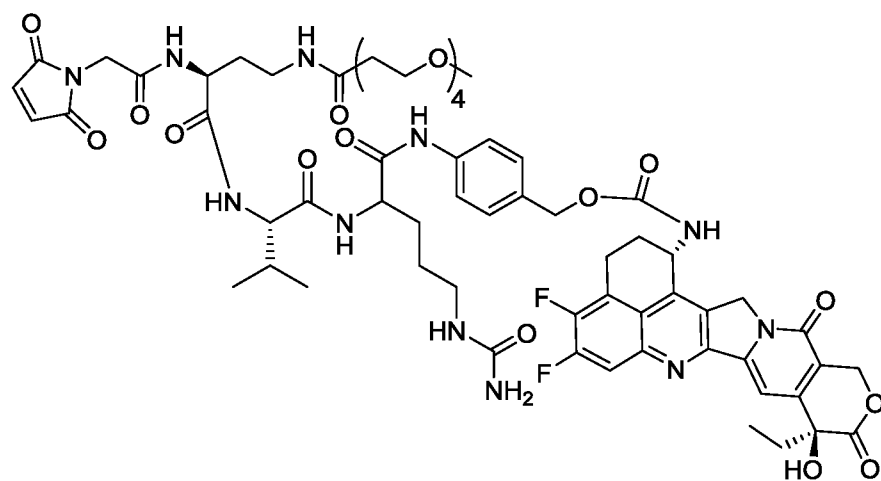
式 III-10-1



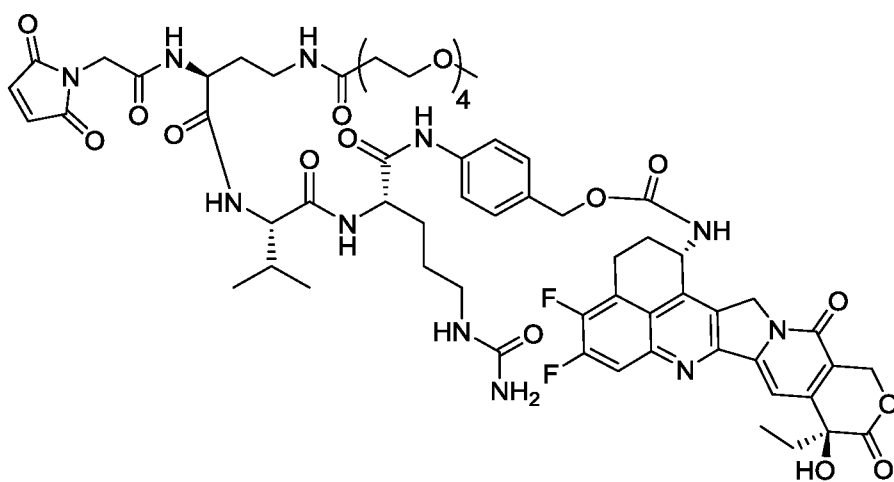
式 III-11



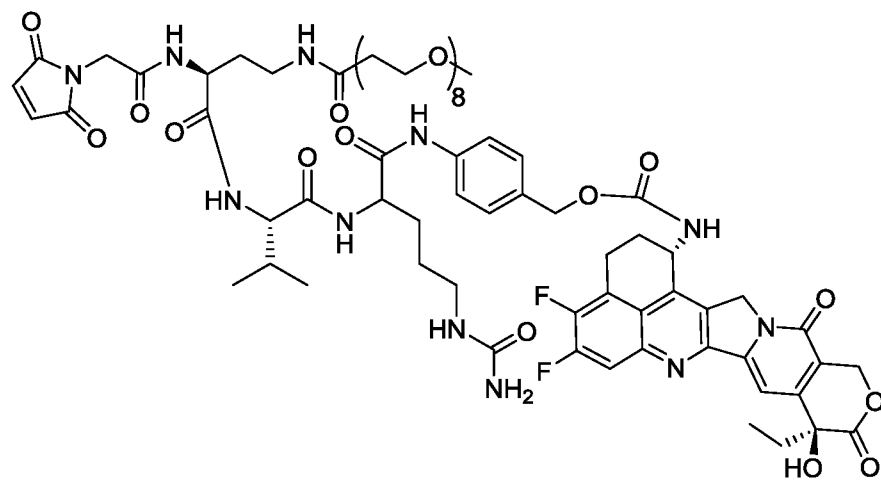
式 III-11-1



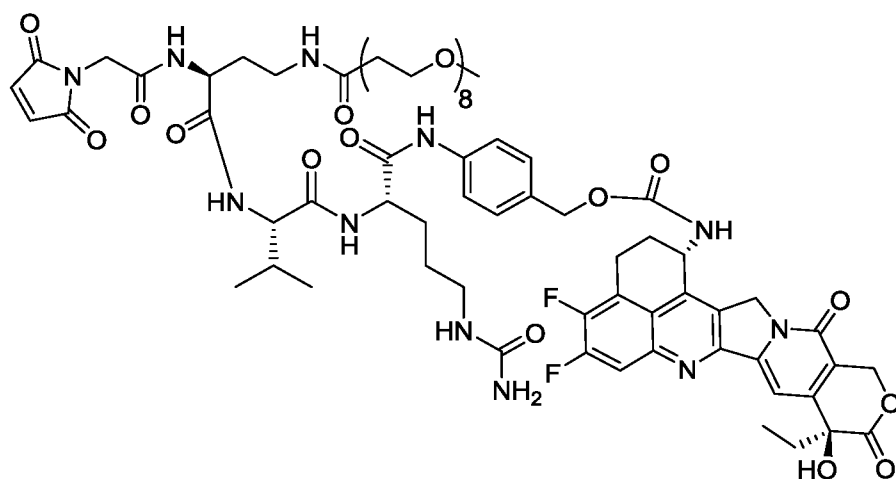
式 III-12



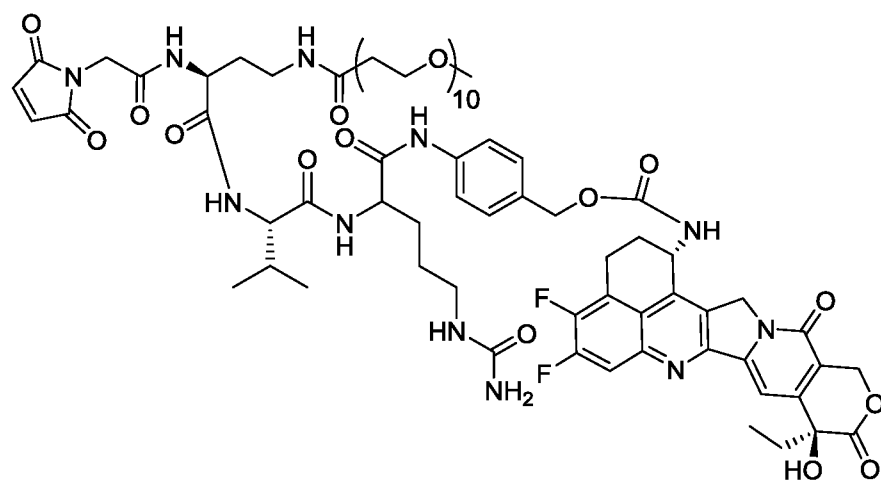
式 III-12-1



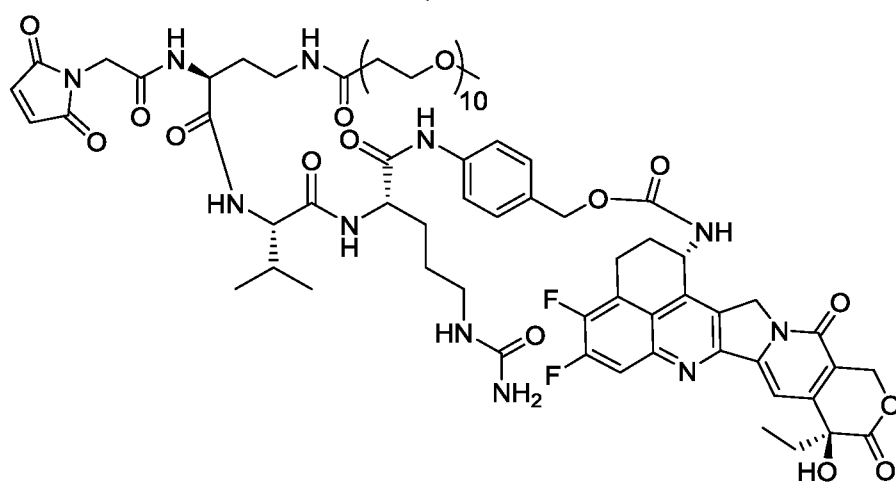
式 III-13



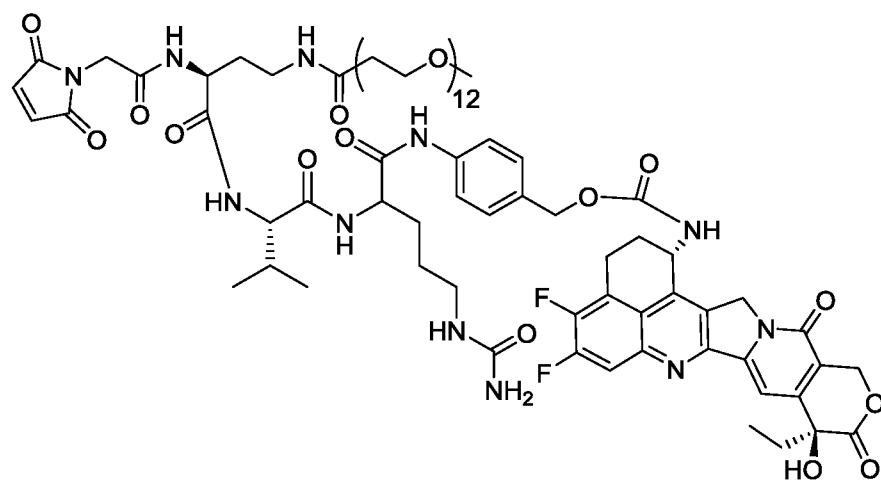
式 III-13-1



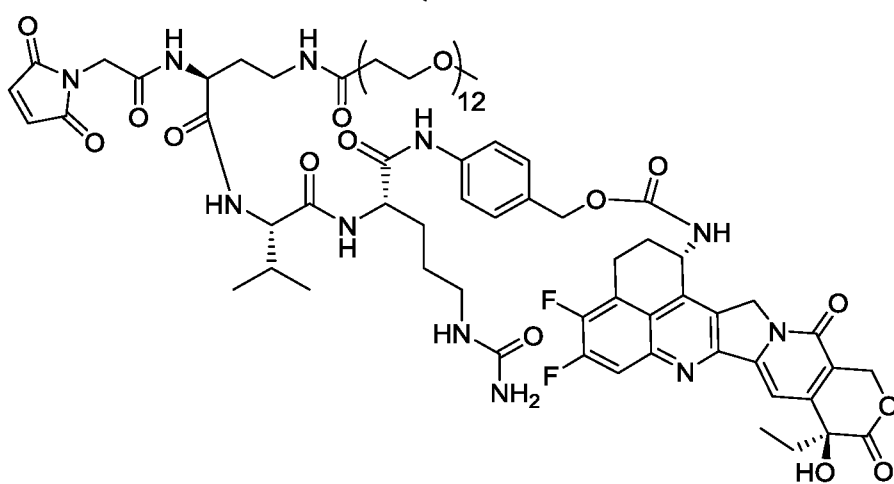
