



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116836235 A

(43) 申请公布日 2023.10.03

(21) 申请号 202210307276.9

A61K 47/68 (2017.01)

(22) 申请日 2022.03.25

(71) 申请人 中国科学院上海药物研究所

地址 201203 上海市浦东新区张江祖冲之
路555号

(72) 发明人 黄蔚 唐峰 曾悦

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

专利代理师 徐迅 马莉华

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

权利要求书4页 说明书84页

序列表3页 附图32页

(54) 发明名称

亲和片段导向的可裂解片段,其设计、合成
及在制备定点药物偶联物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了亲和片段导的可裂解片段,其
设计、合成及在制备定点药物偶联物中的
应用。具体地,本发明提供了一种带有配体亲和导向基
团的偶联物,所述偶联物如式I所示:AT-CL-R
(I);其中,AT为针对目标蛋白(TP)的亲和性部
分;CL为可裂解片段,其具有自裂解反应性;R为
需要被修饰到所述目标蛋白的基团。

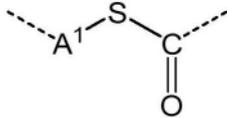
1. 一种带有配体亲和导向基团的偶联物,其特征在于,所述偶联物如式I所示:



其中,

AT为针对目标蛋白(TP)的亲合性部分;

CL为可裂解片段;并且所述CL中存在如下所示的二价片段



其中, A^1 各自独立地为任选取代的 C_{1-10} 亚烷基、任选取代的 C_{6-10} 芳基、任选取代的5至10元杂芳基:

R为需要被修饰到所述目标蛋白的基团;

除非特别说明,所述的取代是指基团中一个或多个H被选自下组的取代基取代:卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基。

2. 如权利要求1所述的偶联物,其特征在于,所述的目标蛋白为具有Fc结构域的抗体或融合蛋白;和/或AT为具有和抗体Fc具有结合能力的多肽。

3. 如权利要求1所述的偶联物,其特征在于,AT为衍生自包含如式II所示序列的Fc结合多肽的核心序列:



其中,X所在位置为多肽的N端,Y所在位置为多肽的C端;

$s1=0、1、2$ 或3;

$s2=0、1、2$ 或3;

X和Y各自独立地为氨基酸残基;

$t1$ 和 $t2$ 各自独立为0-10的整数;

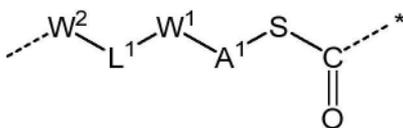
Cys为半胱氨酸残基;

Aa1、Aa2、Aa3、Aa5、Aa7、Aa8和Aa9各自独立地为氨基酸残基;

Aa4和Aa6各自独立地为氨基酸残基并且Aa4和Aa6中的至少一个为侧链含 NH_2 基团的氨基酸残基或侧链含 $-\text{COOH}$ 基团的氨基酸残基;

和/或

CL如下所示



其中,

*代表与R连接的位置

W^1 选自下组:无(单键)、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 和 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$;

W^2 为无(单键)、 $-\text{NH}-$ 、或 $-\text{C}(\text{O})-$;

L^1 为无(单键)或二价连接基团;

A^1 如权利要求1中定义;

和/或

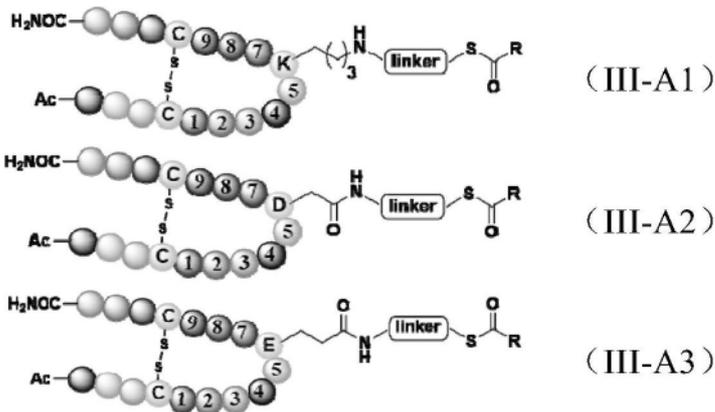
R为包含一个或多个选自下组的活性基团的部分：可被进一步修饰的活性基团、具有生物活性和/或可检测的活性基团。

4. 如权利要求3所述的偶联物，其特征在于，

所述可被进一步修饰的活性基团是指可进行生物正交反应的活性基团；较佳地，所述可进行生物正交反应的活性基团选自：叠氮基、醛基、硫醇基、炔基、烯基、卤素、四嗪基、硝酮基、羟胺基、腈基、肼基、酮基、硼酸基、氰基苯并噻唑基、烯丙基基、膦基、马来酰亚胺基、二硫基、硫酸基、 α -卤代羰基基、异腈基、斯德酮基、硒基、共轭二烯基、磷酸基、环炔基及环烯基，或其组合；和/或

所述具有生物活性和/或可检测的活性基团选自：美登素、DM-1、DM-4、MMAE、MMAF、SN-38、Dxd、PBD及其类似物、鹅膏蕈碱、长春新碱、长春碱、长春瑞滨、VP-16、喜树碱、紫杉醇、多烯紫杉醇、埃博霉素A、埃博霉素B、诺考达唑、秋水仙碱、雌莫司汀、西马多丁、艾榴塞洛素、，荧光试剂、单糖、二糖、寡糖、多聚乙二醇(PEG)、免疫激动剂、细胞毒、放射性治疗物、分子影像试剂，或其组合。

5. 如权利要求1所述的偶联物，其特征在于，所述的偶联物如式III-A1、III-A2或III-A3所示，



其中，

标注有1、2、3、4、5、7、8和9的圆圈分别如权利要求3中式II中Aa1、Aa2、Aa3、Aa4、Aa5、Aa7、Aa8、和Aa9的定义；

靠近标注有1的圆圈的末端为多肽N端，靠近标注有9的圆圈的末端为多肽C端；

Ac为N端保护基或不存在；

各个空白圆圈如式II中的X和Y定义；

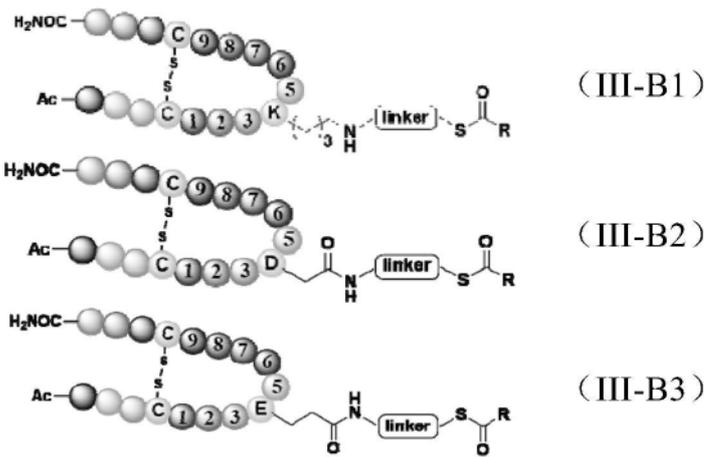
$-\text{linker}-$ 为 $-\text{W}^2-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ ；

圆圈C为半胱氨酸残基，-S-S-代表由半胱氨酸残基的侧链-SH形成的二硫键；

圆圈K为赖氨酸残基的主链部分；圆圈D为天冬氨酸残基(D)的主链部分、圆圈E为谷氨酸残基(E)的主链部分；

R如权利要求1或3中定义。

6. 如权利要求1所述的偶联物，其特征在于，所述的偶联物如式III-B1、III-B2或III-B3所示，



其中，

标注有1、2、3、5、6、7、8和9的圆圈分别如权利要求3中式II中Aa1、Aa2、Aa3、Aa5、Aa6、Aa7、Aa8和Aa9的定义；

靠近标注有1的圆圈的末端为多肽N端，靠近标注有9的圆圈的末端为多肽C端；

Ac为N端保护基或不存在；

各个空白圆圈如式II中的X和Y定义；

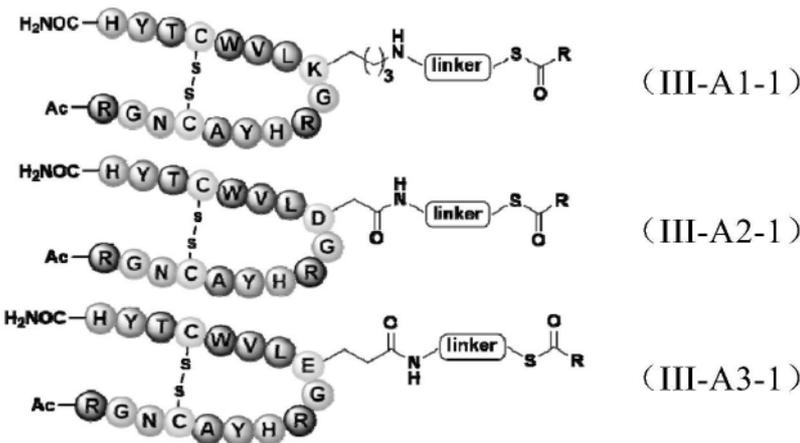
—linker—为 $-W^2-L^1-W^1-A^1-$ ；

圆圈C为半胱氨酸残基，-S-S-代表由半胱氨酸残基的侧链-SH形成的二硫键；

圆圈K为赖氨酸残基的主链部分；圆圈D为天冬氨酸残基(D)的主链部分、圆圈E为谷氨酸残基(E)的主链部分；

R如权利要求1或3中定义。

7. 如权利要求1所述的偶联物，其特征在于，所述偶联物如式III-A1-1、III-A2-1或III-A3-1所示，



其中，

圆圈R为多肽N端，圆圈H为多肽C端；

Ac为N端保护基或不存在；

—linker—为 $-W^2-L^1-W^1-A^1-$ ；

圆圈R为精氨酸残基、圆圈G为甘氨酸残基、圆圈N为天冬酰胺残基、圆圈A为丙氨酸残基、圆圈Y为酪氨酸残基、圆圈H为组氨酸残基、圆圈L为亮氨酸残基、圆圈V为缬氨酸残基、圆

圈W为色氨酸残基、圆圈T为苏氨酸残基；

圆圈C为半胱氨酸残基，-S-S-代表由半胱氨酸残基的侧链-SH形成的二硫键；

圆圈K为赖氨酸残基的主链部分；圆圈D为天冬氨酸残基的主链部分、圆圈E为谷氨酸残基的主链部分；

R如权利要求1或3中定义。

8. 如权利要求1-7任一所述的偶联物，其特征在于，所述的偶联物选自表A1和表A2。

9. 一种对蛋白进行修饰的方法，其特征在于，包括步骤：

(1) 提供如权利要求1-8任一所述的偶联物；

(2) 使需要修饰的目标蛋白与所述的偶联物接触，并使得所述偶联物与蛋白上侧链氨基和/或末端的氨基进行反应，从而得到经修饰的目标蛋白。

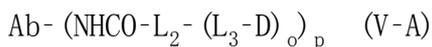
10. 如权利要求9所述的方法，其特征在于，所述的修饰通过一步反应即可得到经修饰的目标蛋白。

11. 一种如式IV所示的经位点选择性修饰的蛋白，其特征在于，



其中，TP为目标蛋白部分、R如权利要求1或3中定义，下标p为1-8的整数。

12. 一种抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体药物偶联物如式V-A所示：



其中，Ab为抗体，下标o为1-10的整数，下标p为1-8的整数，L₂和L₃各自独立地为无或连接片段，D各自独立地为相同或不同的具有生物活性和/或可检测的活性基团。

13. 如权利要求12所述的抗体药物偶联物，其特征在于，基团D定点偶联在抗体恒定区(Fc区域)；较佳地，基团D定点偶联在人IgG Fc区域中的由246-248位氨基酸残基构成的区域。

14. 如权利要求12所述的蛋白，其特征在于，所述抗体药物偶联物选自下组：ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5、ADC-6、ADC-7、ADC-8、ADC-9、ADC-10、ADC-11、ADC-12、ADC13、ADC-14、ADC-15、ADC-16、ADC-17、ADC-18、ADC-19、ADC-20和ADC-21；较佳地，所述抗体药物偶联物选自下组：ADC-5、ADC-6、ADC-7、ADC-8、ADC-9、ADC-10、ADC-11、ADC-12、ADC13、ADC-14、ADC-15、ADC-16、ADC-17、ADC-18、ADC-19、ADC-20和ADC-21。

15. 一种如权利要求1所述的偶联物的用途，其特征在于，用于位点选择性修饰蛋白。

16. 一种如权利要求1所述的偶联物的用途，其特征在于，用于制备抗体药物偶联物(ADC)，较佳地，所述用途不依赖于生物正交反应，所述偶联物可经一步反应直接将需要被修饰到目标蛋白的药物分子，以位点选择性方式修饰至所述抗体上。

亲和片段导向的可裂解片段,其设计、合成及在制备定点药物偶联物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物化学领域,具体涉及一类亲和片段导向的可裂解片段,其设计、合成及在制备定点药物偶联物中的应用。

背景技术

[0002] 抗体-药物偶联物是通过化学链接将具有生物活性的细胞毒药物分子连接到抗体上,通过抗体的靶向作用将细胞毒小分子运输到目标细胞发挥作用的一类靶向药物。由于随机偶联小分子药物不利于药代动力学药效学的研究,且临床评价难以得到均一数据,生产过程中不同批次质量也难以一致,因此发展了许多定点定量引入小分子药物的偶联策略,呈现出很好的应用前景。

[0003] 抗体-药物偶联物中的抗体主要是IgG类抗体,拥有可变的Fab区和恒定可结晶的Fc结构域。在Fc结构域定点连接小分子药物不影响抗体-抗原的识别,同时表现出更好的药效和稳定性。因此,在Fc结构域定点偶联小分子药物是重要的研究方向。目前,针对抗体Fc结构域对抗体进行选择修饰的技术方法有很多,其中基于Fc配体导向实现特定氨基酸选择性修饰的研究为定点ADC药物研究提供了很好的方法。然而,基于Fc配体导向的定点修饰方法,或不能脱除Fc配体,或脱除过程复杂,不利于抗体的稳定性和安全性。因此,发展一种高效的Fc配体导向的复合物,直接实现天然抗体的定点定量修饰,具有重要的研究意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的就是提供一种亲和片段导向的可裂解片段,其设计、合成及在制备定点药物偶联物中的应用。具体地,本发明提供了一类硫酯结构,利用该硫酯结构,制备得到基于硫酯的酰基转移试剂,该试剂在亲和片段导向下,可以实现抗体的定点定量的修饰,本发明涉及该片段的设计、合成以及它们的用途。

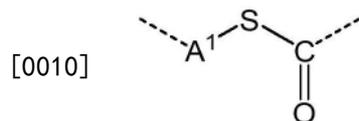
[0005] 在本发明的第一方面,提供了一种带有配体亲和导向基团的偶联物,其特征在于,所述偶联物如式I所示:

[0006] AT-CL-R (I)

[0007] 其中,

[0008] AT为针对目标蛋白(TP)的亲性和部分;

[0009] CL为可裂解片段;并且所述CL中存在如下所示的二价片段



[0011] 其中, A¹各自独立地为任选取代的C₁₋₁₀亚烷基(较佳地, C₁₋₃亚烷基)、任选取代的C₆₋₁₀芳基、任选取代的5至10元杂芳基;

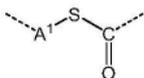
[0012] R为需要被修饰到所述目标蛋白的基团(该基团可以是任意所需基团或含功能性

物质的基团,在R基团中可以包含单一的所需基团,也可以包含2种以上的相同或不同所需基团或功能性物质的);

[0013] 除非特别说明,所述的取代是指基团中一个或多个H被选自下组的取代基取代:卤素(如F、Cl、Br、I)、C₁₋₆烷基(较佳地,C₁₋₄烷基,如甲基、乙基)、C₁₋₆卤代烷基(较佳地,C₁₋₄卤代烷基)。

[0014] 在另一优选例中,所述可裂解片段具有自裂解反应性(例如在特定反应条件下/与特定反应物或反应基团接触时可裂解)。

[0015] 在另一优选例中,所述的亲和性部分衍生自可与目标蛋白形成可逆共价键的小分子化合物,或者衍生自对目标蛋白具有亲和力的蛋白或多肽结构。

[0016] 在另一优选例中,  中,A¹为靠近AT的一端,CO为靠近R的一端。

[0017] 在另一优选例中,所述偶联物为用于目标蛋白(如抗体或Fc融合蛋白)定点修饰的酰基转移试剂。

[0018] 在另一优选例中,所述针对蛋白的亲和性部分是指针对目标蛋白的具有亲和性的或能够可逆结合(能够可逆共价结合)的部分。

[0019] 在另一优选例中,所述的目标蛋白是抗体或融合蛋白。在另一优选例中,所述抗体为含Fc结构域的抗体或者融合蛋白。

[0020] 在另一优选例中,所述目标蛋白是抗体,且所述抗体为含Fc结构域的抗体;此时对应的AT为可以与抗体可逆共价结合的小分子化合物,或具有亲和力的蛋白或多肽结构。

[0021] 在另一优选例中,所述抗体包括:单克隆抗体、双功能抗体、单克隆抗体、含有Fc片段的纳米抗体、Fc融合蛋白,或其组合。

[0022] 在另一优选例中,所选抗体包括:曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、西妥昔单抗、莫罗单抗、吉妥珠单抗、阿昔单抗、达利珠单抗、阿达木单抗、帕利珠单抗、巴利昔单抗、贝伐珠单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗、德尼单抗、迪西妥单抗、雷莫尼单抗、耐昔妥珠单抗、易普利姆玛、达雷木单抗、本妥昔单抗、阿仑单抗、埃罗妥珠单抗、博纳吐单抗、纳武单抗、派姆单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、特瑞普利单抗、卡妥索单抗、贝林妥欧单抗、艾美赛珠单抗、埃万妥单抗(Rybrevant),或其组合。

[0023] 在另一优选例中,所述抗体包括:曲妥珠单抗(Trastuzumab)、利妥昔单抗(Rituximab)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、贝伐单抗(Bevacizumab)、特瑞普利单抗(Toripalimab),纳武单抗(Nivolumab,IgG4),帕尼单抗(Panituzumab,IgG2)或其组合。

[0024] 在另一优选例中,AT为衍生自可与目标蛋白可逆结合的小分子化合物(较佳地,形成可逆共价结合的小分子化合物)的部分,或者衍生自对目标蛋白具有亲和力的蛋白或多肽的部分。

[0025] 在另一优选例中,AT为衍生自可与抗体可逆结合的小分子化合物(较佳地,形成可逆共价结合的小分子化合物)的部分,或者衍生自对抗体具有亲和力的蛋白或多肽(较佳地,衍生自Fc结合肽;更佳地,衍生自来源于ProteinA或ProteinG的且与Fc(Fc段)具有结合能力的多肽片段)的部分。

[0026] 在另一优选例中,AT衍生自蛋白A(与Fc亲和的ProteinA)中的序列。

[0027] 在另一优选例中,AT衍生自与抗体Fab具有亲和力的结合肽。

- [0028] 在另一优选例中,所述多肽为环肽。
- [0029] 在另一优选例中,AT衍生自选自下组的肽:Fc-III肽(如DCAWHLGELVWCT (SEQ ID No.2))、Fc结合肽(如GPDCAYHRGELVWCTFH (SEQ ID No.3)、RGNCAYHRGQLVWCTYH (SEQ ID No.4)、CDCAWHLGELVWCTC (SEQ ID No.5)等),或其组合。
- [0030] 在另一优选例中,AT为衍生自包含式II所示序列的Fc结合多肽的核心序列:
- [0031] $(X_{s_1})_{t_1}$ -Cys-Aa1-Aa2-Aa3-Aa4-Aa5-Aa6-Aa7-Aa8-Aa9-Cys- $(Y_{s_2})_{t_2}$ (II)
- [0032] 其中,
- [0033] X所在位置为多肽的N端,Y所在位置为多肽的C端;
- [0034] $s_1=0,1,2$ 或3;
- [0035] $s_2=0,1,2$ 或3;
- [0036] X和Y各自独立地为氨基酸残基;
- [0037] t_1 和 t_2 各自独立为0-10的整数(较佳地, t_1 和 t_2 各自独立为0、1、2或3,更佳地,1和 t_2 各自独立为0或1);
- [0038] Cys为半胱氨酸残基;
- [0039] Aa1、Aa2、Aa3、Aa5、Aa7、Aa8和Aa9各自独立地为氨基酸残基;
- [0040] Aa4和Aa6各自独立地为氨基酸残基,并且Aa4和Aa6中的至少一个为侧链含 NH_2 基团的氨基酸残基(如赖氨酸残基(K)等)或侧链含-COOH基团的氨基酸残基(如天冬氨酸残基(D)、谷氨酸残基(E)等)。
- [0041] 在另一优选例中,Aa1、Aa2、Aa3、Aa4、Aa5、Aa6、Aa7、Aa8和Aa9不为半胱氨酸残基。
- [0042] 在另一优选例中,所述的衍生是指Aa4或Aa6中侧链- NH_2 脱去一个H形成-NH-,或侧链-COOH与氨基形成的-CONH-(即AT通过Aa4或Aa6的侧链与CL连接)。
- [0043] 在另一优选例中,Aa6为侧链含 NH_2 基团的氨基酸残基或侧链含-COOH基团的氨基酸残基。
- [0044] 在另一优选例中,所述的衍生是指Aa6中侧链- NH_2 脱去一个H形成-NH-,或侧链-COOH与氨基形成的-CONH-(即AT通过Aa6的侧链与CL连接)。
- [0045] 在另一优选例中,所述氨基酸残基为衍生自天然或非天然氨基酸的的氨基酸残基。
- [0046] 在另一优选例中,AT衍生自环肽。
- [0047] 在另一优选例中,AT衍生自式II所示序列中两个Cys之间形成-S-S-键从而形成的环肽。
- [0048] 在另一优选例中, X_{s_1} 和 Y_{s_2} 各自独立地为无或1-3个连续的相同的或不同的氨基酸残基;较佳地, Y_{s_2} 和 Y_{s_2} 各自独立地为1-3个连续的相同的或不同的氨基酸残基(即 $s_1=1,2$ 或3, $s_2=1,2$ 或3)。
- [0049] 在另一优选例中,
- [0050] Aa1为丙氨酸残基(A)、丝氨酸残基(S)、或苏氨酸残基(T);和/或
- [0051] Aa2为酪氨酸残基(Y)、组氨酸残基(H)、或色氨酸残基(W);和/或
- [0052] Aa3为组氨酸残基(H)、苯丙氨酸残基(F)、酪氨酸残基(Y)、色氨酸残基(W)、精氨酸残基(R)或甘氨酸残基(G);和/或
- [0053] Aa5为甘氨酸残基(G)、丝氨酸残基(S)、天冬酰胺残基(N)、谷氨酰胺残基(Q)、天冬

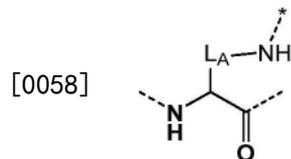
氨酸残基(D)、谷氨酸残基(E)、苯丙氨酸残基(F)、酪氨酸残基(Y)、色氨酸残基(W)、组氨酸残基(H)、苏氨酸残基(T)、亮氨酸残基(L)、丙氨酸残基(A)、缬氨酸残基(V)、异亮氨酸残基(I)、或精氨酸残基(R);和/或

[0054] Aa7为亮氨酸残基(L)、异亮氨酸残基(I)、缬氨酸残基(V)、丙氨酸残基(A)、谷氨酰胺残基(Q)、或谷氨酸残基(E);和/或

[0055] Aa8为缬氨酸(V)、异亮氨酸残基(I)、或亮氨酸残基(L);和/或

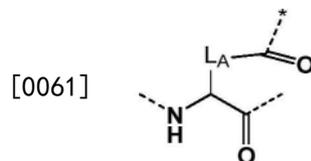
[0056] Aa9为色氨酸残基(W)、或苯丙氨酸残基(F)。

[0057] 在另一优选例中,所述侧链含-NH₂基团的氨基酸残基为如下所示



[0059] 其中,*是指与CL连接的部分;L_A为取代或未取代的C1-8亚烷基;较佳地,为-(CH₂)_{n1}-且n1=1、2、3、4、5或6;较佳地,n1=3、4或5。

[0060] 在另一优选例中,所述侧链含-COOH基团的氨基酸残基为如下所示



[0062] 其中,*是指与-NH-CL连接的部分;L_A为取代或未取代的C1-8亚烷基;较佳地,为-(CH₂)_{n1}-且n1=1、2、3、4、5或6;较佳地,n1=2、3、4或5。

[0063] 在另一优选例中,所述侧链含-NH₂基团的氨基酸残基为赖氨酸残基(K)。

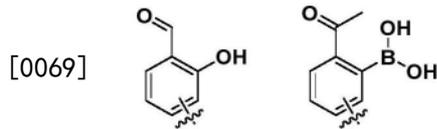
[0064] 在另一优选例中,所述侧链含-COOH基团的氨基酸残基为天冬氨酸残基(D)、谷氨酸残基(E)。

[0065] 在另一优选例中,Aa4为侧链含-NH₂基团的氨基酸残基,且Aa6为谷氨酰胺残基(Q)、谷氨酸残基(E)、组氨酸残基(H)、天冬酰胺残基(N)、脯氨酸残基(P)、天冬氨酸残基(D)、赖氨酸残基(K)、或甘氨酸残基(G);或者,Aa6为侧链含-NH₂基团的氨基酸残基,且Aa4为精氨酸残基(R)、亮氨酸残基(L)、赖氨酸残基(K)、天冬氨酸残基(D)、谷氨酸残基(E)、2-氨基辛二酸或二氨基丙酸。

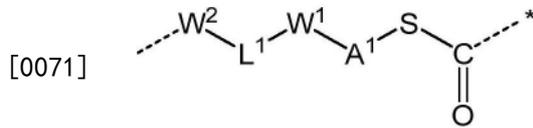
[0066] 在另一优选例中,Aa4为侧链含-COOH基团的氨基酸残基、2-氨基辛二酸或二氨基丙酸,且Aa6为谷氨酰胺残基(Q)、谷氨酸残基(E)、组氨酸残基(H)、天冬酰胺残基(N)、脯氨酸残基(P)、天冬氨酸残基(D)、赖氨酸残基(K)、或甘氨酸残基(G);或者,Aa6为侧链含-COOH基团的氨基酸残基、2-氨基辛二酸或二氨基丙酸,且Aa4为精氨酸残基(R)、亮氨酸残基(L)、赖氨酸残基(K)、天冬氨酸残基(D)、谷氨酸残基(E)、2-氨基辛二酸或二氨基丙酸。

[0067] 在另一优选例中,式II所示序列为HYTCWVLKGRHYACNGR(SEQ ID No.6)、HYTCWVLDGRHYACNGR(SEQ ID NO.7)、或HYTCWVLEGRHYACNGR(SEQ ID No.8)。

[0068] 在另一优选例中,AT为与蛋白具有可逆共价相互作用的小分子片段,较佳地,AT选自下组:



[0070] 在另一优选例中,CL如下所示



[0072] 其中,

[0073] *代表与R连接的位置

[0074] W¹选自下组:无(单键)、-NH-、-C(O)-、-C(O)-NH-和-NH-C(O)-;

[0075] W²为无(单键)、-NH-、或-C(O)-;

[0076] L¹为无(单键)或二价连接基团;

[0077] A¹如前定义。

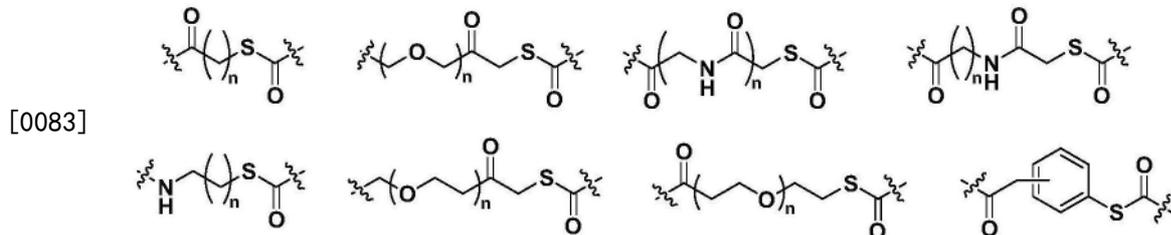
[0078] 在另一优选例中,L¹为无(单键)或由选自下组的一个或多个(较佳地,1-10个;更佳地,1、2、3、4、或5个,最佳地,1、2或3个)单元构成的二价连接基团:氨基酸残基、任选取代的C₁₋₄亚烷基、-(CH₂-NH-CO)-、-(CH₂-CH₂-CO)-、-(CH₂-CH₂-O)-、-(CH₂-O-CH₂)-。

[0079] 在另一优选例中,W²为-NH-或-C(O)-。

[0080] 在另一优选例中,W¹和L¹为无。

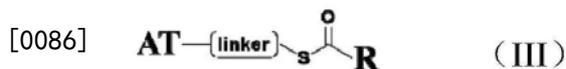
[0081] 在另一优选例中,W¹为-C(O)-和L¹为C₁₋₁₀亚烷基(较佳地,C₁₋₃亚烷基)。

[0082] 在另一优选例中,CL选自组1,并且组1包括如下基团:



[0084] 其中,n为1-10的整数;较佳地,n=1、2、3、4或5。

[0085] 在另一优选例中,所述的偶联物如式III所示,



[0087] 其中,linker为-W²-L¹-W¹-A¹-;W²、L¹、W¹、A¹、AT和R如前定义,

[0088] 在另一优选例中,linker为-CO-L¹-W¹-A¹-。

[0089] 在另一优选例中,R为包含一个或多个选自下组的活性基团的部分:可被进一步修饰的活性基团、具有生物活性和/或可检测的活性基团。

[0090] 在另一优选例中,所述可被进一步修饰的活性基团是指可进行生物正交反应的活性基团(又称为生物正交基团);优选地,所述可进行生物正交反应的活性基团包括:叠氮基(-N₃)、醛基(-CHO)、硫醇基(-SH)、炔基(如C₂-C₆炔基、环张力炔基BCN、DBCO等)、烯基(如C₂-C₆烯基)、卤素(如F、Cl、Br和I)、四嗪基、硝酮基、羟胺基、腈基、肼基、酮基、硼酸残基、氰基苯并噻唑基、烯丙基基、膦基、马来酰亚胺基、二硫基、硫酯基、α-卤代羰基、异腈基、斯德

酮基、硒残基、共轭二烯基、磷酸基、环炔基(如C3-C7环炔基)及环烯基(如C3-C7环烯基)中的一种或多种。

[0091] 在另一优选例中,所述具有生物活性和/或可检测的活性基团为小分子药物、细胞毒、或其他功能性分子中的任意一种或多种。

[0092] 在另一优选例中,所述小分子药物为放射性治疗物、或分子影像试剂。

[0093] 在另一优选例中,所述具有生物活性和/或可检测的活性基团衍生自选自下组的化合物:美登素、DM-1、DM-4、MMAE (Monomethyl auristatin E)、MMAF、SN-38、Dxd、PBD及其类似物、鹅膏蕈碱、长春新碱、长春碱、长春瑞滨、VP-16、喜树碱、紫杉醇、多烯紫杉醇、埃博霉素A、埃博霉素B、诺考达唑、秋水仙碱、雌莫司汀、西马多丁、艾榴塞洛素、荧光试剂、单糖、二糖、寡糖、多聚乙二醇(PEG)、细胞毒、免疫激动剂,或者放射性治疗物、分子影像试剂。

[0094] 在另一优选例中,R为-L₂-(L₃-B)_o,其中,下标o为1-10的整数,L₂和L₃各自独立地为无或连接片段,B各自独立地为相同或不同的可被进一步修饰的活性基团(如生物正交基团)。

[0095] 在另一优选例中,R为-L₂-(L₃-D)_o,其中,下标o为1-10的整数,L₂和L₃各自独立地为无或连接片段,D各自独立地为相同或不同的具有生物活性和/或可检测的活性基团(如小分子化合物)。

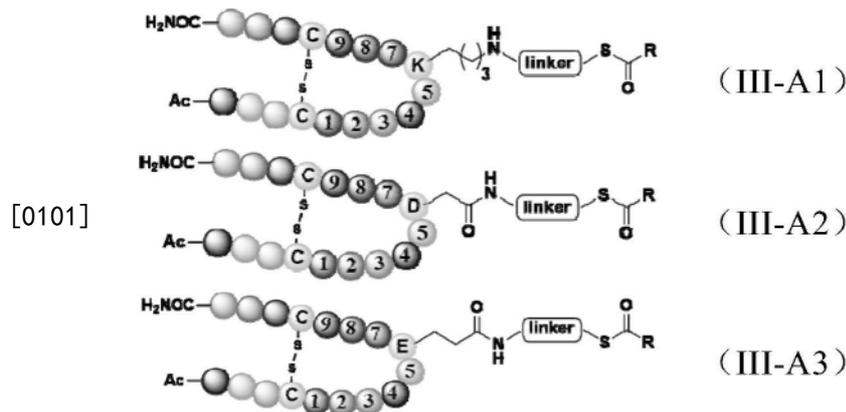
[0096] 在另一优选例中,o为1。

[0097] 在另一优选例中,o为2、3、4、或5。

[0098] 在另一优选例中,L₂和L₃各自独立地为无或由选自下组的一个或多个(如1-10个,较佳地,1、2、3、4、5或6个)单元结构组成的连接片段:CH₂OCH₂、C1-C4亚烷基、CO、NH、氨基酸残基。

[0099] 在另一优选例中,L₂和L₃中不含由正交反应形成的连接基团(例如,如式上定义的B经正交反应形成的连接基团)。

[0100] 在另一优选例中,所述的偶联物如式III-A1、III-A2或III-A3所示,



[0102] 其中,

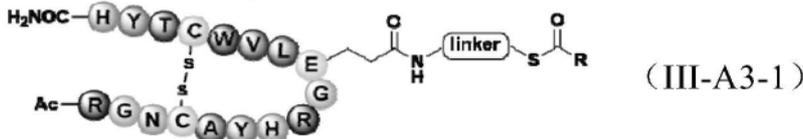
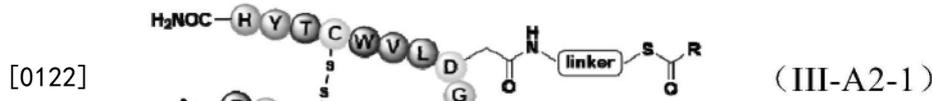
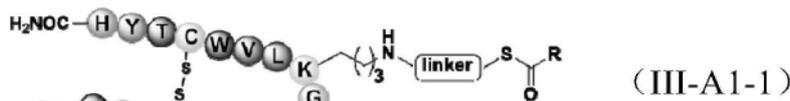
[0103] 标注有1、2、3、4、5、7、8和9的圆圈分别如式II中Aa1、Aa2、Aa3、Aa4、Aa5、Aa7、Aa8、和Aa9的定义;

[0104] 靠近标注有1的圆圈的末端为多肽N端,靠近标注有9的圆圈的末端为多肽C端;

[0105] Ac为N端保护基或不存在;

[0106] 各个空白圆圈如式II中的X和Y定义;

- [0107] $-\text{linker}-$ 为 $-\text{W}^2-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$;较佳地,为 $-\text{CO}-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$;
- [0108] 圆圈C为半胱氨酸残基, $-\text{S}-\text{S}-$ 代表由半胱氨酸残基的侧链 $-\text{SH}$ 形成的二硫键;
- [0109] 圆圈K为赖氨酸残基的主链部分(该氨基酸侧链已示出);圆圈D为天冬氨酸残基(D)的主链部分(该氨基酸侧链已示出)、圆圈E为谷氨酸残基(E)的主链部分(该氨基酸侧链已示出);
- [0110] R如前定义。
- [0111] 在另一优选例中,
- [0112] 空白圆圈(如中的任一个圆圈)各自独立地为无(不存在)或氨基酸残基(较佳地,所述氨基酸残基不为赖氨酸残基和半胱氨酸残基);
- [0113] 标注有数字的圆圈(即圆圈1、圆圈2、圆圈3、圆圈4、圆圈5、圆圈7、圆圈8、和圆圈9)各自独立地为氨基酸残基(较佳地,所述氨基酸残基不为赖氨酸残基和半胱氨酸残基);
- [0114] 标注有C的圆圈(圆圈C)为半胱氨酸残基, $-\text{S}-\text{S}-$ 代表由半胱氨酸残基的侧链 $-\text{SH}$ 形成的二硫键;
- [0115] 标注有K的圆圈(圆圈K)为赖氨酸残基的主链部分;标注有D的圆圈(圆圈D)为天冬氨酸残基(D)的主链部分、标注有E的圆圈(圆圈E)为谷氨酸残基(E)的主链部分;
- [0116] $-\text{linker}-$ 为 $-\text{W}^2-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$;较佳地 $-\text{CO}-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ (即连接在上述式II多肽链的Aa6位点);
- [0117] R如上所述;
- [0118] Ac为N端保护基或不存在(较佳地,为乙酰基),连接在多肽的N端;和
- [0119] $-\text{CONH}_2$ 为酰胺基,为多肽的C端;
- [0120] 当CL连接于环肽Aa6位置时,结合优选的连接子结构,可以实现任意R基团或物质修饰到靶蛋白上(优选地,靶蛋白为抗体)。
- [0121] 在另一优选例中,所述偶联物所述偶联物如式III-A1-1、III-A2-1或III-A3-1所示,



- [0123] 其中,
- [0124] 圆圈R为多肽N端,圆圈H为多肽C端;
- [0125] Ac为N端保护基或不存在;
- [0126] $-\text{linker}-$ 为 $-\text{W}^2-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ (较佳地 $-\text{CO}-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$);

[0127] 圆圈R为精氨酸残基、G为甘氨酸残基、N为天冬酰胺残基、A为丙氨酸残基、Y为酪氨酸残基、H为组氨酸残基、L为亮氨酸残基、V为缬氨酸残基、W为色氨酸残基、T为苏氨酸残基；

[0128] 圆圈C为半胱氨酸残基，-S-S-代表由半胱氨酸残基的侧链-SH形成的二硫键；

[0129] 圆圈K为赖氨酸残基的主链部分；圆圈D为天冬氨酸残基(D)的主链部分、圆圈E为谷氨酸残基(E)的主链部分；

[0130] R如前定义。

[0131] 在另一优选例中，式III-A1为



[0133] 其中，除标注有C和K的圆圈外，标注有字母的圆圈分别代表有该字母表示的氨基酸残基。

[0134] 在另一优选例中，式III-A2为



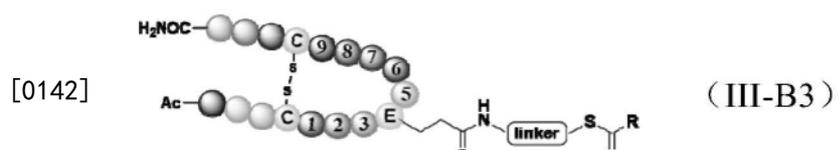
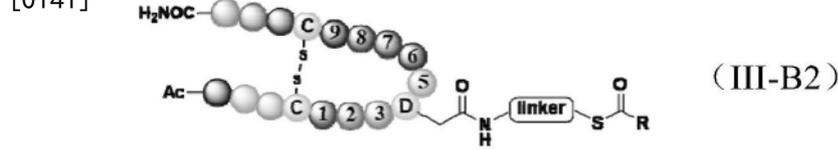
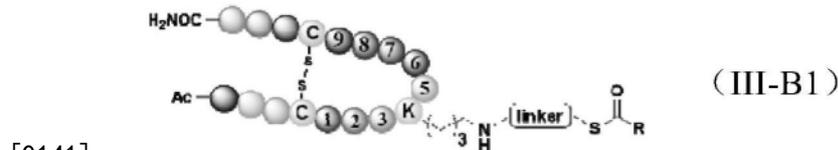
[0136] 其中，除标注有C和D的圆圈外，标注有字母的圆圈分别代表有该字母表示的氨基酸残基。

[0137] 在另一优选例中，式III-A3为



[0139] 其中，除标注有C和E的圆圈外，标注有字母的圆圈分别代表有该字母表示的氨基酸残基。

[0140] 在另一优选例中，所述的偶联物如式III-B1、III-B2或III-B3所示，



[0143] 其中，

[0144] 标注有1、2、3、5、6、7、8和9的圆圈分别如式II中Aa1、Aa2、Aa3、Aa5、Aa6、Aa7、Aa8、

和Aa9的定义；

[0145] 靠近标注有1的圆圈的末端为多肽N端，靠近标注有9的圆圈的末端为多肽C端；

[0146] Ac为N端保护基或不存在；

[0147] 各个空白圆圈如式II中的X和Y定义；

[0148] $-\text{linker}-$ 为 $-\text{W}^2-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ ；较佳地 $-\text{CO}-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ ；

[0149] 圆圈C为半胱氨酸残基， $-\text{S}-\text{S}-$ 代表由半胱氨酸残基的侧链 $-\text{SH}$ 形成的二硫键；

[0150] 圆圈K为赖氨酸残基的主链部分（该氨基酸侧链已示出）；圆圈D为天冬氨酸残基（D）的主链部分（该氨基酸侧链已示出）、圆圈E为谷氨酸残基（E）的主链部分（该氨基酸侧链已示出）；

[0151] R如前定义。

[0152] 在另一优选例中，

[0153] 空白圆圈各自独立地为无（不存在）或氨基酸残基（较佳地，所述氨基酸残基不为赖氨酸残基和半胱氨酸残基）；

[0154] 标注有数字的圆圈（即圆圈1、圆圈2、圆圈3、圆圈5、圆圈6、圆圈7、圆圈8、和圆圈9）各自独立地为氨基酸残基（较佳地，所述氨基酸残基不为赖氨酸残基和半胱氨酸残基）；

[0155] 标注有C的圆圈（圆圈C）为半胱氨酸残基， $-\text{S}-\text{S}-$ 代表由半胱氨酸残基的侧链 $-\text{SH}$ 形成的二硫键；

[0156] 标注有K的圆圈（圆圈K）为赖氨酸残基的主链部分；标注有D的圆圈（圆圈D）为天冬氨酸残基（D）的主链部分；标注有E的圆圈（圆圈E）为谷氨酸残基（E）的主链部分；

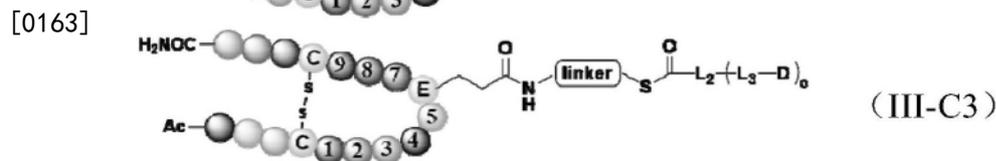
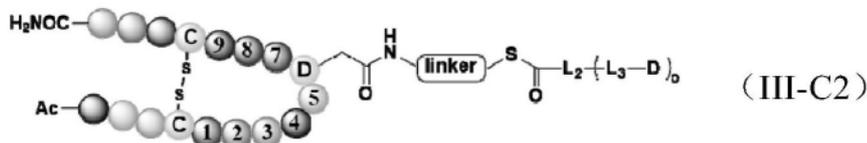
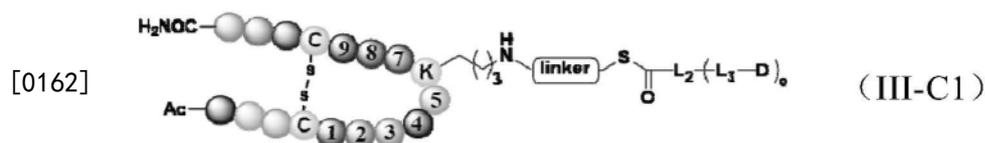
[0157] $-\text{linker}-$ 为 $-\text{W}^2-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ ；较佳地 $-\text{CO}-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ （即连接在式II上述多肽链的Aa4位点）；

[0158] R如上所述；

[0159] Ac为N端保护基或不存在（较佳地为乙酰基），连接在多肽的N端；和

[0160] $-\text{CONH}_2$ 为酰胺基，为多肽的C端。

[0161] 在另一优选例中，所述的偶联物如式III-C1、III-C2或III-C3所示，



[0164] 其中，

[0165] 标注有1、2、4、3、5、7、8和9的圆圈分别如式II中Aa1、Aa2、Aa3、Aa4、Aa5、Aa7、Aa8、和Aa9的定义；

[0166] 靠近标注有1的圆圈的末端为多肽N端，靠近标注有9的圆圈的末端为多肽C端；

[0167] Ac为N端保护基或不存在；各个空白圆圈如式II中的X和Y定义；

[0168] $-\text{linker}-$ 为 $-\text{W}^2-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ ；较佳地为 $-\text{CO}-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ ；

[0169] 圆圈C为半胱氨酸残基，-S-S-代表由半胱氨酸残基的侧链-SH形成的二硫键；

[0170] 圆圈K为赖氨酸残基的主链部分；圆圈D为天冬氨酸残基(D)的主链部分、圆圈E为谷氨酸残基(E)的主链部分。

[0171] 在另一优选例中，

[0172] 空白圆圈各自独立地为无(不存在)或氨基酸残基(较佳地，所述氨基酸残基不为赖氨酸残基和半胱氨酸残基)；

[0173] 标注有数字的圆圈(即圆圈1、圆圈2、圆圈3、圆圈4、圆圈5、圆圈7、圆圈8、和圆圈9)各自独立地为氨基酸残基(较佳地，所述氨基酸残基不为赖氨酸残基和半胱氨酸残基)；

[0174] 标注有C的圆圈为半胱氨酸残基，-S-S-代表由半胱氨酸残基的侧链-SH形成的二硫键；

[0175] 标注有K的圆圈为赖氨酸残基的主链部分；标注有D的圆圈为天冬氨酸残基(D)的主链部分；标注有E的圆圈为谷氨酸残基(E)的主链部分；

[0176] $-\text{linker}-$ 为 $-\text{W}^2-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1-$ ；较佳地为 $-\text{CO}-\text{L}^1-\text{W}^1-\text{A}^1$ (即连接在式II上述多肽链的Aa6位点)；

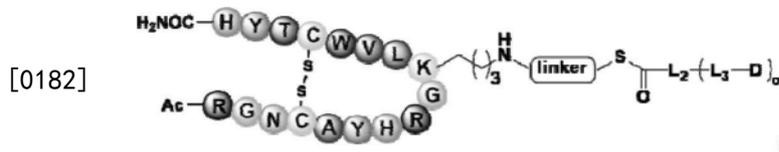
[0177] L2、L3、下标o、和R如前定义；

[0178] Ac为N端保护基或不存在(较佳地为乙酰基)，连接在多肽的N端；和

[0179] $-\text{CONH}_2$ 为酰胺基，为多肽的C端；

[0180] 当CL连接于环肽Aa6位置时，结合优选的连接子结构，可以实现任意 $\text{L}_2-(\text{L}_3-\text{D})_o$ 基团或物质修饰到靶蛋白上(优选地，靶蛋白为抗体)。

[0181] 在另一优选例中，式III-C1为



[0183] 其中，除标注有C和K的圆圈外，标注有字母的圆圈分别代表有该字母表示的氨基酸残基。

[0184] 在另一优选例中，式III-C2为



[0186] 其中，除标注有C和D的圆圈外，标注有字母的圆圈分别代表有该字母表示的氨基酸残基。

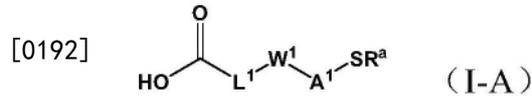
[0187] 在另一优选例中，式III-C3为



[0189] 其中,除标注有C和E的圆圈外,标注有字母的圆圈分别代表有该字母表示的氨基酸残基。在另一优选例中,上述各式中,标注有1、2、3、4、5、6、7、8和9的圆圈分别如式II中Aa1、Aa2、Aa3、Aa4、Aa5、Aa6、Aa7、Aa8和Aa9的定义,各个空白圆圈如式II中的X和Y定义。

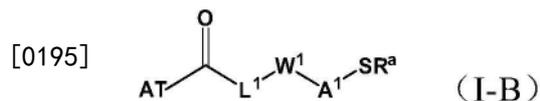
[0190] 在另一优选例中,所述的偶联物选自表A1和表A2。

[0191] 在本发明的第二方面,提供了一种中间体I,所述中间体如式I-A所示



[0193] 其中,R^a为H或保护基团(如三苯甲基(Trt));L¹、W¹和A¹如前定义。

[0194] 在本发明的第三方面提供了一种中间体II,所述中间体如式I-B所示

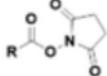


[0196] 其中,R^a为H或保护基团(如三苯甲基(Trt))(较佳地,R^a为H);AT、L¹、W¹和A¹如前定义。

[0197] 在另一优选例中,AT为衍生自包含如II所示序列的Fc结合多肽的核心序列。

[0198] 在本发明的第四方面提供了一种如第一方面所述的偶联物的制备方法,包括步骤:

[0199] (1) 使式I-A中间体与包含如II所示序列的Fc结合多肽的核心序列反应从而形成式I-B中间体;以及

[0200] (2) 使式I-B中间体与R-COOH酯化物(羧酸化合物的活性酯)(如 )形式反应,从而得到如式I所示的偶联物。

[0201] 在本发明的第五方面,提供了一种蛋白位点选择性修饰的方法,包括步骤:

[0202] (1) 提供本发明第一方面所述的偶联物;

[0203] (2) 使需要修饰的目标蛋白与所述的偶联物接触,并使得所述偶联物与蛋白上侧链氨基和/或末端的氨基进行反应,从而得到经修饰的目标蛋白。

[0204] 在另一优选例中,所述的经修饰的目标蛋白被一个或多个所述的R基团修饰。

[0205] 在另一优选例中,所述的修饰为位点选择性修饰。

[0206] 在另一优选例中,所述的氨基包括赖氨酸(K)的侧链氨基。

[0207] 在另一优选例中,所述的修饰通过一步反应即可得到得到经修饰的目标蛋白。

[0208] 在另一优选例中,所述经修饰的目标蛋白是修饰有一个或多个选自下组的活性基团的蛋白:具有生物活性和/或可检测的活性基团、可被进一步修饰的活性基团。

[0209] 在另一优选例中,所述经修饰的目标蛋白如式IV所示



[0211] 其中,R如前定义,TP为目标蛋白部分,下标p为1-8。

[0212] 在另一优选例中,p=2-4。

[0213] 在另一优选例中,TP为目标蛋白中侧链含NH₂基团的氨基酸残基(较佳地,赖氨酸残基;更佳地,位于Fc区域的赖氨酸残基;最佳地,Fc区域中的第246位-248位的赖氨酸残基)中NH₂的与所述的偶联物中-CO-R连接形成-NHCO-R后其余的部分。

- [0214] 在另一优选例中,所述目标蛋白为抗体或Fc融合蛋白。
- [0215] 在另一优选例中,所述目标蛋白为抗体,且所述经修饰的目标蛋白如式V所示
- [0216] $Ab-(NHCOR)_p$ (V)。
- [0217] 其中,R和下标p如前定义,Ab为抗体。
- [0218] 在另一优选例中,Ab为抗体中p个侧链含NH₂基团的氨基酸残基(较佳地,赖氨酸残基;更加地,位于Fc区域的赖氨酸残基;最佳地,Fc区域中的第246位-248位的赖氨酸残基)中NH₂的与所述的偶联物中-CO-R连接形成-NHCO-R后其余的部分。
- [0219] 在另一优选例中,所述目标蛋白具有与式I所示复合物的亲和的片段或序列。
- [0220] 在另一优选例中,所述抗体或Fc结构为人IgG来源。
- [0221] 在另一优选例中,所述目标蛋白被修饰的位置为Fc区域。
- [0222] 在另一优选例中,所述目标蛋白被修饰的位置为包含人IgG的Fc 80%同源序列区域。
- [0223] 在另一优选例中,人IgG的Fc原始序列如SEQ ID No.1所示:
- [0224] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No.1)。
- [0225] 在另一优选例中,所述目标蛋白被修饰的位置为人IgG的Fc区域中第246位-第248位的氨基酸残基所形成的靶区域。
- [0226] 在另一优选例中,与式I偶联物相互作用的共价修饰区域为由连续1-10个氨基酸残基组成的区域,并且该区域包括由人IgG Fc区域中的第246位-248位的氨基酸残基形成的靶区域。
- [0227] 在另一优选例中,所述靶区由人IgG Fc区域中的第246位或第248位为赖氨酸残基。
- [0228] 在另一优选例中,所述方法的区域的选择性为 $\geq 90\%$ 。
- [0229] 在另一优选例中,所述修饰位点为人IgG Fc区域中的第248位赖氨酸残基。
- [0230] 在本发明的第六方面,提供了一种如式IV所示的经位点选择性修饰的蛋白,
- [0231] $TP-(NHCOR)_p$ (IV)
- [0232] 其中,TP、R和下标p如前定义。
- [0233] 在另一优选例中,R为-L₂-(L₃-D)_o;其中,L₂、L₃、D、下标o如前定义。
- [0234] 在另一优选例中,R为-L₂-(L₃-B)_o;其中,L₂、L₃、B、下标o如前定义。
- [0235] 在另一优选例中,R为-L₂-(L₃-B'-L₄-D)_o;其中,L₂、L₃、B、下标o如前定义;B'为B与L₄'-D进行正交反应形成的连接基团,L₄为连接片段,L₄'为带有可与B进行正交反应的活性基团并在反应后可形成L₄的基团。
- [0236] 在另一优选例中,所述的经位点选择性修饰的蛋白为抗体药物偶联物,即TP为抗体且R为-L₂-(L₃-D)_o或R为-L₂-(L₃-B'-L₄-D)_o。
- [0237] 在另一优选例中,TP为抗体,且所述的经位点选择性修饰的蛋白如式V所示;
- [0238] $Ab-(NHCOR)_p$ (V)
- [0239] 其中,Ab为抗体,R和下标p如前定义。

[0240] 在另一优选例中,所述的经位点选择性修饰的蛋白如式IV-A所示;

[0241] $TP-(NHC0-L_2-(L_3-D))_o)_p$ (IV-A)

[0242] 其中,TP、 L_2 、 L_3 、D、下标o和下标p如前定义。

[0243] 在另一优选例中,所述的经位点选择性修饰的蛋白如式V-A所示;

[0244] $Ab-(NHC0-L_2-(L_3-D))_o)_p$ (V-A)

[0245] 其中,Ab、 L_2 、 L_3 、D、下标o和下标p如前定义。

[0246] 在另一优选例中,所述抗体药物偶联物选自:ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5、ADC-6、ADC-7、ADC-8、ADC-9、ADC-10、ADC-11、ADC-12、ADC13、ADC-14、ADC-15、ADC-16、ADC-17、ADC-18、ADC-19、ADC-20和ADC-21。

[0247] 在本发明的第七方面,提供了一种本发明第一方面所述的偶联物的用途,用于位点选择性修饰蛋白。

[0248] 在本发明的第八方面,提供了一种本发明第一方面所述的偶联物的用途,用于制备抗体药物偶联物(ADC)。

[0249] 在另一优选例中,所述用途不依赖于生物正交反应,所述偶联物可经一步反应直接将需要被修饰到目标蛋白的药物分子,以位点选择性方式修饰至抗体上。

[0250] 在本发明的第九方面,提供了一种如式V所示的经位点选择性修饰抗体,

[0251] $Ab-(NHC0-R)_p$ (V)

