



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114846021 B

(45) 授权公告日 2024.06.14

(21) 申请号 202180007477.0

专利权人 上海恒瑞医药有限公司

(22) 申请日 2021.01.22

(72) 发明人 杨阳 胡齐悦 陶维康

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114846021 A

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

(43) 申请公布日 2022.08.02

专利代理师 程伟

(66) 本国优先权数据  
202010073438.8 2020.01.22 CN

(51) Int. Cl.

C07K 7/02 (2006.01)

C07K 5/062 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

C07D 491/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.06.22

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/CN2021/073279 2021.01.22

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/147993 ZH 2021.07.29

(56) 对比文件  
CN 105849126 A, 2016.08.10

(73) 专利权人 江苏恒瑞医药股份有限公司  
地址 222047 江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号

审查员 李雪莹

权利要求书7页 说明书47页  
序列表(电子公布) 附图3页

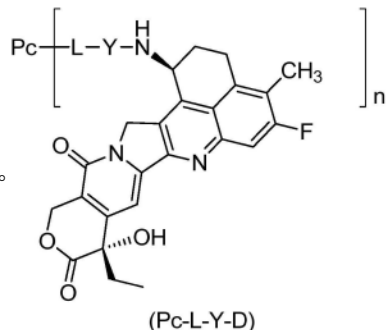
(54) 发明名称

抗TROP-2抗体-依喜替康类似物偶联物及其医药用途

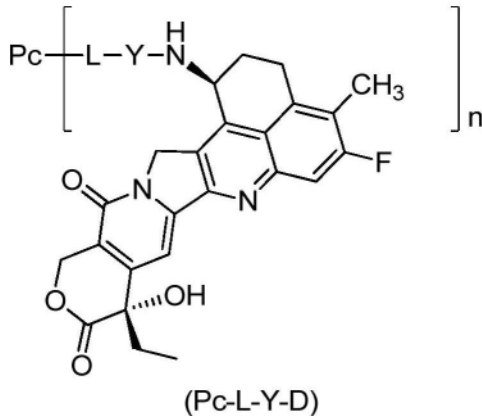
(57) 摘要

本发明提供了抗TROP-2抗体-依喜替康类似物偶联物及其医药用途。具体而言,本发明提供了如通式(Pc-L-Y-D)所示的抗TROP-2抗体-依喜替康类似物偶联物,其中Pc为抗TROP-2抗体或其

抗原结合片段。



1. 一种通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



其中:

Y选自 $-O-(C(R^a)R^b)_m-CR^1R^2-C(=O)-$ ;

$R^a$ 和 $R^b$ 相同或不同,且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $C_{1-6}$ 氘代烷基、 $C_{1-6}$ 烷氧基、羟基和 $C_{1-6}$ 羟烷基;

$R^1$ 选自卤素、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $C_{1-6}$ 氘代烷基、 $C_{3-6}$ 环烷基和 $C_{3-6}$ 环烷基 $C_{1-6}$ 烷基;

$R^2$ 选自氢原子、卤素、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $C_{1-6}$ 氘代烷基、 $C_{3-6}$ 环烷基和 $C_{3-6}$ 环烷基 $C_{1-6}$ 烷基;或者, $R^1$ 和 $R^2$ 与其相连接的碳原子一起形成 $C_{3-6}$ 环烷基;

m为0至4的整数;

n为1至10,n是小数或整数;

L为接头单元;

Pc为抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

3. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中:所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示或与其有至少90%同一性,和/或所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示或与其有至少90%同一性。

4. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:3所示的重链可变区和如SEQ ID NO:4所示的轻链可变区。

5. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含抗体重链恒定区和轻链恒定区。

6. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述重链恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的恒定区,所述轻链恒定区选自人抗体 $\kappa$ 和 $\lambda$ 链的恒定区。

7. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受

的盐,其中所述抗TROP-2抗体包含如SEQ ID NO:11所示的重链恒定区和如SEQ ID NO:12所示的轻链恒定区。

8. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:14所示的轻链。

9. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中n为2至10,n是小数或整数。

10. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中n为4至8,n是小数或整数。

11. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,

其中:

Y为 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ;

$R^a$ 和 $R^b$ 相同或不同,且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基;

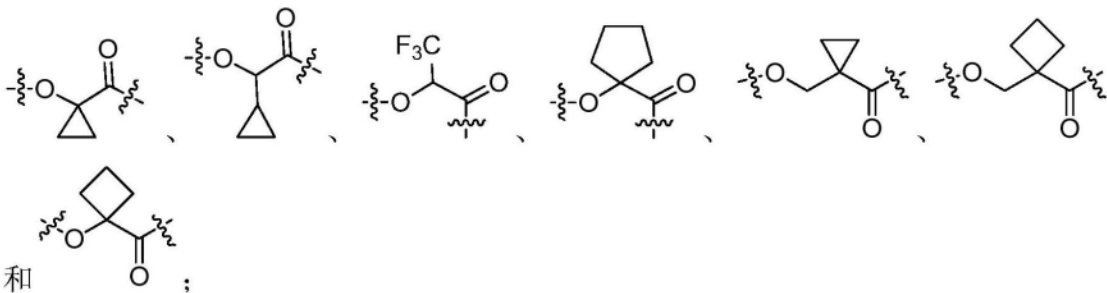
$R^1$ 为 $C_{1-6}$ 卤代烷基或 $C_{3-6}$ 环烷基;

$R^2$ 选自氢原子、 $C_{1-6}$ 卤代烷基和 $C_{3-6}$ 环烷基;

或者, $R^1$ 和 $R^2$ 与其相连接的碳原子一起形成 $C_{3-6}$ 环烷基;

m为0或1。

12. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中Y选自:



其中Y的O端与接头单元-L-相连。

13. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中接头单元-L-为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ,

$L^1$ 选自-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-W-C(O)-,其中W为 $C_{1-8}$ 烷基;

$L^2$ 为化学键;

$L^3$ 为由2至7个氨基酸残基构成的肽残基,其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基;

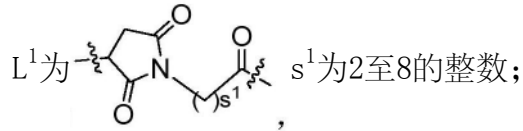
$L^4$ 选自 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ ,其中t为1至6的整数;

$R^5$ 选自氢原子、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $C_{1-6}$ 氘代烷基和 $C_{1-6}$ 羟烷基;

$R^6$ 和 $R^7$ 相同或不同,且各自独立地选自氢原子、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $C_{1-6}$ 氘代烷基和 $C_{1-6}$ 羟烷基。

14. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受

的盐,其中接头单元-L-为-L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>-L<sup>4</sup>-,



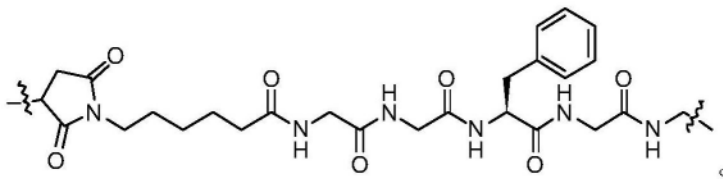
L<sup>2</sup>为化学键;

L<sup>3</sup>为四肽残基;

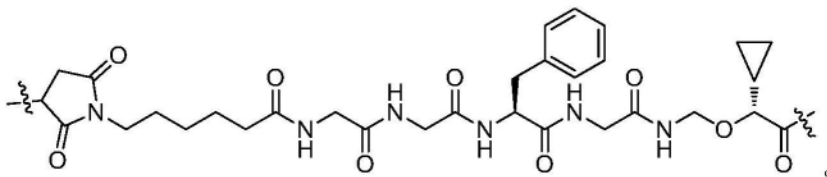
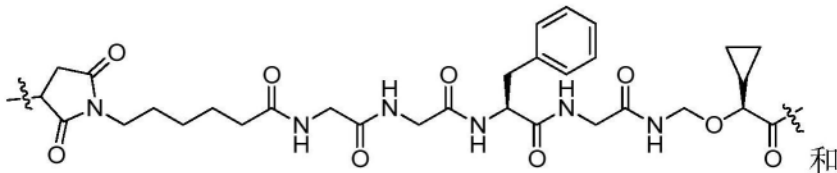
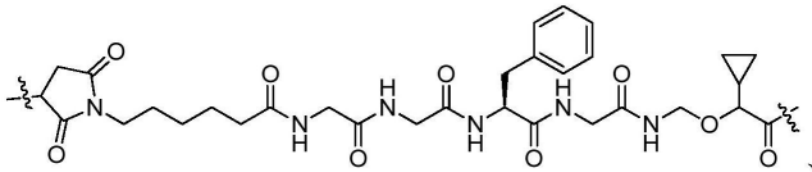
L<sup>4</sup>为-NR<sup>5</sup>(CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>t</sub>-, R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>或R<sup>7</sup>相同或不同,且各自独立地为氢原子或C<sub>1-6</sub>烷基,t为1或2;其中所述的L<sup>1</sup>端与Pc相连,L<sup>4</sup>端与Y相连。

15. 根据权利要求1所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中L<sup>3</sup>为GGFG的四肽残基。

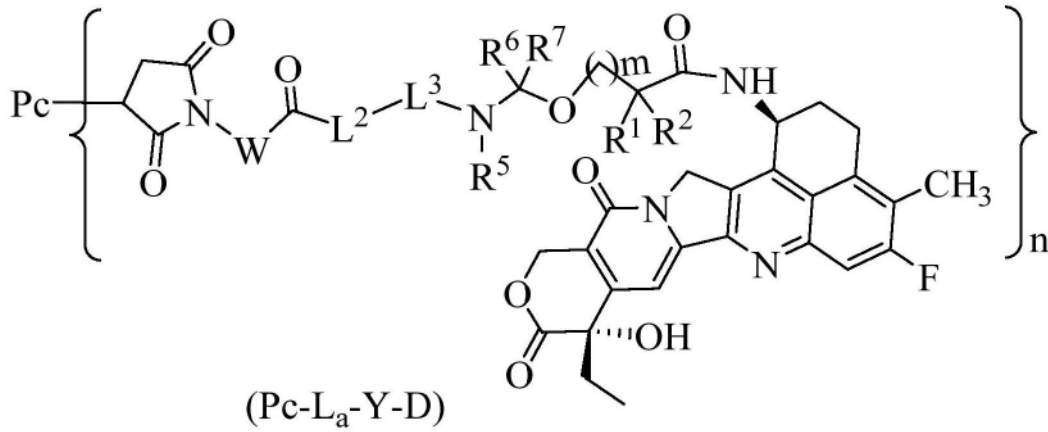
16. 根据权利要求1所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中-L-为:



17. 根据权利要求1所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中-L-Y-任选自:



18. 根据权利要求1所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其为通式(Pc-L<sub>a</sub>-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:

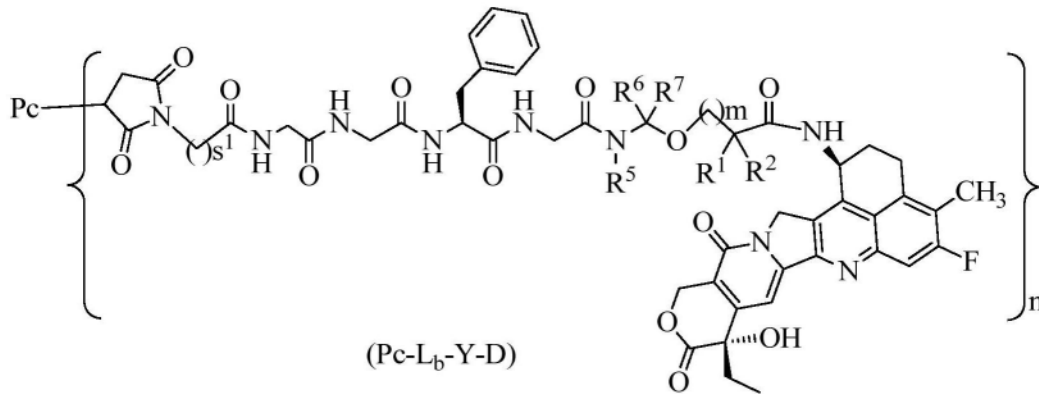


其中,Pc和n如权利要求1中所定义,

m、R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>如权利要求11中所定义,

W、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>如权利要求13中所定义。

19. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其为通式 (Pc-L<sub>b</sub>-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



其中:

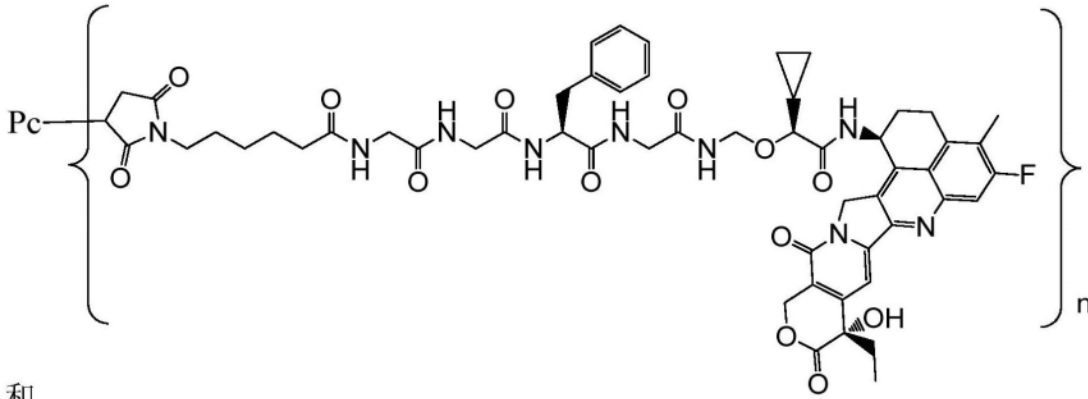
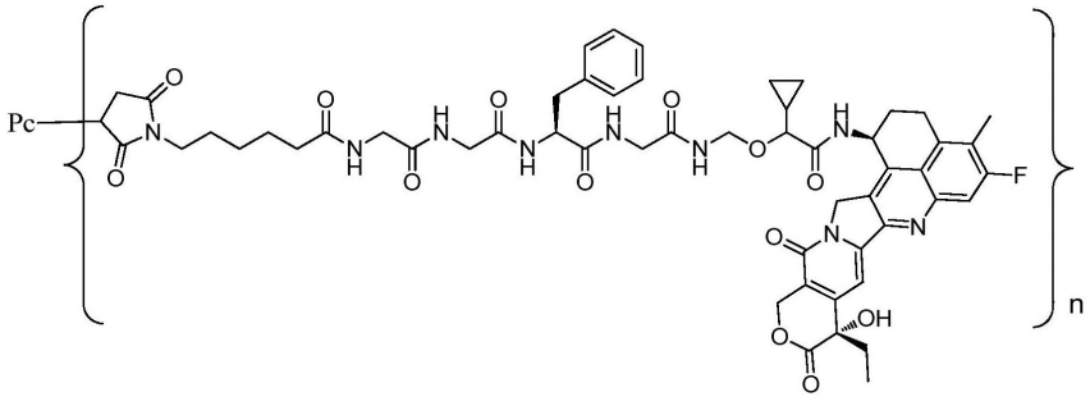
s<sup>1</sup>为2至8的整数;

Pc和n如权利要求1中所定义,

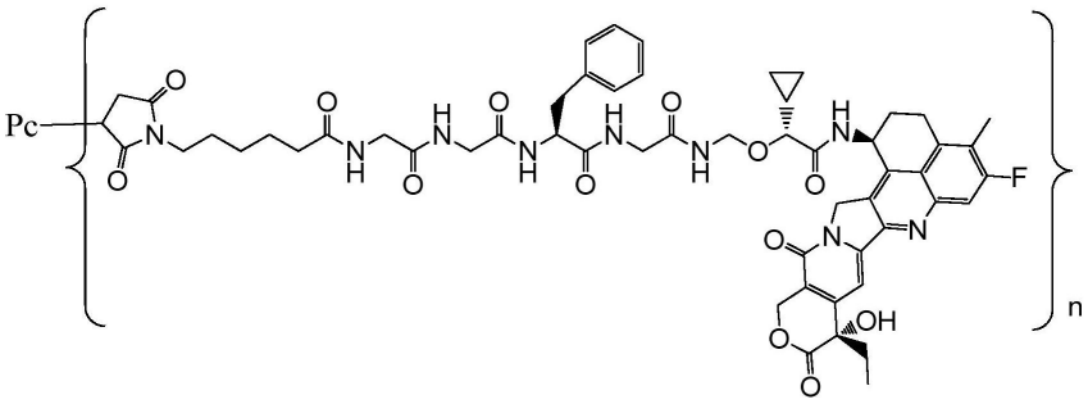
R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和m如权利要求11中所定义,

R<sup>5</sup>至R<sup>7</sup>如权利要求13中所定义。

20. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物选自:

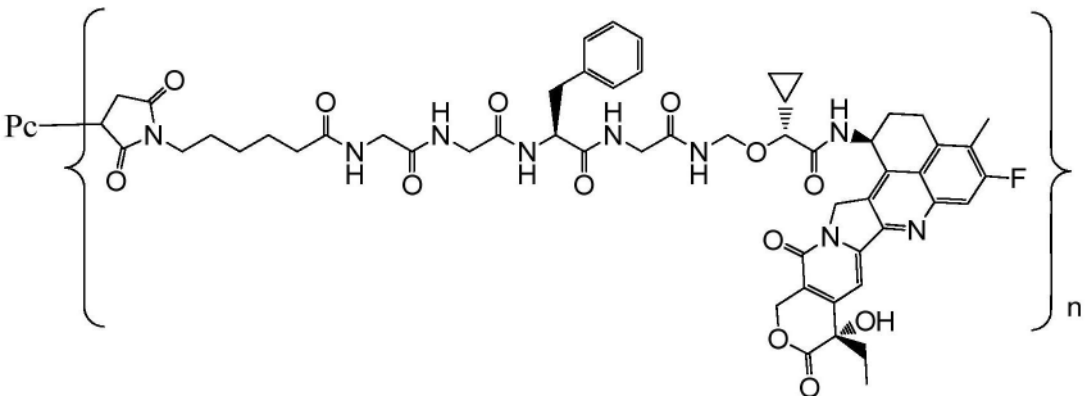


和



其中Pc和n如权利要求1中所定义。

21. 根据权利要求1所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物是:



其中:

n为1至8,n是小数或整数;

Pc为抗TROP-2抗体,其包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:14所示的轻链。

22.根据权利要求1所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中n为4-8的整数或小数。

23.根据权利要求1所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中n为4-6的整数或小数。

24.一种抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

25.根据权利要求24所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗TROP-2抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

26.根据权利要求24所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示或与其有至少90%同一性,和所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示或与其有至少90%同一性。

27.根据权利要求24所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含抗体重链恒定区和轻链恒定区。

28.根据权利要求24所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的恒定区,所述轻链恒定区选自人抗体κ和λ链的恒定区。

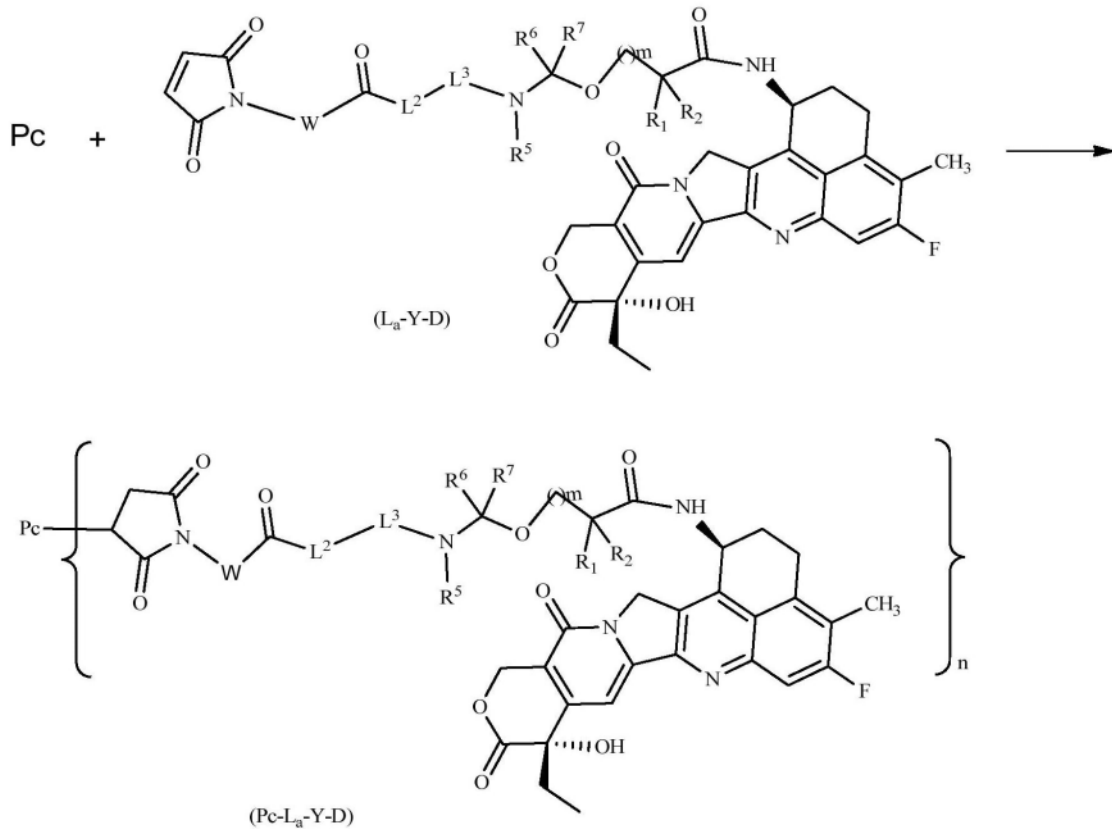
29.根据权利要求24所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗TROP-2抗体包含如SEQ ID NO:11所示的重链恒定区和如SEQ ID NO:12所示的轻链恒定区。

