

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 11 月 3 日 (03.11.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/228563 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 47/68 (2017.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/090450

(22) 国际申请日: 2022 年 4 月 29 日 (29.04.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110481199.4 2021 年 4 月 30 日 (30.04.2021) CN

(71) 申请人: 江苏迈威康新药研发有限公司 (JIANGSU MABWELL HEALTH PHARMACEUTICAL R&D CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道 1 号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。迈威(上海)生物科技股份有限公司 (MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区李冰路 576 号(张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 周伟(ZHOU, Wei); 中国上海市浦东新区李冰路 576 号(张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。谭小钉(TAN, Xiaoding); 中国上海市浦东新区李冰路 576 号(张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。刘大涛(LIU, Datao); 中国上海市浦东新区李冰路 576 号(张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。

(74) 代理人: 北京瑞恒信达知识产权代理事务所(普通合伙) (LEADING INTELLECTUAL PROPERTY FIRM); 中国北京市西城区新街口街道平安里大街 28 号中海国际中心 1802 室, Beijing 100034 (CN)。

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

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

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

本国际公布:

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

(54) Title: ANTIBODY-DRUG CONJUGATE TARGETING NECTIN-4 AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物及其制备方法和用途

(57) Abstract: An antibody-drug conjugate targeting a poliovirus receptor-like molecule 4 (Nectin-4). The antibody-drug conjugate can be used for preparing a drug for treating Nectin-4-related diseases. The antibody-drug conjugate has strong targeting properties to Nectin-4 and a strong endocytosis effect via the target, and has an excellent tumor-killing effect.

(57) 摘要: 一种靶向脊髓灰质炎病毒受体样分子 4(Nectin-4) 的抗体药物偶联物, 该抗体药物偶联物可用于制备治疗与 Nectin-4 有关的疾病的药物。所述抗体药物偶联物具有对 Nectin-4 的强靶向性和经由该靶点的强内吞效应, 具有优异的肿瘤杀伤效果。



WO 2022/228563 A1

靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物及其制备方法和用途

相关申请的交叉引用

本专利申请要求于 2021 年 4 月 30 日提交的申请号为 CN202110481199.4 的中国发明专利申请的优先权权益，在此将其全部内容引入作为参考。

技术领域

本发明涉及抗体药物偶联物，具体而言，本发明涉及靶向脊髓灰质炎病毒受体样分子 4（Nectin-4）的抗体药物偶联物及其制备方法和用途。

背景技术

Nectins（脊髓灰质炎病毒受体样分子）是一类新颖的细胞粘附蛋白，与钙粘蛋白共同或单独调节细胞连接，家族成员包括 Nectin-1、-2、-3、-4，它们都由具有 3 个 Ig 的环状结构、1 个跨膜区、胞质尾区组成。在这些成员中，Nectin-4 特异性表达于胚胎、胎盘以及肿瘤细胞中，已有研究发现其与多种肿瘤细胞的发生、发展有着密切联系。例如，对 2394 例肿瘤患者进行病理切片分析，发现 Nectin-4 广泛表达于膀胱癌、乳腺癌以及胰腺癌患者人群中。因此，Nectin-4 已成为许多肿瘤或癌症的诊断和治疗的一个重要靶点。

抗体药物偶联物（Antibody-drug conjugate；ADC）是一种利用抗体对肿瘤细胞表面特定抗原的特异性识别能力，精准地将抗肿瘤药物（如细胞毒性剂、细胞抑制剂、小分子化疗物等）递送到肿瘤靶细胞，使之发生胞内积蓄并释放，进而精准杀伤肿瘤的技术。抗体药物偶联物一般由三部分组成：抗体或抗体类配体，小分子药物，将抗体或抗体类配体与药物偶联起来的连接子（接头）。由于分子量大小合适，稳定性高，靶向性强，毒副作用小，抗体药物偶联物已被认为是最具潜力的抗肿瘤药物。

但是，成功开发 ADC 也存在诸多必须考虑且解决的问题。例如，抗体需特异性地识别病变部位，免疫致敏性低，能够高效迅速地发生细胞内吞作用；抗体-药物接头，在血液中稳定性要高并需在所靶向的细胞中特异地被激活并高效释放小分子药物，否则会对正常细胞产生不可接受水平的毒性；所偶联的小分子药物需具有强细胞杀伤能力等。在目前进入临床试验的抗体药物偶联物中，高活性的细胞毒性小分子药物通常是通过连接子连接在抗体表面的赖氨酸残基或者铰链区域的半胱氨酸残基处，最佳药物/配体比值（DAR）为 2-4。但是，抗体表面大量的赖氨酸残基（超过 80 个）以及偶联反应的非选择性，导致偶联数目和位点不确定，进而导致生成的抗体药物偶联物不均一。例如，由

抗 HER2 靶向药物曲妥珠单抗与微管抑制剂美坦新(DM1)制成的抗体药物偶联物 T-DM1 (平均 DAR 为 3.5), 其 DAR 分布为 0-8。同样, 虽然抗体铰链区的链间二硫键只有四对, 但为了达到最佳平均 DAR (2-4) 的要求, 需要对链间二硫键进行部分还原。但是, 现有还原剂 (DTT、TCEP 等) 无法选择性地还原链间二硫键, 因此生成的偶联物也不是均一的产物, 而是由多种组分组成, 主要组分的 DAR 为 0、2、4、6、8, 而且对应每一种特定 DAR 的组分都存在由于连接位点不同而形成的异构体。抗体药物偶联物产品的不均一性可导致各成员组分之间药物动力学性质、效价以及毒性的不均一性。例如, 具有较高 DAR 的组分在体内被清除得更快, 并导致更高的毒性。

目前, 西雅图基因公司与安斯泰来合作, 利用该公司特有的连接子 mc-vc-MMAE 与 anti-Nectin-4 抗体 enfortumab 进行随机偶联, 得到一种 anti-Nectin-4 抗体药物偶联物 Enfortumab Vedotin (Padcev)。临床试验结果显示, 在接受化疗以及 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗的患者中, 接受 Enfortumab Vedotin 的患者的中位总生存期为 12.9 个月, 比化疗对照组延长了 3.9 个月, 显示了良好的肿瘤治疗效果。然而, 临床研究同时发现, 使用 Enfortumab Vedotin 往往伴随发热、皮肤瘙痒、周围神经病、干眼症、中性粒细胞下降。这些不良反应与小分子与抗体连接过量、连接方式不稳定直接相关。

因此, 本领域迫切需要提供高效、简单、实用的化学偶联方法用于靶向 Nectin-4 的抗体-药物偶联物研究与开发。

发明内容

本发明要解决的技术问题是, 通过杂交瘤筛选和人源化技术, 获得特异性结合人 Nectin-4 的高亲和力抗体, 其中通过人源化设计, 使该抗体最大程度减少鼠源氨基酸的数目, 以拥有更好的体内安全性和应用前景; 在此基础上, 进一步筛选具有更强细胞内吞效应的抗体, 将其与小分子化学药物制备成抗体药物偶联物 (antibody-drug conjugate), 利用该抗体对 Nectin-4 表达细胞的靶向性和经由靶点的强的内吞效应, 结合该小分子化学药物的作用, 以达到优异的肿瘤杀伤效果。

因此, 本发明的一个目的是提供特异性结合 Nectin-4 的抗体或其片段; 其中, 所述抗体的片段涵盖抗体的各种功能性片段, 例如其抗原结合部分, 如 Fab、F(ab')₂ 或 scFv 片段。本发明的另一个目的是提供采用该抗体或其片段制备的靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐。

本发明的技术方案如下。

一方面, 本发明提供一种靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐, 其包含与药物共

价连接的抗 Nectin-4 的抗体或其片段。

在本发明提供的抗体药物偶联物或其盐中，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段包含重链和轻链，所述重链和轻链分别包含如下所示的重链互补决定区 1 至 3 (CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3) 和轻链互补决定区 1 至 3 (CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3)：

(i) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；和，氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3；

(ii) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；和，氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3；

(iii) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；和，氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3。

优选地，本发明提供的抗体药物偶联物或其盐具有分子式 $Ab-[L-CTD]_m$ ，其中 Ab 表示所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段，L 表示接头，CTD 表示药物，m 表示相对于每一分子 Ab 的药物平均连接数。

优选地，在本发明提供的抗体药物偶联物或其盐中，CTD 为细胞毒药物；优选地，CTD 为选自以下的一种或多种：微管抑制剂类 MMAE、DM1、DM4、Tublysin、鹅膏蕈碱、卡奇霉素、艾日布林及所述药物的衍生物；拓扑异构酶抑制剂类 SN38、依喜替康及所述药物的衍生物；以及 DNA 结合剂 PBD、多柔比星及所述药物的衍生物。

m 为 1.0-5.0，优选为 3.0-4.2，更优选为 3.5-4.5，进一步优选为 3.8-4.2，又优选为 3.9-4.1，特别优选为 4.0。

优选地，在本发明提供的抗体药物偶联物或其盐中，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段的重链和轻链分别包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中所述重链可变区 (VH) 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其变体，所述轻链可变区 (VL) 包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其变体。

更优选地，在本发明提供的抗体药物偶联物或其盐中，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 分别包含：

(i) 如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列或其变体；

(ii) 如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或其变体；

(iii) 如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或其变体；或

(iv) 如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其变体。

本发明的上下文中，“氨基酸序列的变体”是指与所述氨基酸序列具有至少 75% 序列同一性（例如至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、进一步优选至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或甚至 99% 同一性等 $\geq 75\%$ 的任何百分比的同一性）的氨基酸序列。

特别地，本发明抗 Nectin-4 的抗体或其片段至少包含重链可变区和轻链可变区，二者均包括上述 CDR 以及间隔的框架区（framework region, FR），各个结构域的排列方式为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。因此，就本发明抗 Nectin-4 的抗体或其片段所包含的重链可变区和轻链可变区而言，所述“至少 75% 序列同一性”导致的氨基酸序列的至多 25% 差异可存在于重链可变区或轻链可变区中的任意框架区中。或者，就本发明抗 Nectin-4 的抗体或其片段的整体而言，所述至多 25% 差异可存在于本发明的抗体或其片段中重链可变区和轻链可变区以外的任意结构域或序列中。所述差异可以由任何位置的氨基酸缺失、添加或置换产生，其中置换可以是保守置换或非保守置换。

在本发明提供的抗体药物偶联物或其盐中，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段可以为针对 Nectin-4 的单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、单域抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式，或者，所述抗体或其片段为针对 Nectin-4 的半抗体或半抗体的抗原结合片段，例如单链可变片段(single-chain variable fragment, scFv)、二价单链可变片段(bivalent single-chain variable fragment, BsFv)、二硫键稳定的可变片段(disulfide-stabilized variable fragment, dsFv)、(二硫键稳定的可变片段)₂ ((dsFv)₂)、抗原结合片段(antigen-binding fragment, Fab)、Fab' 片段(Fab')、(Fab' 片段)₂ (F(ab')₂) 或可变片段(variable fragment, Fv)。关于本发明提供的抗体的片段，优选地，所述片段为抗体的能够特异性结合 Nectin-4 的任何片段。并且，所述 Nectin-4 为哺乳动物 Nectin-4，优选灵长类动物 Nectin-4，更优选人 Nectin-4。

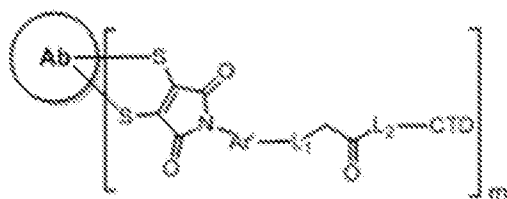
优选地，在本发明提供的抗体药物偶联物或其盐中，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段还可以包含恒定区。优选地，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段还包含人或鼠的重链恒定区 (CH) 和/或轻链恒定区 (CL)，更优选地包含选自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的

重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定区。

优选地，所述抗体为单克隆抗体，优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体；更优选地，所述单克隆抗体的重链恒定区为 IgG1 或 IgG4 亚型，轻链恒定区为 κ 型。或者，例如，所述抗体为免疫球蛋白，具体为 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM，例如 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 的人亚型，更优选为人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型。

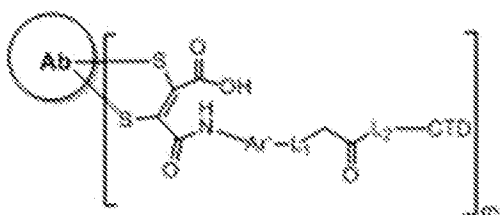
根据本发明的具体实施方式，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段包含重链恒定区，所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或其变体。或者，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段包含轻链恒定区，所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列或其变体。如上文所限定，“氨基酸序列的变体”是指与所述氨基酸序列具有至少 75% 序列同一性的氨基酸序列。

进一步地，本发明提供的抗体药物偶联物或其盐具有如下式 Ia 和/或 Ib 所示的结构：



Ia

和/或



Ib

其中：

Ab 是所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段；

Ar' 为选自如下的任一个：取代或未取代的 C6-C10 亚芳基和取代或未取代的 5-12 元亚杂芳基，其中所述取代指基团上的氢原子被一个或多个取代基所取代，所述取代基选自如下的任一个：卤素（F、Cl、Br 或 I）、卤代烷基（例如卤代 C1-C6 烷基、优选卤代 C1-C4 烷基，例如三氟甲基）和烷氧基（例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基，例如甲氧基）；

L₁ 为连接于 Ar' 基团上的 -O(CH₂CH₂O)_n-, 其中 n 选自 1-24 中任一整数，优选为 1-10、

更优选 3-5 中的任意整数:

L₂ 为酶切片段，如二肽或三肽或四肽或其与自释放结构片段的组合（即 2-4 个氨基酸组成的多肽片段或其与自释放结构片段的组合），如 Val-Ala、Val-Ala-PAB、Val-Cit、Val-Cit-PAB、Phe-Lys-PAB、Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Phe-Gly（GGFG）、MAC glucuronide phenol。

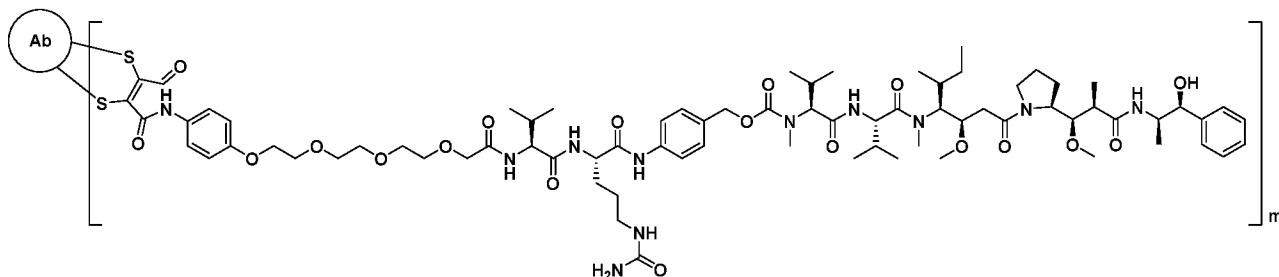
优选地, L₂-CTD 为 VcMMAE、GGFG-Dxd 或 VC-seco-DUBA。

优选地，在 Ar' 取代或未取代的 5-12 元亚杂芳基时，杂原子为 N。

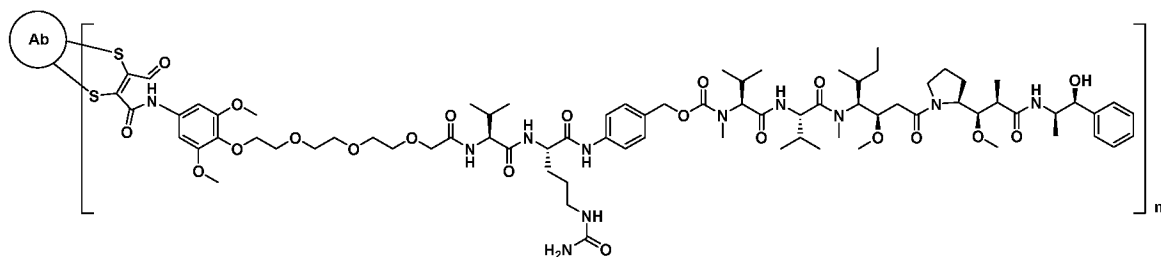
优选地，Ar'为取代或未取代的C6亚芳基或取代或未取代的6元亚杂芳基。

根据本发明的具体实施方式，本发明提供的抗体药物偶联物或其盐具有如下结构：

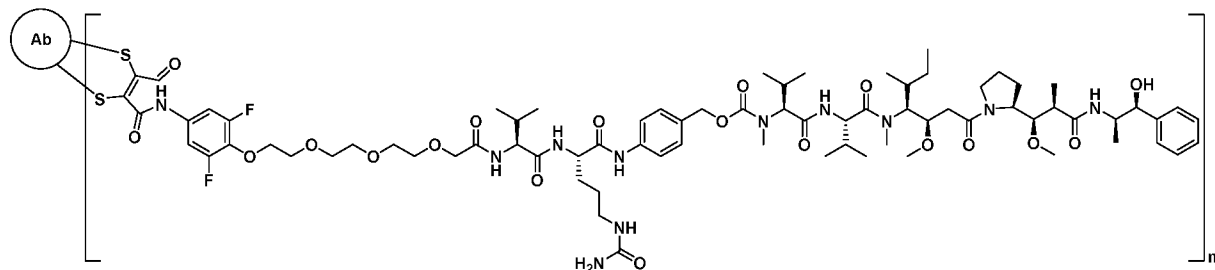
偶联物 ADC-1:



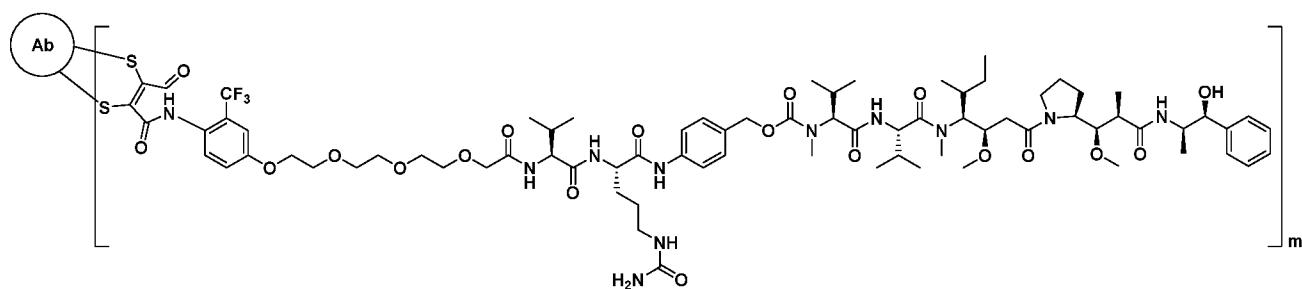
偶联物 ADC-2:



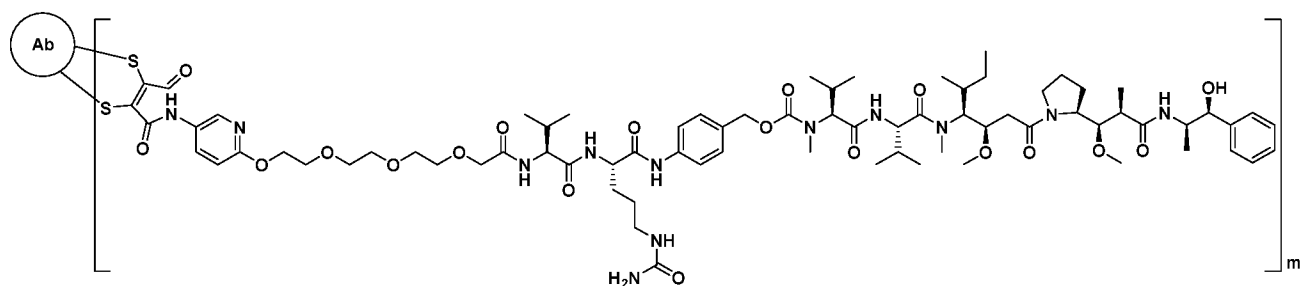
偶联物 ADC-3:



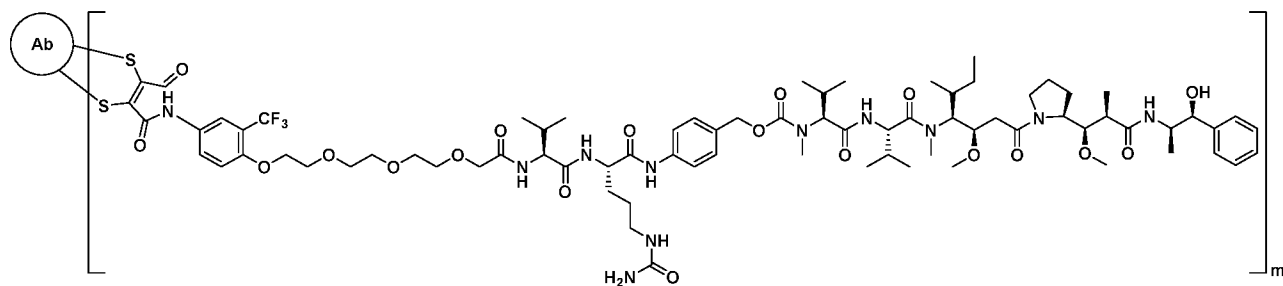
偶联物 ADC-4:



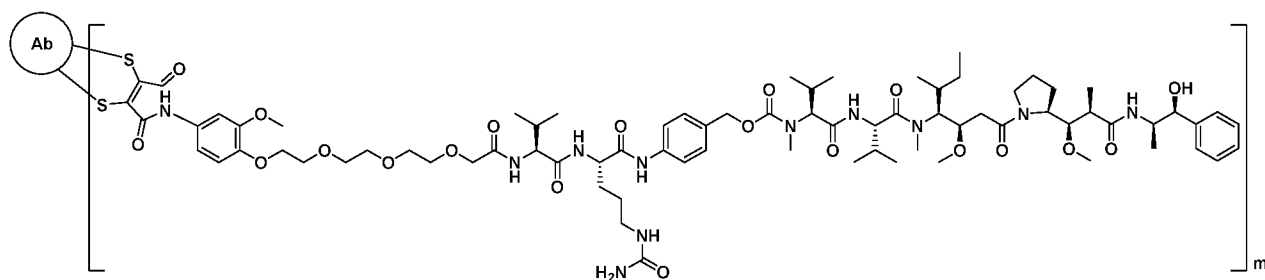
偶联物 ADC-5:



偶联物 ADC-6:

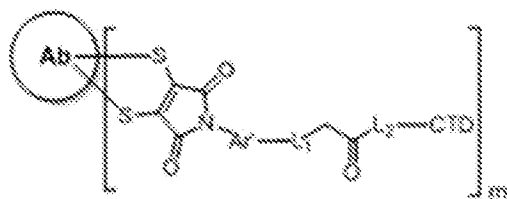


偶联物 ADC-7:



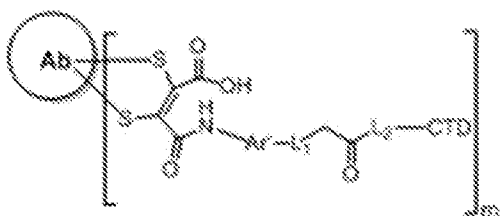
另一方面, 本发明提供一种靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐的制备方法, 所

述抗体药物偶联物或其盐具有式 Ia 和 Ib 所示的结构：



Ia

和/或



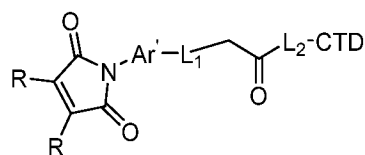
Ib

所述方法包括以下步骤：

(1) 使抗 Nectin-4 的抗体或其片段与还原试剂在缓冲液中反应，得到经还原后的抗体或其片段；

(2) 使药物接头（连接子-药物缀合物）与步骤(1)得到的经还原后的抗体或其片段在缓冲液与有机溶剂的混合液中进行交联，得到靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物。

在本发明提供的制备方法中，所述 Nectin-4 的抗体或其片段为如上文所限定；所述药物接头具有如下式 Ic 所示的结构：



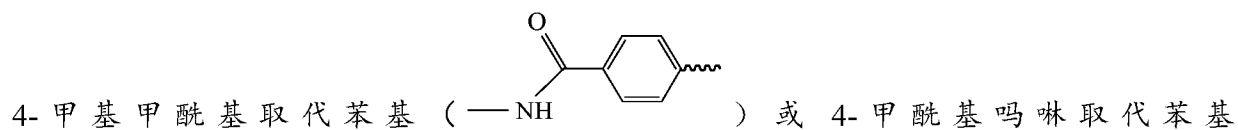
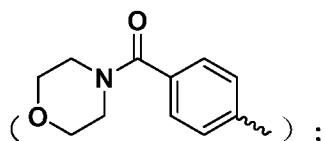
Ic

其中：

R 为 X 或 R'S，其中 X 为卤素（F、Cl、Br 或 I），优选为 Br 或 I；R' 为取代或未取代的 C6-C10 芳基或者取代或未取代的 5-12 元杂芳基，其中所述取代指基团上的氢原子被一个或多个取代基所取代，所述取代基选自如下的任一个：烷基（例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基）、烷氧基（例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基，例如甲氧基）、卤素（F、Cl、Br 或 I）、酯基、酰胺基和氰基；

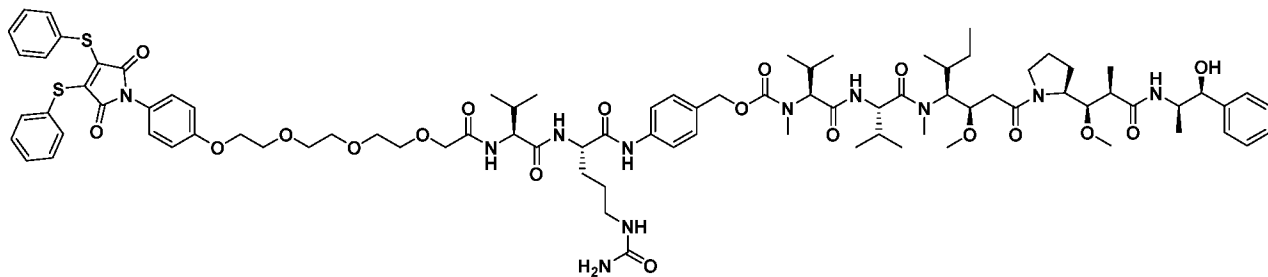
优选地，R 为 R'S，其中 R' 为苯基或取代的苯基，在取代的苯基中，取代基选自烷基（例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基）、烷氧基（例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基）

基, 优选甲氧基)、卤素 (F、Cl、Br 或 I)、酯基、酰胺基和氰基; 优选地, R' 为苯基、

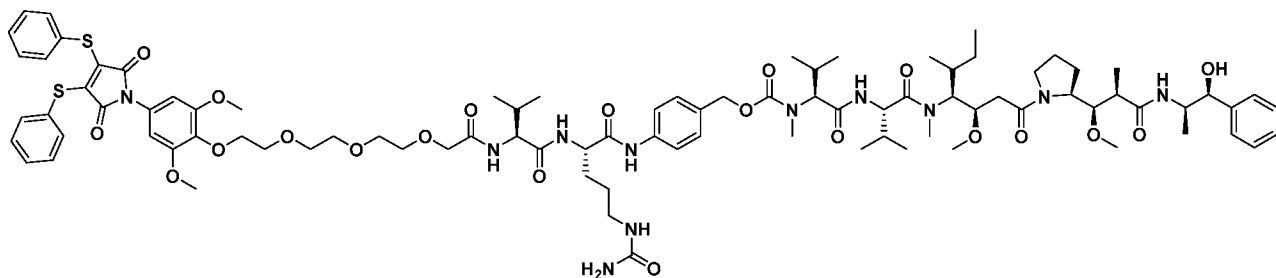


Ar'、L₁、L₂和CTD如上文所限定。

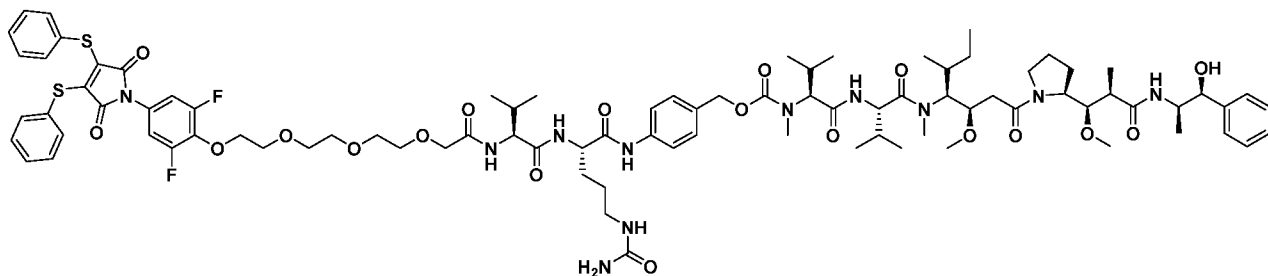
在本发明的上下文中，“药物接头”、“[L-D]”、“含药接头”和“连接子-药物缀合物”等可互换使用。根据本发明的具体实施方式，所述药物接头为选自如下的任一个：