[0252] 其中,Ab为抗体,R和下标p如前定义。

[0253] 在本发明的第十方面,提供了一种抗体药物偶联物(ADC),所述抗体药物偶联物如式V-A所示:

[0254] $Ab-(NHC0-L_2-(L_3-D))_o)_p$ (V-A)

[0255] 其中,Ab、 L_2 、 L_3 、D、下标o和下标p如前定义。

[0256] 在另一优选例中,所述抗体药物偶联物是不依赖于生物正交反应、一步制备得到的,且抗体被定点修饰的定点抗体药物偶联物。

[0257] 在另一优选例中,Ab为抗体,下标p为1~8(较佳地,p=2-4),o为1-10的整数, L_2 和 L_3 为连接片段,D为小分子药物;当o为2-10时,D可以为同一个小分子药物,也可以独立为不同的小分子药物。

[0258] 在另一优选例中,所述定点抗体药物偶联物,D(如小分子药物)定点偶联在抗体恒定区(Fc区域)。

[0259] 在另一优选例中,所述定点抗体药物偶联物,D(如小分子药物)定点偶联在人IgG Fc区域中的由246-248位氨基酸残基构成的区域。

[0260] 在另一优选例中,所述抗体药物偶联物选自:ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5、ADC-6、ADC-7、ADC-8、ADC-9、ADC-10、ADC-11、ADC-12、ADC13、ADC-14、ADC-15、ADC-16、ADC-17、ADC-18、ADC-19、ADC-20和ADC-21。在另一优选例中,所述抗体药物偶联物选自:ADC-5、ADC-6、ADC-7、ADC-8、ADC-9、ADC-10、ADC-11、ADC-12、ADC13、ADC-14、ADC-15、ADC-16、ADC-17、ADC-18、ADC-19、ADC-20和ADC-21。

[0261] 在另一优选例中,,上述定点ADC制备方法为:将天然抗体与物式(III、III-A1-3、III-B1-3、III-C1-3)所示亲和片段-可裂解连接片段-功能性片段复合物孵育后,功能性片段上含有的羰基直接与抗体Fc区域的赖氨酸残基共价形成酰胺键,一步反应制备定点ADC

化合物,不依赖生物正交反应。

[0262] 在本发明的第十一方面,提供了一种如式V-B所示的位点特异性的,双价或多价生物正交基团修饰的抗体,其特征在于,



[0264] 其中,Ab、L₂、L₃、B、下标o和下标p如前定义。

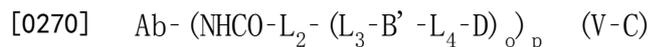
[0265] 在另一优选例中,Ab为抗体,下标p为1~8(较佳地,p=2-4),o为2-10的整数,L₂和L₃为连接片段;

[0266] B为生物正交基团,多个B可以相同也可以独立不同,优选自:叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯炔残基、卤素残基、四嗪残基、硝酮残基、羟胺残基、腈残基、肼残基、酮残基、硼酸残基、氰基苯并噻唑残基、烯丙基残基、膦残基、马来酰亚胺残基、二硫残基、硫酸酯残基、 α -卤代羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基、共轭二烯残基、磷酸残基、环炔残基及环烯残基。

[0267] 上述生物正交基团定点偶联在抗体恒定区(Fc区域);

[0268] 上述生物正交基团定点偶联在人IgG Fc区域中的由246-248位氨基酸残基构成的区域;

[0269] 在本发明的第十二方面,提供了一种如式V-C所示的位点特异性的,双价或多价药物修饰的抗体,其特征在于,



[0271] 其中,L₂、L₃、B、下标o如前定义;且B'为B与L₄'-D进行正交反应形成的连接基团,L₄为连接片段,L₄'为带有可与B进行正交反应的活性基团并在反应后可形成L₄的基团。

[0272] 在另一优选例中,Ab为抗体,下标p为1~8(较佳地,p=2-4,更佳地p=2),o为2-10的整数,L₂和L₃为连接片段,B'为包含药物片段与上述生物正交基团B之间反应生成的连接片段,B'相同或各自不同,L₄为连接B'与药物D的连接子,D如上所述,D在此的结构相同或各自不同。

[0273] 上述生物正交基团定点偶联在抗体恒定区(Fc区域);

[0274] 上述生物正交基团定点偶联在人IgG Fc区域中的由246-248位氨基酸残基构成的区域。

[0275] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0276] 图1a-e显示了实施例47制备得到的生物素化曲妥珠单抗Ab-1的各表征结果。其中,图1a、1b和1c显示了显示ESI-TOFMS测定结果,图1d显示了曲妥珠单抗经胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸的修饰部位的由33个氨基酸残基形成的肽(THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK(C₁₀H₁₄N₂O₂S)DTLMISR)的肽片段的MS谱图,图1e显示了经Mascot 2.3软件分析,确定修饰高选择性地发生在第251位赖氨酸残基。

[0277] 图2a-c显示了实施例48制备得到的偶联叠氮基团的曲妥珠单抗Ab-2的各表征结果。其中,图2a、2b和2c显示了显示ESI-TOFMS测定结果。

[0278] 图3显示了实施例49偶联生物荧光素FITC前后的曲妥珠单抗Ab-3的ESI-TOFMS测定结果。

[0279] 图4显示了实施例50偶联正交基团环丙烯前后的曲妥珠单抗Ab-4的ESI-TOFMS测定结果。

[0280] 图5显示了实施例51偶联正交基团DBC0前后的利妥昔单抗Ab-5的ESI-TOFMS测定结果。

[0281] 图6显示了实施例52偶联正交基团DBC0前后的利妥昔单抗Ab-6的ESI-TOFMS测定结果。

[0282] 图7a-e显示了实施例53制备得到的ADC-1的各表征结果。其中,图7a、7b和7c显示了ESI-TOFMS测定结果,图7d显示了疏水色谱分析结果,图7e显示了分子排阻色谱分析结果。

[0283] 图8a-e显示了实施例54制备得到的ADC-2的各表征结果。其中,图8a、8b和8c显示了ESI-TOFMS测定结果,图8d显示了疏水色谱分析结果,图8e显示了分子排阻色谱分析结果。

[0284] 图9a-e显示了实施例55制备得到的ADC-3的各表征结果。其中,图9a、9b和9c显示了ESI-TOFMS测定结果,图9d显示了疏水色谱分析结果,图9e显示了分子排阻色谱分析结果。

[0285] 图10显示了实施例56制备得到的ADC-4的ESI-TOFMS测定结果。

[0286] 图11a-e显示了实施例57制备得到的ADC-5的各表征结果。其中,图11a、11b和11c显示了ESI-TOFMS测定结果,图11d显示了疏水色谱分析结果,图11e显示了分子排阻色谱分析结果。

[0287] 图12a-e显示了实施例58制备得到的ADC-12的各表征结果。其中,图12a、12b和12c显示了ESI-TOFMS测定结果,图12d显示了疏水色谱分析结果,图12e显示了分子排阻色谱分析结果。

[0288] 图13a-e显示了实施例59制备得到的ADC-7的各表征结果。其中,图13a、13b和13c显示了ESI-TOFMS测定结果,图13d显示了疏水色谱分析结果,图13e显示了分子排阻色谱分析结果。

[0289] 图14a-e显示了实施例60制备得到的ADC-8的各表征结果。其中,图14a、14b和14c显示了ESI-TOFMS测定结果,图14d显示了疏水色谱分析结果,图14e显示了分子排阻色谱分析结果。

[0290] 图15显示了实施例61偶联药物连接子D6前后的利妥昔单抗的ESI-TOFMS测定结果。

[0291] 图16显示了实施例62偶联药物连接子D6前后的帕妥珠单抗的ESI-TOFMS测定结果。

[0292] 图17显示了实施例63偶联药物连接子D6前后的贝伐单抗的ESI-TOFMS测定结果。

[0293] 图18显示了实施例64偶联药物连接子D6前后的特瑞普利单抗的ADC-12的ESI-TOFMS测定结果。

[0294] 图19显示了实施例65偶联药物连接子D6前后的帕尼单抗的ESI-TOFMS测定结果。

[0295] 图20显示了实施例66偶联药物连接子D6前后的纳武单抗的ESI-TOFMS测定结果。

[0296] 图21a显示了实施例67中原料曲妥珠单抗及制备得到的ADC-15的ESI-TOFMS测定结果,图21b显示了疏水色谱分析结果。

[0297] 图22a显示了实施例68中原料曲妥珠单抗及制备得到的ADC-16的ESI-TOFMS测定结果,图22b显示了疏水色谱分析结果。

[0298] 图23a显示了实施例69中原料曲妥珠单抗及制备得到的ADC-17的ESI-TOFMS测定结果,图23b显示了疏水色谱分析结果。

[0299] 图24a显示了实施例70中原料曲妥珠单抗及制备得到的ADC-18的ESI-TOFMS测定结果,图24b显示了疏水色谱分析结果。

[0300] 图25a显示了实施例71中原料曲妥珠单抗及制备得到的ADC-19的ESI-TOFMS测定结果,图25b显示了疏水色谱分析结果。

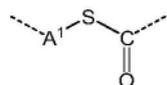
[0301] 图26显示了实施例72中原料曲妥珠单抗及制备得到的ADC-20的ESI-TOFMS测定结果。

[0302] 图27显示了实施例73中原料曲妥珠单抗及制备得到的ADC-21的ESI-TOFMS测定结果。

[0303] 图28显示了本发明实施例制备得的ADC的细胞活性及细胞毒性结果。

具体实施方式

[0304] 经过广泛而深入地研究,本发明人意外地发现一种结构独特的偶联物,它具有



所示的二价片段的裂解片段和亲和性部分(AT),本发明的偶联物十分适合对

蛋白进行直接修饰,尤其是抗体或Fc融合蛋白的Fc段)。采用本发明的偶联物,无需在修饰前对蛋白中的侧链上的活性基团预先修饰,可直接反应(如仅一步直接反应)而得到被R基团修饰的所需产物(如ADC等)。尤其是,采用特定序列的环肽作为亲和性部分且可裂解片段连接于该环肽的特定位置上时,本发明偶联物可以极高的效率进行位点选择性修饰。在此基础上,发明人完成了本发明。

[0305] 术语

[0306] 除非另有说明,在本文中所有的缩写具有本领域技术人员所熟知的含义。

[0307] 如本文所用,“卤素”指F、Cl、Br、和I。更佳地,卤原子选自F、Cl和Br。

[0308] 除非另有说明,术语“烷基”,本身或作为另一取代基的一部分,是指具有指定碳原子数的直链或支链烃基(即,C₁₋₆表示1-6个碳)。烷基的例子包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基等。

[0309] 如本文所用,术语“亚烷基”,其本身或作为另一取代基的一部分,是指衍生自烷烃的二价基团,例如-CH₂CH₂CH₂CH₂-。烷基(或亚烷基)通常具有1-10个碳原子(即C₁₋₁₀亚烷基)。亚烷基的例子包括但不限于:亚甲基、亚乙基。

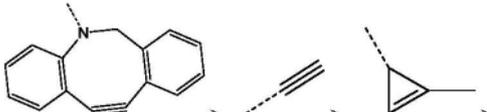
[0310] 除非另有说明,术语“芳基”表示多不饱和的(通常芳香性)的烃基,其可以是单环或稠合在一起或共价连接的多环(最多三环)。一般地,芳基具有6-10个环原子。术语“杂芳基”是指含有1至5个选自N、O、和S的杂原子的芳基(或环),其中氮和硫原子任选被氧化,氮原子任选被季铵化。一般地,杂芳基具有5-10个环原子即5-10元杂芳基,优选地,具有5-6个环原子即5-6元杂芳基,并含有1、2、3或4个杂原子。杂芳基可通过杂原子连接于分子的其余

部分。芳基的非限制性例子包括苯基、萘基和联苯基，而杂芳基的非限制性例子包括吡啶基等。

[0311] 在本文中，以虚线表示的键(---)代表基团(或片段或部分)与其余部分连接的位点。

[0312] 在本文中，除非另有定义，所述取代是指基团中一个或多个H被选自下组的取代基取代：卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基。

[0313] 如本文所用，术语“生物正交基团”是指含可用于生物正交反应的官能团的基团，

例如含叠氮基(-N₃)、环辛炔、、醛基、酮羰基、四嗪、反式

环辛烯、硫醇、卤素、肼、羟胺等基团。

[0314] 如本文所用，术语“氨基酸残基”是指氨基酸的N端-NH₂脱去一个H，C端的-COOH脱去-OH所形成的基团。一般地，将氨基酸(残基)中包括N端和C段的链段称为主链，而决定氨基酸具体种类的部分称为侧链。除非另有定义，在本文中，氨基酸包括天然氨基酸或非天然氨基酸，包括D型和/或L型氨基酸。氨基酸的例子包括但不限于Ala(A)、Arg(R)、Asn(N)、Asp(D)、Cys(C)、Gln(Q)、Glu(E)、Gly(G)、His(H)、Ile(I)、Leu(L)、Lys(K)、Met(M)、Phe(F)、Pro(P)、Ser(S)、Thr(T)、Trp(W)、Tyr(Y)、Val(V)。优选地，在本文中，氨基酸为选自下组的氨基酸：L-甘氨酸(L-Gly)，L-丙氨酸(L-Ala)，β-丙氨酸(β-Ala)，L-谷氨酸(L-Glu)，L-天冬氨酸(L-Asp)，L-组氨酸(L-His)，L-精氨酸(L-Arg)，L-赖氨酸(L-Lys)，L-缬氨酸(L-Val)，L-丝氨酸(L-Ser)，L-苏氨酸(L-Thr)；此外，当氨基酸存在2个或以上的氨基和/或者2个或以上的羧基时，该术语还包括不在同一个碳原子上的-NH₂脱去一个H和-COOH脱去-OH所形成的基团，例如由谷氨酸的-NH₂和非α位-COOH分别脱去一个H后形成的二价基团-C(O)-(CH₂)₂-C(COOH)-NH-。

[0315] 如本文所用，术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0316] 如本文所用，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈β-折叠构型，由形成连接环的三个CDR相连，在某些情况下可形成部分折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0317] 脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不

同的两类(称为 κ 和 λ)中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有5类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

[0318] 一般,抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成4个框架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

[0319] 多肽

[0320] 在本发明中,术语“Fc结合多肽”指具有可逆结合目标蛋白,尤其是抗体的Fc区域能力的肽;较佳地,其具有如式II所示的核心序列(即 $(X_{s1})_{t1}$ -Cys-Aa1-Aa2-Aa3-Aa4-Aa5-Aa6-Aa7-Aa8-Aa9-Cys- $(Y_{s2})_{t2}$)。此外,所述术语还包括所述Fc结合多肽的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):1-5个(通常为1-4个,较佳地1-3个,更佳地1-2个,最佳地1个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加或缺失一个或数个(通常为5个以内,较佳地为3个以内,更佳地为2个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加或缺失一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的结构和功能。此外,所述术语还包括单体和多聚体形式本发明多肽。该术语还包括线性以及非线性的多肽(如环肽)。

[0321] 一类优选的活性衍生物指与式I的氨基酸序列相比,有至多5个,较佳地至多3个,更佳地至多2个,最佳地1个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

[0322] 表1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn

[0323]

[0324]	Glu (E)	Asp	Asp
	Gly (G)	Pro; Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
	Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0325] 发明还提供本发明多肽的类似物。这些类似物与天然本发明多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解,本发明的多肽并不限于上述列举的代表性的多肽。

[0326] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

[0327] 亲和片段导向的可裂解片段

[0328] 在本发明的一个方面,提供了一种亲和片段导向的可裂解片段(也可称为本发明的偶联物)或其衍生物(如其盐),所述由以下式I表示:

[0329] AT-CL-R (I)

[0330] 该复合物作为酰基转移试剂,可以直接将R基团偶联到蛋白上,与特定定位点氨基酸形成新的共价键。

[0331] 在一些实施方案中,AT(affinity tag)为针对蛋白的亲和性物质;CL(cleavable linker)为可裂解片段,其具有自水解反应性的切割片段;R(reagent)为化合物。

[0332] 在另一些优选实施方案中,AT为蛋白的亲和片段,该片段既可以是与蛋白形成可逆共价结合的小分子化合物,也可以是具有亲和力的蛋白或多肽结构。特别地,在修饰抗体方面,AT既可以是与抗体形成可逆共价结合的小分子化合物,也可以是与抗体具有亲和力

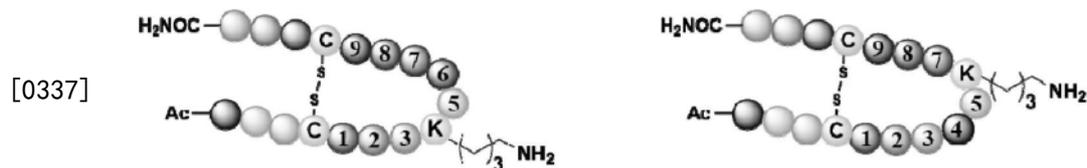
的蛋白或多肽结构如Fc结合肽,来源于ProteinA或ProteinG的与Fc具有结合能力的多肽片段结构等。

[0333] 在另一些优选实施方案中,AT可以是例如Fc-III肽(DCAWHLGELVWCT (SEQ ID No.2))、其他Fc结合肽(GPDCAHYRGELVWCTFH (SEQ ID No.3)、RGNCAYHRGQLVWCTYH (SEQ No.4)、CDCAWHLGELVWCTC (SEQ ID No.5))等,其核心结构序列如下(II)所示:

[0334] $(X_{0-3})_{t_1}$ -Cys-Aa1-Aa2-Aa3-Aa4-Aa5-Aa6-Aa7-Aa8-Aa9-Cys- $(Y_{0-3})_{t_2}$ (II)

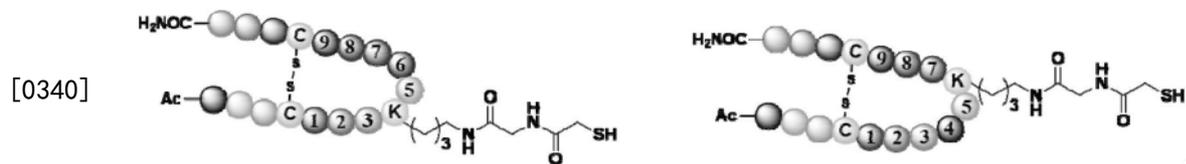
[0335] 其中,C为半胱氨酸残基, X_{0-3} 和 Y_{0-3} 为除了赖氨酸和半胱氨酸以外的任意氨基酸,可为1-3个连续的相同的或不同的氨基酸残基,m和n分别独立为0-10的数字。Aa1-Aa3和Aa5以及Aa7-Aa9为除了半胱氨酸和赖氨酸的任意氨基酸,Aa4或Aa6分别独立为赖氨酸残基,即当Aa4为赖氨酸时,Aa6为除了半胱氨酸和赖氨酸的其他任意氨基酸,当Aa6为赖氨酸时,Aa4为除了半胱氨酸和赖氨酸的其他任意氨基酸。

[0336] 优选地,所述的亲和性片段(AT)为或衍生自可以与抗体Fc具有亲和力的环多肽片段,优选结构为:



[0338] 其中,无标记或以数字标记的圆圈代表除半胱氨酸和赖氨酸的任意氨基酸,无标记的圆圈也可以不存在,C代表半胱氨酸且-S-S-代表有该两个半胱氨酸中-SH基团形成的-S-S-键,以及K代表赖氨酸主链,并描绘出其侧链结构。

[0339] 更优选地,所述的亲和性片段(AT)及可裂解片段(CL)的一部分(即AT-W²-L¹-W¹-A¹-S-)衍生自含有巯基的Fc结合肽,其优选修饰结构如下任一所述:



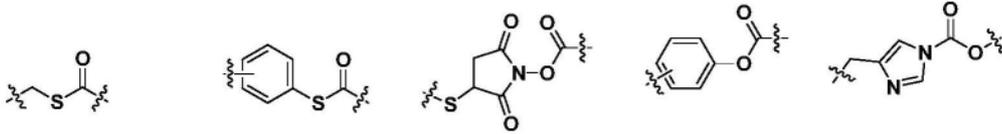
[0341] 在另一些优选实施方案中,AT也可以为与抗体Fab具有亲和力的结合肽;例如曲妥珠单抗Fab结合肽等。

[0342] 在一些实施方案中,AT也可以为与蛋白具有可逆共价相互作用的小分子片段,例如,如下所示的邻羟基苯甲醛、临乙酰基苯硼酸等,

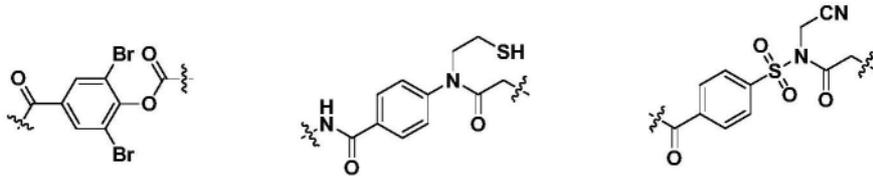
[0343] 在一些实施方案中,CL为可裂解片段,该片段可以在亲核试剂的进攻下形成新的化学键,将R片段共价连接到蛋白特定位点,同时该片段发生断裂,释放出亲和性片段AT。优选地,CL如下所示,CL片段可为硫酯片段、马来酰亚胺酯片段、酯片段等酰基转移试剂:

[0344] 其中,R1和R2分别独立为氢原子、甲基、乙基等脂肪族或芳香族片段,或R1与R2形成环状烷烃或烯烃结构。

[0345] 更优选地,CL如下任一所示

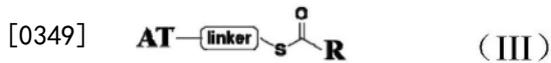


[0346]

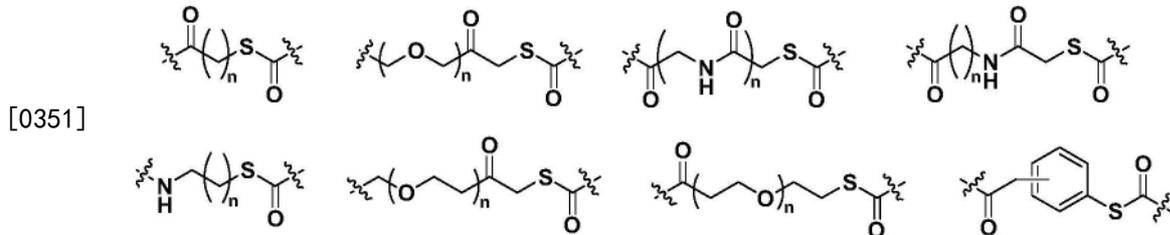


[0347] 其中,可裂解片段的羰基连接R片段,可裂解片段的S或O部分偶联亲和性片段。

[0348] 在一些优选实施方案中,CL片段是以硫酯为核心的酰基转移试剂,其结构如下式(III)所示:



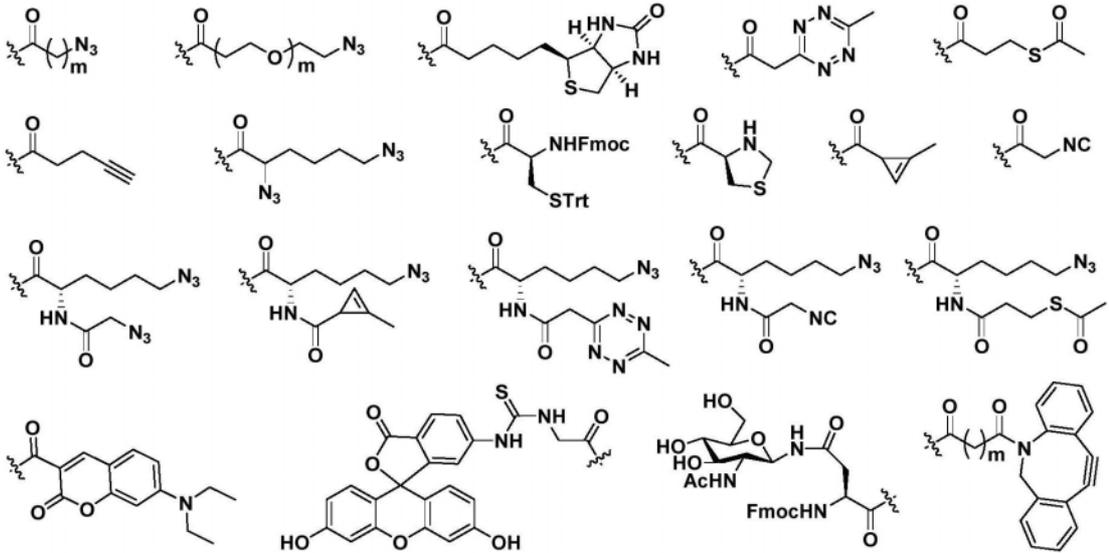
[0350] 其中,连接子(linker)的结构为不同长度的亚甲基结构、氨基酸、多聚甘氨酸、多聚乙醇(PEG)结构等;更优选地,连接子的结构如下所示:



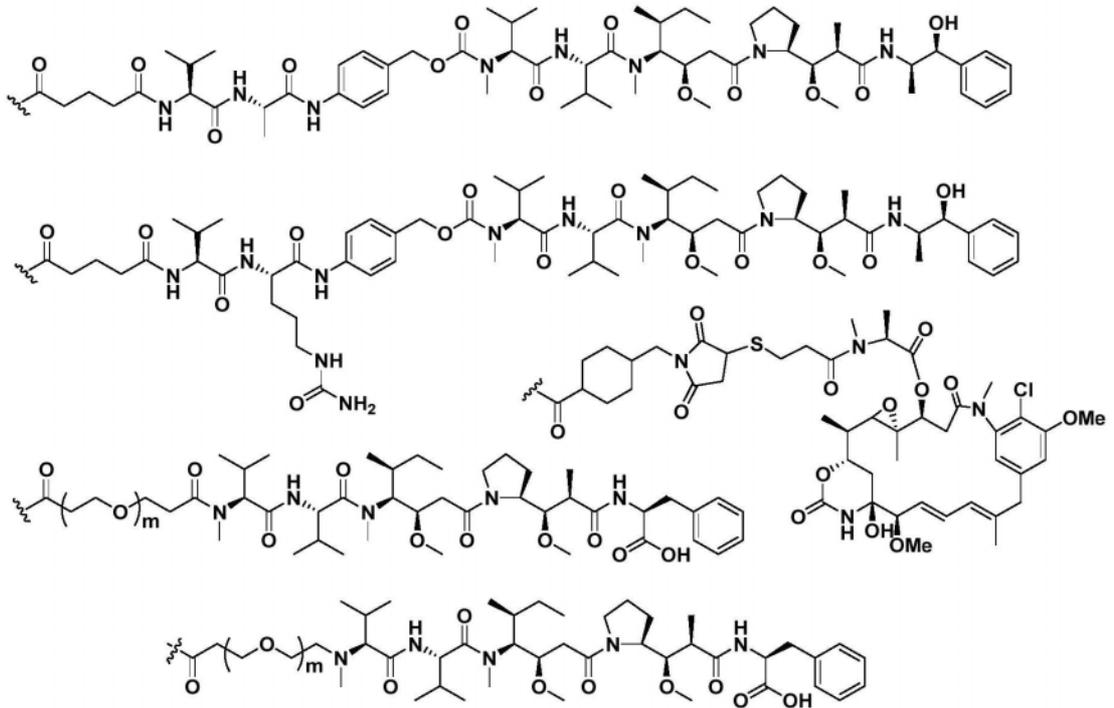
[0352] 其中,n为1-10的整数。

[0353] 在一些实施方案中,R衍生自将要修饰到蛋白上的化合物,其包括可被进一步修饰的活性基团如生物正交基团等或者含或衍生自生物素、荧光试剂、小分子药物、mRNA、多肽化合物及蛋白等。R的来源化合物本身包含羧酸片段或可衍生获得羧酸结构,通过羧酸与巯基、马来酰亚胺、苯酚等形成CL可裂解片段中的-CO-结构,即酰基转移试剂。

[0354] 在另一优选例中,-CO-R选自组2(其中-CO-为CL中的-CO-),并且组2包括如下所示的基团:

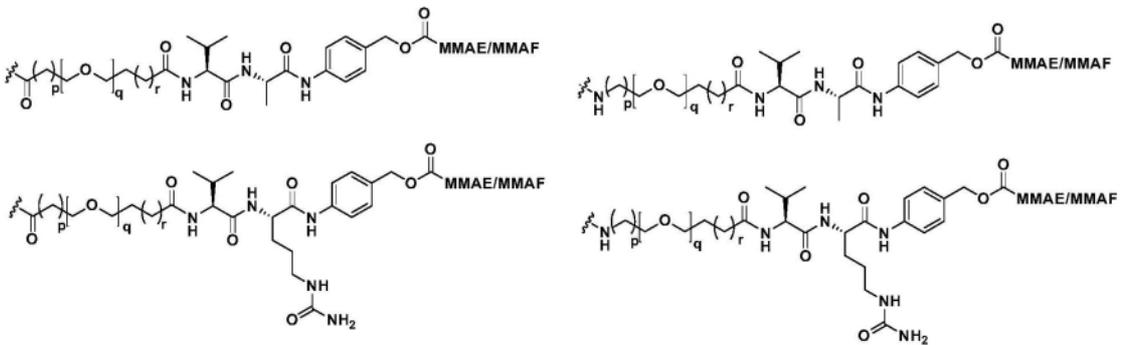


[0355]



[0356] 其中, m 为 0 或任意正整数; 优选地为 1~20 的正整数。

[0357] 在另一优选例中, L_3 -D 选自下组:

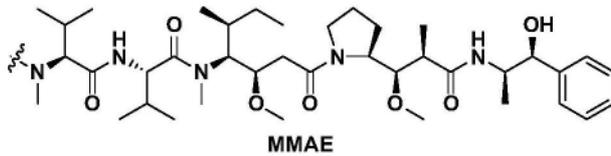


[0358]

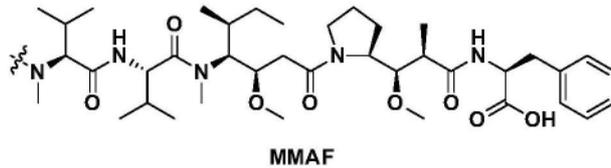
[0359] 其中,

[0360] p、q和r为0或任意正整数；优选地为0或1~20的正整数；更优选地，p和r各自独立地为0、1、2或3，且q为1、2、3、4、5或6；

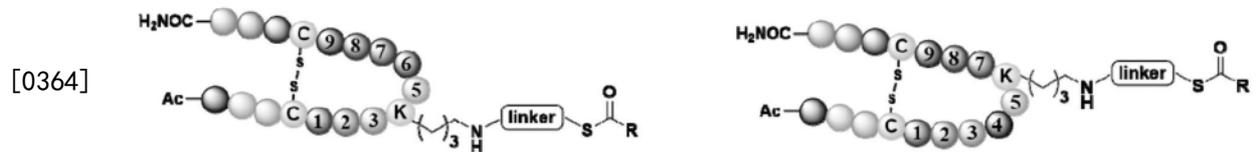
[0361] MMAE/MMAF是指MMAE或MMAF，并且MMAE和MMAF的结构如下：



[0362]



[0363] 在一些实施方案中，式III所示的亲片段导向的可裂解片段如下式任一所示



[0365] 其中，R和linker的定义如前定义，圆圈1、2、3、4、5、6、7、8和9分别指如前定义的Aa1、Aa2、Aa3、Aa4、Aa5、Aa6、Aa7、Aa8、和Aa9，圆圈C是指Cys，圆圈K是指赖氨酸残基的主链部分（即赖氨酸残基的-NH-C-CO-部分）。

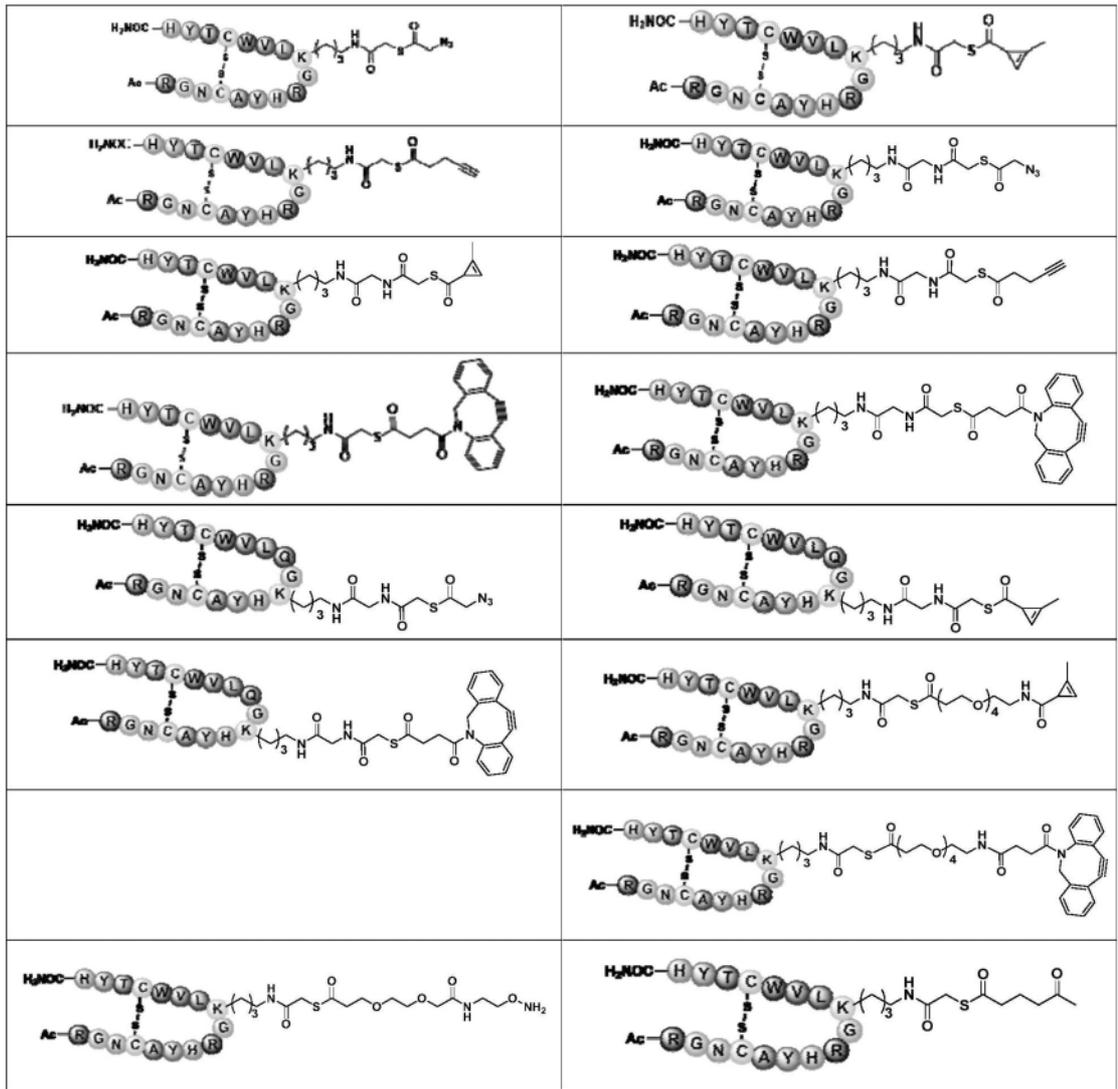
[0366] 在一些实施方案中，AT、CL和R如第一方面中定义。

[0367] 在一些实施方案中，AT、CL和R各自独立地为表A1和表A2所示的偶联物或实施例中之具体化合物中对应的基团。

[0368] 在一些具体实施方式中，所述的偶联物（或称亲片段导向的可裂解片段）选自表A1和表A2所示的化合物（环肽中K的侧链结构（即-(CH₂)₄-NH-）已示出）：

[0369] 表A1

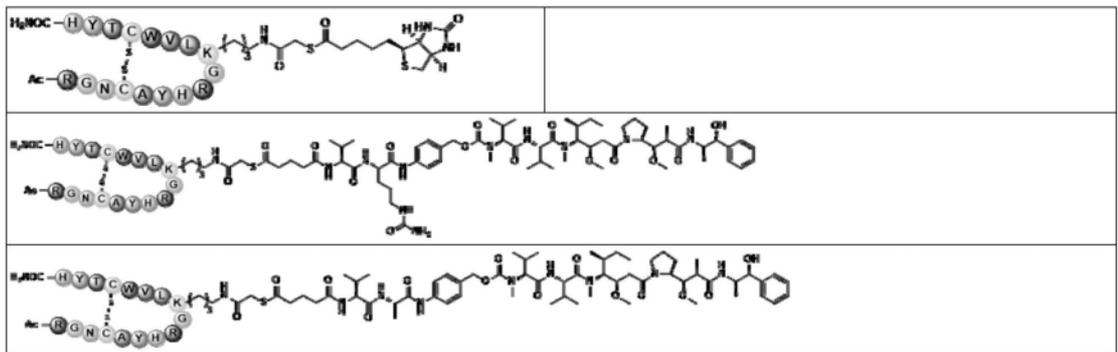
[0370]



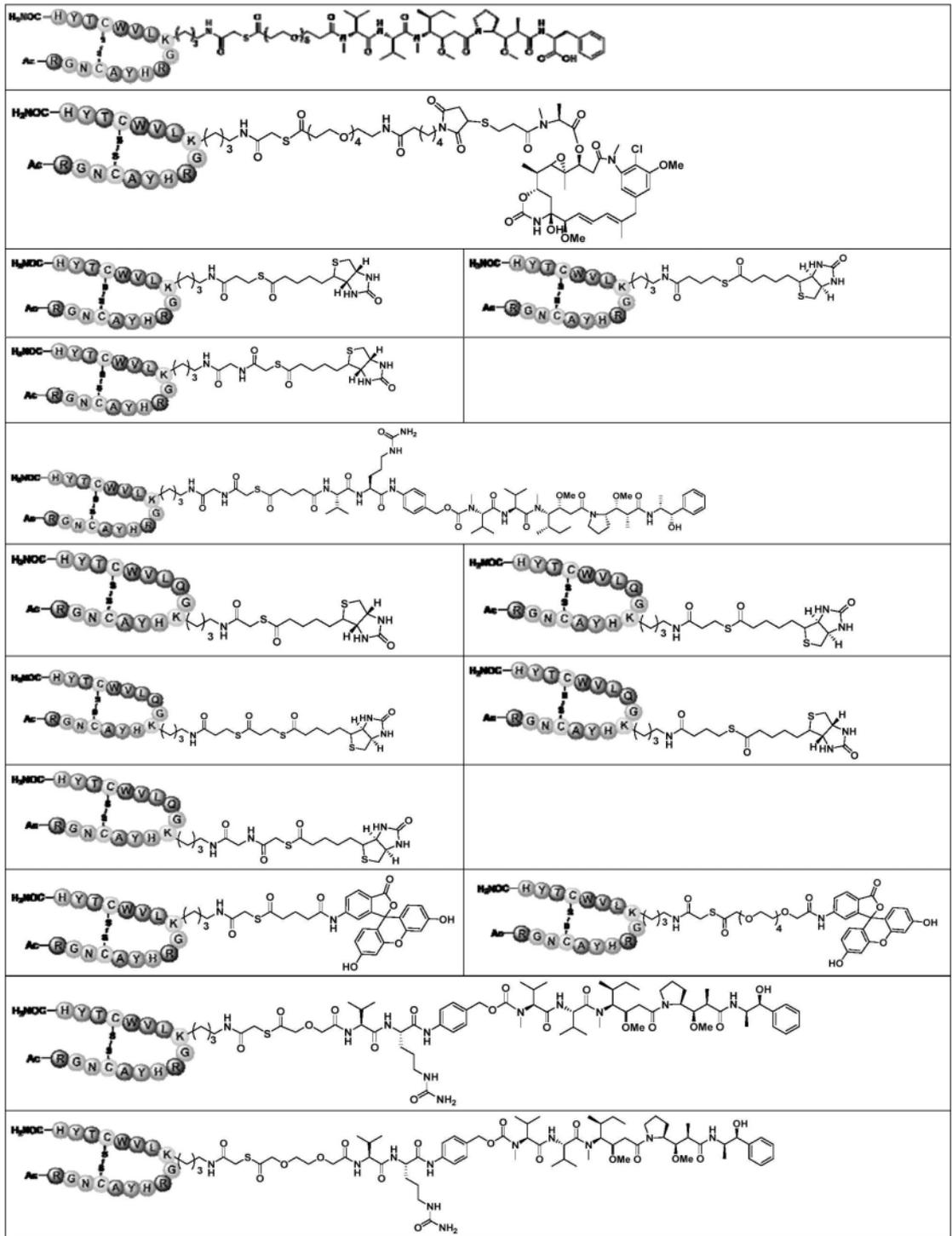
[0371] 其中,Ac为N端保护基或不存在(较佳地为乙酰基)。

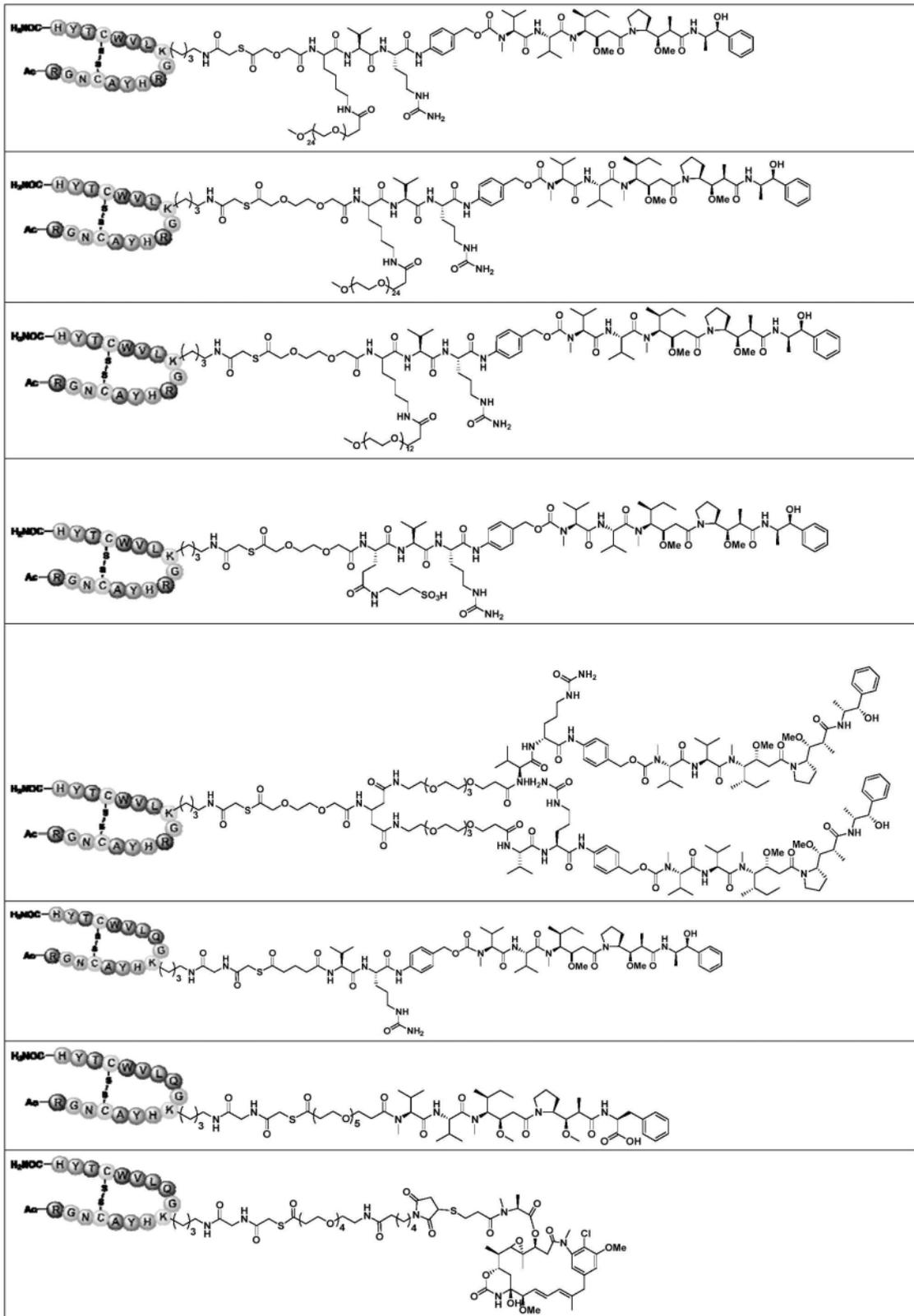
[0372] 表A2

[0373]



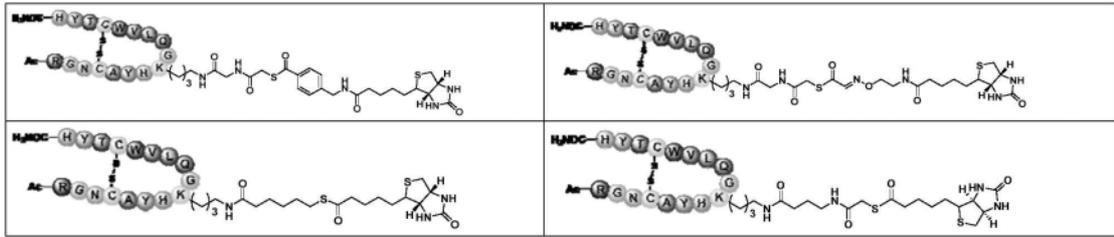
[0374]





[0375]

[0376]



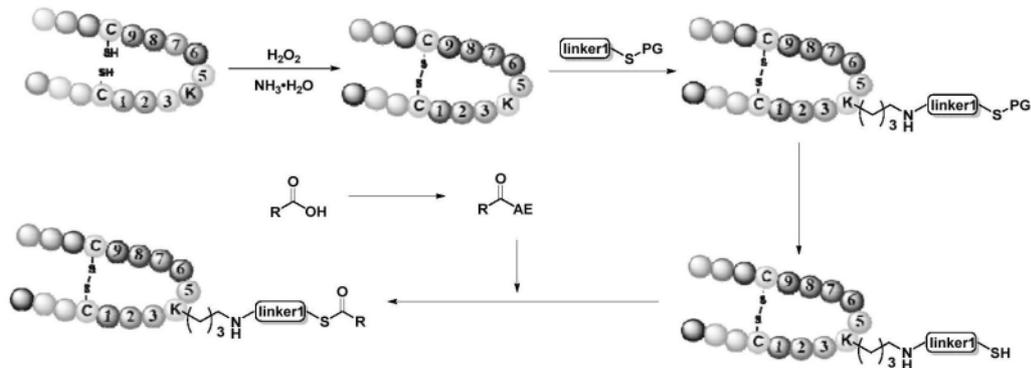
[0377] 其中,Ac为N端保护基或不存在(较佳地为乙酰基)。

[0378] 优选地,所述的亲和片段导向的可裂解片段(酰基转移试剂),可以直接将R基团转移到天然抗体(Ab)上,实现抗体的氨基酸选择性修饰,形成抗体的官能团化修饰、荧光修饰、药物偶联,多肽偶联、mRNA偶联等,形成如下式(V)所示的抗体修饰结构:

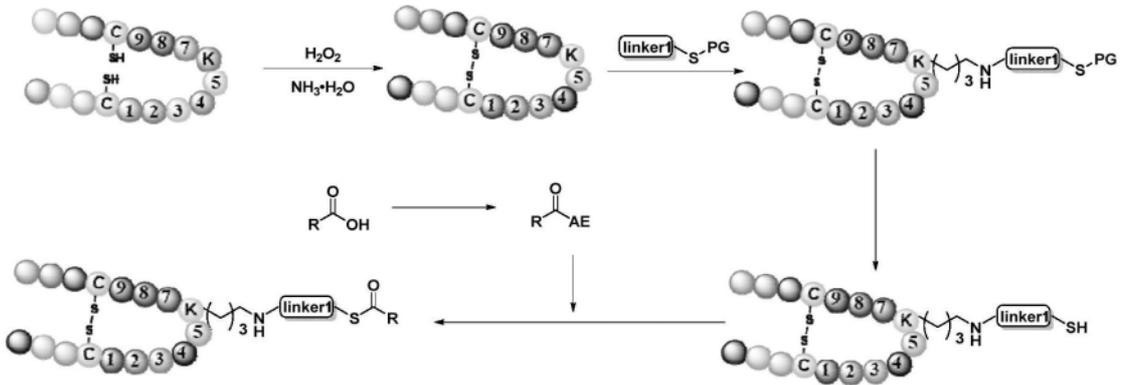
[0379] Ab-NHCO-R (V)

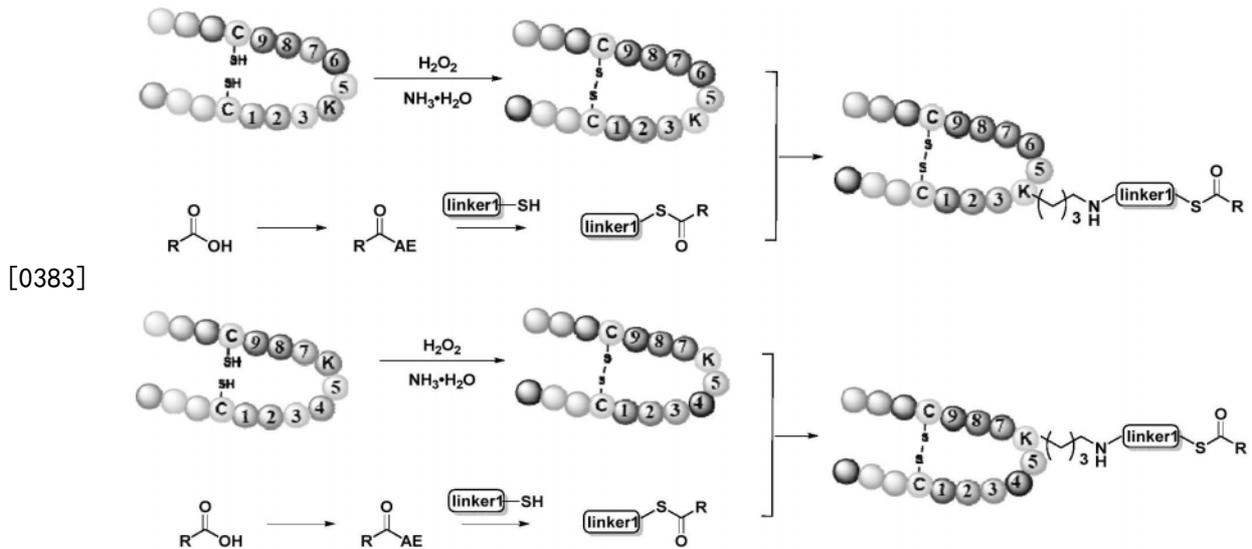
[0380] 其中,Ab为抗体,-NHCO-为酰胺键结构,R为修饰到抗体上的修饰片段。

[0381] 在本发明的另一个方面,提供了一种如上所述的亲和片段导向的可裂解片段的制备方法,其如下任一反应式所示:



[0382]





[0384] 其中, linker 1为 $-L^1-W^1-A^1-$; PG为硫醇以外任意巯基保护基团, 如Trt-、Acm-、Mob等; AE为任意活性酯形式, 如NHS酯、酰氯、酰基叠氮、硫酯、对硝基苯酚酯等; L^1 、 W^1 、 A^1 、圆圈1-9、圆圈K、圆圈C、linker和R如前定义。

[0385] 在另一个实施方案中, 所述方法包括以下步骤:

[0386] 步骤1: 亲和片段的合成: 通过固相合成获得多肽后, 将其溶解于DMSO中使终浓度为5mM, 加入过氧化氢(10mM)、氨水(100mM), 室温搅拌过夜, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得亲和片段。

[0387] 步骤2: 带保护的亲和片段-巯基衍生物的合成

[0388] 步骤3: 亲和片段-巯基衍生物的合成: 通过相应的脱保护策略得亲和片段-巯基衍生物粗品。

[0389] 步骤4: 亲和片段导向的可裂解片段的制备: 将上述亲和片段-巯基衍生物粗品与羧酸化合物的活性酯形式混合LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干即得亲和片段导向的可裂解片段。

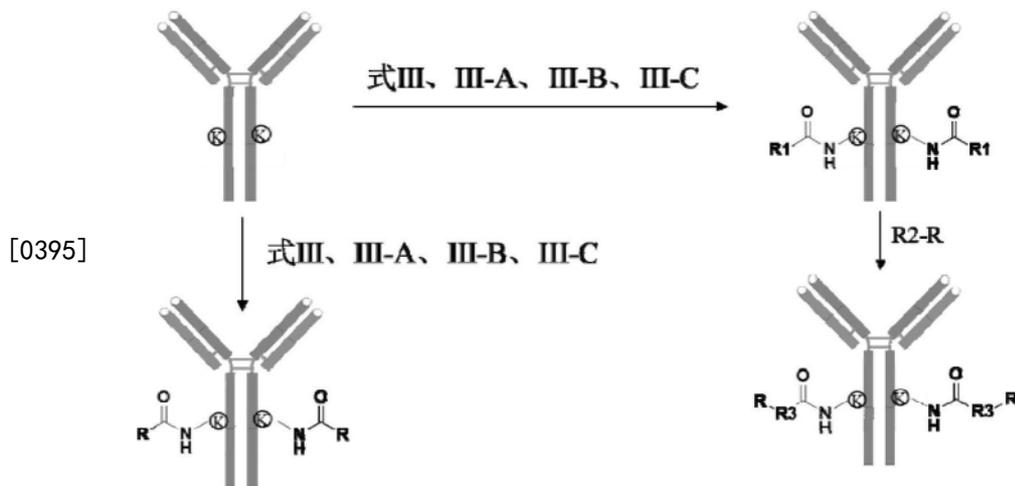
[0390] 在另一个实施方案中, 所述方法包括以下步骤:

[0391] 步骤1: 亲和片段的合成: 通过固相合成获得多肽后, 将其溶解于DMSO中使终浓度为5mM, 加入过氧化氢(10mM)、氨水(100mM), 室温搅拌过夜, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得亲和片段。

[0392] 步骤2: 可裂解片段的合成: 利用羧酸化合物的活性酯形式与巯基衍生物反应得到可裂解片段——硫酯化合物。

[0393] 步骤3: 亲和片段导向的可裂解片段的制备: 亲和片段与可裂解片段通过缩合、还原胺化等反应获得亲和片段导向的可裂解片段。

[0394] 在本发明的一个方面, 提供一种基于上述亲和片段导向的可裂解片段(即导向基-硫酯-载体分子复合物)的定点抗体药物偶联物的制备方法(或抗体或Fc融合蛋白定点修饰方法), 如以下反应式所示:



[0396] 其中,R为偶联到抗体上的修饰结构,R1和R2为生物正交基团,R3为R1与R2反应形成的接头结构。

[0397] 优选地,所述制备方法或定点修饰方法包括式(I)所示复合物(如前所述),与抗体或Fc融合蛋白孵育,实现抗体或Fc融合蛋白Fc区域特定位点赖氨酸的定点修饰。