30.根据权利要求24所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗TROP-2抗体包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:14所示的轻链。

31.一种核酸分子,其编码权利要求24至30中任一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段。

32.一种宿主细胞,其包含如权利要求31所述的核酸分子。

33.一种制备如通式(Pc-L<sub>a</sub>-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法,其包括以下步骤:



Pc还原后,与通式(L<sub>a</sub>-Y-D)所示的化合物进行偶联反应,得到通式(Pc-L<sub>a</sub>-Y-D)所示的化合物;

其中:

Pc为权利要求1中所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段;

n、m、W、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>如权利要求18中所定义。

34. 一种药物组合物,其包含:

根据权利要求1至23中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,或根据权利要求24至30中任一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

35. 根据权利要求1至23中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐、根据权利要求24至30中任一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求34所述的药物组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途,其中所述肿瘤选自头和颈癌、神经胶质瘤、食管癌、甲状腺癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肾癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、和尿路上皮癌。

36. 根据权利要求35所述的用途,其中所述肺癌选自:非小细胞肺癌和小细胞肺癌;所述头和颈癌为头和颈鳞状细胞癌。



## 抗TROP-2抗体-依喜替康类似物偶联物及其医药用途

[0001] 本申请要求2020年1月22日提交的中国专利申请(申请号CN202010073438.8)的优先权。

### 技术领域

[0002] 本公开涉及抗TROP-2抗体、抗TROP-2抗体-依喜替康类似物偶联物,其制备方法,包含其的药物组合物,以及其用于制备治疗TROP-2介导的疾病或病症的药物中的用途;尤其在用于制备抗癌药物中的用途。

### 背景技术

[0003] 这里的陈述仅提供与本公开有关的背景信息,而不必然地构成现有技术。

[0004] TROP-2是人滋养层细胞表面糖蛋白抗原2,又名肿瘤相关钙离子信号转导子2(TACSTD2)、表皮糖蛋白1(EGP-1)、胃肠肿瘤相关抗原(GA733-1)、表面标志物1(M1S1),是由染色体1p32区域的Tacstd2基因编码表达的细胞表面糖蛋白。TROP-2属GA733蛋白家族,与上皮细胞黏附分子(EpCAM,又称Trop1、TACSTD1)有较高结构序列相似性,同源性达49%。

[0005] TROP-2蛋白初级结构是由约323个氨基酸组成的约36kD的多肽,初级结构经N-端糖基化翻译后修饰,形成不同于EpCAM的I型细胞膜糖蛋白,即TROP-2蛋白。TROP-2蛋白横跨细胞膜,N-端为胞外域(Trop2EC),该胞外域通过一个单向跨膜螺旋(TM)与由26个氨基酸残基构成的疏水性多肽的胞内短尾(Trop2IC)连接,从而固定于胞膜。

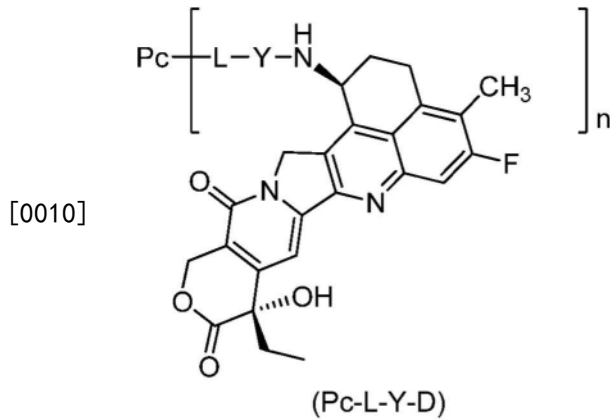
[0006] 目前发现TROP-2在胚胎发育和肿瘤细胞增殖转移的过程中具有重要意义。TROP-2最初发现于滋养层细胞,并作为其表面标志物,滋养细胞源于胚胎外滋养层,TROP-2有助于胚胎着床及胎盘组织形成,并且在胚胎干细胞增殖特性维持以及器官形成发展过程中发挥重要作用。除此之外,TROP-2还是重要的肿瘤发展相关因子,其高表达于多种肿瘤,如胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、口腔鳞癌、卵巢癌等,可促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移扩散等过程,其高表达与肿瘤受试者生存期缩短及不良预后密切相关,因此以TROP-2为靶点的抗肿瘤药物研究具有重要意义。

[0007] 抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate,ADC)将单克隆抗体或者抗体片段通过接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连,充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒性物质的高效性,同时又避免了抗体的疗效偏低和毒性物质的毒副作用过大等缺陷。这也就意味着,与以往传统的化疗药物相比,抗体-药物偶联物能更精准地杀伤肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

### 发明内容

[0008] 本公开涉及抗TROP-2抗体,其ADC以及其用途,提供与抗TROP-2抗体或抗原结合片段与细胞毒性物质依喜替康类似物偶联的ADC药物。

[0009] 本公开提供了一种通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



[0011] 其中：

[0012] Y选自  $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 、 $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ 、 $-O-CR^1R^2-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$  和  $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ；

[0013]  $R^a$ 和 $R^b$ 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基和杂环基；或者， $R^a$ 和 $R^b$ 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

[0014]  $R^1$ 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基； $R^2$ 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；或者， $R^1$ 和 $R^2$ 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

[0015] 或者， $R^a$ 和 $R^2$ 与其相连的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

[0016]  $m$ 为0至4的整数；非限制性实施例如 $m$ 选自0、1、2、3和4；

[0017]  $n$ 为1至10， $n$ 是小数或整数；

[0018] L为接头单元；

[0019] Pc为抗TROP-2抗体或其抗原结合片段。

[0020] 在一些实施方案中，如前所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:3所示的重链可变区相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3，所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:4所示的轻链可变区相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0021] 在一些实施方案中，如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0022] 在一些实施方案中，如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗TROP-2抗体是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0023] 在一些实施方案中，如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示或与其有至少90%-100%

同一性,包括但不限于至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%同一性和所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示或与其有至少90%-100%同一性,包括但不限于至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%同一性。

[0024] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含序列如SEQ ID NO:3所示的重链可变区和序列如SEQ ID NO:4所示的轻链可变区。

[0025] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含重链恒定区和轻链恒定区;优选地,所述重链恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的恒定区,所述轻链恒定区选自人抗体 $\kappa$ 和 $\lambda$ 链的恒定区;更优选地,所述抗体包含序列如SEQ ID NO:11所示的重链恒定区和序列如SEQ ID NO:12所示的轻链恒定区。

[0026] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:14所示的轻链。

[0027] 在一些实施方案中,如前所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗TROP-2抗体包含序列如SEQ ID NO:15所示的重链和序列如SEQ ID NO:16所示的轻链;或者包含序列如SEQ ID NO:17所示的重链和序列如SEQ ID NO:18所示的轻链。

[0028] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中n为2至10,优选为4至8,n是小数或整数。在一些实施方案中,n为0-10,优选1-10,更优选1-8,或2-8,或2-7,或2-4,或3-8,或3-7,或3-6,或4-7,或4-6,或4-5的平均值;在一些实施方案中,n为1,2,3,4,5,6,7,8,9,10的平均值。

[0029] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,

[0030] 其中:

[0031] Y为 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ;

[0032]  $R^a$ 和 $R^b$ 相同或不同,且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素和烷基;

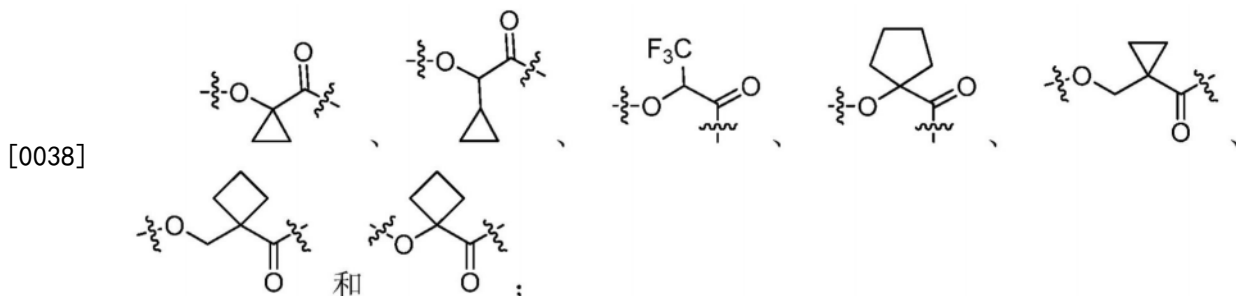
[0033]  $R^1$ 为卤代烷基或 $C_{3-6}$ 环烷基;

[0034]  $R^2$ 选自氢原子、卤代烷基和 $C_{3-6}$ 环烷基;

[0035] 或者, $R^1$ 和 $R^2$ 与其相连接的碳原子一起形成 $C_{3-6}$ 环烷基;

[0036] m为0或1。

[0037] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中Y选自:



[0039] 其中Y的O端与接头单元L相连。

[0040] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中接头单元-L-为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ,

[0041]  $L^1$ 选自-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-W-C(O)-、 $-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$ 和 $-C(O)-W-C(O)-$ ,其中W选自 $C_{1-8}$ 烷基、 $C_{1-8}$ 烷基-环烷基和1至8个原子的直链杂烷基,所述杂烷基包含1至3个选自N、O和S的杂原子,其中所述的 $C_{1-8}$ 烷基、环烷基和直链杂烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

[0042]  $L^2$ 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_pC(O)-$ 或化学键,其中p为1至20的整数;

[0043]  $L^3$ 为由2至7个氨基酸残基构成的肽残基,其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基,并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代;

[0044]  $L^4$ 选自 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ 、 $-C(O)NR^5-$ 、 $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$ 和化学键,其中t为1至6的整数;

[0045]  $R^3$ 、 $R^4$ 和 $R^5$ 相同或不同,且各自独立地选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

[0046]  $R^6$ 和 $R^7$ 相同或不同,且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

[0047] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中接头单元-L-为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ,

[0048]  $L^1$ 选自-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-W-C(O)-、 $-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$ 和 $-C(O)-W-C(O)-$ ,其中W选自 $C_{1-8}$ 烷基、 $C_{1-8}$ 烷基-环烷基和1至8个链原子的直链杂烷基,所述杂烷基包含1至3个选自N、O和S的杂原子,其中所述的 $C_{1-8}$ 烷基、环烷基和直链杂烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

[0049]  $L^2$ 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_pC(O)-$ 或化学键,其中p为1至20的整数;

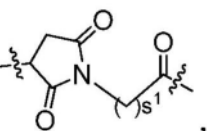
[0050]  $L^3$ 为由2至7个氨基酸残基构成的肽残基,其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸(F)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、赖氨酸(K)、瓜氨酸、丝氨酸(S)、谷氨酸(Q)和天冬氨酸(D)中的氨基酸形成的氨基酸残基,并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代;

[0051]  $L^4$ 选自  $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ 、 $-C(O)NR^5-$ 、 $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$  和化学键, 其中  $t$  为 1 至 6 的整数, 非限制性实施例为 1, 2, 3, 4, 5 和 6;

[0052]  $R^3$ 、 $R^4$  和  $R^5$  相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

[0053]  $R^6$  和  $R^7$  相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

[0054] 在一些实施方案中, 如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中接头单元 -L- 为  $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ,

[0055]  $L^1$  为 ,  $s^1$  为 2 至 8 的整数, 非限制性实施例为 2, 3, 4, 5, 6, 7 和 8;

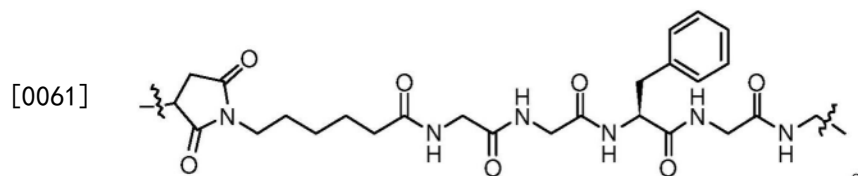
[0056]  $L^2$  为化学键;

[0057]  $L^3$  为四肽残基; 优选地,  $L^3$  为 GGFG 的四肽残基;

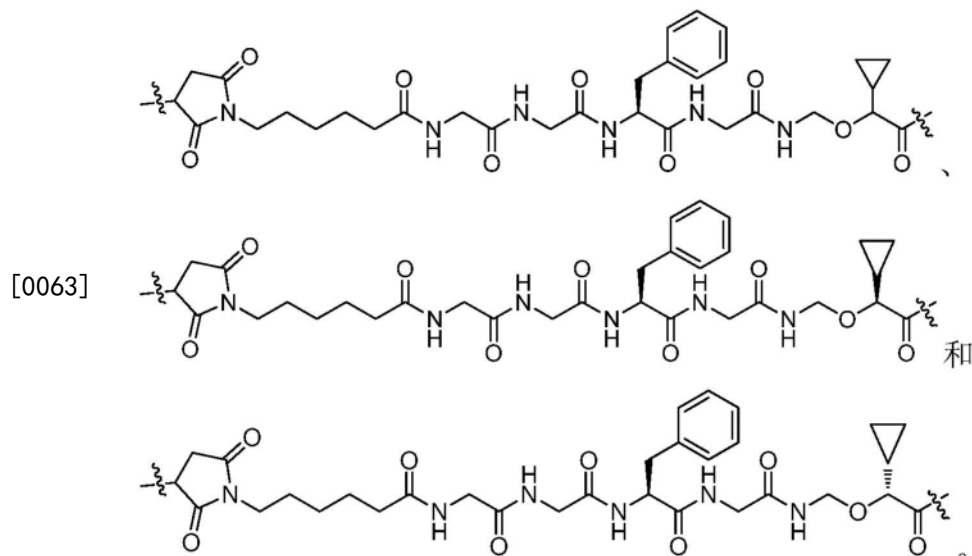
[0058]  $L^4$  为  $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ ,  $R^5$ 、 $R^6$  或  $R^7$  相同或不同, 且各自独立地为氢原子或烷基,  $t$  为 1 或 2;

[0059] 其中所述的  $L^1$  端与 Pc 相连,  $L^4$  端与 Y 相连。

[0060] 在一些实施方案中, 如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中 -L- 为:

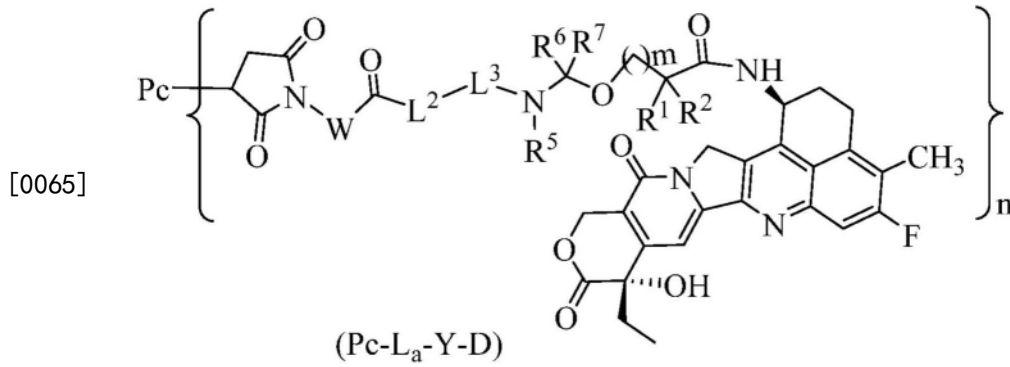


[0062] 在一些实施方案中, 如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中 -L-Y- 任选自:



[0064] 在一些实施方案中, 如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其为通式 (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受

的盐:

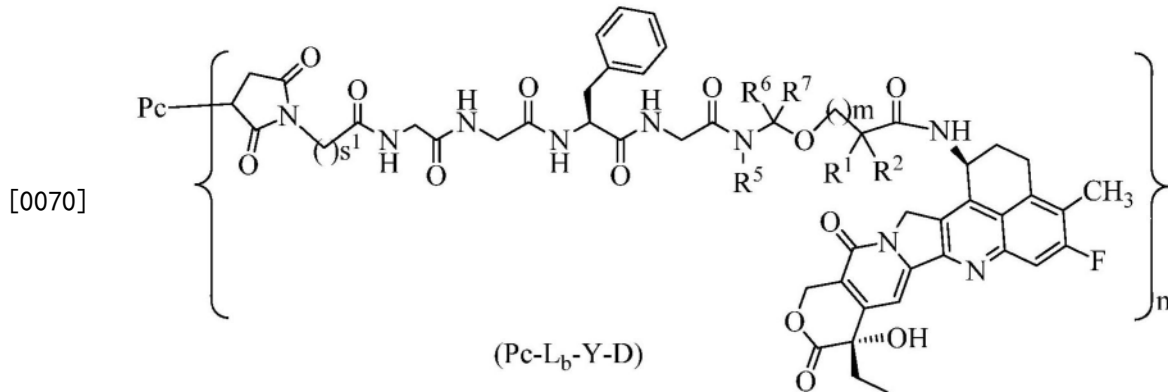


[0066] 其中:

[0067] W、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>如前所述接头单元-L中所定义;

[0068] Pc、n、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、m如通式(Pc-L-Y-D)中所定义。

[0069] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其为通式(Pc-L<sub>b</sub>-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:

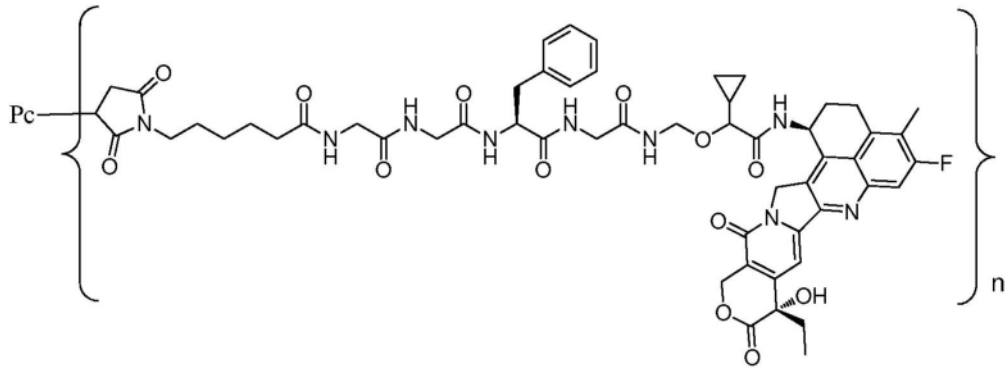


[0071] 其中:

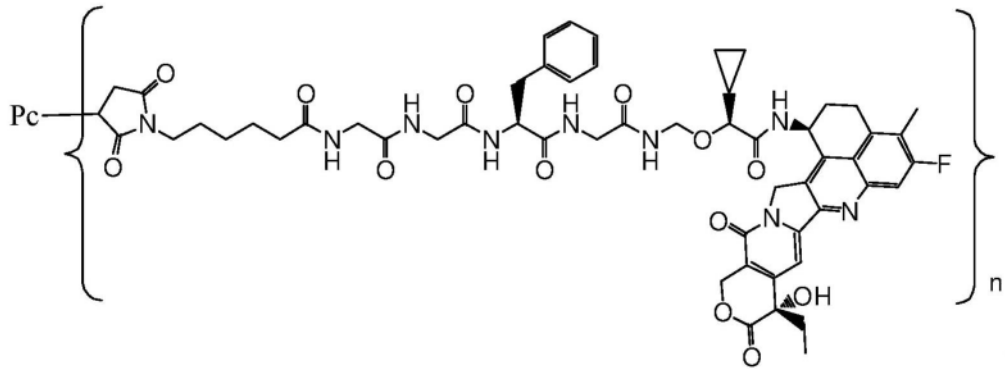
[0072] s<sup>1</sup>为2至8的整数;

[0073] Pc、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、m和n如通式(Pc-L<sub>a</sub>-Y-D)中所定义。

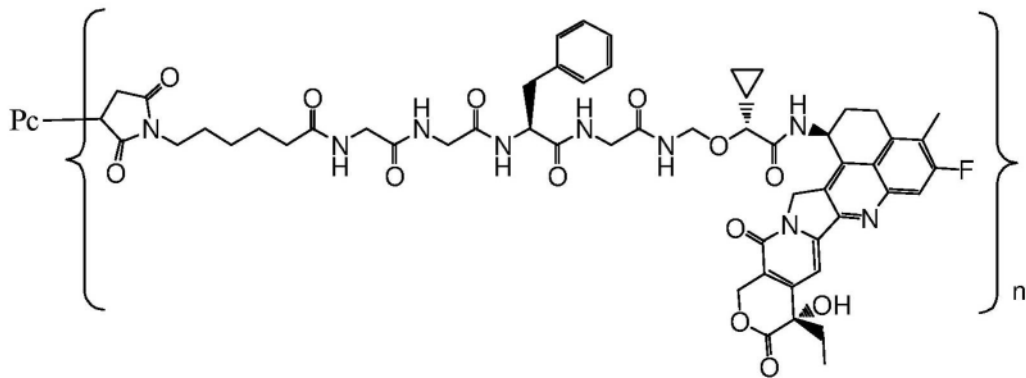
[0074] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物选自:



[0075]