式 III-14



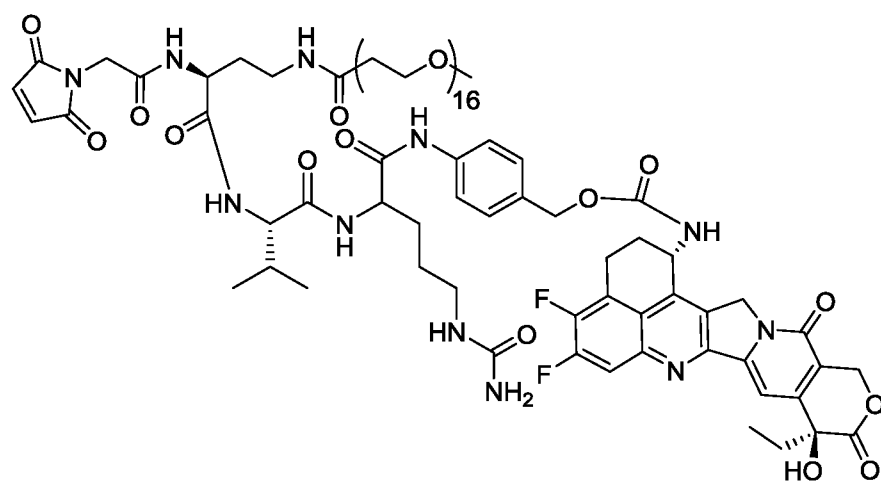
式 III-14-1



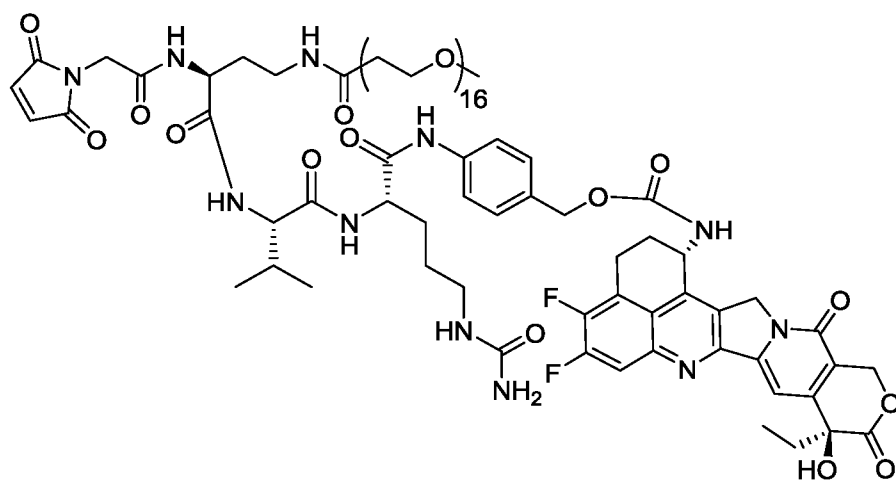
式 III-15



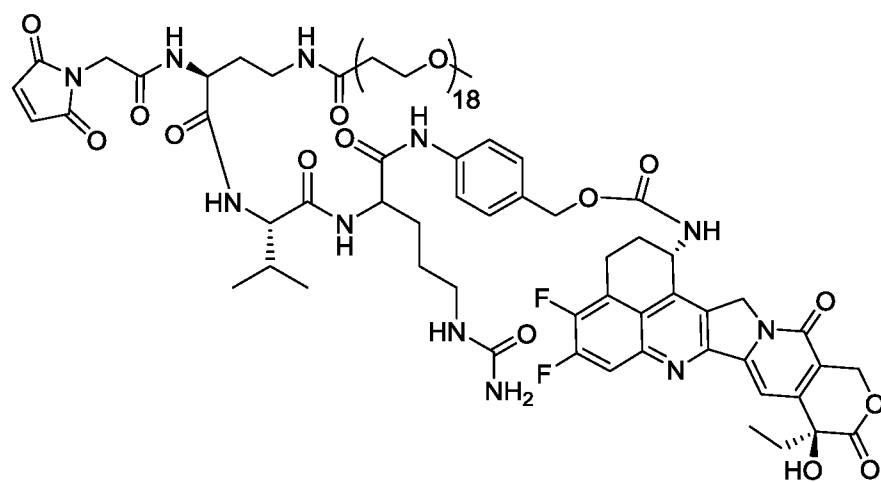
式 III-15-1



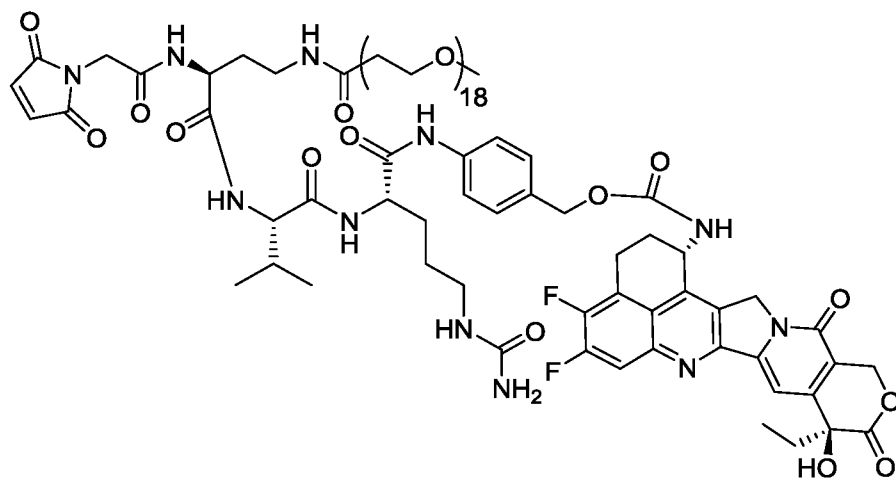
式 III-16



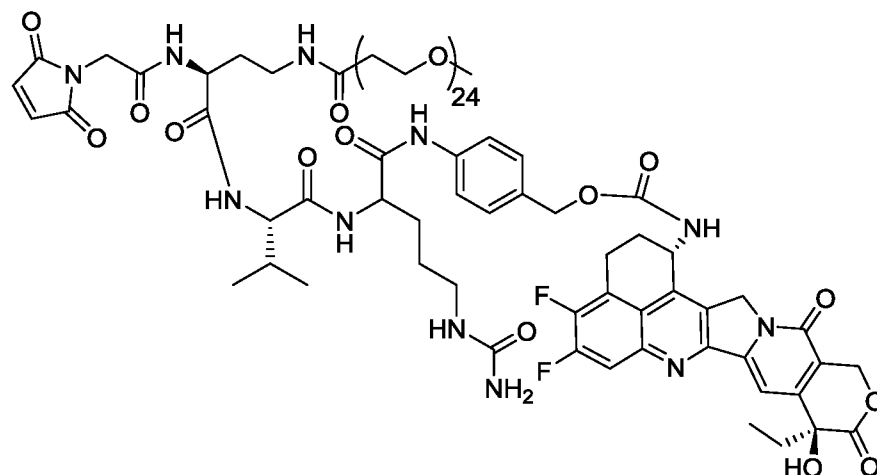
式 III-16-1



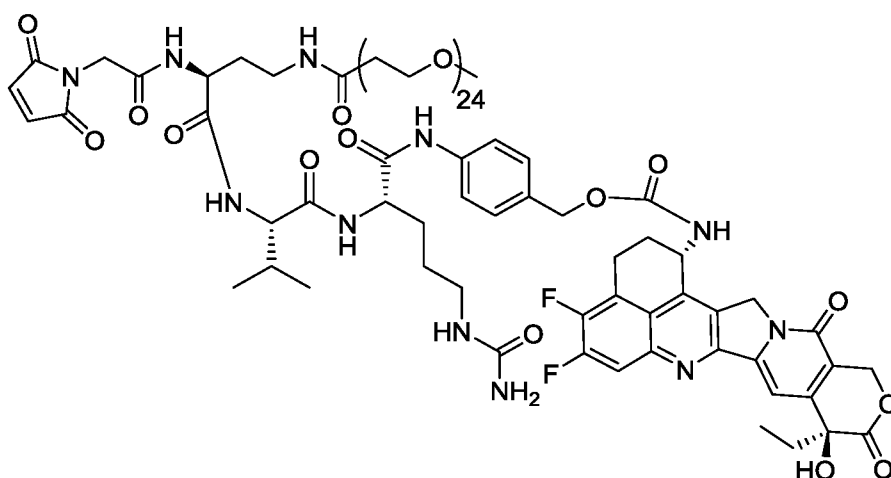
式 III-17



式 III-17-1



式 III-18



式 III-18-1

33. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-10、22-31 任一项所述的药物偶联物以及药物可接受的载体、赋形剂和/或辅料；或者，任选的其他抗癌药物。

34. 权利要求 1-10、22-31 中任一项所述的抗体药物偶联物或者权利要求 33 所述的药物组合物在制备用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的药物中的用途。

35. 权利要求 11-32 中任一项所述的化合物或者其药学上可接受的盐或溶剂合物在制药物偶联物中的用途；或所述药物偶联物为权利要求 1-10、22-31 中任一项所述的抗体药物偶联物。

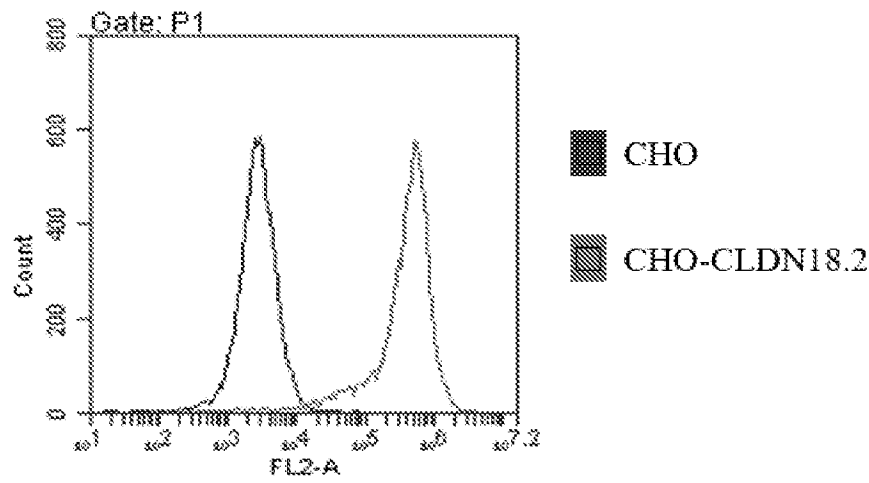
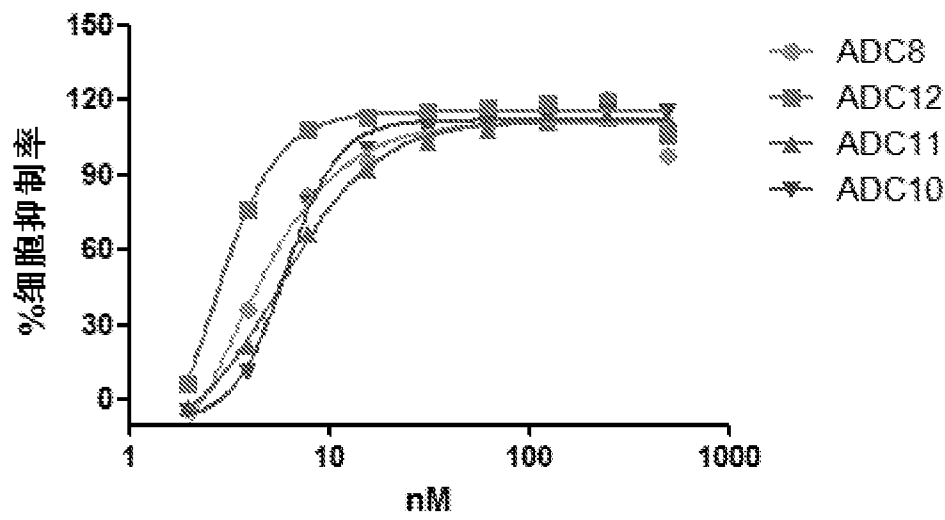