[0398] 优选地,所述抗体或Fc融合蛋白具有与式(I)所示复合物的亲和片段或序列。

[0399] 优选地,抗体或Fc结构为人IgG来源

[0400] 优选地,与(I)所示复合物相互作用形成的共价修饰区域,由连续1-10个氨基酸残基组成的区域,其中所述靶区由人IgG Fc区域中的第246位-248位的氨基酸残基形成的区域。

[0401] 优选地,其中所述靶区由人IgG Fc区域中的第246位或第248位为赖氨酸残基。

[0402] 优选地,所述的抗体或Fc融合蛋白,其中,所述区域的选择性为90%以上。

[0403] 优选地,抗体药物偶联物或者定点修饰后的抗体或Fc融合蛋白

[0404] 本发明的主要优点包括

[0405] (a) 本发明提供的偶联物用于修饰蛋白如抗体时修饰效率高(>95%)。

[0406] (b) 本发明提供的偶联物可直接修饰在蛋白需被修饰部位的氨基酸残基的侧链氨基上而无需预先对该侧链氨基先进行修饰。

[0407] (c) 本发明提供的偶联物对抗体活性的影响小。

[0408] (d) 本发明提供的偶联物对抗体修饰操作简便,对pH,浓度无严苛的要求(pH 5.5-8.0,抗体浓度0.5mg/mL-10mg/mL),便于技术推广。

[0409] (e) 本发明构建的方法用途广泛,可用于构建抗体快速修饰平台,即抗体的多样化修饰与抗体药物偶联物(ADC)的制备。

[0410] (f) 本发明构建的方法首次实现了抗体的一步定点无痕修饰。

[0411] (g) 本发明构建的方法可用于一步制备定点修饰的ADC,有望构建大容量ADC库,用于ADC的药物连接子的系统筛选与优化。

[0412] (h) 本发明提供的硫酯片段作为酰基转移试剂,与Fc结合肽的特定位点连接,可以实现小分子药物的“一步”高效定点偶联,且兼容多样性的药物连接子结构,底物适用性广泛。

[0413] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明

而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0414] 除非另有说明,各实施例中的检测方法和条件如下:

[0415] ESI-TOFMS

[0416] 流动相A:0.1%FA的水溶液,流动相B:0.1%FA的乙腈溶液。

[0417] 方法A:用于小分子化合物的质谱分析。使用C18色谱柱(ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1x50mm),其液相程序为0-0.2-1.5-1.8-2.0-2.5分钟时对应流动相B为10-10-70-70-10-10%,检测波长为214nm,柱温:35 $^{\circ}$ C。

[0418] 方法B:用于抗体及ADC分子的质谱分析。使用C4柱(ACQUITY UPLC Protein BEH C4, 1.7 μ m, 2.1mm x 50mm),其液相程序为0-2.0-6.0-7.2-7.3-7.6-7.7-8.0-8.1-10.0分钟时对应流动相B为5-5-90-90-5-90-5-90-5-5%,检测波长为280nm,柱温:80 $^{\circ}$ C。

[0419] 疏水色谱分析

[0420] 将待测ADC分子使用1x PBS稀释至5mg/mL,进样5 μ L。流动相A:0.1M磷酸钠,1.5M硫酸铵缓冲液,pH=7.0;流动相B:0.1M磷酸钠缓冲液,pH=7.0,流速1mL/min,0-15min,线性梯度0-100%流动相B。检测波长为280nm。

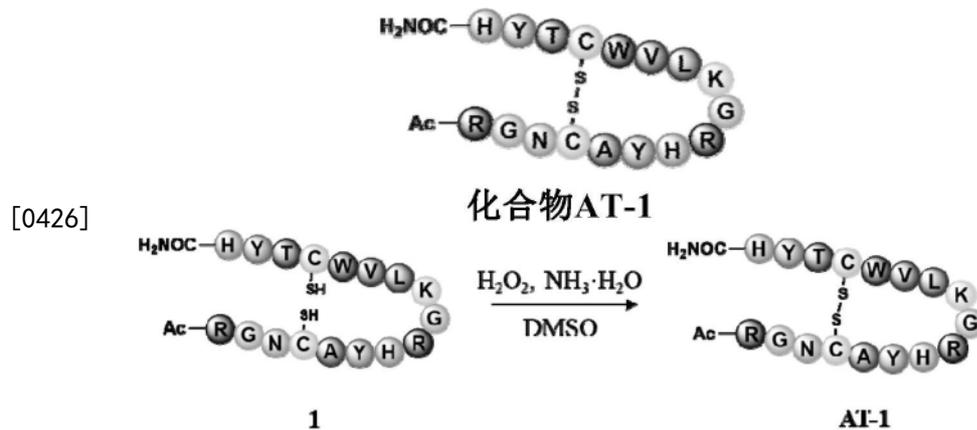
[0421] 分子排阻色谱分析

[0422] 将待测ADC分子使用1x PBS稀释至1mg/mL,60 $^{\circ}$ C PCR仪加热48h,0h,6h,12h,24h,48h分别取点进行SEC分析,每个时间点取样15 μ L。SEC分析使用流动相为150mM磷酸钠,pH=7.4,流速为1mL/min,等度洗脱15min,检测波长为280nm。

[0423] I:亲和片段的制备

[0424] 制备例1:化合物AT-1的合成

[0425] 化合物AT-1的结构以及合成方法如下:



[0427] 称取化合物1 (200mg, 0.095mmol) 溶解于DMSO中使终浓度为5mM,加入过氧化氢(10mM)、氨水(100mM),室温搅拌过夜,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干后得到白色粉末即化合物AT-1(产率91%)。HRMS,计算值 $C_{93}H_{135}N_{31}O_{22}S_2$: $[M+H]^+$ 2102.9918, $[M+2H]^{2+}$ 1051.9998, $[M+3H]^{3+}$ 701.6691, $[M+4H]^{4+}$ 526.5038测量值701.6684, 526.5048。

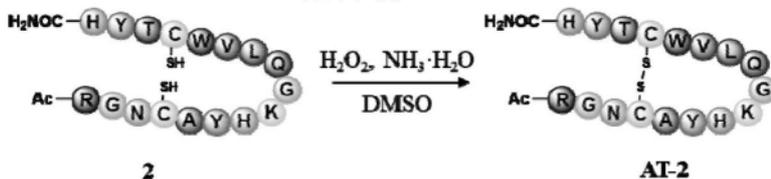
[0428] 制备例2:化合物AT-2的合成

[0429] 化合物AT-2的结构以及合成方法如下:



[0430]

化合物AT-2



[0431] 称取化合物2 (200mg, 0.096mmol) 溶解于DMSO中使终浓度为5mM, 加入过氧化氢 (10mM)、氨水 (100mM), 室温搅拌过夜, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干后得到白色粉末即化合物AT-2 (产率90%)。HRMS, 计算值 $C_{92}H_{131}N_{29}O_{23}S_2$: $[M+H]^+$ 2074.9491, $[M+2H]^{2+}$ 1037.9785, $[M+3H]^{3+}$ 692.3216, 测量值1037.9715, 692.3156。

[0432] II: 亲和片段-巯基衍生物的制备

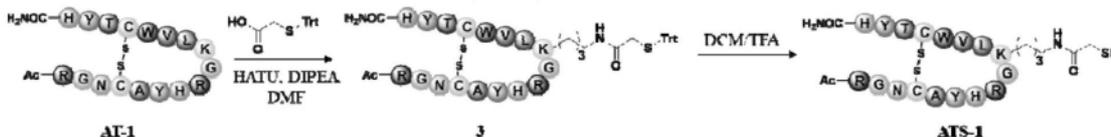
[0433] 制备例3: 化合物ATS-1的合成

[0434] 化合物ATS-1的结构以及合成方法如下:



[0435]

化合物ATS-1



[0436] 步骤1: 称取2-(三苯甲硫基)乙酸 (15.7mg, 0.047mmol) 溶解于DMF中, 依次加入HATU (7.14mg, 0.0188mmol), DIPEA (4.84 μ L, 0.028mmol) 以及化合物AT-1 (20mg, 0.0094mmol), 室温搅拌1h, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末即化合物3 (产率92%)。HRMS, 计算值 $C_{114}H_{151}N_{31}O_{23}S_3$: $[M+H]^+$ 2419.0839, $[M+3H]^{3+}$ 807.0332, $[M+4H]^{4+}$ 605.5269, 测量值807.0342, 605.5232。

[0437] 步骤2: 称取化合物3 (15mg) 溶于500 μ L二氯甲烷中, 冰浴条件下, 加入450 μ L三氟乙酸、50 μ L三异丙基硅烷, 室温反应1h后, N_2 吹干, 得化合物ATS-1。HRMS, 计算值 $C_{95}H_{137}N_{31}O_{23}S_3$: $[M+H]^+$ 2176.9744, $[M+3H]^{3+}$ 726.3300, $[M+4H]^{4+}$ 544.9995, 测量值726.3278, 545.0035。

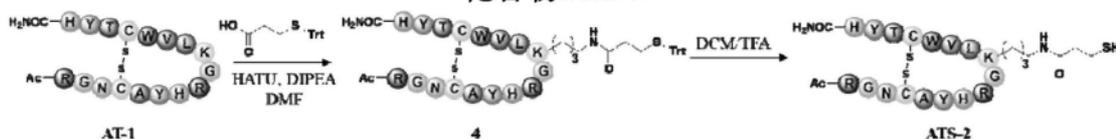
[0438] 制备例4: 化合物ATS-2的合成

[0439] 化合物ATS-2的结构以及合成方法如下:



化合物ATS-2

[0440]



[0441] 步骤1:称取3-(三苯甲硫基)丙酸(16.36mg,0.047mmol)溶解于DMF中,依次加入HATU(7.14mg,0.0188mmol),DIPEA(4.84 μ L,0.028mmol)以及化合物AT-1(20mg,0.0094mmol),室温搅拌1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末即化合物4(产率89%)。HRMS,计算值 $C_{115}H_{153}N_{31}O_{23}S_3$: $[M+H]^+$ 2433.0996, $[M+3H]^{3+}$ 811.7051, $[M+4H]^{4+}$ 609.0308,测量值811.7012,609.0299。

[0442] 步骤2:称取化合物4(15mg)溶于500 μ L二氯甲烷中,冰浴条件下,加入450 μ L三氟乙酸、50 μ L三异丙基硅烷,室温反应1h后, N_2 吹干,得化合物ATS-2。HRMS,计算值 $C_{96}H_{139}N_{31}O_{23}S_3$: $[M+H]^+$ 2190.9900, $[M+3H]^{3+}$ 731.0019, $[M+4H]^{4+}$ 548.5034,测量值731.0054,548.5102。

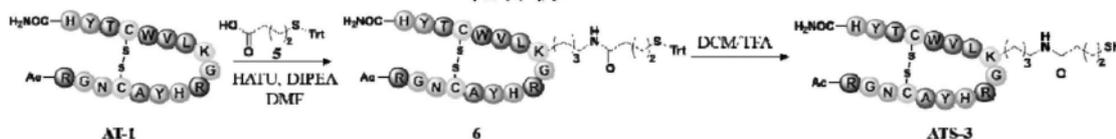
[0443] 制备例5:化合物ATS-3的合成

[0444] 化合物ATS-3的结构以及合成方法如下:



化合物ATS-3

[0445]



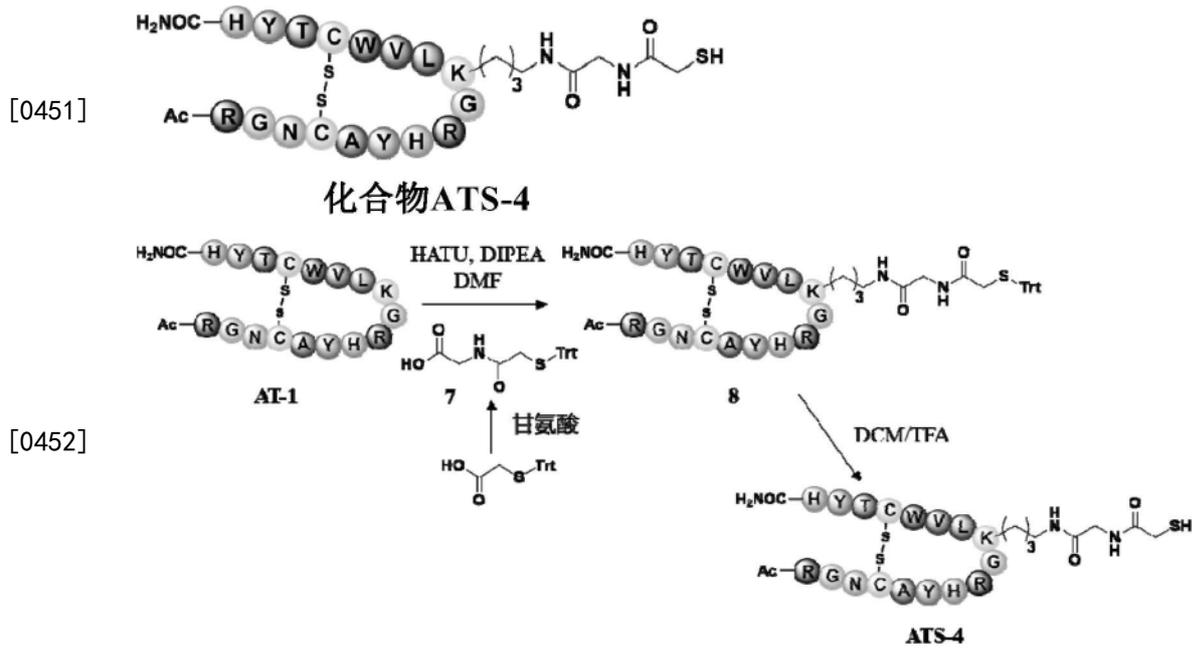
[0446] 步骤1:称取NaH(34.5mg,1.44mmol)溶解于DMF(5mL)中,在 N_2 保护,0 $^{\circ}$ C,冰浴条件下,加入三苯基甲硫醇(200mg,0.72mmol),冰浴搅拌30min后,加入4-溴丁酸(60mg,0.36mmol),待温度缓慢升至室温后,搅拌过夜反应,硅胶柱分离纯化,得化合物5(产率76%)。 1H NMR(600MHz,DMSO- d_6) δ 12.02(s,1H),7.33-7.15(m,15H),2.12(t,J=7.3Hz,2H),2.08(t,J=7.4Hz,2H),1.48(p,J=7.3Hz,2H)。 ^{13}C NMR(151MHz,DMSO) δ 173.70,144.50,129.08,128.02,126.70,66.02,32.72,30.72,23.56。

[0447] 步骤2:称取化合物5(17mg,0.047mmol)溶解于DMF中,依次加入HATU(7.14mg,0.0188mmol),DIPEA(4.84 μ L,0.028mmol)以及化合物AT-1(20mg,0.0094mmol),室温搅拌1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末即化合物6(产率91%)。HRMS,计算值 $C_{116}H_{155}N_{31}O_{23}S_3$: $[M+H]^+$ 2447.1152, $[M+3H]^{3+}$ 816.3770, $[M+4H]^{4+}$ 612.5347,测量值816.3715,612.5382。

[0448] 步骤3:称取化合物6(15mg)溶于500 μ L二氯甲烷中,冰浴条件下,加入450 μ L三氟乙酸、50 μ L三异丙基硅烷,室温反应1h后, N_2 吹干,得化合物ATS-3。HRMS,计算值 $C_{97}H_{141}N_{31}O_{23}S_3$: $[M+H]^+$ 2205.0057, $[M+3H]^{3+}$ 735.6738, $[M+4H]^{4+}$ 552.0073,测量值735.6742,552.0153。

[0449] 制备例6:化合物ATS-4的合成

[0450] 化合物ATS-4的结构以及合成方法如下:



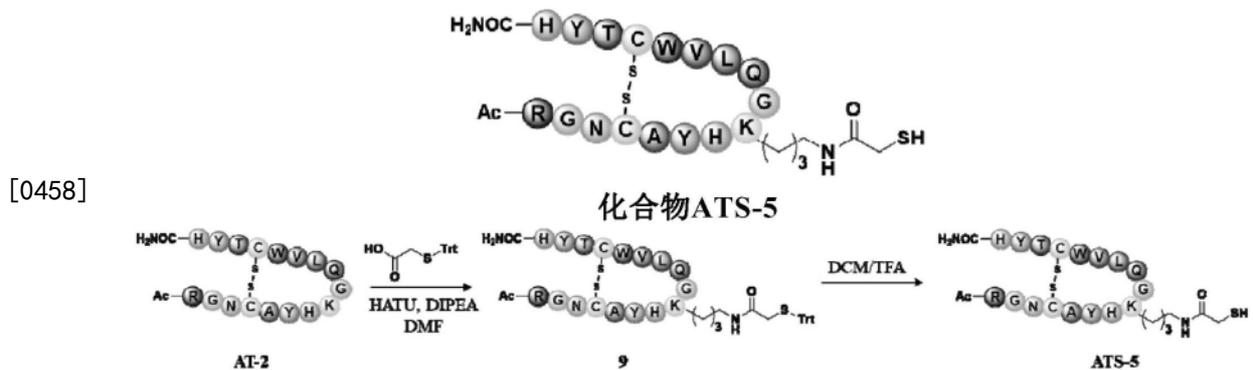
[0453] 步骤1:称取2-(三苯甲硫基)乙酸(334mg,1mmol)溶解于5mL DMF中,加入N-羟基丁二酰亚胺(138mg,1.2mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(230mg,1.2mmol),室温搅拌过夜。然后加入甘氨酸(75mg,1mmol),室温反应2h。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ8.24(t,J=5.8Hz,1H),7.38-7.23(m,15H),3.67(d,J=5.8Hz,2H),2.84(s,2H)。¹³C NMR(126MHz,DMSO) δ170.93,167.63,144.03,129.10,128.11,126.83,66.03,40.89,35.77。

[0454] 步骤2:称取化合物7(18.4mg,0.047mmol)溶解于DMF中,依次加入HATU(7.14mg,0.0188mmol),DIPEA(4.84μL,0.028mmol)以及化合物AT-1(20mg,0.0094mmol),室温搅拌1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末即化合物8(产率87%)。HRMS,计算值C₁₁₆H₁₅₄N₃₂O₂₄S₃: [M+H]⁺2476.1054, [M+3H]³⁺826.0404, [M+4H]⁴⁺619.7822,测量值826.0475,619.1098。

[0455] 步骤3:称取化合物8(15mg)溶于500μL二氯甲烷中,冰浴条件下,加入450μL三氟乙酸、50μL三异丙基硅烷,室温反应1h后,N₂吹干,得化合物ATS-4。HRMS,计算值C₉₇H₁₄₀N₃₂O₂₄S₃: [M+H]⁺2233.9955, [M+3H]³⁺745.3372, [M+4H]⁴⁺559.2548,测量值745.3356,559.2573。

[0456] 制备例7:化合物ATS-5的合成

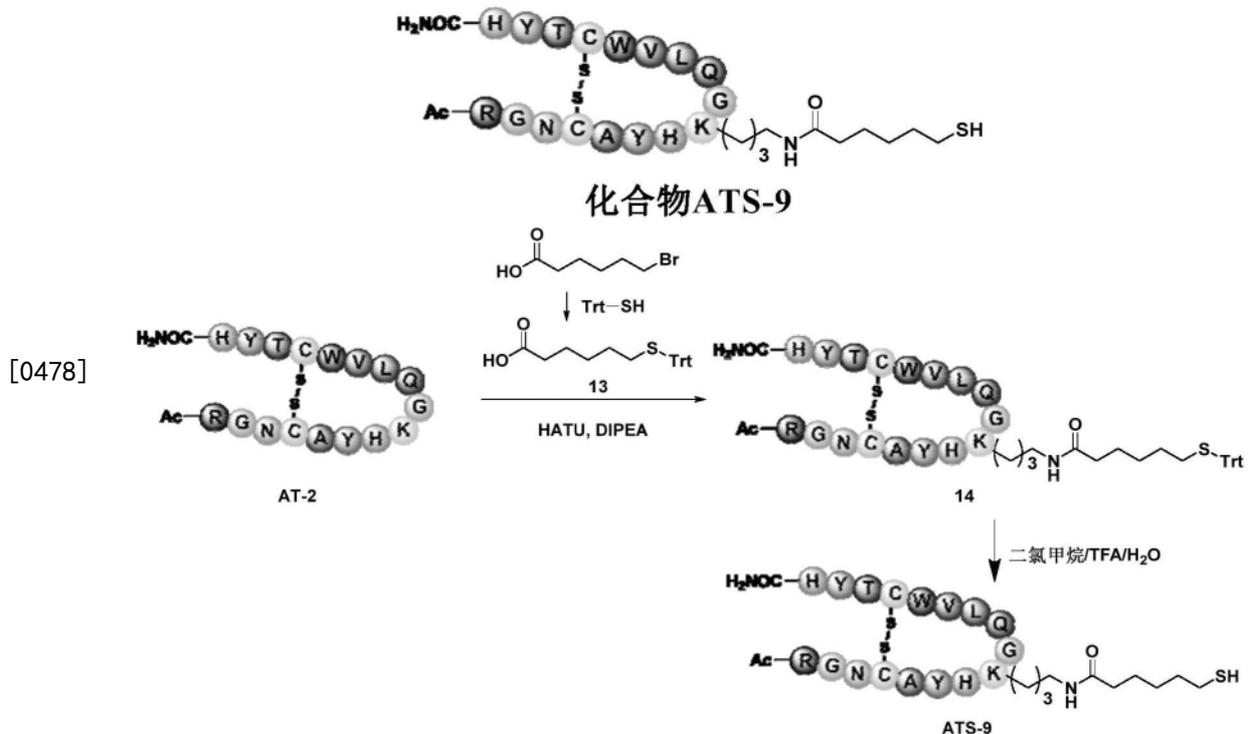
[0457] 化合物ATS-5的结构以及合成方法如下:



$C_{96}H_{136}N_{30}O_{25}S_3$: $[M+H]^+2205.9533$, $[M+3H]^{3+}735.9897$, $[M+4H]^{4+}552.2442$, 测量值735.9910, 552.2418.

[0476] 制备例11:化合物ATS-9的合成

[0477] 化合物ATS-9的结构以及合成方法如下:



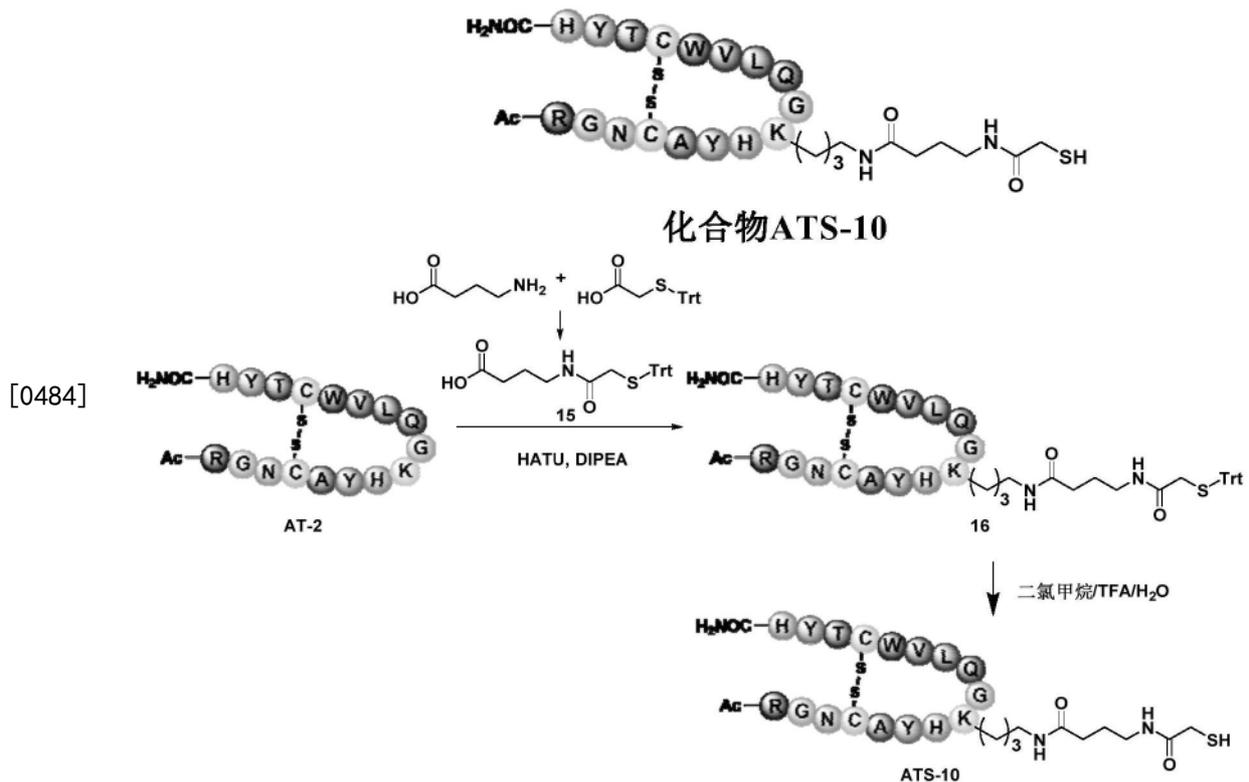
[0479] 步骤1:称取NaH (34.5mg, 1.44mmol) 溶解于DMF (5mL) 中,在 N_2 保护,0℃,冰浴条件下,加入三苯基甲硫醇 (200mg, 0.72mmol),冰浴搅拌30min后,加入6-溴己酸 (70mg, 0.36mmol),待温度缓慢升至室温后,搅拌过夜反应,硅胶柱分离纯化,得化合物13 (产率82%)。

[0480] 步骤2:称取化合物13 (18.3mg, 0.047mmol) 溶解于DMF中,依次加入HATU (7.14mg, 0.0188mmol), DIPEA (4.84μL, 0.028mmol) 以及化合物AT-2 (19.5mg, 0.0094mmol),室温搅拌1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末即化合物14 (产率87%)。HRMS,计算值 $C_{117}H_{155}N_{29}O_{24}S_3$: $[M+H]^+2447.1040$, $[M+3H]^{3+}816.3732$, $[M+4H]^{4+}612.5319$,测量值816.3798, 612.5326。

[0481] 步骤3:称取化合物14 (15mg) 溶于500μL二氯甲烷中,冰浴条件下,加入450μL三氟乙酸、50μL三异丙基硅烷,室温反应1h后, N_2 吹干,得化合物ATS-9。HRMS,计算值 $C_{98}H_{141}N_{29}O_{24}S_3$: $[M+H]^+2204.9945$, $[M+3H]^{3+}735.6700$, $[M+4H]^{4+}552.0044$,测量值735.6712, 552.0019。

[0482] 制备例12:化合物ATS-10的合成

[0483] 化合物ATS-10的结构以及合成方法如下:



[0485] 步骤1:称取2-(三苯甲硫基)乙酸(334mg,1mmol)溶解于5mL DMF中,加入N-羟基丁二酰亚胺(138mg,1.2mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(230mg,1.2mmol),室温搅拌过夜。然后加入4-氨基丁酸(103mg,1mmol),室温反应2h,得化合物15(产率78%)。HRMS,计算值 $C_{25}H_{25}NO_3S$: $[M+H]^+$ 420.1633,测量值420.1649。

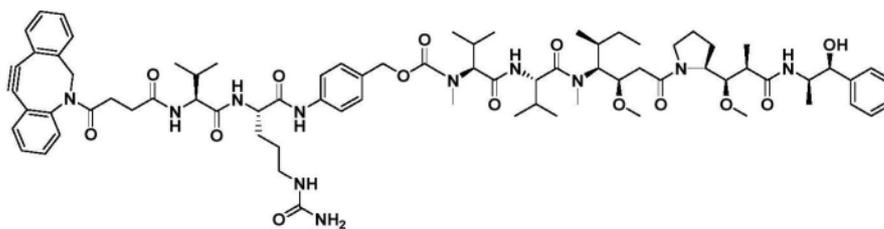
[0486] 步骤2:称取化合物15(19.7mg,0.047mmol)溶解于DMF中,依次加入HATU(7.14mg,0.0188mmol),DIPEA(4.84 μ L,0.028mmol)以及化合物AT-2(19.5mg,0.0094mmol),室温搅拌1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末即化合物16(产率82%)。HRMS,计算值 $C_{117}H_{154}N_{30}O_{25}S_3$: $[M+H]^+$ 2476.0942, $[M+3H]^{3+}$ 826.0366, $[M+4H]^{4+}$ 619.7794,测量值826.0342,619.7758。

[0487] 步骤3:称取化合物16(15mg)溶于500 μ L二氯甲烷中,冰浴条件下,加入450 μ L三氟乙酸、50 μ L三异丙基硅烷,室温反应1h后, N_2 吹干,得化合物ATS-10。HRMS,计算值 $C_{98}H_{140}N_{30}O_{25}S_3$: $[M+H]^+$ 2233.9846, $[M+3H]^{3+}$ 745.3334, $[M+4H]^{4+}$ 559.2520,测量值745.3316,559.2561。

[0488] III:药物连接子的合成

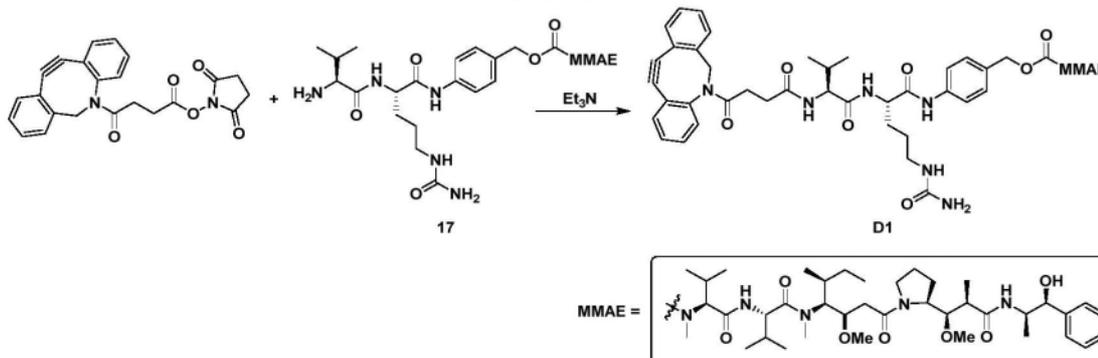
[0489] 制备例13:化合物D-1的合成

[0490] 化合物D-1的结构以及合成方法如下:



化合物D1

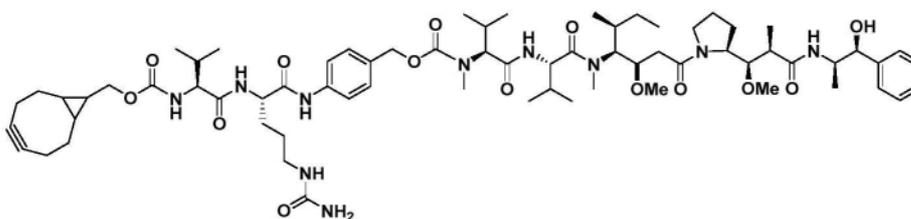
[0491]



[0492] 称取化合物17(10mg, 8.9 μ mol)溶解在200mL DMF中,加入DBC0-CONHS(4.3mg, 10.7 μ mol),三乙胺(3.7mL, 26.7 μ mol),室温搅拌2h,LC-MS监测反应完全,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末即为化合物D1(产率81%)。HRMS,计算值: $C_{77}H_{107}N_{11}O_{14}$: $[M+H]^+$ 1410.8077,测量值1410.8052.

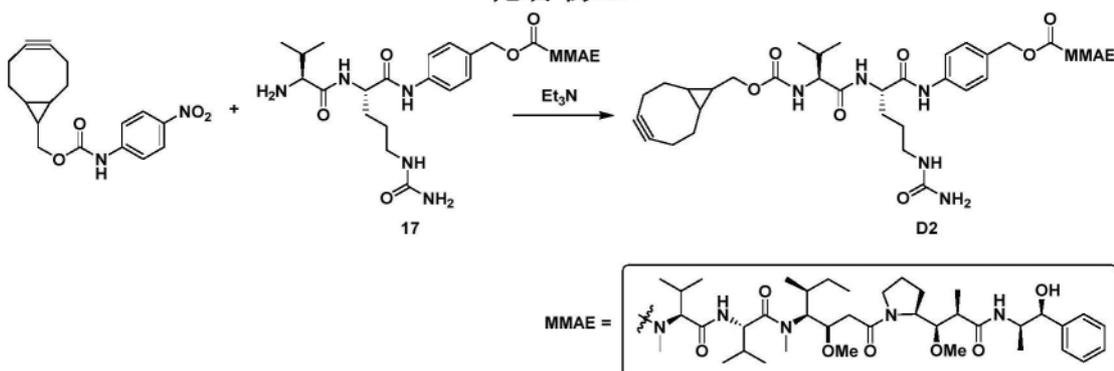
[0493] 制备例14:化合物D-2的合成

[0494] 化合物D-2的结构以及合成方法如下:



化合物D2

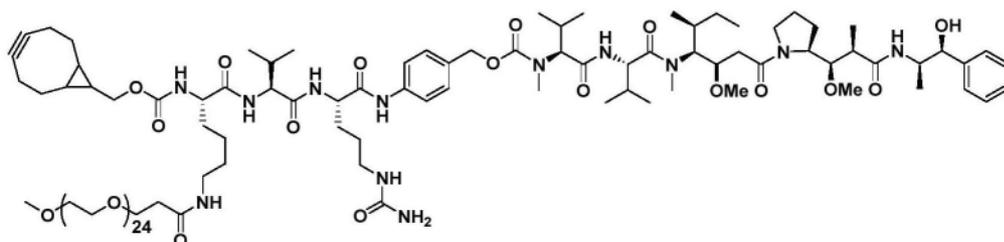
[0495]



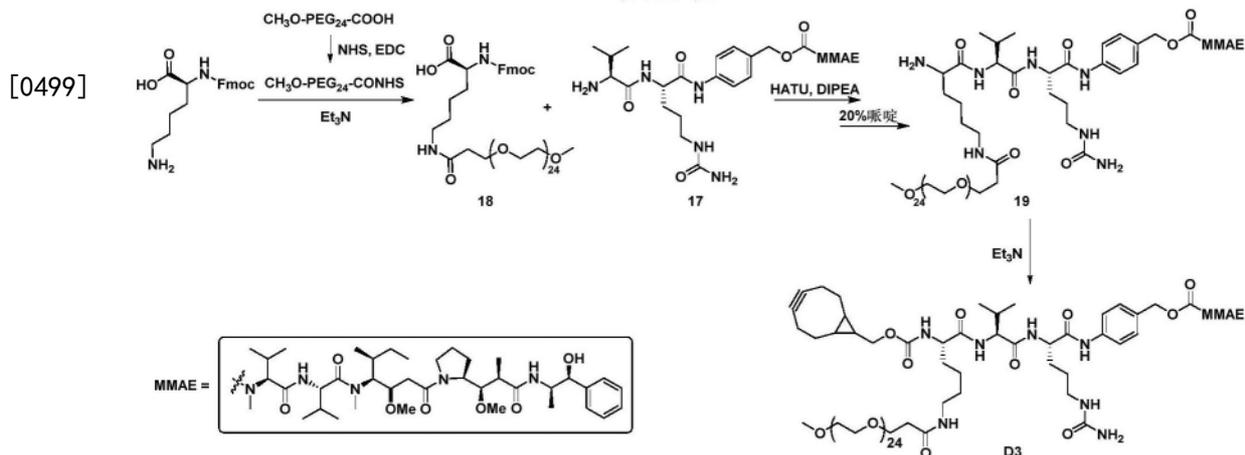
[0496] 称取化合物17(10mg, 8.9 μ mol)溶解在200 μ L DMF中,加入BCN-0-PNP(3.5mg, 10.7 μ mol),三乙胺(3.7 μ L, 26.7 μ mol),室温搅拌3h,LC-MS监测反应完全,使用半制备分离纯化,冻干得化合物D2(产率76%)。HRMS,计算值: $C_{69}H_{106}N_{10}O_{14}$: $[M+H]^+$ 1299.7968,测量值1299.8016.

[0497] 制备例15:化合物D-3的合成

[0498] 化合物D-3的结构以及合成方法如下:



化合物D3



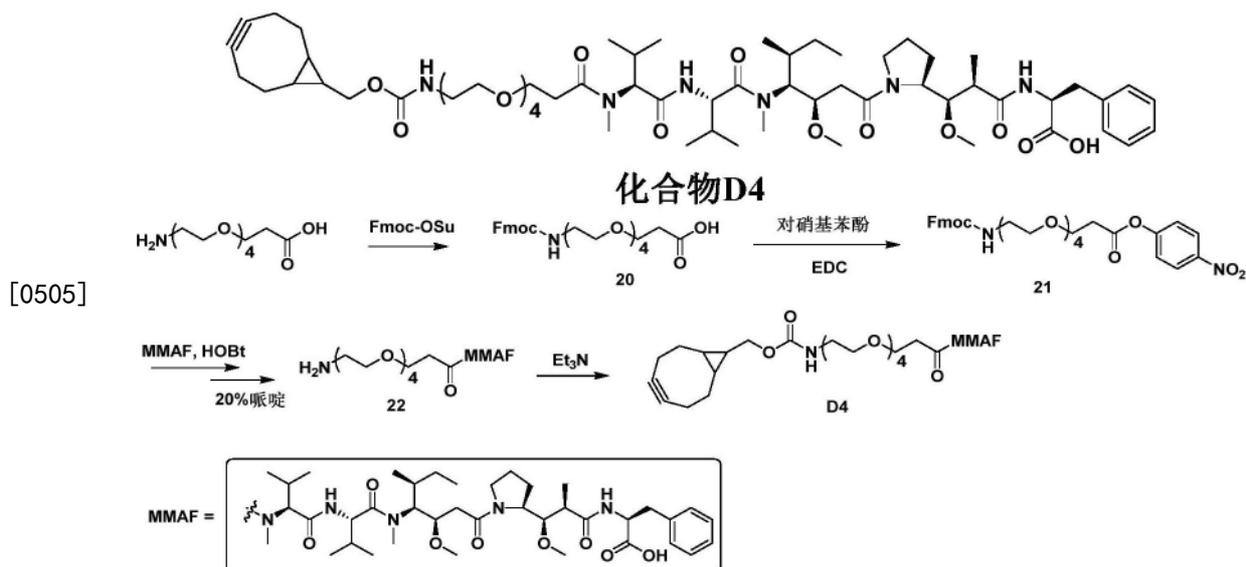
[0500] 步骤1:称取CH₃O-PEG₂₄-COOH (58mg, 0.05mmol) 溶解于乙腈中,加入NHS (6.8mg, 0.06mmol), EDC (7.9μL, 0.06mmol), 室温反应过夜后,加入Fmoc-Lys(NH₂)-OH (18.4mg, 0.05mmol) 的乙腈溶液,室温搅拌2h,LC-MS监测反应完全,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,得化合物18 (产率78%)。HRMS,计算值:C₇₃H₁₂₆N₂O₃₀: [M+H]⁺756.4275, 测量值756.4218。

[0501] 步骤2:称取化合物18 (13.5mg, 8.9μmol) 溶解于DMF中,加入HATU (6.8mg, 17.8μmol), DIPEA (4.6μL, 27.6μmol), 化合物17 (10mg, 8.9μmol), 室温反应2h,LC-MS监测反应完全,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末即化合物19 (产率86%)。HRMS,计算值:C₁₁₆H₂₀₈N₁₂O₃₉: [M+H]⁺2394.4741, [M+3H]³⁺798.8299, 测量值798.8312。

[0502] 步骤3:称取化合物19 (10mg, 4.2μmol) 溶解于DMF中,加入BCN-0-PNP (1.63mg, 5μmol), 三乙胺 (1.7μL, 12.6μmol), 室温搅拌2h,LC-MS监测反应完全,使用半制备分离纯化,冻干得化合物D3 (产率76%)。HRMS,计算值:C₁₂₇H₂₂₀N₁₂O₄₁: [M+H]⁺2570.5577, [M+3H]³⁺857.5244, 测量值857.5267。

[0503] 制备例16:化合物D-4的合成

[0504] 化合物D-4的结构以及合成方法如下:



[0506] 步骤1: $\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}_4-\text{COOH}$ (26.5mg, 0.1mmol) 溶于DMF中, 加入9-芴甲基-N-琥珀酰亚胺基碳酸酯 (67.4mg, 0.2mmol), 三乙胺 (41.6 μL , 0.3mmol), 室温反应3h后, LC-MS监测反应体系, 显示反应完全, 半制备分离纯化后冻干得到化合物20。HRMS, 计算值: $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{NO}_8$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 488.2284, 测量值488.2243。

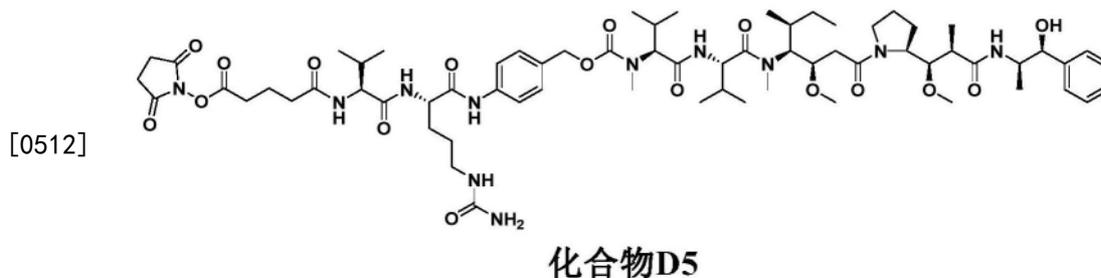
[0507] 步骤2: 称取化合物20 (17mg, 0.035mmol) 溶于DMF中, 加入对硝基苯酚 (9.7mg, 0.07mmol), EDC (12.7 μL , 0.07mmol), 室温反应1h后, LC-MS监测反应体系, 显示反应完全, 半制备分离纯化后冻干得到化合物21。HRMS, 计算值: $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{10}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 609.2448, 测量值609.2252。

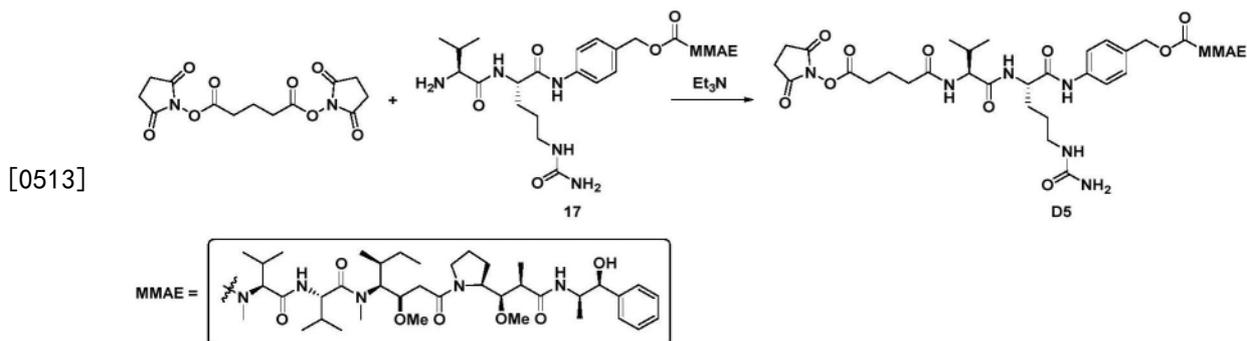
[0508] 步骤3: 称取化合物21 (10mg, 0.016mmol) 溶于DMF中, 加入MMAF (12mg, 0.02mmol), HOBt (0.54mg, 3.2 μmol), 吡啶 (36 μL , 0.45mmol), 室温反应1h, LC-MS监测基本反应完全后, 加入20%哌啶反应15min, 半制备分离纯化后冻干得到化合物22。HRMS, 计算值: $\text{C}_{50}\text{H}_{86}\text{N}_6\text{O}_{13}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 979.6331, 测量值979.6328。

[0509] 步骤4: 称取化合物22 (10mg, 0.01mmol) 溶于DMF中, 加入BCN-0-PNB (9.45mg, 0.03mmol), 三乙胺 (8.3 μL , 0.06mmol), 室温反应4h, LC-MS监测基本反应完全, 半制备分离纯化后冻干得到化合物D4。HRMS, 计算值: $\text{C}_{61}\text{H}_{98}\text{N}_6\text{O}_{15}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1155.7168, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 578.3623, 测量值578.3619。

[0510] 制备例17: 化合物D-5的合成

[0511] 化合物D-5的结构以及合成方法如下:

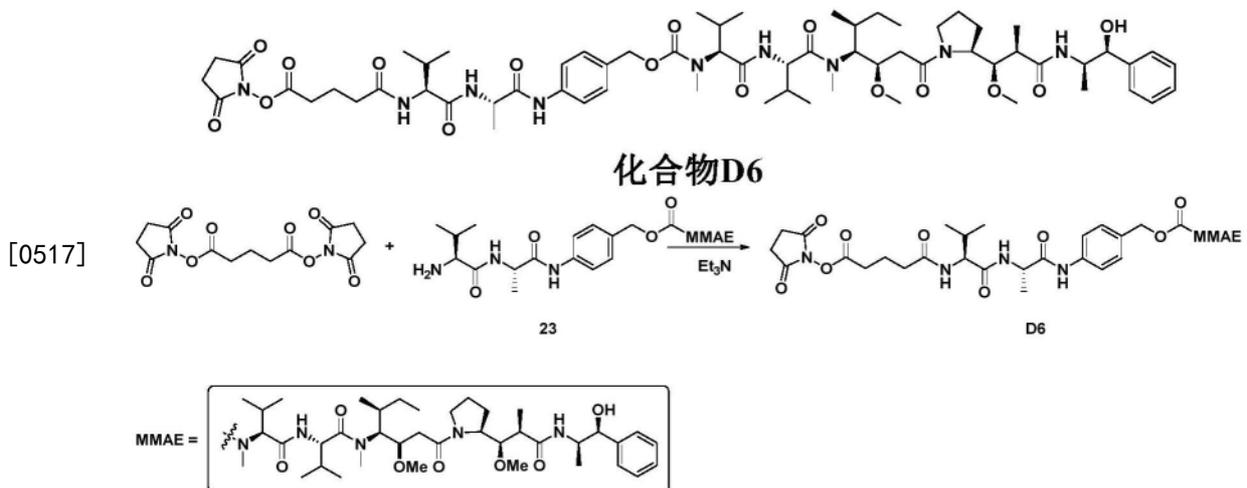




[0514] 称取化合物17(10mg, 9.8 μ mol)溶解于DMF(500 μ L)中,加入双琥珀酰亚胺戊二酸酯(DSG, 15.6mg, 0.048mmol),三乙胺(4 μ L, 0.029mmol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末D5(产率91%)。HRMS,计算值: $C_{67}H_{103}N_{11}O_{17}$: $[M+H]^+$ 1334.7612,测量值1334.7655。

[0515] 制备例18:化合物D-6的合成

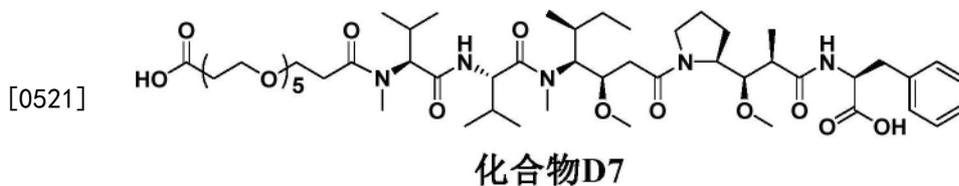
[0516] 化合物D-6的结构以及合成方法如下:

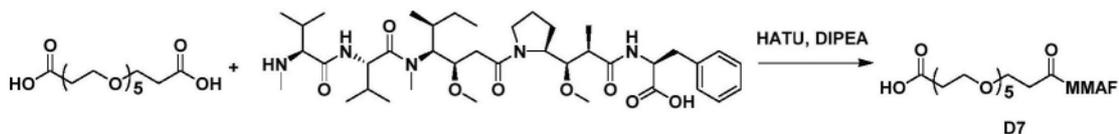


[0518] 称取化合物23(10.1mg, 9.8 μ mol)溶解于DMF(500 μ L)中,加入双琥珀酰亚胺戊二酸酯(DSG, 15.6mg, 0.048mmol),三乙胺(4 μ L, 0.029mmol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末D6(产率85%)。HRMS,计算值: $C_{64}H_{97}N_9O_{16}$: $[M+H]^+$ 1248.7132,测量值1248.7154。

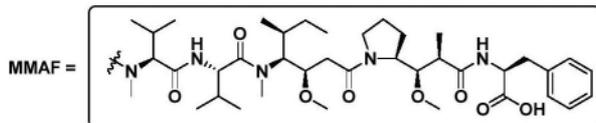
[0519] 制备例19:化合物D-7的合成

[0520] 化合物D-7的结构以及合成方法如下:





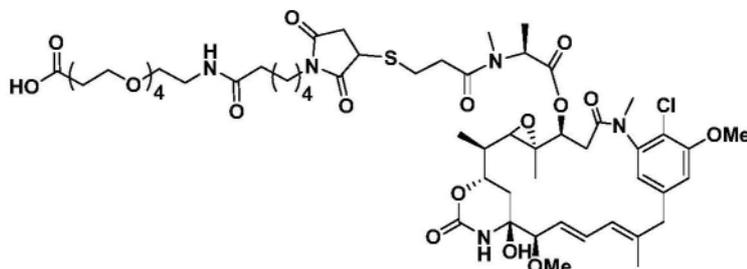
[0522]



[0523] 称取HOOC-PEG₅-COOH (23mg, 0.068mmol) 溶解于DMF (500μL) 中, 加入HATU (26mg, 0.068mmol), DIPEA (23.5μL, 0.136mmol), 药物毒素MMAF (10mg, 0.0136mmol), 室温反应1h后, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末D7 (产率82%)。HRMS, 计算值:C₅₃H₈₉N₅O₁₆: [M+H]⁺ 1052.6383, 测量值1052.6354。

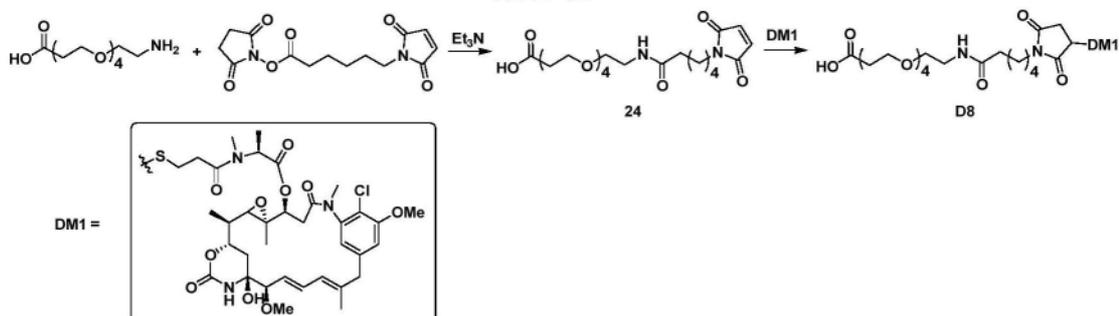
[0524] 制备例20: 化合物D-8的合成

[0525] 化合物D-8的结构以及合成方法如下:



化合物D8

[0526]



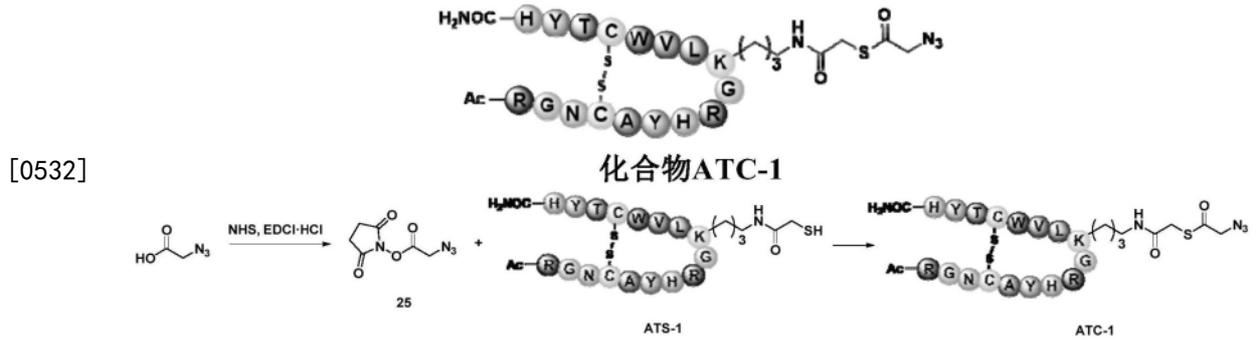
[0527] 步骤1: 称取HOOC-PEG₄-NH₂ (26.5mg, 0.1mmol) 溶解于DMF (400μL) 中, 加入6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯 (30.8mg, 0.1mmol), 三乙胺 (41.6μL, 0.3mmol), 室温搅拌1h, LC-MS监测反应完全, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末, 即为化合物24 (产率86%)。HRMS, 计算值:C₂₀H₃₂N₂O₁₀: [M+H]⁺ 461.2135, 测量值461.2169。

[0528] 步骤2: 称取化合物24 (10mg, 0.022mmol) 溶解于PB 7.4 (500μL), 加入细胞毒素DM1 (16mg, 0.022mmol), 室温搅拌1h, LC-MS监测反应完全, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物D8 (产率87%)。HRMS, 计算值:C₅₅H₈₀C₁N₅O₂₀S: [M+H]⁺ 1198.4884, 测量值1198.4798。

[0529] IV: 亲和片段导向的可裂解片段的制备

[0530] 实施例1: 化合物ATC-1的合成

[0531] 化合物ATC-1的结构以及合成方法如下:

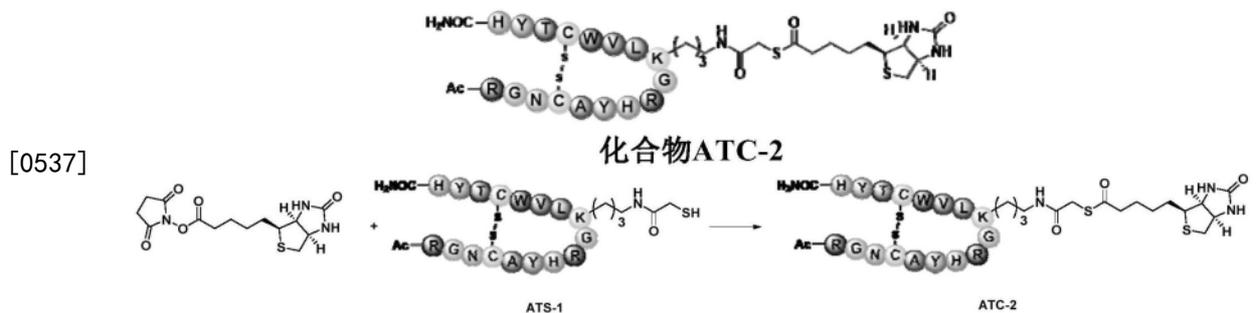


[0533] 步骤1:称取叠氮乙酸(250mg, 2.5mmol)溶解于THF(5mL)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(288mg, 2.5mmol), 0℃搅拌10min后,加入二环己基碳二亚胺(516mg, 2.5mmol),并将反应液于0℃搅拌4h。过滤除去DCU后,收集滤液,加入乙醚(20mL)重结晶,并在4℃下静置过夜。过滤,滤饼用THF(40mL)洗涤并真空干燥,得到白色粉末状即为化合物25(产率82%)。¹H NMR(600MHz, DMSO-d₆) δ4.71(s, 2H), 2.84(s, 4H)。¹³C NMR(151MHz, DMSO) δ169.91, 165.51, 47.50, 25.50。