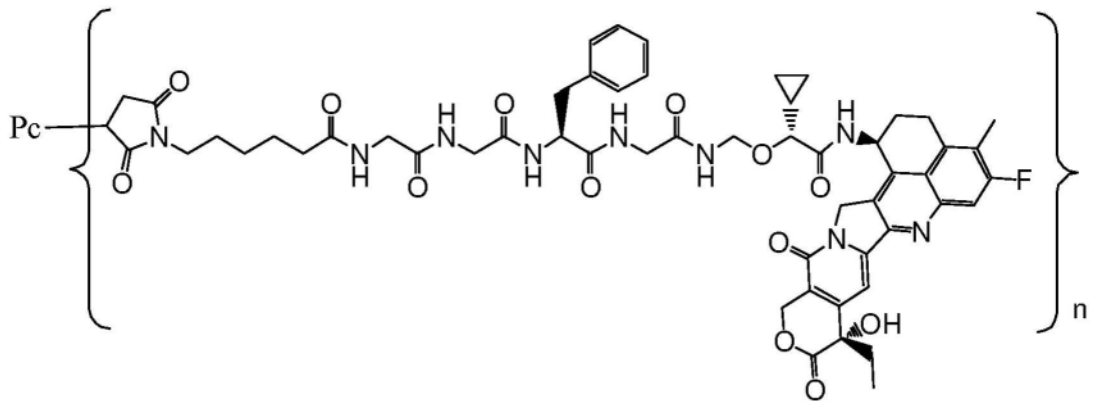
和



[0076] 其中Pc和n如通式 (Pc-L-Y-D) 中所定义。

[0077] 在一些实施方案中,如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物选自:

[0078]

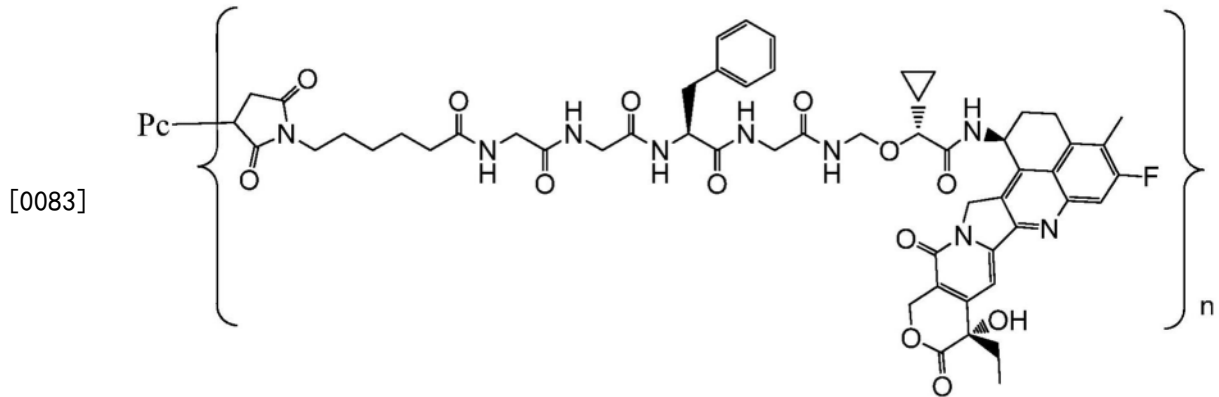


[0079] 其中:

[0080] n为4至8,n是小数或整数;

[0081] Pc为抗TROP-2抗体,其包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:14所示的轻链。

[0082] 在一些实施方案中,如前所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物是:



[0084] 其中:

[0085] n为1至8,n是小数或整数,优选2-4或者4-8的整数或小数,更优选4-6的整数或小数;

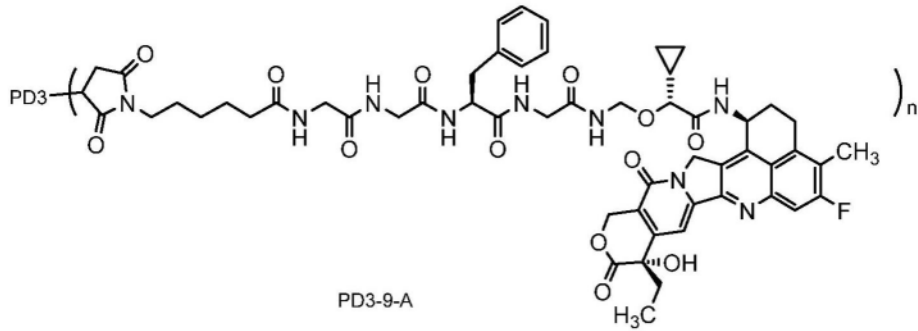
[0086] Pc为抗TROP-2抗体,其包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:14所示的轻链;

[0087] 或者包含如SEQ ID NO:15所示的重链和如SEQ ID NO:16所示的轻链;

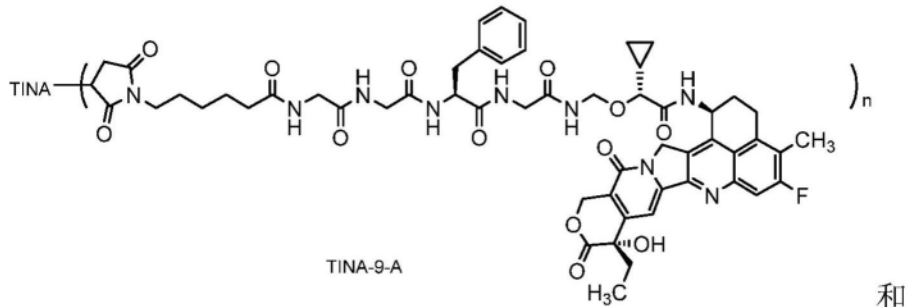
[0088] 或者包含如SEQ ID NO:17所示的重链和如SEQ ID NO:18所示的轻链。

[0089] 在一些实施方案中,如前所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物选自:

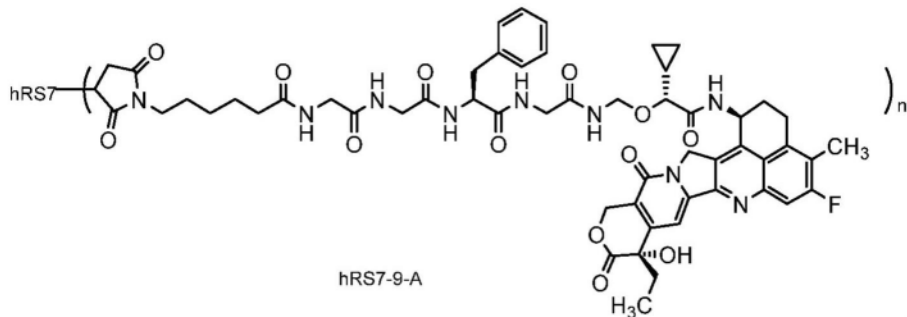




[0090]



和



[0091] 其中：

[0092] n为1至8的小数或整数,优选2-4或者4-8的整数或小数,更优选4-6的整数或小数；

[0093] PD3为抗TROP-2抗体,其包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:14所示的轻链；

[0094] hRS7为抗TROP-2抗体,或者包含如SEQ ID NO:15所示的重链和如SEQ ID NO:16所示的轻链；

[0095] TINA为抗TROP-2抗体,或者包含如SEQ ID NO:17所示的重链和如SEQ ID NO:18所示的轻链。

[0096] 本公开还提供了一种抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其包含抗体重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:3序列的重链可变区相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:4所示的轻链可变区相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0097] 在一些实施方案中,如前所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0098] 在一些实施方案中,如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗TROP-2抗体是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0099] 在一些实施方案中,如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示或与其有至少90%-100%的同一性,包括但不限于至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%同一性,和所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示或与其有至少90%-100%同一性,包括但不限于至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%同一性。

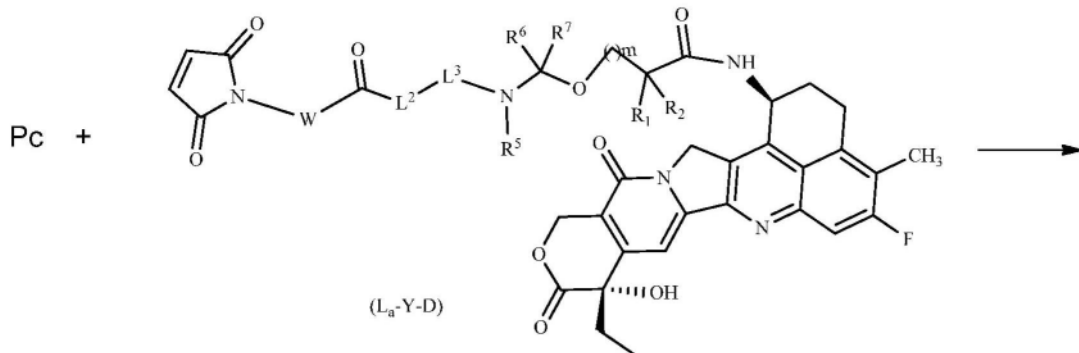
[0100] 在一些实施方案中,如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗TROP-2抗体或其抗原结合片段包含抗体重链恒定区和轻链恒定区;优选地,所述重链恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的恒定区及其常规变体,所述轻链恒定区选自人抗体 $\kappa$ 和 $\lambda$ 的链恒定区及其常规变体;更优选地,所述抗体包含如SEQ ID NO:11所示的重链恒定区和如SEQ ID NO:12所示的轻链恒定区。

[0101] 在一些实施方案中,如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段,其中所述抗TROP-2抗体包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:14所示的轻链。

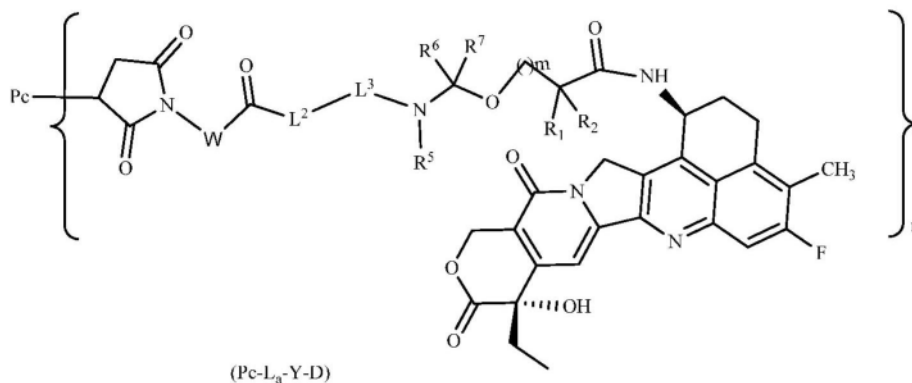
[0102] 另一方面,本公开提供了一种核酸分子,其编码如前所述的抗TROP-2抗体。另一方面,本公开提供了一种核酸分子,其编码如前所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段。

[0103] 另一方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包含如前所述的核酸分子。

[0104] 本公开进一步提供一种制备如通式(Pc-L<sub>a</sub>-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法,其包括以下步骤:



[0105]



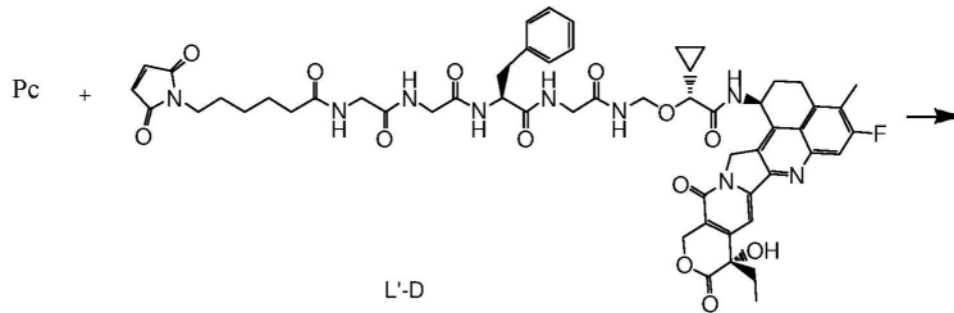
[0106] Pc还原后,与通式(L<sub>a</sub>-Y-D)所示的化合物进行偶联反应,得到通式(Pc-L<sub>a</sub>-Y-D)所示的化合物;

[0107] 其中:

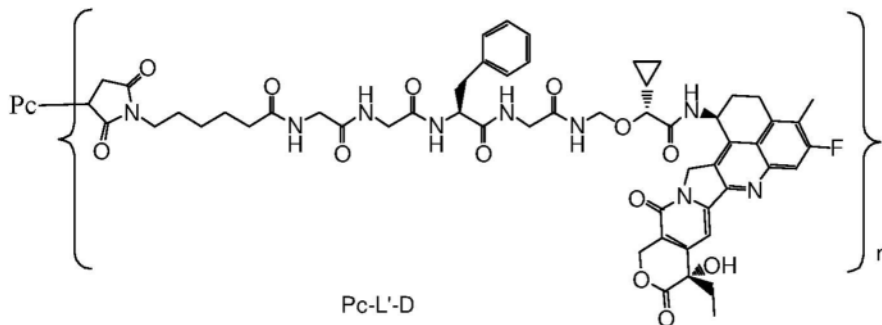
[0108] Pc为抗TROP-2抗体或其抗原结合片段；

[0109] n、m、W、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>如前述通式(Pc-L<sub>a</sub>-Y-D)中所定义。

[0110] 本公开进一步提供一种制备如通式(Pc-L'-D)所示的配体药物偶联物的方法，其包括以下步骤：



[0111]



[0112] Pc还原后，与式(L'-D)所示的化合物进行偶联反应，得到通式(Pc-L'-D)所示的化合物；其中：

[0113] Pc为如前所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段；

[0114] n如通式(Pc-L-Y-D)中所定义。

[0115] 另一方面，本公开提供了一种药物组合物，其包含根据如前一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。在一些实施方案中，所述单位剂量的药物组合物中含有0.1-3000mg或1-1000mg如前所述的抗TROP-2抗体或如前所述的抗体-药物偶联物。

[0116] 另一方面，本公开提供了如前一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段或包含其的药物组合物作为药物的用途。

[0117] 另一方面，本公开提供了如前一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段或包含其的药物组合物在制备用于治疗TROP-2介导的疾病或病症或肿瘤的药物中的用途其中所述TROP-2介导的疾病或病症为TROP-2高表达癌症，中表达癌症或低表达癌症。

[0118] 另一方面，本公开提供如前一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段或包含其的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途，其中所述肿瘤和癌症优选头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、咽鳞癌、口腔鳞癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、肺癌、乳腺

癌、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、骨癌、软骨肉瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、库肯勃氏瘤、骨髓增生性肿瘤、鳞状细胞癌、尤因氏肉瘤、尿路上皮癌和梅克尔细胞癌；更优选的，所述淋巴瘤选自：何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大B-细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、原发性纵隔大B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、富含T-细胞/组织细胞的大B-细胞淋巴瘤和淋巴浆细胞性淋巴瘤，所述肺癌选自：非小细胞肺癌和小细胞肺癌，所述白血病选自：慢性髓细胞样白血病、急性髓细胞样白血病、淋巴细胞白血病、成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和髓样细胞白血病。

[0119] 另一方面，本公开进一步涉及一种用于治疗和/或预防肿瘤的方法，该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物；优选其中所述的肿瘤为与TROP-2高表达，中表达或低表达相关的癌症。

[0120] 另一方面，本公开进一步涉及一种用于治疗或预防肿瘤或癌症的方法，该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的配体药物偶联物或其药学上可接受的盐或如前一项所述的抗TROP-2抗体或其抗原结合片段或包含其的药物组合物；其中所述肿瘤和癌症优选头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、咽鳞癌、口腔鳞癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、肺癌、乳腺癌、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、骨癌、软骨肉瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、库肯勃氏瘤、骨髓增生性肿瘤、鳞状细胞癌、尤因氏肉瘤、尿路上皮癌和梅克尔细胞癌；更优选的，所述淋巴瘤选自：何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大B-细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、原发性纵隔大B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、富含T-细胞/组织细胞的大B-细胞淋巴瘤和淋巴浆细胞性淋巴瘤，所述肺癌选自：非小细胞肺癌和小细胞肺癌，所述白血病选自：慢性髓细胞样白血病、急性髓细胞样白血病、淋巴细胞白血病、成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和髓样细胞白血病。

[0121] 另一方面，本公开进一步提供前述的抗TROP-2抗体或其抗体-药物偶联物作为药物，优选作为治疗癌症或肿瘤的药物，更优选作为治疗TROP-2介导的癌症的药物。

[0122] 可将活性化合物（例如根据本公开所述的配体-药物偶联物、或其药学上可接受的盐）制成适合于通过任何适当途径给药的形式，活性化合物优选是以单位剂量的方式，或者是以受试者能够以单位剂量进行自我给药的方式。本公开所述的活性化合物或组合物的单位剂量的方式可以是片剂、胶囊、扁囊剂、瓶装药水、药粉、颗粒剂、锭剂、栓剂、再生药粉或液体制剂。

[0123] 本公开治疗方法中所用活性化合物或组合物的施用剂量通常将随疾病的严重性、受试者的体重和活性化合物的功效而改变。作为一般性指导，合适的单位剂量可以是0.1mg至1000mg。

[0124] 本公开的药物组合物除活性化合物外，可含有一种或多种辅料，所述辅料选自以

下成分:填充剂、稀释剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂或赋形剂等。根据给药方法的不同,组合物可含有0.1至99重量%的活性化合物。

[0125] 本公开提供的TROP-2抗体及抗体-药物偶联物具有与细胞表面抗原良好的亲和力,良好的细胞内吞效率和很强的肿瘤抑制效率,并且具有更宽的药物应用窗口,适于临床的药物应用。

### 附图说明

[0126] 图1:抗TROP-2抗体与表达TROP-2的细胞结合实验结果。

[0127] 图2:ADC对BxPC3细胞和MiaPaCa2混合细胞的旁观杀伤活性结果。

[0128] 图3:不同ADC对小鼠体内FaDu移植瘤的抑制活性。

[0129] 图4:不同剂量的ADC对小鼠体内SKOV3移植瘤的抑制活性。

[0130] 图5:不同剂量的ADC对小鼠体内Colo205移植瘤的抑制活性。

### 具体实施方式

[0131] 一.术语

[0132] 除非另有限定,本文所用的所有技术和科学术语均与本公开所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本公开,但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本公开时,依据以下定义使用下列术语。

[0133] 当本公开中使用商品名时,旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的药物和活性药物部分。

[0134] 除非有相反陈述,在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

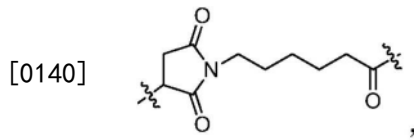
[0135] 术语“药物”是指细胞毒性药物,能在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死细胞,但是由于缺乏特异性,在杀伤肿瘤细胞的同时,也会导致正常细胞的凋亡,导致严重的副作用。该术语包括毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,放射性同位素(例如At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>和Lu的放射性同位素),化疗药物,抗生素和核溶酶。

[0136] 术语“接头单元”、“接头”、“连接单元”或“连接片段”是指一端与配体连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键,也可以连接其他接头后再与配体或药物相连。

[0137] 接头可以包含一种或多种接头构件。示例性的接头构件包括6-马来酰亚氨基己酰基(“MC”)、马来酰亚氨基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1羧酸酯(“SMCC”,在本文中也称作“MCC”)和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。接头可以选自以下的元件或其组合:延伸物、间隔物和氨基酸单元。可以通过本领域已知方法合成接头,诸如US2005-0238649A1中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头(例如脞)、蛋白酶敏感(例如肽酶敏感)接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari等,Cancer Research 52:127-131(1992);美国专利No.5,208,020)。

[0138] 接头元件包括但不限于：

[0139] MC=6-马来酰亚氨基己酰基，结构如下：



[0141] Val-Cit或“vc”=缬氨酸-瓜氨酸(蛋白酶可切割接头中的示例二肽)，

[0142] 瓜氨酸=2-氨基-5-脲基戊酸，

[0143] PAB=对氨基苄氧羰基(“自我牺牲”接头元件的示例)，

[0144] Me-Val-Cit=N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(其中接头肽键已经修饰以防止其受到组织蛋白酶B的切割)，

[0145] MC(PEG)6-OH=马来酰亚氨基己酰基-聚乙二醇(可附着于抗体半胱氨酸)，

[0146] SPP=N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯，

[0147] SPDP=N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯，

[0148] SMCC=琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯，

[0149] IT=亚氨基硫烷。

[0150] 术语“配体-药物偶联物”指配体通过连接单元与具有生物活性的药物相连，优选为“抗体-药物偶联物”。在本公开中“抗体-药物偶联物”(antibody drug conjugate, ADC)，指将单克隆抗体或者抗体片段通过连接单元与具有生物活性的毒性药物相连。抗体可直接地或经接头地偶联至药物。n是每个抗体的平均药物模块数，可以是整数或小数，其范围可以是：例如每个抗体约0到约20个药物模块，在某些实施方案中是每个抗体1个到约10个药物模块，在某些实施方案中是每个抗体1个到约8个药物模块，如2、3、4、5、6、7、8个药物模块。本公开的抗体-药物偶联物的混合物的组合物，其中每个抗体的平均药物载荷是约1个至约10个，包括但不限于约3个至约7个，约3个至约6个，约3个至约5个，约1个至约9个，约7个或约4个。

[0151] 本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J. biol. chem, 243, p3558(1968)中所述。

[0152] 术语“抗体”指免疫球蛋白，是由两条重链和两条轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。根据免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE，其相应的重链分别为 $\mu$ 链、 $\delta$ 链、 $\gamma$ 链、 $\alpha$ 链、和 $\epsilon$ 链。同一类Ig根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如IgG可分为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 $\kappa$ 链或 $\lambda$ 链。五类Ig中每类Ig都可以有 $\kappa$ 链或 $\lambda$ 链。