图 1



	ADC8	ADC12	ADC11	ADC10
EC50	3.293	2.534	5.654	6.077

图 2

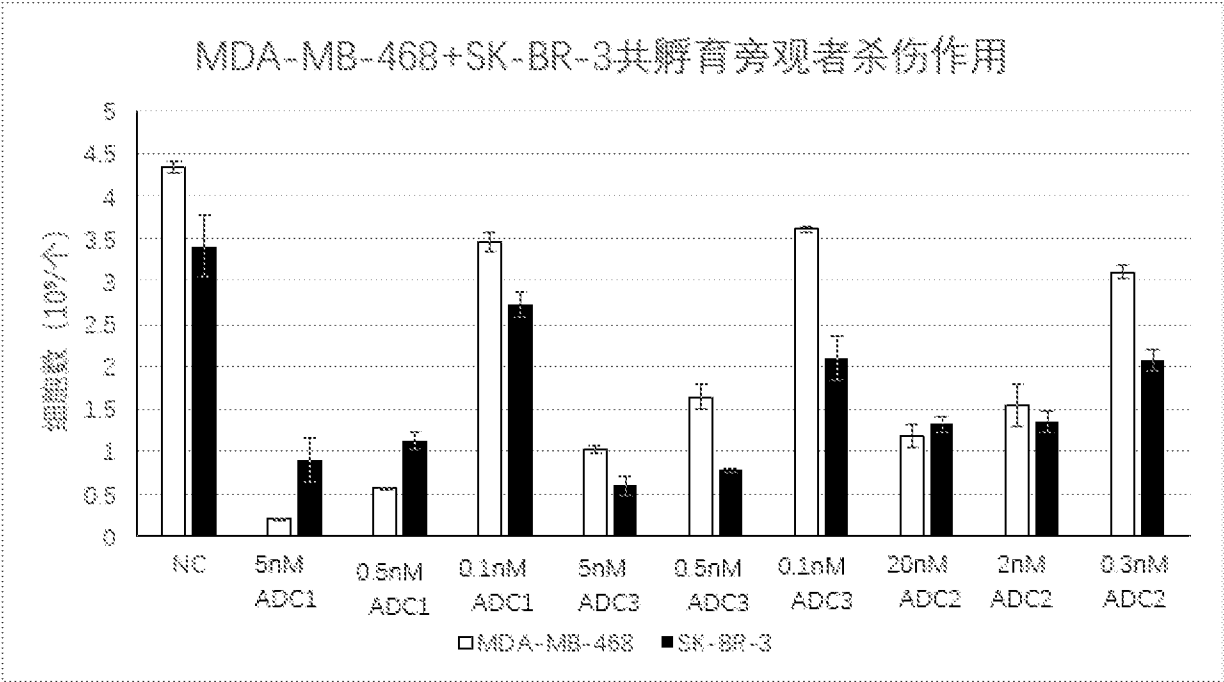


图 3

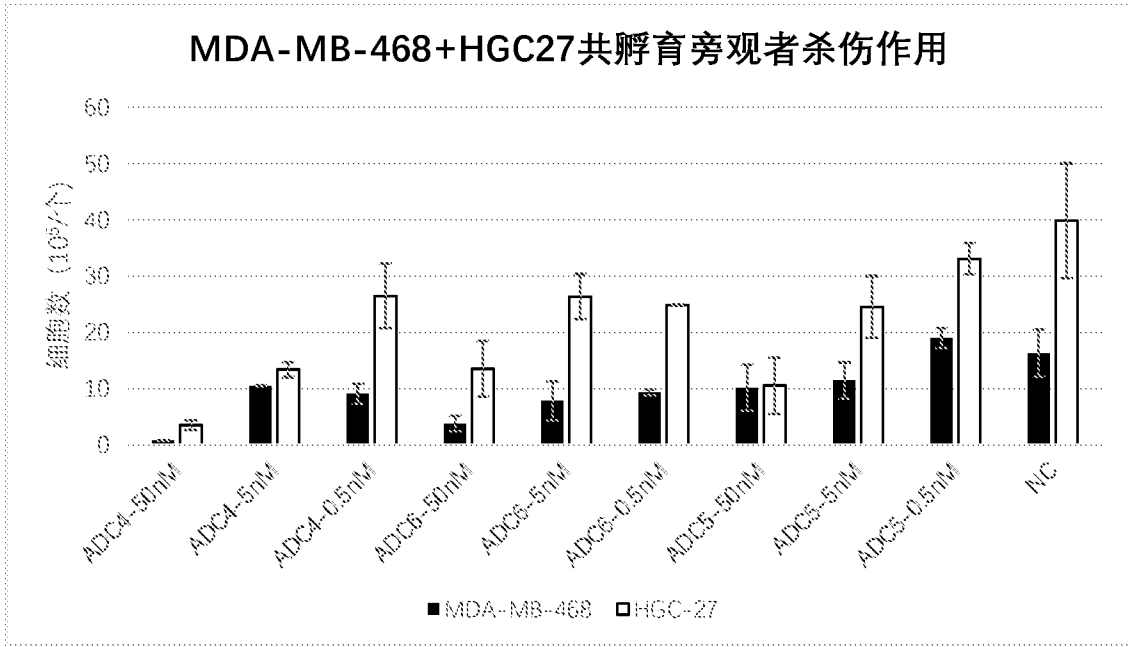


图 4

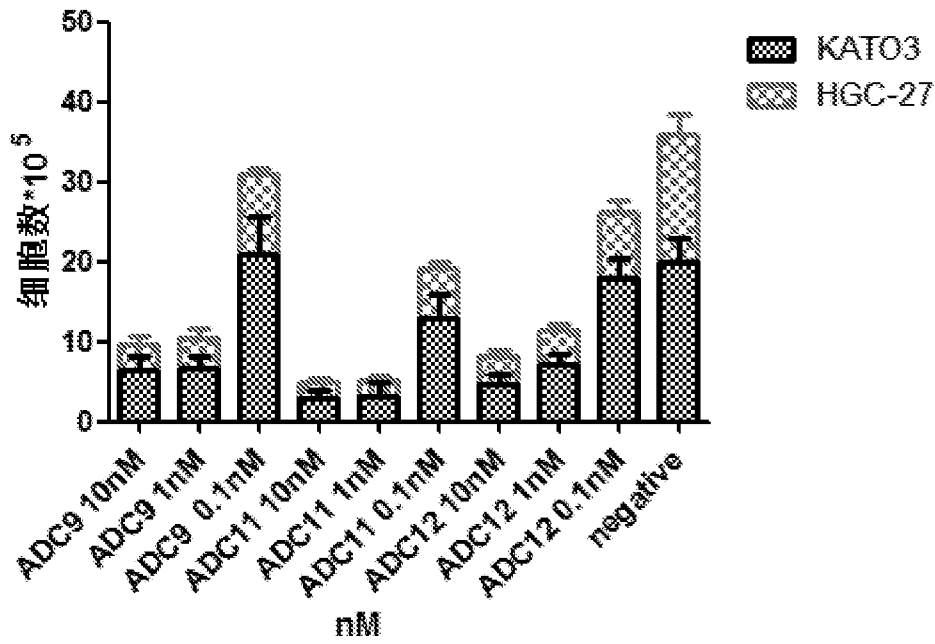


图 5

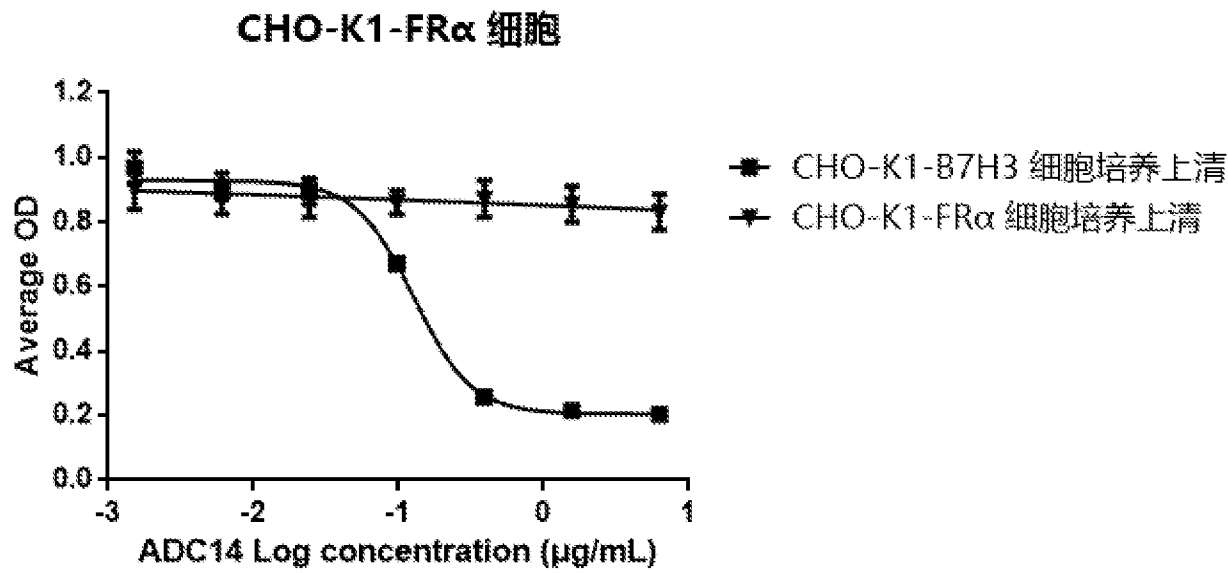


图 6

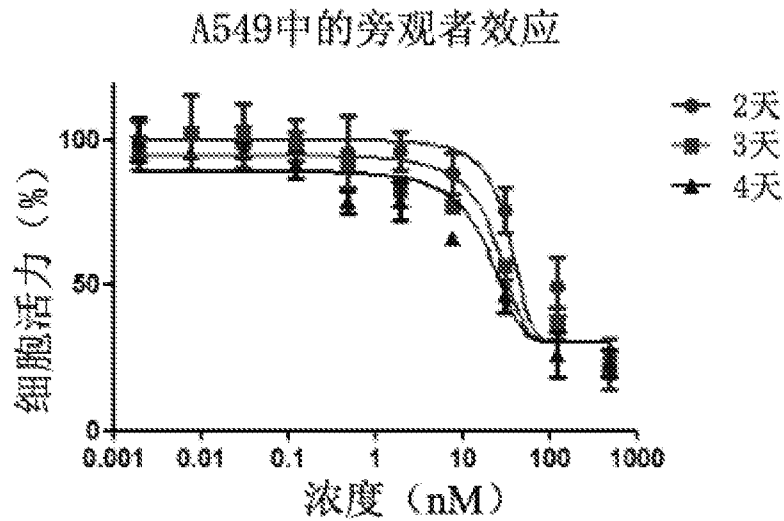


图 7

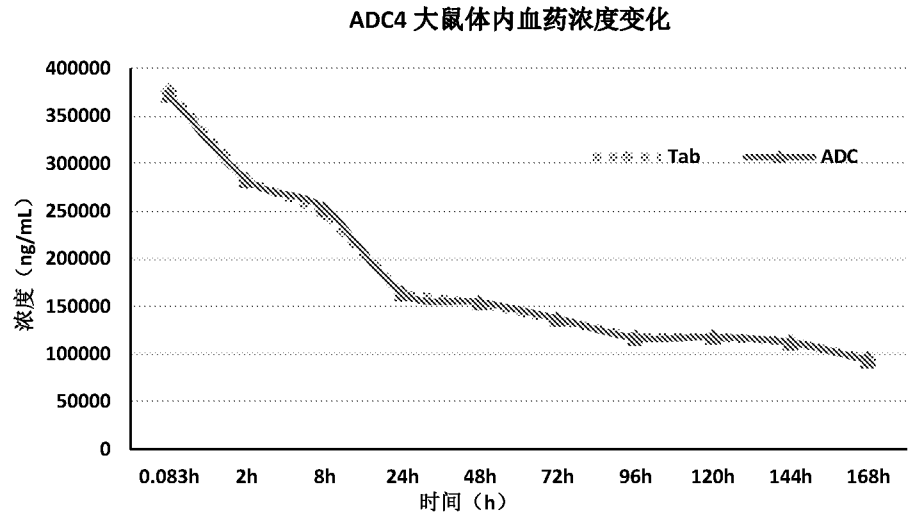


图 8

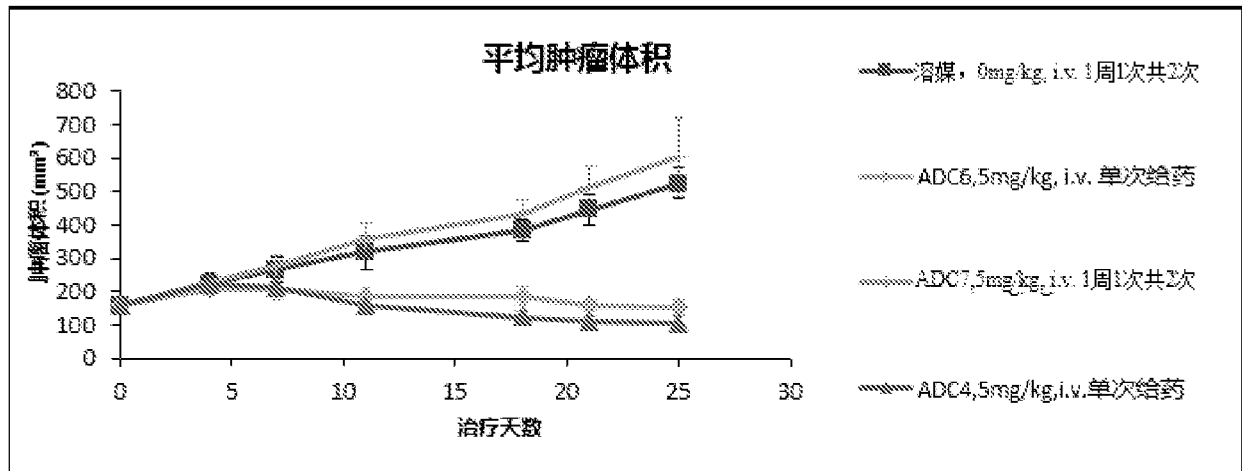


图 9

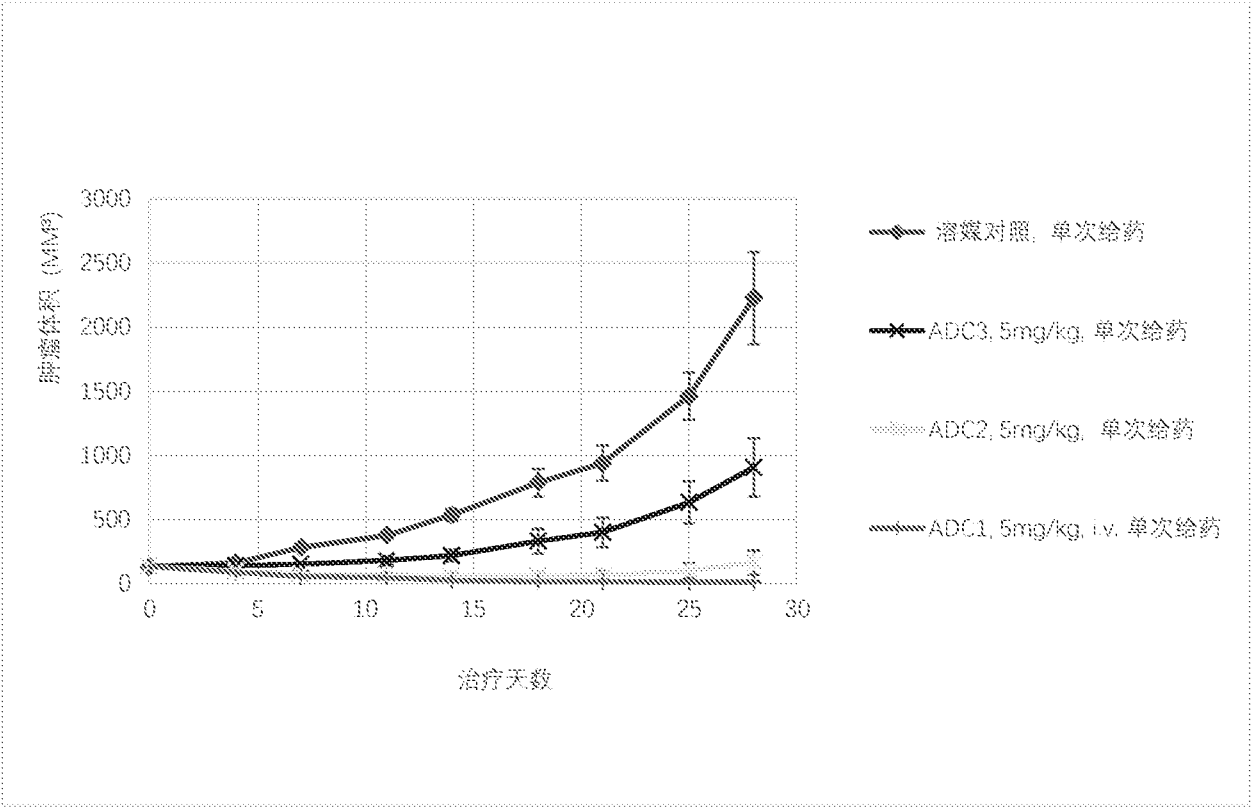


图 10