[0534] 步骤2:称取化合物ATS-1(7mg, 3.2μmol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中,加入化合物25(0.77mg, 3.86μmol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-1(产率71%)。HRMS,计算值:C₉₇H₁₃₈N₃₄O₂₄S₃: [M+H]⁺ 2259.9861, [M+3H]³⁺ 754.0006, [M+4H]⁴⁺ 565.7524, 测量值753.9815, 565.7080。

[0535] 实施例2:化合物ATC-2的合成

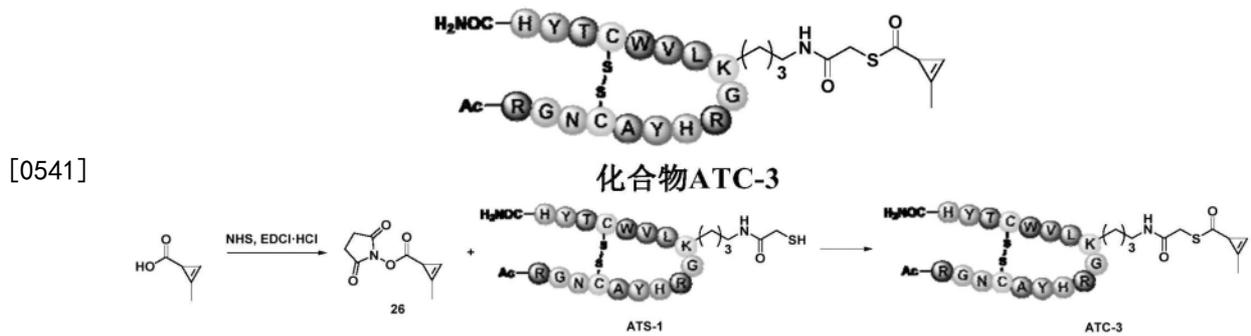
[0536] 化合物ATC-2的结构以及合成方法如下:



[0538] 称取化合物ATS-1(7mg, 3.2μmol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中,加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(1.32mg, 3.86μmol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-2(产率77%)。HRMS,计算值:C₁₀₅H₁₅₁N₃₃O₂₅S₄: [M+H]⁺ 2403.0520, [M+3H]³⁺ 801.6892, [M+4H]⁴⁺ 601.5188, 测量值801.6801, 601.5139。

[0539] 实施例3:化合物ATC-3的合成

[0540] 化合物ATC-3的结构以及合成方法如下:

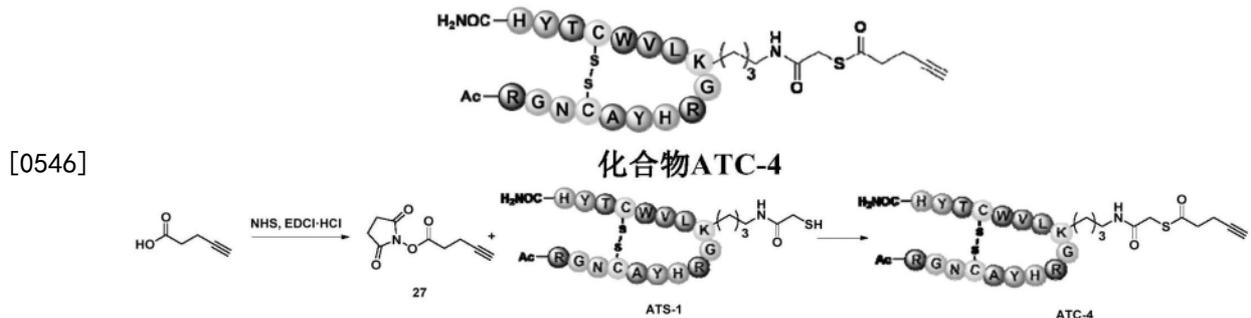


[0542] 步骤1:称取2-甲基-2-环丙烯甲酸(0.4mg,4 μ mol)溶解于DMF(50 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.69mg,6 μ mol),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15mg,6 μ mol),室温反应过夜后,得化合物26粗品。

[0543] 步骤2:称取化合物ATS-1(7mg,3.2 μ mol)溶于DMF中(50 μ L)中,加至步骤1所得反应液,再加入PB 7.4缓冲液(200 μ L),室温搅拌30min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-3(产率67%)。HRMS,计算值: $C_{100}H_{141}N_{31}O_{24}S_3$: $[M+H]^+$ 2257.0006, $[M+3H]^{3+}$ 753.0054, $[M+4H]^{4+}$ 565.0060,测量值753.0013,565.0059。

[0544] 实施例4:化合物ATC-4的合成

[0545] 化合物ATC-4的结构以及合成方法如下:

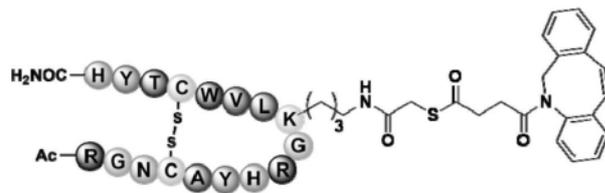


[0547] 步骤1:称取戊炔酸(0.4mg,4 μ mol)溶解于DMF(50 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.69mg,6 μ mol),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15mg,6 μ mol),室温反应过夜后,得化合物27粗品。

[0548] 步骤2:称取化合物ATS-1(7mg,3.2 μ mol)溶于DMF中(50 μ L)中,加至步骤1所得反应液,再加入PB 7.4缓冲液(200 μ L),室温搅拌30min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-4(产率59%)。HRMS,计算值: $C_{100}H_{141}N_{31}O_{24}S_3$: $[M+H]^+$ 2257.0006, $[M+3H]^{3+}$ 753.0054, $[M+4H]^{4+}$ 565.0060,测量值753.0051,565.0086。

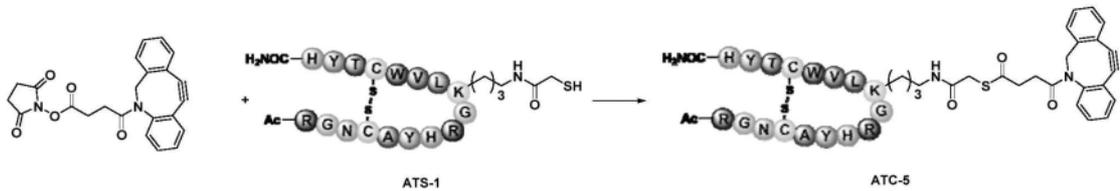
[0549] 实施例5:化合物ATC-5的合成

[0550] 化合物ATC-5的结构以及合成方法如下:



[0551]

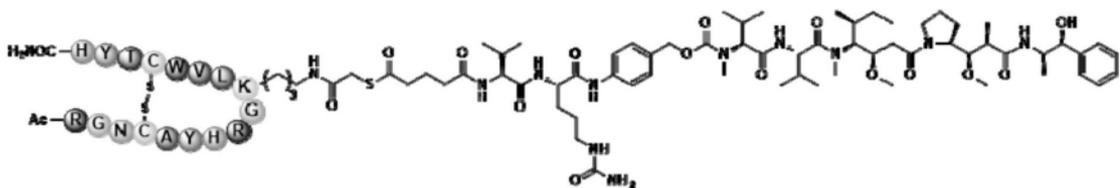
化合物ATC-5



[0552] 称取化合物ATS-1 (7mg, 3.2 μ mol) 溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入DBC0-NHS (1.55mg, 3.86 μ mol), 室温搅拌15min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-6 (产率68%)。HRMS, 计算值: C₁₁₄H₁₅₀N₃₂O₂₅S₃: [M+H]⁺2464.0690, [M+3H]³⁺822.0282, [M+4H]⁴⁺616.7731, 测量值822.0264, 616.7715。

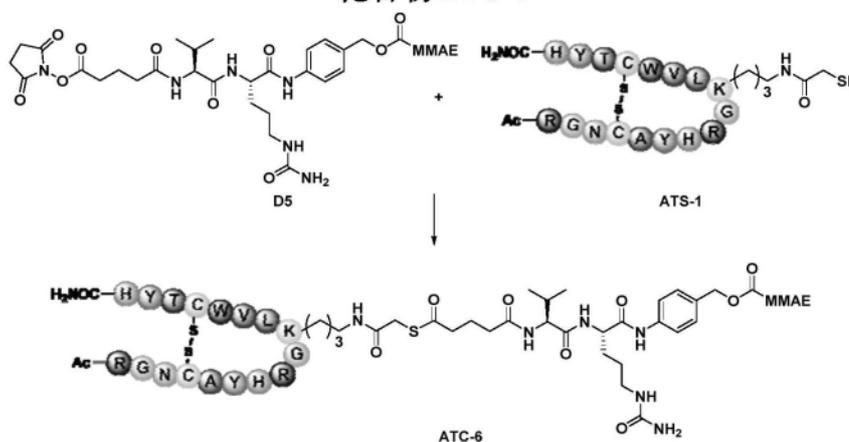
[0553] 实施例6: 化合物ATC-6的合成

[0554] 化合物ATC-6的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-6

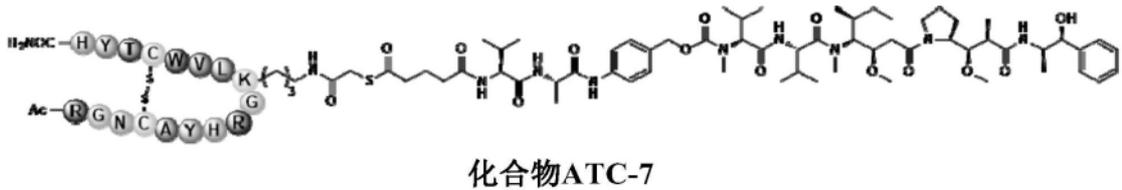
[0555]



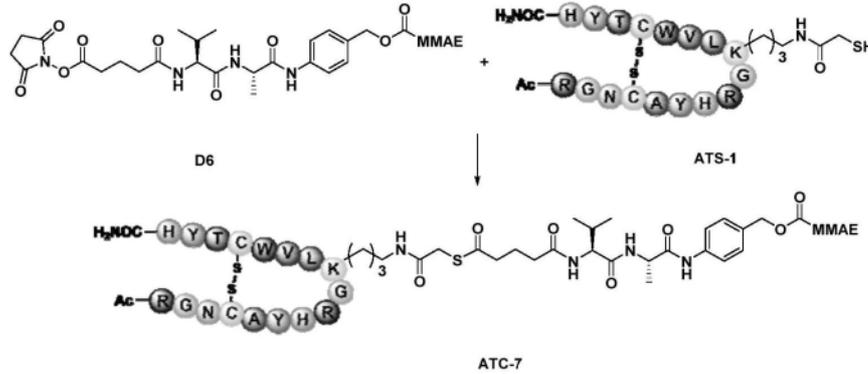
[0556] 称取化合物D5 (13.3mg, 0.01mmol) 溶解于DMF/PB7.4=1/1混合溶液中, 加入化合物ATS-1, 室温反应30min后, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末即为化合物ATC-6 (产率76%)。HRMS, 计算值: C₁₅₈H₂₃₅N₄₁O₃₇S₃: [M+H]⁺3395.7007, [M+3H]³⁺1132.5721, [M+4H]⁴⁺849.6810, 测量值1133.5587, 849.6596。

[0557] 实施例7: 化合物ATC-7的合成

[0558] 化合物ATC-7的结构以及合成方法如下:



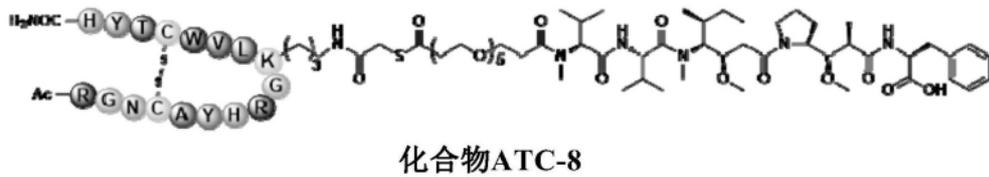
[0559]



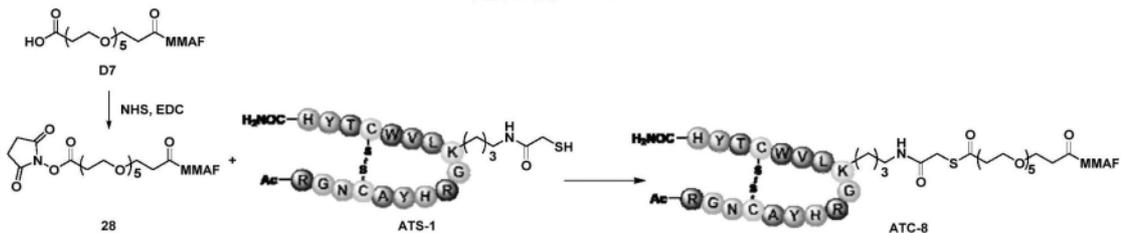
[0560] 称取化合物D6 (12.5mg, 0.01mmol) 溶解于DMF/PB7.4=1/1混合溶液中, 加入化合物ATS-1, 室温反应30min后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-7 (产率81%)。HRMS, 计算值: $C_{155}H_{229}N_{39}O_{36}S_3$: $[M+H]^+$ 3309.6526, $[M+3H]^{3+}$ 1103.8894, $[M+4H]^{4+}$ 828.1690, 测量值 1103.8900, 828.1674。

[0561] 实施例8: 化合物ATC-8的合成

[0562] 化合物ATC-8的结构以及合成方法如下:



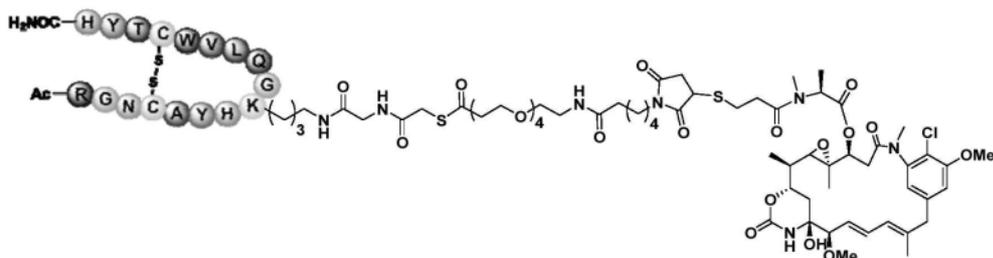
[0563]



[0564] 称取D7 (10.5mg, 0.01mmol) 溶解于DMF中, 加入NHS (1.4mg, 0.012mmol), EDC (2.1μL, 0.012mmol), 室温反应过夜。反应液中加入化合物ATS-1的DMF溶液, 同时加入等体积的0.2M PB 7.4缓冲液, 室温反应2h后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-8 (产率77%)。HRMS, 计算值: $C_{148}H_{224}N_{36}O_{38}S_3$: $[M+H]^+$ 3210.5941, $[M+3H]^{3+}$ 1070.8699, $[M+4H]^{4+}$ 803.4044, 测量值 1070.4196, 803.9044。

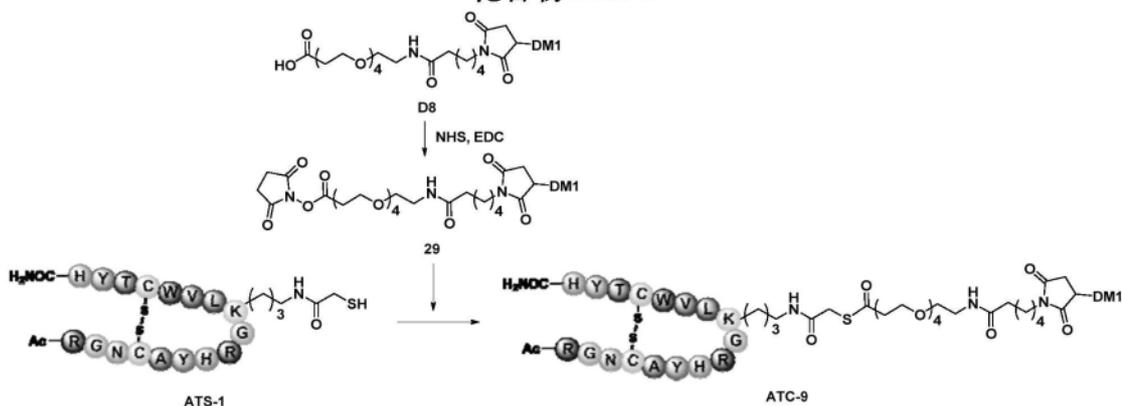
[0565] 实施例9: 化合物ATC-9的合成

[0566] 化合物ATC-9的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-9

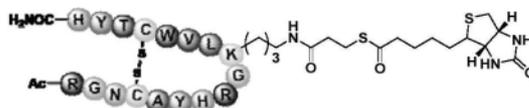
[0567]



[0568] 称取D8 (12mg, 0.01mmol) 溶解于DMF中, 加入NHS (1.4mg, 0.012mmol), EDC (2.1 μ L, 0.012mmol), 室温反应过夜后, 加入ATS-1的DMF溶液, 再加入等体积的0.2M PB 7.4缓冲液, 室温反应2h后, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末即化合物ATC-9 (产率72%)。HRMS, 计算值: $C_{150}H_{215}ClN_{36}O_{42}S_4$: $[M+H]^+$ 3356.4445, $[M+3H]^{3+}$ 1119.4867, $[M+4H]^{4+}$ 839.8669, 测量值 1119.4882, 839.8637。

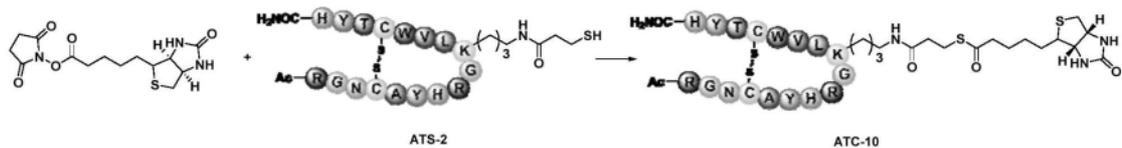
[0569] 实施例10: 化合物ATC-10的合成

[0570] 化合物ATC-10的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-10

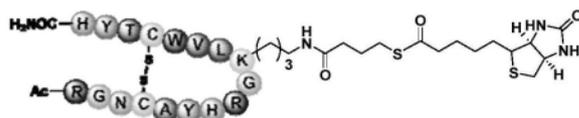
[0571]



[0572] 称取化合物ATS-2 (7mg, 3.2 μ mol) 溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯 (1.32mg, 3.86 μ mol), 室温搅拌15min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-10 (产率79%)。HRMS, 计算值: $C_{106}H_{153}N_{33}O_{25}S_4$: $[M+H]^+$ 2417.0676, $[M+3H]^{3+}$ 806.3611, $[M+4H]^{4+}$ 605.0228, 测量值 806.3648, 605.0256。

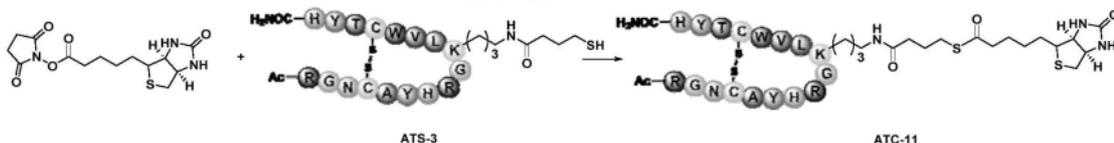
[0573] 实施例11: 化合物ATC-11的合成

[0574] 化合物ATC-11的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-11

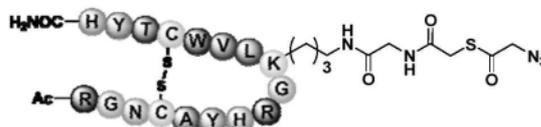
[0575]



[0576] 称取化合物ATS-3(7.05mg, 3.2 μ mol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中,加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(1.32mg, 3.86 μ mol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-11(产率67%)。HRMS,计算值: $C_{107}H_{155}N_{33}O_{25}S_4$: $[M+H]^+$ 2431.0833, $[M+3H]^{3+}$ 811.0330, $[M+4H]^{4+}$ 608.5267,测量值811.0325, 608.5286。

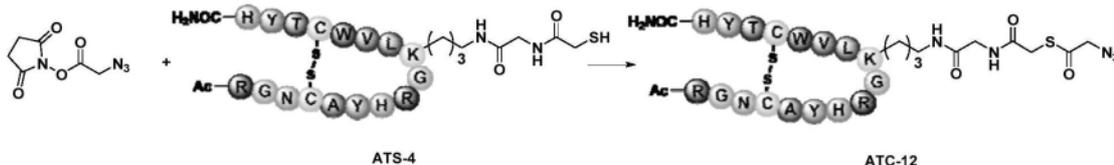
[0577] 实施例12:化合物ATC-12的合成

[0578] 化合物ATC-12的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-12

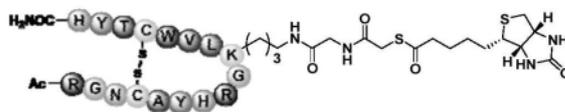
[0579]



[0580] 称取化合物ATS-4(7.05mg, 3.2 μ mol)溶于PB 7.0/DMF=1/1混合溶液中,加入化合物25(0.77mg, 3.86 μ mol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-12(产率89%)。HRMS,计算值: $C_{99}H_{141}N_{35}O_{25}S_3$: $[M+H]^+$ 2317.0078, $[M+3H]^{3+}$ 773.0078, $[M+4H]^{4+}$ 580.0078,测量值773.0123, 580.0071。

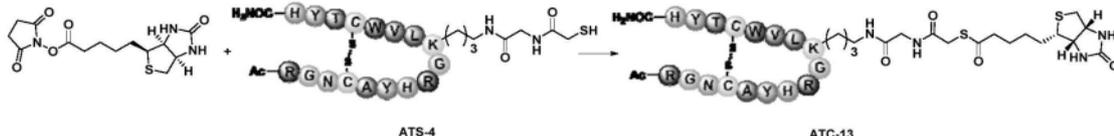
[0581] 实施例13:化合物ATC-13的合成

[0582] 化合物ATC-13的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-13

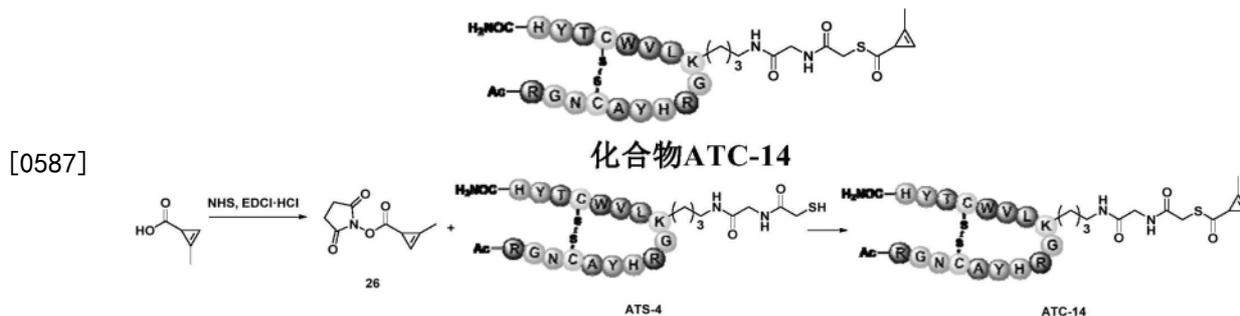
[0583]



[0584] 称取化合物ATS-4(7.05mg, 3.2 μ mol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中,加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(1.32mg, 3.86 μ mol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-13(产率77%)。HRMS,计算值: $C_{107}H_{154}N_{34}O_{26}S_4$: $[M+H]^+$ 2460.0734, $[M+3H]^{3+}$ 820.6963, $[M+4H]^{4+}$ 615.7742,测量值820.7012, 615.7726。

[0585] 实施例14:化合物ATC-14的合成

[0586] 化合物ATC-14的结构以及合成方法如下:

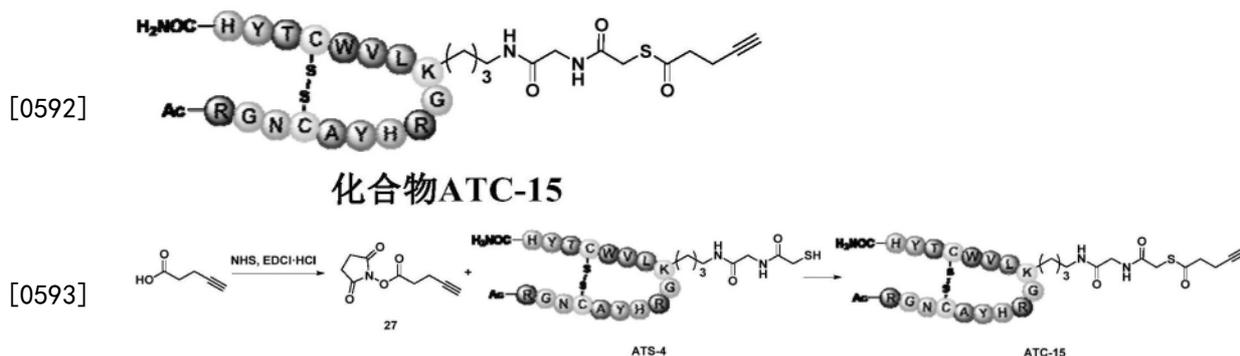


[0588] 步骤1:称取2-甲基-2-环丙基甲酸(0.4mg,4 μ mol)溶解于DMF(50 μ L)中,加入N-羧基琥珀酰亚胺(0.69mg,6 μ mol),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15mg,6 μ mol),室温反应过夜后,得化合物26粗品。

[0589] 步骤2:称取化合物ATS-4(7.05mg,3.2 μ mol)溶于DMF中(50 μ L)中,加至步骤1所得反应液,再加入PB 7.4缓冲液(200 μ L),室温搅拌30min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-14(产率59%)。HRMS,计算值: $C_{102}H_{144}N_{32}O_{25}S_3$: $[M+H]^+$ 2314.0221, $[M+3H]^{3+}$ 772.0126, $[M+4H]^{4+}$ 579.2614,测量值772.0148,579.2658。

[0590] 实施例15:化合物ATC-15的合成

[0591] 化合物ATC-15的结构以及合成方法如下:

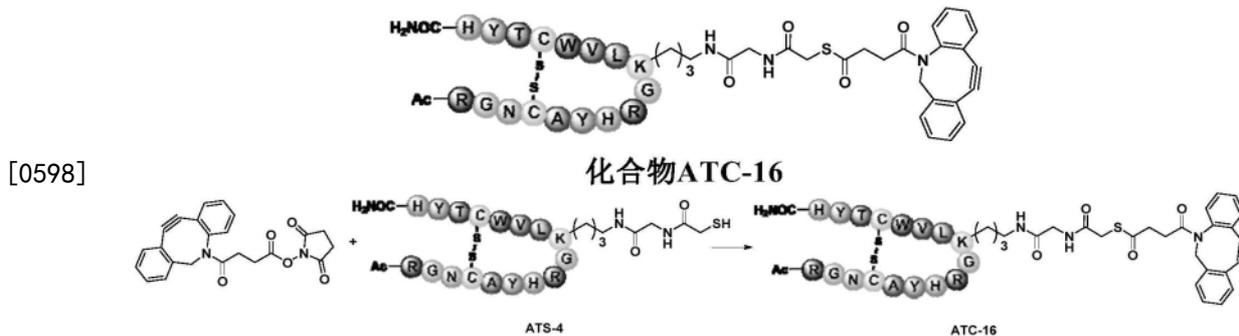


[0594] 步骤1:称取戊炔酸(0.4mg,4 μ mol)溶解于DMF(50 μ L)中,加入N-羧基琥珀酰亚胺(0.69mg,6 μ mol),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15mg,6 μ mol),室温反应过夜后,得化合物27粗品。

[0595] 步骤2:称取化合物ATS-4(7.05mg,3.2 μ mol)溶于DMF中(50 μ L)中,加至步骤1所得反应液,再加入PB 7.4缓冲液(200 μ L),室温搅拌30min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-4(产率66%)。HRMS,计算值: $C_{102}H_{144}N_{32}O_{25}S_3$: $[M+H]^+$ 2314.0221, $[M+3H]^{3+}$ 772.0126, $[M+4H]^{4+}$ 579.2614,测量值772.0148,579.2594。

[0596] 实施例16:化合物ATC-16的合成

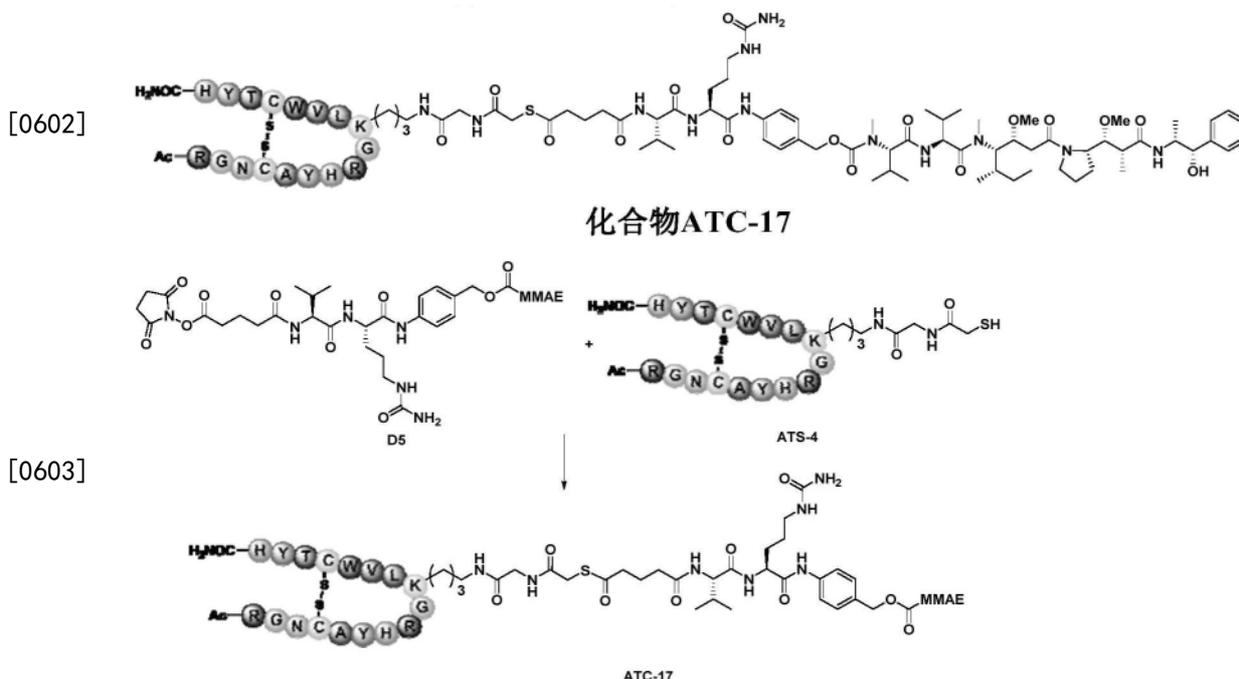
[0597] 化合物ATC-16的结构以及合成方法如下:



[0599] 称取化合物ATS-4 (7.05mg, 3.2 μ mol) 溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入DBC0-NHS (1.55mg, 3.86 μ mol), 室温搅拌15min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-16 (产率68%)。HRMS, 计算值: C₁₁₆H₁₅₃N₃₃O₂₆S₃: [M+H]⁺2521.0905, [M+3H]³⁺841.0354, [M+4H]⁴⁺631.0285, 测量值841.0389, 631.0268。

[0600] 实施例17: 化合物ATC-17的合成

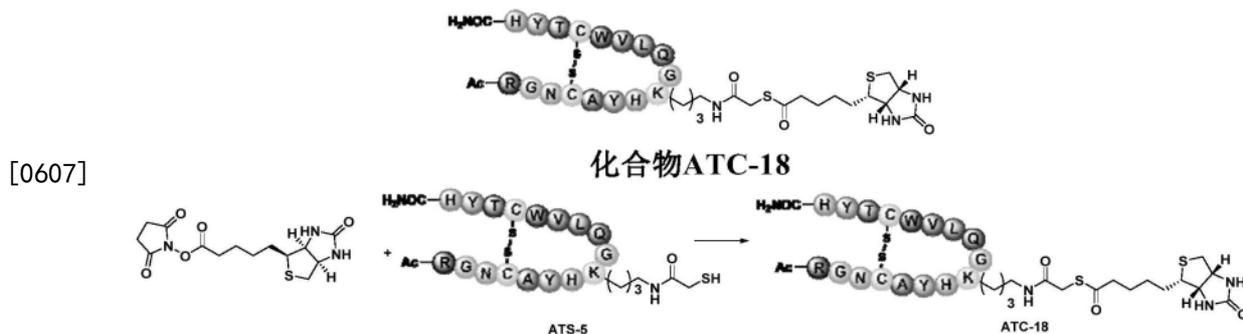
[0601] 化合物ATC-17的结构以及合成方法如下:



[0604] 称取化合物D5 (13.3mg, 0.01mmol) 溶解于DMF/PB7.4=1/1混合溶液中, 加入化合物ATS-4, 室温反应30min后, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末即为化合物ATC-17 (产率73%)。HRMS, 计算值: C₁₅₉H₂₃₆N₄₂O₃₈S₃: [M+H]⁺3438.7066, [M+3H]³⁺1146.9074, [M+4H]⁴⁺860.4325, 测量值860.4365。

[0605] 实施例18: 化合物ATC-18的合成

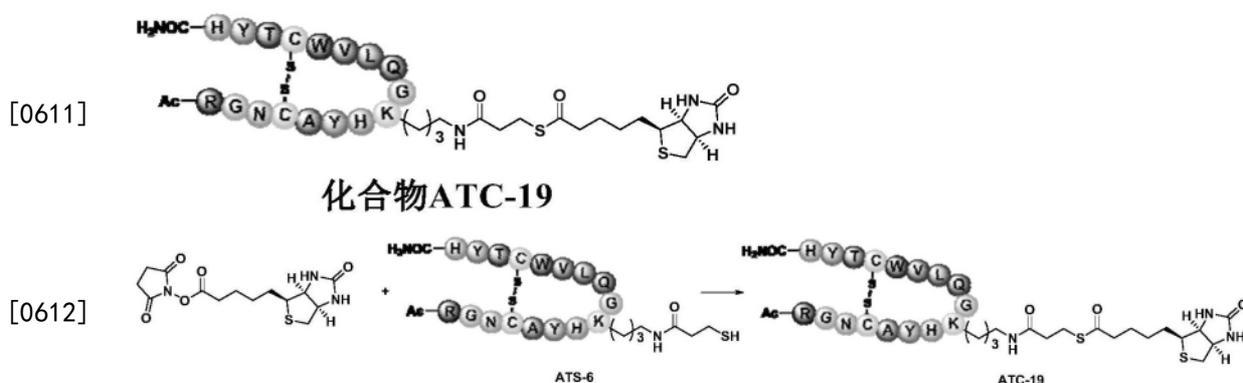
[0606] 化合物ATC-18的结构以及合成方法如下:



[0608] 称取化合物ATS-5 (6.9mg, 3.2 μ mol) 溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯 (1.32mg, 3.86 μ mol), 室温搅拌20min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-2 (产率77%)。HRMS, 计算值: C₁₀₄H₁₄₇N₃₁O₂₆S₄: [M+H]⁺ 2375.0094, [M+3H]³⁺ 792.3417, [M+4H]⁴⁺ 594.5082, 测量值792.3395, 594.5079。

[0609] 实施例19: 化合物ATC-19的合成

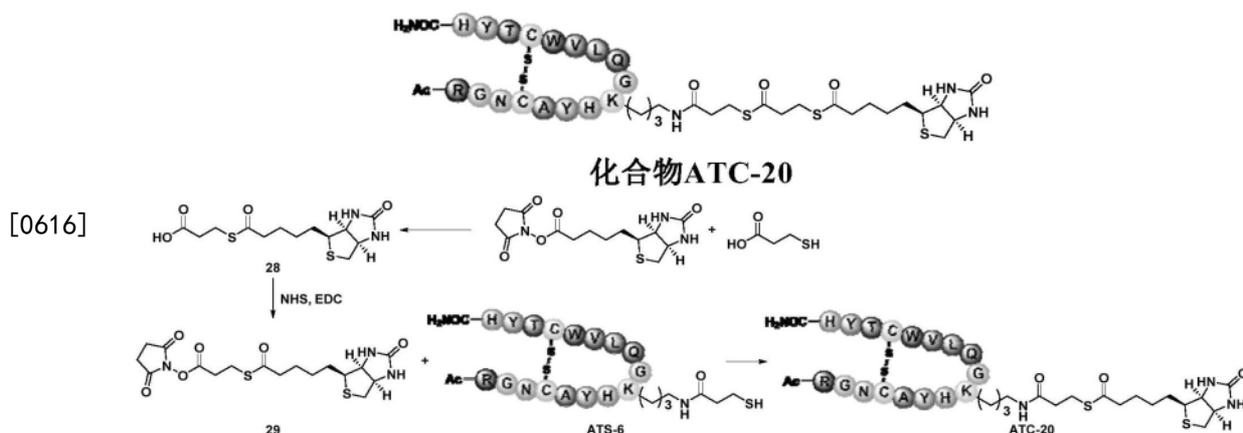
[0610] 化合物ATC-19的结构以及合成方法如下:



[0613] 称取化合物ATS-6 (6.9mg, 3.2 μ mol) 溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯 (1.32mg, 3.86 μ mol), 室温搅拌15min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-19 (产率76%)。HRMS, 计算值: C₁₀₅H₁₄₉N₃₁O₂₆S₄: [M+H]⁺ 2389.0251, [M+3H]³⁺ 797.0136, [M+4H]⁴⁺ 598.0121, 测量值797.0178, 598.0135。

[0614] 实施例20: 化合物ATC-20的合成

[0615] 化合物ATC-20的结构以及合成方法如下:



[0617] 步骤1: 称取巯基丙酸 (26.5mg, 0.25mmol) 溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯 (17mg, 0.05mmol), 室温搅拌过夜, LC-MS监测反应完全后, 使用

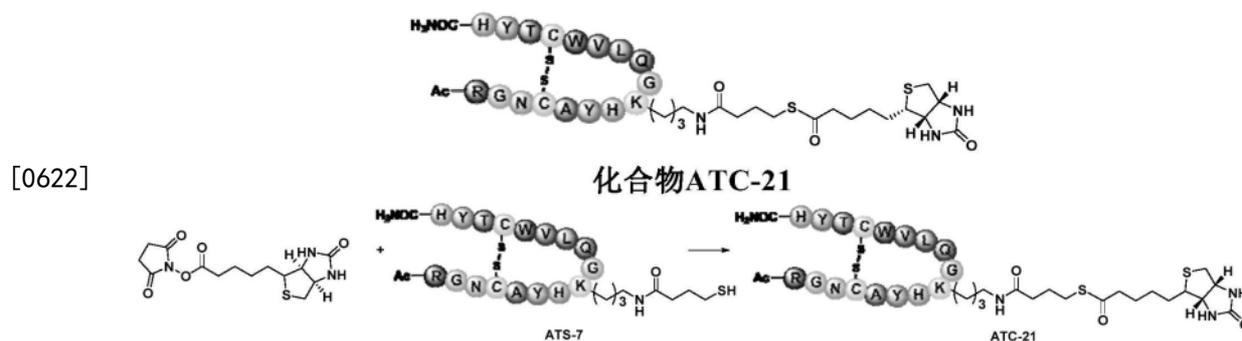
半制备分离纯化,冻干得化合物28(产率53%)。

[0618] 步骤2:称取化合物28(1.33mg,4 μ mol)溶解于DMF(50 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.69mg,6 μ mol),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15mg,6 μ mol),室温反应过夜后,得化合物29粗品。

[0619] 步骤3:称取化合物ATS-6(6.9mg,3.2 μ mol)溶于DMF中(50 μ L)中,加至步骤2所得反应液,再加入PB 7.4缓冲液(200 μ L),室温搅拌1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-20(产率75%)。HRMS,计算值: $C_{108}H_{153}N_{31}O_{27}S_5$: $[M+H]^+$ 2477.0234, $[M+3H]^{3+}$ 826.3463, $[M+4H]^{4+}$ 620.0117,测量值826.3457,619.9915。

[0620] 实施例21:化合物ATC-21的合成

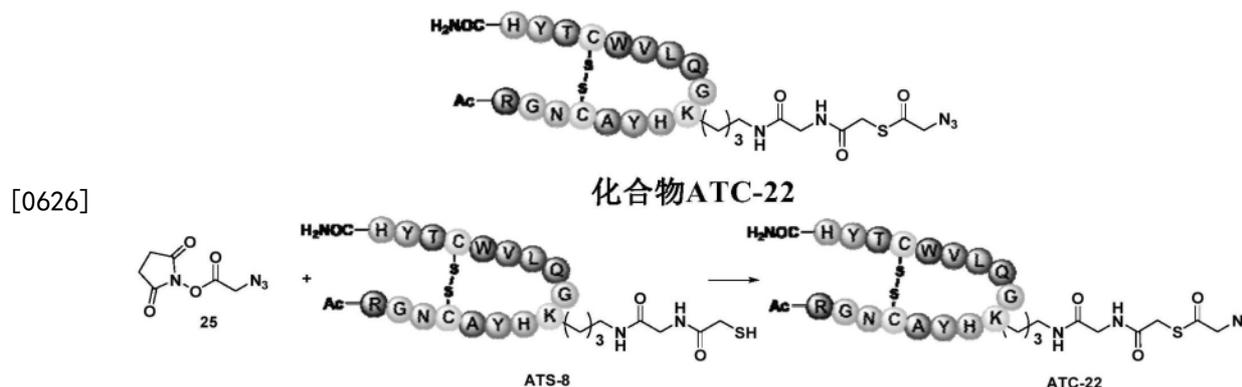
[0621] 化合物ATC-21的结构以及合成方法如下:



[0623] 称取化合物ATS-7(7mg,3.2 μ mol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中,加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(1.32mg,3.86 μ mol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-21(产率74%)。HRMS,计算值: $C_{106}H_{151}N_{31}O_{26}S_4$: $[M+H]^+$ 2403.0407, $[M+3H]^{3+}$ 801.6854, $[M+4H]^{4+}$ 601.5160,测量值801.6794,601.5172。

[0624] 实施例22:化合物ATC-22的合成

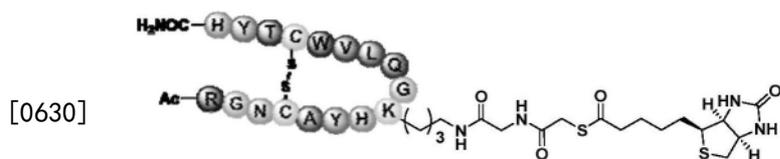
[0625] 化合物ATC-22的结构以及合成方法如下:



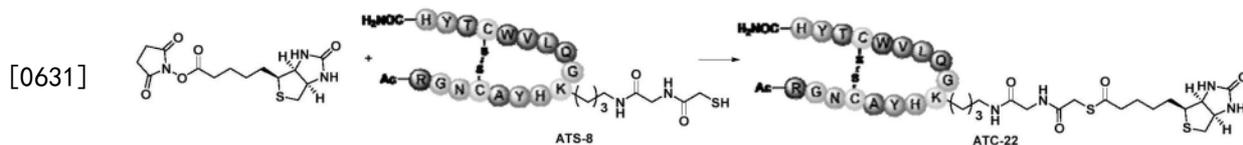
[0627] 称取化合物ATS-8(7mg,3.2 μ mol)溶于PB 7.0/DMF=1/1混合溶液中,加入化合物25(0.77mg,3.86 μ mol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-22(产率91%)。HRMS,计算值: $C_{98}H_{137}N_{33}O_{26}S_3$: $[M+H]^+$ 2288.9653, $[M+3H]^{3+}$ 763.6603, $[M+4H]^{4+}$ 572.9971,测量值763.6584,571.9829。

[0628] 实施例23:化合物ATC-23的合成

[0629] 化合物ATC-23的结构以及合成方法如下:



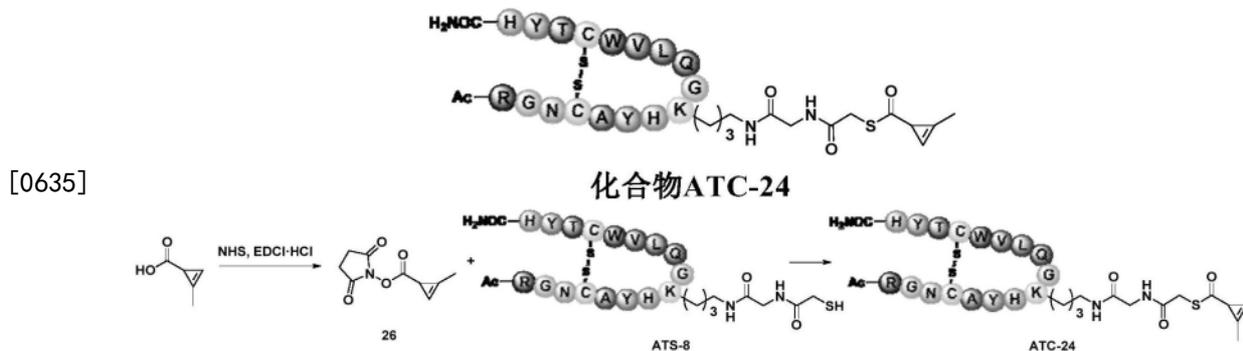
化合物ATC-23



[0632] 称取化合物ATS-8 (7mg, 3.2 μ mol) 溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯 (1.32mg, 3.86 μ mol), 室温搅拌15min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-23 (产率81%)。HRMS, 计算值: C₁₀₆H₁₅₀N₃₂O₂₇S₄: [M+H]⁺ 2432.0309, [M+3H]³⁺ 811.3488, [M+4H]⁴⁺ 608.7636, 测量值811.2514, 608.7618。

[0633] 实施例24: 化合物ATC-24的合成

[0634] 化合物ATC-24的结构以及合成方法如下:

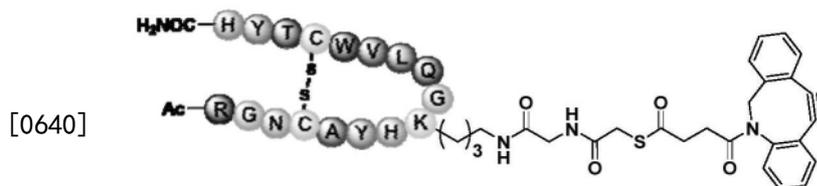


[0636] 步骤1: 称取2-甲基-2-环丙基甲酸 (0.4mg, 4 μ mol) 溶解于DMF (50 μ L) 中, 加入N-羰基琥珀酰亚胺 (0.69mg, 6 μ mol), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (1.15mg, 6 μ mol), 室温反应过夜后, 得化合物26粗品。

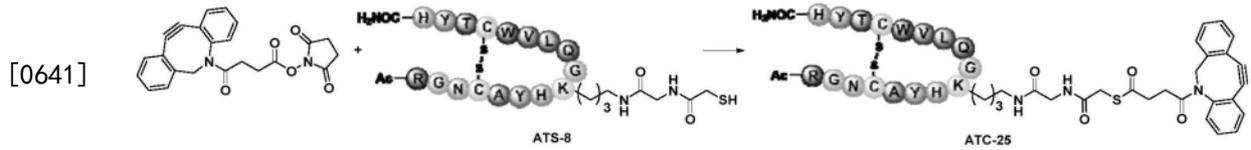
[0637] 步骤2: 称取化合物ATS-8 (7mg, 3.2 μ mol) 溶于DMF (50 μ L) 中, 加至步骤1所得反应液, 再加入PB 7.4缓冲液 (200 μ L), 室温搅拌30min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末, 即为化合物ATC-24 (产率64%)。HRMS, 计算值: C₁₀₁H₁₄₀N₃₀O₂₆S₃: [M+H]⁺ 2285.9795, [M+3H]³⁺ 762.6650, [M+4H]⁴⁺ 572.2507, 测量值762.6612, 572.2547。

[0638] 实施例25: 化合物ATC-25的合成

[0639] 化合物ATC-25的结构以及合成方法如下:



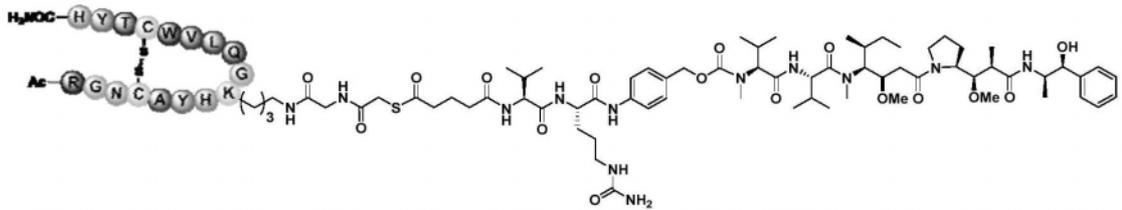
化合物ATC-25



[0642] 称取化合物ATS-8 (7mg, 3.2 μ mol) 溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入DCO-NHS (1.55mg, 3.86 μ mol), 室温搅拌15min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-25 (产率65%)。HRMS, 计算值: C₁₁₅H₁₄₉N₃₁O₂₇S₃: [M+H]⁺2493.0479, [M+3H]³⁺831.6878, [M+4H]⁴⁺624.0178, 测量值831.6894, 624.0189。

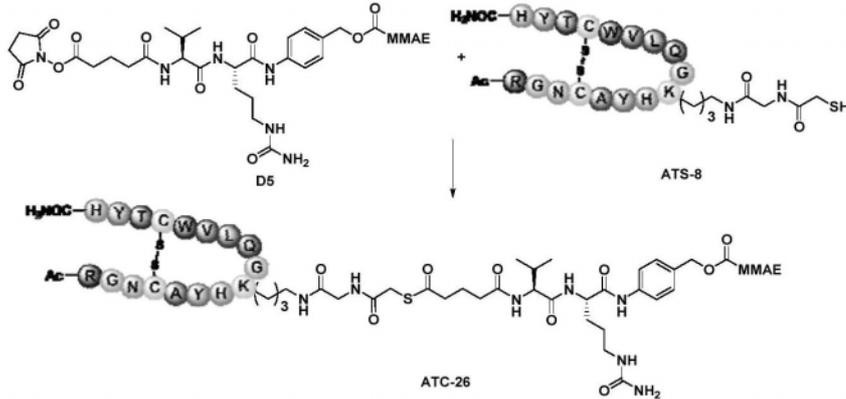
[0643] 实施例26: 化合物ATC-26的合成

[0644] 化合物ATC-26的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-26

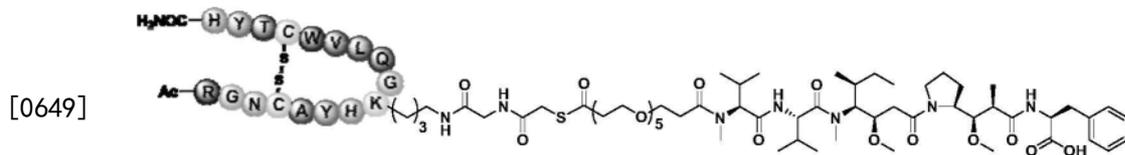
[0645]



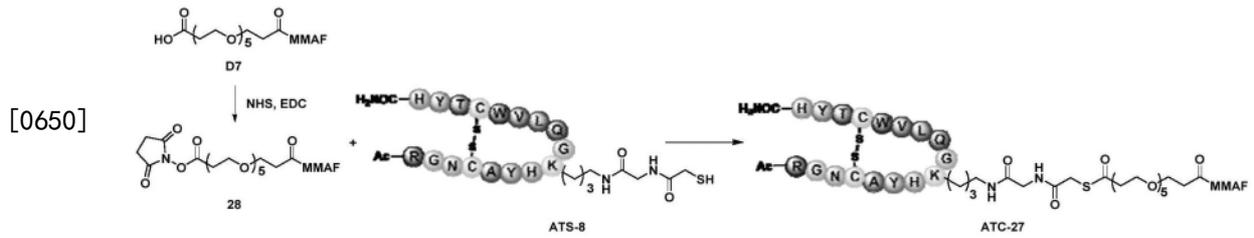
[0646] 称取化合物D5 (13.3mg, 0.01mmol) 溶解于DMF/PB7.4=1/1混合溶液中, 加入化合物ATS-8, 室温反应30min后, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末即为化合物ATC-26 (产率83%)。HRMS, 计算值: C₁₅₉H₂₃₄N₄₀O₃₉S₃: [M+H]⁺3424.6797, [M+3H]³⁺1142.2318, [M+4H]⁴⁺856.9258, 测量值856.9314。

[0647] 实施例27: 化合物ATC-27的合成

[0648] 化合物ATC-27的结构以及合成方法如下:



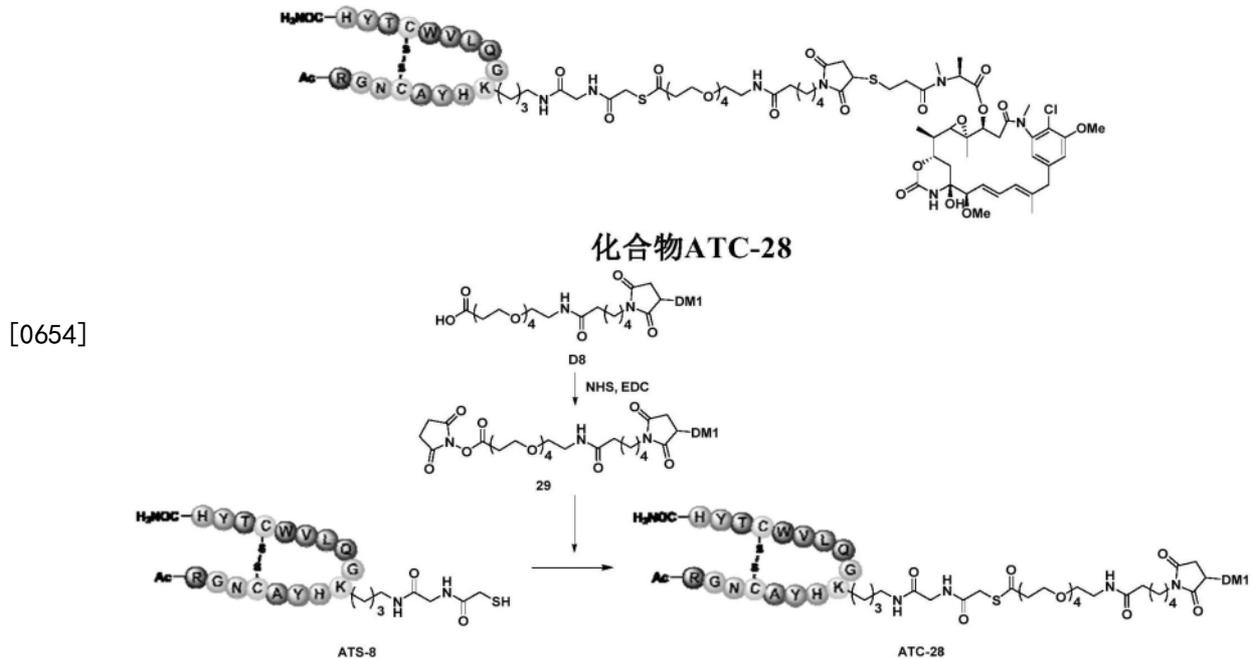
化合物ATC-27



[0651] 称取D7 (10.5mg, 0.01mmol) 溶解于DMF中, 加入NHS (1.4mg, 0.012mmol), EDC (2.1 μ L, 0.012mmol), 室温反应过夜。反应液中加入化合物ATS-8的DMF溶液, 同时加入等体积的0.2M PB 7.4缓冲液, 室温反应2h后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-27 (产率70%)。HRMS, 计算值: $C_{149}H_{223}N_{35}O_{40}S_3$: $[M+H]^+$ 3239.5732, $[M+3H]^{3+}$ 1080.5296, $[M+4H]^{4+}$ 810.6492, 测量值810.6554。