[0153] 全长抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大，为可变区(Fv区)；靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的框架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区4个FR区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2、和LCDR3；重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0154] 术语“完全人源抗体”、“完全人抗体”、“人抗体”或“全人抗体”，也称“全人源单克

隆抗体”，其抗体的可变区和恒定区都是人源的，去除免疫原性和毒副作用。全人源抗体制备的相关技术主要有：人杂交瘤技术、EBV转化B淋巴细胞技术、噬菌体显示技术 (phage display)、转基因小鼠抗体制备技术 (transgenic mouse) 和单个B细胞抗体制备技术等。

[0155] 术语“抗原结合片段”是指抗体的保持特异性结合抗原的能力的一个或多个片段。可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。“抗原结合片段”中包含的结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体 (scFv)、二聚化的V区 (双抗体)、二硫键稳定化的V区 (dsFv) 和包含CDR的肽的抗原结合片段，示例包括 (i) Fab片段，由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段，包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段；(iv) 由抗体的单臂的VH和VL结构域组成的Fv片段；(v) 单结构域或dAb片段 (Ward等人，(1989) Nature 341:544-546)，其由VH结构域组成；和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR) 或 (vii) 可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外，虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码，但可使用重组方法，通过合成的接头连接它们，从而使得其能够产生为其中VL和VH区配对形成单价分子的单个蛋白质链 (称为单链Fv (scFv)；参见，例如，Bird等人 (1988) Science 242:423-426；和Huston等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组DNA技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。

[0156] 通常，Fab是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶 (例如，切割H链的224位的氨基酸残基) 处理IgG抗体分子所获得的片段中的具有约50,000的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，其中H链N端侧的部分和L链通过二硫键结合在一起。

[0157] 通常，F(ab')<sub>2</sub>是通过用酶胃蛋白酶消化IgG铰链区中二硫键的下方部分而获得的，分子量约为100,000，并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个Fab区的抗体片段。

[0158] 通常，Fab'是通过切割上述F(ab')<sub>2</sub>的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000并具有抗原结合活性的抗体片段。

[0159] 此外，可以通过将编码Fab'片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab'来生产所述Fab'。

[0160] 术语“单链抗体”、“单链Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域 (或VH) 和抗体轻链可变结构域 (或VL) 的分子。此类scFv分子可具有一般结构：NH<sub>2</sub>-VL-接头-VH-COOH或NH<sub>2</sub>-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成，例如使用1-4个重复的变体 (Holliger等人 (1993), Proc Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。可用于本公开的其他接头由Alfthan等人 (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi等人 (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu等人 (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov等人 (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56和Roovers等人 (2001), Cancer Immunol. 描述。

[0161] 术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。通常，每个重链可变区中存在三个CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)，每个轻链可变区中存在三个CDR

(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定CDR的氨基酸序列边界,包括“Kabat”编号规则(参见Kabat等(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)、“Chothia”编号规则(参见Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273:927-948)和ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则(Lefranc M.P.,Immunologist,7,132-136(1999); Lefranc,M.P.等,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003)等。例如,对于经典格式,遵循Kabat规则,所述重链可变域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);轻链可变域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。遵循Chothia规则,VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3);并且VL中的氨基酸残基编号为26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3)。通过组合Kabat和Chothia两者的CDR定义,CDR由人VH中的氨基酸残基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)和人VL中的氨基酸残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)构成。遵循IMGT规则,VH中的CDR氨基酸残基编号大致为26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和93-102(CDR3),VL中的CDR氨基酸残基编号大致为27-32(CDR1)、50-52(CDR2)和89-97(CDR3)。遵循IMGT规则,抗体的CDR区可以使用程序IMGT/DomainGap Align确定。

[0162] 术语“框架区”,是指可变结构域VL或VH的一部分,其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲,其是不具有CDR的可变结构域。

[0163] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上被免疫球蛋白或抗体结合的部位。表位通常以独特的空间构象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续或非连续的氨基酸。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。

[0164] 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体或其片段对预先确定的抗原上的表位的结合。通常,抗体或其片段以大约小于 $10^{-7}$ M,例如大约小于 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或更小的亲和力(KD)结合。

[0165] 术语“KD”是指抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常,本公开的抗体或抗原结合片段以小于大约 $10^{-7}$ M,例如小于大约 $10^{-8}$ M或 $10^{-9}$ M的解离平衡常数(KD)结合TROP-2或其表位,例如,在本公开中抗体与细胞表面抗原的亲和力采用FACS法测定KD值。

[0166] 术语“核酸分子”是指DNA分子或RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

[0167] 氨基酸序列“同一性”指比对氨基酸序列过程中,在必要时引入间隙,以达成最大序列同一性百分比,且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分,第一序列中与第二序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为测定氨基酸序列同一性百分比的目的,比对可以通过属于本领域技术的范围内的多种方式来实现,例如使用公开可得到的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或MegaAlign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数,包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。



[0168] 术语“表达载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中,载体是“质粒”,其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。在另一个实施方案中,载体是病毒载体,其中可将另外的DNA区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组,从而随宿主基因组一起复制(例如,非附加型哺乳动物载体)。

[0169] 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个个人源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件,从ImMunoGeneTics(IMGT)的网站得到,或者从免疫球蛋白杂志,Lefranc,G., The Immunoglobulin FactsBook,Academic Press,2001ISBN012441351上获得。

[0170] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括微生物(如细菌)、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)的菌株;芽孢杆菌科(Bacillaceae)例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌(*Pneumococcus*);链球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)和NS0细胞。

[0171] 本公开工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,编码重链和轻链的cDNA序列,可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染宿主细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,特别是在Fc区的N端位点。阳性的克隆在生物反应器的培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如,用A或G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用pH梯度法洗脱结合的抗体,用SDS-PAGE检测抗体片段,收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

[0172] 术语“肽”是指由2个或2个以上氨基酸分子通过肽键相互连接而成的分子,是蛋白质的结构与功能片段。

[0173] 术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团,其为包含1至20个碳原子的直链或支链基团,优选含有1至12个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个)碳原子的烷基,更优选含有1至10个碳原子的烷基,最优选含有1至6个碳原子(包含1个、2个、3个、4个、5个或6个碳原子)的烷基。非限制性示例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基

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

[0174] 术语“杂烷基”指含有一个或多个选自N、O或S的杂原子的烷基,其中烷基如上所定义。

[0175] 术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基,其具有从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基,其为包含1至20个碳原子的直链或支链基团,优选含有1至12个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个)碳原子,更优选含有1至6个碳原子(包含1个、2个、3个、4个、5个或6个碳原子)的亚烷基。亚烷基的非限制性示例包括但不限于亚甲基(-CH<sub>2</sub>-)、1,1-亚乙基(-CH(CH<sub>3</sub>)-)、1,2-亚乙基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)、1,1-亚丙基(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-)、1,2-亚丙基(-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-)、1,3-亚丙基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)、1,4-亚丁基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)和1,5-亚丁基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基优选独立地任选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基所取代。

[0176] 术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基),其中烷基或环烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性示例包括:甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

[0177] 术语“卤代烷基”指烷基上的氢被一个或多个卤素取代,其中烷基如上所定义。

[0178] 术语“氘代烷基”指烷基上的氢被一个或多个氘原子取代,其中烷基如上所定义。

[0179] 术语“羟烷基”指烷基上的氢被一个或多个羟基取代,其中烷基如上所定义。

[0180] 术语“羟基”指-OH基团。

[0181] 术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

[0182] 术语“氨基”指-NH<sub>2</sub>。

[0183] 术语“硝基”指-NO<sub>2</sub>。

[0184] 术语“氰基”指-CN。

[0185] 本公开还包括各种氘化形式的式(Pc-L-Y-D)化合物。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式(Pc-

L-Y-D) 化合物。在制备氘代形式的式 (Pc-L-Y-D) 化合物时可使用市售的氘代起始物质, 或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成, 氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

[0186] “任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生, 该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如, “任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在, 该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

[0187] “取代的”指基团中的一个或多个氢原子, 优选为最多5个, 更优选为1个、2个或3个氢原子彼此独立地被取代基取代。取代基仅处在它们的可能的化学位置, 本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定(通过实验或理论)可能或不可能的取代。例如, 具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和(如烯)键的碳原子结合时可能是不稳定的。

[0188] 术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物, 以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药, 利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0189] 术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本公开抗体-药物偶联物的盐, 这类盐用于受试者时具有安全性和有效性, 且具有应有的生物活性, 本公开配体药物偶联物至少含有一个氨基, 因此可以与酸形成盐, 可药用盐的非限制性示例包括: 盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

[0190] 术语“载药量”或“平均药物载荷”是指配体-药物偶联物中每个配体上加载的细胞毒性药物平均数量, 也可以表示为药物量和抗体量的比值, 药物载量的范围可以是每个配体 (Pc) 连接0-12个, 优选1-10个细胞毒性药物。在本公开的实施方案中, 载药量表示为n, 也可称为DAR (Drug-antibody Ratio) 值, 示例性的为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10的平均值。可用常规方法如UV/可见光光谱法、质谱、ELISA试验和HPLC特征鉴定偶联反应后每个ADC分子的药物均数量。

[0191] 本公开的一个实施方式中, 细胞毒性药物通过连接单元偶联在抗体的巯基上。

[0192] 可以用以下非限制性方法控制配体-药物偶联物的载量, 包括:

[0193] (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比,

[0194] (2) 控制反应时间和温度,

[0195] (3) 选择不同的反应试剂。

[0196] 常规的药物组合物的制备见中国药典。

[0197] 术语“载体”用于本公开的药物, 是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失, 降低副作用, 提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构, 可以进行自组装, 形成各种形式的聚集体, 优选的示例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力, 同时又对膜有良好的渗透性, 可以作为优良的药物载体。

[0198] 术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物, 也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂; 半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分; 液体制剂中的防

腐剂、抗氧化剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

[0199] 术语“稀释剂”又称填充剂,其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小,而且减少主要成分的剂量偏差,改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时,需加入吸收剂吸收油性物,使保持“干燥”状态,以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

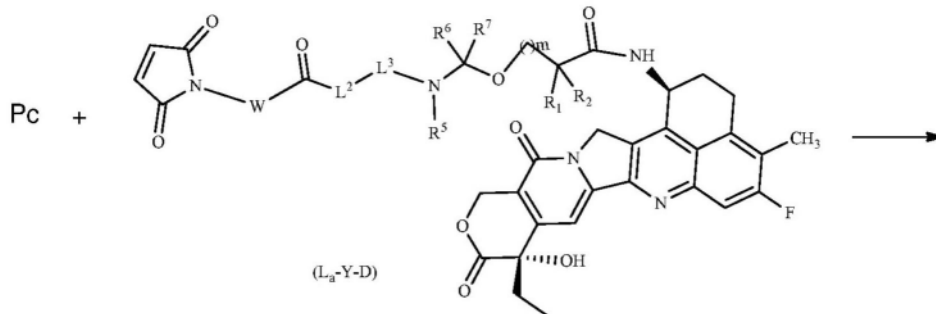
[0200] 药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射,将注射液或微乳注入受试者的血流中。或者,最好按可保持本公开化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度,可使用连续静脉内递药装置。这种装置的示例是Deltec CADD-PLUS.TM.5400型静脉注射泵。

[0201] 药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术,用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液,例如1,3-丁二醇中制备的溶液。此外,可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外,脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

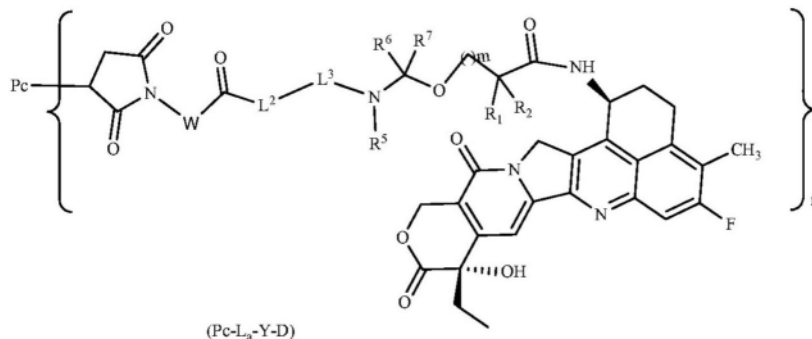
[0202] 二、合成方法

[0203] 为了完成合成目的,采用如下的合成技术方案:

[0204] 通式 (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) 所示的化合物的制备方法,其包括如下步骤:



[0205]



[0206] Pc还原后,与通式 (L<sub>a</sub>-Y-D) 偶联反应,得到通式 (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) 所示的化合物;还原剂优选TCEP,特别地,优选还原抗体上的二硫键;

[0207] 其中:

[0208]  $P_c$ 、 $W$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $m$ 和 $n$ 如前述通式( $P_c-L_a-Y-D$ )中所定义。

[0209] 在以上说明书中提出了本公开一种或多种实施方案的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本公开,但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书,本公开的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中,除非上下文中有清楚的另外指明,单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语都具有本公开所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本公开的优选实施方案。这些实施例不应以任何方式理解为限制本公开的范围,本公开的范围由权利要求书限定。

[0210] 实施例

[0211] 本发明实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见Sambrook等,分子克隆,实验室手册,冷泉港实验室;当代分子生物学方法,Ausubel等著,Greene出版协会,Wiley Interscience,NY。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0212] 一、抗体的制备

[0213] 实施例1-1:TROP-2高表达细胞株构建

[0214] 将pCDH-hTROP-2慢病毒表达载体质粒与pVSV-G,pCMV-dR8.91慢病毒系统包装载体用Lipofectamine 3000转染试剂转染至病毒包装细胞293T中,收集含有病毒的培养基上清,过滤并进行超高速离心,使用浓缩后的病毒感染中国仓鼠卵巢细胞CHO-K1,经嘌呤霉素(puromycin)筛选两至三周,再进行FACS单细胞分选。

[0215] 通过FACS检测慢病毒感染的CHO-K1细胞表面的TROP-2表达量,挑选出TROP-2表达量高的CHO-K1/hTROP-2单克隆细胞株。

[0216] TROP-2氨基酸序列(Genbank:NP\_002344.2)如下:

```
MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRC
QCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLV RPSEHALVDNDGLYDP
DCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGDL SLRCDELVRTHHILIDLR
[0217] HRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVA AVHYEQPTIQIELRQNTSQKA
AGVDVIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKF
SMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYKKVEIKELGELRKEPSL
SEQ ID NO: 1;
```

[0218] Trop2-His氨基酸序列:

```
MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRC
QCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLV RPSEHALVDNDGLYDP
DCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGDL SLRCDELVRTHHILIDLR
HRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVA AVHYEQPTIQIELRQNTSQKA
[0219] AGVDVIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKF
SMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYKKVEIKELGELRKEPSL
HHHHHH
```

SEQ ID NO: 2。

[0220] 实施例1-2:抗人TROP-2单克隆抗体的制备

[0221] 本申请中的抗人TROP-2单克隆抗体依照W003074566专利中公开的方法制备,以hRS7的抗体可变区基因为模板利用计算机软件针对CDR进行点突变改造设计。通过分子克隆插入至蛋白表达载体Phr-IgG(带信号肽及恒定区基因(CH1-Fc/CL)片段)中,在HEK293和Expi-CHO-S细胞中进行表达。按照常规方法进行抗体纯化。利用过表达huTROP-2蛋白的CHO-K1细胞和huTROP-2蛋白(His27-Thr274登录号#NP\_002344.2)进行活性验证,挑选出靶点结合活性较好的抗体,其中PD3可变区序列如下:

[0222] PD3重链可变区:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWM  
 [0223] GWINTYTGEPTYTQDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGFGS  
SYWYFDVWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 3;

[0224] PD3轻链可变区:

DIQLTQSPSSLASVSGDRVSITCKASQDVSIAWYQKPGKAPKLLIYSASYRY  
 [0225] IGVPPDRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIK

SEQ ID NO: 4;

[0226] 注:下划线部分为依照Kabat编号规则确定的CDR区。

[0227] 表1.PD3抗体的CDR区

抗体	PD3
重链CDR1	NYGMN (SEQ ID NO:5)
重链CDR2	WINTYTGEPTYTQDFKG (SEQ ID NO:6)
重链CDR3	GGFGSSYWYFDV (SEQ ID NO:7)
轻链CDR1	KASQDVSI <u>AWYQKPGKAPKLLIYSASYRY</u>
轻链CDR2	<u>SASYRYT</u>
轻链CDR3	<u>QQHYITPLT</u>

[0229] 抗体的重链恒定区可选自人IgG1、IgG2、IgG4及其变体的恒定区,轻链恒定区可选自人源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区。示例性的,抗体重链恒定区选自序列如SEQ ID NO:11所示的人IgG1,轻链恒定区选自序列如SEQ ID NO:12所示的人 $\kappa$ 链的恒定区。

[0230] 人IgG1的重链恒定区:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
 [0231] KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSPGK

SEQ ID NO: 11;

[0232] 人源 $\kappa$ 轻链恒定区:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
 [0233] SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
 SEQ ID NO: 12;

[0234] 示例性地,将上述轻链/重链恒定区与前述PD3抗体的可变区组合形成完整的抗体,其轻链/重链序列如下:

[0235] PD3重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLKWM  
 GWINTYTGEPTYTQDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGFGS  
 SYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP  
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN  
 [0236] TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV  
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV  
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13;

[0237] PD3轻链:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRY  
 TGVPDRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVA  
 [0238] APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
 QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 14;

[0239] 本公开中使用的对照分子hRS7参照专利W003074566构建,TINA抗体参照专利W02015098099A1构建,其序列分别如下:

[0240] hRS7重链:

QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYT  
 GEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWG  
 QGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK  
 [0241] SCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
 NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH  
 NHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 15;

[0242] hRS7轻链:

[0243] *DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI(A)VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP  
DRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO: 16;

[0244] TINA重链:

[0245] *QVQLVQSGAEVKKPGASVKV(S)CKASGYFTT(A)GMQWVRQAPGQGLEWMGWINTHS  
GVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQ(L)SSLKSEDTAVYYC(A)RSGFGSSYWF(D)VWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP(V)TVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV(V)TVPSSSLGTQ(T)YIC(N)VN(H)KPSNTK(V)DKKVEPKSC  
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV(T)C(V)VDVSHEDPEVKF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQ(N)NSTYRV(S)SVLT(V)LHQDWLNGKEYKCKV(S)NK  
ALPAPIEK(T)ISKAKGQPREPQ(V)YTLPPSRDELTK(N)QVSLTCLVKGF(Y)PSDIAVEWE  
SNGQPENNYK(T)TPPVLDSDGSFFLYSKLTV(D)KSRWQ(Q)GNV(F)SC(S)VMHEALHNH  
YTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO: 17;

[0246] TINA轻链:

[0247] *DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVST(A)VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP  
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO: 18。

[0248] 二、化合物的制备

[0249] 本公开实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0250] 化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或质谱(MS)来确定的。NMR的测定是用BrukerAVANCE-400核磁仪,测定溶剂为氘代二甲基亚砷(DMSO-d<sub>6</sub>)、氘代氯仿(CDCl<sub>3</sub>)、氘代甲醇(CD<sub>3</sub>OD),内标为四甲基硅烷(TMS),化学位移是以10<sup>-6</sup>(ppm)作为单位给出。

[0251] MS的测定用FINNIGAN LCQAd(ESI)质谱仪(生产商:Thermo,型号:Finnigan LCQ advantage MAX)。

[0252] UPLC的测定用Waters Acquity UPLC SQD液质联用仪。

[0253] HPLC的测定使用安捷伦1200DAD高压液相色谱仪(Sunfire C18 150×4.6mm色谱柱)和Waters 2695-2996高压液相色谱仪(Gimini C18 150×4.6mm色谱柱)。

[0254] UV-HPLC的测定使用Thermo nanodrop2000紫外分光光度计。

[0255] 增殖抑制率及IC<sub>50</sub>值的测定用PHERA starFS酶标仪(德国BMG公司)。

[0256] 薄层层析硅胶板使用烟台黄海HSGF254或青岛GF254硅胶板,薄层色谱法(TLC)使用的硅胶板采用的规格是0.15mm至0.2mm,薄层层析分离纯化产品采用的规格是0.4mm至0.5mm硅胶板。

[0257] 柱层析一般使用烟台黄海200~300目硅胶为载体。



[0258] 本公开的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成,或可购买自 ABCR GmbH&Co.KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, 韶远化学科技 (Accela ChemBio Inc)、达瑞化学品等公司。

[0259] 实施例中如无特殊说明,反应均在氩气氛或氮气气氛下进行。

[0260] 氩气氛或氮气气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氩气或氮气气球。

[0261] 氢气气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氢气气球。

[0262] 加压氢化反应使用Parr 3916EKX型氢化仪和清蓝QL-500型氢气发生器或HC2-SS型氢化仪。

[0263] 氢化反应通常抽真空,充入氢气,反复操作3次。

[0264] 微波反应使用CEM Discover-S 908860型微波反应器。

[0265] 实施例中如无特殊说明,反应中的溶液是指水溶液。

[0266] 实施例中如无特殊说明,反应的温度为室温。

[0267] 室温为最适宜的反应温度,温度范围是20℃至30℃。

[0268] 实施例中pH=6.5的PBS缓冲液的配制:取 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  8.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  8.56g, NaCl 5.85g, EDTA 1.5g置于瓶中,定容至2L,超声波使其全部溶解,摇匀即得。

[0269] 纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂的体系包括:A:二氯甲烷和异丙醇体系,B:二氯甲烷和甲醇体系,C:石油醚和乙酸乙酯体系,溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节,也可以加入少量的三乙胺和酸性或碱性试剂等进行调节。