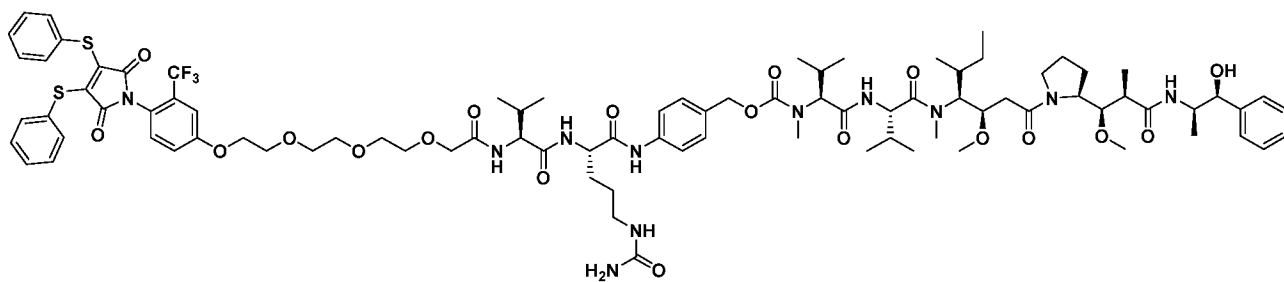
A-1



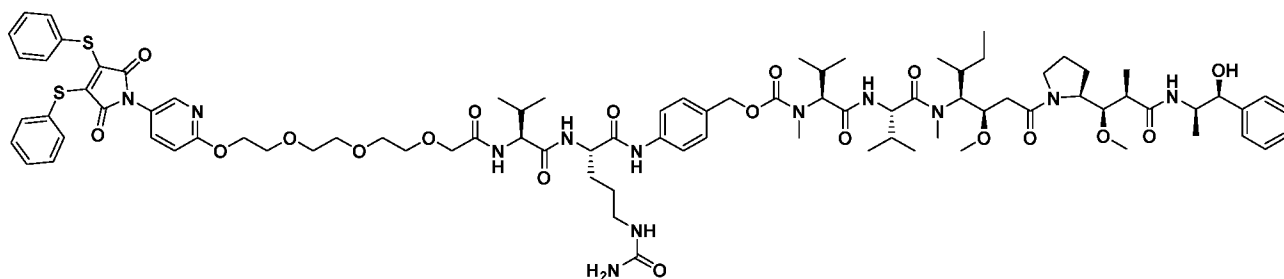
A-2



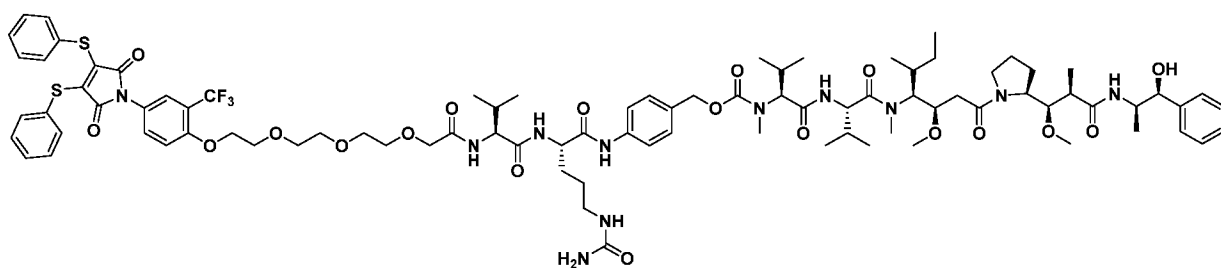
A-3



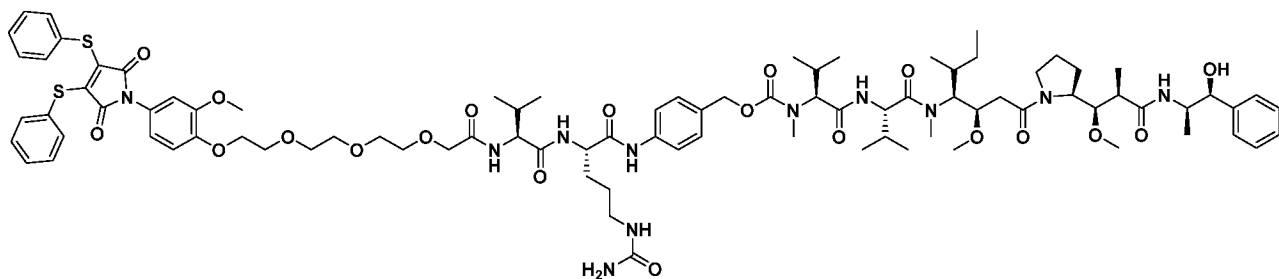
A-4



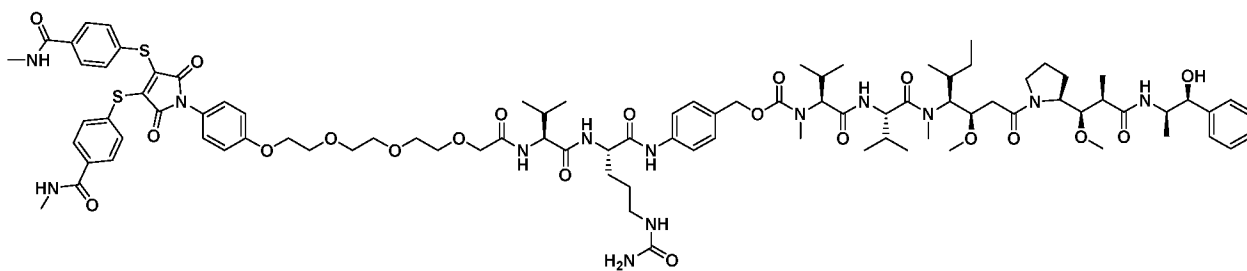
A-5



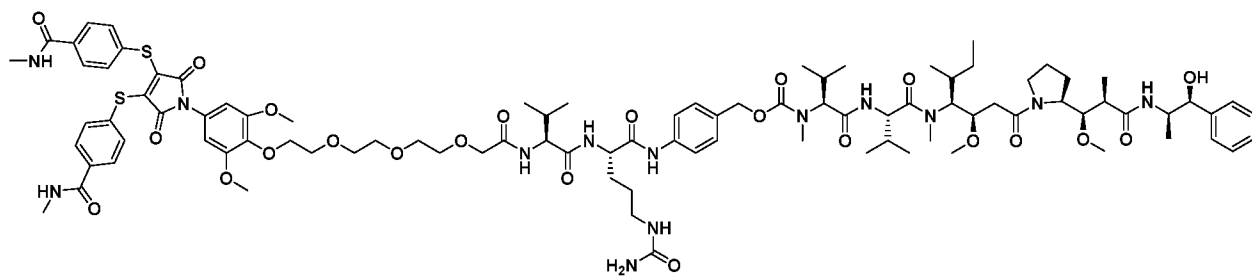
A-6



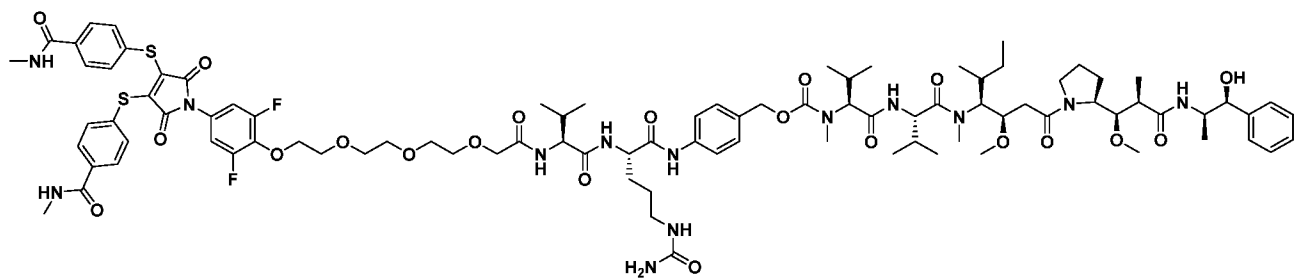
A-7



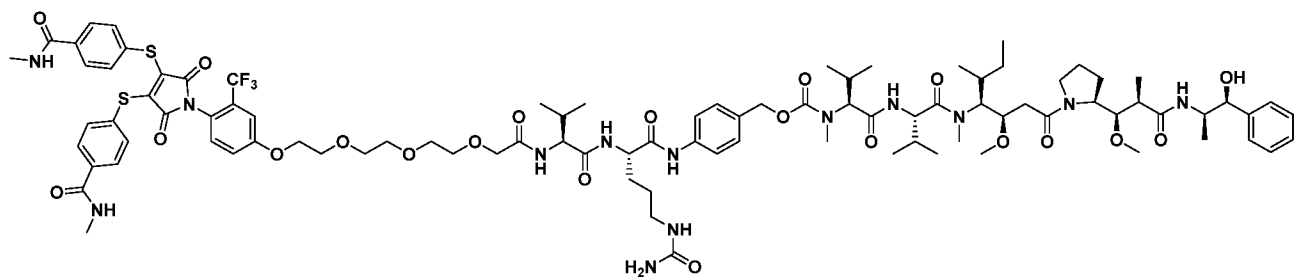
B-1



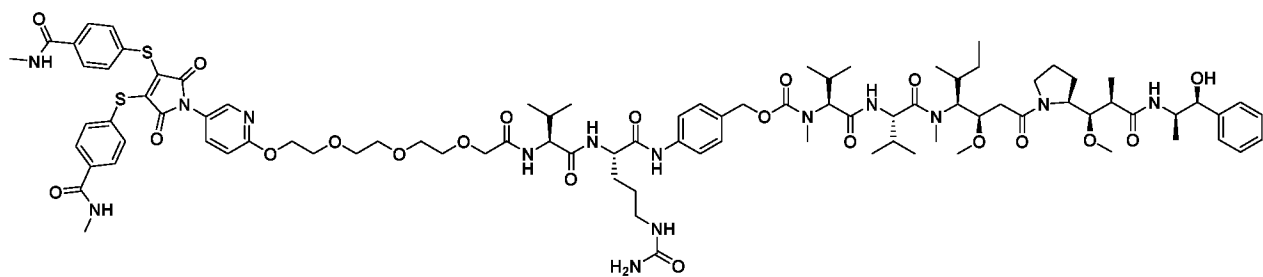
B-2



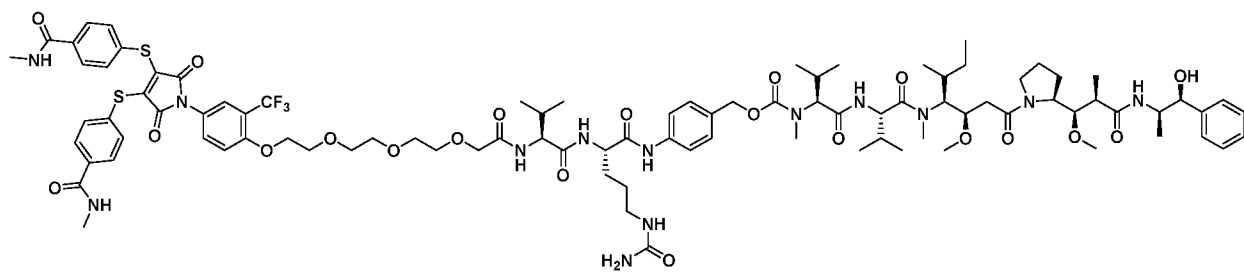
B-3



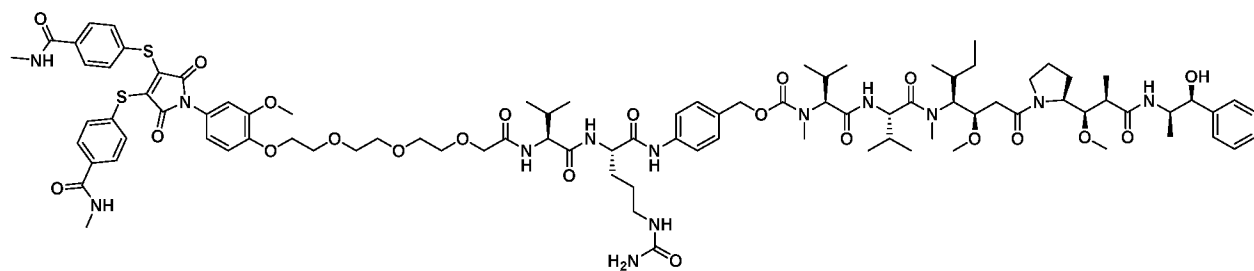
B-4



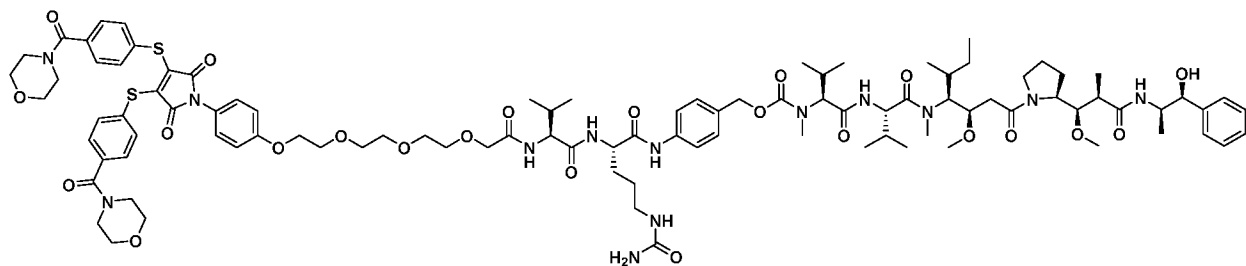
B-5



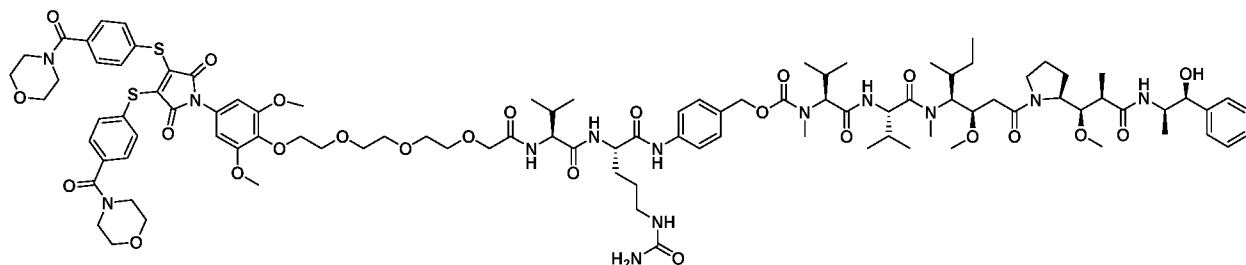
B-6



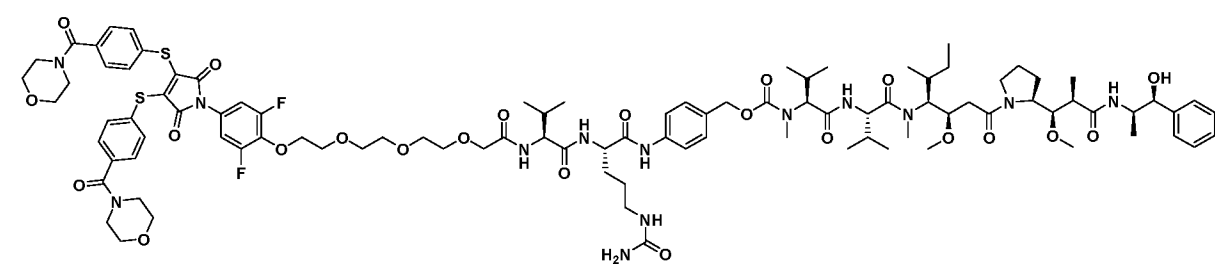
B-7



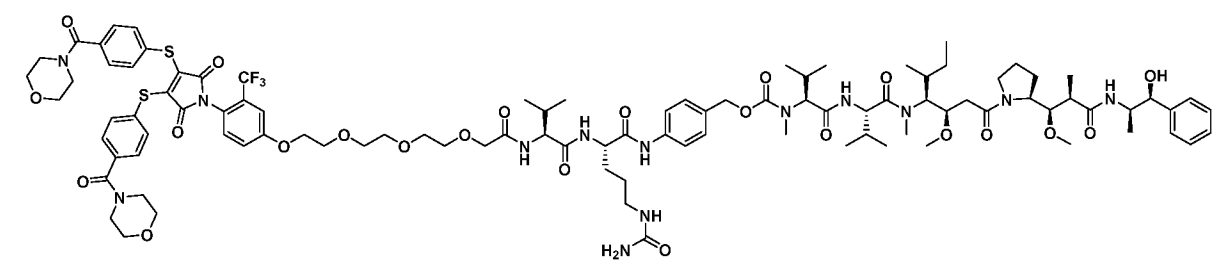
C-1



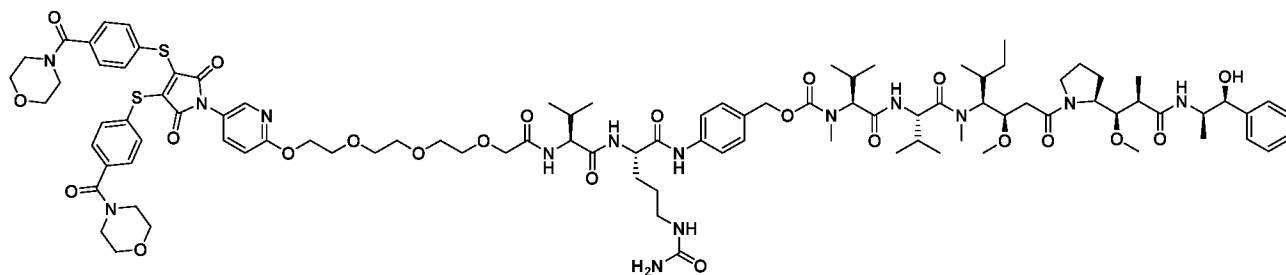
C-2



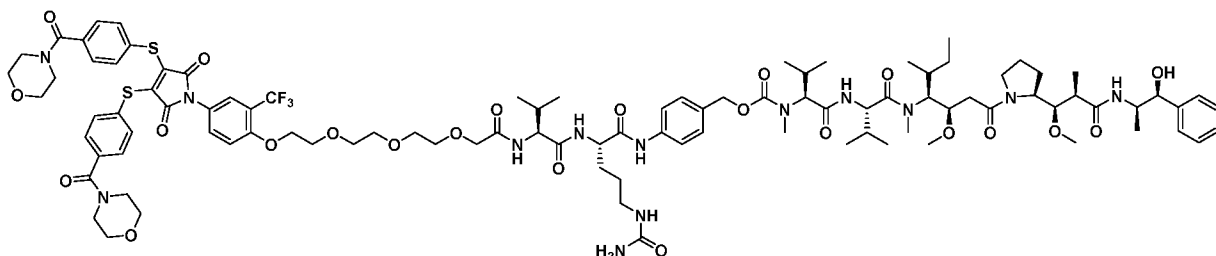
C-3



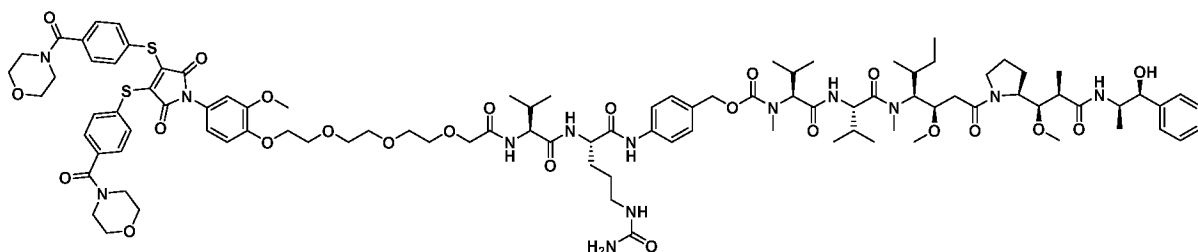
C-4



C-5



C-6



C-7

优选地，所述制备方法包括以下步骤：

a. 抗体还原：将 ≥ 5.5 倍抗体摩尔当量的还原剂加入到含 5-30mg/mL 浓度抗体的磷酸盐缓冲液中，反应 1.5-2 h，其中所述还原剂为选自 TCEP、DTT、2-MEA 和 DTBA 中的一种或多种；

b. 抗体偶联：将步骤 a 中经还原的抗体置换到 pH 6.5-7.8 的磷酸盐缓冲液中，并将抗体稀释到 3.5-15mg/mL 浓度，将溶解于有机共溶剂中的 4.5-6.5 倍抗体摩尔当量的含药接头加入到所述抗体稀释液中，在 15-35℃ 下搅拌反应 ≥ 0.5 h，其中所述有机共溶剂为选自 DMA、DMSO、DMF 和 ACN 中的一种或多种；

c. 疏水层析：使用疏水填料对抗体偶联产物进行疏水层析纯化。

进一步优选地，所述制备方法在步骤 b 之后或步骤 c 之后还包括以下步骤：

d. 水解：将抗体偶联产物置换到 pH 7.4-9.0 的磷酸盐缓冲液中，在 $35 \pm 10^\circ\text{C}$ 下加热 2-24 h，得到水解产物。

优选地，步骤 a、b 和 d 中的置换采用分子筛、超滤离心管或超滤膜包进行。优选地，步骤 c 中可采用的疏水填料为 Butyl Sepharose HP、Capto Phenyl Impres 或 Butyl Sepharose FF。

又一方面，本发明提供一种抗 Nectin-4 的抗体或其片段。上文就靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐中包含的抗 Nectin-4 的抗体或其片段进行的描述与定义均适用于这一方面的抗 Nectin-4 的抗体或其片段。关于具体序列，本发明提供的抗 Nectin-4 的抗体或其片段包含重链和轻链，所述重链和轻链分别包含如下所示的重链互补决定区 1 至 3 (CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3) 和轻链互补决定区 1 至 3 (CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3)：

氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；和，氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3。

优选地，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段的重链和轻链分别包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中所述重链可变区 (VH) 包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其变体，所述轻链可变区 (VL) 包含 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其变体。

更优选地，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 分别包含：

(A) 如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或其变体；或

(B) 如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其变体。

进一步地，这一方面，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段还具有本申请上文中关于抗体药物偶联物中的抗体成分所限定的各个特征。

根据本发明提供的上述抗体，本发明提供一种核酸分子，其包含编码本发明所述的抗 Nectin-4 的抗体或其片段中包含的轻链可变区、重链可变区、重链或轻链的核苷酸序列。

本发明的核酸分子可以被克隆到载体中，进而转化或转染宿主细胞。因此，还一方面，本发明提供一种载体，其包含本发明的核酸分子。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。

本发明的载体或核酸分子可以用于转化或转染宿主细胞或者以任何方式进入宿主细胞内，用于保存或表达抗体等目的。因此，又一方面，本发明提供一种宿主细胞，所述宿主细胞包含本发明的核酸分子和/或载体，或者所述宿主细胞被本发明的核酸分子和/或载体转化或转染。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞，例如细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

本发明提供的抗 Nectin-4 的抗体或其片段可以利用本领域已知的任何方法获得。例如，可以先由本发明提供的核酸分子获得所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或者获得所述抗体分子的重链和/或轻链，然后与所述抗体分子的任选其他结构域组装成抗体；或者，在允许本发明提供的宿主细胞表达所述抗体分子的重链可变区和/或轻链可变区或者所述抗体分子的重链和/或轻链以组装成所述抗体的情况下，培养所述宿主细胞。任选地，所述方法还包括回收产生的抗体分子的步骤。

本发明提供的靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐、抗 Nectin-4 的抗体或其片段、核酸分子、载体或宿主细胞可以被包含在组合物中，更特别地被包含在药物制剂中，从而根据实际需要用于各种目的。因此，在又一方面，本发明还提供一种组合物，所述组合物包含本发明提供的本发明的靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐、抗 Nectin-4 的抗体或其片段、核酸分子、载体和/或宿主细胞。优选地，所述组合物为药物组合物，其可选地还包含药学上可接受的载体、辅料或赋形剂。

再一方面，本发明还提供所述靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐、抗 Nectin-4 的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。或者，本发明还提供一种用于治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用本发明提供的所述靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐、抗 Nectin-4 的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物。其中，所述受试者为哺乳类动物，优选地为灵长类动物，更优选为人。

优选地，所述肿瘤为与 Nectin-4 高表达相关的肿瘤或癌症；优选地，所述肿瘤或癌症为选自如下的任一种：膀胱癌，乳腺癌，卵巢癌，胰腺癌，肝细胞癌，胃癌，非霍奇金淋巴瘤，霍奇金淋巴瘤，急性淋巴细胞性白血病，间变性大细胞淋巴瘤，多发性骨髓瘤，前列腺癌，非小细胞肺癌，小细胞肺癌，恶性黑色素瘤，鳞状细胞癌，胶质母细胞瘤，肾细胞癌，胃肠道肿瘤，前列腺癌，直肠癌，神经胶质瘤，间皮瘤。

附图说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

图 1 显示了 ADC 3d 的表征结果，其中 1A: HIC 图谱；1B: SEC 图谱；1C: NR-CE-SDS 图谱；1D: LCMS 图谱。

图 2 显示了不同 ADC 的体内药效结果。

图 3 显示了不同 ADC 的体内药效结果。

图 4 显示了不同 ADC 的体内药效结果。

图 5 显示了不同 ADC 的体内药效结果。

图 6 显示了不同 ADC 的体内药效结果。

实施发明的最佳方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

实施例组 1 anti-Nectin-4 抗体的筛选与制备

采用重组蛋白人 Nectin-4（购自近岸蛋白，Cat: CJ19）免疫小鼠，然后获取被免疫小鼠的 B 细胞与提前准备好的 SP20 骨髓瘤细胞融合，筛选能够结合人 Nectin-4 抗原的阳性杂交瘤细胞，最后获得只分泌一个抗体的阳性杂交瘤细胞株。

将分泌抗人 Nectin-4 抗体的杂交瘤细胞扩大培养后，提取细胞总 RNA，反转录成 cDNA；PCR 扩增抗体轻链可变区 IgVL(κ)和重链可变区 VH 序列，纯化扩增产物后连接至 T 载体并转化大肠杆菌细胞，菌株扩增、抽提质粒后进行 DNA 测序获得单克隆抗体的重轻链可变区序列。

将鼠源抗人 Nectin-4 单克隆抗体的重链可变区序列和公开发表的人单克隆抗体 IgG1 亚类的重链恒定区序列（SEQ ID NO: 9）拼接在一起，构建到哺乳动物细胞表达载体中；将鼠源抗人 Nectin-4 单克隆抗体的轻链可变区序列和公开发表的人单克隆抗体 κ 亚类的轻链恒定区序列（SEQ ID NO: 10）拼接在一起，构建到哺乳动物细胞表达载体中。构建好的抗人 Nectin-4 嵌合抗体的重链载体和轻链载体配对混合，使用 PEI 转染 HEK293 细胞，约 7 天后收集细胞上清，使用 Mabselect 纯化得到抗人 Nectin-4 嵌合抗体。

综合抗体编码方案，确定鼠源抗体的重轻链 6 个抗原互补决定簇（CDR）的氨基酸序列区域与支撑抗体保守三维构象的框架区。随后通过分析搜索已知人源抗体序列，选择与鼠源抗体最为相似接近的人源抗体重链可变区序列，如 IGHV1|IGHJ4*01，选择其抗体框架区序列作为模板，将鼠源抗体重链 CDR 与人源抗体框架区结合，最终生成人源化抗体重链可变区序列。同样过程，生成人源化抗体轻链可变区序列。根据结合活性变化，根据需要将框架区个别氨基酸进行从人源改回鼠源的回复突变，和/或对存在的翻译后修饰位点等个别氨基酸进行修改，最终获得备选的人源化的重链可变区和轻链可变区。

将人源化的重链可变区和轻链可变区两两组合，参考嵌合抗体的制备，获得人源化抗体。通过针对人 Nectin-4 的体外细胞结合实验、靶标癌细胞内吞实验、靶标癌细胞增殖抑制实验、与已知含药接头制成 ADC 筛选抗原结合、内吞活性或药效等，筛选出如下人源化抗体，下划线显示 CDR：

42D20-hz63

VH (SEQ ID NO: 1; CDR 依次为: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, 根据 CHOTHIA 定义方式)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGGGKIYYNSVLKSRV
TISKDNSKSKVSLKLSSVTAADTAVYYCAKQGGLLFYAMDYWGQGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 2; CDR 依次为: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, 根据 CHOTHIA 定义方式)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNTYSQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRF
SGSGSETDFTLTISLQAEDLAVYFCQQHYNTPFTFGAGTKLELK

42D20-hz10:

VH (SEQ ID NO: 3; CDR 依次为: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 13, 根据 CHOTHIA 定义方式)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGDGKIYYNSVLKSRV
TISKDNSKSKVSLKLSSVTAADTAVYYCAKQGGLLFYAMDYWGQGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 4; CDR 依次为: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, 根据 CHOTHIA 定义方式)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSYSQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESGVPDR
FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPFTFGAGTKLELK

hH2L1:

VH (SEQ ID NO: 5; CDR 依次为: SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 13, 根据 KABAT 定义方式)

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGGGKIYYNSVLKSRVT
ISKDNSKSKVSLKLSSVTAADTAVYYCAKQGGLLFYAMDYWGQGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 6; CDR 依次为: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, 根据 KABAT 定义方式)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNTYSQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESGVPDRF
SGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPFTFGGGTKVEIK

hL2H1mut1:

VH (SEQ ID NO: 7; CDR 依次为: SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 13, 根据 KABAT 定义方式)

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGGGKIYYNSVLKSRVT

ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAKQGGLLFYAMDYWGQGLTVTVSS

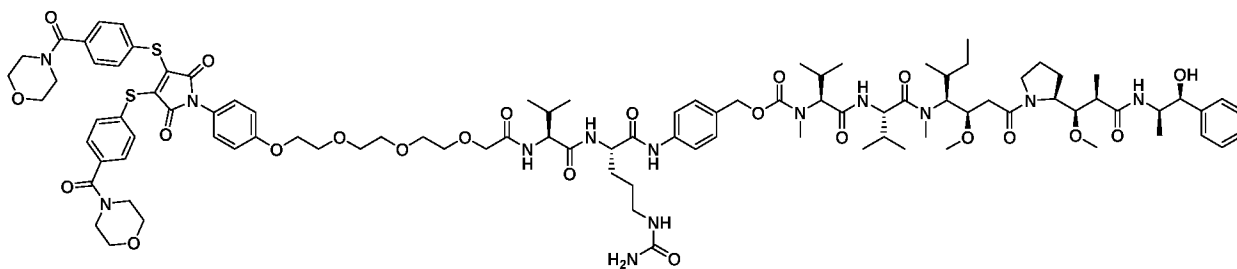
VL (SEQ ID NO: 8; CDR 依次为: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, 根据 KABAT 定义方式)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNTYSQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRF
SGSGSETDFTLTISLQAEDLAVYFCQQHYNTPTFTFGGGTKVEIK