[0652] 实施例28: 化合物ATC-28的合成

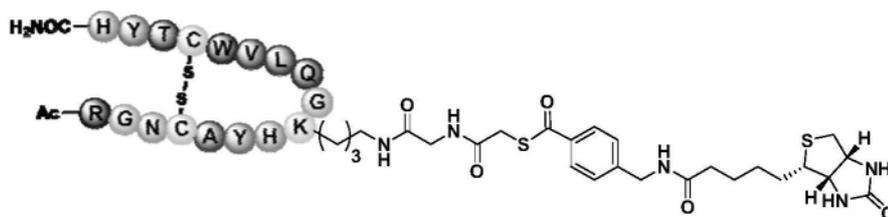
[0653] 化合物ATC-28的结构以及合成方法如下:



[0655] 称取D8 (12mg, 0.01mmol) 溶解于DMF中, 加入NHS (1.4mg, 0.012mmol), EDC (2.1 μ L, 0.012mmol), 室温反应过夜后, 加入ATS-8的DMF溶液, 再加入等体积的0.2M PB 7.4缓冲液, 室温反应2h后, 使用半制备分离纯化, 冻干得白色粉末即化合物ATC-28 (产率73%)。HRMS, 计算值: $C_{149}H_{210}ClN_{35}O_{43}S_4$: $[M+H]^+$ 3341.3971, $[M+3H]^{3+}$ 1114.4709, $[M+4H]^{4+}$ 836.1051, 测量值836.1095。

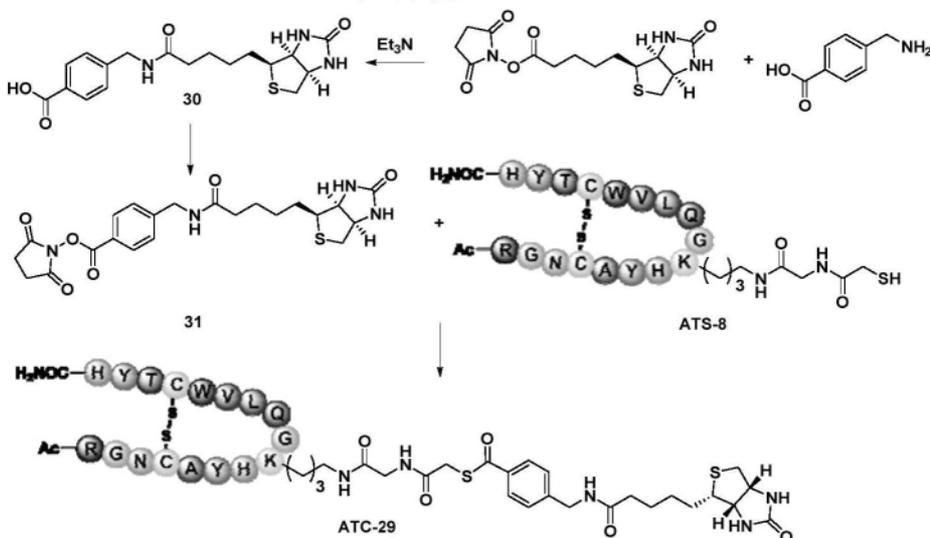
[0656] 实施例29: 化合物ATC-29的合成

[0657] 化合物ATC-29的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-29

[0658]



[0659] 步骤1:称取4-(氨基甲基)苯甲酸(9mg,0.06mmol)溶于DMF中,加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(17mg,0.05mmol),三乙胺(20 μ L,0.15mmol),室温搅拌过夜,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物30(产率91%)。

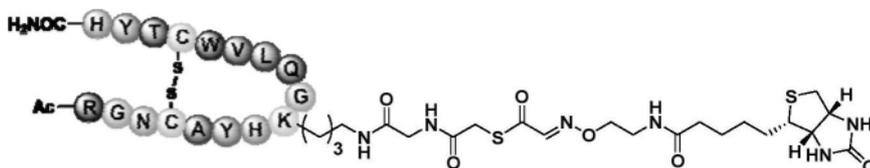
[0660] 步骤2:称取化合物30(1.33mg,4 μ mol)溶解于DMF(50 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.69mg,6 μ mol),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15mg,6 μ mol),室温反应过夜后,得化合物31粗品。

[0661] 步骤3:称取化合物ATS-8(7mg,3.2 μ mol)溶于DMF中(50 μ L)中,加至步骤2所得反应液,再加入PB 7.4缓冲液(200 μ L),室温搅拌1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-29(产率74%)。HRMS,计算值: $C_{114}H_{157}N_{33}O_{28}S_4$: $[M+H]^+$ 2565.0837, $[M+3H]^{3+}$ 855.6998, $[M+4H]^{4+}$ 642.0268,测量值855.7043,642.0276。

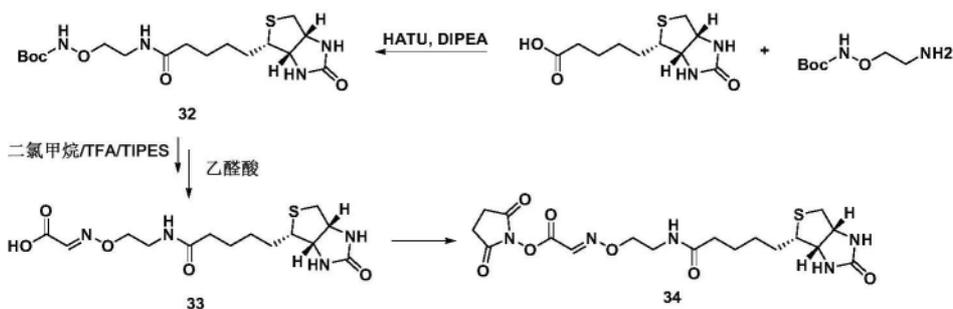
[0662] 实施例30:化合物ATC-30的合成

[0663] 化合物ATC-30的结构以及合成方法如下:

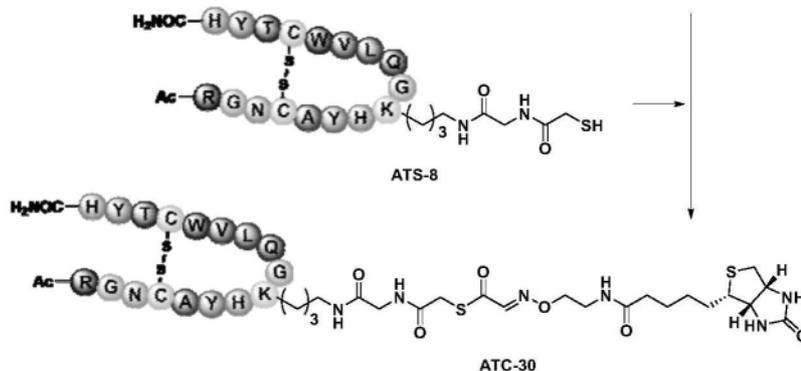
[0664]



化合物ATC-30



[0665]



[0666] 步骤1:称取生物素(50mg,0.2mmol)溶于DMF中,加入HATU(152mg,0.4mmol),DIPEA(103 μ L,0.6mmol)以及(2-氨基乙氧基)氨基甲酸叔丁酯(35mg,0.2mmol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物32(产率85%)。HRMS,计算值: $C_{17}H_{30}N_4O_5$: $[M+H]^+$ 403.2015,测量值403.2114。

[0667] 步骤2:称取化合物32(20mg,0.05mmol)溶于500 μ L二氯甲烷中,冰浴条件下,加入450 μ L三氟乙酸、50 μ L三异丙基硅烷,室温反应1h后, N_2 吹干待用。

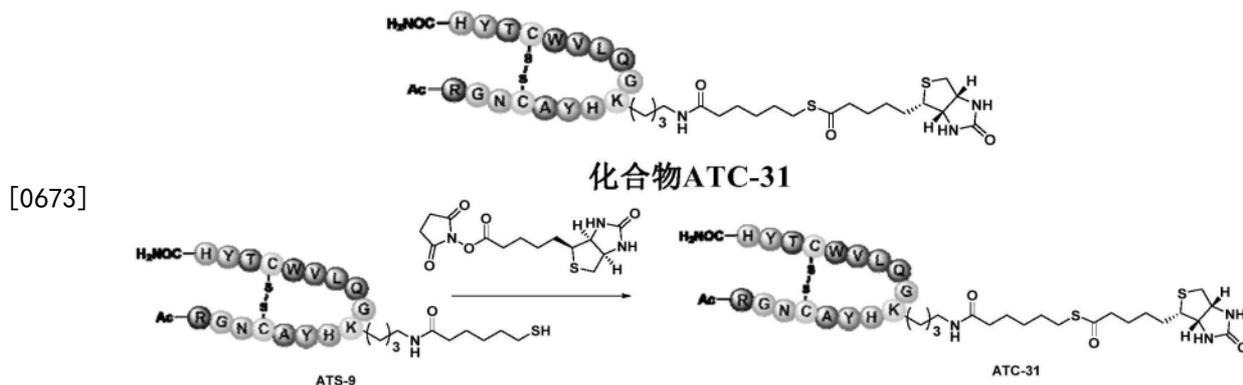
[0668] 步骤3:在步骤2所得粗品中加入乙腈/水/醋酸=9/9/2的混合溶液500 μ L,并加入乙酐(2.8 μ L,0.05mmol),室温反应15min,半制备分离纯化,冻干得化合物33(产率92%)。HRMS,计算值: $C_{14}H_{22}N_4O_5$: $[M+H]^+$ 359.1389,测量值359.1425。

[0669] 步骤4:称取化合物33(1.43mg,4 μ mol)溶解于DMF(50 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.69mg,6 μ mol),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15mg,6 μ mol),室温反应过夜后,得化合物34粗品。

[0670] 步骤5:称取化合物ATC-8(7mg,3.2 μ mol)溶于DMF中(50 μ L)中,加至步骤2所得反应液,再加入PB 7.4缓冲液(200 μ L),室温搅拌1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末,即为化合物ATC-30(产率63%)。HRMS,计算值: $C_{110}H_{156}N_{34}O_{29}S_4$: $[M+H]^+$ 2546.0738, $[M+3H]^{3+}$ 849.3631, $[M+4H]^{4+}$ 637.2743,测量值849.3654,637.2842。

[0671] 实施例31:化合物ATC-31的合成

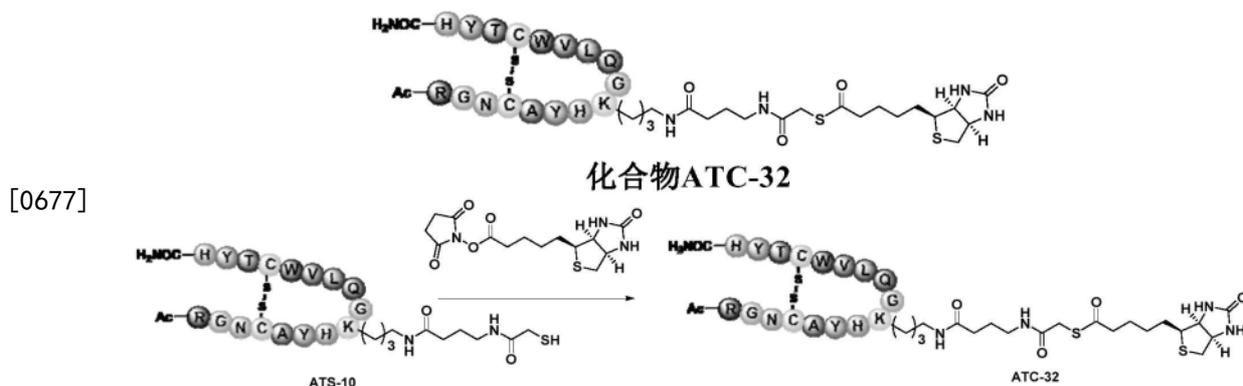
[0672] 化合物ATC-31的结构以及合成方法如下:



[0674] 称取化合物ATS-9(7.05mg, 3.2 μ mol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中,加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(1.32mg, 3.86 μ mol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-31(产率78%)。HRMS,计算值: $C_{112}H_{160}N_{32}O_{28}S_5$: $[M+H]^+$ 2562.0761, $[M+3H]^{3+}$ 854.6972, $[M+4H]^{4+}$ 641.2749,测量值854.7015, 641.2796.

[0675] 实施例32:化合物ATC-32的合成

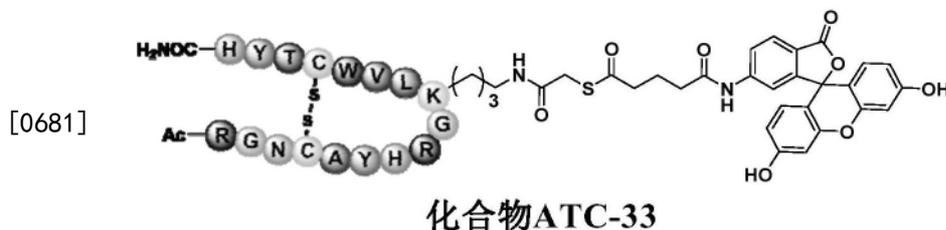
[0676] 化合物ATC-32的结构以及合成方法如下:

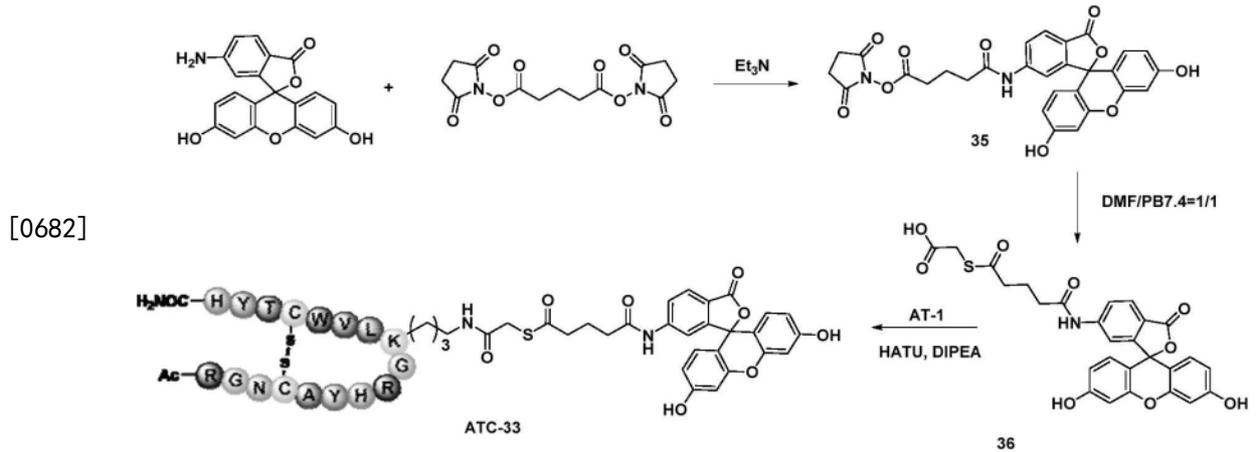


[0678] 称取化合物ATS-10(7.2mg, 3.2 μ mol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中,加入生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(1.32mg, 3.86 μ mol),室温搅拌15min,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-32(产率78%)。HRMS,计算值: $C_{112}H_{159}N_{33}O_{29}S_5$: $[M+H]^+$ 2591.0663, $[M+3H]^{3+}$ 864.3606, $[M+4H]^{4+}$ 648.5224,测量值864.3587, 648.5246.

[0679] 实施例33:化合物ATC-33的合成

[0680] 化合物ATC-33的结构以及合成方法如下:



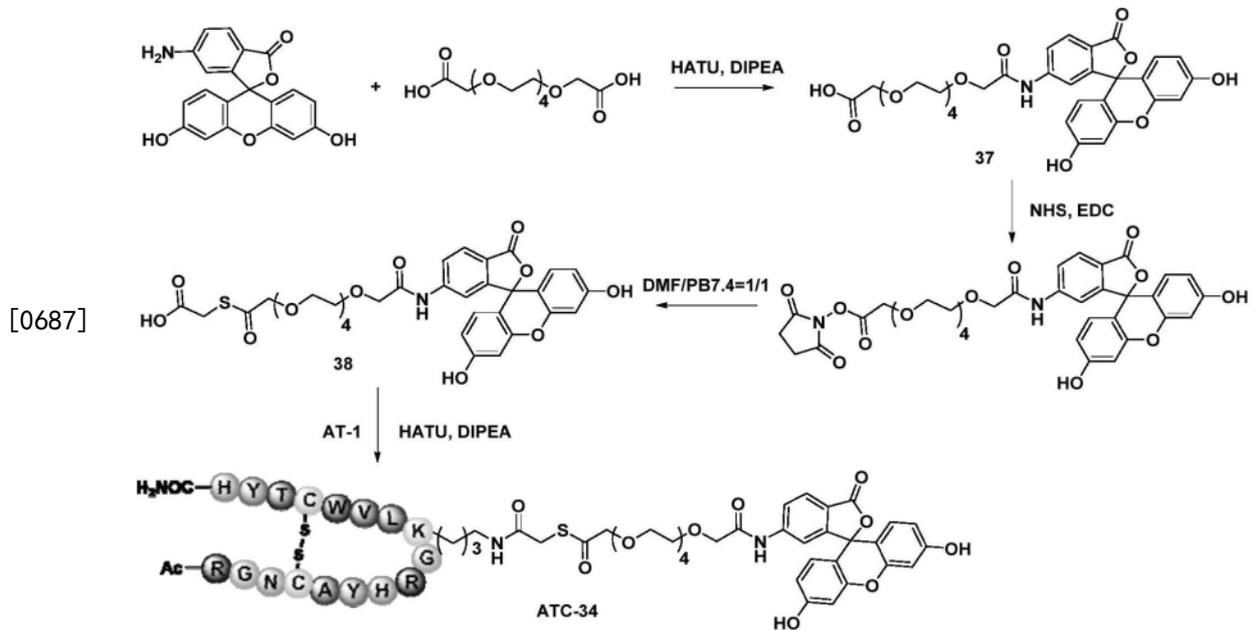


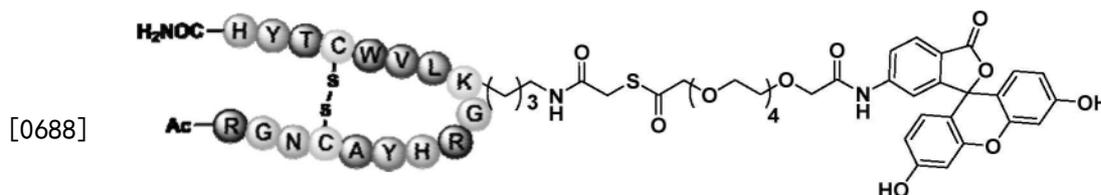
[0683] 步骤1:称取氨基荧光素 (10.4mg, 0.03mmol) 溶于DMF (500 μ L) 中,加入双琥珀酰亚胺戊二酸酯 (DSG, 39mg, 0.12mmol), 三乙胺 (12.5 μ L, 0.09mmol), 室温避光反应2h, LC-MS监测反应完全后,得化合物35,反应液加入巯基乙酸 (6.3 μ L, 0.09mmol), PB 7.4缓冲液 (500 μ L), 室温避光反应2h, LC-MS监测反应完全后,半制备分离纯化,冻干得黄色粉末 (产率84%)。HRMS, 计算值: $C_{27}H_{22}NO_9S$: $[M+H]^+$ 536.1015, 测量值536.1028。

[0684] 步骤2:称取化合物36 (5.1mg, 9.51 μ mol) 溶于DMF (300 μ L) 中,加入HATU (2.7mg, 7.14 μ mol), DIPEA (1.84 μ L, 10.7 μ mol) 以及AT-1 (10mg, 4.76 μ mol), 室温反应2h, LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-33。HRMS, 计算值: $C_{120}H_{154}N_{32}O_{30}S_3$: $[M+H]^+$ 2620.0749, $[M+3H]^{3+}$ 874.0302, $[M+4H]^{4+}$ 655.7746, 测量值874.0562, 655.7789。

[0685] 实施例34:化合物ATC-34的合成

[0686] 化合物ATC-34的结构以及合成方法如下:





化合物ATC-34

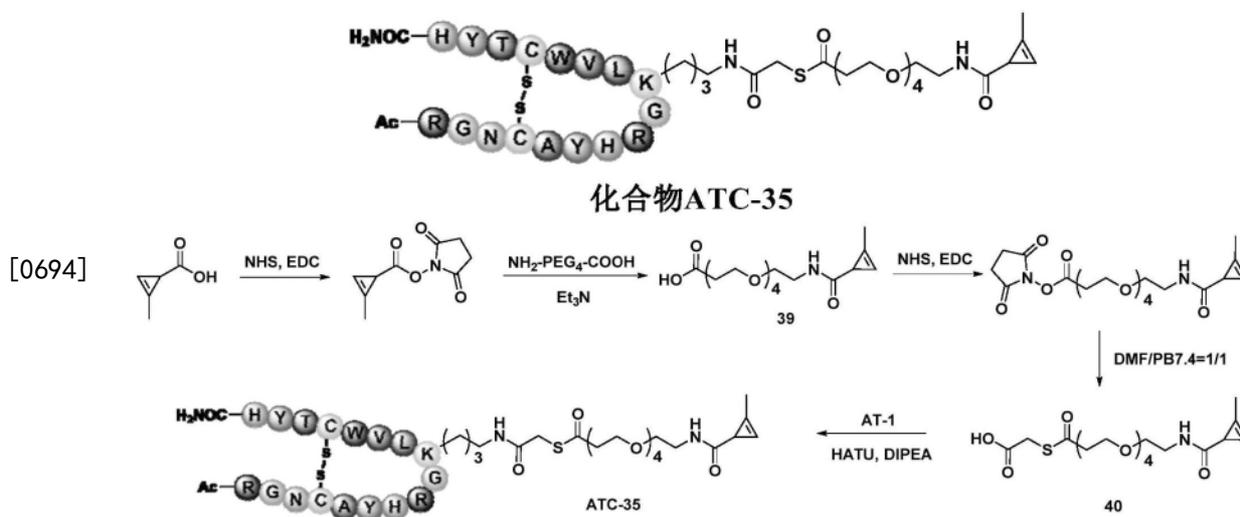
[0689] 步骤1:称取氨基荧光素(17mg, 49 μ mol)溶于DMF(400 μ L)中,加入HATU(28mg, 73.5 μ mol), DIPEA(18.9 μ L, 110 μ mol)以及羧酸-聚乙二醇-羧酸(17.4mg, 98 μ mol),室温避光反应1h, LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物37(产率92%)。HRMS, 计算值: $C_{26}H_{21}NO_{10}$: $[M+H]^+$ 508.1244, 测量值508.1312。

[0690] 步骤2:称取化合物37(15.2mg, 0.03mmol)溶于DMF(300 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 4.1mg, 0.036mmol), EDCI(6.4 μ L, 0.036mmol),室温避光反应过夜, LC-MS监测反应完全后,反应液加入巯基乙酸(6.3 μ L, 0.09mmol), PB 7.4缓冲液(300 μ L),室温避光反应2h, LC-MS监测反应完全后,半制备分离纯化,冻干得黄色粉末(产率81%)。HRMS, 计算值: $C_{28}H_{23}NO_{11}S$: $[M+H]^+$ 582.1070, 测量值582.1235。

[0691] 步骤3:称取化合物38(5.5mg, 9.51 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入HATU(2.7mg, 7.14 μ mol), DIPEA(1.84 μ L, 10.7 μ mol)以及AT-1(10mg, 4.76 μ mol),室温反应2h, LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-34(产率84%)。HRMS, 计算值: $C_{121}H_{156}N_{32}O_{32}S_3$: $[M+H]^+$ 2666.0804, $[M+3H]^{3+}$ 889.3653, $[M+4H]^{4+}$ 667.2760, 测量值889.3815, 667.2715。

[0692] 实施例35:化合物ATC-35的合成

[0693] 化合物ATC-35的结构以及合成方法如下:



[0695] 步骤1:称取2-甲基-2-环丙烯甲酸(20mg, 0.2mmol)溶于DMF(400 μ L)中,加入NHS(27.6mg, 0.24mmol), EDCI(42.4 μ L, 0.24mmol),室温反应过夜,反应液中加入3-[2-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸(53mg, 0.2mmol),三乙胺(83 μ L, 0.6mmol) LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物39(产率78%)。HRMS, 计算值: $C_{16}H_{27}NO_7$: $[M+H]^+$ 346.1866, 测量值346.1902。

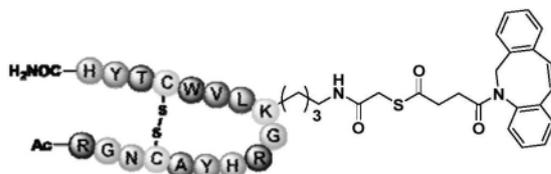
[0696] 步骤2:称取化合物39(10.4mg, 0.03mmol)溶于DMF(300 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰

亚胺(NHS, 4.1mg, 0.036mmol), EDCI (6.4μL, 0.036mmol), 室温反应过夜后, 反应液加入巯基乙酸(6.3μL, 0.09mmol), PB 7.4缓冲液(300μL), 室温反应1h, LC-MS监测反应完全后, 半制备分离纯化, 冻干得白色粉末(产率84%)。HRMS, 计算值: $C_{18}H_{29}NO_8S$: $[M+H]^+$ 420.1692, 测量值420.1589。

[0697] 步骤3: 称取化合物40(4mg, 9.51μmol)溶于DMF(200μL)中, 加入HATU(2.7mg, 7.14μmol), DIPEA(1.84μL, 10.7μmol)以及AT-1(10mg, 4.76μmol), 室温反应2h, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-35(产率90%)。HRMS, 计算值: $C_{111}H_{162}N_{32}O_{29}S_3$: $[M+H]^+$ 2531.1426, $[M+3H]^{3+}$ 844.3861, $[M+4H]^{4+}$ 633.5415, 测量值844.3845, 633.5436。

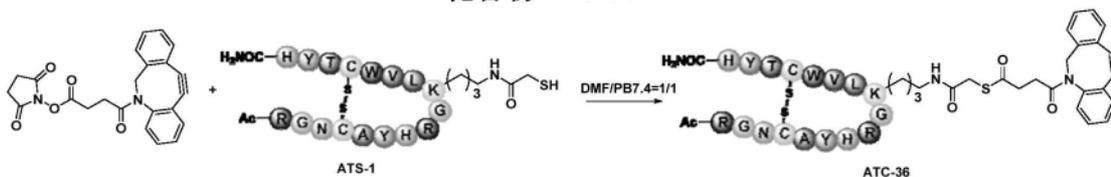
[0698] 实施例36: 化合物ATC-36的合成

[0699] 化合物ATC-36的结构以及合成方法如下:



[0700]

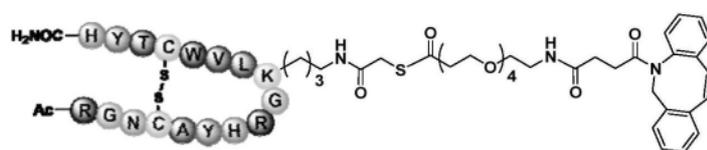
化合物ATC-36



[0701] 称取化合物ATS-1(6.7mg, 3.2μmol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中, 加入DBC0-NHS(1.55mg, 3.86μmol), 室温搅拌30min, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-36(产率62%)。HRMS, 计算值: $C_{114}H_{150}N_{32}O_{25}S_3$: $[M+H]^+$ 2464.0690, $[M+3H]^{3+}$ 822.0282, $[M+4H]^{4+}$ 616.7731, 测量值822.0315, 616.7712。

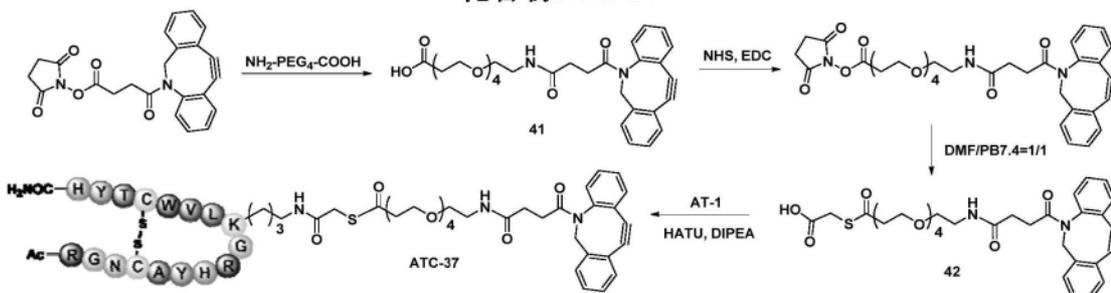
[0702] 实施例37: 化合物ATC-37的合成

[0703] 化合物ATC-37的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-37

[0704]



[0705] 步骤1: 称取DBC0-NHS(40mg, 0.1mmol)溶于DMF(400μL)中, 加入NHS(13.8mg, 0.12mmol), EDCI(21.2μL, 0.12mmol), 室温反应过夜, 反应液中加入3-[2-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙氧基]丙酸(26.5mg, 0.1mmol), 三乙胺(41.5μL, 0.3mmol) LC-MS监

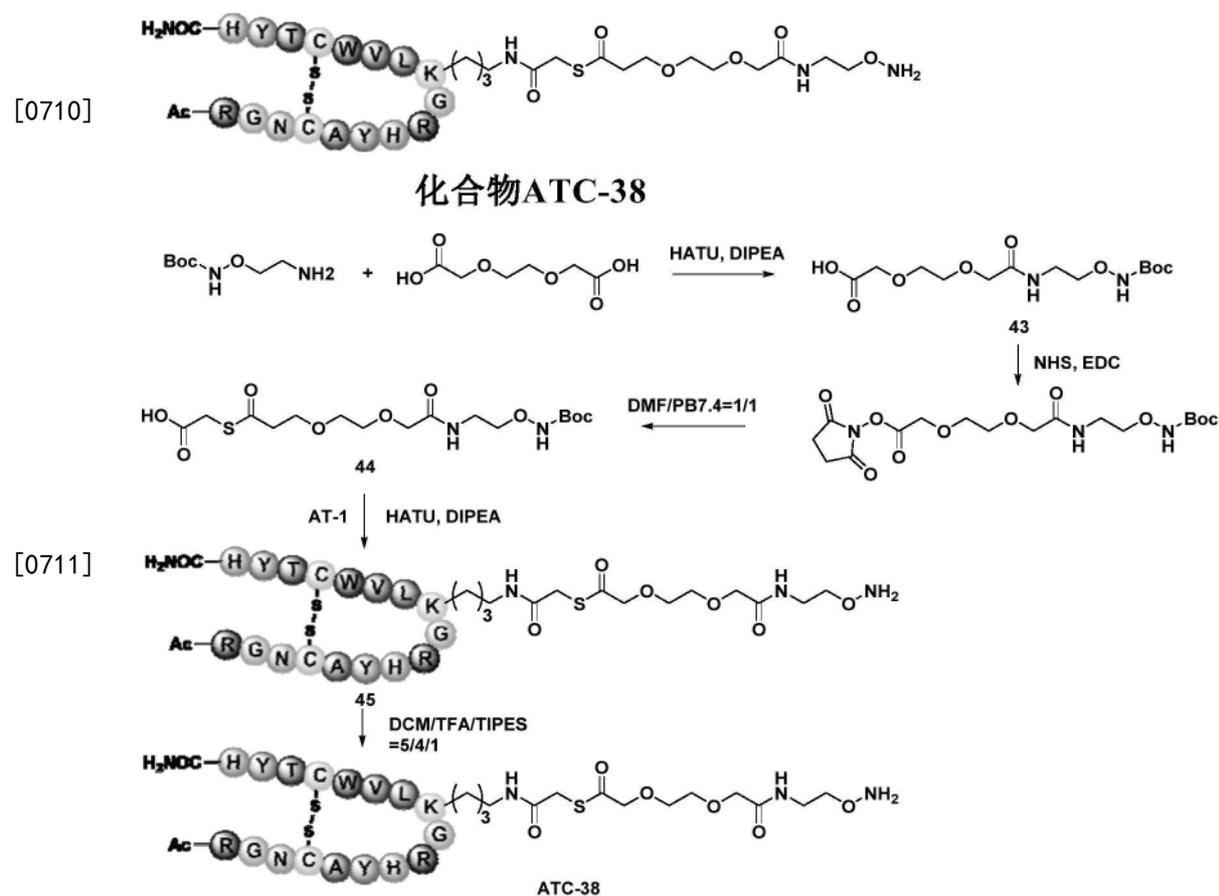
测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物41(产率81%)。HRMS,计算值: $C_{30}H_{36}N_2O_8$: $[M+H]^+$ 553.2550,测量值553.2548。

[0706] 步骤2:称取化合物41(16.5mg,0.036mmol)溶于DMF(400 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,4.1mg,0.036mmol),EDCI(6.4 μ L,0.036mmol),室温反应过夜后,反应液加入巯基乙酸(6.3 μ L,0.09mmol),PB 7.4缓冲液(400 μ L),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,半制备分离纯化,冻干得白色粉末,为化合物42(产率87%)。HRMS,计算值: $C_{32}H_{38}N_2O_9S$: $[M+H]^+$ 627.2376,测量值627.2315。

[0707] 步骤3:称取化合物42(6mg,9.51 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入HATU(2.7mg,7.14 μ mol),DIPEA(1.84 μ L,10.7 μ mol)以及AT-1(10mg,4.76 μ mol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-37(产率92%)。HRMS,计算值: $C_{125}H_{171}N_{33}O_{30}S_3$: $[M+H]^+$ 2711.2110, $[M+3H]^{3+}$ 904.4089, $[M+4H]^{4+}$ 678.5586,测量值904.4123,678.5591。

[0708] 实施例38:化合物ATC-38的合成

[0709] 化合物ATC-38的结构以及合成方法如下:



[0712] 步骤1:称取2-氨基乙氧基氨基甲酸叔丁酯(17.6mg,0.1mmol)溶于DMF(400 μ L)中,加入HATU(76mg,0.2mmol),DIPEA(51.5 μ L,0.3mmol)以及羧酸-聚乙二醇-羧酸(53.4mg,0.3mmol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物43(产率88%)。HRMS,计算值: $C_{13}H_{24}N_2O_8$: $[M+H]^+$ 337.1611,测量值337.1587。

[0713] 步骤2:称取化合物43(20mg,0.06mmol)溶于DMF(400 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,8.2mg,0.072mmol),EDCI(12.8 μ L,0.072mmol),室温避光反应过夜,LC-MS监测反应

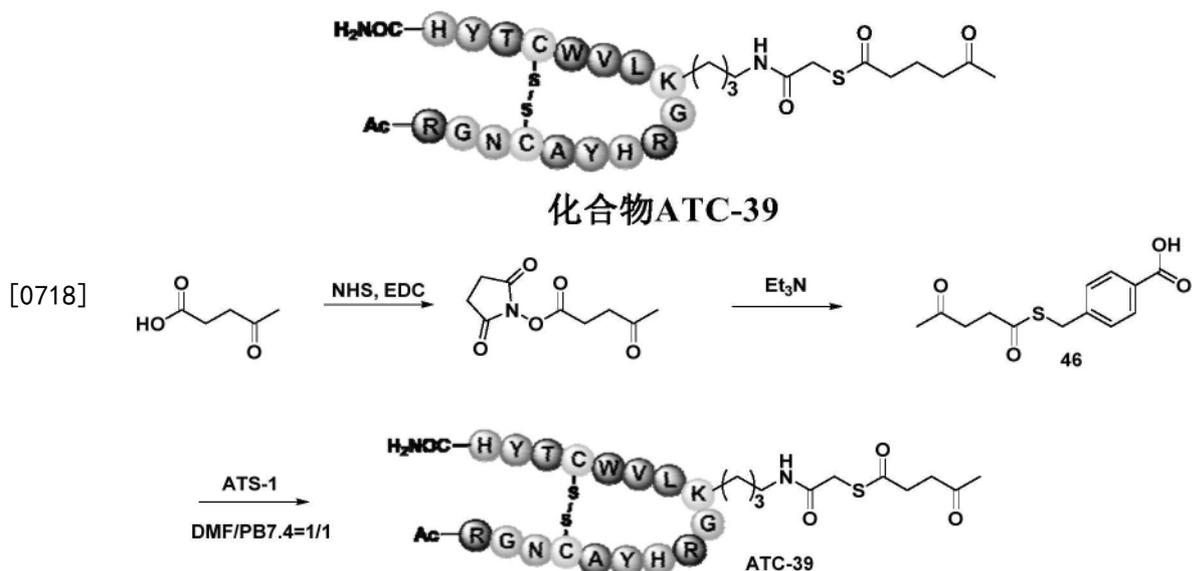
完全后,反应液加入巯基乙酸(12.6 μ L,0.18mmol),PB 7.4缓冲液(400 μ L),室温避光反应2h,LC-MS监测反应完全后,半制备分离纯化,冻干得白色粉末即为化合物44(产率83%)。HRMS,计算值: $C_{16}H_{28}N_2O_9S$: $[M+H]^+$ 425.1594,测量值425.1608。

[0714] 步骤3:称取化合物44(4mg,9.51 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入HATU(2.7mg,7.14 μ mol),DIPEA(1.84 μ L,10.7 μ mol)以及AT-1(10mg,4.76 μ mol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物45(产率90%)。HRMS,计算值: $C_{108}H_{159}N_{33}O_{30}S_3$: $[M+H]^+$ 2495.1171, $[M+3H]^{3+}$ 832.3776, $[M+4H]^{4+}$ 624.5351,测量值832.3810,624.5305。

[0715] 步骤4:称取化合物45(9mg,3.6 μ mol)加入二氯甲烷200 μ L,三氟乙酸180 μ L,异丙基硅烷20 μ L,4 $^{\circ}$ C反应30min, N_2 吹干溶剂,得化合物ATC-38(产率95%)。HRMS,计算值: $C_{103}H_{151}N_{33}O_{28}S_3$: $[M+H]^+$ 2395.0646, $[M+3H]^{3+}$ 799.0267, $[M+4H]^{4+}$ 599.5220,测量值799.0248,599.5278。

[0716] 实施例39:化合物ATC-39的合成

[0717] 化合物ATC-39的结构以及合成方法如下:

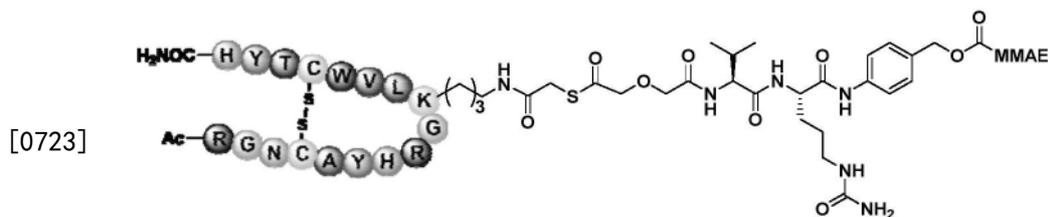


[0719] 步骤1:称取乙酰丙酸(23.2mg,0.2mmol)溶于DMF(400 μ L)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,27.6mg,0.24mmol),EDCI(42.4 μ L,0.24mmol),室温反应过夜后,反应液加入4-巯基丙基乙酸(67.2mg,0.4mmol),三乙胺(83 μ L,0.6mmol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,半制备分离纯化,冻干得白色粉末即为化合物46(产率73%)。HRMS,计算值: $C_{14}H_{16}O_4S$: $[M+H]^+$ 281.0848,测量值281.0923。

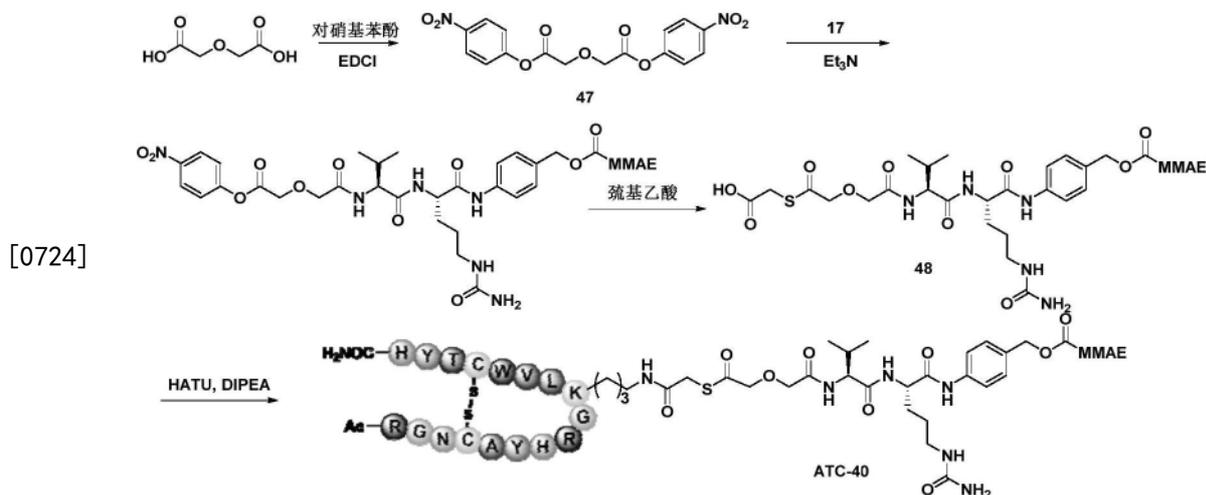
[0720] 步骤2:称取化合物ATS1(6.7mg,3 μ mol)溶于PB 7.4/DMF=1/1混合溶液中,加入化合物46(2.7mg,9.6 μ mol),室温搅拌4h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-39(产率74%)。HRMS,计算值: $C_{101}H_{145}N_{31}O_{25}S_3$: $[M+H]^+$ 2290.0346, $[M+3H]^{3+}$ 764.0167, $[M+4H]^{4+}$ 573.2645,测量值764.0205,573.0618。

[0721] 实施例40:化合物ATC-40的合成

[0722] 化合物ATC-40的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-40



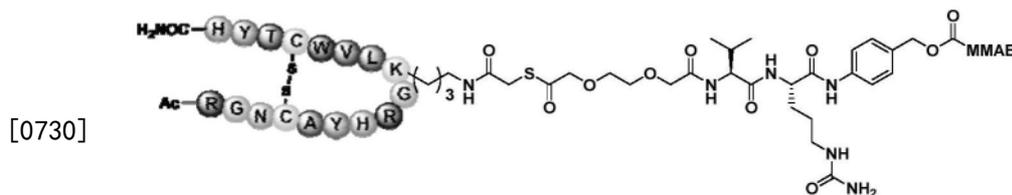
[0725] 步骤1:称取二甘醇酸(26.8mg,0.2mmol)溶于DMF(400 μ L)中,加入对硝基苯酚(66.7mg,0.48mmol),EDCI(84.8 μ L,0.48mmol),室温反应过夜后,加入乙醚沉淀,得产物47(产率69%)。

[0726] 步骤2:化合物47(11.3mg,30 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入化合物17(11.2mg,10 μ mol),三乙胺(6.94 μ L,50 μ mol),室温反应20min后,加入巯基乙酸(2.1 μ L,30 μ mol),PB7.4缓冲液,室温反应1h,半制备分离纯化,得化合物48(产率76%)。HRMS,计算值: $C_{64}H_{100}N_{10}O_{17}S$: $[M+H]^+$ 1313.7067,测量值1313.7054。

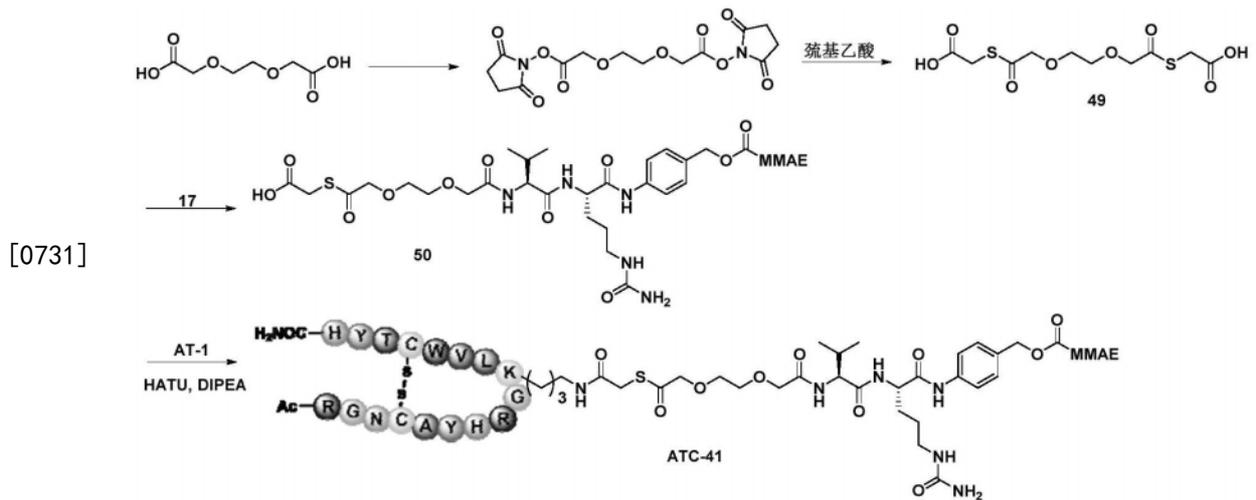
[0727] 步骤3:称取化合物48(6.2mg,4.76 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入HATU(2.7mg,7.14 μ mol),DIPEA(1.84 μ L,10.7 μ mol)以及AT-1(10mg,4.76 μ mol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-40(产率91%)。HRMS,计算值: $C_{157}H_{233}N_{41}O_{38}S_3$: $[M+H]^+$ 3397.6800, $[M+3H]^{3+}$ 1133.2319, $[M+4H]^{4+}$ 850.1759,测量值1133.2291,850.1782。

[0728] 实施例41:化合物ATC-41的合成

[0729] 化合物ATC-41的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-41



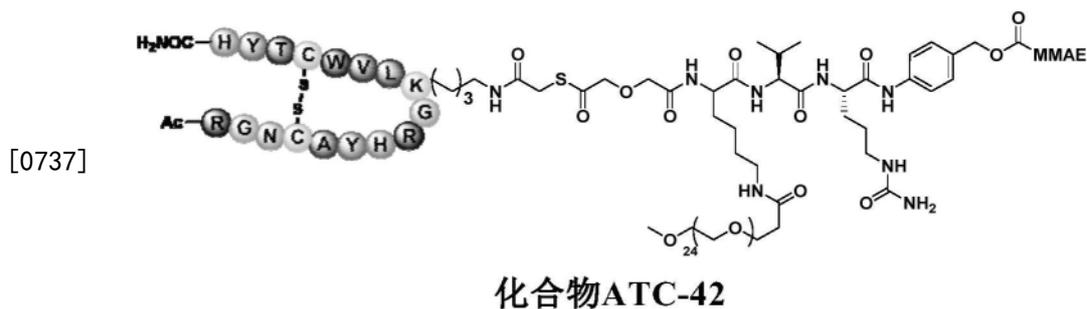
[0732] 步骤1:称取羧酸-聚乙二醇-羧酸(17.8mg,0.1mmol)溶于DMF(400 μ L)中,加入NHS(66.7mg,0.24mmol),EDCI(42.4 μ L,0.24mmol),室温反应过夜后,加入巯基乙酸(20.8 μ L,0.3mmol),PB 7.4缓冲液(400 μ L),室温反应1h,半制备分离纯化得产物49(产率79%)。HRMS,计算值:C₁₀H₁₄O₈S₂: [M+H]⁺327.0208,测量值327.0197。

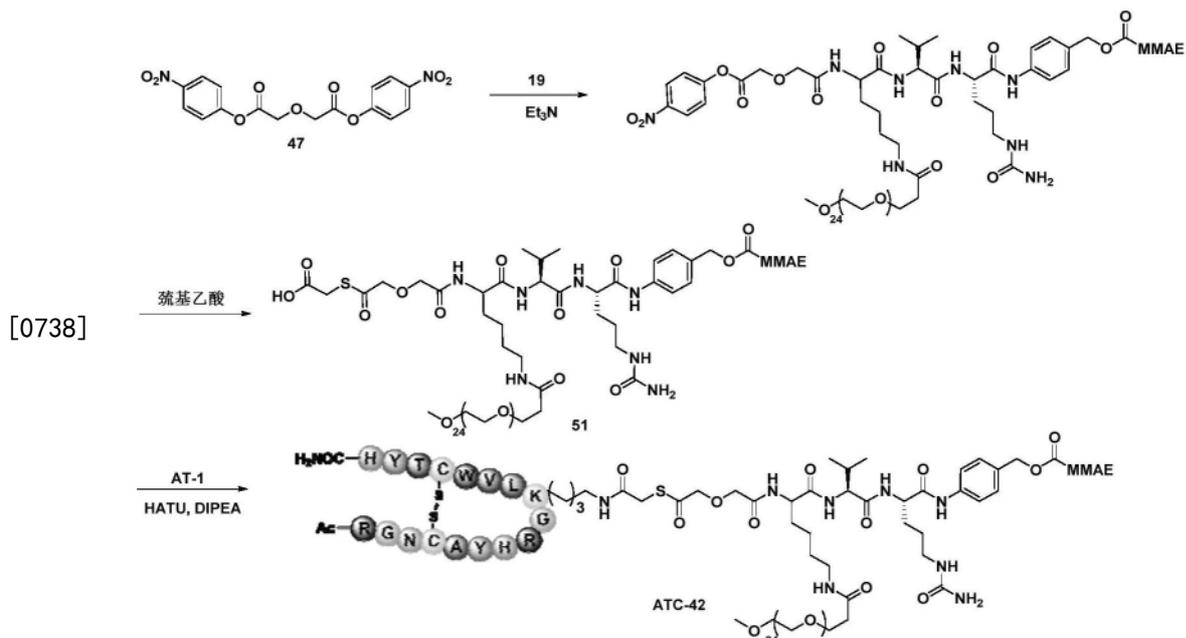
[0733] 步骤2:称取化合物49(9.8mg,30 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入化合物17(11.2mg,10 μ mol),三乙胺(125 μ L,0.9mmol),室温反应2h后,LC-MS监测反应完全,半制备分离纯化,得化合物50(产率88%)。HRMS,计算值:C₆₆H₁₀₄N₁₀O₁₈S: [M+H]⁺1357.7329, [M+2H]²⁺679.3704,测量值679.3759。

[0734] 步骤3:称取化合物50(6.5mg,4.76 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入HATU(2.7mg,7.14 μ mol),DIPEA(1.84 μ L,10.7 μ mol)以及AT-1(10mg,4.76 μ mol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-41(产率85%)。HRMS,计算值:C₁₅₉H₂₃₇N₄₁O₃₉S₃: [M+H]⁺3441.7062, [M+4H]⁴⁺861.1824, [M+5H]⁵⁺689.1475,测量值861.1859,689.1512。

[0735] 实施例42:化合物ATC-42的合成

[0736] 化合物ATC-42的结构以及合成方法如下:



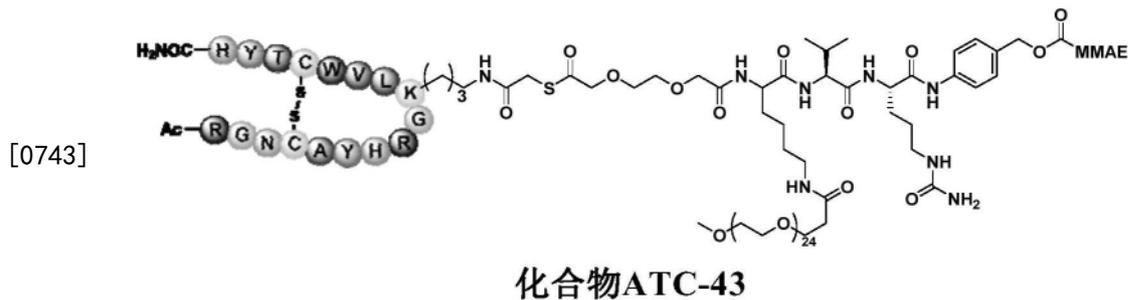


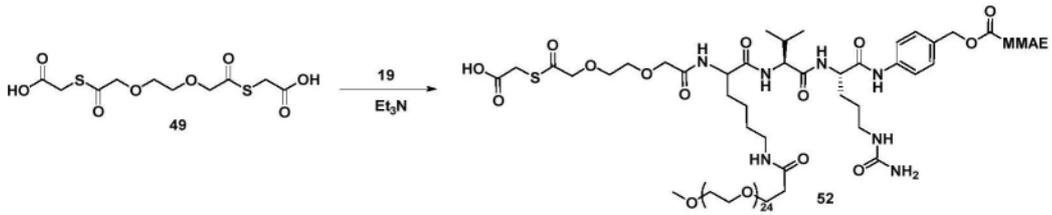
[0739] 步骤1: 化合物47 (11.3mg, 30 μ mol) 溶于DMF (200 μ L) 中, 加入化合物19 (23.9mg, 10 μ mol), 三乙胺 (6.94 μ L, 50 μ mol), 室温反应20min后, 加入巖基乙酸 (2.1 μ L, 30 μ mol), PB7.4缓冲液, 室温反应1h, 半制备分离纯化, 得化合物51 (产率81%)。HRMS, 计算值: C₁₂₂H₂₁₄N₁₂O₄₄S: [M+H]⁺2584.4676, [M+3H]³⁺862.1611, [M+4H]⁴⁺646.8728, 测量值862.1596, 646.8756。

[0740] 步骤2: 称取化合物51 (6.15mg, 2.38 μ mol) 溶于DMF (200 μ L) 中, 加入HATU (1.35mg, 4.76 μ mol), DIPEA (1.23 μ L, 7.14 μ mol) 以及AT-1 (5mg, 2.38 μ mol), 室温反应2h, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-42 (产率84%)。HRMS, 计算值: C₂₁₅H₃₄₇N₄₃O₆₅S₃: [M+H]⁺4668.4409, [M+4H]⁴⁺1167.8661, [M+5H]⁵⁺934.4944, [M+6H]⁶⁺778.9133 测量值934.5015, 778.9215。