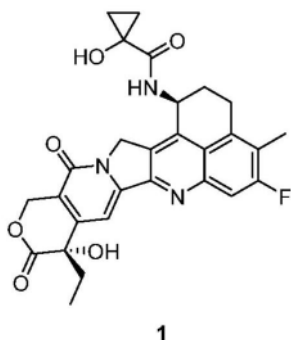
[0270] 本公开部分化合物是通过Q-TOF LC/MS来表征的。Q-TOF LC/MS使用安捷伦6530精确质量数四级杆-飞行时间质谱仪和安捷伦1290-Infinity超高效液相色谱仪(安捷伦 Poroshell 300SB-C8 5 $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 75mm色谱柱)。

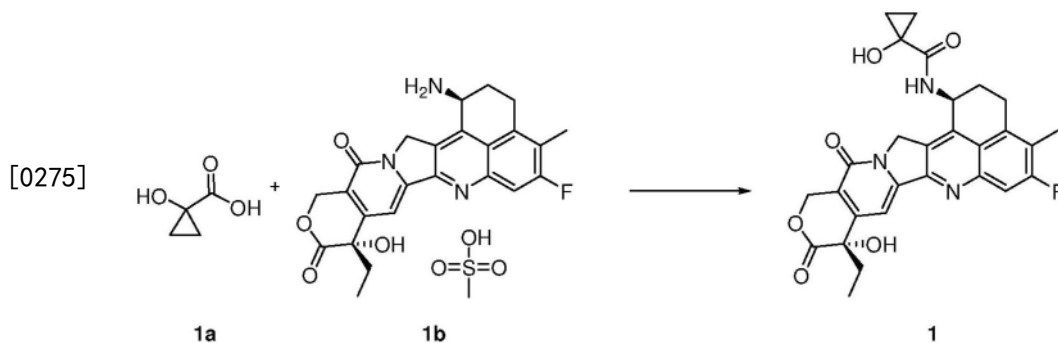
[0271] 本公开抗体-药物偶联物的Y-D药物部分参见PCT/CN2019/107873,相关的化合物合成及测试引用至本专利。其中的非限制性实施例合成引用如下:

[0272] 实施例2-1

[0273] N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-羟基环丙烷-1-甲酰胺1

[0274]





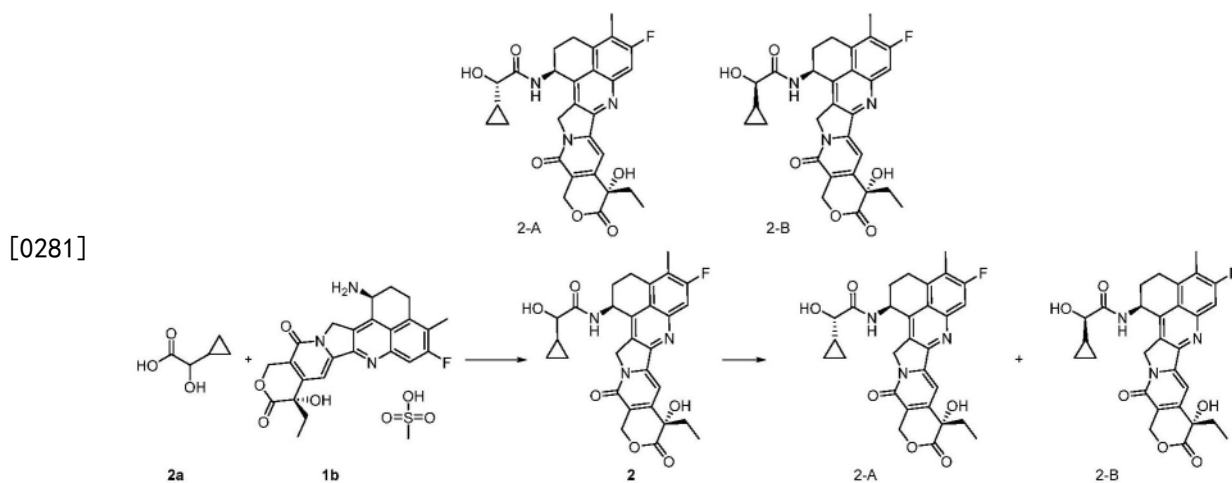
[0276] 向依喜替康甲磺酸盐1b(2.0mg, 3.76 $\mu$ mol, 采用专利申请“EP0737686A1”公开的方法制备而得)中添加1mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5 $^{\circ}$ C,滴加一滴三乙胺,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-羟基环丙基甲酸1a(1.4mg, 3.7 $\mu$ mol, 采用公知的方法“Tetrahedron Letters, 25(12), 1269-72; 1984”制备而得)和4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(3.8mg, 13.7 $\mu$ mol),加毕,在0-5 $^{\circ}$ C搅拌反应2小时。向反应液中加入5mL水淬灭反应,用乙酸乙酯(8mL $\times$ 3)萃取反应液,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(5mL $\times$ 2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物1(1.6mg, 产率:82.1%)。

[0277] MS m/z (ESI): 520.2 [M+1]

[0278]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 7.90-7.84 (m, 1H), 7.80-7.68 (m, 1H), 5.80-5.70 (m, 1H), 5.62-5.54 (m, 2H), 5.44-5.32 (m, 2H), 5.28-5.10 (m, 2H), 3.40-3.15 (m, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.23 (t, 1H), 2.06-1.75 (m, 2H), 1.68-1.56 (m, 1H), 1.22-1.18 (m, 2H), 1.04-0.98 (m, 2H), 0.89 (t, 3H)。

[0279] 实施例2-2

[0280] (S)-2-环丙基-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶啉并[1,2-b]喹啉-1-基)-2-羟基乙酰胺2-A(R)-2-环丙基-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶啉并[1,2-b]喹啉-1-基)-2-羟基乙酰胺2-B



[0282] 向1b(4mg, 7.53 $\mu$ mol)中加入2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴冷却至0-5 $^{\circ}$ C,滴加0.3mL N-甲基吗啉,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入

2-环丙基-2-羟基乙酸2a (2.3mg, 19.8 $\mu$ mol, 采用专利申请“W02013106717”公开的方法制备而得)、1-羟基苯并三唑 (3mg, 22.4 $\mu$ mol) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (4.3mg, 22.4 $\mu$ mol), 加毕, 在0-5 $^{\circ}$ C搅拌反应1小时。撤去冰水浴, 加热至30 $^{\circ}$ C搅拌2小时。反应液减压浓缩, 所得到的粗品化合物2用高效液相色谱法纯化 (分离条件: 色谱柱: XBridge Prep C18 OBD5 $\mu$ m 19\*250nm; 流动相: A-水 (10mmol NH<sub>4</sub>OAc), B-乙腈, 梯度洗脱, 流速: 18mL/min), 收集其相应组分, 减压浓缩, 得到标题产物 (2-A: 1.5mg, 2-B: 1.5mg)。

[0283] MS m/z (ESI): 534.0 [M+1]。

[0284] 单一构型化合物2-B (较短保留时间)

[0285] UPLC分析: 保留时间1.06分钟, 纯度: 88% (色谱柱: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 $\mu$ m 2.1\*50mm, 流动相: A-水 (5mmol NH<sub>4</sub>OAc), B-乙腈)。

[0286] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ 8.37 (d, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.58-5.56 (m, 1H), 5.48 (d, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.32-5.29 (m, 2H), 3.60 (t, 1H), 3.19-3.13 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.20-2.14 (m, 1H), 1.98 (q, 2H), 1.87-1.83 (m, 1H), 1.50-1.40 (m, 1H), 1.34-1.28 (m, 1H), 0.86 (t, 3H), 0.50-0.39 (m, 4H)。

[0287] 单一构型化合物2-A (较长保留时间)

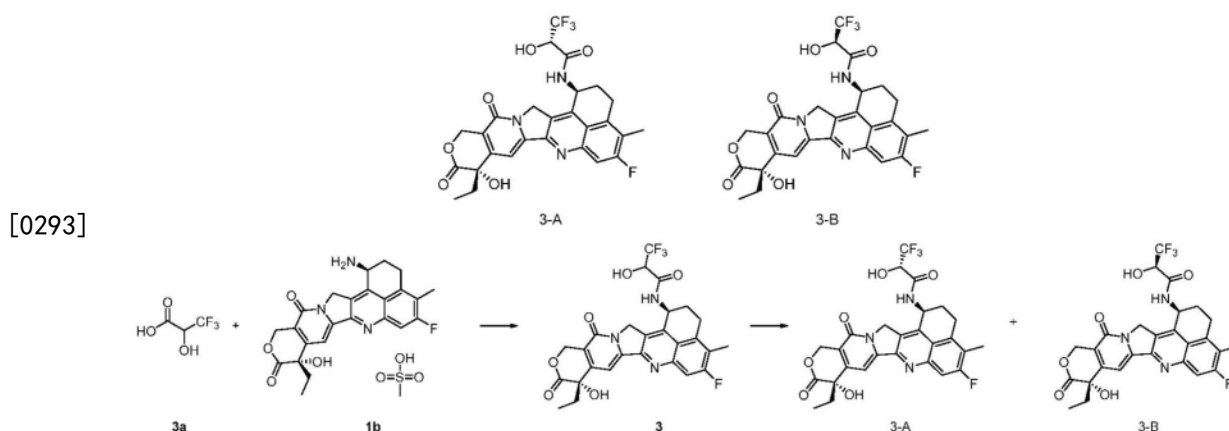
[0288] UPLC分析: 保留时间1.10分钟, 纯度: 86% (色谱柱: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 $\mu$ m 2.1\*50mm, 流动相: A-水 (5mmol NH<sub>4</sub>OAc), B-乙腈)。

[0289] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ 8.35 (d, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.58-5.53 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.37 (d, 1H), 5.32 (t, 1H), 3.62 (t, 1H), 3.20-3.15 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.25-2.16 (m, 1H), 1.98 (q, 2H), 1.87-1.82 (m, 1H), 1.50-1.40 (m, 1H), 1.21-1.14 (m, 1H), 0.87 (t, 3H), 0.47-0.35 (m, 4H)。

[0290] 实施例2-3

[0291] (S)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)-3,3,3-三氟-2-羟基丙酰胺3-A

[0292] (R)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)-3,3,3-三氟-2-羟基丙酰胺3-B



[0294] 向1b (5.0mg, 9.41 $\mu$ mol) 中添加2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺, 冰水浴冷却至0-5 $^{\circ}$ C, 滴加0.3mL N-甲基吗啡啉, 搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入3,3,3-三

氟-2-羟基丙酸3a (4.1mg, 28.4 $\mu$ mol, 供应商Alfa)、1-羟基苯并三唑 (3.8mg, 28.1 $\mu$ mol) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (5.4mg, 28.2 $\mu$ mol), 加毕, 在0-5 $^{\circ}$ C搅拌反应10分钟。撤去冰水浴, 加热至30 $^{\circ}$ C搅拌8小时。反应液减压浓缩, 所得到的粗品化合物3用高效液相色谱法纯化(分离条件: 色谱柱: XBridge Prep C18 OBD 5 $\mu$ m 19\*250mm; 流动相: A-水 (10mmol NH<sub>4</sub>OAc): B-乙腈, 梯度洗脱, 流速: 18mL/min), 收集其相应组分, 减压浓缩, 得到标题产物 (1.5mg, 1.5mg)。

[0295] MS m/z (ESI): 561.9 [M+1]。

[0296] 单一构型化合物 (较短保留时间)

[0297] UPLC分析: 保留时间1.11分钟, 纯度: 88% (色谱柱: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 $\mu$ m 2.1\*50mm, 流动相: A-水 (5mmol NH<sub>4</sub>OAc), B-乙腈)。

[0298] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ 8.94 (d, 1H), 7.80 (d, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.20 (d, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.61-5.55 (m, 1H), 5.45-5.23 (m, 3H), 5.15-5.06 (m, 1H), 4.66-4.57 (m, 1H), 3.18-3.12 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.26-2.20 (m, 1H), 2.16-2.08 (m, 1H), 2.02-1.94 (m, 1H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.50-1.40 (m, 1H), 0.87 (t, 3H)。

[0299] 单一构型化合物 (较长保留时间)

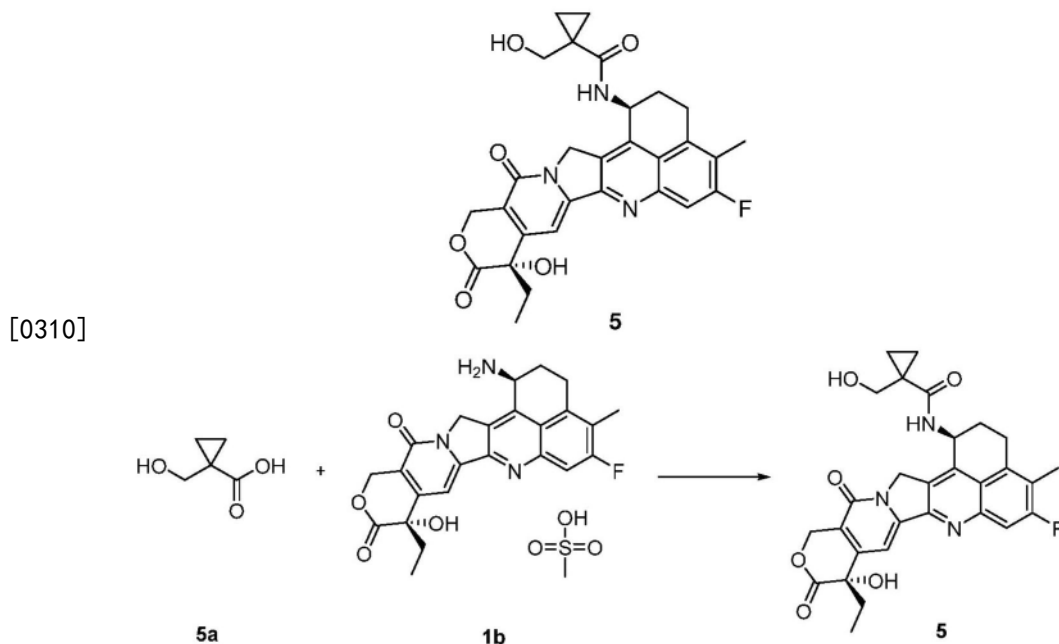
[0300] UPLC分析: 保留时间1.19分钟, 纯度: 90% (色谱柱: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 $\mu$ m 2.1\*50mm, 流动相: A-水 (5mmol NH<sub>4</sub>OAc), B-乙腈)。

[0301] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ 8.97 (d, 1H), 7.80 (d, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.16 (d, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.63-5.55 (m, 1H), 5.45-5.20 (m, 3H), 5.16-5.07 (m, 1H), 4.66-4.57 (m, 1H), 3.18-3.12 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.22-2.14 (m, 1H), 2.04-1.95 (m, 2H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.50-1.40 (m, 1H), 0.87 (t, 3H)。

[0302] 实施例2-4

[0303] N-((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10, 13-二氧代-2, 3, 9, 10, 13, 15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4': 6, 7]吲哚啉并[1, 2-b]喹啉-1-基)-1-羟基环戊烷-1-甲酰胺4





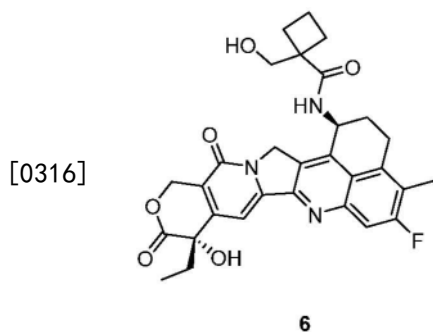
[0311] 向1b(2.0mg, 3.76 $\mu$ mol)中添加1mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5 $^{\circ}$ C,滴加一滴三乙胺,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-(羟甲基)-环戊烷甲酸5a(0.87mg, 7.5 $\mu$ mol,采用专利申请“W0201396771”公开的方法制备而得)和4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(2mg, 7.24 $\mu$ mol),加毕,在0-5 $^{\circ}$ C搅拌反应2小时。向反应液中加入5mL水淬灭反应,用乙酸乙酯(8mL $\times$ 3)萃取反应液,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(5mL $\times$ 2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物5(1.0mg,产率:50%)。

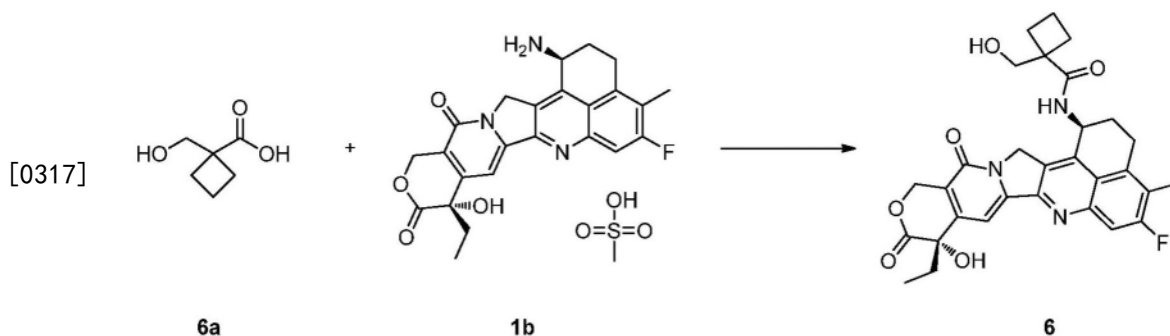
[0312] MS m/z (ESI): 533.9 [M+1]。

[0313]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.07 (s, 1H), 7.23-7.18 (m, 2H), 6.71-6.64 (m, 1H), 6.55-6.51 (m, 1H), 5.36-5.27 (m, 2H), 4.67-4.61 (m, 2H), 3.53-3.48 (m, 1H), 3.30-3.22 (m, 2H), 3.18-3.13 (m, 1H), 2.71-2.61 (m, 2H), 2.35-2.28 (m, 1H), 2.04-1.91 (m, 4H), 1.53-1.40 (m, 3H), 0.91-0.75 (m, 4H)。

[0314] 实施例2-6

[0315] N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-(羟基甲基)环丁烷-1-甲酰胺6





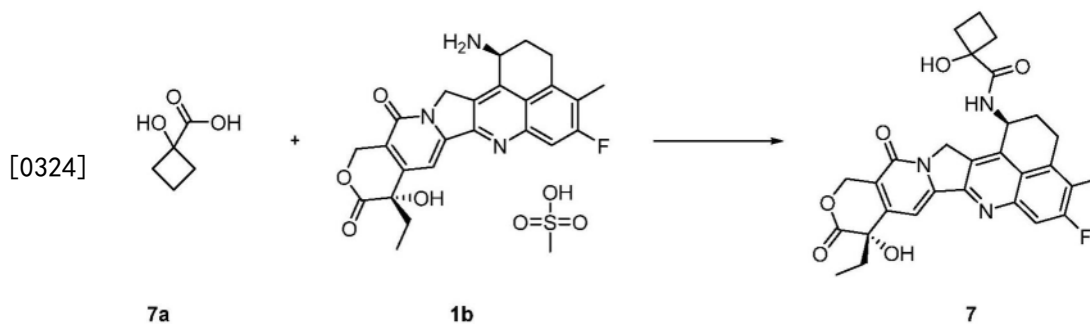
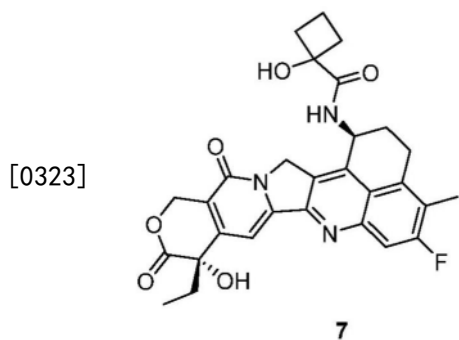
[0318] 向1b(3.0mg, 5.64 $\mu$ mol)中添加1mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5 $^{\circ}$ C,滴加一滴三乙胺,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-(羟基甲基)环丁烷-1-甲酸6a(2.2mg, 16.9 $\mu$ mol;采用文献“Journal of the American Chemical Society, 2014, vol.136, #22, p.8138-8142”公开的方法制备而得)和4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(4.7mg, 16.9 $\mu$ mol),加毕,在0-5 $^{\circ}$ C搅拌反应1小时。向反应液中加入5mL水淬灭反应,用乙酸乙酯(10mL $\times$ 3)萃取反应液,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(5mL $\times$ 2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物6(2.1mg, 产率:67.9%)。

[0319] MS m/z (ESI): 548.0 [M+1]。

[0320]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ 7.85-7.62 (m, 1H), 6.88 (br, 1H), 5.87-5.48 (m, 2H), 5.47-5.33 (m, 1H), 5.31-5.06 (m, 1H), 4.25-3.91 (m, 2H), 3.25 (br, 1H), 2.60-2.32 (m, 3H), 2.23 (t, 1H), 2.15-1.95 (m, 3H), 1.70-1.56 (m, 2H), 1.41-1.17 (m, 9H), 1.03 (s, 1H), 0.95-0.80 (m, 2H)。