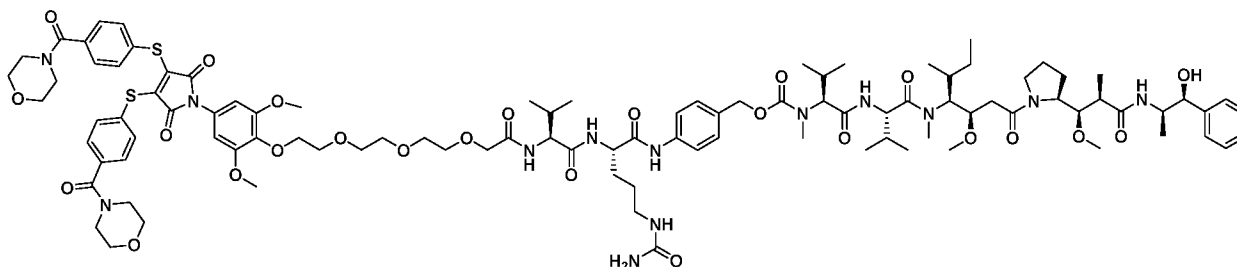
实施例组 2 抗体偶联药物的制备与理化表征

示例性地, 使用以下方法进行实验。

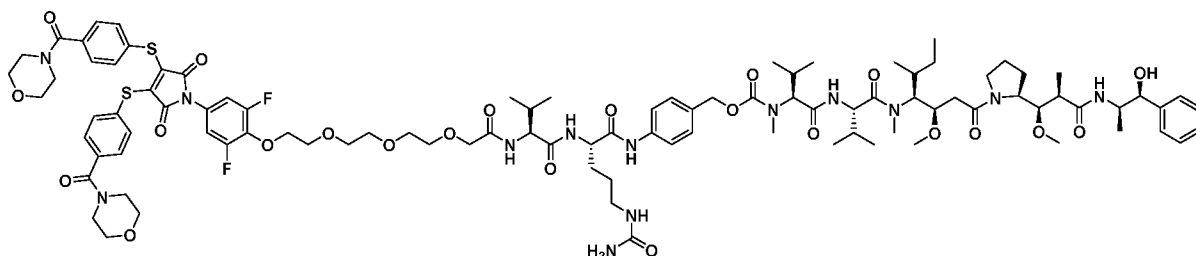
2.1 含药接头 C-1、C-2、C-3、C-4 的制备



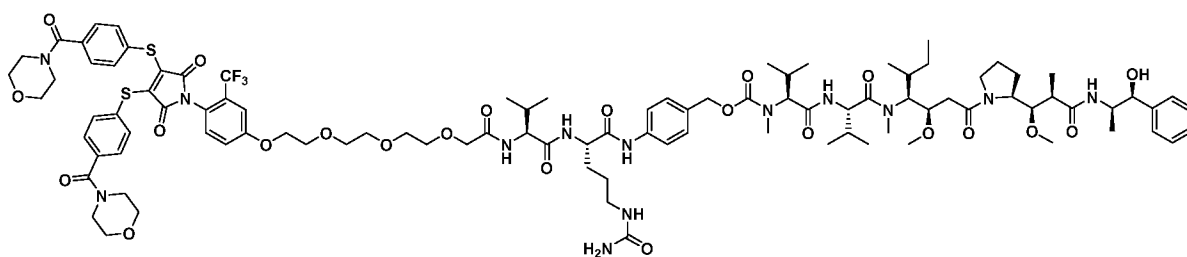
C-1



C-2



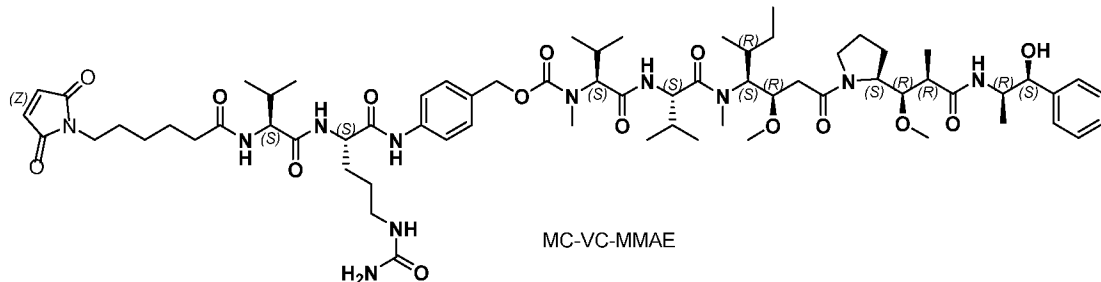
C-3



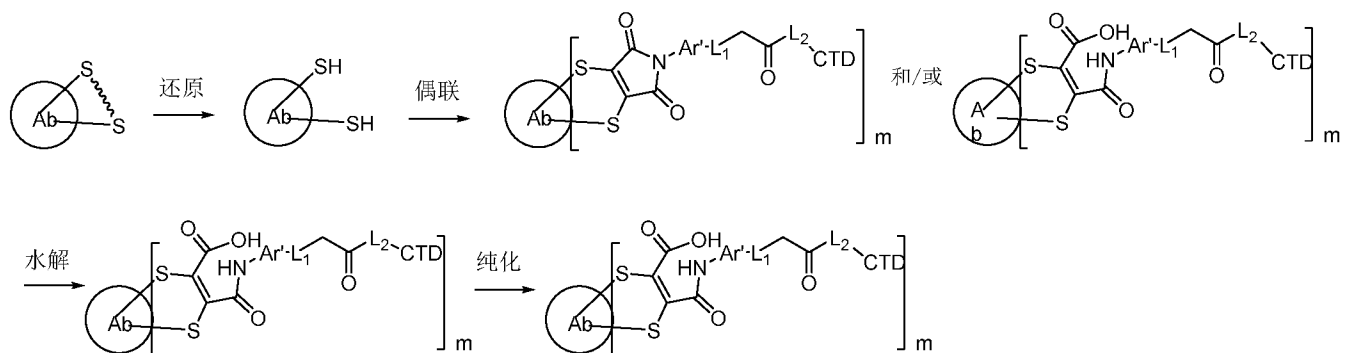
C-4

化合物按照 WO2018/095422A1 公开的方法合成，产物均为黄色固体，LC-MS (ESI): M+1 分别为 1927 (C-1)、1987 (C-2)、1963 (C-3) 和 1995 (C-4)。

含药接头 MC-VC-MMAE 购自 MCE。



2.2 定点偶联的抗体药物偶联物的制备



根据专利申请 CN202011046911X 所述的抗体药物偶联物制备方法：将抗体经还原打开二硫键，再与含药接头进行偶联形成抗体药物偶联物，再经水解打开马来酰亚胺环，最后经纯化得到 DAR=4 的抗体药物偶联物（发明专利申请 CN202011046911X 的全部内容以引用方式并入本文）。

具体示例性方法如下：

样品还原与偶联：将抗体样品使用Sephadex G-25载体的NAP-25脱盐柱置换至pH值7.4含有50mM的氯化钠、50mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液中，并将抗体浓度稀释至10mg/ml。取10ml共计100mg的抗体样品，以抗体-还原剂摩尔比1比10当量添加10mg/ml的TCEP (Sigma-Aldrich) 的水溶液。孵育2小时后，使用Sephadex G25脱盐柱将反应溶液进行置换，置换至pH 7.0 含有50mM氯化钠，50mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钠的缓冲溶液中。

将上述还原后的抗体稀释至5mg/mL，依次加入反应总体积7.4%的1.33ml N,N-二甲基乙酰胺 (DMA) 作为预溶剂、以抗体-小分子药物摩尔比1比5.5倍当量添加含10mg/mL药

物接头的DMA-药物接头混合溶液。室温搅拌60分钟。Sephadex G-25载体的NAP-25脱盐柱将反应液置换至pH8.0的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液，除去过量的药物接头，37℃水浴加热3小时。在水浴加热前后，分别进行质谱分析偶联产物结构。不同偶联产物的分析结果均表明，在水浴之前偶联产物为式Ia结构，水浴之后，得到完全开环的式Ib结构，即100%水解。

样品纯化：将上述样品使用AMICOM超滤离心管进行浓缩，将样品浓缩至15mg/mL左右。添加50mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+3M磷酸铵缓冲溶液至电导率为74ms/cm。上样至Butyl-Sepharose 4 FF填料（购自GE Healthcare）疏水柱，使用A相为50mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+0.45M硫酸铵；B相为50mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠的缓冲溶液。B相0-80%线性梯度12倍柱体积、B相100%等度梯度洗脱，对主峰进行收集。

使用AMICOM超滤离心管将最终样品置换至pH值7.4的50mM的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，并使用0.22um的滤膜进行过滤（Sartorius stedim Ministart）。

如实际反应规模 $\geq 1g$ ，在反应当量比不变的情况下，将上述 Sephadex G-25 载体脱盐步骤以及 AMICOM 超滤离心管替换为 HYDRO-30kD（Sartorius）超滤膜包。其他主要参数不变。

2.3 定点偶联的抗体药物偶联物的理化表征

a. 紫外分光光度法测定药物抗体偶联比（UV-DAR 法）与浓度

抗体药物偶联物浓度可通过测定在280nm及小分子特征吸收波长下的UV吸光度，然后进行下述计算而得到。

a1. 随机偶联药物的药物抗体偶联比（DAR）测定

根据文献[Clin Cancer Res. 2004 Oct 15;10(20):7063-70]可知DAR（抗体药物偶联比） $= (\epsilon_{280}^{Ab} - A_{280} / A_{248} * \epsilon_{248}^{Ab}) / (A_{280} / A_{248} * \epsilon_{248}^D - \epsilon_{280}^D)$ ，其中， ϵ_{280}^{Ab} 为抗体在280nm下摩尔吸收系数， A_{280} 为抗体药物偶联物在280nm下紫外吸收值， A_{248} 为抗体药物偶联物在含药接头特征吸收波长248 nm下紫外吸收值， ϵ_{248}^{Ab} 为抗体在含药接头特征吸收波长248 nm下摩尔吸收系数， ϵ_{248}^D 为含药接头在其特征吸收波长248 nm下摩尔吸收系数， ϵ_{280}^D 为含药接头在280 nm下摩尔吸收系数。

其中：

抗体/小分子	ϵ_{280}^{Ab}	ϵ_{248}^{Ab}	ϵ_{248}^D	ϵ_{280}^D
Enfortumab	200895	72266		
hH2L1	208776	78129		
Hz10	203460	73069		
hH1L2mut1	203837	75632		
Hz63	200869	69845		
mc-vc-MMAE			15900	1500

a2. 定点偶联药物的药物抗体偶联比 (DAR) 测定

根据文献[Clin Cancer Res. 2004 Oct 15;10(20):7063-70]可知DAR (抗体药物偶联比) $= (\epsilon_{280}^{Ab} - A_{280} / A_{251} * \epsilon_{251}^{Ab}) / (A_{280} / A_{251} * \epsilon_{251}^D - \epsilon_{280}^D)$, 其中, ϵ_{280}^{Ab} 为抗体在280nm下摩尔吸收系数, A_{280} 为抗体药物偶联物在280nm下紫外吸收值, A_{251} 为抗体药物偶联物在含药接头特征吸收波长251 nm下紫外吸收值, ϵ_{251}^{Ab} 为抗体在含药接头特征吸收波长251 nm下摩尔吸收系数, ϵ_{251}^D 为含药接头在其特征吸收波长251 nm下摩尔吸收系数, ϵ_{280}^D 为含药接头在280 nm下摩尔吸收系数。

其中:

抗体/小分子	ϵ_{280}^{Ab}	ϵ_{251}^{Ab}	ϵ_{251}^D	ϵ_{280}^D
Enfortumab	200895	67251		
hH2L1	208776	71247		
H210	203460	68210		
hH1L2mut1	203837	70084		
H263	200869	65892		
BL20E			22806	8304

注: BL20E为上文中C-3化合物去掉离去基团R并且马来酰亚胺环开环后的产物。

a3. 药物浓度测定

由于某一波长下的总吸光度等于存在于体系内的所有吸收化学物质种类的吸光度的和 (吸光度的加成性), 所以假设在抗体与含药接头偶联前后, 抗体及含药接头的摩尔吸光系数不发生变化时, 抗体药物偶联物浓度有如下关系:

$$A_{280} = \epsilon_{280}^{ADC} * C_{ADC} * L = (\epsilon_{280}^D * DAR + \epsilon_{280}^{Ab}) C_{ADC} * L$$

$$\text{因此, 抗体药物偶联物摩尔浓度 (mol/L) } C_{ADC} = A_{280} / (\epsilon_{280}^{Ab} + \epsilon_{280}^D * DAR)$$

由此得到抗体药物偶联物浓度 (g/L) $C_{ADC} = A_{280} / (\epsilon_{280}^{Ab} + \epsilon_{280}^D * DAR) * MW_{ADC} = A_{280} / (\epsilon_{280}^{Ab} + \epsilon_{280}^D * DAR) * (MW_{ab} + MW_D * DAR)$, 将DAR值代入式中即得蛋白浓度。

其中, MW_{ADC} 为抗体药物偶联物分子量, MW_{ab} 为抗体分子量, MW_D 为含药接头分子量。

b-1. 定点偶联药物疏水色谱HIC-HPLC测定DAR值

样品制备: 样品用流动相 B 稀释至 2.0 mg/ml 后, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清用于 HPLC 分析;

色谱柱: Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 μ m, 4.6mm *35mm;

流动相 A: 0.025M 磷酸盐+1.2M 硫酸铵(pH 7.0);

流动相 B: 0.025M 磷酸盐(pH 7.0);

流动相 C: 100% IPA;

流速：0.8mL/min；

检测波长：280nm；

柱温：30℃；

上样量：20 μL。

HIC 色谱梯度

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%	流动相 C%
0	100	0	0
1	100	0	0
12	0	80	20
16	0	80	20
17	100	0	0
21	100	0	0

DAR 计算公式：

$DAR = \sum (\text{加权峰面积}) / 100$ ，即 $DAR = (D0 \text{ 峰面积比} * 0 + D1 \text{ 峰面积比} * 1 + D2 \text{ 峰面积比} * 2 + D3 \text{ 峰面积比} * 3 + D4 \text{ 峰面积比} * 4 + D5 \text{ 峰面积比} * 5 + D6 \text{ 峰面积比} * 6 + D7 \text{ 峰面积比} * 7 + D8 \text{ 峰面积比} * 8) / 100$ 。

b-2. 随机偶联药物疏水色谱 HIC-HPLC 测定 DAR 值

样品制备：样品用流动相 B 稀释至 2.0 mg/ml 后，12000 rpm 离心 10 min，取上清用于 HPLC 分析；

色谱柱：TOSOH Butyl NPR，2.5μm，4.6mm *100mm；

流动相 A：125mM 磷酸盐+2.5M 硫酸铵(pH 6.8)；

流动相 B：125mM 磷酸盐(pH 6.8)；

流动相 C：100% IPA；

流动相 D：H₂O；

流速：0.7mL/min；

检测波长：280nm；

柱温：30℃；

上样量：10 μL。

HIC 色谱梯度

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%	流动相 C%	流动相 D%
0	50	0	5	45
10	0	50	5	45
20	0	50	5	45
20.1	50	0	5	45

35	50	0	5	45
----	----	---	---	----

DAR 计算公式:

$$\text{DAR} = \frac{\sum (\text{加权峰面积})}{100}$$
, 即 $\text{DAR} = (\text{D0 峰面积比} \times 0 + \text{D1 峰面积比} \times 1 + \text{D2 峰面积比} \times 2 + \text{D3 峰面积比} \times 3 + \text{D4 峰面积比} \times 4 + \text{D5 峰面积比} \times 5 + \text{D6 峰面积比} \times 6 + \text{D7 峰面积比} \times 7 + \text{D8 峰面积比} \times 8) / 100$ 。

c. 质谱法 LC-MS 测定 DAR 值

样品处理: 取适量样品于超滤管中, 采用 50mM NH_4HCO_3 置换缓冲液(pH7.1)进行置换, 补加缓冲液, 超滤离心 (13000g*5min)。加入 8 μL 的 PNGase F 酶至置换后的样品中, 37℃ 孵育 5 h 进行脱糖处理, 孵育结束后, 12000 rpm 离心 5 min, 取上清液于进样小瓶中作为供试样品待用。

色谱柱: PolyLC® PolyHYDROXYETHYLA Column, 300 Å, 5 μm , 2.1mm×200mm;

流动相: 50mM 乙酸铵, pH 7.0;

运行时间: 10min;

流速: 0.1mL/min;

进样体积: 2 μL ;

柱温: 25℃;

检测波长: 280nm;

离子化方式: ESI positive

干燥气体温度: 325℃

干燥气体流速: 8 L/min

雾化器压力: 20psig

鞘气温度: 325℃;

鞘气流量: 12L/min;

扫描设置: 900-8000 m/z。

d. 分子排阻色谱 SEC-HPLC 测定分子大小异质性

样品处理: 样品用流动相稀释至约 1.0 mg/ml 后, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清进样分析。

色谱柱: TOSOH, TSKgel G3000SW_{XL}, 5 μm , 7.8mm*300mm;

流动相: 100mM PB+200 mM 盐酸精氨酸, 5%异丙醇 (pH 6.8);

流速: 0.6 mL/min;

检测波长: 280 nm;

柱温: 30℃;

上样量: 20 μL ;

洗脱时间: 25 min;

洗脱梯度：等度洗脱。

e. 非还原毛细管电泳 NR-CE-SDS 测定纯度

根据《中国药典四部》通则 3127 单抗分子大小变异体测定法测定。

实施例 1 靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物的制备和理化分析

根据本实施例组 2.2 所述，将 anti-Nectin-4 抗体 Ref（根据 WHO Drug Information 中 Enfortumab 的序列进行制备）、42D20-hz63、42D20-hz10、hH2L1、hH1L2mut1、IgG1（Bio-Rad Antibodies，产品编号 MCA928）各 100mg，分别与含药接头 C-1 和 C-3 进行偶联，得到定点偶联 ADC 药物 1a、1b、1c、1d、1e、1f 和 2a、2b、2c、2d、2e。

根据本实施例组 2.2，采用专利申请 CN202011046911X 所述的抗体药物偶联物制备方法，将 anti-Nectin-4 抗体 hH2L1 与 C-3 进行放大制备，获得样品 3d。

根据专利 US 2009/0010945 A1 方法，将 anti-Nectin-4 抗体 42D20-hz63、42D20-hz10、IgG1 各 100mg，Ref、hH2L1、hH1L2mut1 各 500mg 分别与含药接头 MC-VC-MMAE 进行偶联，得到随机偶联 ADC 药物 4a、4b、4c、4d、4e、4f。

分别使用本实施例组 2 中 2.3a、2.3b-1、2.3b-2、2.3d 以及 2.3c、2.3e 对得到的定点偶联 ADC 药物和随机偶联 ADC 药物进行各项理化性质测定，结果分别见表 1 至表 3 以及图 1。

表 1. 靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物的质量表征结果

ADC	抗体	含药接头	UV DAR	HIC DAR	SEC
1a	Ref (Enfortumab)	C-1	3.7	4.0	99.1
1b	42D20-hz10	C-1	4.2	4.0	98.7
1c	42D20-hz63	C-1	4.1	4.0	97.9
1d	hH2L1	C-1	4.3	4.0	99.7
1e	hH1L2mut1	C-1	4.4	4.0	99.3
1f	IgG1	C-1	4.3	4.0	98.7
2a	Ref (Enfortumab)	C-3	3.9	4.0	99.3
2b	42D20-hz10	C-3	3.9	4.0	99.1
2c	42D20-hz63	C-3	4.0	4.0	98.5
2d	hH2L1	C-3	4.0	4.0	99.4
2e	hH1L2mut1	C-3	3.9	4.0	98.8
2f	IgG1	C-3	3.7	4.0	97.9
3d	hH2L1	C-3	4.0	4.0	98.7

表 2. 靶向 Nectin-4 的对照抗体药物偶联物的质量表征结果

ADC	抗体	含药接头	UV DAR	HIC DAR	SEC
-----	----	------	--------	---------	-----

4a	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	4.2	4.0	98.2
4b	42D20-hz10	MC-VC-MMAE	4.0	3.7	96.9
4c	42D20-hz63	MC-VC-MMAE	4.2	3.8	94.1
4d	hH2L1	MC-VC-MMAE	4.1	4.2	98.5
4e	hH1L2mut1	MC-VC-MMAE	4.1	4.3	99.3
4f	IgG1	MC-VC-MMAE	4.2	4.2	99.5

表 3. 3d 水解前和水解后质谱表征结果

样品名称	实测分子量	体系内容物
3d-水解前	155015	体系内为 Ia 和 Ib 混合物
3d-水解后	155034	体系内为 Ib 单一物质

通过质谱实测分子量可知，样品水解前为式 Ia 和 Ib 所示结构的混合物，水解后马来酰亚胺完全开环，得到如式 Ib 所示单一物质。

实施例组 3 抗体药物偶联物的体外杀伤作用与体内药效研究

示例性地，使用以下方法进行实验。

3.1 体外杀伤作用研究方法

本实验利用人乳腺导管癌细胞 BT474 细胞（购自 ATCC）。用完全培养基（RPMI 1640 培养基 45ml，5 ml FBS，混匀后使用）将 BT474 细胞密度调到 15×10^4 之后，100 μ l/孔加入细胞培养板中，过夜培养。第二天，用上述完全培养基稀释 ADC 样品，分别稀释到 50ug/ml，之后再 4 倍梯度稀释，共 9 个梯度加零点，所有样品均设 3 个复孔。设阴性对照（细胞+培养基）和空白对照（无细胞，纯培养基）；将上述稀释后的 ADC 样品依次加入到过夜培养的细胞培养板中，100 μ l/孔。然后置于细胞培养箱中孵育 96h。取出细胞培养板，40 μ l/孔加入 MTS 后，37 $^{\circ}$ C 培养箱反应 2-4h；取出细胞板，在 490nm 处读取 OD 值。

3.2 体内药效研究方法

分别使用人乳腺导管癌细胞 BT474 细胞（购自 ATCC）、人乳腺癌细胞 MDA-MB-468（购自 ATCC）对裸小鼠（BALB/cJGpt-Foxn1nu/Gpt，4-5 周）进行接种造模。待肿瘤生长至 100-200mm³ 后，对小鼠静脉注射(IV)给药，给药体积 10 mL/kg；溶剂组给予相同体积的溶剂（生理盐水）；具体给药剂量和给药方案见下文。每周测 2 次肿瘤体积，称小鼠体重，记录数据。