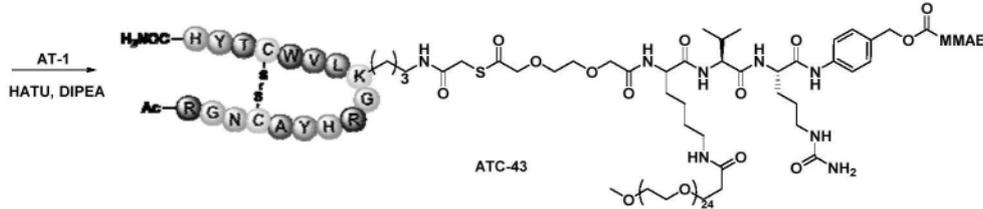
[0741] 实施例43: 化合物ATC-43的合成

[0742] 化合物ATC-43的结构以及合成方法如下:





[0744]

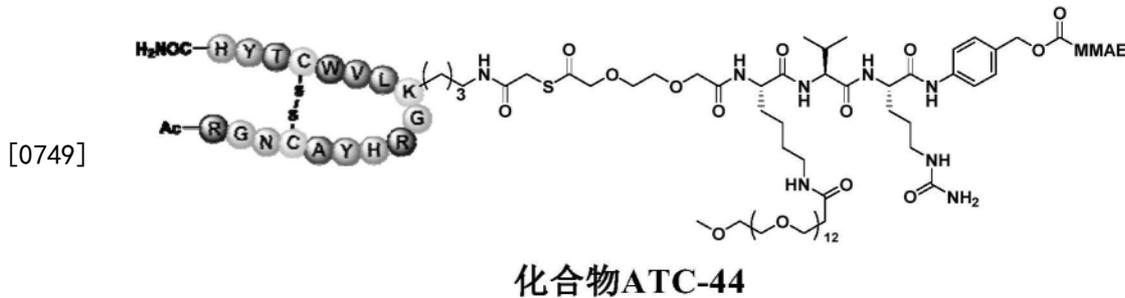


[0745] 步骤1:称取化合物49(4.9mg, 15 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入化合物19(12mg, 5 μ mol),三乙胺(62.5 μ L, 0.45mmol),室温反应3h后,LC-MS监测反应完全,半制备分离纯化,得化合物52(产率85%)。HRMS,计算值: $C_{124}H_{218}N_{12}O_{45}S$: $[M+H]^+$ 2628.4938, $[M+3H]^{3+}$ 876.8365, $[M+4H]^{4+}$ 657.8793,测量值876.8395,657.8852。

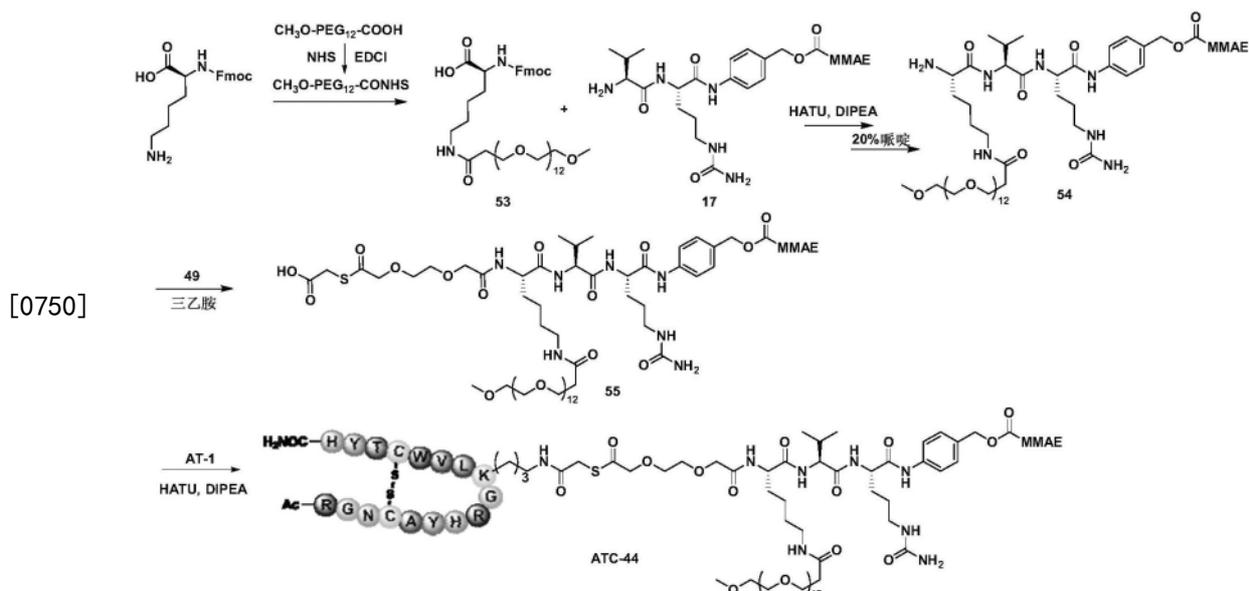
[0746] 步骤2:称取化合物52(6.25mg, 2.38 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入HATU(1.8mg, 4.76 μ mol),DIPEA(1.23 μ L, 7.14 μ mol)以及AT-1(5mg, 2.38 μ mol),室温反应1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-43(产率87%)。HRMS,计算值: $C_{217}H_{351}N_{43}O_{66}S_3$: $[M+H]^+$ 4712.4671, $[M+5H]^{5+}$ 943.2997, $[M+6H]^{6+}$ 786.2510测量值943.3005, 786.2519。

[0747] 实施例44:化合物ATC-44的合成

[0748] 化合物ATC-44的结构以及合成方法如下:



[0749]



[0751] 步骤1:称取 $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}_{12}-\text{COOH}$ (17mg, 0.027mmol) 溶解于乙腈中,加入NHS (3.71mg, 0.032mmol), EDCI (5.7 μL , 0.032mmol), 室温反应过夜后,加入Fmoc-Lys(NH₂)-OH (10mg, 0.027mmol) 的乙腈/水=1/1混合溶液,室温搅拌2h,LC-MS监测反应完全,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末53 (产率78%)。HRMS, 计算值: $\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{18}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 983.5328, 测量值983.5318。

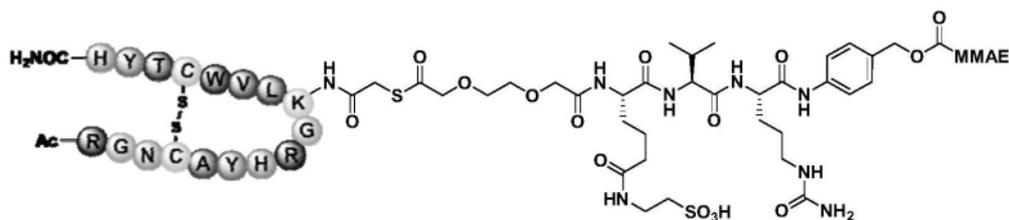
[0752] 步骤2:称取化合物53 (8.74mg, 8.9 μmol) 溶解于DMF中,加入HATU (6.8mg, 17.8 μmol), DIPEA (4.6 μL , 27.6 μmol), 化合物17 (10mg, 8.9 μmol), 室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,加入20%哌啶,室温反应15min后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末54 (产率78%)。HRMS, 计算值: $\text{C}_{92}\text{H}_{160}\text{N}_{12}\text{O}_{27}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1866.1594, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 622.7250, 测量值622.7289。

[0753] 步骤3:称取化合物54 (9.33mg, 5 μmol) 溶于DMF (200 μL) 中,加入化合物49 (4.9mg, 15 μmol), 三乙胺 (20.8 μL , 0.15mmol), 室温反应2h后,LC-MS监测反应完全,半制备分离纯化,得化合物55 (产率87%)。HRMS, 计算值: $\text{C}_{100}\text{H}_{170}\text{N}_{12}\text{O}_{33}\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2100.1792, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 700.7316, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 525.8007, 测量值700.7359, 525.8095。

[0754] 步骤4:称取化合物52 (5mg, 2.38 μmol) 溶于DMF (200 μL) 中,加入HATU (1.8mg, 4.76 μmol), DIPEA (1.23 μL , 7.14 μmol) 以及AT-1 (5mg, 2.38 μmol), 室温反应1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-44 (产率86%)。HRMS, 计算值: $\text{C}_{193}\text{H}_{303}\text{N}_{43}\text{O}_{54}\text{S}_3$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 4184.1526, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 837.6368, $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 698.1986, 测量值837.6389, 698.2015。

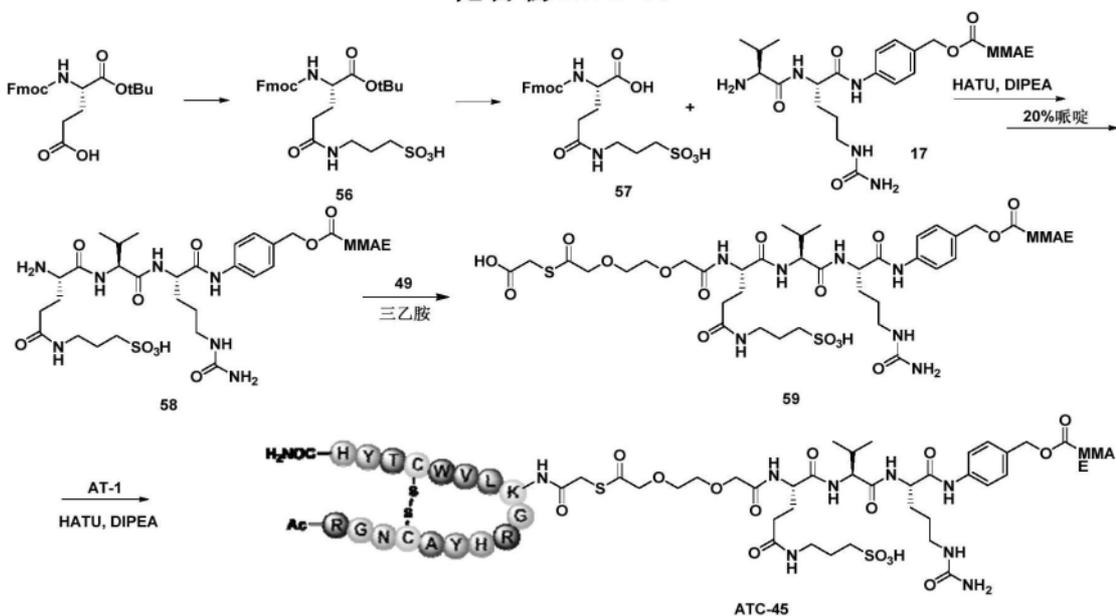
[0755] 实施例45:化合物ATC-45的合成

[0756] 化合物ATC-45的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-45

[0757]



[0758] 步骤1:称取苄氧羰基-L-谷氨酸1-叔丁酯(20mg,0.047mmol)溶解于DMF中,加入HATU(35.8mg,0.094mmol),DIPEA(24.2 μ L,0.14mmol),3-氨基-1-丙烷磺酸(6.5mg,0.047mmol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末56(产率85%)。HRMS,计算值: $C_{27}H_{34}N_2O_8S$: $[M+H]^+$ 547.2114,测量值547.2156。

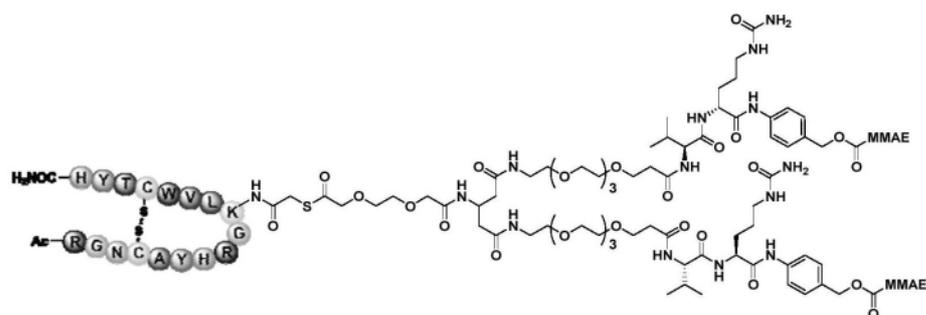
[0759] 步骤2:称取化合物56(4.9mg,8.9 μ mol)加入二氯甲烷200 μ L,三氟乙酸180 μ L,异丙基硅烷20 μ L,室温反应1h, N_2 吹干溶剂,得化合物57,溶于DMF中,加入HATU(6.8mg,17.8 μ mol),DIPEA(4.6 μ L,27.6 μ mol),化合物17(10mg,8.9 μ mol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,加入20%吡啶,室温反应15min后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末58(产率81%)。HRMS,计算值: $C_{66}H_{108}N_{12}O_{17}S$: $[M+H]^+$ 1373.7754, $[M+2H]^{2+}$ 687.3916,测量值687.3988。

[0760] 步骤3:称取化合物58(7.2mg,10 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入化合物49(9.8mg,30 μ mol),三乙胺(41.6 μ L,0.30mmol),室温反应2h后,LC-MS监测反应完全,半制备分离纯化,得化合物59(产率82%)。HRMS,计算值: $C_{74}H_{118}N_{12}O_{23}S_2$: $[M+H]^+$ 1607.7952, $[M+2H]^{2+}$ 804.4015,测量值804.4110。

[0761] 步骤4:称取化合物59(3.8mg,2.38 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入HATU(1.8mg,4.76 μ mol),DIPEA(1.23 μ L,7.14 μ mol)以及AT-1(5mg,2.38 μ mol),室温反应1h,LC-MS监测反应完全后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物ATC-45(产率90%)。HRMS,计算值: $C_{167}H_{251}N_{43}O_{44}S_4$: $[M+H]^+$ 3691.7686, $[M+5H]^{5+}$ 739.1600,测量值739.1642。

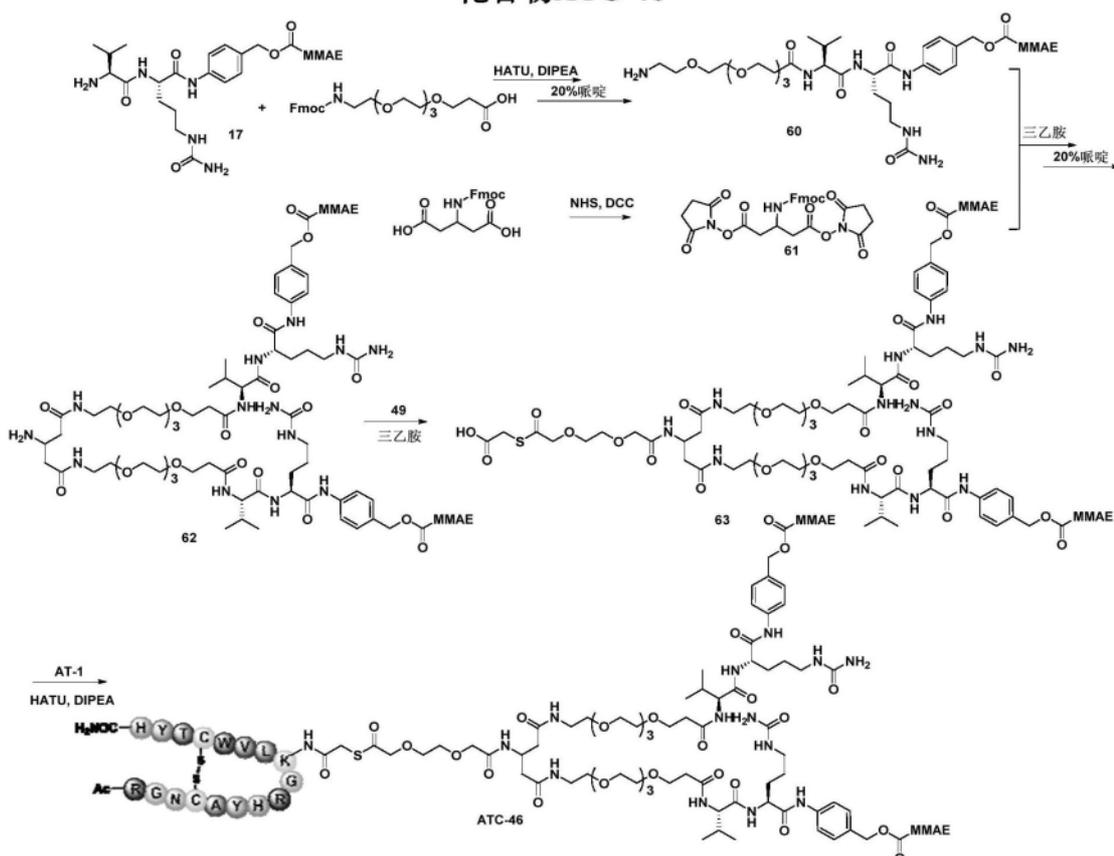
[0762] 实施例46:化合物ATC-46的合成

[0763] 化合物ATC-46的结构以及合成方法如下:



化合物ATC-46

[0764]



[0765] 步骤1:称取Fmoc-PEG₄-COOH(8.8mg, 17.8 μ mol),加入HATU(13.6mg, 35.6 μ mol), DIPEA(9.2 μ L, 55.2 μ mol),化合物17(20mg, 17.8 μ mol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,加入20%哌啶,室温反应15min后,使用半制备分离纯化,冻干得白色粉末60(产率87%)。HRMS,计算值:C₆₉H₁₁₅N₁₁O₁₇: [M+H]⁺1370.8550,测量值1370.8547。

[0766] 步骤2:称取3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)戊二酸(10mg, 27.1 μ mol)溶于DMF(300 μ L),加入NHS(3.8mg, 32.5 μ mol),DCC(6.7mg, 32.5 μ mol),4 $^{\circ}$ C反应过夜,得化合物61粗品。取反应液80 μ L,加入化合物60(10mg, 7.3 μ mol)的DMF溶液80 μ L,三乙胺(3 μ L, 21.9 μ mol),室温反应2h,LC-MS监测反应完全后,加入哌啶40 μ L,室温反应15min后,使用半制备分离纯化,冻干得化合物62(产率90%)。HRMS,计算值:C₁₄₃H₂₃₅N₂₃O₃₆: [M+H]⁺2851.7343, [M+3H]³⁺951.2500,测量值951.2495。

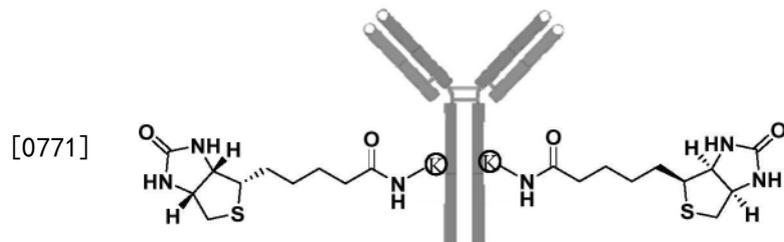
[0767] 步骤3:称取化合物62(7.12mg, 2.5 μ mol)溶于DMF(200 μ L)中,加入化合物49(1.7mg, 5 μ mol),三乙胺(16.6 μ L, 0.12mmol),室温反应5h后,LC-MS监测反应完全,半制备分离纯化,得化合物63(产率70%)。HRMS,计算值:C₁₅₁H₂₄₅N₂₃O₄₂S: [M+H]⁺3085.7541, [M+3H]³⁺

1029.2566, $[M+4H]^{4+}$ 772.1944, 测量, 1029.1856, 772.2015.

[0768] 步骤4: 称取化合物63 (5mg, 1.62 μ mol) 溶于DMF (200 μ L) 中, 加入HATU (1.2mg, 3.24 μ mol), DIPEA (0.84 μ L, 4.86 μ mol) 以及AT-1 (5mg, 2.38 μ mol), 室温反应2h, LC-MS监测反应完全后, 使用半制备分离纯化, 冻干得化合物ATC-46 (产率88%)。HRMS, 计算值: $C_{244}H_{378}N_{54}O_{63}S_3$: $[M+H]^+$ 5169.7275, $[M+5H]^{5+}$ 1034.7517, 测量值 1034.7451.

[0769] V: 亲和片段导向的可裂解片段的应用实施例

[0770] 实施例47: 生物素化抗体Ab-1的制备及表征



抗体Ab-1

[0772] 47-1. 抗体Ab-1的制备:

[0773] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-2 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37 $^{\circ}$ C反应2h, LC-MS监测反应完全。经protein A纯化、超滤管浓缩, 进而置换为1 \times PBS缓冲液后得到生物素化抗体Ab-1。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145870观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个生物素的产物在146355观测到峰 (图1a)。

[0774] 47-2. 抗体Ab-1的重链选择性确认:

[0775] 将抗体Ab-1用50mM PB 7.4缓冲液稀释至5mg/mL, 加入TCEP (20eq, 终浓度: 0.668mM), 37 $^{\circ}$ C孵育20min。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的轻链峰, 原料重链在49499观测到峰, 关于产物, 在重链中引入了生物素标签在49725观测到峰 (图1b)。

[0776] 47-3. 抗体Ab-1的Fc选择性确认:

[0777] 将抗体Ab-1用50mM PB 7.0缓冲液稀释至5mg/mL, 加入IdeS protease (终浓度: 0.5U/ μ L), 37 $^{\circ}$ C孵育过夜。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的Fab峰, 原料Fc在24136观测到峰, 关于产物, 在Fc区域中引入了生物素标签在24362观测到峰 (图1c)。

[0778] 47-4. 抗体Ab-1的位点确证:

[0779] 47-4-1. 样品制备

[0780] 取抗体Ab-1 (10 μ g) 用50mM碳酸氢铵缓冲液稀释至90 μ L。加入1 μ L的PNGase F酶, 37 $^{\circ}$ C孵育4h。加入DTT (5mM) 37 $^{\circ}$ C孵育30min, 然后加入碘乙酰胺 (11mM) 室温避光反应30min。随后用0.5 μ g胰酶在37 $^{\circ}$ C下消化过夜。用2%的三氟乙酸终止消化, 对消化后的蛋白质脱盐、干燥。随后进行进一步的LC-MS/MS分析。

[0781] 47-4-2. LC-MS/MS装置及分析条件

[0782] 纳米HPLC: EASY-nLC 1200UHPLC系统 (ThermoFisher Scientific)

[0783] 质谱仪: Q Exactive HF-X质谱仪 (ThermoFisher Scientific)

[0784] 分析柱: C18柱 (75 μ m \times 25cm, 1.9 μ m) (Dr. Maisch GmbH)

[0785] 流动相A: 含0.1%甲酸的水溶液

[0786] 流动相B:含0.1%甲酸的乙腈溶液

[0787] 梯度条件(B%):5%-90%(0-30min)

[0788] 使用纳米喷雾源进行分析。在Orbitrap中以60,000的分辨率检测到完整的肽。MS扫描范围为350-2000m/z,自动增益控制值为 $1e^6$,最大进样时间为45ms。使用28的归一化碰撞能量设置为MS/MS选择肽段;获得了质量分辨率为30,000的串联质谱。在每次MS扫描中选择具有2-5个电荷的前12个母离子用于随后的MS/MS扫描,自动增益控制值为 $5e^4$,最大进样时间为100ms。动态排除设置为10s。

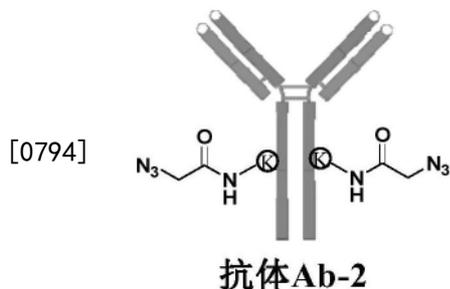
[0789] 47-4-3.数据获取

[0790] 使用蛋白质鉴定软件Mascot 2.3分析原始数据。将曲妥珠单抗序列添加到提供给搜索引擎的肽识别数据库中。将胰蛋白酶设定为消化酶(C端裂解为Lys和Arg残基),最多允许有两个缺失的裂解。将甲硫氨酸残基的氧化(+15.9949Da)、对赖氨酸的新修饰(+226.0776Da)以及天冬酰胺的脱酰胺(+0.9840Da)设置为可变修饰。对半胱氨酸(+57.0215Da)上的氨基甲酸甲酯作为固定修饰进行搜索。母离子和碎片离子的质量容差分别设置为10ppm和0.05Da。所有修饰的肽都经过人工验证。

[0791] 47-4-4.结果分析

[0792] 从LC-MS/MS分析结果中可观测到曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸的修饰部位的由33个氨基酸残基形成的肽(THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK(C₁₀H₁₄N₂O₂S)DTLMISR)的肽片段的MS谱(图1d),根据CID谱确认了重链上第251位的赖氨酸残基的修饰。此外通过Mascot 2.3软件进一步分析,表明了高选择性地发生了对第251位赖氨酸残基的修饰(图1e)。

[0793] 实施例48:叠氮化抗体Ab-2的制备及表征



[0795] 48-1.抗体Ab-2的制备:

[0796] 将曲妥珠单抗(5mg/mL),化合物ATC-1(5eq,0.168mM)加入NaOAc缓冲溶液中(50mM,pH 5.5,含20%DMF),置于37°C孵育30min,LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩,进而置换为1×PBS缓冲液后得到生物素化抗体Ab-2。经ESI-TOFMS测定质量,原料曲妥珠单抗在145870观测到峰,关于反应产物,偶联2个叠氮乙酸的产物在146037观测到峰(图2a)。

[0797] 48-2.抗体Ab-2的重链选择性确认:

[0798] 将抗体Ab-2用50mM PB 7.4缓冲液稀释至5mg/mL,加入TCEP(20eq,终浓度:0.668mM),37°C孵育20min。经ESI-TOFMS测定质量,原料、产物观测到相同的轻链峰,原料重链在49499观测到峰,关于产物,在重链中引入了生物素标签在49583观测到峰(图2b)。

[0799] 48-3抗体Ab-2的Fc选择性确认:

[0800] 将抗体Ab-2用50mM PB 7.0缓冲液稀释至5mg/mL,加入IdeS protease(终浓度:0.5U/μL),37°C孵育过夜。经ESI-TOFMS测定质量,原料、产物观测到相同的Fab峰,原料Fc在

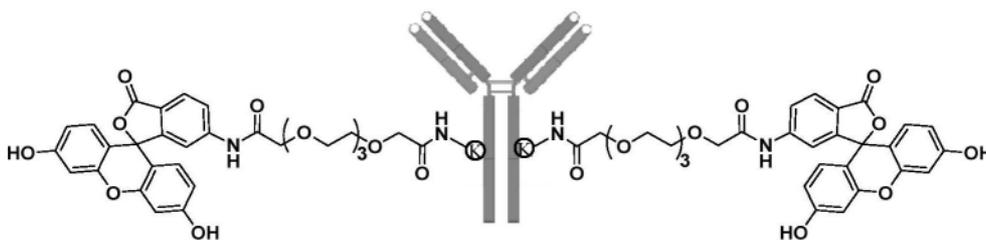
24136观测到峰,关于产物,在Fc区域中引入了叠氮基团在24219观测到峰(图2c)。

[0801] 实施例49:FITC定点修饰抗体Ab-3的制备及表征

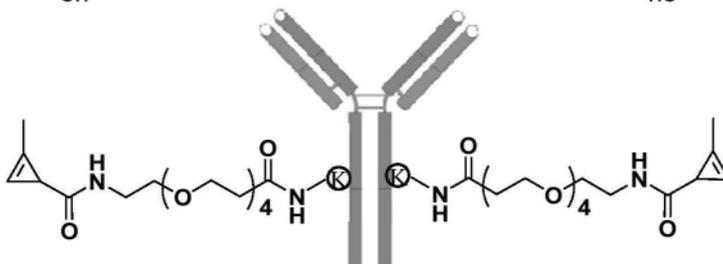
[0802] 抗体Ab-3

[0803] 将曲妥珠单抗(5mg/mL),化合物ATC-34(10eq,0.334mM)加入PIPES缓冲溶液中(50mM,pH 7.4,含20%DMF),置于37℃孵育2h,LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩,进而置换为1×PBS缓冲液后得到FITC定点修饰抗体Ab-3。经ESI-TOFMS测定质量,原料曲妥珠单抗在145870观测到峰,关于反应产物,偶联2个荧光素的产物在147150观测到峰(图3)。

[0804] 实施例50:甲基环丙烯定点修饰抗体Ab-4的制备及表征



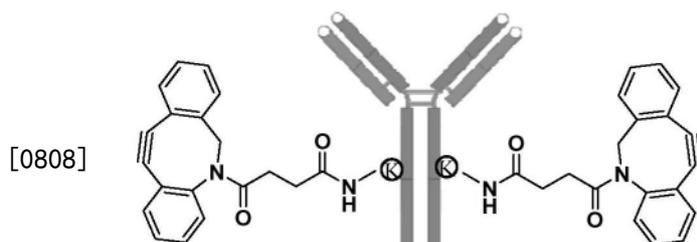
[0805]



抗体Ab-4

[0806] 将曲妥珠单抗(5mg/mL),化合物ATC-35(10eq,0.334mM)加入PIPES缓冲溶液中(50mM,pH 7.4,含20%DMF),置于37℃孵育2h,LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩,进而置换为1×PBS缓冲液后得到甲基环丙烯定点修饰抗体Ab-4。经ESI-TOFMS测定质量,原料曲妥珠单抗在145870观测到峰,关于反应产物,偶联2个甲基环丙烯的产物在146524观测到峰(图4)。

[0807] 实施例51:DBCO定点修饰抗体Ab-5的制备及表征

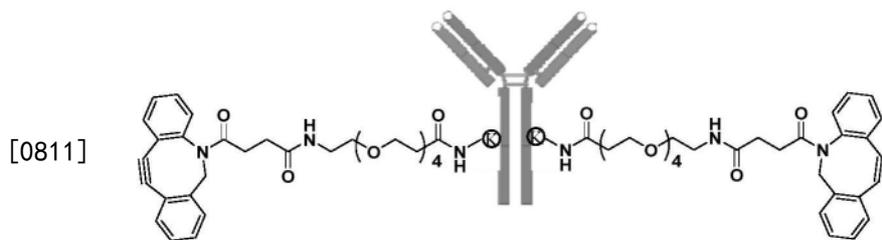


[0808]

抗体Ab-5

[0809] 将利妥昔单抗(5mg/mL),化合物ATC-36(10eq,0.334mM),加入PIPES缓冲溶液中(50mM,pH 7.4,含20%DMF),置于37℃孵育2h,LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩,进而置换为1×PBS缓冲液后得到DBCO定点修饰抗体Ab-5。经ESI-TOFMS测定质量,原料曲妥珠单抗在144891观测到峰,关于反应产物,偶联2个DBCO的产物在145465观测到峰(图5)。

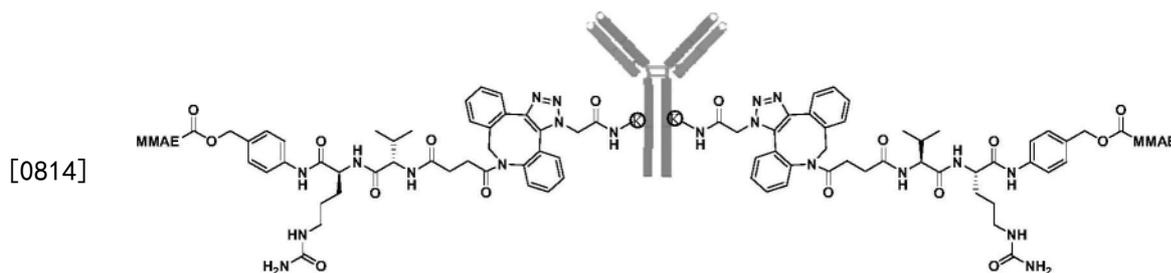
[0810] 实施例52:DBCO定点修饰抗体Ab-6的制备及表征



抗体Ab-6

[0812] 将利妥昔单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-37 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37°C孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到DBCO定点修饰抗体Ab-6。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在144891观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个DBCO的产物在145947观测到峰 (图6)。

[0813] 实施例53: 两步法ADC-1的制备及表征



化合物ADC-1

[0815] 53-1. ADC-1的制备:

[0816] 将叠氮化抗体Ab-2 (5mg/mL), 药物连接子D1 (15eq, 0.5mM) 分别加入PB缓冲溶液 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF) 中, 置于37°C孵育过夜, LC-MS监测反应完全, 使用ProteinA纯化、超滤管浓缩进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145870观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D1的产物在148859观测到峰 (图7a)。

[0817] 53-2. ADC-1的重链选择性确认:

[0818] 将ADC-1用50mM PB 7.4缓冲液稀释至5mg/mL, 加入TCEP (20eq, 终浓度: 0.668mM), 37°C孵育20min。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的轻链峰, 原料重链在49499观测到峰, 关于产物, 在重链中引入1个药物连接子D1在50992观测到峰 (图7b)。

[0819] 53-3. ADC-1的Fc选择性确认:

[0820] 将ADC-1用50mM PB 7.0缓冲液稀释至5mg/mL, 加入IdeS protease (终浓度: 0.5U/μL), 37°C孵育过夜。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的Fab峰, 原料Fc在24136观测到峰, 关于产物, 在Fc区域中引入1个药物连接子在25629观测到峰 (图7c)。

[0821] 53-4. ADC-1的HIC分析 (疏水色谱分析)

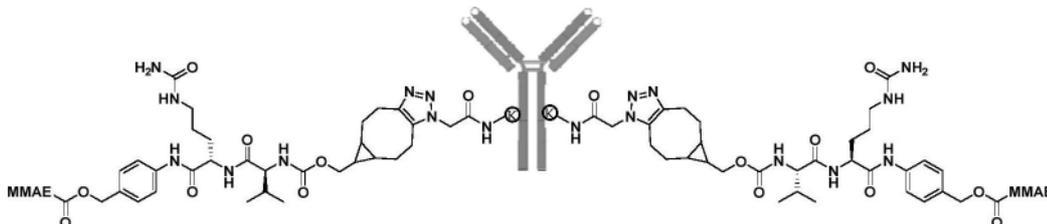
[0822] 将ADC-1使用1×PBS稀释至5mg/mL, 进样5μL。HIC柱使用TSKgel, (4.6×10cm, 2.5μm); 流动相A: 0.1M磷酸钠, 1.5M硫酸铵缓冲液, pH=7.0; 流动相B: 0.1M磷酸钠缓冲液, pH=7.0, 流速1mL/min, 0-15min, 线性梯度0-100%流动相B。检测波长为280nm。保留时间9.391min被认为是药物连接子D1纯度不够以引入的杂峰, 10.354min被认为是在曲妥珠单抗中引入2个药物连接子D1的化合物 (图7d)。

[0823] 53-5.ADC-1的聚集稳定性分析(分子排阻色谱分析)

[0824] 将ADC-1使用1×PBS稀释至1mg/mL,60℃PCR仪加热48h,0h,6h,12h,24h,48h分别取点进行SEC分析,每个时间点取样15μL.SEC柱使用BioCore SEC-300column(7.8×300mm 5μm),SEC分析使用流动相为150mM磷酸钠,pH=7.4,流速为1mL/min,等度洗脱15min,检测波长为280nm.保留时间5.4-8.0min被认为是聚集体的峰,保留时间8.907min被认为是单体的峰(图7e)。

[0825] 实施例54:两步法ADC-2的制备及表征

[0826]



化合物ADC-2

[0827] 54-1.ADC-2的制备:

[0828] ADC-2的制备条件同ADC-1.经ESI-TOFMS测定质量,原料曲妥珠单抗在145870观测到峰,关于反应产物,偶联2个药物连接子D2的产物在148636观测到峰(图8a)。

[0829] 54-2.ADC-2的重链选择性确认:

[0830] TCEP处理条件同ADC-1.经ESI-TOFMS测定质量,原料、产物观测到相同的轻链峰,原料重链在49499观测到峰,关于产物,在重链中引入1个药物连接子D2在50811观测到峰(图8b)。

[0831] 54-3.ADC-2的Fc选择性确认:

[0832] IdeS protease处理条件同ADC-1.经ESI-TOFMS测定质量,原料、产物观测到相同的Fab峰,原料Fc在24136观测到峰,关于产物,在Fc区域中引入1个药物连接子在25518观测到峰(图8c)。

[0833] 54-4.ADC-2的HIC分析(疏水色谱分析)

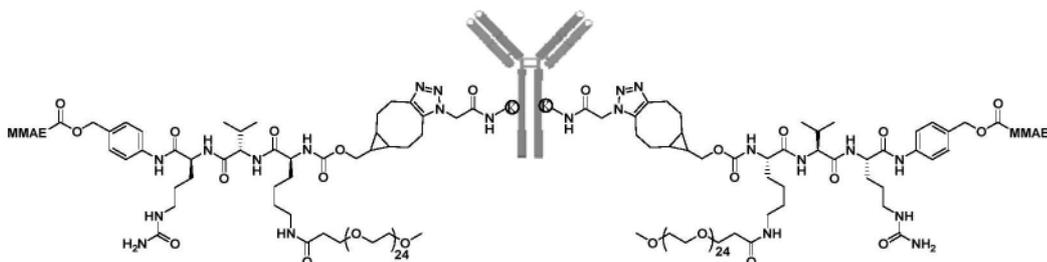
[0834] HIC分析操作同ADC-1.保留时间9.071min被认为是在曲妥珠单抗中引入1个药物连接子D2的化合物,10.170min被认为是在曲妥珠单抗中引入2个药物连接子D2的化合物(图8d)。

[0835] 54-5.ADC-2的聚集稳定性分析(分子排阻色谱分析)

[0836] 聚集稳定性分析操作同ADC-1.保留时间5.4-8.0min被认为是聚集体的峰,保留时间8.923min被认为是单体的峰(图8e)。

[0837] 实施例55:两步法ADC-3的制备及表征

[0838]



化合物ADC-3

[0839] 55-1.ADC-3的制备:

[0840] ADC-3的制备条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量,原料曲妥珠单抗在145870观测到峰,关于反应产物,偶联2个药物连接子D3的产物在151180观测到峰(图9a)。

[0841] 55-2.ADC-3的重链选择性确认:

[0842] TCEP处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量,原料、产物观测到相同的轻链峰,原料重链在49499观测到峰,关于产物,在重链中引入1个药物连接子D3在52154观测到峰(图9b)。

[0843] 55-3.ADC-3的Fc选择性确认:

[0844] IdeS protease处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量,原料、产物观测到相同的Fab峰,原料Fc在24136观测到峰,关于产物,在Fc区域中引入1个药物连接子D3在26790观测到峰(图9c)。

[0845] 55-4.ADC-3的HIC分析(疏水色谱分析)

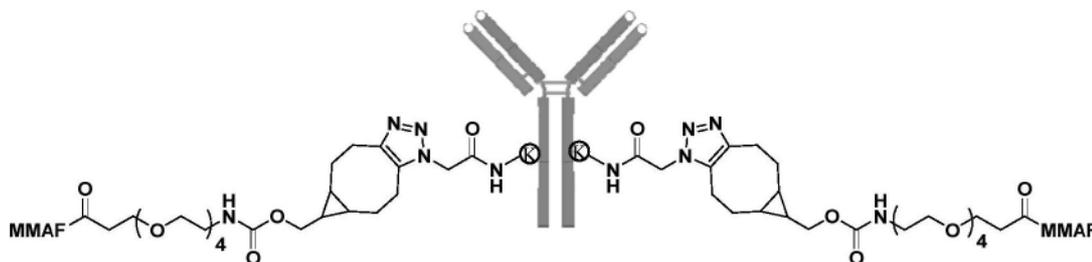
[0846] HIC分析操作同ADC-1。保留时间8.846min被认为是在曲妥珠单抗中引入1个药物连接子D3的化合物,9.611min被认为是在曲妥珠单抗中引入2个药物连接子D3的化合物(图9d)。

[0847] 55-5.ADC-3的聚集稳定性分析(分子排阻色谱分析)

[0848] 聚集稳定性分析操作同ADC-1。保留时间5.4-8.0min被认为是聚集体的峰,保留时间8.850min被认为是单体的峰(图9e)。

[0849] 实施例56:两步法ADC-4的制备及表征

[0850]



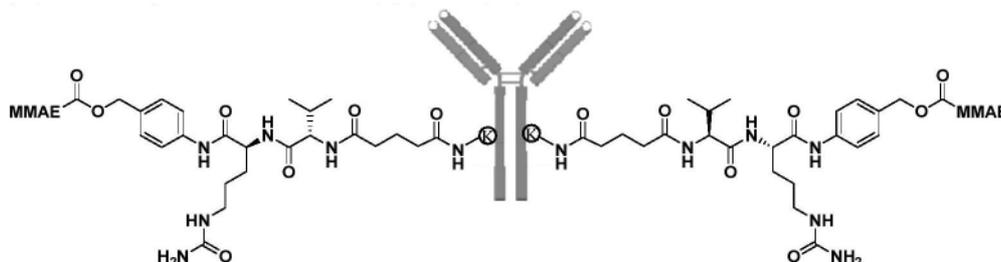
化合物ADC-4

[0851] ADC-4的制备:

[0852] ADC-4的制备条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量,原料曲妥珠单抗在145870观测到峰,关于反应产物,偶联2个药物连接子D4的产物在148377观测到峰(图10)。

[0853] 实施例57:一步法ADC-5的制备及表征

[0854]



化合物ADC-5

[0855] 57-1.ADC-5的制备:

[0856] 将曲妥珠单抗(5mg/mL),化合物ATC-6(10eq,0.334mM)加入PIPES缓冲溶液中

(50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37℃孵育3h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-5。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145870观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D5的产物在148311观测到峰(图11a)。

[0857] 57-2. ADC-5的重链选择性确认:

[0858] TCEP处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的轻链峰, 原料重链在49499观测到峰, 关于产物, 在重链中引入1个药物连接子D5在50718观测到峰(图11b)。

[0859] 57-3. ADC-5的Fc选择性确认:

[0860] IdeS protease处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的Fab峰, 原料Fc在24136观测到峰, 关于产物, 在Fc区域中引入1个药物连接子D5在25355观测到峰(图11c)。

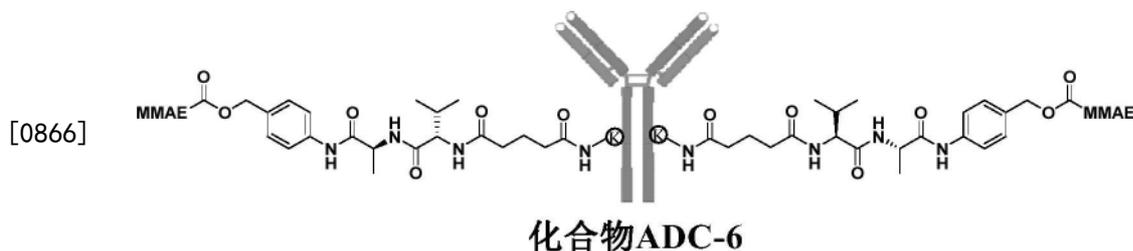
[0861] 57-4. ADC-5的HIC分析(疏水色谱分析)

[0862] HIC分析操作同ADC-1。保留时间8.687min被认为是在曲妥珠单抗中引入1个药物连接子D5的化合物, 9.676min被认为是在曲妥珠单抗中引入2个药物连接子D5的化合物(图11d)。

[0863] 57-5. ADC-5的聚集稳定性分析(分子排阻色谱分析)

[0864] 聚集稳定性分析操作同ADC-1。保留时间5.4-8.0min被认为是聚集体的峰, 保留时间8.940min被认为是单体的峰(图11e)。

[0865] 实施例58: 一步法ADC-6的制备及表征



[0867] 58-1. ADC-6的制备:

[0868] 将曲妥珠单抗(5mg/mL), 化合物ATC-7(10eq, 0.334mM)加入PIPES缓冲溶液中(50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37℃孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-6。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145870观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D6的产物在148139观测到峰(图12a)。

[0869] 58-2. ADC-6的重链选择性确认:

[0870] TCEP处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的轻链峰, 原料重链在49499观测到峰, 关于产物, 在重链中引入1个药物连接子D6在50633观测到峰(图12b)。

[0871] 58-3. ADC-6的Fc选择性确认:

[0872] IdeS protease处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的Fab峰, 原料Fc在24136观测到峰, 关于产物, 在Fc区域中引入1个药物连接子D6在25270观测到峰(图12c)。

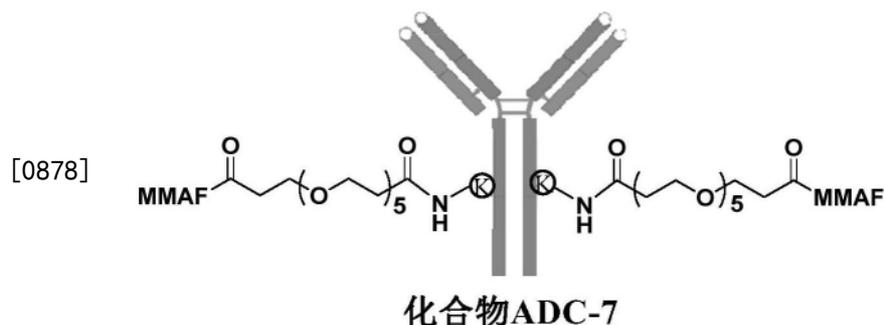
[0873] 58-4. ADC-6的HIC分析(疏水色谱分析)

[0874] HIC分析操作同ADC-1。保留时间8.623min被认为是在曲妥珠单抗中引入1个药物连接子D6的化合物,9.565min被认为是在曲妥珠单抗中引入2个药物连接子D6的化合物(图12d)。

[0875] 58-5.ADC-6的聚集稳定性分析(分子排阻色谱分析)

[0876] 聚集稳定性分析操作同ADC-1。保留时间5.4-8.0min被认为是聚集体的峰,保留时间8.883min被认为是单体的峰(图12e)。

[0877] 实施例59:一步法ADC-7的制备及表征



[0879] 59-1.ADC-7的制备:

[0880] 将曲妥珠单抗(5mg/mL),化合物ATC-8(10eq,0.334mM)加入PIPES缓冲溶液中(50mM,pH 7.4,含20%DMF),置于37℃孵育10h,LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩,进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-7。经ESI-TOFMS测定质量,原料曲妥珠单抗在145870观测到峰,关于反应产物,偶联2个药物连接子D7的产物在147938观测到峰(图13a)。

[0881] 59-2.ADC-7的重链选择性确认:

[0882] TCEP处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量,原料、产物观测到相同的轻链峰,原料重链在49499观测到峰,关于产物,在重链中引入1个药物连接子D7在50533观测到峰(图13b)。

[0883] 59-3.ADC-7的Fc选择性确认:

[0884] IdeS protease处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量,原料、产物观测到相同的Fab峰,原料Fc在24136观测到峰,关于产物,在Fc区域中引入1个药物连接子D7在25170观测到峰(图13c)。

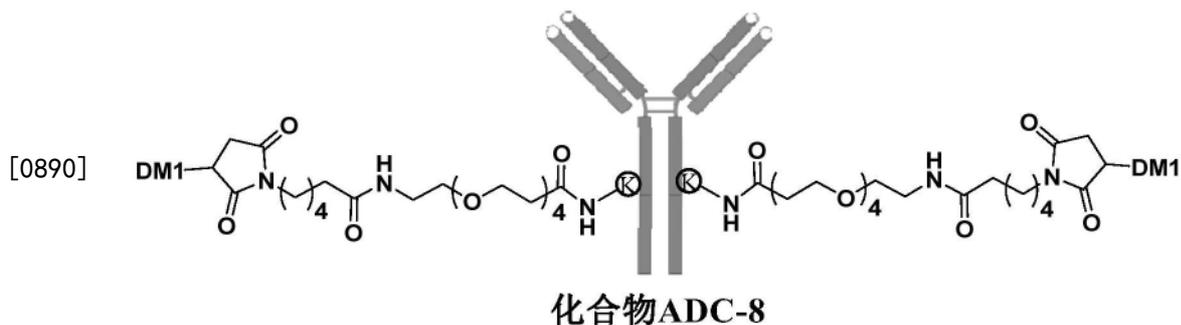
[0885] 59-4.ADC-7的HIC分析(疏水色谱分析)

[0886] HIC分析操作同ADC-1。保留时间8.623min被认为是在曲妥珠单抗中引入2个药物连接子D7的化合物(图13d)。

[0887] 59-5.ADC-7的聚集稳定性分析(分子排阻色谱分析)

[0888] 聚集稳定性分析操作同ADC-1。保留时间5.4-8.0min被认为是聚集体的峰,保留时间8.690min被认为是单体的峰(图13e)。

[0889] 实施例60:一步法ADC-8的制备及表征



[0891] 60-1. ADC-8的制备:

[0892] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-9 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37℃孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-8。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145870观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D8的产物在148225观测到峰 (图14a)。

[0893] 60-2. ADC-8的重链选择性确认:

[0894] TCEP处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的轻链峰, 原料重链在49499观测到峰, 关于产物, 在重链中引入1个药物连接子D8在50677观测到峰 (图14b)。

[0895] 60-3. ADC-8的Fc选择性确认:

[0896] IdeS protease处理条件同ADC-1。经ESI-TOFMS测定质量, 原料、产物观测到相同的Fab峰, 原料Fc在24136观测到峰, 关于产物, 在Fc区域中引入1个药物连接子D8在25315观测到峰 (图14c)。

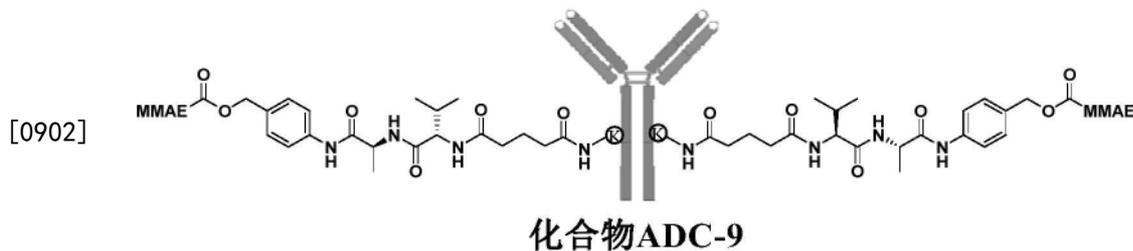
[0897] 60-4. ADC-8的HIC分析 (疏水色谱分析)

[0898] HIC分析操作同ADC-1。保留时间8.370min被认为是在曲妥珠单抗中引入1个药物连接子D8的化合物, 9.063min被认为是在曲妥珠单抗中引入2个药物连接子D8的化合物 (图14d)。

[0899] 60-5. ADC-8的聚集稳定性分析 (分子排阻色谱分析)

[0900] 聚集稳定性分析操作同ADC-1。保留时间5.4-8.0min被认为是聚集体的峰, 保留时间8.623min被认为是单体的峰 (图14e)。

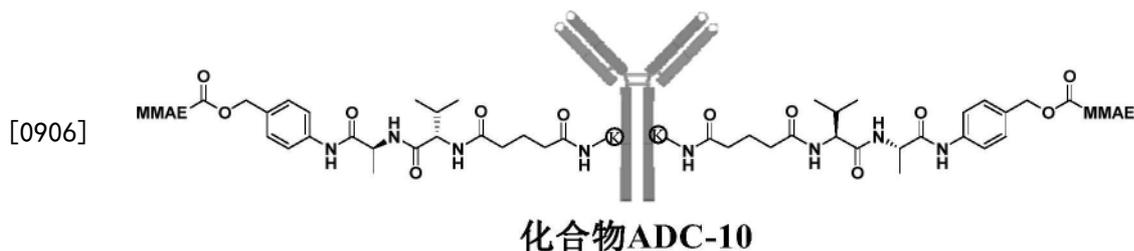
[0901] 实施例61: 一步法ADC-9的制备及表征



[0903] ADC-9的制备:

[0904] 将利妥昔单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-7 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37℃孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-9。经ESI-TOFMS测定质量, 原料利妥昔单抗在144898观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D6的产物在147136观测到峰 (图15)。

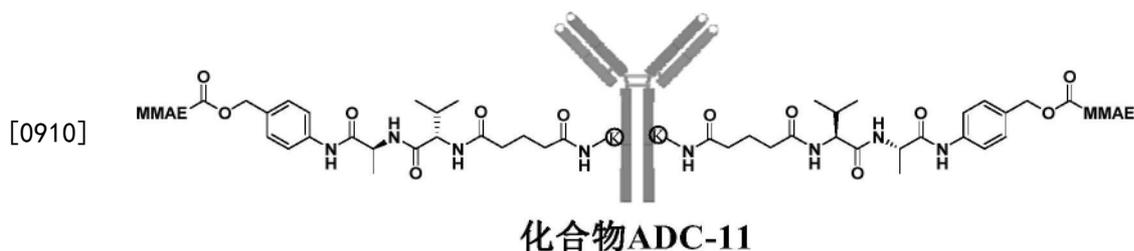
[0905] 实施例62:一步法ADC-10的制备及表征



[0907] ADC-10的制备:

[0908] 将帕妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-7 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37℃孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-10。经ESI-TOFMS测定质量, 原料帕妥珠单抗在145909观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D6的产物在148175观测到峰 (图16)。

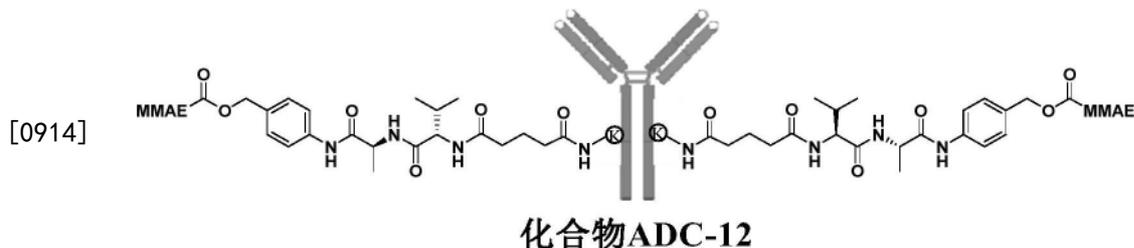
[0909] 实施例63:一步法ADC-11的制备及表征



[0911] ADC-11的制备:

[0912] 将贝伐单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-7 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37℃孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-11。经ESI-TOFMS测定质量, 原料贝伐单抗在147020观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D6的产物在149286观测到峰 (图17)。

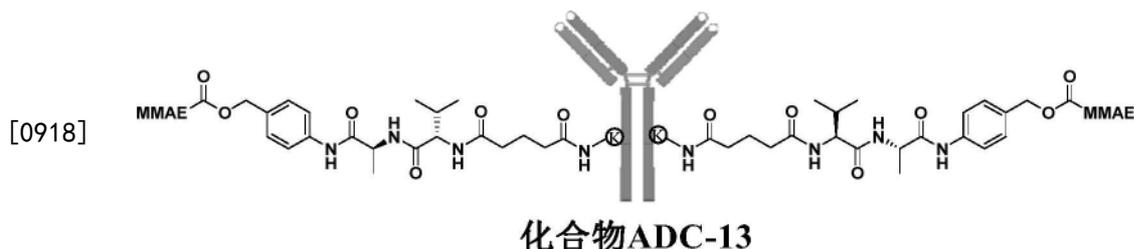
[0913] 实施例64:一步法ADC-12的制备及表征



[0915] ADC-12的制备:

[0916] 将特瑞普利单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-7 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37℃孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-12。经ESI-TOFMS测定质量, 原料特瑞普利单抗在147729观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D6的产物在149996观测到峰 (图18)。