[0321] 实施例2-7

[0322] N-((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-羟基环丁烷-1-甲酰胺7



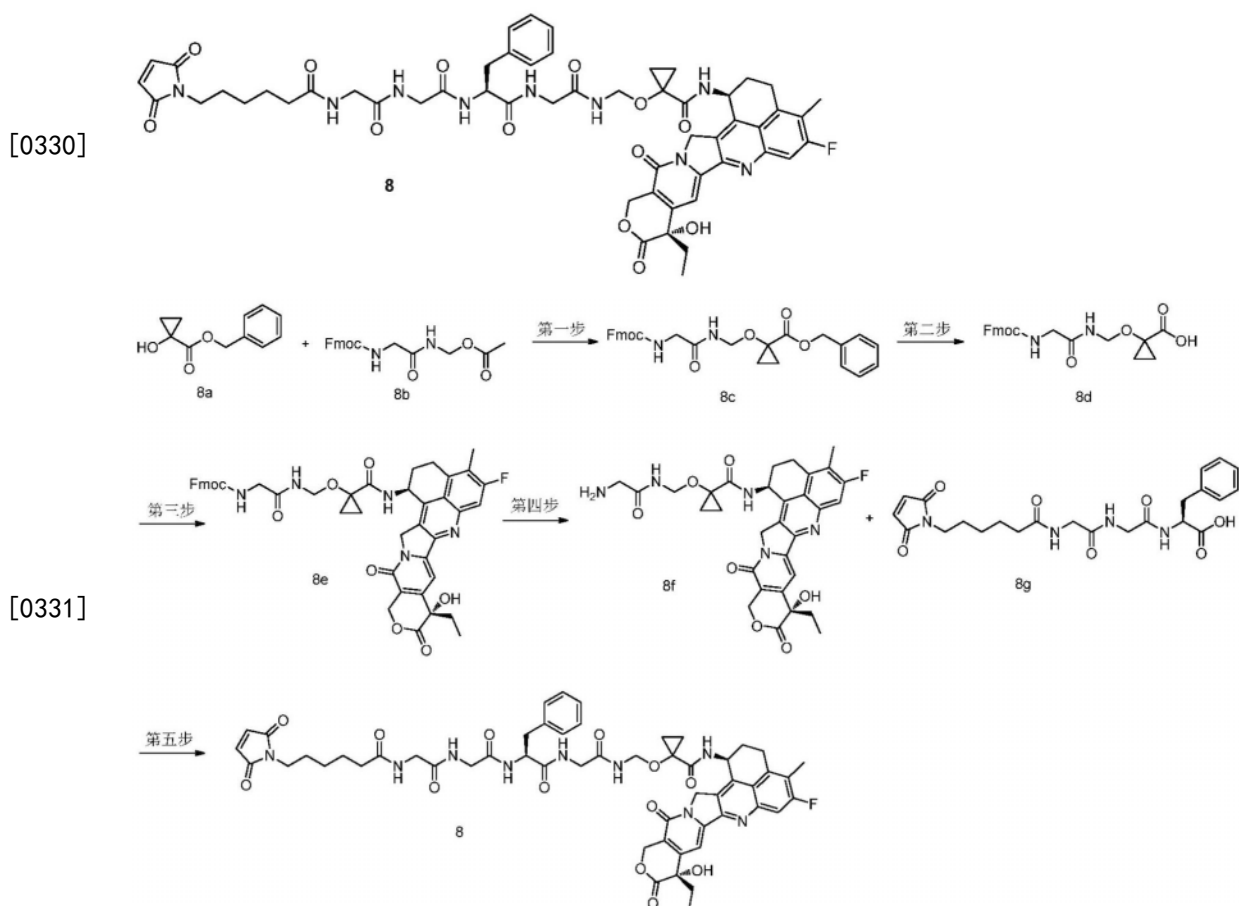
[0325] 向1b(3.0mg, 5.64 $\mu$ mol)中添加2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5 $^{\circ}$ C,滴加0.3mL N-甲基吗啡啉,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-羟基环丁烷甲酸7a(2.0mg, 17.22 $\mu$ mol, 供应商药石), 1-羟基苯并三唑(2.3mg, 17.0 $\mu$ mol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(3.2mg, 16.7 $\mu$ mol),加毕,在0-5 $^{\circ}$ C搅拌反应10分钟。撤去冰水浴,常温搅拌2小时。反应液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物7(2.5mg, 产率:83.1%)。

[0326] MS m/z (ESI): 534.0 [M+1]。

[0327]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ 8.28 (d, 1H), 7.75 (d, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.59-5.51 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.20-5.01 (m, 2H), 3.27-3.17 (m, 1H), 3.15-3.05 (m, 1H), 2.71-2.63 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.12-2.05 (m, 1H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.92-1.78 (m, 4H), 1.50-1.42 (m, 1H), 0.90-0.83 (m, 4H)。

[0328] 实施例2-8

[0329] 1-(((S)-7-苄基-20-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3,6,9,12,15-五氧代-2,5,8,11,14-五氮杂二十烷基)氧基)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶啉并[1,2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺8



[0332] 第一步

[0333] 1-((2-(((9H-苻-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲氧基)环丙烷-1-羧酸苄酯8c



[0334] 将1-羟基环丙烷-1-羧酸苄酯8a (104mg, 0.54mmol; 采用专利申请“US2005/20645”公开的方法制备而得) 和2-(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯8b (100mg, 0.27mmol; 采用专利申请“CN105829346A”公开的方法制备而得) 加入反应瓶, 加入5mL四氢呋喃, 氩气置换三次, 冰水浴降温至0-5℃, 加入叔丁醇钾(61mg, 0.54mmol), 撤去冰浴, 升至室温搅拌10分钟, 加入20mL冰水, 用乙酸乙酯(5mL×2)和氯仿(5mL×5)萃取, 合并有机相并浓缩。所得残余物溶于3mL 1,4-二氧六环中, 加入0.6mL水, 加入碳酸氢钠(27mg, 0.32mmol)和氯甲酸-9-苄甲酯(70mg, 0.27mmol), 室温搅拌1小时。加入20mL水, 用乙酸乙酯(8mL×3)萃取, 有机相用饱和氯化钠溶液(20mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 用硅胶柱色谱法以展开剂体系B纯化所得残余物, 得到标题产物8c (100mg, 产率: 73.6%)。

[0335] MS m/z (ESI): 501.0 [M+1]。

[0336] 第二步

[0337] 1-((2-(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲氧基)环丙烷-1-羧酸8d

[0338] 将8c (50mg, 0.10mmol) 溶于3mL四氢呋喃和乙酸乙酯(V:V=2:1)混合溶剂中, 加入钯碳(25mg, 含量10%), 氢气置换三次, 室温搅拌反应1小时。反应液用硅藻土过滤, 滤饼用四氢呋喃淋洗, 滤液浓缩, 得到标题产物8d (41mg, 产率: 100%)。

[0339] MS m/z (ESI): 411.0 [M+1]。

[0340] 第三步

[0341] (9H-苄-9-基)甲基(2-(((1-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10, 13-二氧代-2, 3, 9, 10, 13, 15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4': 6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-1-基)氨基)羰基)环丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯8e

[0342] 将1b (7mg, 0.013mmol) 加入反应瓶, 加入1mL N,N-二甲基甲酰胺, 氩气置换三次, 冰水浴降温至0-5℃, 滴加一滴三乙胺, 加入8d (7mg, 0.017mmol) 的0.5mL N,N-二甲基甲酰胺溶液, 加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(7mg, 0.026mmol), 冰浴搅拌反应35分钟。加入10mL水, 用乙酸乙酯(5mL×3)萃取, 有机相用饱和氯化钠溶液(10mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物, 得到标题产物8e (8.5mg, 产率78.0%)。

[0343] MS m/z (ESI): 828.0 [M+1]。

[0344] 第四步

[0345] 1-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-N-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10, 13-二氧代-2, 3, 9, 10, 13, 15-六氢-1H, 12H-苯并[de]吡喃并[3', 4': 6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺8f

[0346] 将8e (4mg, 4.84μmol) 溶于0.2mL二氯甲烷中, 加入0.1mL二乙胺, 室温搅拌2小时。反应液减压浓缩, 加入2mL甲苯减压浓缩, 重复两次, 加入3mL正己烷打浆, 倾出上层正己烷, 重复三次, 减压浓缩得到粗品标题产物8f (2.9mg), 产品不经纯化直接用于下一步反应。

[0347] MS m/z (ESI): 606.0 [M+1]。

[0348] 第五步

[0349] 1-(((S)-7-苄基-20-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3,6,9,12,15-五氧代-2,5,8,11,14-五氮杂二十烷基)氧基)-N-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,

13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺8

[0350] 将粗品8f (2.9mg, 4.84 $\mu$ mol)溶于0.5mL N,N-二甲基甲酰胺,氙气置换三次,冰水浴降温至0-5 $^{\circ}$ C,加入(S)-2-(2-(2-(6-(2,5-二氧代-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)乙酰氨基)乙酰氨基)-3-苯基丙酸8g (2.7mg, 5.80 $\mu$ mol,采用专利申请“EP2907824”公开的方法制备而得)的0.3mL N,N-二甲基甲酰胺溶液,加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(2.7mg, 9.67 $\mu$ mol),冰浴搅拌反应30分钟,撤去冰浴,升至室温搅拌15分钟。反应液进行高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5 $\mu$ m 19\*250mm;流动相:A-水(10mmol NH<sub>4</sub>OAc):B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓缩得到标题产物8(2mg,产率:39.0%)。

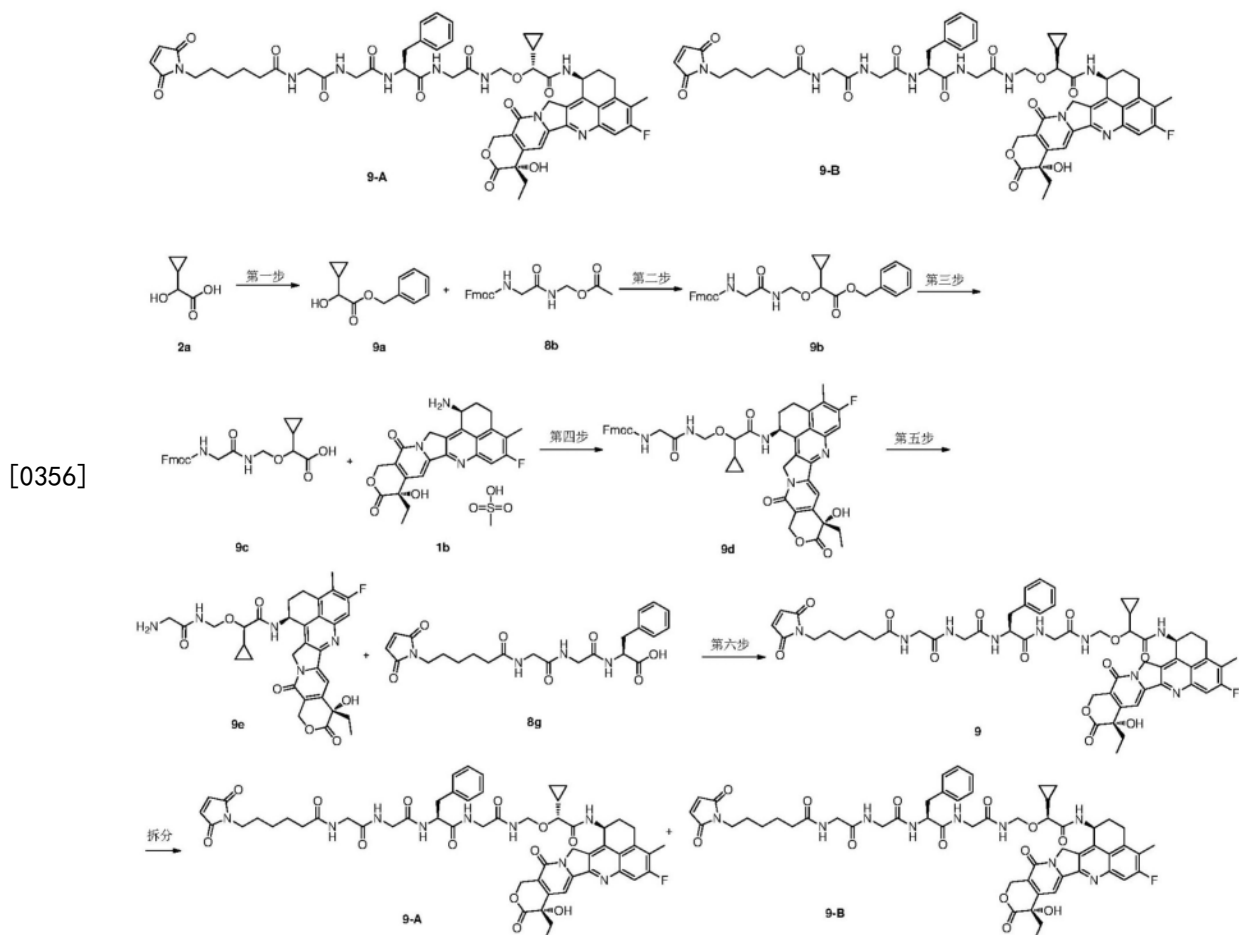
[0351] MS m/z (ESI): 1060.0 [M+1]。

[0352] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ 9.01 (d, 1H), 8.77 (t, 1H), 8.21 (t, 1H), 8.08-7.92 (m, 2H), 7.73 (d, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.24-7.07 (m, 4H), 6.98 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.61 (q, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.32 (t, 1H), 5.12 (q, 2H), 4.62 (t, 1H), 4.52 (t, 1H), 4.40-4.32 (m, 1H), 3.73-3.47 (m, 8H), 3.16-3.04 (m, 2H), 2.89 (dd, 1H), 2.69-2.55 (m, 2H), 2.37-2.23 (m, 4H), 2.12-1.93 (m, 4H), 1.90-1.74 (m, 2H), 1.52-1.38 (m, 4H), 1.33-1.11 (m, 5H), 0.91-0.81 (m, 4H)。

[0353] 实施例2-9

[0354] N-((2R,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺9-A

[0355] N-((2S,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺9-B



[0365] 10-环丙基-1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧化-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸9c

[0366] 将9b(20mg, 0.038mmol)溶于4.5mL四氢呋喃和乙酸乙酯(V:V=2:1)混合溶剂中,加入钨碳(12mg, 含量10%, 干型), 氩气置换三次, 室温搅拌反应1小时。反应液用硅藻土过滤, 滤饼用乙酸乙酯淋洗, 滤液浓缩, 得到粗品标题产物9c(13mg), 产品不经纯化直接进行下一步反应。

[0367] MS m/z(ESI): 424.9[M+1]。

[0368] 第四步

[0369] (9H-芴-9-基)甲基(2-(((1-环丙基-2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯9d

[0370] 将1b(10mg, 18.8 $\mu$ mol)加入反应瓶, 加入1mL N,N-二甲基甲酰胺, 氩气置换三次, 冰水浴降温至0-5 $^{\circ}$ C, 滴加一滴三乙胺, 加入粗品9c(13mg, 30.6 $\mu$ mol), 加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(16.9mg, 61.2 $\mu$ mol), 冰浴搅拌反应40分钟。加入10mL水, 用乙酸乙酯(10mL $\times$ 3)萃取, 合并有机相。有机相用饱和氯化钠溶液(10mL $\times$ 2)洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩。用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物, 得到标题产物9d(19mg, 产率: 73.6%)。

[0371] MS m/z(ESI): 842.1[M+1]。

[0372] 第五步

[0373] 2-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-2-环丙基-N-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)乙酰胺)9e

[0374] 将9d(19mg, 22.6 $\mu$ mol)溶于2mL二氯甲烷中, 加入1mL二乙胺, 室温搅拌2小时。反应液减压浓缩, 加入1mL甲苯并减压浓缩, 重复两次。往残余物中加入3mL正己烷打浆, 静置后倾倒入上层清液, 保留固体。将固体残余物减压浓缩, 油泵拉干得到粗品标题产物9e(17mg), 产品不经纯化直接用于下一步反应。

[0375] MS m/z(ESI): 638.0[M+18]。

[0376] 第六步

[0377] N-(((2R,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺9-A

[0378] N-(((2S,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺9-B

[0379] 将粗品9e(13.9mg, 22.4 $\mu$ mol)溶于0.6mL N,N-二甲基甲酰胺, 氩气置换三次, 冰水浴降温至0-5 $^{\circ}$ C, 加入8g(21.2mg, 44.8 $\mu$ mol)的0.3mLN,N-二甲基甲酰胺溶液, 加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(18.5mg, 67.3 $\mu$ mol), 冰浴搅拌反应10分钟, 撤去冰浴, 升至室温搅拌1小时, 反应生成化合物9。反应液进行高效液相色谱法纯化(分

离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5um 19\*250mm;流动相:A-水(10mmol NH<sub>4</sub>OAc):B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min,收集其相应组分,减压浓缩,得到标题产物(9-A:2.4mg, 9-B:1.7mg)。

[0380] MS m/z (ESI): 1074.4 [M+1]。

[0381] 单一构型化合物9-A (较短保留时间):

[0382] UPLC分析:保留时间1.14分钟,纯度:85% (色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1\*50mm,流动相:A-水(5mmol NH<sub>4</sub>OAc),B-乙腈)。

[0383] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ8.60 (t, 1H), 8.51-8.49 (d, 1H), 8.32-8.24 (m, 1H), 8.13-8.02 (m, 2H), 8.02-7.96 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26-7.15 (m, 4H), 6.99 (s, 1H), 6.55-6.48 (m, 1H), 5.65-5.54 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.35-5.15 (m, 3H), 4.74-4.62 (m, 1H), 4.54-4.40 (m, 2H), 3.76-3.64 (m, 4H), 3.62-3.48 (m, 2H), 3.20-3.07 (m, 2H), 3.04-2.94 (m, 1H), 2.80-2.62 (m, 1H), 2.45-2.30 (m, 3H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 2H), 1.93-1.78 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 3H), 1.34-1.12 (m, 5H), 0.87 (t, 3H), 0.64-0.38 (m, 4H)。

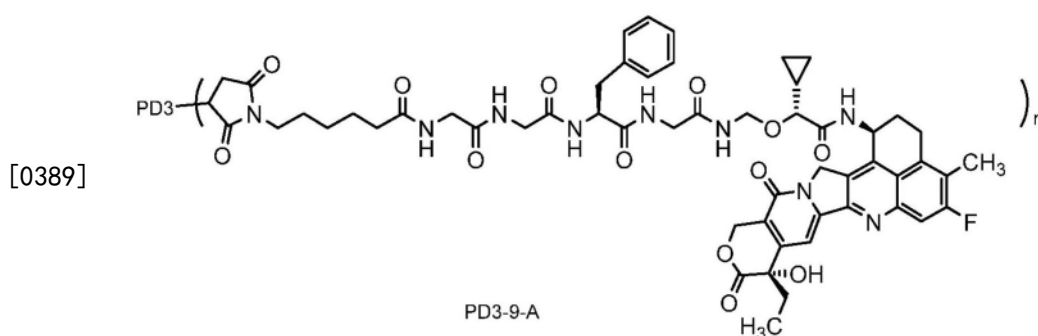
[0384] 单一构型化合物9-B (较长保留时间):

[0385] UPLC分析:保留时间1.16分钟,纯度:89% (色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1\*50mm,流动相:A-水(5mmol NH<sub>4</sub>OAc),B-乙腈)。

[0386] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ8.68-8.60 (m, 1H), 8.58-8.50 (m, 1H), 8.32-8.24 (m, 1H), 8.13-8.02 (m, 2H), 8.02-7.94 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26-7.13 (m, 3H), 6.99 (s, 1H), 6.55-6.48 (m, 1H), 5.60-5.50 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.35-5.15 (m, 2H), 4.78-4.68 (m, 1H), 4.60-4.40 (m, 2H), 3.76-3.58 (m, 4H), 3.58-3.48 (m, 1H), 3.20-3.10 (m, 2H), 3.08-2.97 (m, 2H), 2.80-2.72 (m, 2H), 2.45-2.30 (m, 3H), 2.25-2.13 (m, 2H), 2.13-2.04 (m, 2H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.91-1.78 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 3H), 1.34-1.12 (m, 4H), 0.91-0.79 (m, 3H), 0.53-0.34 (m, 4H)。

[0387] 三、ADC的制备

[0388] 实施例3-1 ADC-1



[0390] 在37℃条件下,向抗体PD3的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液; 10.0mg/mL, 4.0mL, 270nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM, 67.5μL, 675nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0391] 将化合物9-A(2.9mg, 2700nmol)溶解于180μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯

化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到如式PD3-9-A所示的示例性产物ADC-1的PBS缓冲液(1.93mg/mL,18.4mL),于4℃储存。

[0392] UV-Vis计算平均值:n=3.77。

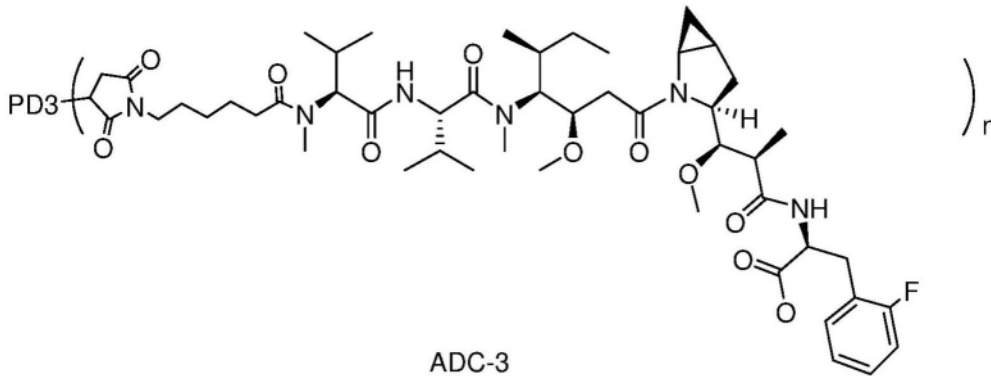
[0393] 实施例3-2 ADC-2

[0394] 在37℃条件下,向抗体PD3的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,4.0mL,270nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,143.1μL,1431nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0395] 将化合物9-A(4.35mg,4050nmol)溶解于270μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到式PD3-9-A所示的示例性产物ADC-2的PBS缓冲液(1.69mg/mL,17.8mL),于4℃储存。