实验结束、达到实验终点或肿瘤体积达到 1500mm³，CO₂ 麻醉处死动物，随后解剖取瘤并拍照。

3.3 体内药效统计方法

实验指标为考察药物对肿瘤生长的影响，具体指标为 T/C% 或抑瘤率 TGI(%)。

每周二次用游标卡尺测量肿瘤直径，肿瘤体积（V）计算公式为：

$V = 1/2 \times a \times b^2$ ，其中 a、b 分别表示长、宽。

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

抑瘤率(TGI)(%)=100-T/C(%)。

当肿瘤出现消退时，抑瘤率(TGI) (%)=100-(T- T_0)/ $T_0 \times 100$

如果肿瘤比起始体积缩小，即 $T < T_0$ 或 $C < C_0$ 时，即定义为肿瘤部分消退(PR)；如果肿瘤完全消失，即定义为肿瘤完全消退(CR)。

实施例 1 对靶向 Nectin-4 抗体药物偶联物的体外杀伤作用研究

根据本实施例组 3 中 3.1 的方法对不同含药接头与不同 anti-Nectin-4 抗体的偶联 ADC 产物进行分组比较研究。发现：

使用不同抗体与 MC-VC-MMAE 形成 ADC 时，使用抗体 hH2L1 与对照抗体 Ref (Enfortumab) 的体外杀伤效果处于相当的水平，略优于使用抗体 42D20-hz10、42D20-hz63 以及 hH1L2mut1。进一步地，通过对 2a、1a、2e 的比较可知，C-3、C-1 体内活性相当。结果见表 4。

表 4. 不同抗体与含药接头的体外杀伤研究

板编号	ADC	抗体	含药连接子	EC50 (ng/ml)	细胞杀伤效果最 高百分比%
Plate 1	4b	42D20-hz10	MC-VC-MMAE	16.34	55
	4a	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	10.89	62.4
	4d	hH2L1	MC-VC-MMAE	11.24	55
Plate 2	4e	hH1L2mut1	MC-VC-MMAE	132.5	30.7
	4a	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	17.2	60.7
	4d	hH2L1	MC-VC-MMAE	13.79	55.7
Plate 3	4a	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	11.74	47.6
	4e	hH1L2mut1	MC-VC-MMAE	138.1	27.2
	4b	42D20-hz10	MC-VC-MMAE	12.060	41.0
Plate 4	4a	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	14.13	58.5
	4b	42D20-hz10	MC-VC-MMAE	14.04	49.6

	4c	42D20-hz63	MC-VC-MMAE	11.34	45.8
Plate 5	2a	Ref (Enfortumab)	C-3	12.42	39.9
	1a	Ref (Enfortumab)	C-1	8.345	37.8
	2e	hH1L2mut1	C-3	N/A	N/A

实施例 2 对靶向 Nectin-4 抗体药物偶联物的体内药效研究 (1)

根据本实施例组 3 中 3.2 和 3.3 的方法使用 BT474 进行造模, 对不同含药接头与不同 anti-Nectin-4 抗体的偶联 ADC 产物进行分组比较研究。

表 5. 不同 ADC 药物分组与给药方案

给药组	抗体	含药连接子	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药时间	给药体积 (mL/kg)
溶剂	无	无	无	IV	D0	10
4a	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	5	IV	D0	10
4c	42D20-hz63	MC-VC-MMAE	5	IV	D0	10
2c	42D20-hz63	C-3	5	IV	D0	10
4b	42D20-hz10	MC-VC-MMAE	5	IV	D0	10
2b	42D20-hz10	C-3	5	IV	D0	10
4f	IgG1	MC-VC-MMAE	5	IV	D0	10
2f	hH1L2mut1	MC-VC-MMAE	5	IV	D0	10

结果见图 2 和表 6。

表 6. 不同 ADC 的体内药效结果

分组	平均肿瘤体积 (mm ³)		平均肿瘤体积 (mm ³)		% T/C	% 抑瘤率	P 值	实验开始 每组 动物数	实验结束 每组 动物数
	D0	SEM	D26	SEM	D26	D26	D26		
溶剂	118.1	± 2.7	2005.1	± 253.9	-	-	-	10	10
4a 5mg/kg	115.6	± 4.0	169.7	± 50	3	97	0.000	6	6
4c 5mg/kg	112.0	± 3.6	421.3	± 156.7	16	84	0.001	6	6
2c 5mg/kg	113.0	± 3.5	220.9	± 59.3	6	94	0.000	6	6
4b 5mg/kg	114.8	± 4.3	289.3	± 47.3	9	91	0.000	6	6
2b 5mg/kg	115.1	± 3.6	160.5	± 28.6	2	98	0.000	6	6
4f 5mg/kg	114.3	± 3.6	1879.0	± 347.4	94	6	0.777	6	6
2f 5mg/kg	114.8	± 4.1	1230.1	± 219.4	59	41	0.058	6	6

注：表中 P 值为与溶剂组相比。

实施例 3 对靶向 Nectin-4 抗体药物偶联物的体内药效研究 (2)

根据实施例组 3 中 3.2 和 3.3 的方法使用 MDA-MB-468 进行造模，对不同含药接头与不同 anti-Nectin-4 抗体的偶联 ADC 产物进行分组比较研究。

表 7. 不同 ADC 的药物分组与给药方案

给药组	抗体	含药连接子	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药时间	给药体积 (mL/kg)
溶剂	无	无	无	IV	D0	10
4d	hH2L1	MC-VC-MMAE	5	IV	D0	10
2d	hH2L1	C-3	5	IV	D0	10
4a	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	5	IV	D0	10

结果见图 3 和表 8。

表 8. 不同 ADC 的体内药效结果

分组	TV(D0)	SEM	TV(D24)	SEM	T/C(%) (D24)	TGI% (D24)	P 值	PR (D24)	动物数 (D0)	动物数 (D24)
溶剂	112.9	± 2.5	589.6	± 68.3	-	-	-	0	10	10
4d 5 mg/kg	116.1	± 3.0	333.0	± 35.0	46	54	0.015	0	6	6
2d 5 mg/kg	112.0	± 3.9	110.6	± 10.8	-1	101	0.000	4	6	6
4a 5 mg/kg	115.7	± 2.7	248.7	± 26.5	28	72	0.002	0	6	6

注：表中 P 值为与溶剂组相比；TV：肿瘤体积，mm³。

实施例组 4 抗体药物偶联物 3d 在不同肿瘤模型对候选药物的药效评估

示例性地，使用以下方法进行实验。

4.1 药物分组与实验设计

分别使用人乳腺癌细胞 MDA-MB-468 (购自 ATCC)、肺癌细胞 NCI-H322 (购自 ATCC)、膀胱癌细胞 T24/nectin-4 (中国科学院细胞库) 对裸小鼠 (BALB/cJGpt-Foxn1nu/Gpt, 4-5 周) 进行接种造模。

使用抗体药物偶联物 3d 与对照药物 PADCE (Enfortumab Vedotin; 购自 Seattle Genetics) 进行分组比较研究 (如表 9)。分别对小鼠静脉注射 (IV) 给药，给药体积 10 mL/kg；溶剂组给予相同体积的溶剂 (生理盐水)；具体给药剂量和给药方案见表 9。每周测 2 次肿瘤体积，称小鼠体重，记录数据。

实验结束、达到实验终点或肿瘤体积达到 1500mm³，CO₂ 麻醉处死动物，随后解剖取瘤并拍照。

表 9. 不同 ADC 的药物分组与给药方案

给药组	抗体	含药连接子	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药时间	给药体积 (mL/kg)
溶剂	无	无	无	IV	D0	10
3d	hH2L1	C-3	1	IV	D0	10
3d	hH2L1	C-3	3	IV	D0	10
3d	hH2L1	C-3	10	IV	D0	10
PADCVE	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	3	IV	D0	10
PADCVE	Ref (Enfortumab)	MC-VC-MMAE	10	IV	D0	10

4.2 体内药效统计方法

同实施例组 3 中的 3.3。

实施例 1 乳腺癌动物模型中对靶向 Nectin-4 抗体药物偶联物的体内药效研究

根据本实施例组 4.1 和 4.2 的方法使用 MDA-MB-468 进行造模，对 3d 和 PADCVE 进行分组比较研究。结果见图 4 和表 10。

表 10. 不同 ADC 的体内药效结果

分组	TV(D0)	SEM	TV(D21)	SEM	T/C(%) (D21)	TGI% (D21)	P 值	PR (D21)	动物 数 (D0)	动物 数 (D21)
溶剂	132.4	± 3.6	739.1	± 20.7	-	-	-	0	10	10
3d 1 mg/kg	133.7	± 3.1	628.1	± 60.8	82	18	0.721	0	8	8
3d 3 mg/kg	134.6	± 4.6	355.5	± 59.7	36	64	0.000	0	8	8
3d 10 mg/kg	133.9	± 3.4	119.5	± 31.2	-11	111	0.000	7	8	8
PADCEV [®] 3 mg/kg	133.1	± 3.4	516.4	± 33.7	63	37	0.000	0	8	8
PADCEV [®] 10 mg/kg	139.5	± 3.3	309.5	± 49.7	28	72	0.000	0	8	8

注：表中 P 值为与溶剂组相比；TV：肿瘤体积，mm³；PR：部分消退。

实施例 2 肺癌动物模型中对靶向 Nectin-4 抗体药物偶联物的体内药效研究

根据本实施例组 4.1 和 4.2 的方法使用 NCI-H322 进行造模，对 3d 和 PADCVE 进行分组比较研究。结果见图 5 和表 11。

表 11. 不同 ADC 的体内药效结果

分组	TV(D0)	SEM	TV(D26)	SEM	T/C(%) (D26)	TGI% (D26)	P 值	PR (D26)	动物数 (D0)	动物数 (D26)
溶剂	121.0	± 1.6	676.2	± 41.3	-	-	-	0	12	12

3d 1 mg/kg	122.3 ± 1.9	325.8 ± 36.6	37	63	<0.001	0	8	8
3d 3 mg/kg	124.4 ± 2.1	216.7 ± 31.1	17	83	<0.001	1	8	8
3d 10 mg/kg	123.1 ± 2.0	81.1 ± 2.5	-34	134	<0.001	8	8	8
PADCEV® 3 mg/kg	125.1 ± 1.9	325.9 ± 33.3	36	64	<0.001	0	8	8
PADCEV® 10 mg/kg	124.1 ± 2.6	95.9 ± 5.2	-23	123	<0.001	7	8	8

注：表中 P 值为与溶剂组相比；TV：肿瘤体积，mm³；PR：部分消退。

实施例 3 膀胱癌动物模型中对靶向 Nectin-4 抗体药物偶联物的体内药效研究

根据上述实施例组 4.1 和 4.2 的方法使用 T24/nectin-4 进行造模，对 3d 和 PADCEV 进行分组比较研究。结果见图 6 和表 12。

表 12. 不同 ADC 的体内药效结果

分组	平均体重(g)		小鼠数目		平均瘤重(g) (D22)	SD	抑瘤率% (D22)	P 值
	开始	结束	开始	结束				
溶剂	22.1	19.5	10	10	2.46	± 0.25	—	
3d 1 mg/kg	22.0	18.8	8	8	1.98	± 0.35	19.3	0.004
3d 3 mg/kg	22.0	22.2	8	8	0.58	± 0.88	76.2	0.000
3d 10 mg/kg	22.2	23.5	8	8	0.08	± 0.03	96.9	0.000
PADCEV® 3 mg/kg	22.0	23.0	8	8	0.23	± 0.15	90.7	0.000
PADCEV® 10 mg/kg	22.0	23.3	8	8	0.09	± 0.02	96.3	0.000

注：表中 P 值为与溶剂组相比。

实施例组 5 抗体偶联药物的功能评估

实施例 1 靶向 Nectin-4 抗体药物偶联物的 Fab 功能区亲和力分析

使用 BIAcore 测定 3d 和 Padcev 与抗原重组人 Nectin 4 胞外区的亲和力。

通过脱盐柱及运行试剂 1(10 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N-2 磺酸, 150 mM 氯化钠, 3 mM 乙二胺四乙酸, 0.005%吐温-20, pH 调至 7.4) 将人 Nectin4 蛋白(购自 novoprotein) 进行缓冲液置换。将待测样品用运行试剂 1 稀释至 5 µg/mL, 并以 10 µL/min 的流速依次注入到 His 捕获芯片实验通道约 400 RU。参比通道不需要进行配体的捕获。将人 Nectin4 蛋白用相应运行试剂稀释至 50、25、12.5、6.25、3.125、1.563、0.781、0.391、0 nM。将稀释后的人 Nectin4 蛋白以 30 µL/min 的流速注入到实验通道和参比通道, 结合 120 s 和解离 300 s。使用 Biocore 8K 分析软件计算每个抗体的 KD 值。参比通道用于背景的扣减。

hH2L1、3d 和 Padcev 与人 Nectin 4 亲和力检测结果见表 13。结果显示, hH2L1、3d 以及 Padcev 与人 Nectin 4 的亲和力(KD)均为 nM 级别, 批间一致性较好, 且 hH2L1

与 3d 亲和力基本一致,说明 ADC 偶联工艺没有显著影响抗体与 Nectin 4 的结合; Padcev 的结合速率 k_a 高于 3d,但解离速率 k_d 高于 3d,总体亲和力 3d 略优于 Padcev,是 Padcev 的 2 倍左右。

表 13. 与抗原的亲和力检测结果

分组	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (nM)
hH2L1	5.62E+05	1.45E-03	2.58
3d	5.89E+05	1.42E-03	2.41
PADCEV	1.05E+06	5.12E-03	4.87

实施例 2 靶向 Nectin-4 抗体药物偶联物的 Fc 功能区分析

使用 BIAcore 测定 hH2L1、3d 和 Padcev 与 Fc 受体的亲和力, Fc 受体包括: FcRn、人 FcγR I (CD64)、人 FcγR IIa (人 CD32a (H167))、人 FcγR IIb (人 CD32b) 和人 FcγR IIIa (人 CD16a (V176))。将人 FcγR I (CD64)、FcγR IIa (CD32a (H167))、FcγR IIb (CD32b) 和 FcγR IIIa (CD16a (V176)) 蛋白用运行试剂 1 (10 mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N-2 磺酸, 150 mM 氯化钠, 3 mM 乙二胺四乙酸, 0.005%吐温-20, pH 调至 7.4) 稀释至 0.25 μg/mL, FcRn 蛋白用运行试剂 2 (2 mM 磷酸二氢钠, 10 mM 磷酸氢二钠, 137 mM 氯化钠, 2.7 mM 氯化钾, 0.05%吐温-20, pH 调至 6.0) 稀释至 0.25 μg/mL 并以 10 μL/min 的流速依次注入到 His 捕获芯片实验通道 (FC2) 约 40 RU。参比通道 (FC1) 不需要进行配体的捕获。将待测样品用相应运行试剂稀释, 稀释后的样品依次以 30 μL/min 的流速注入到实验通道和参比通道, 结合和解离相应时间。使用 Biocore 8K 分析软件计算每个抗体的 KD 值。参比通道 (FC1) 用于背景的扣减。

hH2L1、3d 和 Padcev 与 Fc 受体亲和力检测结果见表 14。结果显示, hH2L1 及 4 批 3d 与 Fc 受体的亲和力批间无显著差异; 3d 及 1 批 Padcev 与 FcγR IIIa 的亲和力整体略差于 hH2L1, 其余受体的亲和力三者之间无明显差异。

表 14. 与 Fc 受体的亲和力检测结果

分组	亲和力 (KD)				
	FcRn (μM)	FcγRI (nM)	FcγRIIa (μM)	FcγRIIb (μM)	FcγRIIIa (μM)
hH2L1	0.549	13.9	4.00	35.8	0.178
3d	0.557	9.81	3.51	13.8	0.300
PADCEV	0.513	12.3	2.77	16.3	0.252

实施例 3 靶向 Nectin-4 抗体偶联药物内吞活性研究

以高表达 Nectin4 的稳转细胞株 PC-3-Nectin4(2-4) (自制) 细胞作为靶细胞检测

HH2L1、3D 及 PADCEV 的药物内吞作用。

实验方法：取生长至对数期的靶细胞，离心收集细胞，以完全培养基（含有 10% FBS 和 250 μ g/ml G418 的 F-12K 培养基）调整密度至 5×10^5 个/ml，分别吸取 1ml 细胞悬液至 EP 管中，即 5×10^5 个细胞，然后离心，弃上清，并用 PBS 清洗两遍。取样品 hH2L1、3d 及 PADCEV 各 200 μ l 加入细胞中，然后分别置于 4 $^{\circ}$ C（作为对照组）和 37 $^{\circ}$ C（作为实验组），反应 2h 后加入荧光标记二抗 Goat Anti human IgG Fc-FITC（购自 Sigma）4 $^{\circ}$ C 孵育 1h，最后利用流式细胞仪检测荧光强度，按公式计算样品内吞率：tx 时间点的内吞百分比 = $(1 - 37^{\circ}\text{C 样品的荧光值} / 4^{\circ}\text{C 样品的荧光值}) \times 100\%$ （tx 表示一抗与细胞孵育的 x 时间）

结果表明，通过与无关抗体比较，PC-3-Nectin4(2-4)细胞表面有较高水平的靶蛋白 Nectin4 的表达，且与目的 ADC、裸抗及 PADCEV 均有较强的结合能力。从目前的结果来看，3d 及三批 ADC 原液与 PADCEV 的药物内吞效应之间无明显差异。

实验结果见表 15。

表 15. hH2L1、3d 和 PADCEV 的内吞作用检测结果

分组	平均值			中位值		
	4 $^{\circ}$ C	37 $^{\circ}$ C	内吞率	4 $^{\circ}$ C	37 $^{\circ}$ C	内吞率
空白	229	N/A	N/A	216	N/A	N/A
hH2L1	83591	29646	64.53%	78157	19948	74.48%
3d	90122	42886	52.41%	85562	30891	63.90%
PADCEV	83966	33129	60.54%	78925	25038	62.28%

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求的范围。

权 利 要 求

1. 一种靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐，其包含与药物共价连接的抗 Nectin-4 的抗体或其片段；

其中，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段包含重链和轻链，所述重链和轻链分别包含如下所示的重链互补决定区 1 至 3 (CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3) 和轻链互补决定区 1 至 3 (CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3)：

(i) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；和，氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3；

(ii) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；和，氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3；

(iii) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；和，氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体药物偶联物或其盐，其特征在于，所述抗体药物偶联物或其盐具有分子式 $Ab-[L-CTD]_m$ ，其中 Ab 表示所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段，L 表示接头，CTD 表示药物，m 表示相对于每一分子 Ab 的药物平均连接数；

优选地，CTD 为细胞毒药物，优选地，CTD 为选自以下的一种或多种：微管抑制剂类 MMAE、DM1、DM4、Tublysin、鹅膏蕈碱、卡奇霉素、艾日布林及所述药物的衍生物；拓扑异构酶抑制剂类 SN38、依喜替康及所述药物的衍生物；DNA 结合剂 PBD、多柔比星及所述药物的衍生物；

优选地，m 为 1.0-5.0，优选为 3.0-4.2，更优选为 3.5-4.5，进一步优选为 3.8-4.2，又优选为 3.9-4.1，特别优选为 4.0。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体药物偶联物或其盐，其特征在于，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段的重链和轻链分别包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中所述重链可变区 (VH) 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其变体，所述轻链可变区 (VL) 包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其变体；

优选地，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 分别包含：

(i) 如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基

酸序列或其变体；

(ii) 如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或其变体；

(iii) 如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或其变体；或

(iv) 如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其变体。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体药物偶联物或其盐，其特征在于，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段为针对 Nectin-4 的单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、单域抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式；或者，所述抗体或其片段为针对 Nectin-4 的半抗体或半抗体的抗原结合片段，例如 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv；

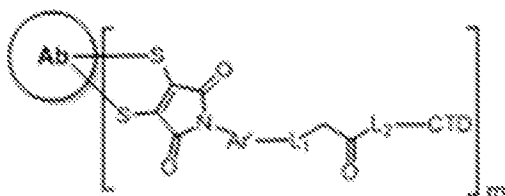
优选地，所述 Nectin-4 为哺乳动物 Nectin-4，优选灵长类动物 Nectin-4，更优选人 Nectin-4。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体药物偶联物或其盐，其特征在于，所述抗体为单克隆抗体，优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体；更优选地，所述单克隆抗体的重链恒定区为 IgG1 或 IgG4 亚型，轻链恒定区为 κ 型；

或者，所述抗体为免疫球蛋白，具体为 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM，例如 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 的人亚型，更优选为人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型；

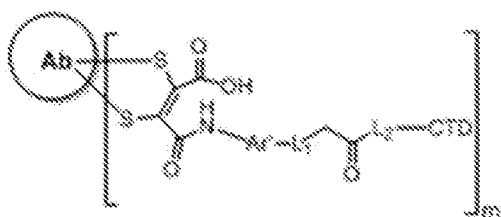
优选地，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段包含重链恒定区，所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或其变体；或者，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段包含轻链恒定区，所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列或其变体。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体药物偶联物或其盐，其特征在于，所述抗体药物偶联物或其盐具有如下式 Ia 和/或 Ib 所示的结构：