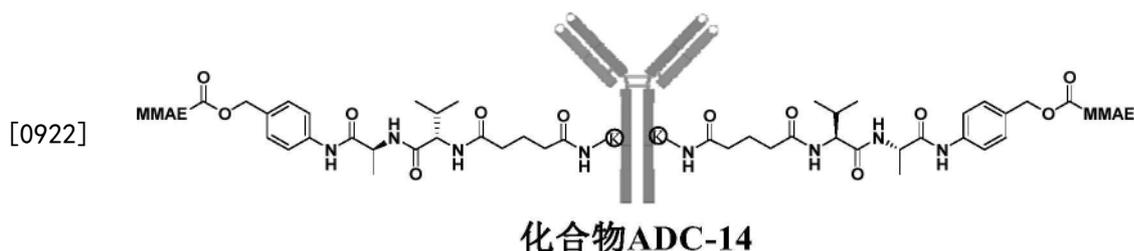
[0917] 实施例65:一步法ADC-13的制备及表征



[0919] ADC-13的制备:

[0920] 将帕尼单抗 (2mg/mL), 化合物ATC-7 (10eq, 0.134mM) 加入1x PBS缓冲溶液中 (含20%DMF), 置于37°C孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-13。经ESI-TOFMS测定质量, 原料帕尼单抗在144723观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D6的产物在146992观测到峰 (图19)。

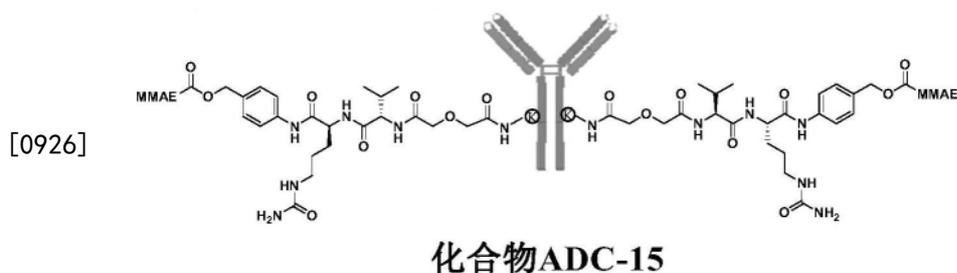
[0921] 实施例66: 一步法ADC-14的制备及表征



[0923] ADC-14的制备:

[0924] 将纳武单抗 (2mg/mL), 化合物ATC-7 (10eq, 0.134mM) 加入1x PBS缓冲溶液中 (含20%DMF), 置于37°C孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-13。经ESI-TOFMS测定质量, 原料纳武单抗在144016观测到峰, 关于反应产物, 偶联2个药物连接子D6的产物在146313观测到峰 (图20)。

[0925] 实施例67: 一步法ADC-15的制备及表征



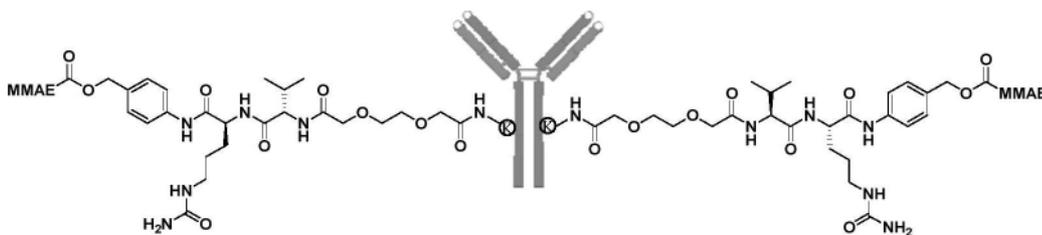
[0927] ADC-15的制备:

[0928] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-40 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37°C孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-15。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145860观测到峰, 关于反应产物在148299观测到峰 (图21a)。

[0929] HIC分析操作同ADC-1 (图21b)。

[0930] 实施例68: 一步法ADC-16的制备及表征

[0931]



化合物ADC-16

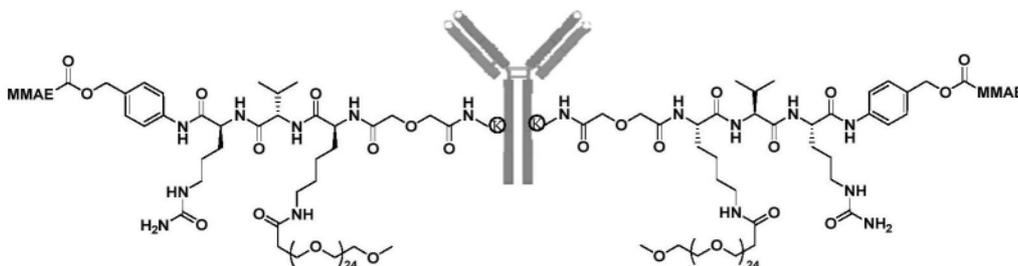
[0932] ADC-16的制备:

[0933] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-41 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37°C孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-16。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145860观测到峰, 关于反应产物在148385观测到峰 (图22a)。

[0934] HIC分析操作同ADC-1 (图22b)。

[0935] 实施例69: 一步法ADC-17的制备及表征

[0936]



化合物ADC-17

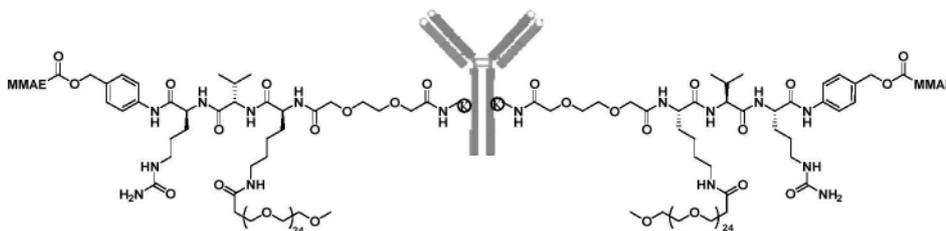
[0937] ADC-17的制备:

[0938] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-42 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37°C孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-17。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145860观测到峰, 关于反应产物在150841观测到峰 (图23a)。

[0939] HIC分析操作同ADC-1 (图23b)。

[0940] 实施例70: 一步法ADC-18的制备及表征

[0941]



化合物ADC-18

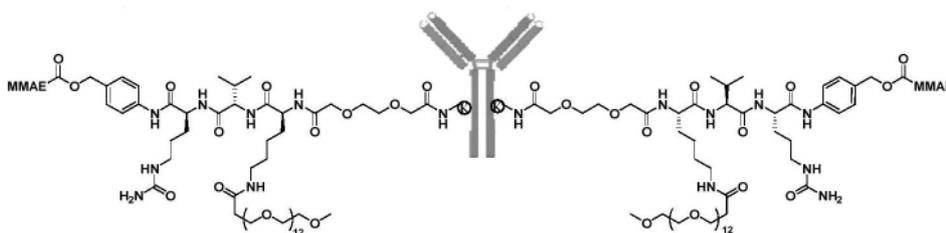
[0942] ADC-18的制备:

[0943] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-43 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37°C孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-18。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145860观测到峰, 关于反应产物在150930观测到峰 (图24a)。

[0944] HIC分析操作同ADC-1(图24b)。

[0945] 实施例71:一步法ADC-19的制备及表征

[0946]



化合物ADC-19

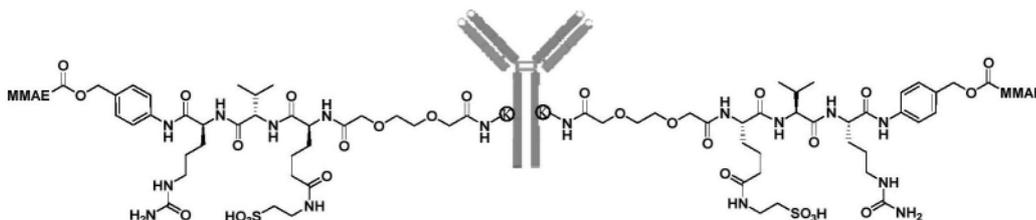
[0947] ADC-19的制备:

[0948] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-44 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于37℃孵育2h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-19。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145860观测到峰, 关于反应产物在149875观测到峰(图25a)。

[0949] HIC分析操作同ADC-1(图25b)。

[0950] 实施例72:一步法ADC-20的制备及表征

[0951]



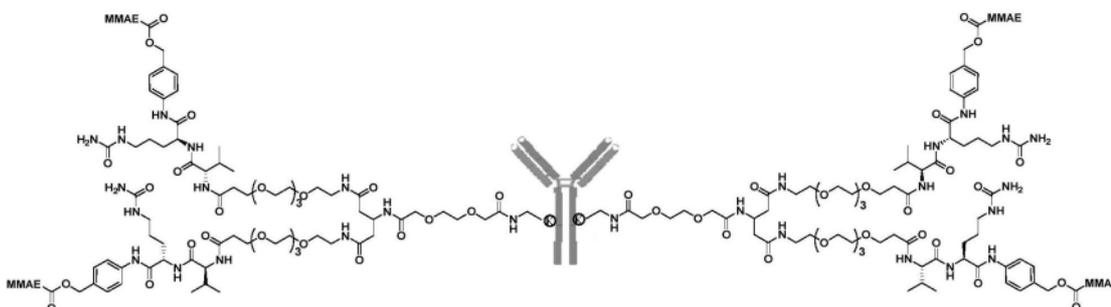
化合物ADC-18

[0952] ADC-20的制备:

[0953] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-45 (10eq, 0.334mM) 加入PIPES缓冲溶液中 (50mM, pH 7.4, 含20%DMF), 置于室温孵育1h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-20。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145860观测到峰, 关于反应产物在148882观测到峰(图26)。

[0954] 实施例73:一步法DAR4 ADC-21的制备及表征

[0955]



化合物ADC-21

[0956] ADC-21的制备:

[0957] 将曲妥珠单抗 (5mg/mL), 化合物ATC-46 (10eq, 0.334mM) 加入醋酸钠缓冲溶液中 (50mM, pH 5.5, 含20%DMF), 置于37℃孵育1h, LC-MS监测反应完全。经超滤管浓缩, 进而置换为1×PBS缓冲液后得到ADC-21。经ESI-TOFMS测定质量, 原料曲妥珠单抗在145860观测到

峰,关于反应产物在151842观测到峰(图27)。

[0958] 测试例1

[0959] 活性数据实验过程及结果分析

[0960] 采用MTT法对上述部分ADC进行细胞活性及毒性测定。胰酶消化细胞,终止后离心收集,使用1-3mL培养基重悬细胞,混匀后进行细胞计数,补充培养基调整细胞悬液浓度。使用96孔板进行细胞实验,每孔加入细胞悬液90 μ L,使得待测细胞密度为 \sim 6000/孔,设置3个复孔,边缘孔加入100 μ L 1x PBS填充,同时设置调零孔(90 μ L培养基)以及对照孔(90 μ L细胞,不加药物),5%CO₂,37 $^{\circ}$ C培养箱孵育12h,使细胞完全贴壁。每个样品设置9个浓度梯度,最高浓度为1 μ M,5倍梯度稀释,每孔中加入相应浓度梯度ADC分子10 μ L,6个对照孔中也分别加入10 μ L培养基。5%CO₂,37 $^{\circ}$ C孵育72h后,每孔加入10 μ L MTT溶液(5mg/mL),继续培养4h,随后每孔中加入90 μ L SDS裂解液,37 $^{\circ}$ C孵育7小时后,使用酶联免疫检测仪测定各孔570nm的吸收值,使用GraphPad Prism 8软件进行数据处理(图28)。