[0396] UV-Vis计算平均值:n=6.59。

[0397] 实施例3-3 ADC-3

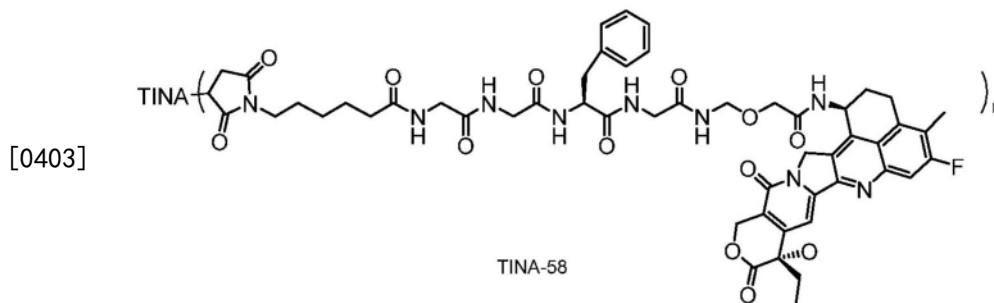


[0399] 在37℃条件下,向抗体PD3的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,0.3mL,20.3nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,5.1μL,51nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0400] 将化合物12h(0.194mg,203nmol,化合物的制备参照W02017063509)溶解于20μL乙腈中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到含标题产物ADC-3的PBS缓冲液(4.3mg/mL,0.6mL),于4℃储存。

[0401] UV-Vis计算平均值:n=4.14。

[0402] 实施例3-4 ADC-4



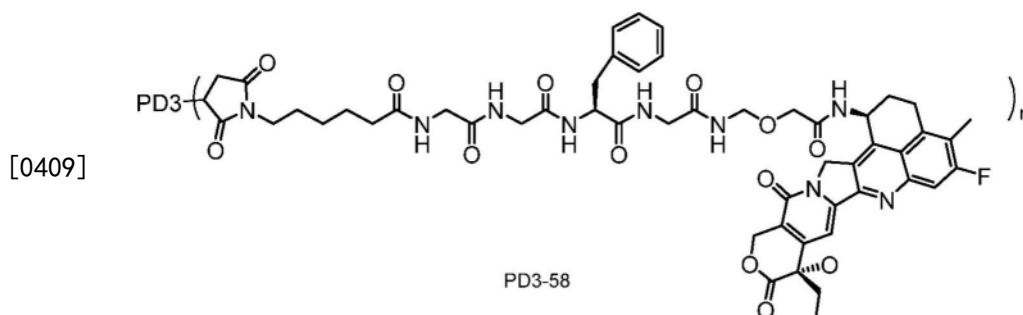
[0404] 其合成过程参照W02015098099实施例19。

[0405] 在37℃条件下,向抗体TINA的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液; 10.0mg/mL, 2.0mL, 135.4nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM, 33.8μL, 338nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0406] 将化合物58(1.4mg, 1354nmol)溶解于70μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到式TINA-58所示的示例性标题产物ADC-4的PBS缓冲液(1.13mg/mL, 15.1mL),于4℃储存。

[0407] UV-Vis计算平均值:n=3.99。

[0408] 实施例3-5 ADC-5

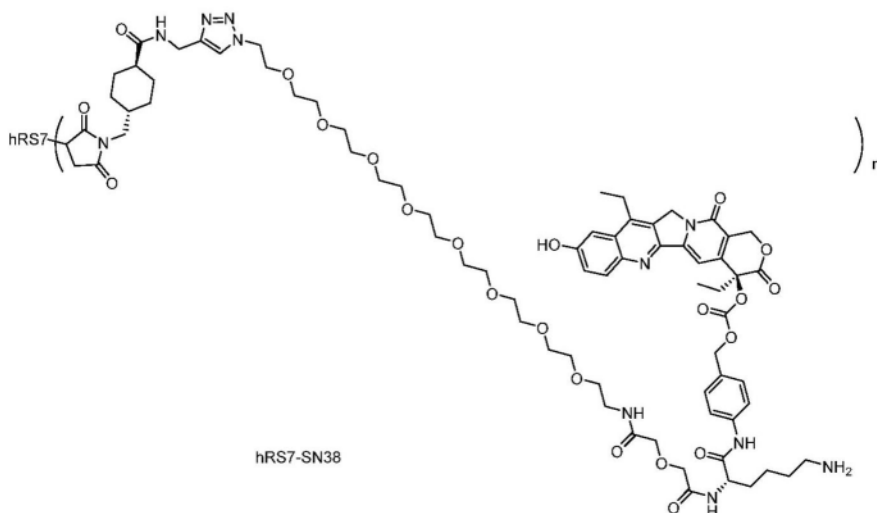


[0410] 在37℃条件下,向抗体PD3的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液; 10.0mg/mL, 1.5mL, 101.4nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM, 25.3μL, 253nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0411] 将化合物58(1.05mg, 1014nmol, 参照专利“CN104755494A中第163页的实施例58)溶解于60μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液),得到式PD3-58所示的示例性标题产物ADC-5的PBS缓冲液(0.82mg/mL, 13.5mL),于4℃储存。

[0412] UV-Vis计算平均值:n=3.88。

[0413] 实施例3-6 ADC-6



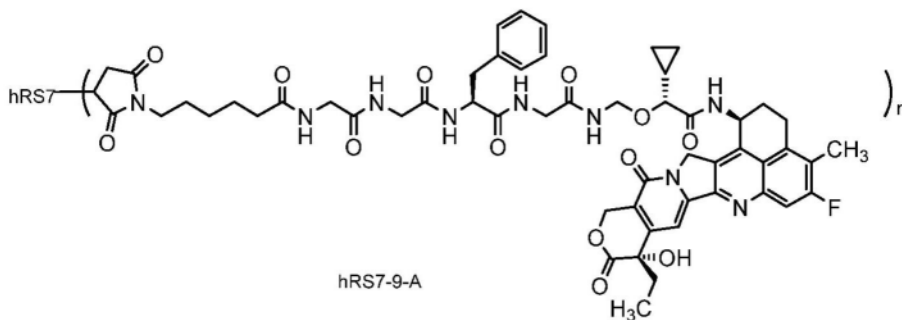
[0414]

[0415] 在37℃条件下,向抗体hRS7的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液; 10.0mg/mL, 1.4mL, 94.60nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM, 50.1μL, 501nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0416] 将化合物SN38(参照专利CN105407891A第59页实施例1合成, 2.1mg, 1419nmol)溶解于50μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液),得到式hRS7-SN38所示的示例性标题产物ADC-6的PBS缓冲液(1.03mg/mL, 11.5mL),于4℃储存。

[0417] CE-SDS计算平均值:n=7.56。

[0418] 实施例3-7 ADC-7



[0419]

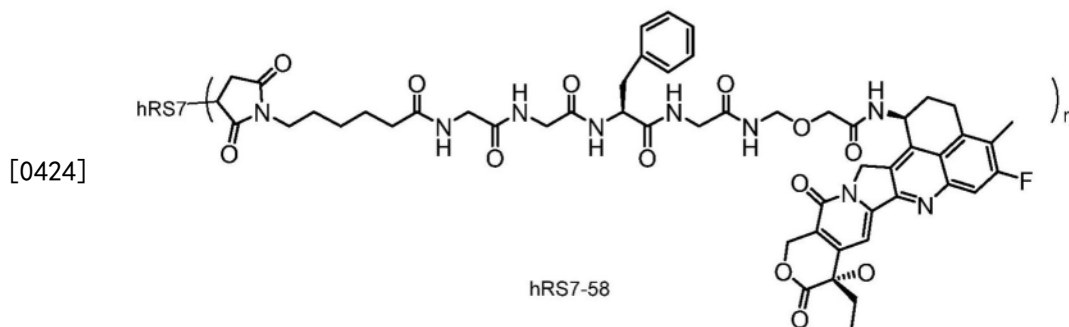
[0420] 在37℃条件下,向抗体hRS7的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液; 10.0mg/mL, 2.18mL, 147.3nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM, 36.8μL, 368nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0421] 将化合物9-A(1.58mg, 1471nmol)溶解于100μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液),得到式hRS7-9-A所示的示例性标题产物ADC-7的PBS缓冲液(1.10mg/mL, 16.4mL),于4℃储存。

[0422] UV-Vis计算平均值:n=3.72。

[0423] 实施例3-8 ADC-8



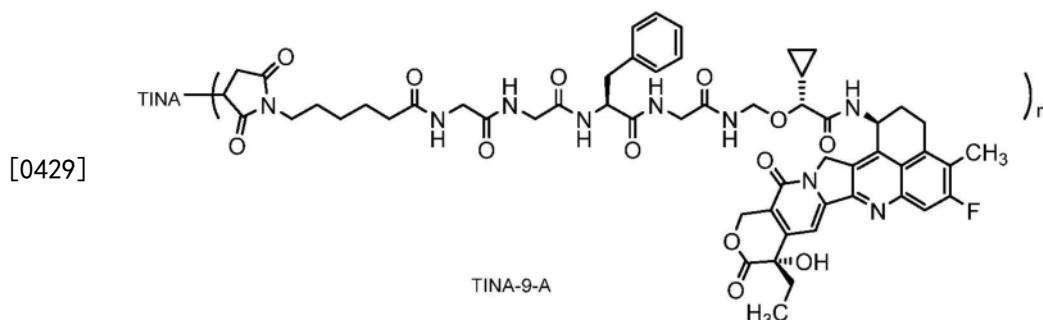


[0425] 在37℃条件下,向抗体hRS7的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液; 10.0mg/mL, 2.18mL, 147.3nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM, 36.8μL, 368nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0426] 将化合物58(1.52mg, 1473nmol, 参照专利“CN104755494A中第163页的实施例58)溶解于100μLDMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液),得到式hRS7-58所示的示例性标题产物ADC-8的PBS缓冲液(1.02mg/mL, 16.8mL),于4℃储存。

[0427] UV-Vis计算平均值:n=3.93。

[0428] 实施例3-9 ADC-9



[0430] 在37℃条件下,向抗体TINA的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液; 10.0mg/mL, 0.95mL, 64.2nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM, 16.0μL, 160nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0431] 将化合物9-A(0.69mg, 642nmol)溶解于30μLDMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液),得到式TINA-9-A所示的示例性标题产物ADC-9的PBS缓冲液(0.99mg/mL, 7.0mL),于4℃储存。

[0432] UV-Vis计算平均值:n=3.99。

[0433] ADC原液药物载量分析

[0434] ADC是一种抗体交联物类药物,其治疗疾病的机理是依赖抗体的靶向性将毒素分子运送到细胞中,进而将细胞杀死。药物的载量对药效起着决定性的作用。

[0435] 一、UV-Vis计算方法

[0436] 使用紫外法对ADC原液的药物载量进行测定。

[0437] 实验方法

[0438] 将装有琥珀酸钠缓冲液的比色皿分别置于参比吸收池和样品测定吸收池中后,扣除溶剂空白后,再将装有供试品溶液的比色皿置于样品测定吸收池中,测定280nm和370nm处吸光度。

[0439] 结果计算

[0440] 采用紫外分光光度法(使用仪器:Thermo nanodrop2000紫外分光光度计)测定ADC原液载量,其原理是在某波长下ADC原液的总吸光值等于细胞毒性药物与单克隆抗体在该波长下吸光值的加和,即:

$$[0441] \quad (1) A_{280\text{nm}} = \epsilon_{\text{mab}-280} b C_{\text{mab}} + \epsilon_{\text{Drug}-280} b C_{\text{Drug}}$$

[0442]  $\epsilon_{\text{Drug}-280}$ : 药物在280nm平均摩尔消光系数5100;

[0443]  $C_{\text{Drug}}$ : 药物的浓度;

[0444]  $\epsilon_{\text{mab}-280}$ : 单抗原液在280nm平均摩尔消光系数214600;

[0445]  $C_{\text{mab}}$ : 单抗原液的浓度;

[0446] b: 光程长度为1cm。

[0447] 同理可以得到样品在370nm下的总吸光值方程:

$$[0448] \quad (2) A_{370\text{nm}} = \epsilon_{\text{mab}-370} b C_{\text{mab}} + \epsilon_{\text{Drug}-370} b C_{\text{Drug}}$$

[0449]  $\epsilon_{\text{Drug}-370}$ : 药物在370nm平均摩尔消光系数19000;

[0450]  $C_{\text{Drug}}$ : 药物的浓度;

[0451]  $\epsilon_{\text{mab}-370}$ : 单抗原液在370nm消光系数为0;

[0452]  $C_{\text{mab}}$ : 单抗原液的浓度;

[0453] b: 光程长度为1cm。

[0454] 由(1)和(2)方程结合单克隆抗体和药物在两个检测波长下的消光系数和浓度数据可以计算出药物的载量。

[0455] 药物载量 =  $C_{\text{Drug}}/C_{\text{mab}}$ 。

[0456] 二、CE-SDS计算方法

[0457] 试剂和仪器

[0458] SDS-Mw Analysis Kit: Beckman生产, 货号390953, 该试剂盒中包含SDS-MW凝胶分离缓冲液、SDS-MW样品缓冲液、酸性清洗液(0.1mol/L盐酸溶液)、碱性清洗液(0.1mol/L氢氧化钠溶液)、内标物质(10kDa)。也可采用北京博思雅生化技术研究院生产的SDS试剂盒, 货号BSYK018, 该试剂盒中包含CE-SDS凝胶缓冲液、CE-SDS样品缓冲液。

[0459] 烷基化溶液(0.25mol/L碘乙酰胺溶液): 称取约0.046g碘乙酰胺, 加入1mL超纯水溶解混匀, 可于2-8℃避光保存7天。

[0460] 毛细管电泳仪: SCIEX公司PA800plus。

[0461] 毛细管: 非涂层熔融石英毛细管(内径50 $\mu\text{m}$ ), 切割至总长为30.2cm, 高分辨率方法有效分离长度为20cm。

[0462] 供试品溶液制备

[0463] 用SDS样品缓冲液将供试品稀释至1mg/mL。取供试品溶液(1mg/mL) 95 $\mu\text{L}$ , 加入0.8mol/L碘乙酰胺水溶液5 $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀。取空白对照95 $\mu\text{L}$ , 加入0.8mol/L碘乙酰胺水溶液5

$\mu\text{L}$ , 涡旋混匀, 从样品管中分别取出75 $\mu\text{L}$ 至样品瓶中, 立即进行分析。

[0464] 测定方法

[0465] 1) 毛细管的预处理: 0.1mol/L氢氧化钠溶液在60psi压力下冲洗3分钟, 然后用0.1mol/L盐酸溶液在60psi压力下冲洗2分钟, 最后用纯水在70psi压力下冲洗1分钟。每次运行前应进行。

[0466] 2) 毛细管的预填充: SDS凝胶分离缓冲液在50psi压力下冲洗15分钟。每次运行前应进行。

[0467] 样品进样: 10kV反相极性电动进样, 还原样品进样20秒。

[0468] 分离: 15kV下运行40分钟, 反相极性。

[0469] 样品室温度: 18至25 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0470] 毛细管温度: 18至25 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0471] 结果分析

[0472] 基于抗体中打开的二硫键游离出的巯基都偶联上相应的药物, 用Beckman软件对数据进行分析, 以重链、非糖基化重链和轻链等校正峰面积分别占所有校正峰面积计算。根据公式:  $\text{DAR} = [4 * \text{重链 (H) 峰面积} + 2 * \text{半抗 (H-L) 峰面积} + 4 * \text{双重链 (H-H) 峰面积} + 2 * \text{重重轻链 (H-H-L) 峰面积}] / [\text{重链 (H) 峰面积} / 2 + \text{半抗 (H-L) 峰面积} / 2 + \text{双重链 (H-H) 峰面积} + \text{重重轻链 (H-H-L) 峰面积} + \text{全抗峰面积}]$ , 最终计算出该ADC的加权平均值。

[0473] 以下用生化测试方法验证本公开的抗体的活性

[0474] 测试例1: 抗体蛋白水平结合实验

[0475] 用pH7.4的PBS (源培生物, B320) 缓冲液将hTROP-2蛋白稀释至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 以100 $\mu\text{L}$ /孔的体积加入96孔酶标板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。弃去液体后, 每孔加入300 $\mu\text{L}$ 用PBS稀释的5%脱脂牛奶 (BD, 232100) 进行封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2小时。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用PBST缓冲液 (PH7.4 PBS含0.1% tween-20) 洗板3次后, 每孔加入100 $\mu\text{L}$ 梯度稀释的抗体溶液, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时。孵育结束后用PBST洗板3次, 每孔加入100 $\mu\text{L}$ 鼠抗-人IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 209-035-088, 1:8000稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时。用PBST洗板3次后, 每孔加入100 $\mu\text{L}$ TMB显色底物 (KPL, 5120-0077), 室温孵育10-15分钟, 每孔加入50 $\mu\text{L}$  1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 用酶标仪读取在450nm处的吸收值, 用软件拟合出抗体与抗原的结合曲线, 计算出 $\text{EC}_{50}$ 值。抗体与蛋白的结合活性见表2。

[0476] 表2. 抗体蛋白水平结合活性

[0477]

抗体	PD3	hRS7	TINA
$\text{E}_{\text{max}}$ (OD值)	1.40	1.37	1.39
$\text{EC}_{50}$ (nM)	13.6	18.29	16.14

[0478] 结果显示, 本申请中的PD3抗体与hTROP-2蛋白具有较高的结合活性。

[0479] 测试例2: 抗体细胞水平结合实验

[0480] 将稳转TROP-2的CHOK1细胞用FACS缓冲液 (2%胎牛血清 (Gibco, 10099141) pH7.4 PBS (Sigma, P4417-100TAB)) 制备成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液, 100 $\mu\text{L}$ /孔加入96孔圆底板中。离心去除上清后加入50 $\mu\text{L}$ /孔用FACS缓冲液稀释的不同浓度待测抗体, 放于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光孵育1小时。以FACS缓冲液300g离心洗涤3次后, 加入工作浓度的Alexa Fluor 488羊抗-人IgG (H+L) (invitrogen, A-11013), 放于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光孵育40分钟。以FACS缓冲液300g离心洗

涤3次后,在BD FACSCantoII流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度(MFI),计算抗体对稳转表达TROP-2的细胞的结合 $EC_{50}$ 值。抗体与细胞的结合活性见图1与表3。

[0481] 表3. 抗体细胞水平结合活性

[0482]	抗体	PD3	hRS7	TINA
	$E_{max}$ (MFI)	16693	16050	14217
	$EC_{50}$ (nM)	1.57	2.31	3.55

[0483] 结果显示,本申请中的PD3抗体与表达TROP-2蛋白的细胞具有较高的结合活性。

[0484] 测试例3: 抗体内吞实验

[0485] 本实验的目的是根据DT3C蛋白进入细胞后,活化的DT对细胞进行杀伤,间接反映了抗TROP-2抗体的内吞情况。根据 $EC_{50}$ 和 $E_{max}$ 来评价抗体的体外内吞活性。

[0486] DT3C是重组表达的融合蛋白,由白喉毒素的片段A(仅毒素部分)和G群链球菌的3C片段(IgG结合部分)融合而成,该蛋白能够与抗体的IgG部分高度亲和,在抗体发生内吞时一同进入细胞,在胞内弗林蛋白酶的作用下,释放出具有毒性的DT,DT能够抑制EF2-ADP核糖基化的活性,阻断蛋白翻译过程,最终导致细胞死亡。而未进入细胞的DT3C则不具有杀伤细胞的活性。根据细胞杀伤情况来评价抗体的内吞活性。

[0487] 用含20%低IgG FBS的新鲜细胞培养基制备细胞悬液,细胞密度为 $2 \times 10^4$ 细胞/mL,以 $50 \mu\text{L}$ /孔加入细胞培养板中,5%二氧化碳 $37^\circ\text{C}$ 培养16小时。用无血清培养基配制 $4 \times$ 浓度的DT3C, $0.22 \mu\text{m}$ 小过滤器过滤成无菌溶液。用无血清培养基配制 $4 \times$ 浓度的抗体,将 $80 \mu\text{L}$  DT3C和 $80 \mu\text{L}$ 抗体按照1:1的体积混匀,室温下静置孵育30分钟。取 $50 \mu\text{L}$ 稀释好的抗体-DT3C混合物加入 $50 \mu\text{L}$ 的细胞中,培养箱中孵育三天。每孔加入 $50 \mu\text{L}$  CTG,室温下避光孵育10分钟,Victor3上读取化学发光。抗体的内吞活性见表4。

[0488] 表4. 抗体内吞活性

[0489]	抗体	PD3	hRS7	TINA
	$E_{max}$	99.1%	98.5%	98.7%
	$EC_{50}$ (nM)	0.15	0.18	0.18

[0490] 结果显示,本申请中的PD3抗体有较高的内吞效率。

[0491] 测试例4: 抗体亲和力测定

[0492] 抗体对TROP-2亲和力的检测,采用捕获抗体的形式。用偶联有抗-人IgG抗体(Cat.#BR-1008-39, Lot.#10260416, GE)的Protein A(Cat.#29127556, GE)生物传感芯片亲和捕获抗体,然后于芯片表面流经抗原hTROP-2,用Biacore T200仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后,用再生缓冲液Glycine1.5(Cat#BR100354, GE)或 $3\text{M MgCl}_2$ (来自Human antibody capture kit, Cat.#BR100839, GE)将芯片洗净再生。实验结束后用GE Biacore T200 Evaluation version 3.0软件以(1:1) Langmuir模型拟合数据,得出亲和力数值。抗体与蛋白的亲和力见表5。

[0493] 表5. Biacore测定的抗体的亲和力

[0494]	抗体	PD3	hRS7	TINA
	KD (M)	$6.86\text{E}-10$	$9.87\text{E}-10$	$2.15\text{E}-8$