Ia

和/或



Ib

其中：

Ab 是所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段；

Ar' 为选自如下的任一个：取代或未取代的 C6-C10 亚芳基和取代或未取代的 5-12 元亚杂芳基，其中所述取代指基团上的氢原子被一个或多个取代基所取代，所述取代基选自如下的任一个：卤素（F、Cl、Br 或 I）、卤代烷基（例如卤代 C1-C6 烷基、优选卤代 C1-C4 烷基，例如三氟甲基）和烷氧基（例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基，例如甲氧基）；

L₁ 为连接于 Ar' 基团上的 -O(CH₂CH₂O)_n-，其中 n 选自 1-24 中任一整数，优选为 1-10、更优选 3-5 中的任意整数；

L₂ 为酶切片段，如二肽或三肽或四肽或其与自释放结构片段的组合（即 2-4 个氨基酸组成的多肽片段或其与自释放结构片段的组合），如 Val-Ala、Val-Ala-PAB、Val-Cit、Val-Cit-PAB、Phe-Lys-PAB、Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Phe-Gly（GGFG）、MAC glucuronide phenol。

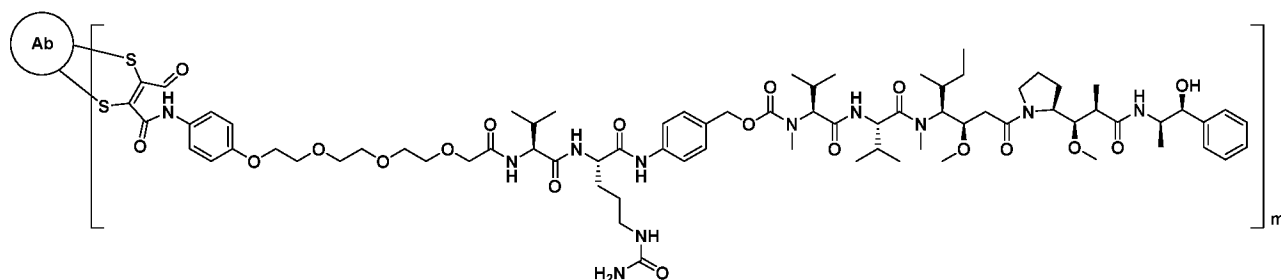
7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗体药物偶联物或其盐，其特征在于，L₂-CTD 为 VcMMAE、GGFG-Dxd 或 VC-seco-DUBA；

优选地，在 Ar' 取代或未取代的 5-12 元亚杂芳基时，杂原子为 N；

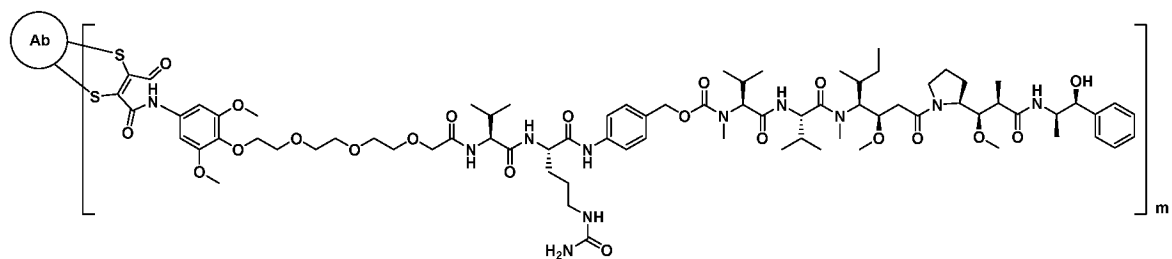
优选地，Ar' 为取代或未取代的 C6 亚芳基或取代或未取代的 6 元亚杂芳基；

更优选地，所述抗体药物偶联物或其盐具有如下结构：

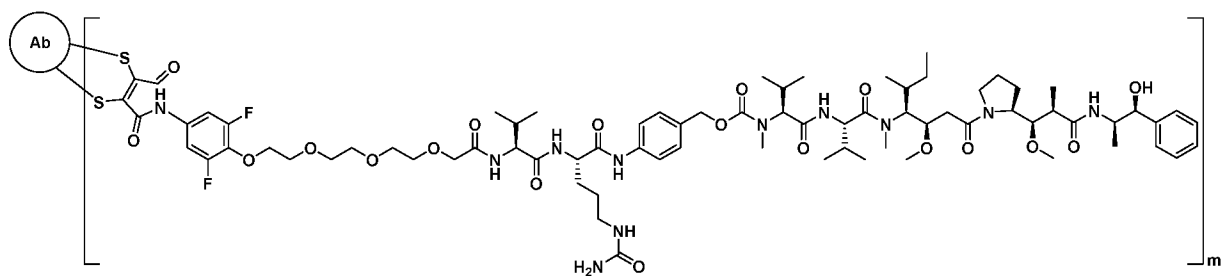
偶联物 ADC-1：



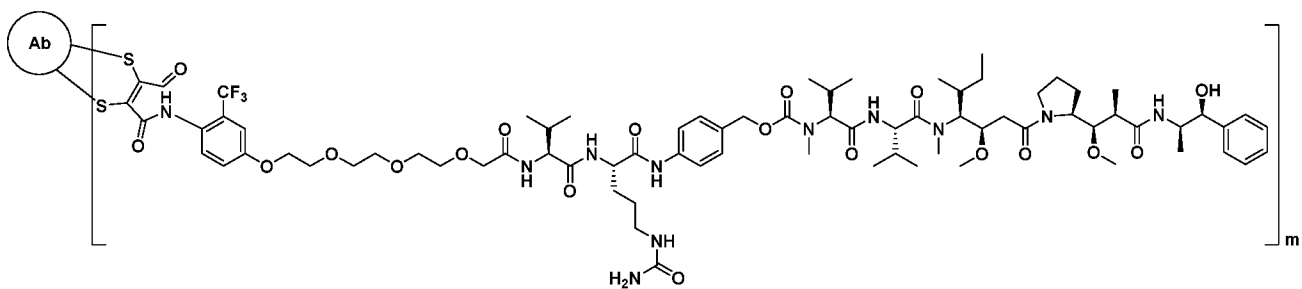
偶联物 ADC-2：



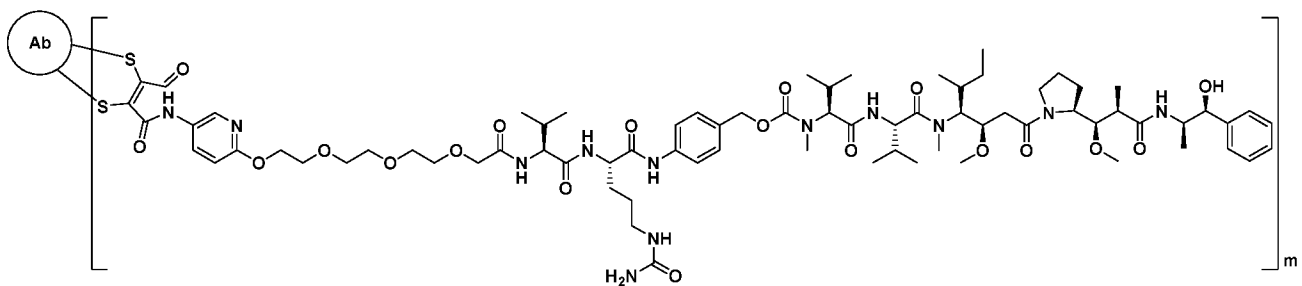
偶联物 ADC-3:



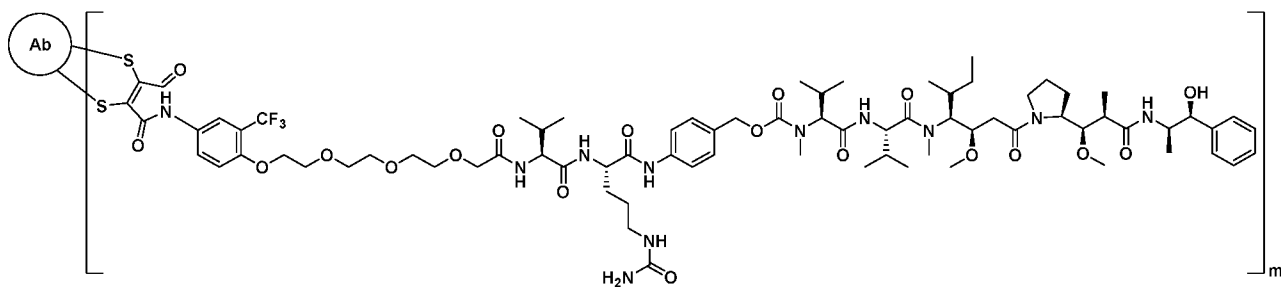
偶联物 ADC-4:



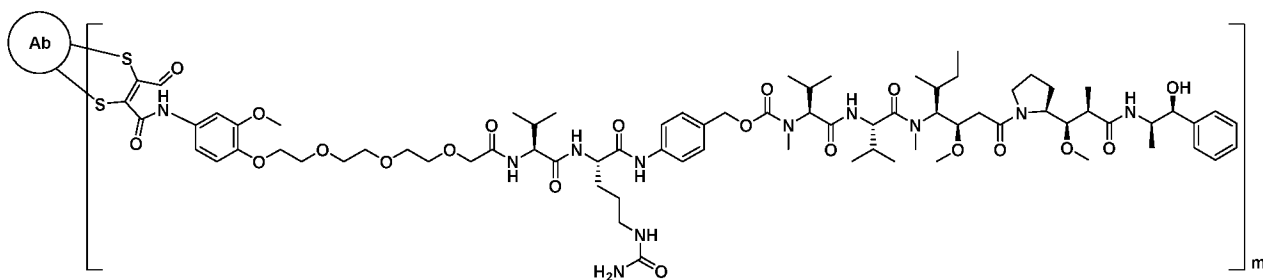
偶联物 ADC-5:



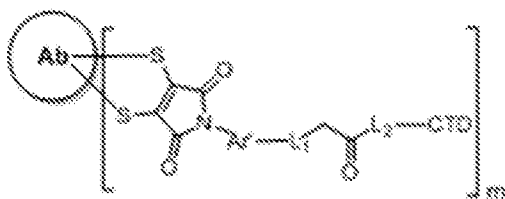
偶联物 ADC-6:



偶联物 ADC-7:

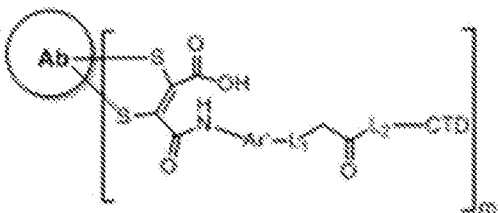


8. 一种靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐的制备方法, 所述抗体药物偶联物或其盐具有式 Ia 和 Ib 所示的结构:



Ia

和/或



Ib

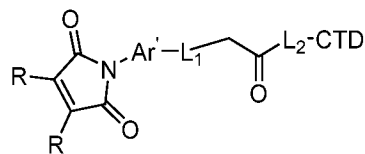
所述方法包括以下步骤：

(1) 使抗 Nectin-4 的抗体或其片段与还原试剂在缓冲液中反应，得到经还原后的抗体或其片段；

(2) 使药物接头(连接子-药物缀合物)与步骤(1)得到的经还原后的抗体或其片段

在缓冲液与有机溶剂的混合液中进行交联, 得到靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物。

9. 根据权利要求 8 所述的制备方法, 其特征在于, 所述药物接头具有如下式 Ic 所示的结构:

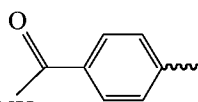


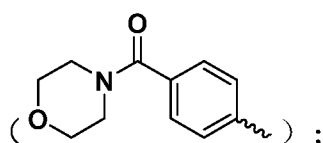
Ic

其中:

R 为 X 或 R'S, 其中 X 为卤素 (F、Cl、Br 或 I), 优选为 Br 或 I; R' 为取代或未取代的 C6-C10 芳基或者取代或未取代的 5-12 元杂芳基, 其中所述取代指基团上的氢原子被一个或多个取代基所取代, 所述取代基选自如下的任一个: 烷基 (例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 例如甲氧基)、卤素 (F、Cl、Br 或 I)、酯基、酰胺基和氰基;

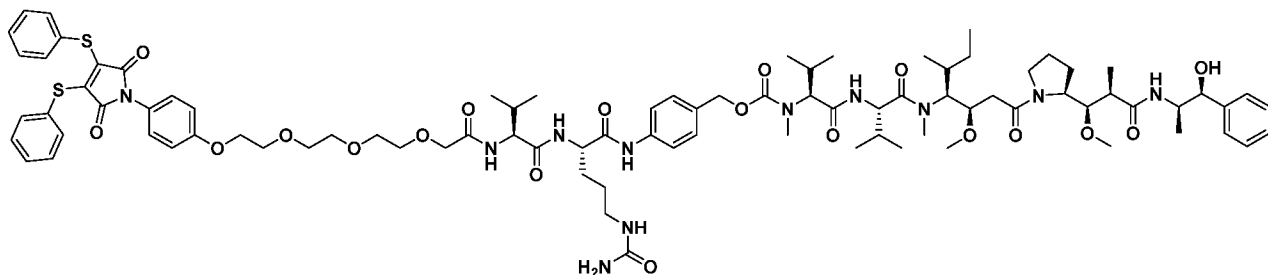
优选地, R 为 R'S, 其中 R' 为苯基或取代的苯基, 在取代的苯基中, 取代基选自烷基 (例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C4 烷基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C4 烷氧基, 优选甲氧基)、卤素 (F、Cl、Br 或 I)、酯基、酰胺基和氰基; 优选地, R' 为

苯基、4-甲基甲酰基取代苯基 () 或 4-甲酰基吗啉取代苯基

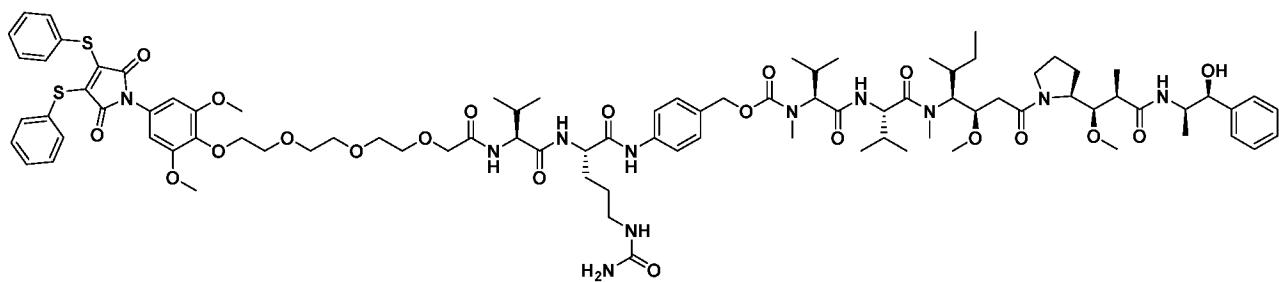


Ar', L₁, L₂ 和 CTD 如权利要求 6 至 8 中任一项所限定。

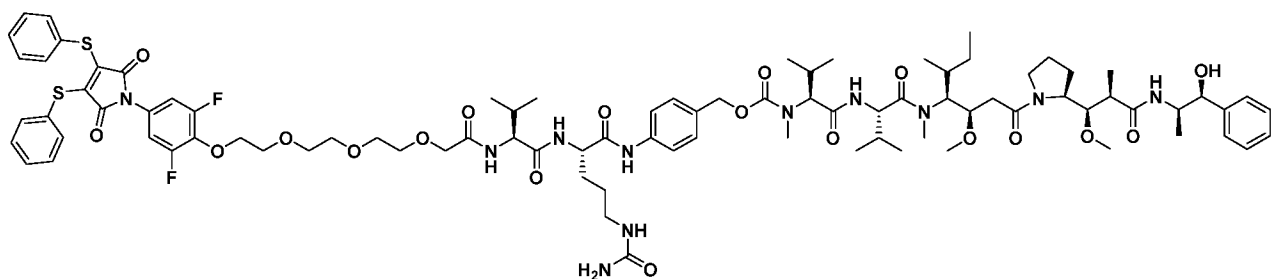
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的制备方法, 其特征在于, 所述药物接头为选自如下的任一个:



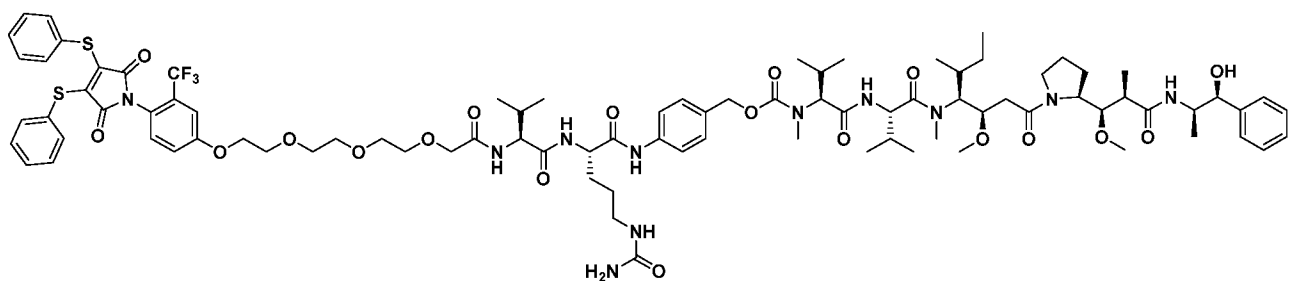
A-1



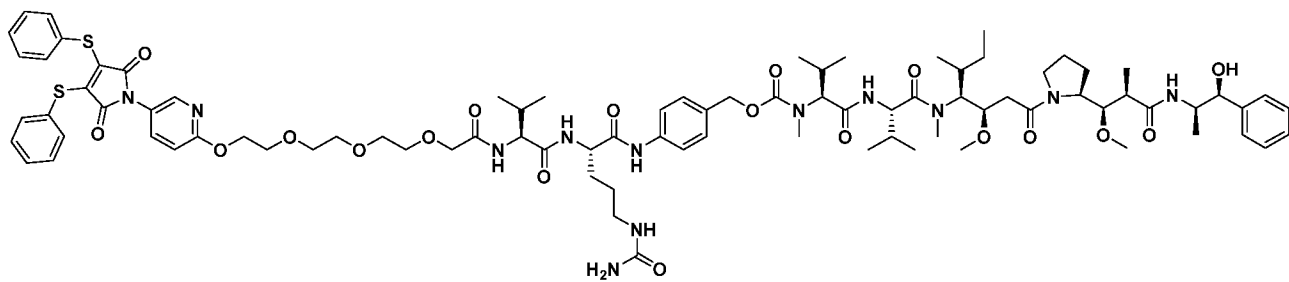
A-2



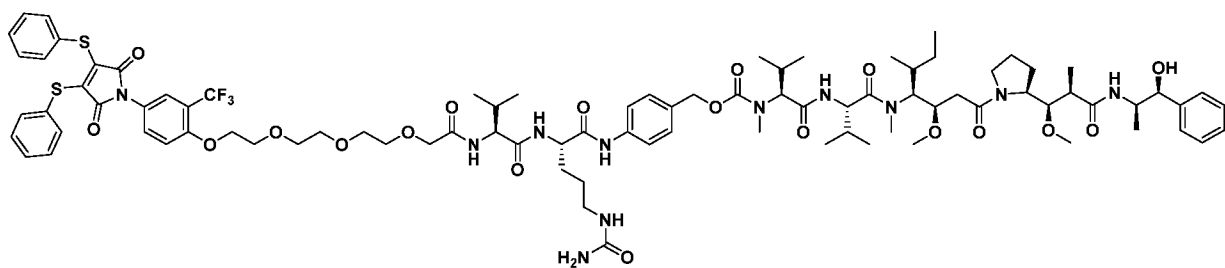
A-3



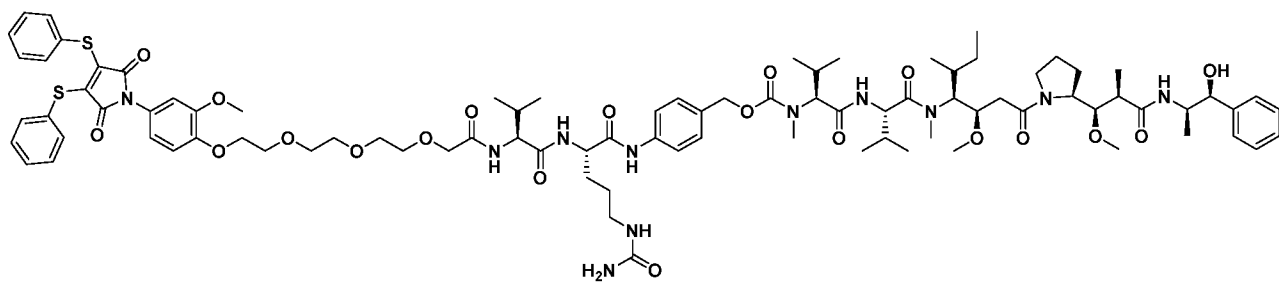
A-4



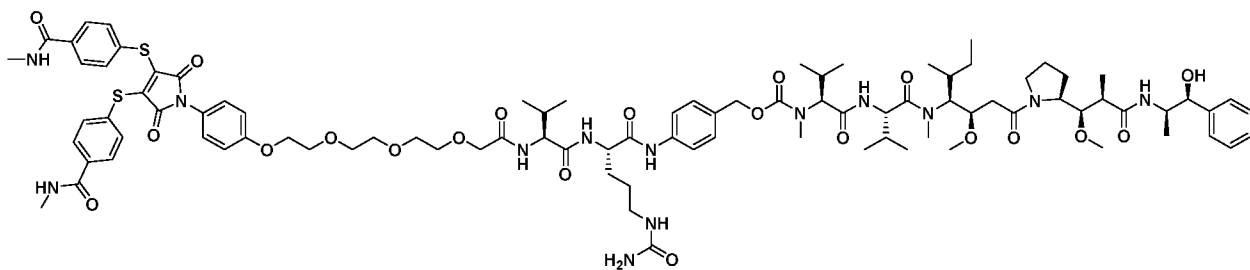
A-5



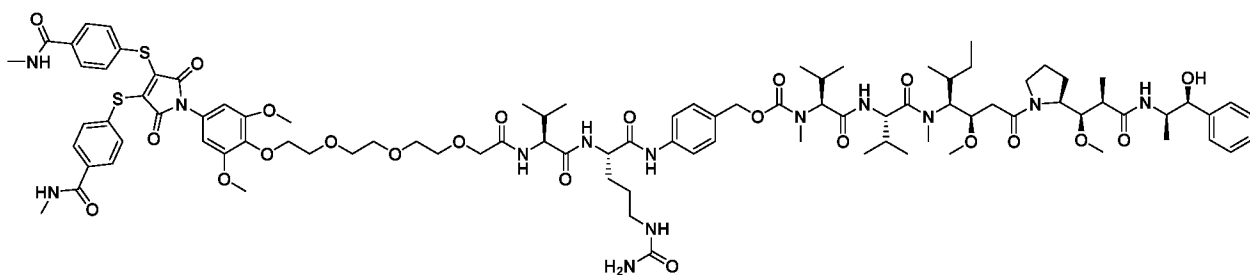
A-6



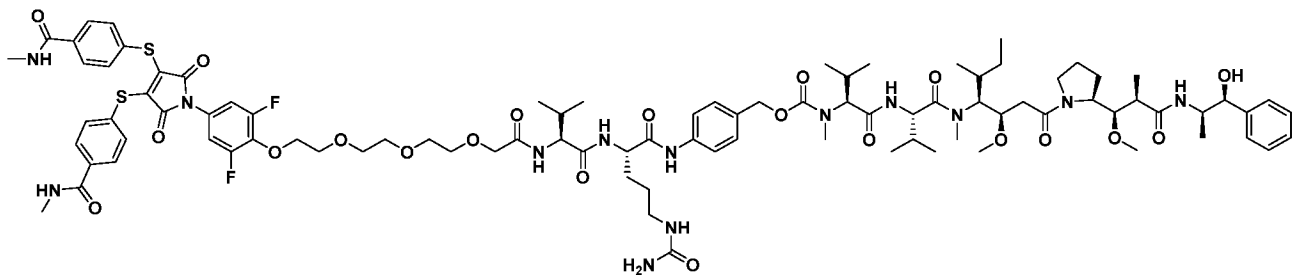
A-7



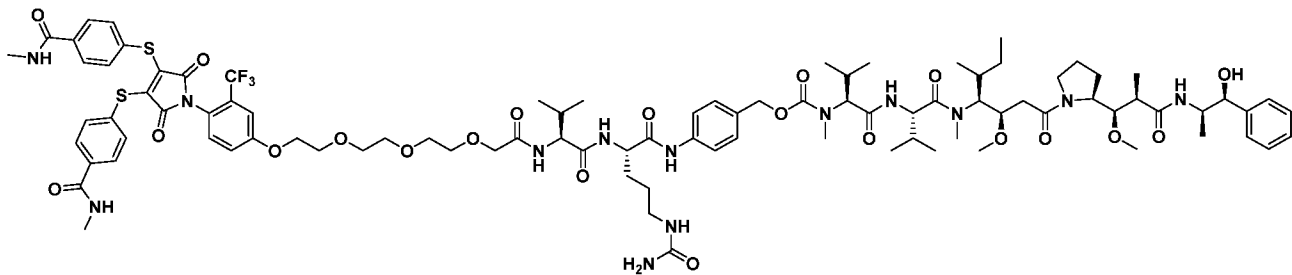
B-1



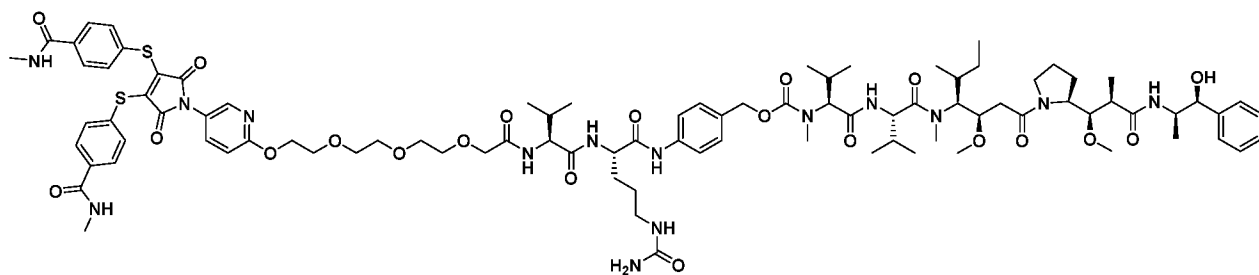
B-2



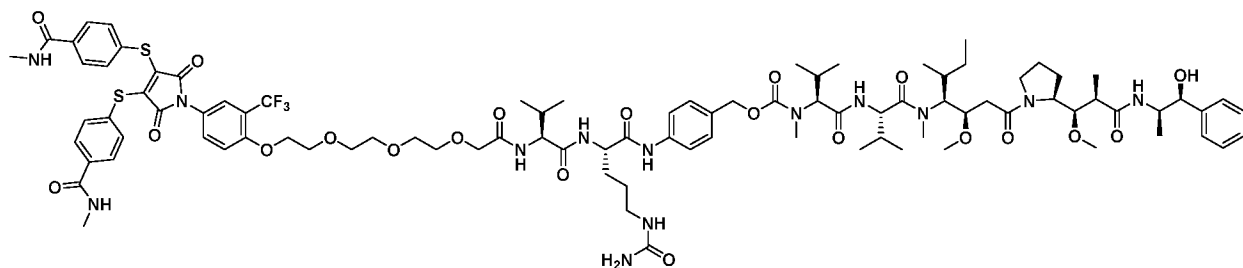
B-3



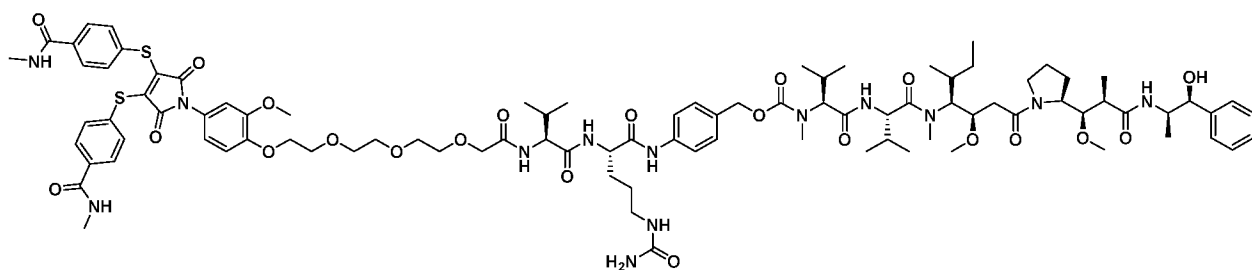
B-4



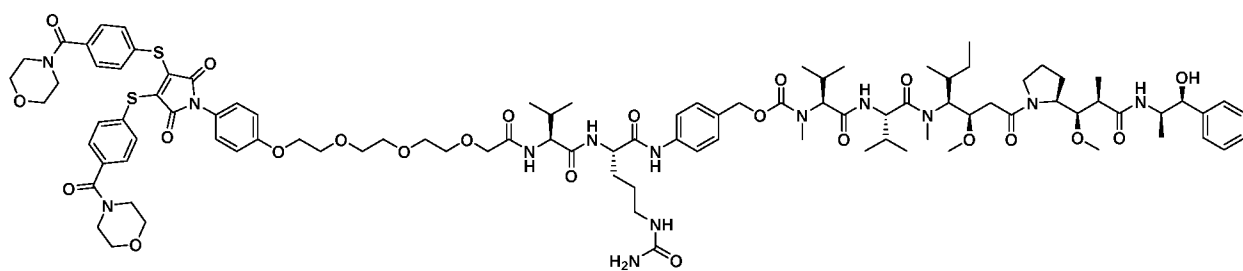
B-5



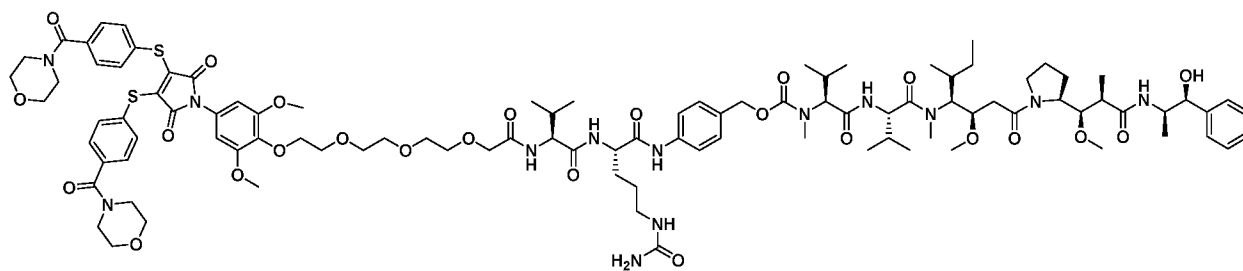
B-6



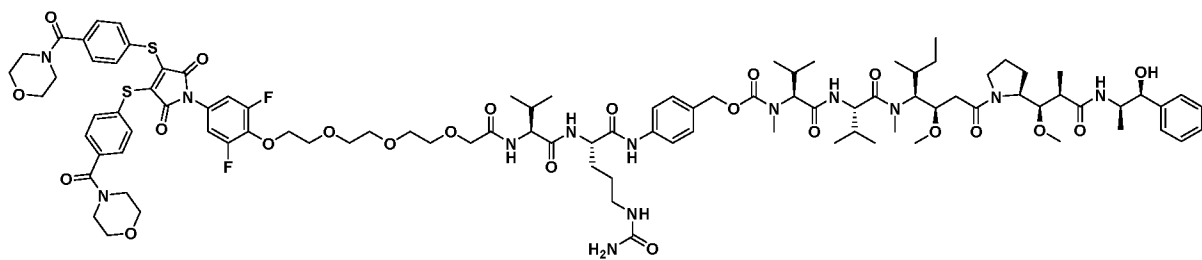
B-7



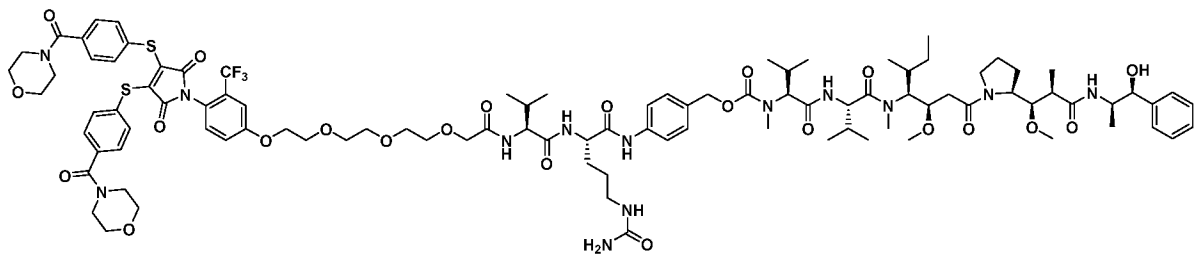
C-1



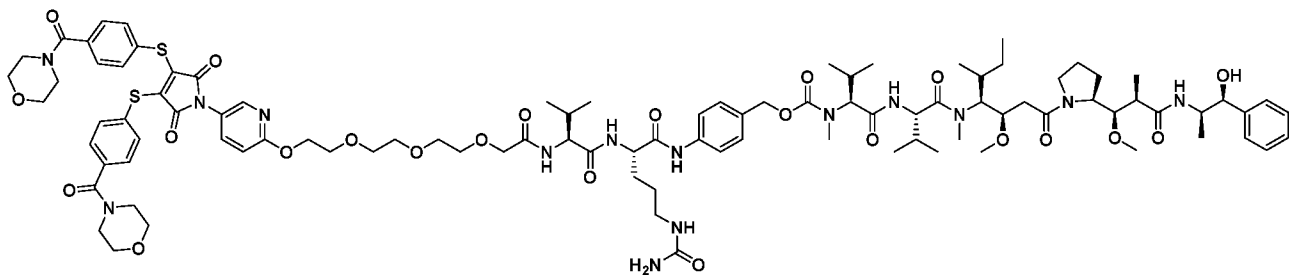
C-2



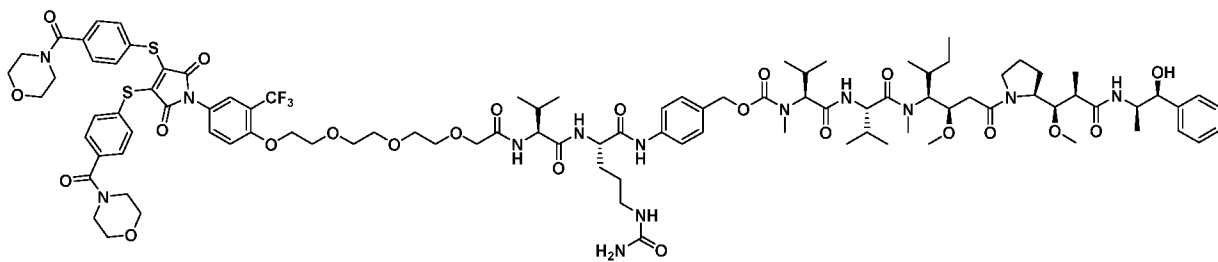
C-3



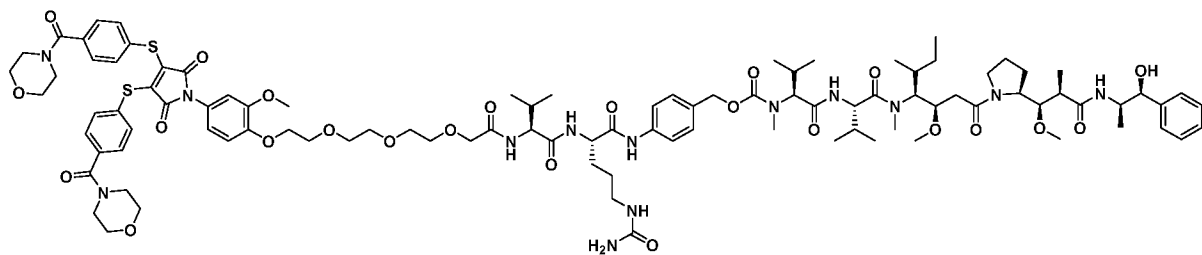
C-4



C-5



C-6



C-7

11. 根据权利要求 8 至 10 中任一项所述的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括以下步骤：

a. 抗体还原：将 ≥ 5.5 倍抗体摩尔当量的还原剂加入到含 5-30mg/mL 浓度抗体的磷酸盐缓冲液中，反应 1.5-2 h，其中所述还原剂为选自 TCEP、DTT、2-MEA 和 DTBA 中的一种或多种；

b. 抗体偶联：将步骤 a 中经还原的抗体置换到 pH 6.5-7.8 的磷酸盐缓冲液中，并将抗体稀释到 3.5-15mg/mL 浓度，将溶解于有机共溶剂中的 4.5-6.5 倍抗体摩尔当量的含药接头加入到所述抗体稀释液中，在 15-35℃ 下搅拌反应 ≥ 0.5 h，其中所述有机共溶剂为选自 DMA、DMSO、DMF 和 ACN 中的一种或多种；

c. 疏水层析：使用疏水填料对抗体偶联产物进行疏水层析纯化；

优选地，所述制备方法在步骤 b 之后或步骤 c 之后还包括以下步骤：

d. 水解：将抗体偶联产物置换到 pH 7.4-9.0 的磷酸盐缓冲液中，在 $35 \pm 10^\circ\text{C}$ 下加热 2-24 h，得到水解产物。

12. 一种抗 Nectin-4 的抗体或其片段，其包含重链和轻链，所述重链和轻链分别包含如下所示的重链互补决定区 1 至 3（CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3）和轻链互补决定区 1 至 3（CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3）：

氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；和，氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3。

13. 根据权利要求 12 所述的抗 Nectin-4 的抗体或其片段，其特征在于，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段的重链和轻链分别包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其变体，所述轻链可变区（VL）包含 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其变体；

优选地，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）分别包含：

(A) 如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或其变体；或

(B) 如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其变体；和，如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其变体；

进一步优选地，所述抗 Nectin-4 的抗体或其片段如权利要求 4 或 5 中任一项所限定。

14. 一种核酸分子，其包含编码权利要求 12 或 13 所述的抗 Nectin-4 的抗体或其片段中包含的轻链可变区、重链可变区、重链或轻链的核苷酸序列。

15. 一种载体，其包含权利要求 14 所述的核酸分子。

16. 一种宿主细胞，其包含权利要求 14 所述的核酸分子和/或权利要求 15 所述的载体。

17. 一种组合物，所述组合物包含权利要求 1 至 7 中任一项所述的靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐、权利要求 12 或 13 所述的抗 Nectin-4 的抗体或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体和/或权利要求 16 所述的宿主细胞。

18. 权利要求 1 至 8 中任一项所述的靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐、权利要求 12 或 13 所述的抗 Nectin-4 的抗体或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞和/或权利要求 17 所述的组合物在制备用于治疗肿瘤的药品中的用途。

19. 根据权利要求 18 所述的用途，其特征在于，所述肿瘤为与 Nectin-4 高表达相关的肿瘤或癌症；

优选地，所述肿瘤或癌症为选自如下的任一种：膀胱癌，乳腺癌，卵巢癌，胰腺癌，肝细胞癌，胃癌，非霍奇金淋巴瘤，霍奇金淋巴瘤，急性淋巴细胞性白血病，间变性大细胞淋巴瘤，多发性骨髓瘤，前列腺癌，非小细胞肺癌，小细胞肺癌，恶性黑色素瘤，鳞状细胞癌，胶质母细胞瘤，肾细胞癌，胃肠道肿瘤，前列腺癌，直肠癌，神经胶质瘤，间皮瘤。

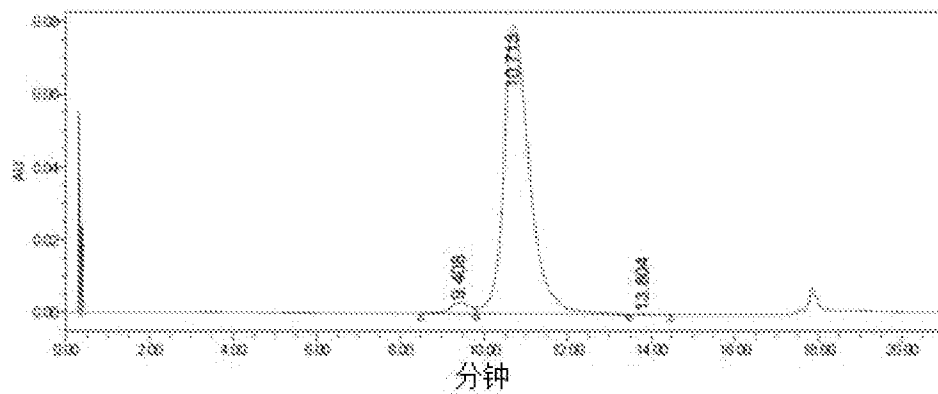
20. 一种用于治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用权利要求 1 至 8 中任一项所述的靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物或其盐、权利要求 12 或 13 所述的抗 Nectin-4 的抗体或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞和/或权利要求 17 所述的组合物。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述受试者为哺乳类动物，优选地为灵长类动物，更优选为人；