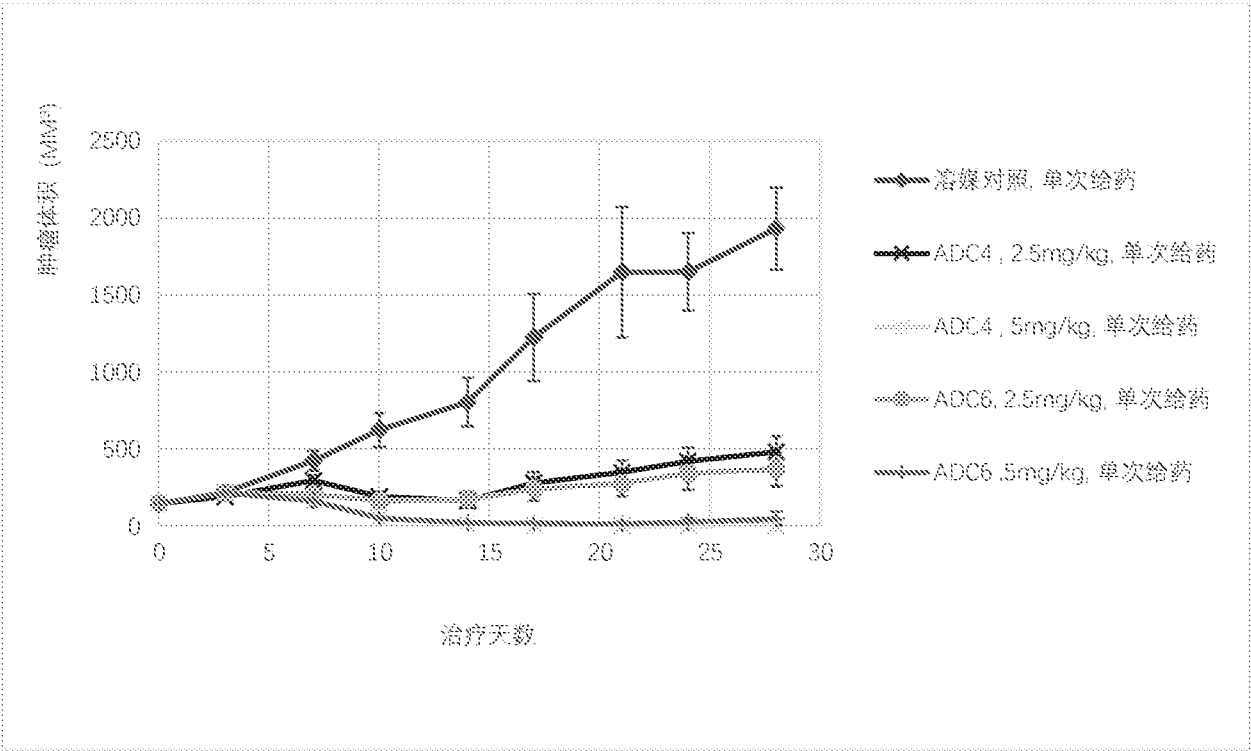


图 11

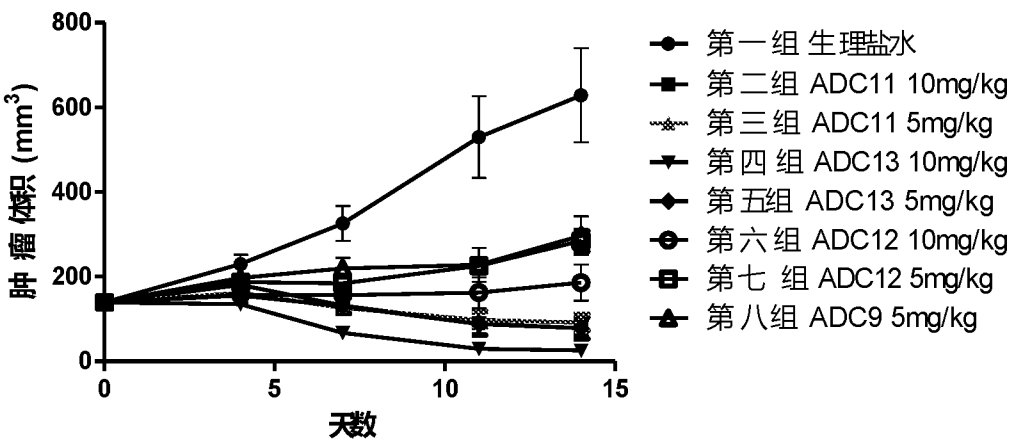


图 12

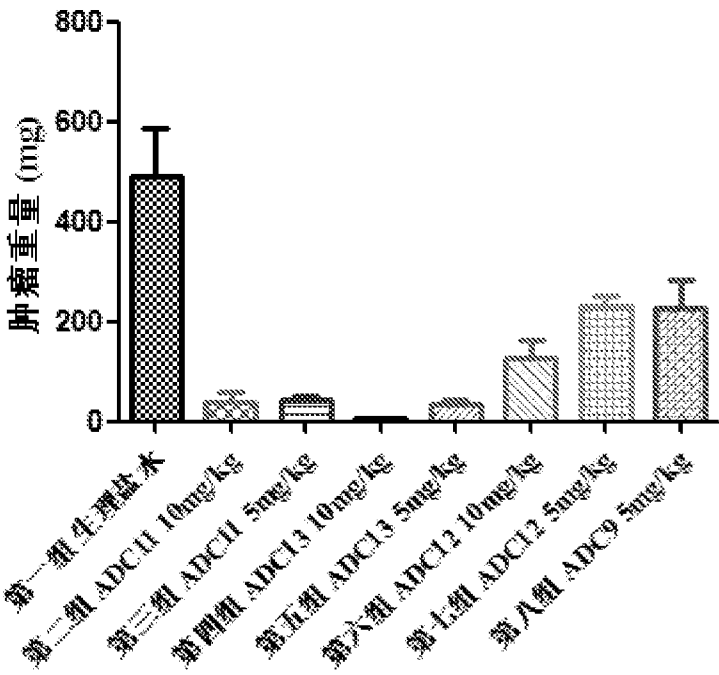


图 13

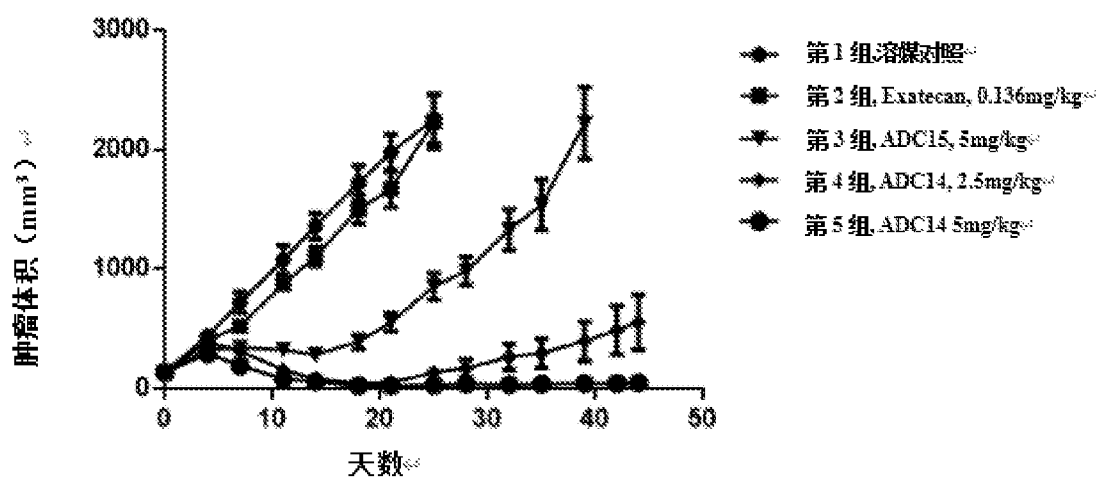


图 14

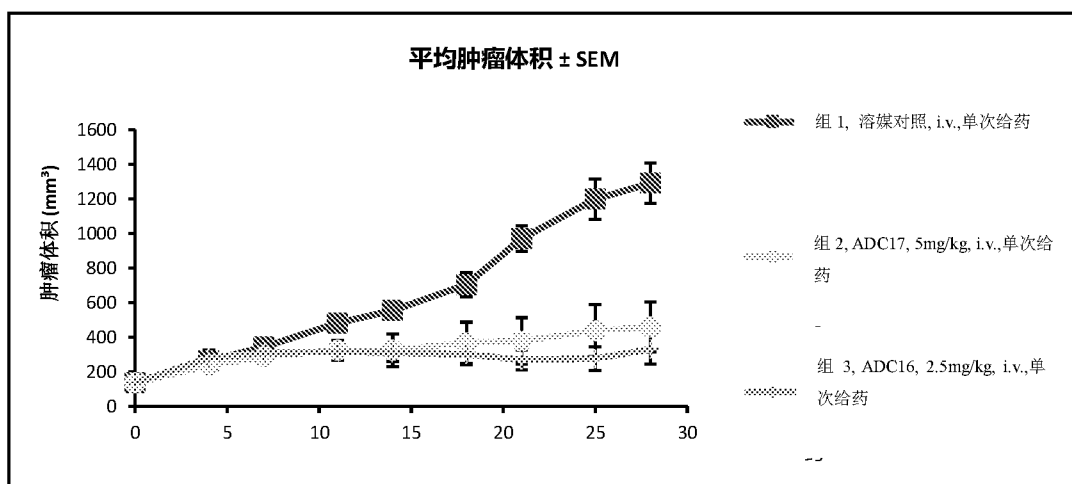


图 15

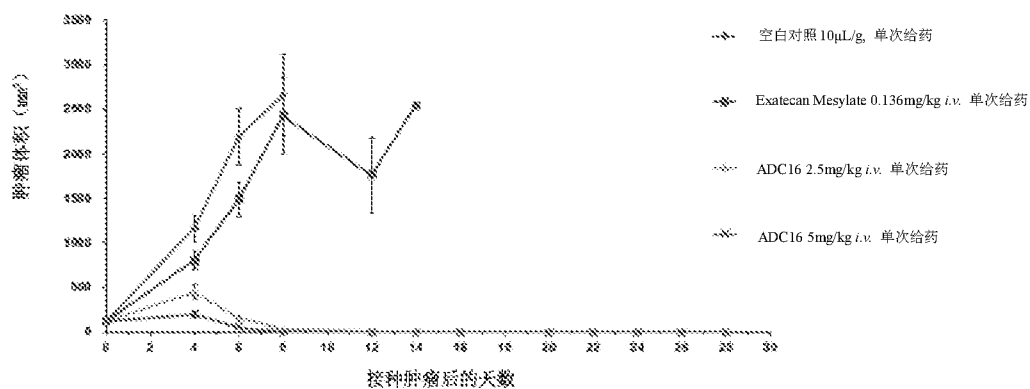


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/096690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 47/65(2017.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61P 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; C07K; 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)

CNTXT; CNABS; DWPI; SIPOABS; STNext caplus/reg; CNKI: 百奥泰; 汤伟佳; 抗体偶联药物; 聚乙二醇; 连接器; 结构检索, structural search; ADC; antibody drug conjugate; PEG; polyethylene glycol; linker

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021093733 A1 (OBI PHARMA, INC.) 01 April 2021 (2021-04-01) description, page 58, and claims 53, 59 and 61	1-35
X	WO 2019243825 A1 (CURADEV PHARMA LTD.) 26 December 2019 (2019-12-26) description, pp. 128 and 133	1-35
A	WO 2020236841 A2 (NOVARTIS AG.) 26 November 2020 (2020-11-26) description, pages 221-222L77-P1, L78-P1, L79-P1 and L80-P1	1-35
A	US 2021085799 A1 (MABPLEX INTERNATIONAL, LTD.) 25 March 2021 (2021-03-25) entire document	1-35
A	CN 108883198 A (EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.) 23 November 2018 (2018-11-23) entire document	1-35