[0961] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院上海药物研究所

<120> 亲和片段导向的可裂解片段,其设计、合成及在制备定点药物偶联物中的应用

<130> P2021-2829

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 227

<212> PRT

<213> 人IgG的Fc序列

<400> 1

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1           5           10           15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
           20           25           30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
           35           40           45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
           50           55           60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65           70           75           80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
           85           90           95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
           100          105          110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
           115          120          125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
           130          135          140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145          150          155          160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
           165          170          175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
           180          185          190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
           195          200          205

```

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Asp Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Arg Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe

1 5 10 15

His

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Arg Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

His

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

Cys Asp Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Cys

1 5 10 15

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

His Tyr Thr Cys Trp Val Leu Lys Gly Arg His Tyr Ala Cys Asn Gly

1 5 10 15

Arg

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

His Tyr Thr Cys Trp Val Leu Asp Gly Arg His Tyr Ala Cys Asn Gly

1 5 10 15

Arg

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

His Tyr Thr Cys Trp Val Leu Glu Gly Arg His Tyr Ala Cys Asn Gly

1 5 10 15

Arg

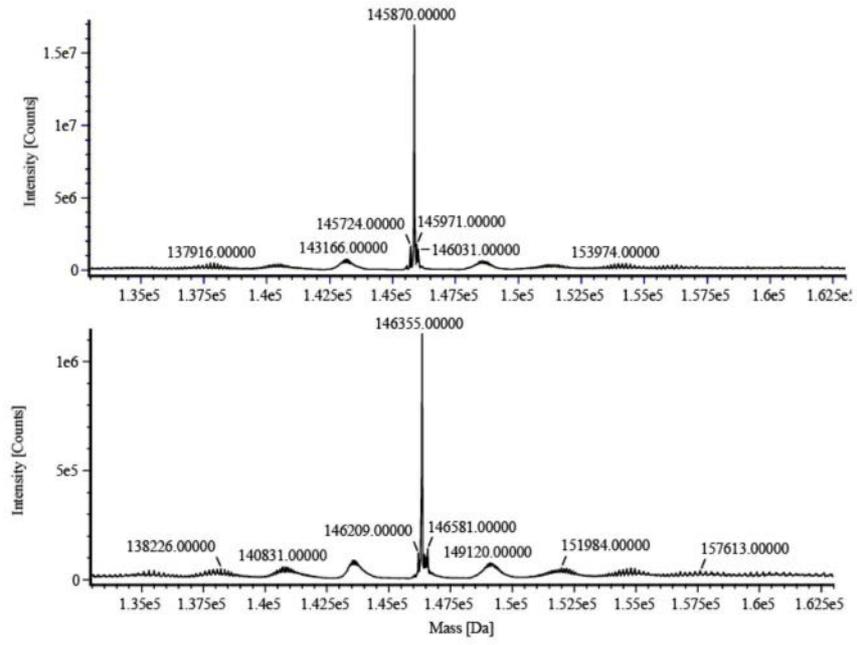


图1a

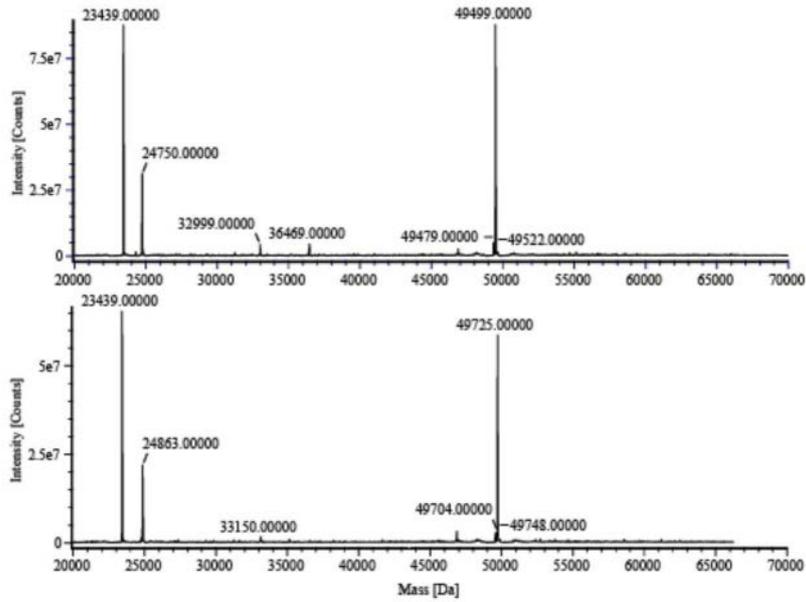


图1b

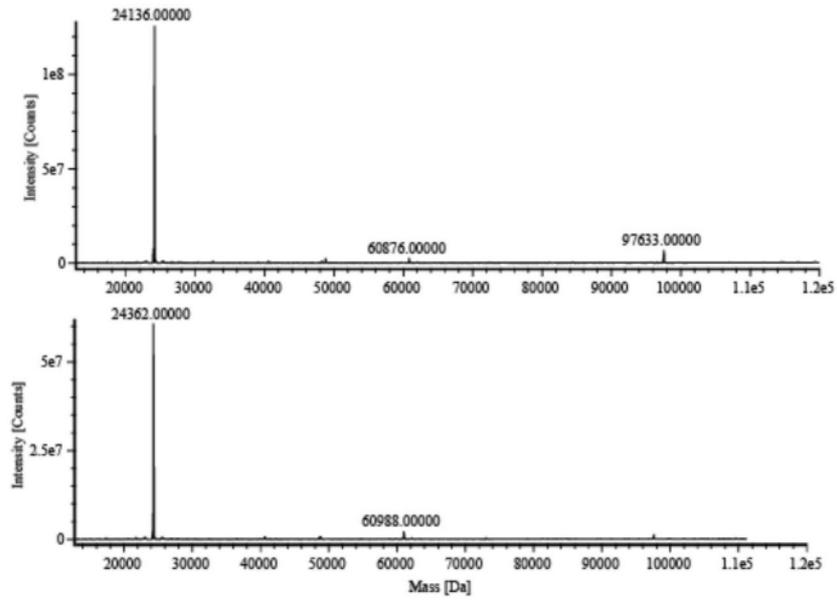


图1c

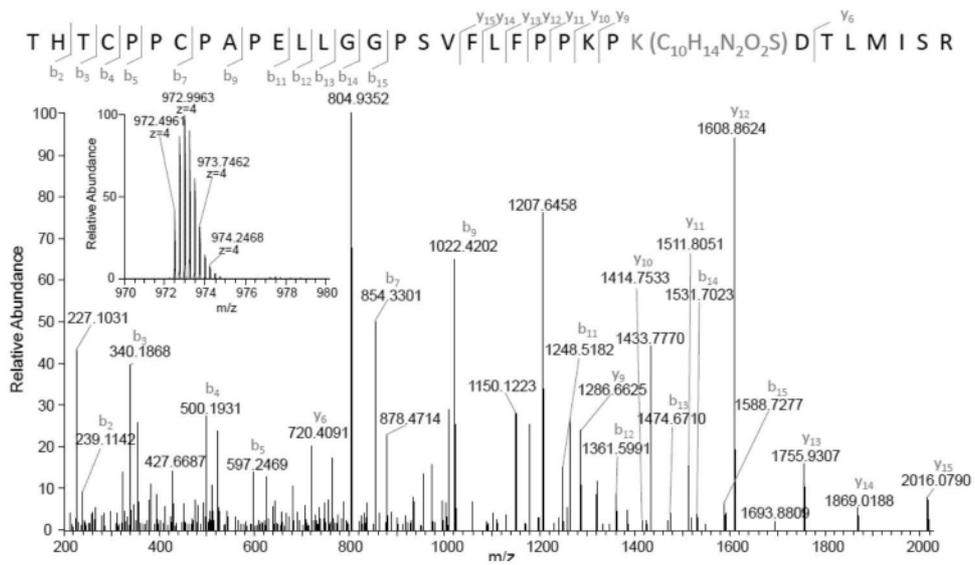


图1d

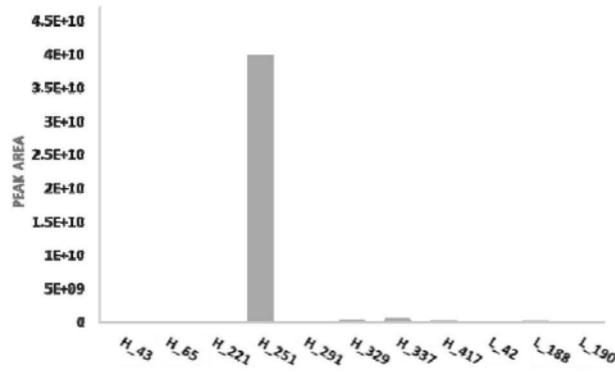


图1e

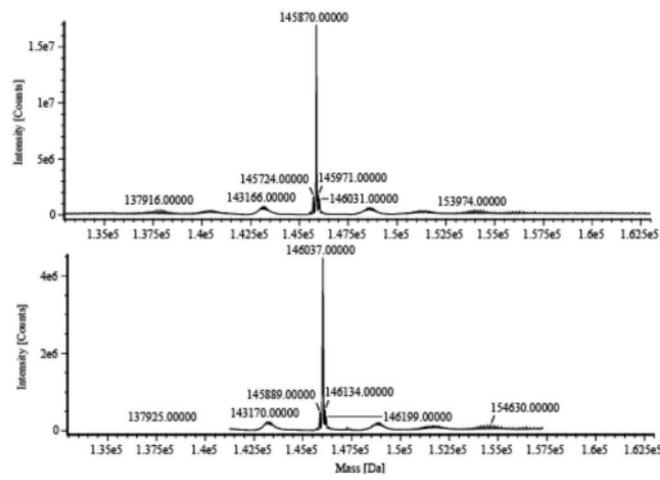


图2a

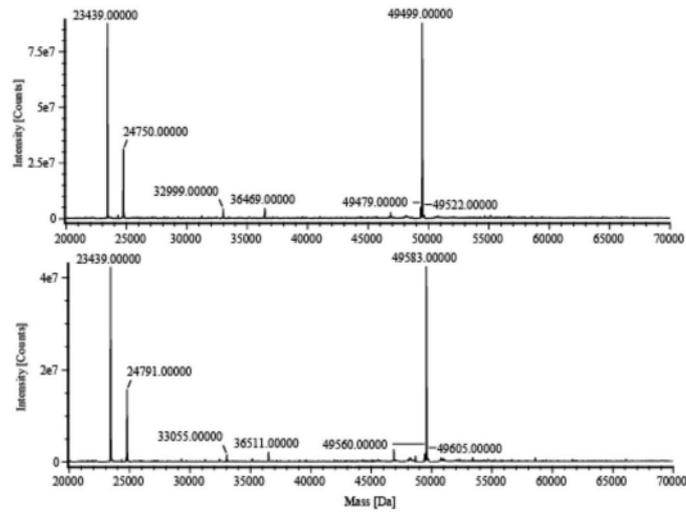


图2b

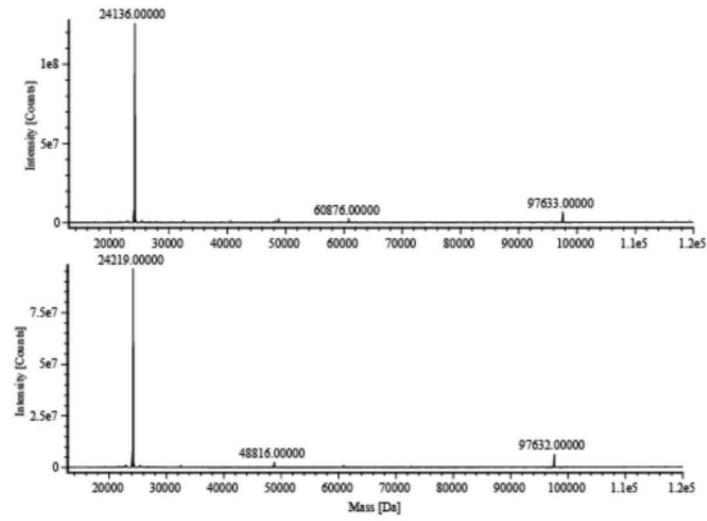


图2c

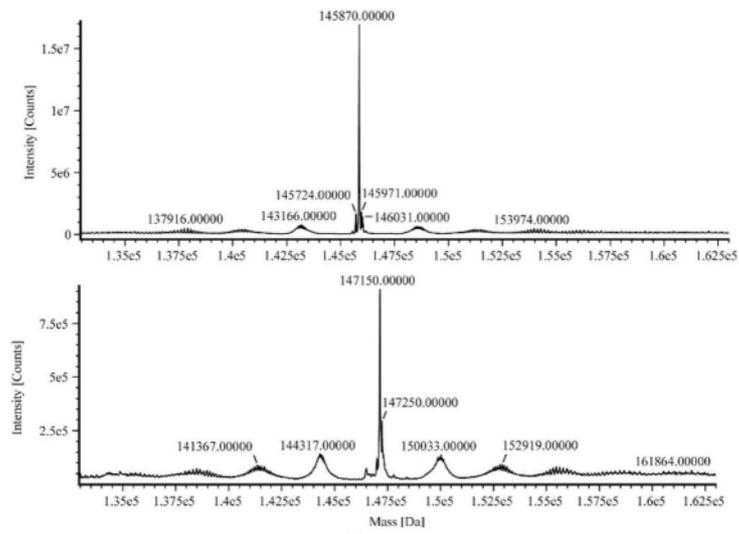


图3

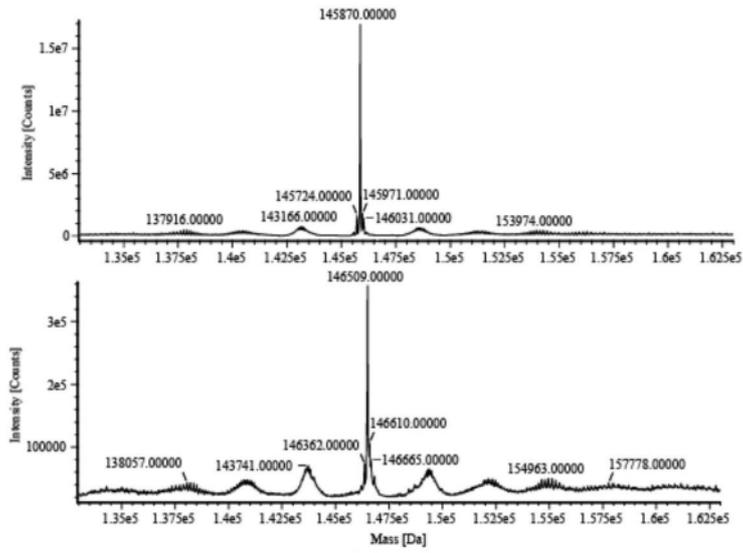


图4

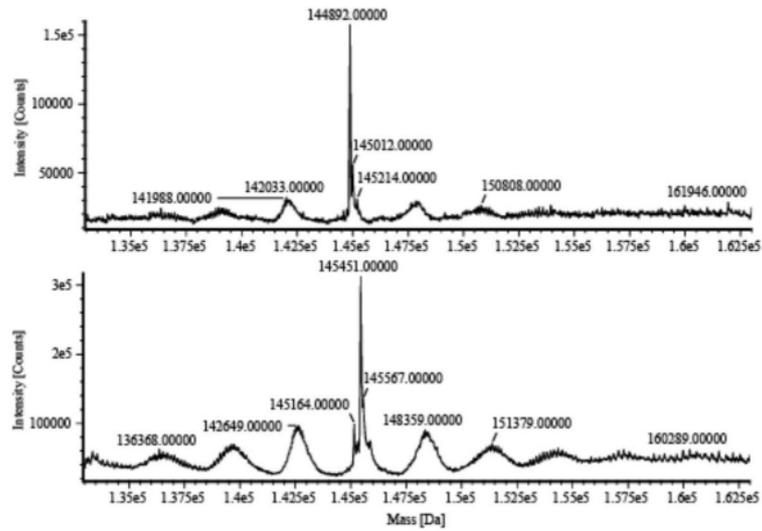


图5

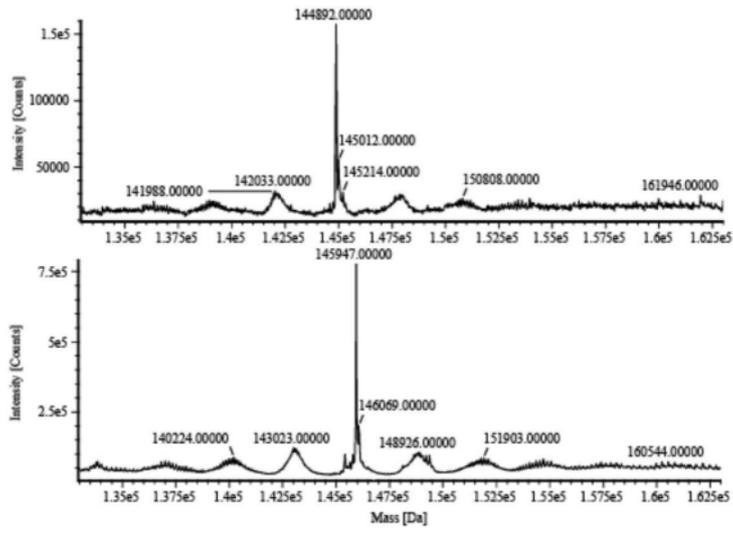


图6

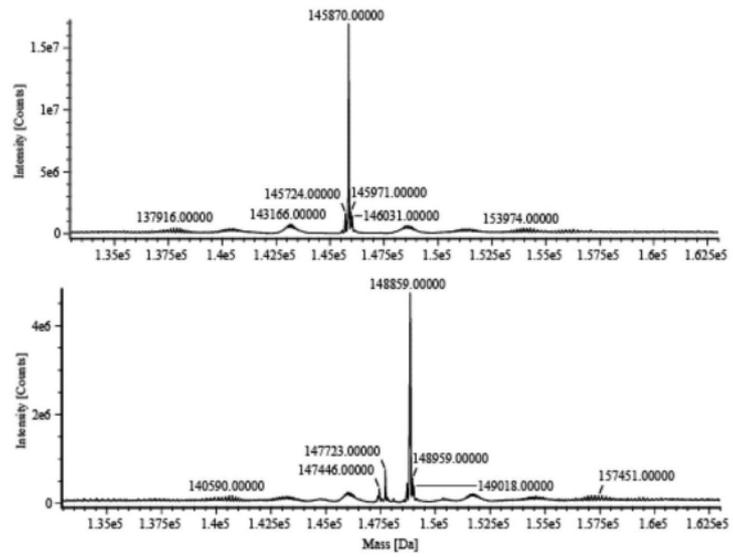


图7a

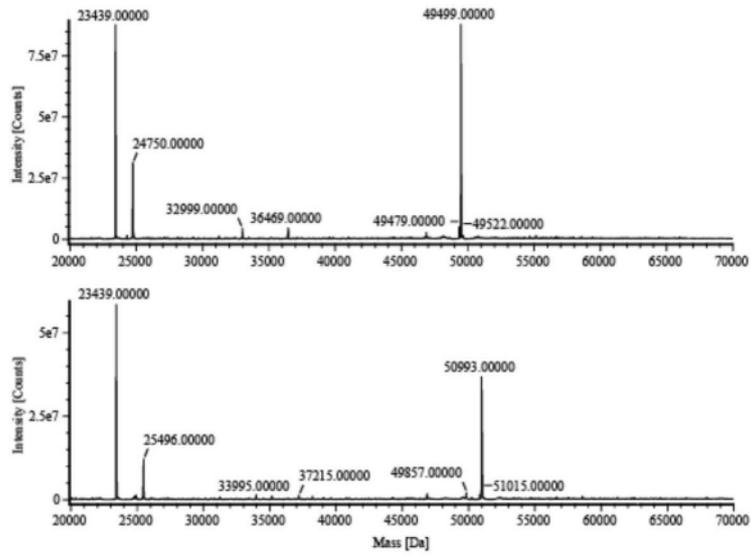


图7b

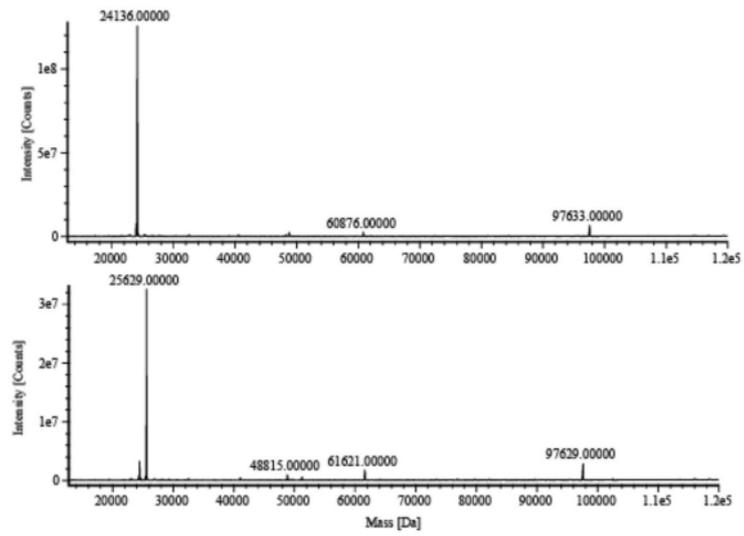


图7c

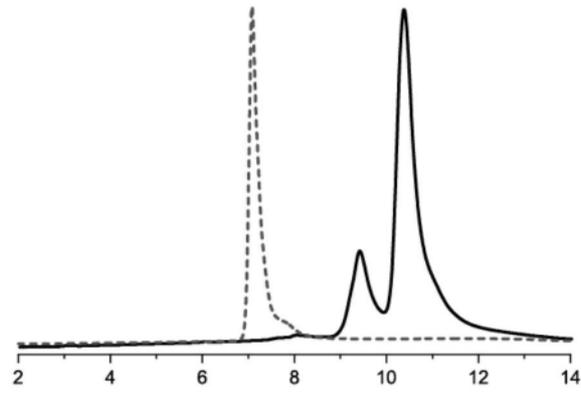


图7d

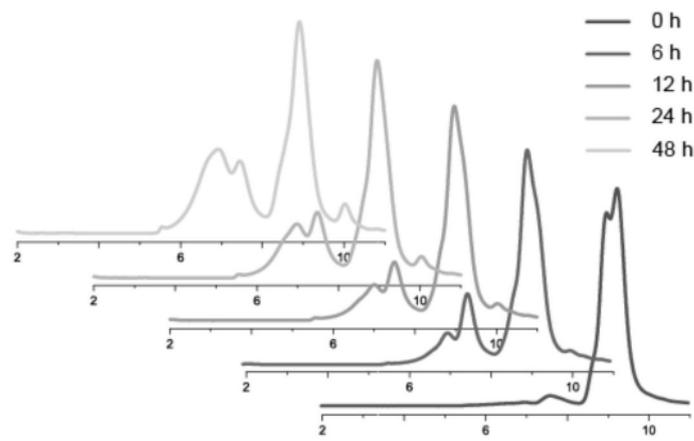


图7e

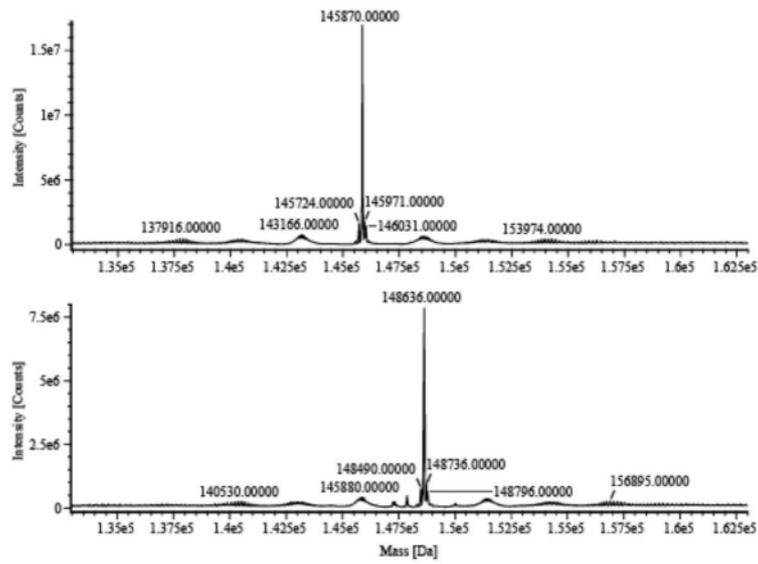


图8a

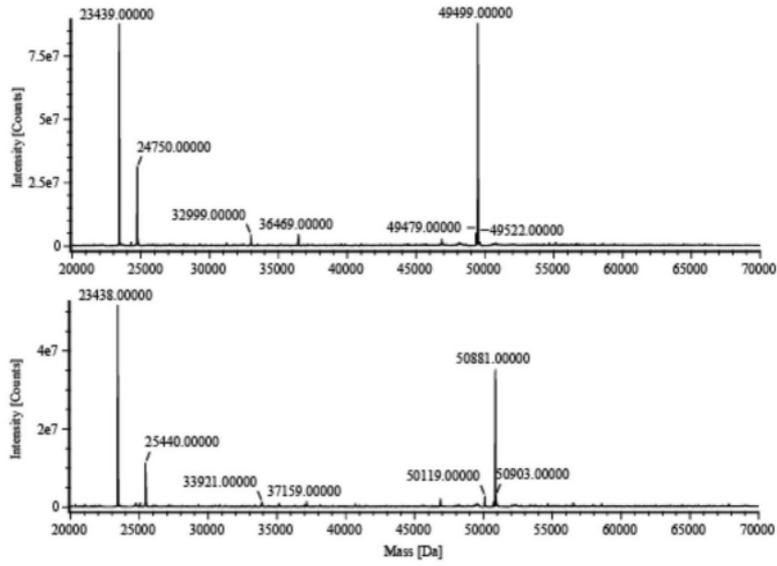


图8b

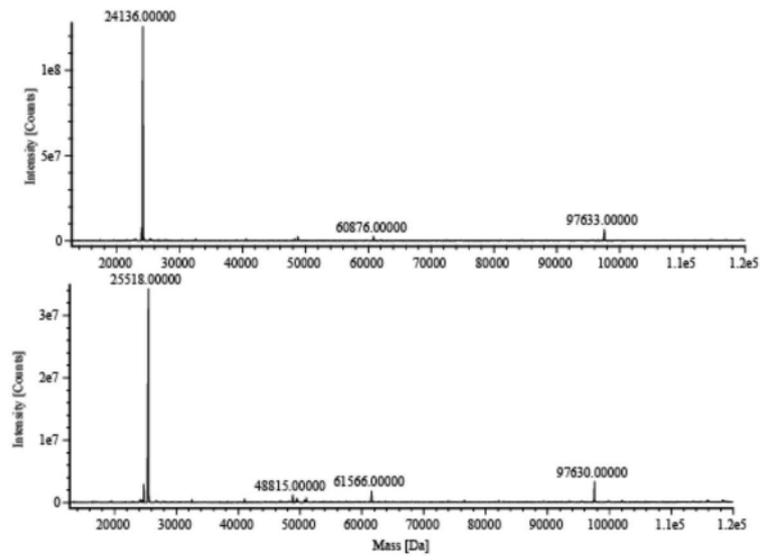


图8c

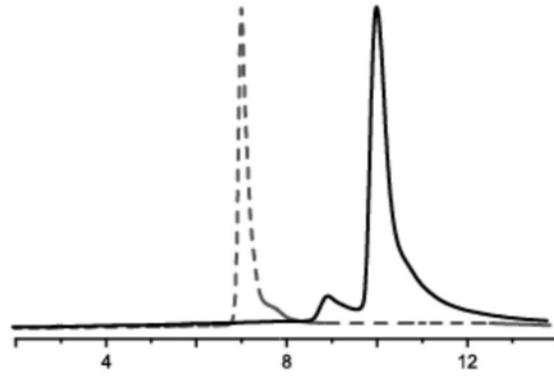


图8d

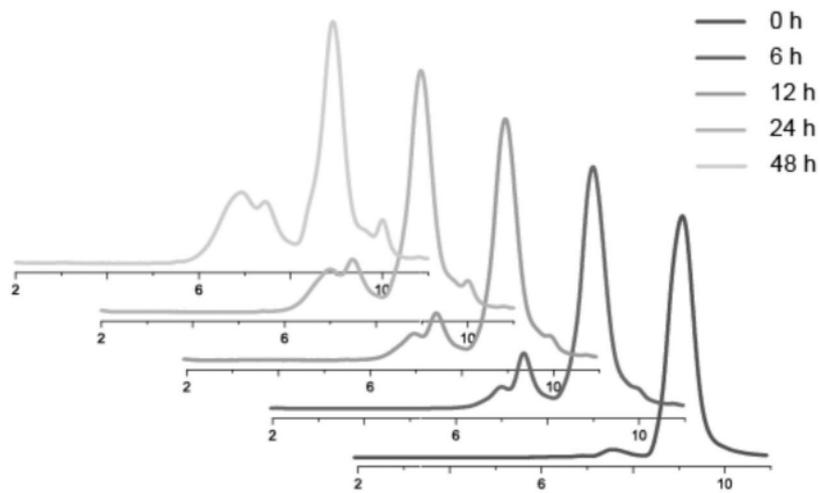


图8e

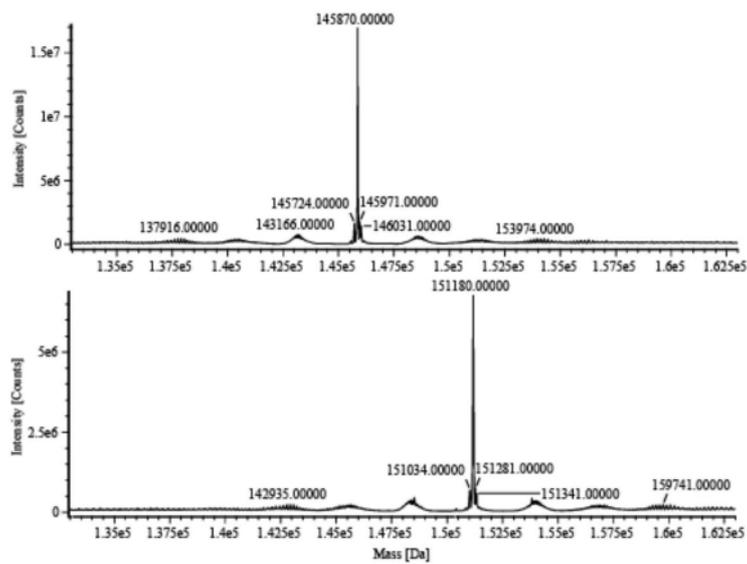


图9a

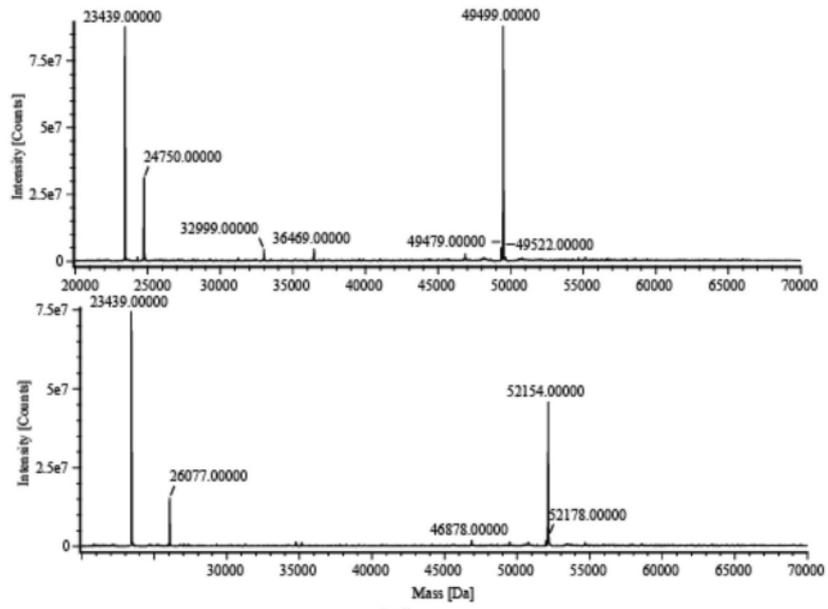


图9b

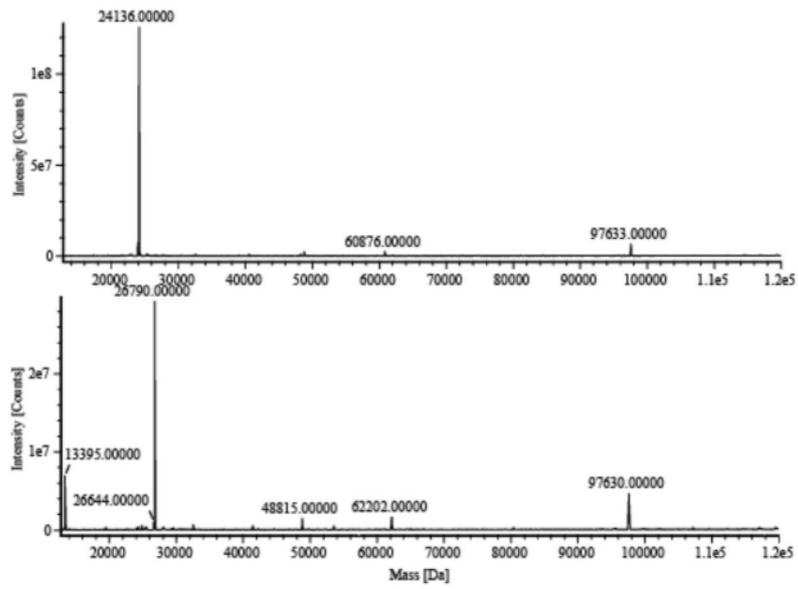


图9c

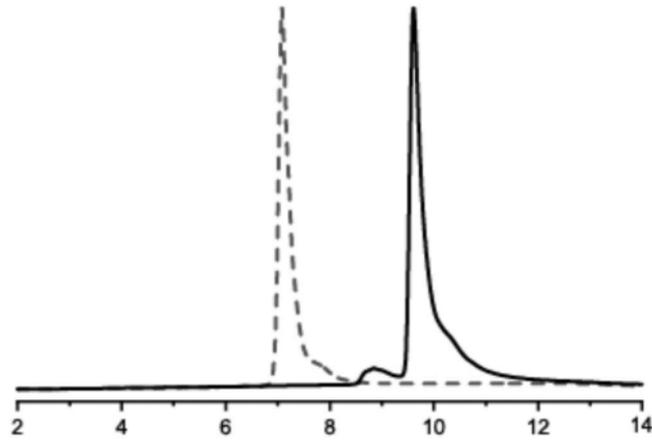


图9d

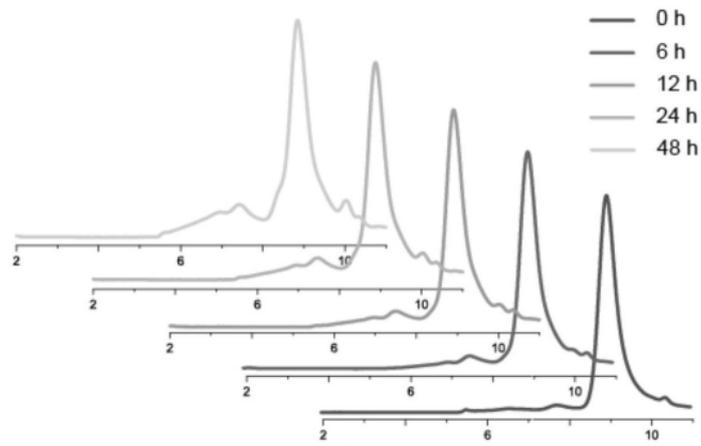


图9e

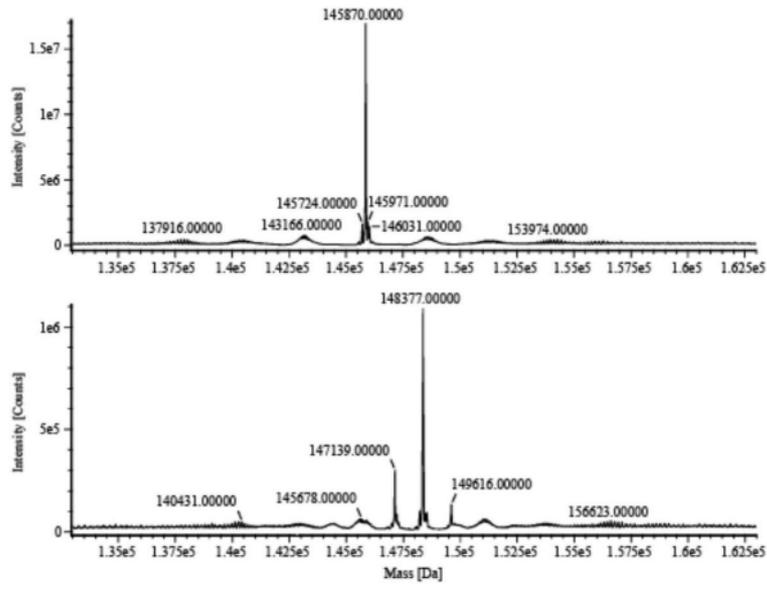


图10

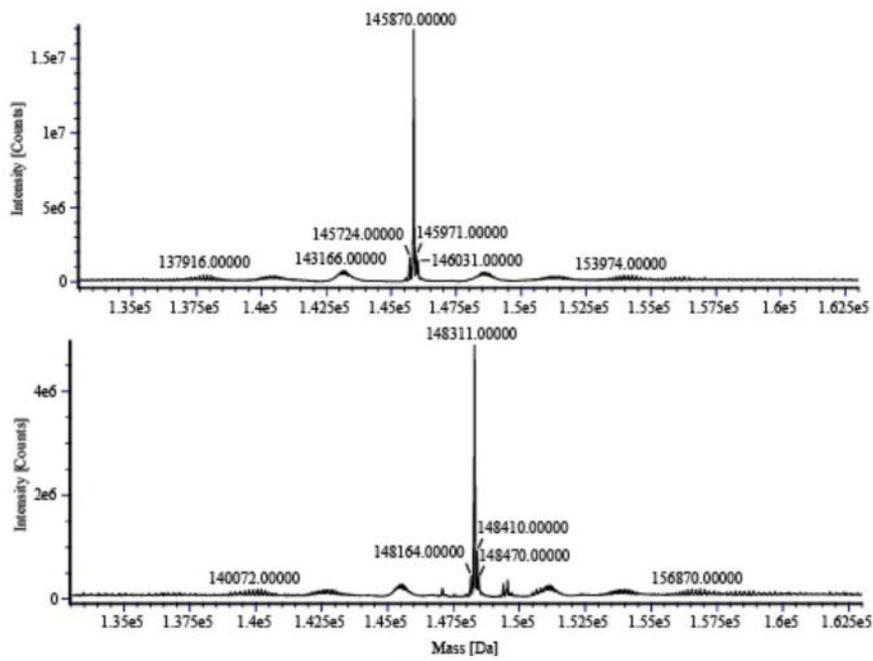


图11a

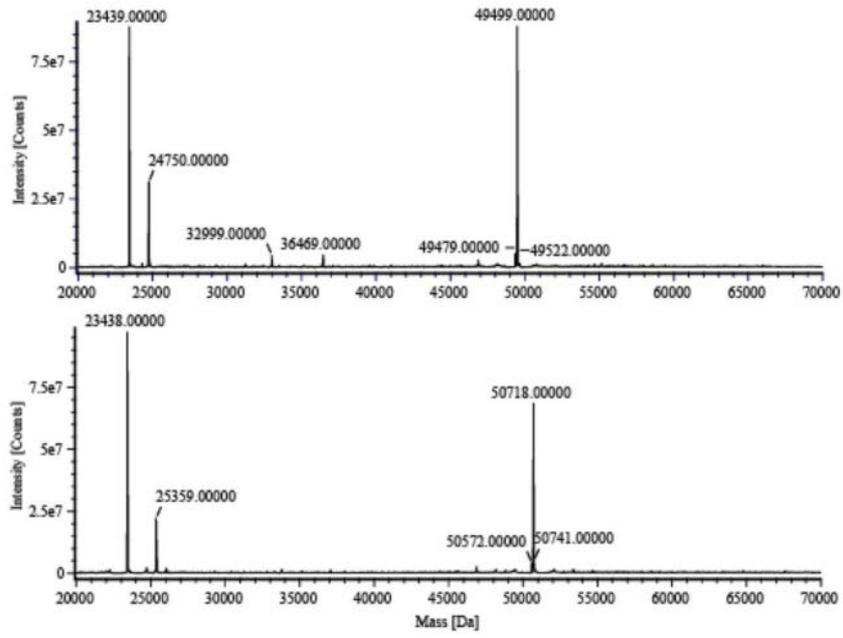


图11b

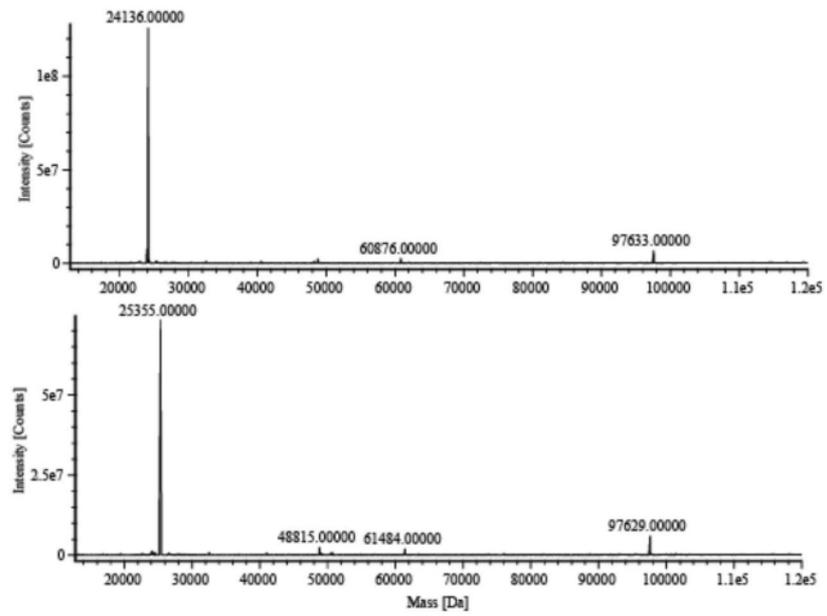


图11c

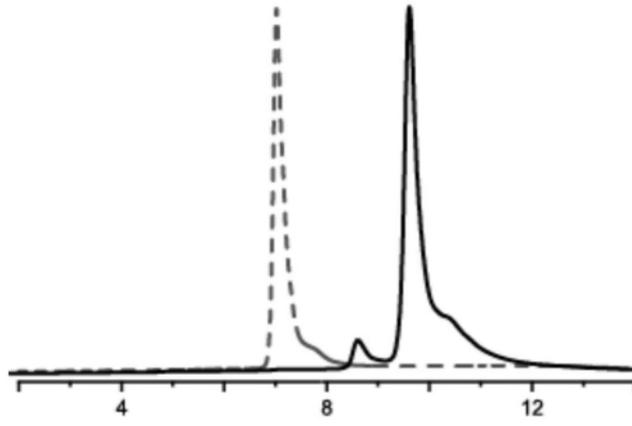


图11d

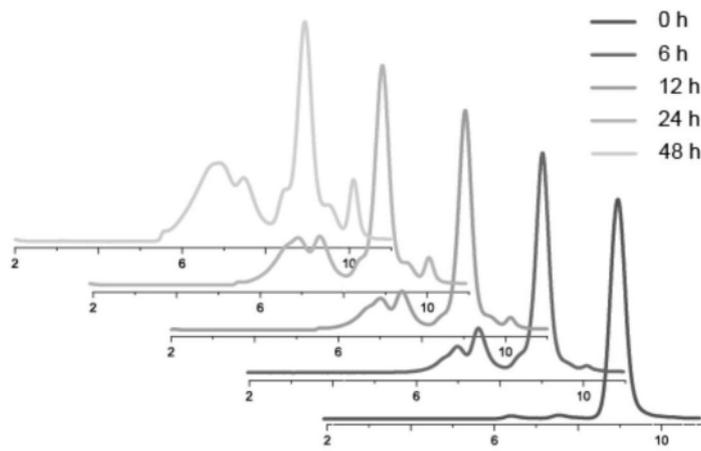


图11e

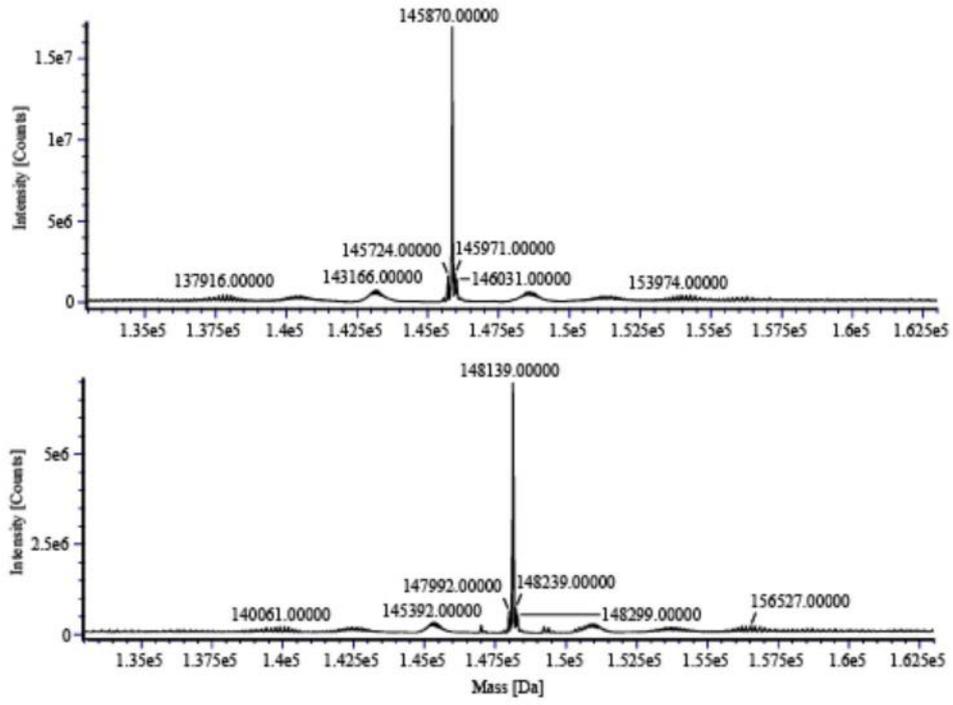


图12a

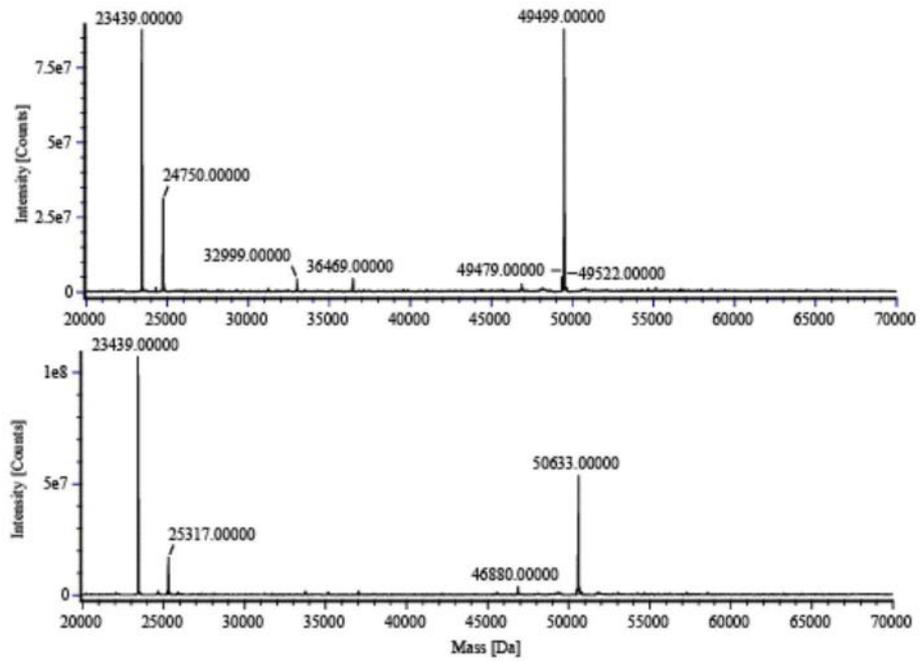


图12b

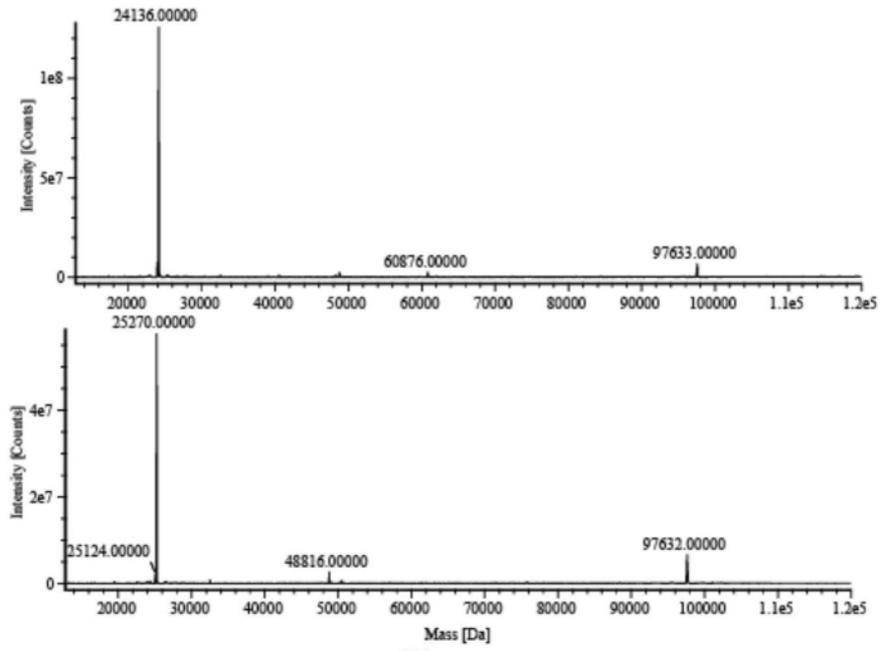


图12c

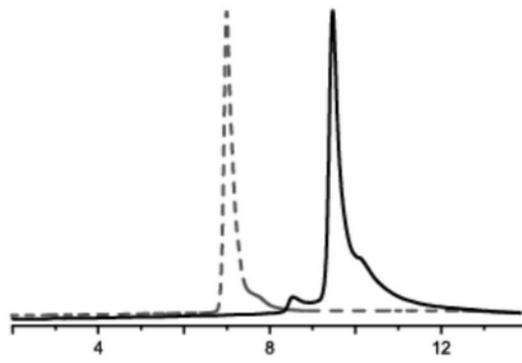


图12d

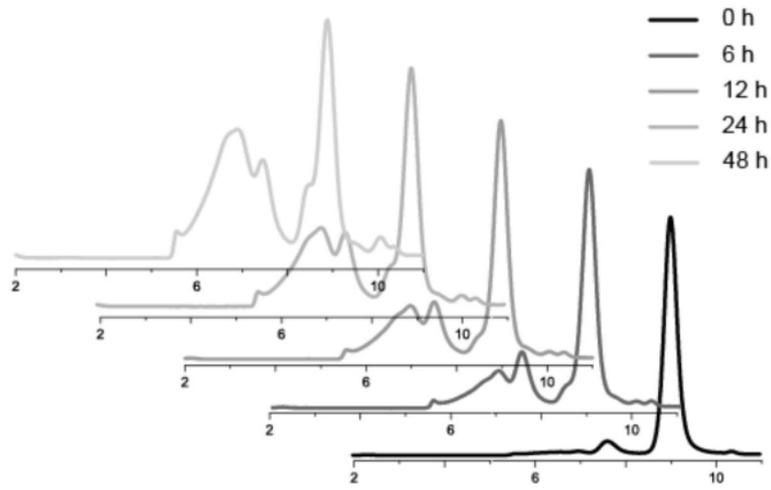


图12e

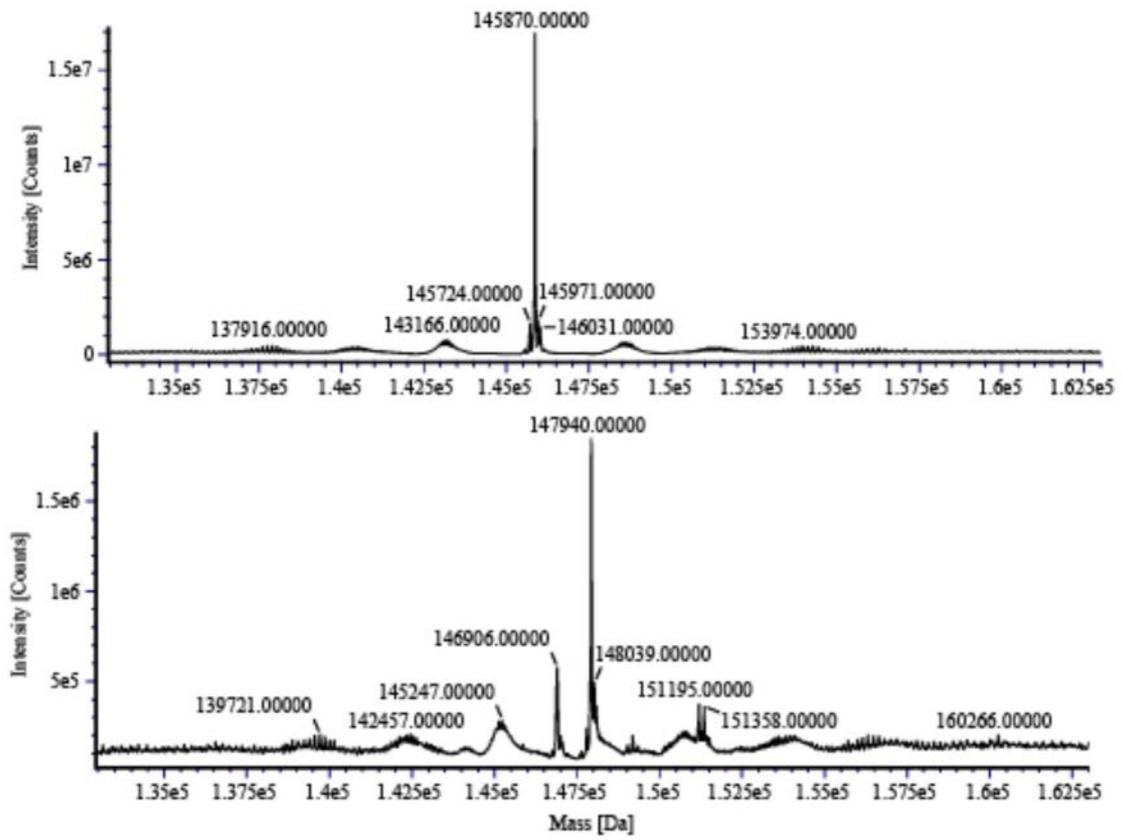


图13a

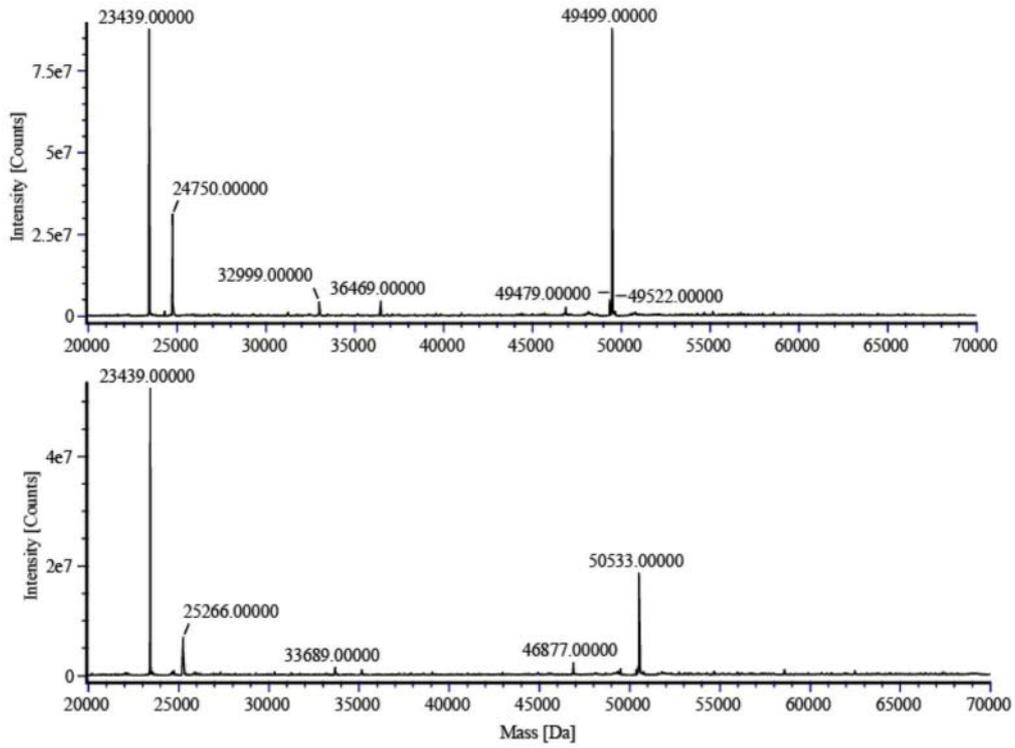


图13b

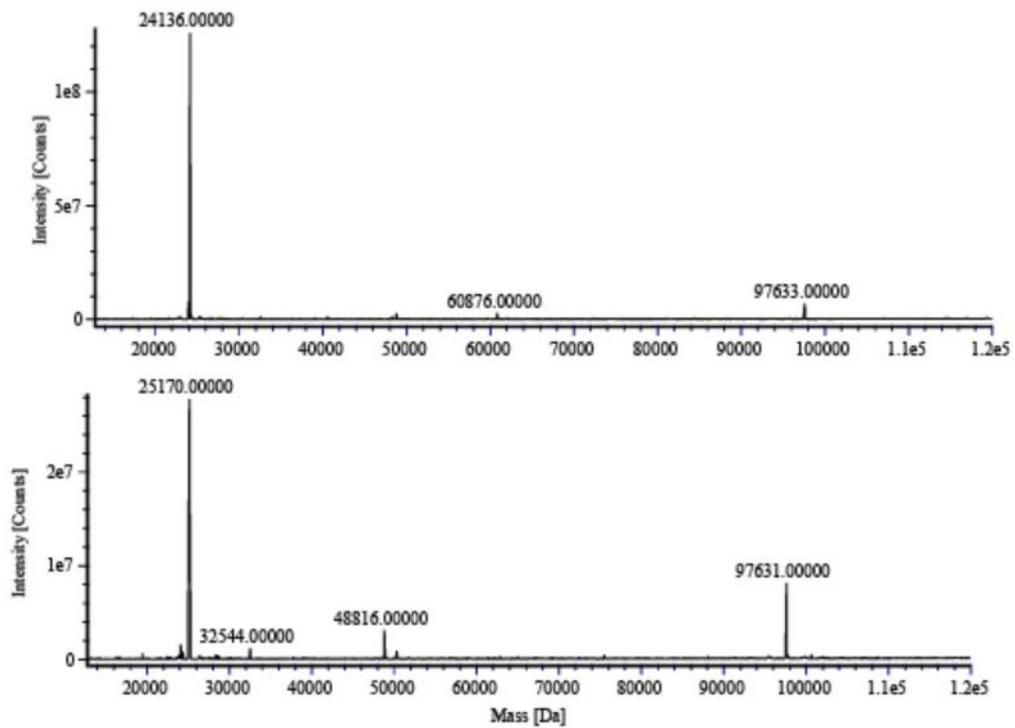


图13c

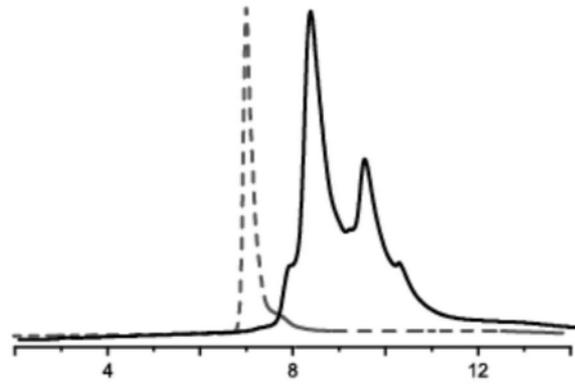


图13d

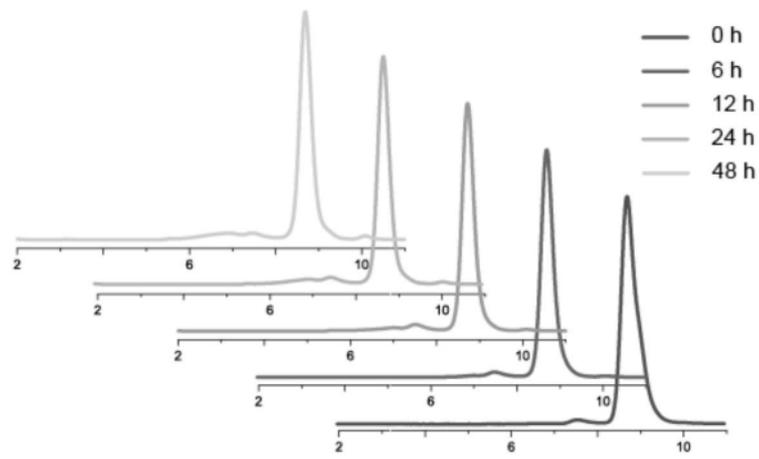


图13e

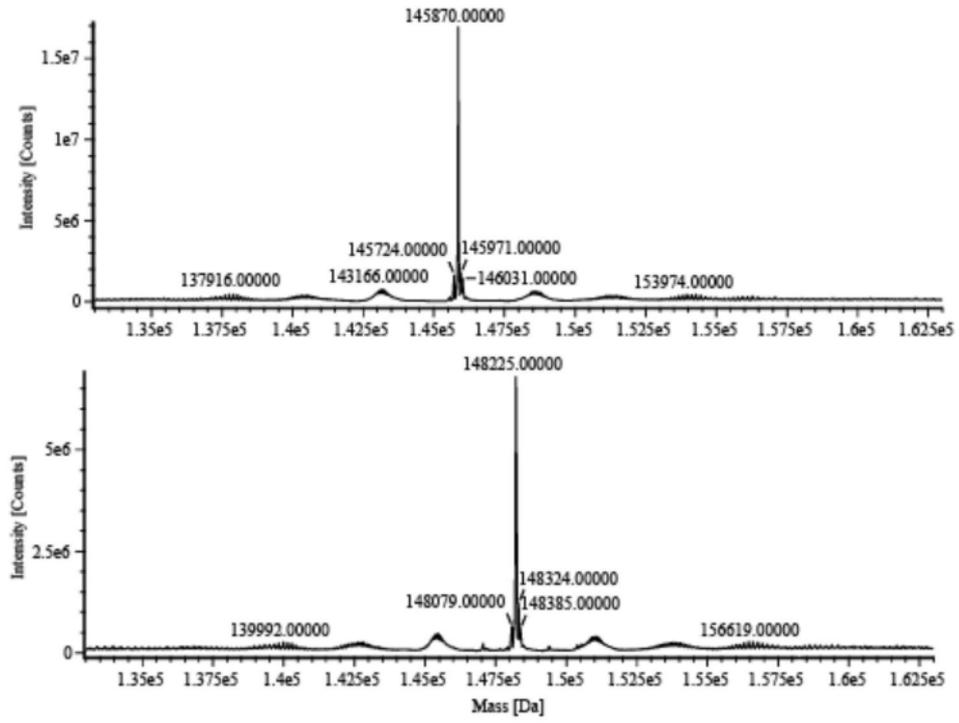


图14a

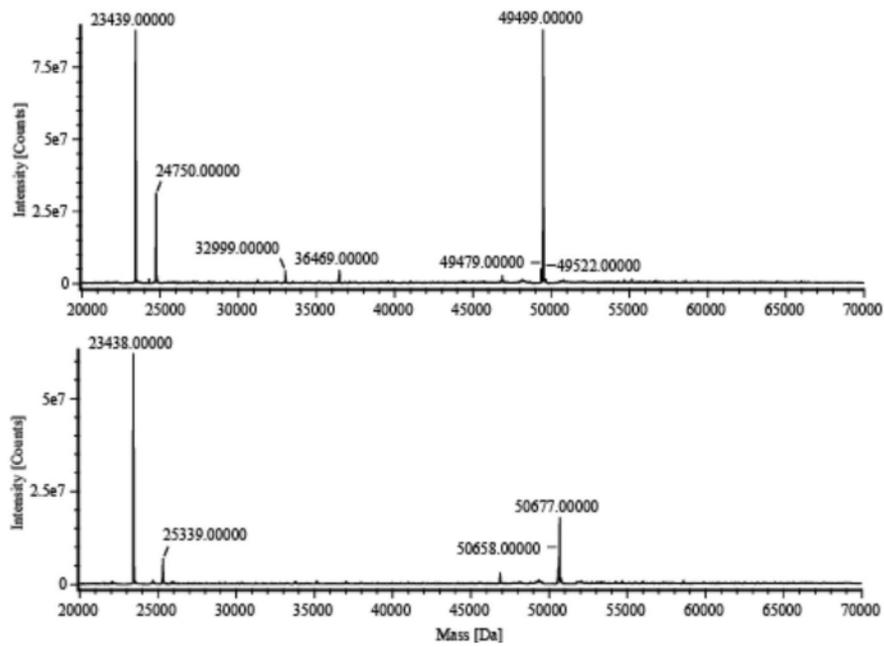


图14b

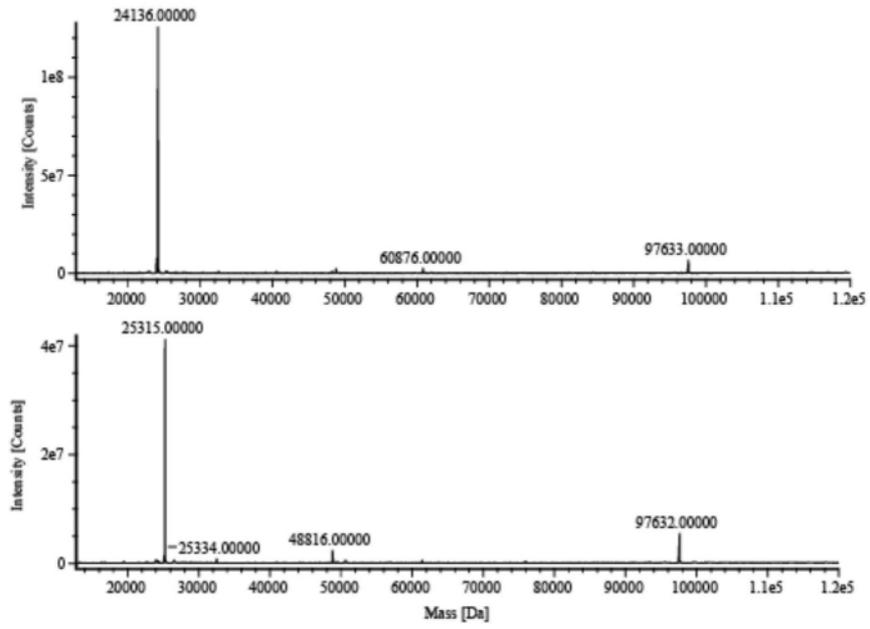


图14c

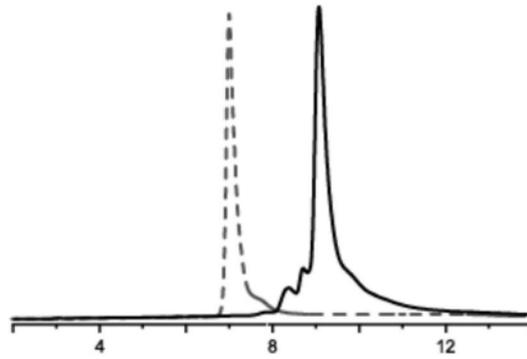


图14d

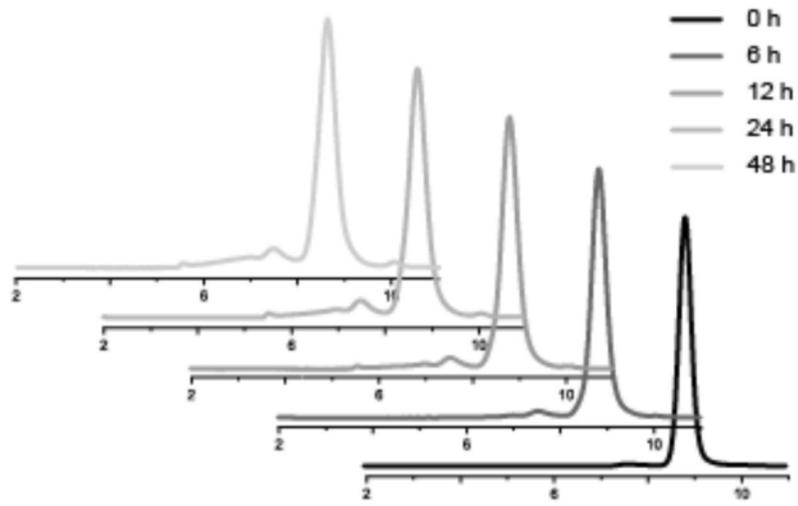


图14e

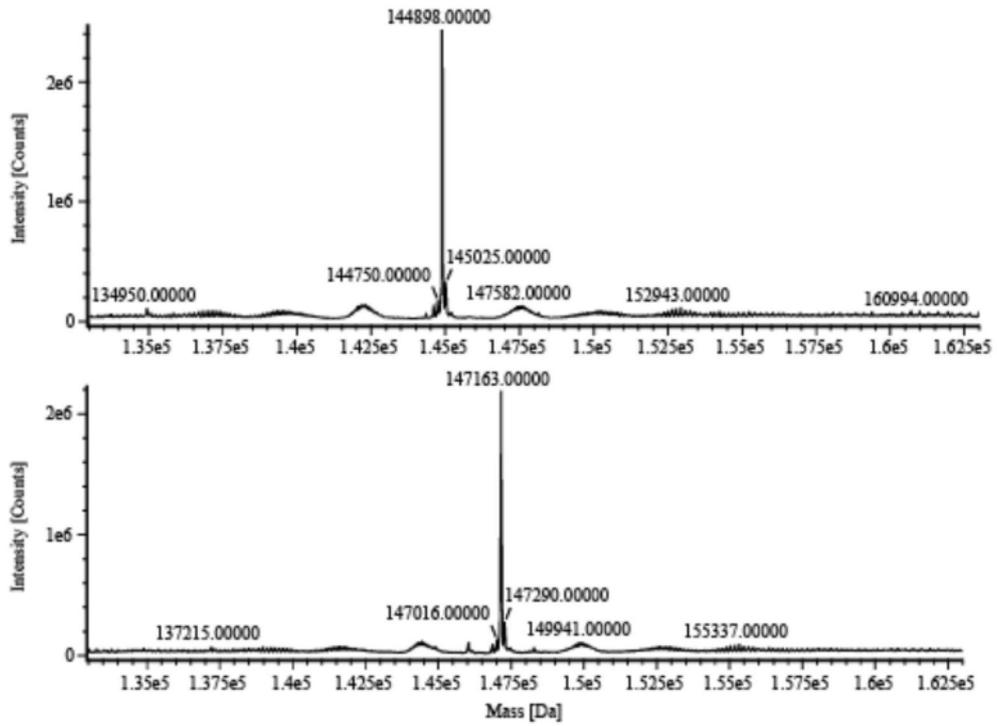


图15

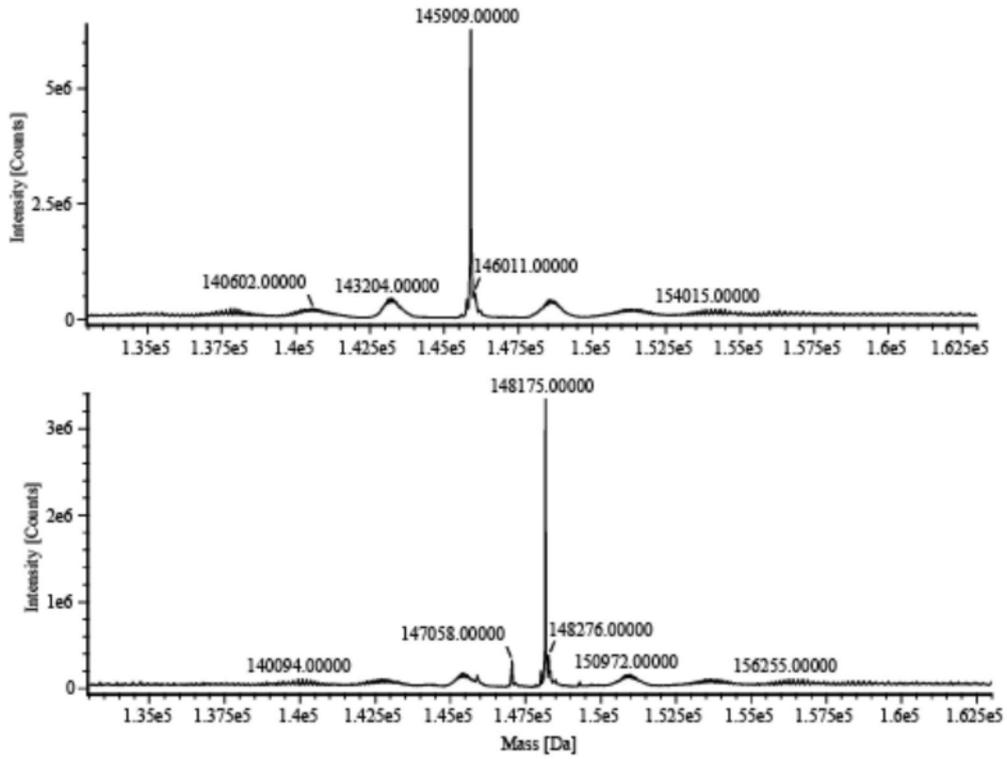


图16

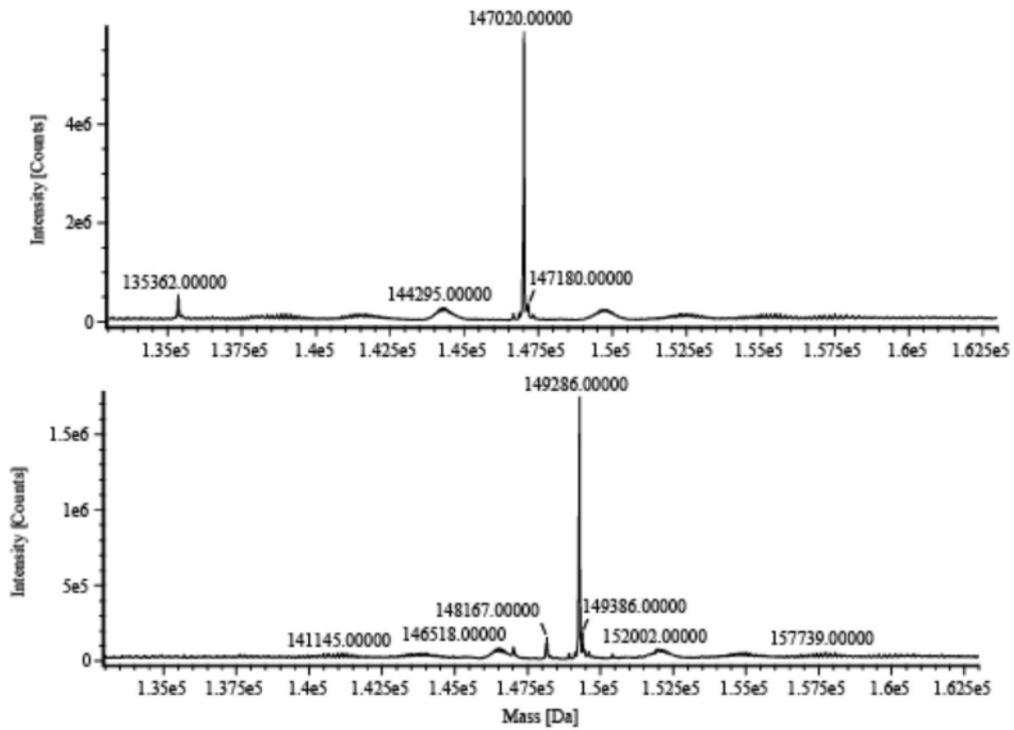


图17

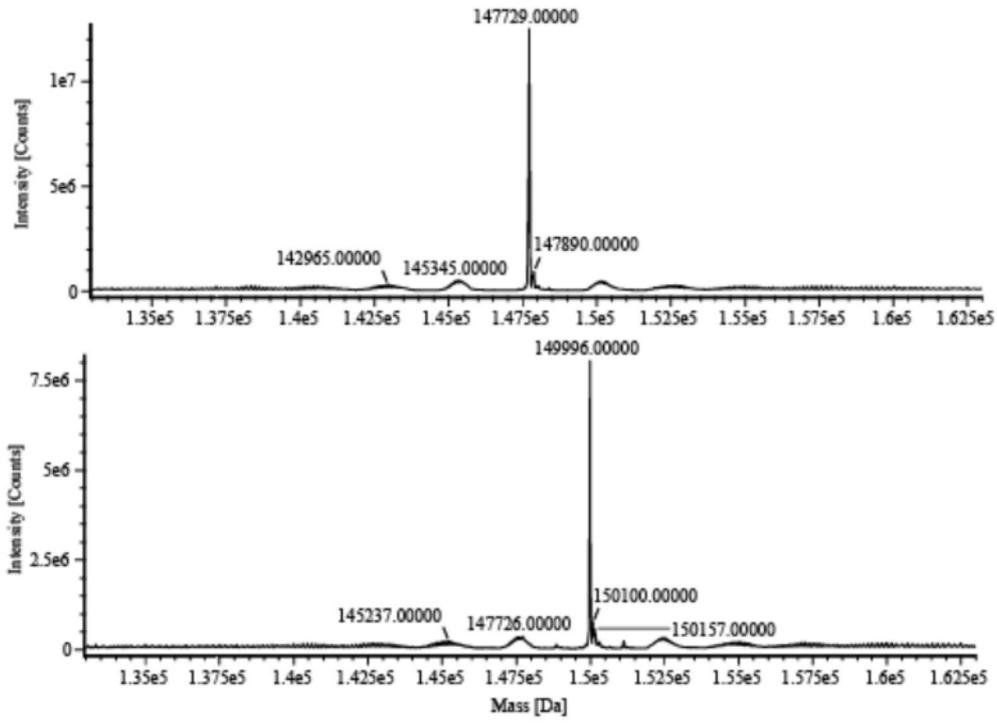


图18

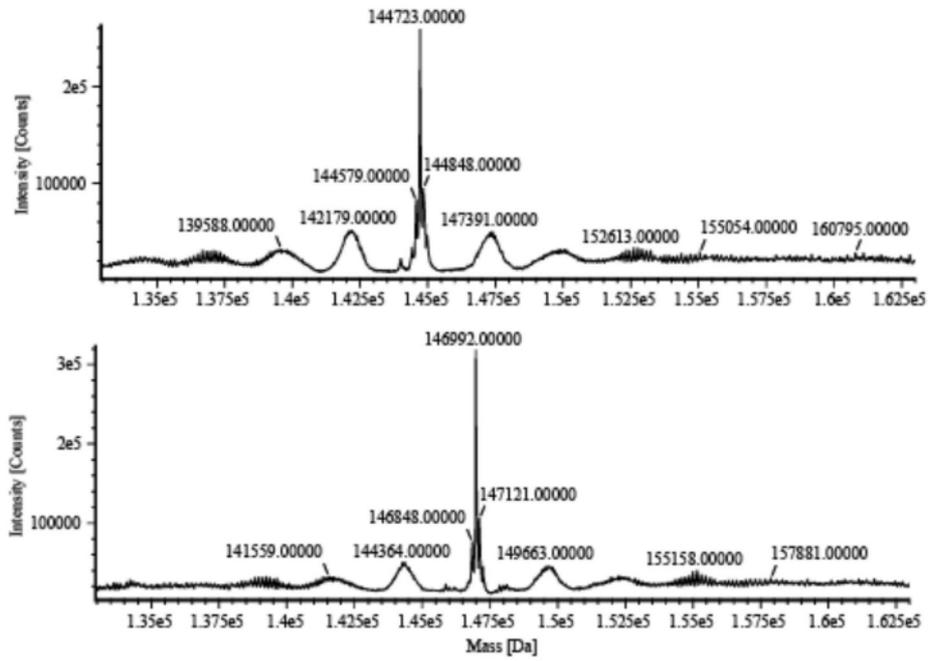


图19

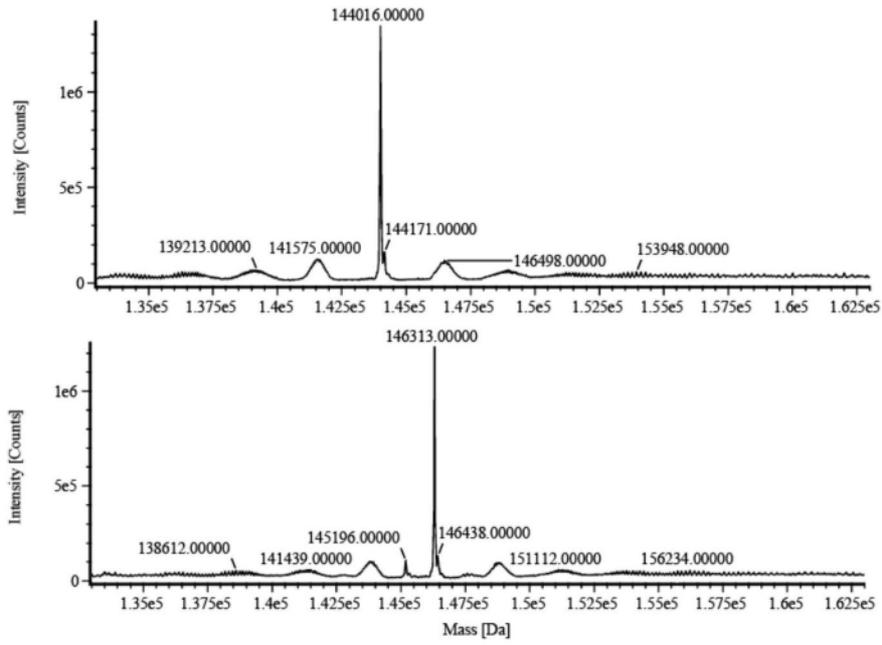


图20

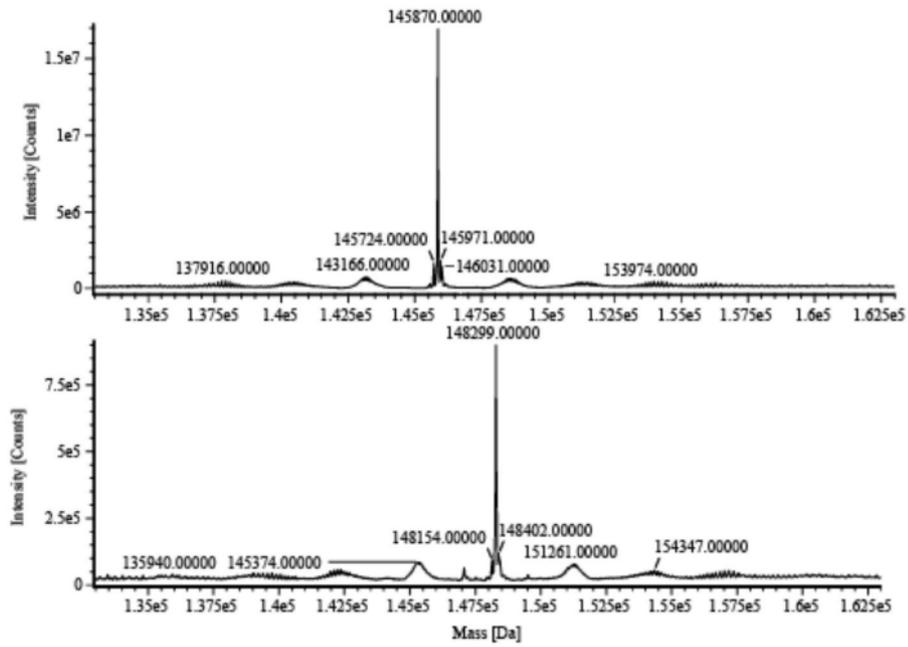


图21a

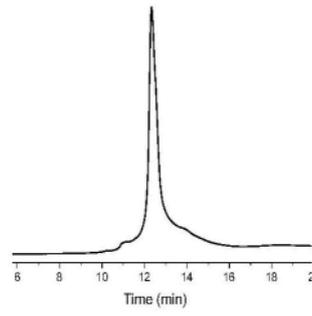


图21b

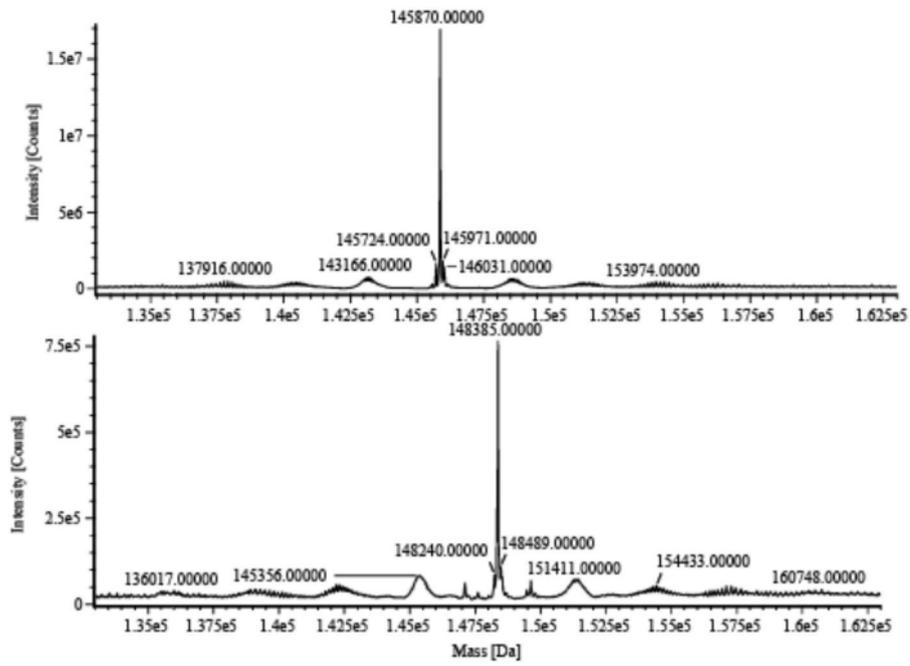


图22a

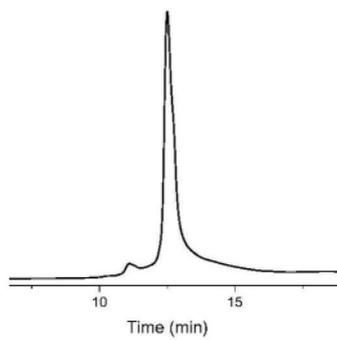


图22b

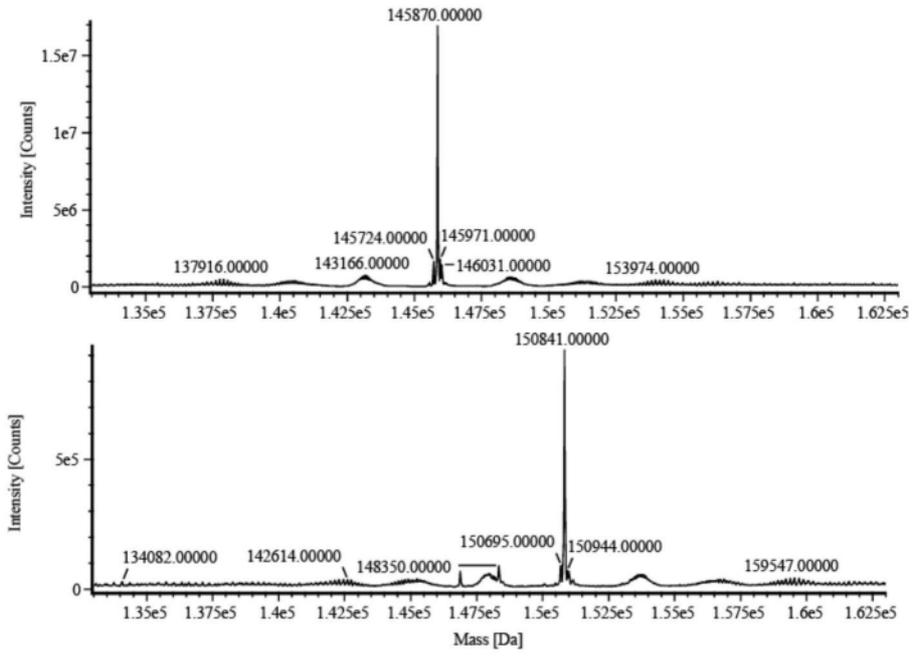


图23a

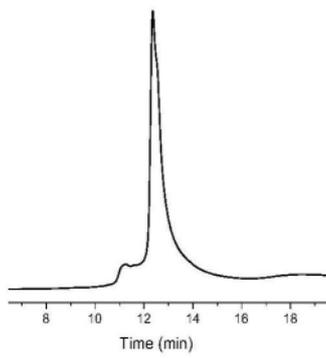


图23b

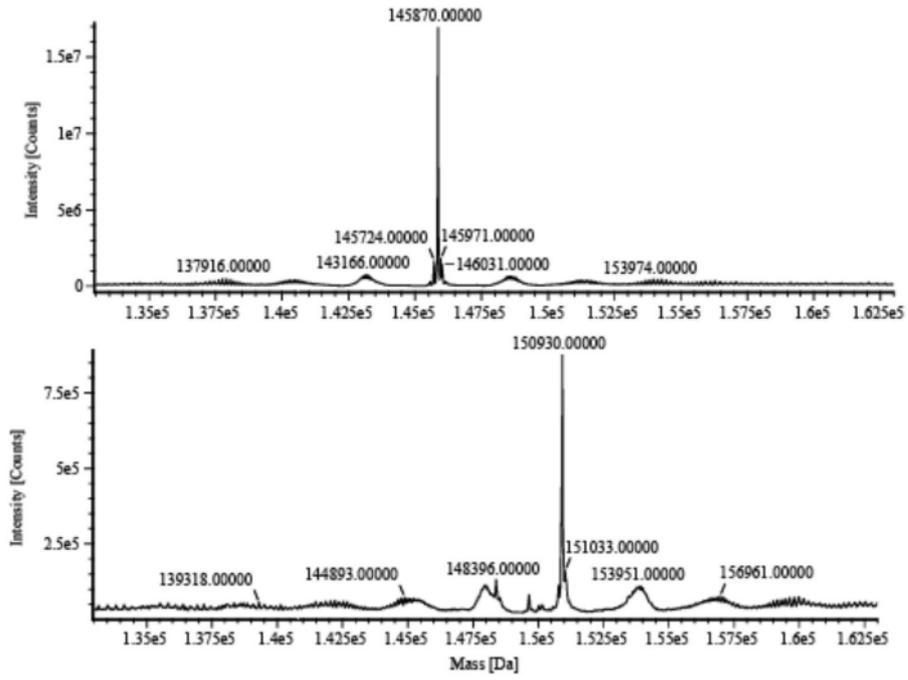


图24a

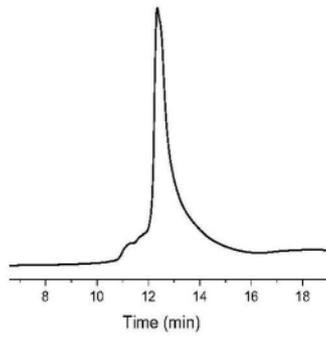


图24b

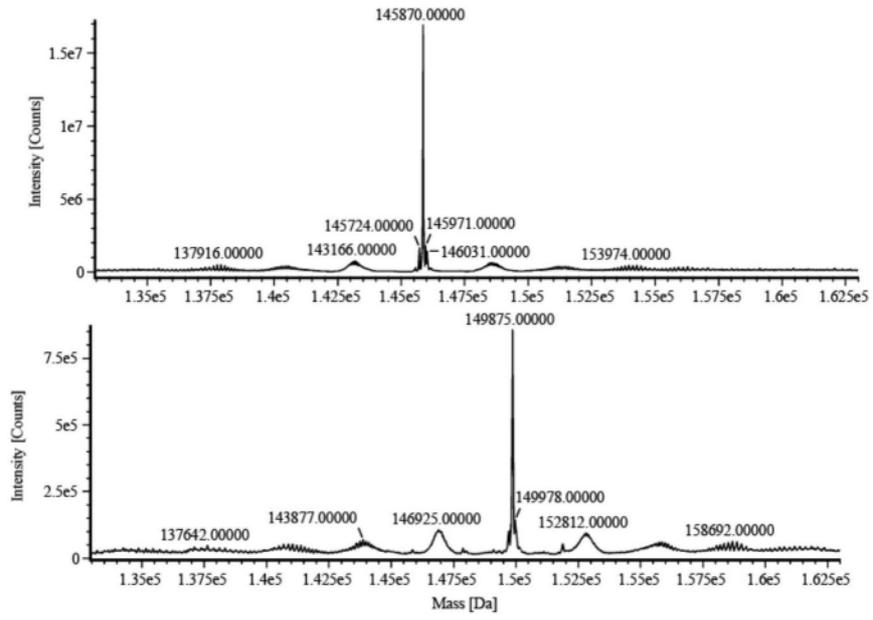


图25a

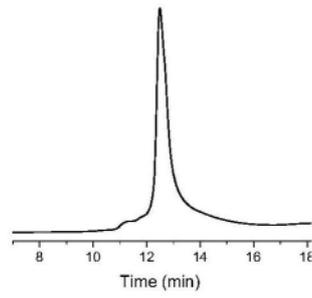


图25b

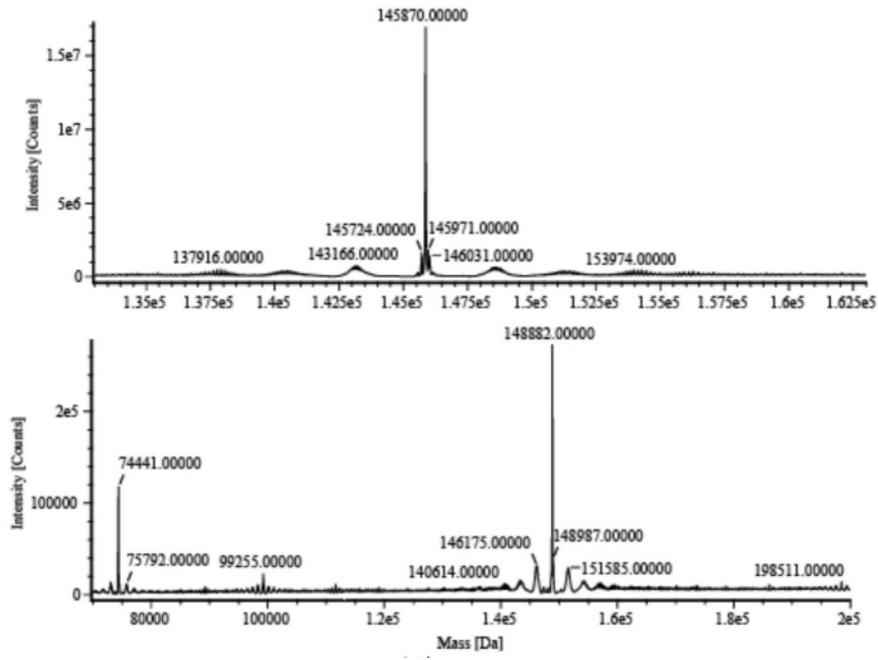


图26

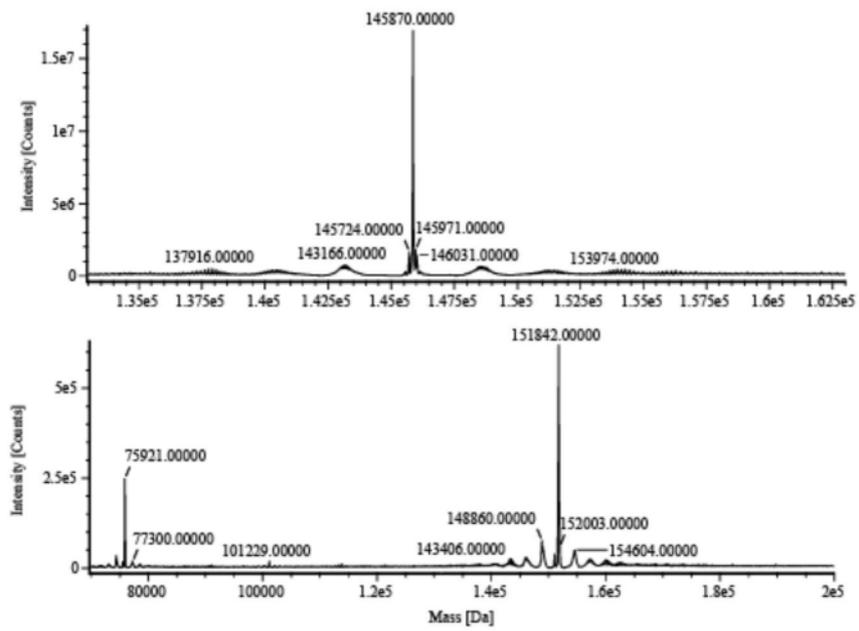


图27

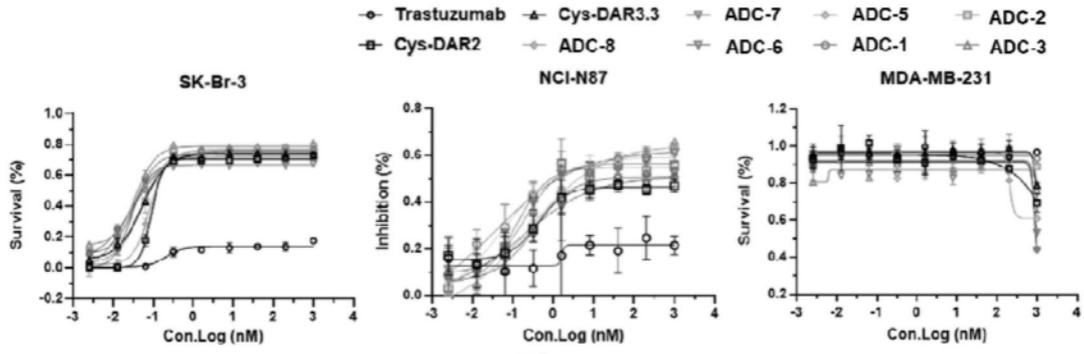


图28