[0495] 结果显示,本申请中的PD3抗体与hTROP-2的亲和力较高。

[0496] 测试例5:ADC分子细胞活性实验

[0497] 该实验中使用的细胞如下:FaDu(++++) 购于ATCC,货号HTB-43<sup>TM</sup>;HCC827(+++) ,购于ATCC,货号CRL-2868;Colo205(++),购于中科院细胞库,货号:TCHu102;DMS53(++),购于ATCC,货号:CRL-2062<sup>TM</sup>;SK-OV-3(+),购于ATCC,货号:HTB-77;CHO-K1(-),购于ATCC,货号:CCL-61<sup>TM</sup>。其中“+”表示细胞汇总TROP-2的表达量,“+”越多,表示TROP-2的表达量越高,“-”表示不表达TROP-2。

[0498] 用含10%FBS的新鲜细胞培养基制取细胞悬液,密度为3703细胞/mL,以每孔135 $\mu$ L加入到96孔细胞培养板中,5%二氧化碳37 $^{\circ}$ C 16小时培养。ADC样品用PBS配制成5 $\mu$ M。以此为浓度,用PBS五倍稀释,共8个浓度。每孔加入15 $\mu$ L的上述ADC溶液。5%二氧化碳37 $^{\circ}$ C培养6天。每孔加入70 $\mu$ L CTG,室温下避光孵育10分钟,Victor3上读取化学发光利用GraphPad Prism软件进行数据分析。

[0499] 结果显示ADC-1有较强的细胞杀伤效果,而且杀伤效果与肿瘤细胞表面TROP-2表达水平正向相关。

[0500] 表6-1.ADC对不同TROP-2表达量细胞的杀伤活性

样品	FaDu		HCC827		Colo205		DMS53		SK-OV-3		CHO-K1	
	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)
ADC-1	0.23	100.42	0.14	89.64	39.23	99.38	42.46	89.39	NA	61.91	NA	9.31
ADC-4	0.53	101.25	0.27	88.16	59.8	99.66	75.58	89.83	NA	49.15	NA	1.71
ADC-7	0.31	100.75	0.18	89.33	52.75	99.52	72.92	88.74	NA	66.11	NA	8.69

[0502] 按照上述方法进行第二次平行比较实验,获得如下结果:

[0503] 表6-2.ADC对不同TROP-2表达量细胞的杀伤活性

样品	FaDu		HCC827		Colo205		DMS53	
	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)
ADC-1	0.08	101.6	0.06	89.57	12.07	100.34	15.08	93.24
ADC-5	0.14	101.58	0.13	88.23	25.63	99.64	25.71	92.47

[0505] 测试例6:旁观杀伤活性实验

[0506] BxPC3(人胰腺癌细胞,ATCC,CRL-1687)和MiaPaCa2细胞(人胰腺癌细胞,biocytogen,B-HCL-014)分别用RPMI 1640+10%FBS和DMEM/高葡萄糖+10%FBS培养,细胞用胰酶消化,新鲜培养基中和,1000rpm离心3分钟,弃上清,细胞用RPMI 1640+10%FBS重悬。细胞计数后,将BxPC3细胞密度调整为 $6 \times 10^4$ 个/mL,将MiaPaCa2-luc细胞密度调整为 $1.5 \times 10^4$ 个/mL。12孔板板1中每孔加入500 $\mu$ L的BxPC3细胞和500 $\mu$ L的MiaPaCa2-luc细胞。12孔板板2中加入500 $\mu$ L的MiaPaCa2-luc细胞和500 $\mu$ L的含10%FBS血清的RPMI 1640培养液。5%二氧化碳37 $^{\circ}$ C培养24小时。

[0507] ADC样品配制成40 $\times$ 浓度的中间溶液(0.2 $\mu$ M)。各取25 $\mu$ L上述样品加入到12孔板相应孔中。设置溶剂对照组。5%二氧化碳37 $^{\circ}$ C培养6天。12孔板中的细胞用胰酶消化,新鲜培养基中和,1000rpm离心3分钟,弃上清,用1mL的FACS缓冲液(PBS+2.5%FBS)重悬,取20 $\mu$ L的细胞加入20 $\mu$ L的台盼蓝,计数。板1的细胞,1000rpm离心3分钟,弃上清,用100 $\mu$ L的FACS Buffer重悬,加入2 $\mu$ L的TROP-2(EGP-1)单克隆抗体(MR54),冰上孵育30分钟。4 $^{\circ}$ C,2000rpm

离心1分钟,弃去上清,加入150 $\mu$ L FACS缓冲液重悬细胞。用BD FACSVerse检测。用Flowjo 7.6分析数据。旁观杀伤活性实验结果见图2。

[0508] 结果显示,本公开中的ADC-1有明确的旁观杀伤效果,ADC并不会杀伤TROP-2阴性的MiaPaCa2细胞,但将表达TROP-2的BxPC3细胞与阴性细胞MiaPaCa2混合后,ADC-1对TROP-2阴性的细胞也有杀伤作用。

[0509] 体内活性生物学评价

[0510] 测试例7:Fadu细胞CDX小鼠模型体内药效评价

[0511] 将Fadu细胞( $3 \times 10^6$ 个)接种于Ba1b/c裸鼠右肋部皮下,接种10天后,待肿瘤体积在 $\sim 245\text{mm}^3$ 后去除体重、肿瘤过大和过小的,按肿瘤体积将小鼠随机分为5组,每组8只。

[0512] ADC腹腔注射,于0天和第8天共给药2次,每只按体重注射10g/0.1mL,给药量1mg/kg。每周测量2次瘤体积和体重,记录数据,共记录21天。

[0513] 使用Excel统计软件记录数据:平均值以avg计算;SD值以STDEV计算;SEM值以STDEV/SQRT(每组动物数)计算;采用GraphPad Prism软件作图,采用Two-way ANOVA或One-way ANOVA对数据进行统计学分析。

[0514] 肿瘤体积(V)计算公式为: $V = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$

[0515] 相对肿瘤增殖率T/C(%) =  $(T - T_0) / (C - C_0) \times 100$ ,其中T、C为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积; $T_0$ 、 $C_0$ 为实验开始时的肿瘤体积。

[0516] 抑瘤率TGI(%) =  $1 - T/C$ (%)。

[0517] 结果见表7和图3,表明在1mpk剂量下,ADC-1对FaDu移植瘤有较强的抑瘤效果。

[0518] 表7.ADC对荷瘤裸鼠FaDu移植瘤的疗效

分组	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		抑瘤率 TGI (%)
	D0	SEM	D21	SEM	
空白对照	246.8	29.04	2245.04	275.14	N/A
ADC-4 1mg/kg	244.41	29.62	1180.96	193.55	53
ADC-1 1mg/kg	251.19	23.45	238.54	107.62	101
ADC-2 1mg/kg	270.48	21.36	0	0	114
PD3 30mg/kg	246.02	25	2407.37	207.71	-8

[0520] 测试例8:SKOV3细胞CDX小鼠模型体内药效评价

[0521] 将SKOV3细胞( $5 \times 10^6$ 个)接种于Ba1b/c裸鼠右肋部皮下,接种23天后,待肿瘤体积在约180mm<sup>3</sup>后去除体重、肿瘤过大和过小的,按肿瘤体积将小鼠随机分为5组,每组8只。

[0522] ADC腹腔注射,共给药2次,每只按体重注射10g/0.1mL,给药量见下表。每周测量2次瘤体积和体重,记录数据。使用Excel统计软件记录数据:平均值以avg计算;SD值以STDEV计算;SEM值以STDEV/SQRT(每组动物数)计算;采用GraphPad Prism软件作图,采用双因素ANOVA或单因素ANOVA对数据进行统计学分析。

[0523] 肿瘤体积(V)计算公式为: $V = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$

[0524] 相对肿瘤增殖率T/C(%) =  $(T - T_0) / (C - C_0) \times 100$ ,其中T、C为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积; $T_0$ 、 $C_0$ 为实验开始时的肿瘤体积。

[0525] 抑瘤率TGI(%) =  $1 - T/C$ (%)。

[0526] 结果显示见表8和图4,在不同剂量下,ADC-1对SKOV3移植瘤有较强的抑瘤效果,同时抑瘤效果有剂量依赖效应。

[0527] 效果有剂量依赖效应。

[0528] 表8.ADC对荷瘤裸鼠SKOV3移植瘤的疗效

分组	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		抑瘤率 TGI (%)
	D0	SEM	D21	SEM	
空白对照	183.26	7.6	1081.36	132.88	N/A
ADC-110mg/kg	185.48	9.62	302.93	39.34	87
ADC-1 3mg/kg	185.09	10.07	519.9	38.93	63
ADC-1 1mg/kg	183.29	8.87	795.34	124.81	32
ADC-4 10mg/kg	183.83	8.9	938.99	148.98	16
ADC-4 3mg/kg	184.17	8.2	873.38	50.84	23
ADC-4 1mg/kg	185.17	8.38	1110.52	159.73	-3
PD3 30mg/kg	182.85	8.38	1384.28	93.87	-34

[0531] 测试例9:Colo205细胞CDX小鼠模型体内药效评价

[0532] 将Colo205细胞( $5 \times 10^6$ 个)接种于Balb/c裸鼠右肋部皮下,接种10天后,待肿瘤体积在 $\sim 245\text{mm}^3$ 后去除体重、肿瘤过大和过小的,按肿瘤体积将小鼠随机分为6组,每组8只。

[0533] ADC腹腔注射,于第0天(D0)和第10天共给药2次,每只按体重注射10g/0.1mL,给药量10mg/kg。每周测量2次瘤体积和体重,记录数据,共记录28天(D28)。

[0534] 使用Excel统计软件记录数据:平均值以avg计算;SD值以STDEV计算;SEM值以STDEV/SQRT(每组动物数)计算;采用GraphPad Prism软件作图,采用双因素ANOVA单因素ANOVA对数据进行统计学分析。

[0535] 肿瘤体积(V)计算公式为: $V = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$

[0536] 相对肿瘤增殖率T/C(%) =  $(T - T_0) / (C - C_0) \times 100$ ,其中T、C为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积; $T_0$ 、 $C_0$ 为实验开始时的肿瘤体积。

[0537] 抑瘤率TGI(%) =  $1 - T/C$ (%)。

[0538] 结果见表9和图5,表明在1mpk剂量下,偶联有化合物9-A的ADC-9和ADC-7对Colo205移植瘤有较强的抑瘤效果。

[0539] 表9.ADC对荷瘤裸鼠FaDu移植瘤的疗效

分组	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		抑瘤率 TGI (%)
	D0	SEM	D28	SEM	
空白对照	210.30	24.91	1355.56	117.46	N/A
ADC-6 10mg/kg	194.93	26.56	1344.84	95.93	0
ADC-7 10mg/kg	194.64	21.03	35.13	12.80	<b>113</b>
ADC-8 10mg/kg	199.09	23.41	475.66	175.24	76
ADC-9 10mg/kg	206.70	21.21	99.86	32.55	<b>109</b>
ADC-4 10mg/kg	201.52	27.85	513.83	118.53	73

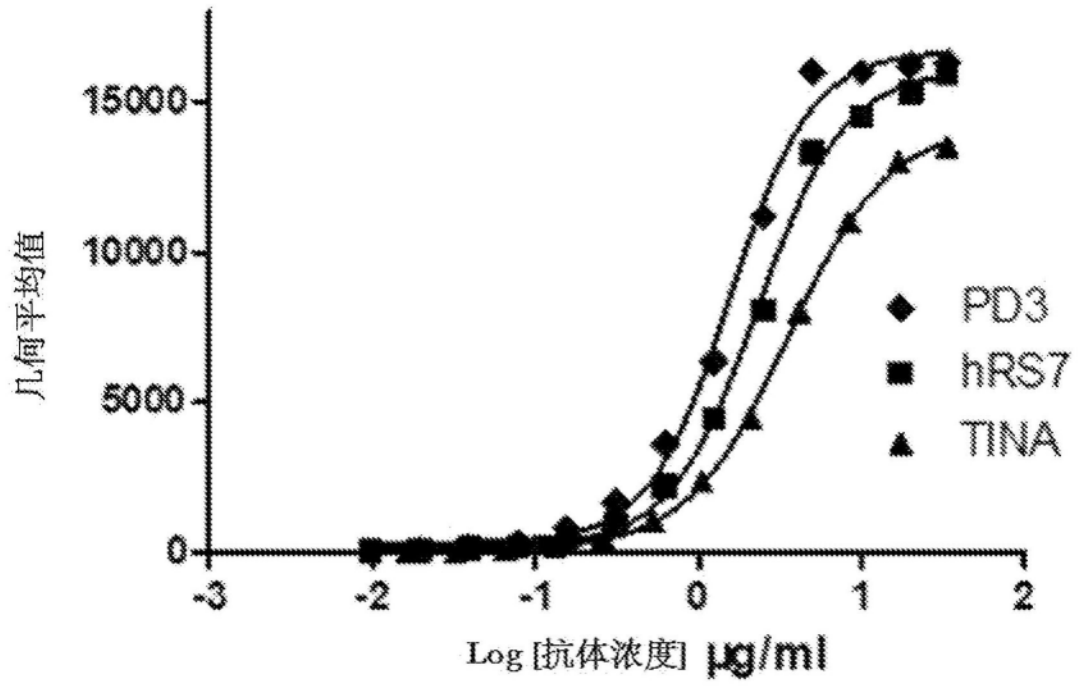


图1

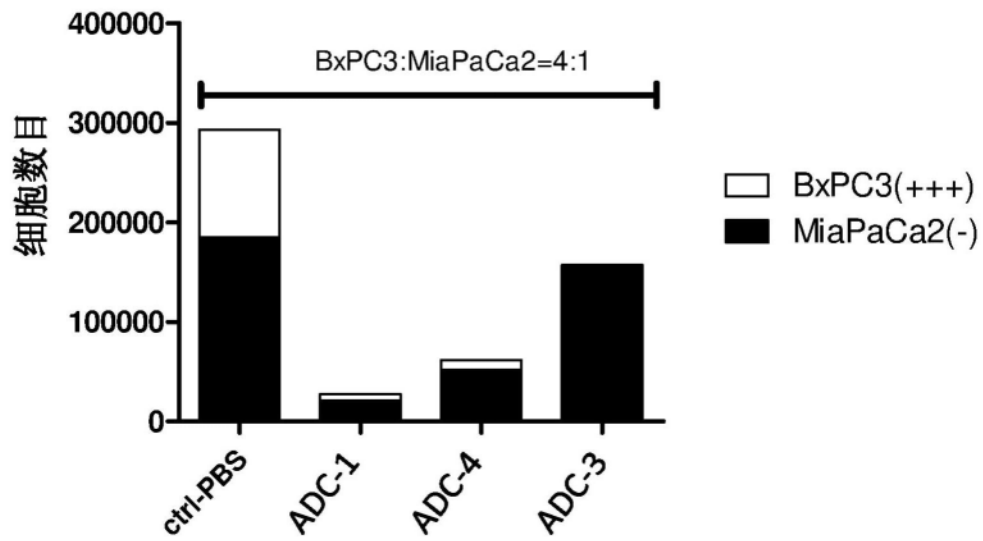
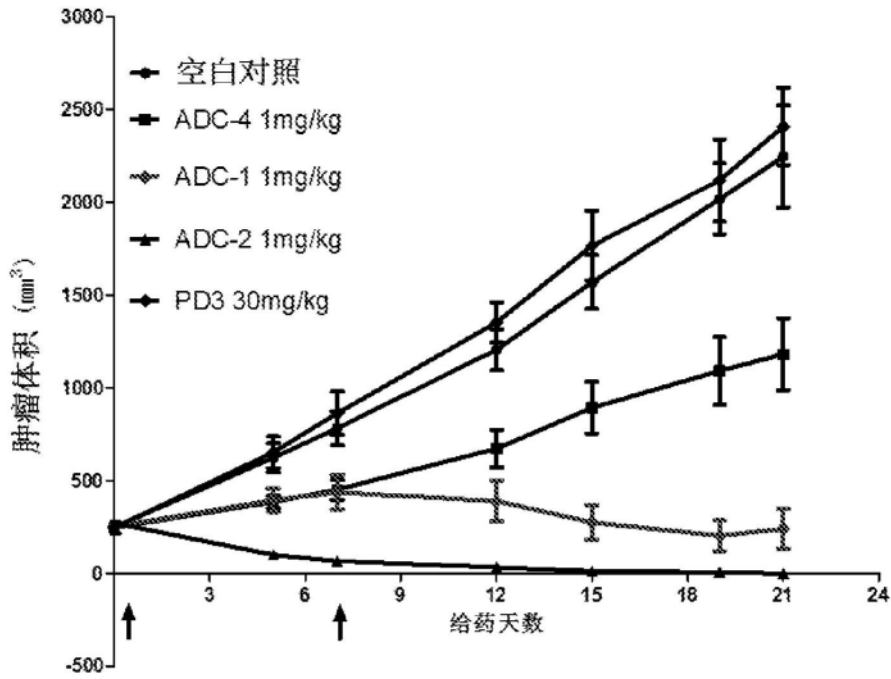


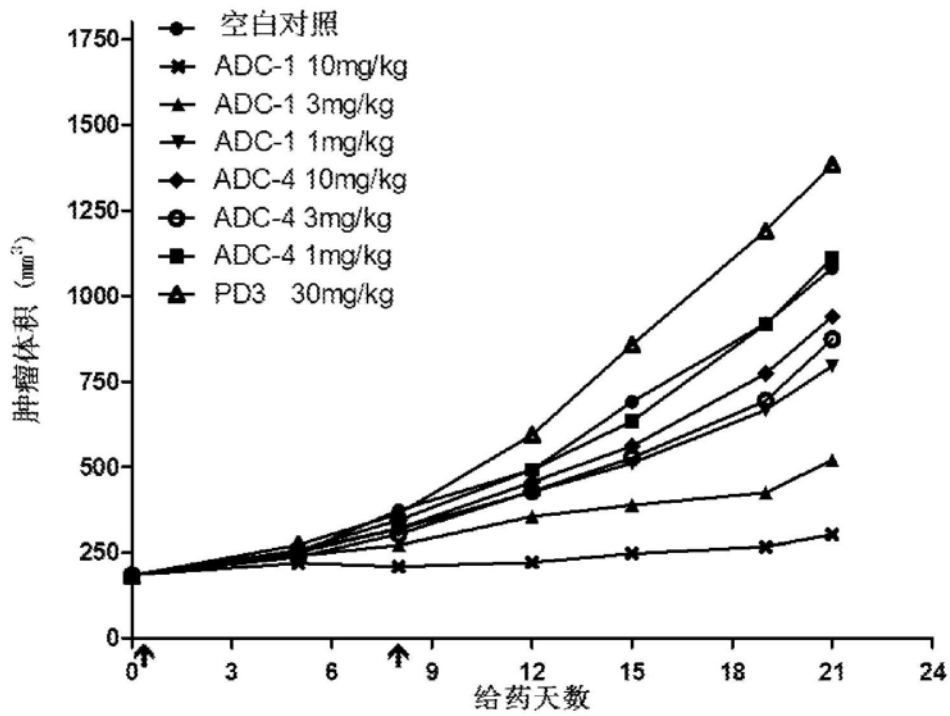
图2





↑: 第 0 天和第 8 天给药

图3



↑: 第 0 天和第 8 天给药

图4

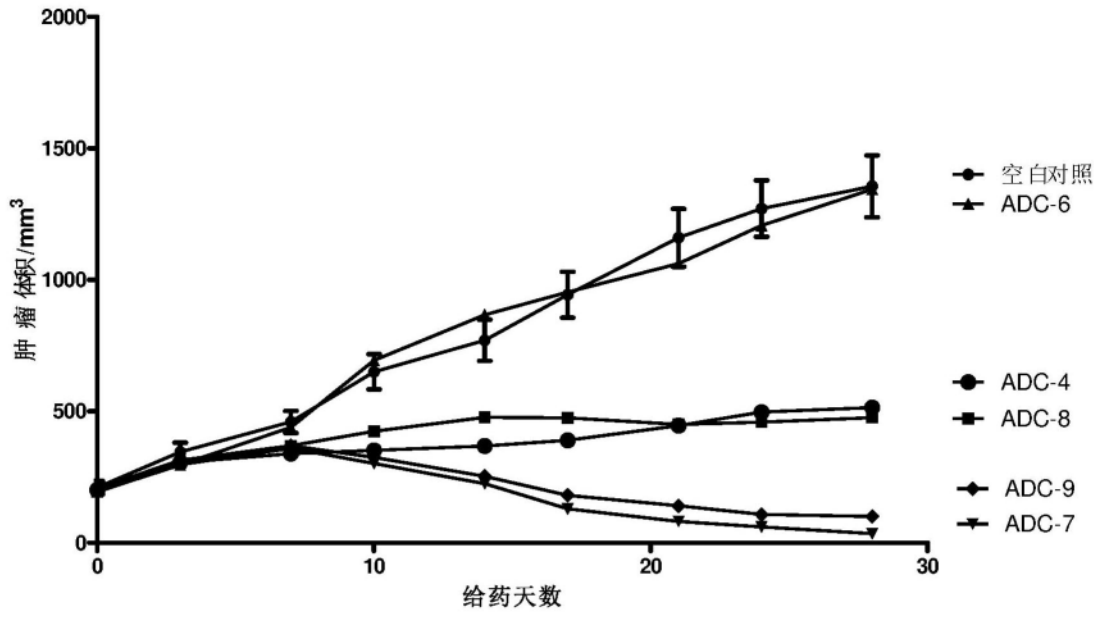


图5