☐ 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

16 August 2022

Date of mailing of the international search report

30 August 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/096690

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/096690

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2021093733	A1	01 April 2021	None			
WO	2019243825	A1	26 December 2019	TW	202016081	A	01 May 2020
WO	2020236841	A2	26 November 2020	IL	287596	A	01 December 2021
				KR	20220010527	A	25 January 2022
				AU	2020279731	A1	06 January 2022
				CA	3140063	A1	26 November 2020
				CN	113853219	A	28 December 2021
				JP	2022533215	A	21 July 2022
				EP	3972650	A2	30 March 2022
US	2021085799	A1	25 March 2021	AU	2020204250	A1	10 December 2020
				RU	2745738	C1	31 March 2021
				WO	2020233174	A1	26 November 2020
				JP	2022512519	A	07 February 2022
				EP	3760233	A1	06 January 2021
				KR	20200135284	A	02 December 2020
CN	108883198	A	23 November 2018	UA	125024	C2	29 December 2021
				CA	3013791	A1	08 September 2017
				JP	2020019787	A	06 February 2020
				US	2017252458	A1	07 September 2017
				EP	3824909	A1	26 May 2021
				US	2020297860	A1	24 September 2020
				SG	10202007520 W	A	29 September 2020
				LT	3423105	T	10 September 2021
				AR	121302	A2	04 May 2022
				IL	261428	A	31 October 2018
				SG	11201806515 R	A	27 September 2018
				CO	2018008667	A2	31 August 2018
				RS	62108	B1	31 August 2021
				BR	112018067379	A2	15 January 2019
				KR	20180115330	A	22 October 2018
				HU	E054726	T2	28 September 2021
				CN	114191428	A	18 March 2022
				CN	114191563	A	18 March 2022
				CL	2021000048	A1	28 May 2021
				TW	201800110	A	01 January 2018
				JP	2020128413	A	27 August 2020
				JP	2019516664	A	20 June 2019
				HR	P20211125	T1	15 October 2021
				PL	3423105	T3	25 October 2021
				MD	3423105	T2	31 October 2021
				ES	2880402	T3	24 November 2021
				EP	3423105	A1	09 January 2019
				WO	2017151979	A1	08 September 2017
				US	2018193478	A1	12 July 2018
				AR	107787	A1	06 June 2018
				PE	20181953	A1	17 December 2018
				AU	2017225982	A1	16 August 2018
				PH	12018501847	A1	15 May 2019
				SI	3423105	T1	31 December 2021
				AR	121301	A2	04 May 2022

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/096690

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		MX 2018010562 A	20 February 2019
		DK 3423105 T3	26 July 2021
		CL 2018002456 A1	21 December 2018
		RU 2018134331 A	02 April 2020
		PT 3423105 T	19 July 2021
		RU 2021125492 A	05 April 2022
		MA 45280 A	09 January 2019
		JP 2021185176 A	09 December 2021
		CL 2021000049 A1	28 May 2021
		CN 114272389 A	05 April 2022

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/096690

A. 主题的分类

A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 47/65(2017.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61P 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; C07K; 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))

CNXTX; CNABS; DWPI; SIPOABS; STNext caplus/reg; CNKI:百奥泰; 汤伟佳; 抗体偶联药物; 聚乙二醇; 连接子; 结构检索; ADC; antibody drug conjugate; PEG; polyethylene glycol; linker

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	US 2021093733 A1 (OBI PHARMA, INC.) 2021年4月1日 (2021 - 04 - 01) 说明书第58页, 权利要求53, 59, 61	1-35
X	WO 2019243825 A1 (CURADEV PHARMA LIMITED) 2019年12月26日 (2019 - 12 - 26) 说明书第128, 133页	1-35
A	WO 2020236841 A2 (NOVARTIS AG) 2020年11月26日 (2020 - 11 - 26) 说明书第221-222页L77-P1, L78-P1, L79-P1, L80-P1	1-35
A	US 2021085799 A1 (MABPLEX INTERNATIONAL, LTD.) 2021年3月25日 (2021 - 03 - 25) 全文	1-35
A	CN 108883198 A (卫材研究发展管理有限公司) 2018年11月23日 (2018 - 11 - 23) 全文	1-35

☐ 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

2022年8月16日

国际检索报告邮寄日期

2022年8月30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

吴铁生

电话号码 (86) 10-53961870

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

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

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/096690

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)
US	2021093733	A1	2021年4月1日	无			
WO	2019243825	A1	2019年12月26日	TW	202016081	A	2020年5月1日
WO	2020236841	A2	2020年11月26日	IL	287596	A	2021年12月1日
				KR	20220010527	A	2022年1月25日
				AU	2020279731	A1	2022年1月6日
				CA	3140063	A1	2020年11月26日
				CN	113853219	A	2021年12月28日
				JP	2022533215	A	2022年7月21日
				EP	3972650	A2	2022年3月30日
US	2021085799	A1	2021年3月25日	AU	2020204250	A1	2020年12月10日
				RU	2745738	C1	2021年3月31日
				WO	2020233174	A1	2020年11月26日
				JP	2022512519	A	2022年2月7日
				EP	3760233	A1	2021年1月6日
				KR	20200135284	A	2020年12月2日
CN	108883198	A	2018年11月23日	UA	125024	C2	2021年12月29日
				CA	3013791	A1	2017年9月8日
				JP	2020019787	A	2020年2月6日
				US	2017252458	A1	2017年9月7日
				EP	3824909	A1	2021年5月26日
				US	2020297860	A1	2020年9月24日
				SG	10202007520W	A	2020年9月29日
				LT	3423105	T	2021年9月10日
				AR	121302	A2	2022年5月4日
				IL	261428	A	2018年10月31日
				SG	11201806515R	A	2018年9月27日
				CO	2018008667	A2	2018年8月31日
				RS	62108	B1	2021年8月31日
				BR	112018067379	A2	2019年1月15日
				KR	20180115330	A	2018年10月22日
				HU	E054726	T2	2021年9月28日
				CN	114191428	A	2022年3月18日
				CN	114191563	A	2022年3月18日
				CL	2021000048	A1	2021年5月28日
				TW	201800110	A	2018年1月1日
				JP	2020128413	A	2020年8月27日
				JP	2019516664	A	2019年6月20日
				HR	P20211125	T1	2021年10月15日
				PL	3423105	T3	2021年10月25日
				MD	3423105	T2	2021年10月31日
				ES	2880402	T3	2021年11月24日
				EP	3423105	A1	2019年1月9日
				WO	2017151979	A1	2017年9月8日
				US	2018193478	A1	2018年7月12日
				AR	107787	A1	2018年6月6日
				PE	20181953	A1	2018年12月17日
				AU	2017225982	A1	2018年8月16日
				PH	12018501847	A1	2019年5月15日
				SI	3423105	T1	2021年12月31日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/096690

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)
		AR 121301 A2	2022年5月4日
		MX 2018010562 A	2019年2月20日
		DK 3423105 T3	2021年7月26日
		CL 2018002456 A1	2018年12月21日
		RU 2018134331 A	2020年4月2日
		PT 3423105 T	2021年7月19日
		RU 2021125492 A	2022年4月5日
		MA 45280 A	2019年1月9日
		JP 2021185176 A	2021年12月9日
		CL 2021000049 A1	2021年5月28日
		CN 114272389 A	2022年4月5日