优选地，所述肿瘤为与 Nectin-4 高表达相关的肿瘤或癌症；

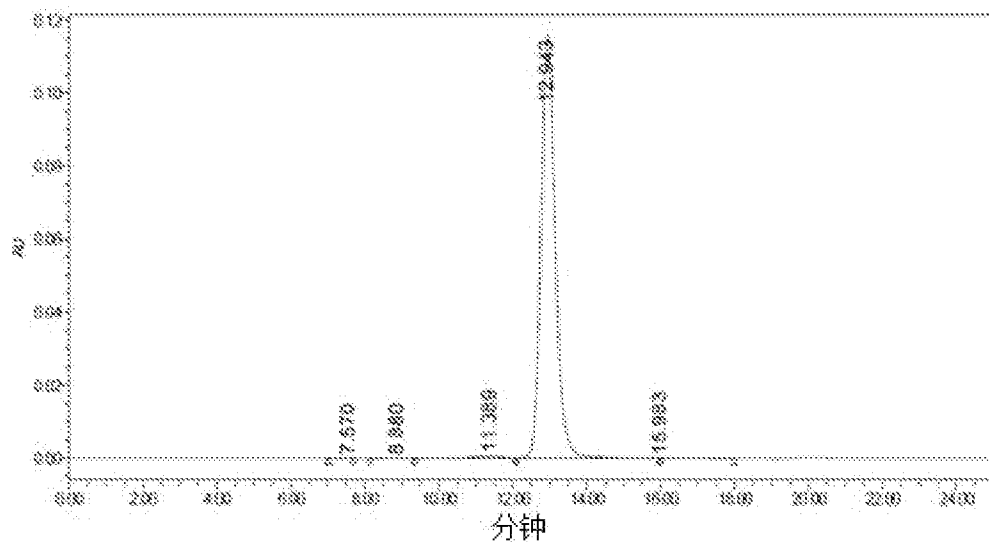
优选地，所述肿瘤或癌症为选自如下的任一种：膀胱癌，乳腺癌，卵巢癌，胰腺癌，肝细胞癌，胃癌，非霍奇金淋巴瘤，霍奇金淋巴瘤，急性淋巴细胞性白血病，间变性大细胞淋巴瘤，多发性骨髓瘤，前列腺癌，非小细胞肺癌，小细胞肺癌，恶性黑色素瘤，鳞状细胞癌，胶质母细胞瘤，肾细胞癌，胃肠道肿瘤，前列腺癌，直肠癌，神经胶质瘤，间皮瘤。

1/6



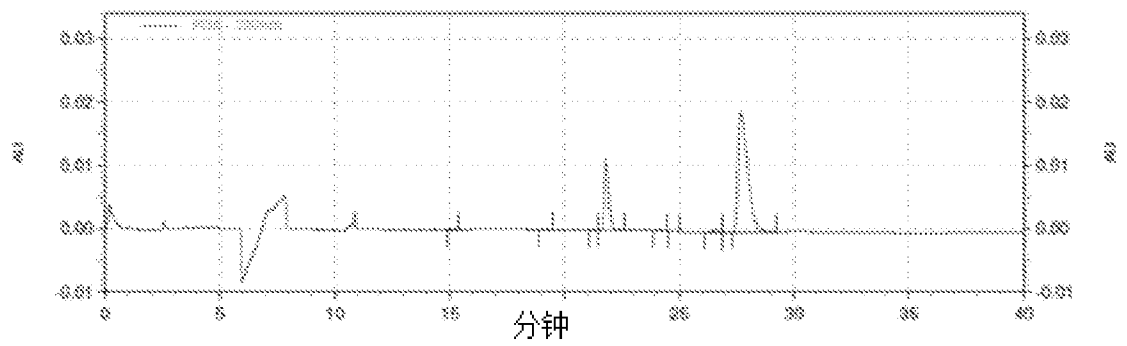
时间 (min)	面积	面积百分比 (%)	高度
9.408	105247	3.00	3102
10.713	3404231	96.91	79100
13.804	3211	0.09	98

1A

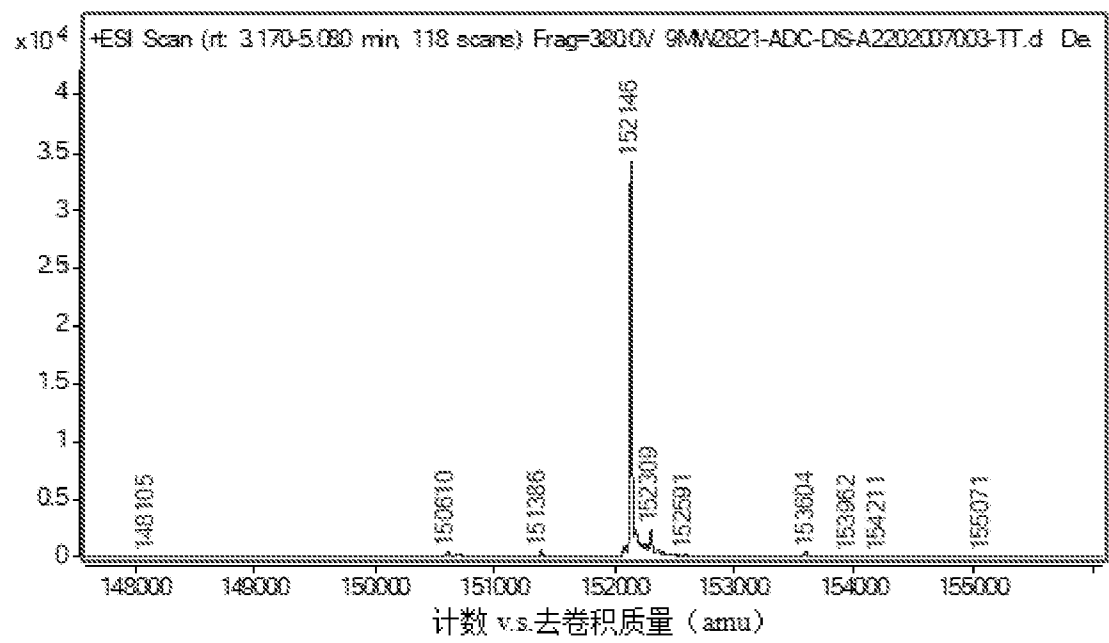


时间 (min)	面积	面积百分比 (%)	高度
7.570	339	0.01	49
8.880	1853	0.06	34
11.389	34848	1.12	662
12.943	3058044	98.67	115675
15.983	4244	0.14	78

1B



时间 (min)	面积	面积百分比 (%)
15.025	35	0.39
19.100	15	0.16
21.342	15	0.17
21.808	2278	25.21
24.017	9	0.10
24.775	14	0.16
26.533	89	0.99
27.183	13	0.14
27.692	6564	72.67



Dn	实测分子量 (Da)	高度	面积	比率-H	比率-A
D3	150610	444.62	9283	0.012	0.013
D3+suger	150772	50.61	1740	0.001	0.003
D4	152146	34221.09	614335	0.920	0.893
D4+suger	152309	2478.63	62571	0.067	0.091
Sum		37194.95	687929	1.000	1.000
DAR				3.99	3.98

1D

图 1

4/6

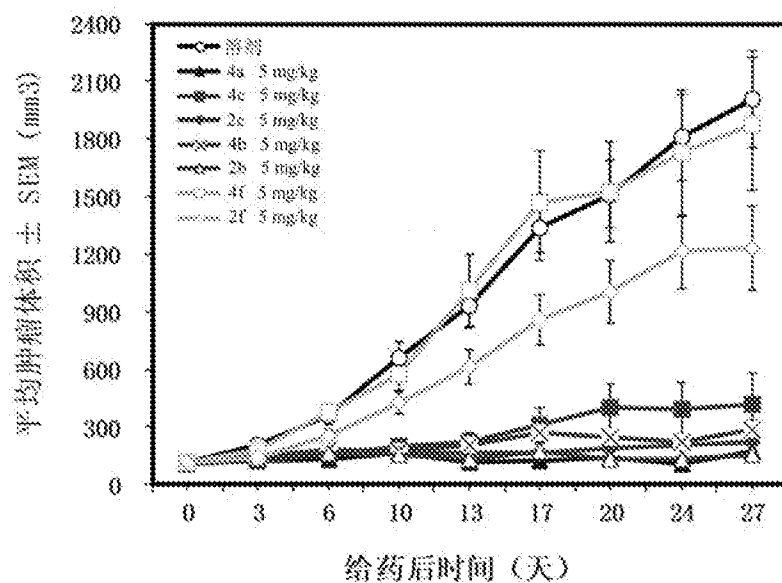


图 2

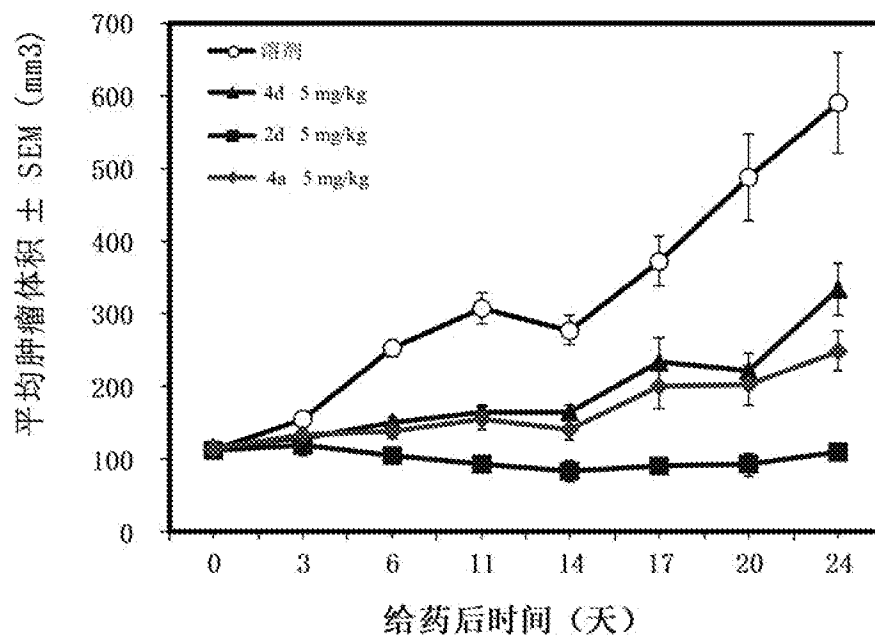


图 3

5/6

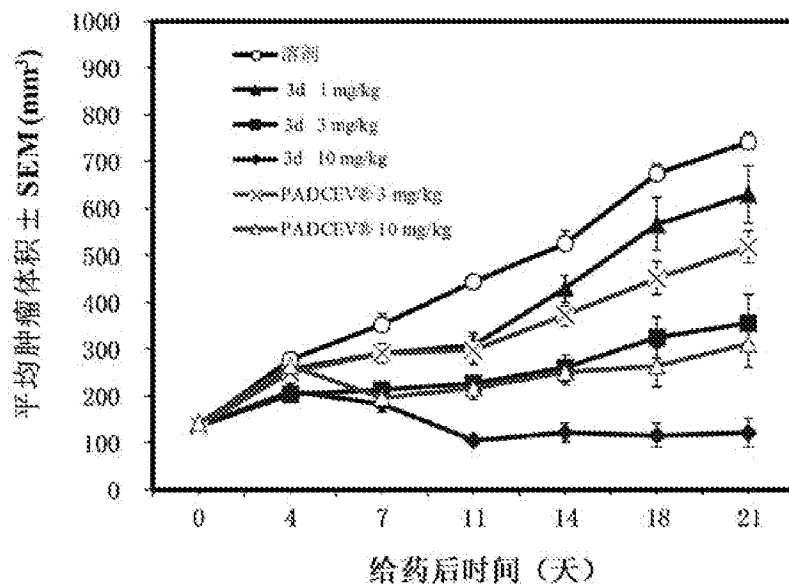


图 4

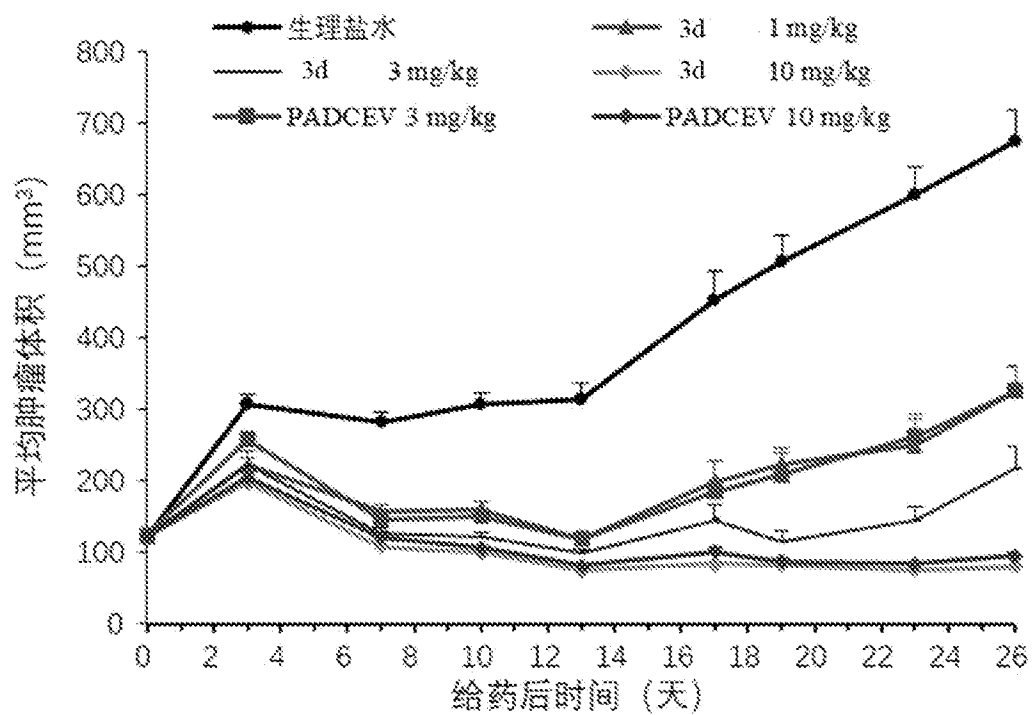


图 5

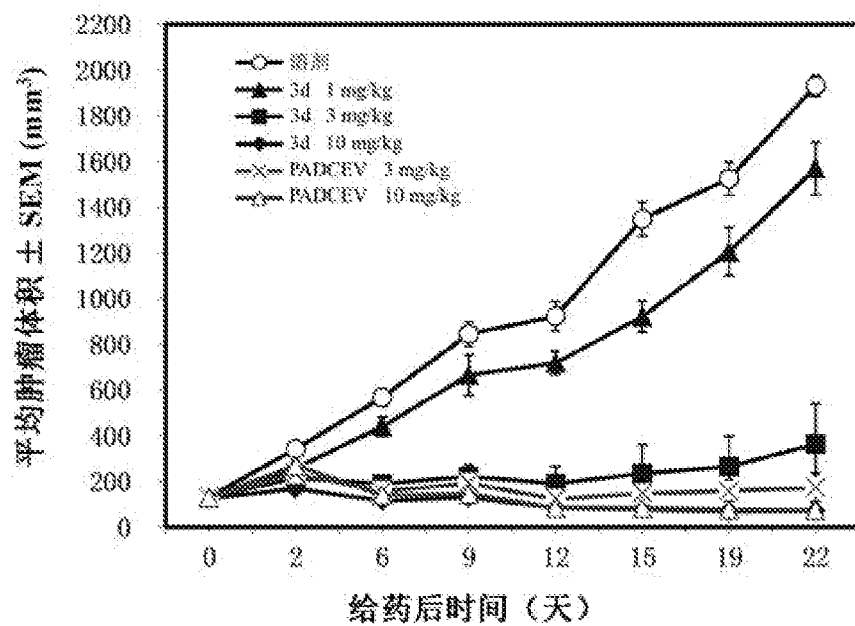


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/090450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/68(2017.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; C07K; A61P

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

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

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, baidu, pubmed, STN, 江苏迈威康新药研发有限公司, 周伟, Nectin-4, 抗体, 缀合物, 偶联物, conjugate, SEQ ID NOs: 1-20

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113527486 A (MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.) 22 October 2021 (2021-10-22) entire document	1-21
A	WO 2021069508 A1 (Aix-Marseille University et al.) 15 April 2021 (2021-04-15) entire document	1-21
A	CN 109810039 A (SHANGHAI QINGRUN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 28 May 2019 (2019-05-28) entire document	1-21
A	WO 2017042210 A1 (INSERM INSTITUT NAT DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE et al.) 16 March 2017 (2017-03-16) entire document	1-21
A	WO 2019243832 A1 (BICYCLETX LIMITED) 26 December 2019 (2019-12-26) entire document	1-21
A	CHALLITA-EID, P. M. et al. "Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models." <i>Cancer Research</i> , Vol. 76, No. 10, 24 March 2016 (2016-03-24), pp. 3003-3013	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 July 2022

Date of mailing of the international search report

27 July 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/090450

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/090450

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **20-21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 20-21 relate to a method for treating tumors, which belongs to a method for treating diseases as defined in PCT Rule 39.1(iv). However, a search was still conducted on the basis of a pharmaceutical use.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/090450

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
CN	113527486	A	22 October 2021	None			
WO	2021069508	A1	15 April 2021	IL	291966	D0	01 June 2022
				AU	2020364959	A1	07 April 2022
				CA	3156451	A1	15 April 2021
CN	109810039	A	28 May 2019	None			
WO	2017042210	A1	16 March 2017	JP	2018531913	A	01 November 2018
				US	2018243434	A1	30 August 2018
				EP	3347048	A1	18 July 2018
				ES	2794557	T3	18 November 2020
WO	2019243832	A1	26 December 2019	PH	12020552179	A1	28 June 2021
				CN	112601539	A	02 April 2021
				KR	20210029783	A	16 March 2021
				TW	202016129	A	01 May 2020
				WO	2019243833	A1	26 December 2019
				BR	112020025985	A2	23 March 2021
				IL	279489	D0	31 January 2021
				JP	2021527701	A	14 October 2021
				SG	11202012413 T	A	28 January 2021
				US	2022089643	A1	24 March 2022
				AU	2019289199	A1	11 February 2021
				EP	3810167	A1	28 April 2021
				US	2019389906	A1	26 December 2019
				KR	20210025603	A	09 March 2021
				EP	3810169	A1	28 April 2021
				CN	112566651	A	26 March 2021
				CA	3101427	A1	26 December 2019
				IL	279488	D0	31 January 2021
				BR	112020025715	A2	06 April 2021
				SG	11202012415 P	A	28 January 2021
				CA	3101164	A1	26 December 2019
				AU	2019289200	A1	11 February 2021
				JP	2021527702	A	14 October 2021
				US	2021269480	A1	02 September 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/090450

A. 主题的分类

A61K 47/68(2017.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; C07K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, baidu, pubmed, STN, 江苏迈威康新药研发有限公司, 周伟, Nectin-4, 抗体, 缀合物, 偶联物, conjugate, SEQ ID NOs: 1-20

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 113527486 A (迈威上海生物科技股份有限公司) 2021年10月22日 (2021 - 10 - 22) 全文	1-21
A	WO 2021069508 A1 (UNIVERSITÉ D' AIX-MARSEILLE等) 2021年4月15日 (2021 - 04 - 15) 全文	1-21
A	CN 109810039 A (上海青润医药科技有限公司) 2019年5月28日 (2019 - 05 - 28) 全文	1-21
A	WO 2017042210 A1 (INSERM INSTITUT NAT DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICA-LE等) 2017年3月16日 (2017 - 03 - 16) 全文	1-21
A	WO 2019243832 A1 (BICYCLETX LIMITED) 2019年12月26日 (2019 - 12 - 26) 全文	1-21
A	CHALLITA-EID, P.M. 等. "Enfortumab Vedotin Antibody - Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models." Cancer Research., 第76卷, 第10期, 2016年3月24日 (2016 - 03 - 24), 第3003-3013页	1-21

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年7月6日

国际检索报告邮寄日期

2022年7月27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

陈皓

电话号码 86-(10)-53962068

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

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

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

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

3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 20-21
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求20-21涉及一种用于治疗肿瘤的方法，属于PCT Rule 39.1 (iv) 规定的疾病的治疗方法，但仍然基于其制药用途进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/090450

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113527486	A	2021年10月22日	无			
WO	2021069508	A1	2021年4月15日	IL	291966	D0	2022年6月1日
				AU	2020364959	A1	2022年4月7日
				CA	3156451	A1	2021年4月15日
CN	109810039	A	2019年5月28日	无			
WO	2017042210	A1	2017年3月16日	JP	2018531913	A	2018年11月1日
				US	2018243434	A1	2018年8月30日
				EP	3347048	A1	2018年7月18日
				ES	2794557	T3	2020年11月18日
WO	2019243832	A1	2019年12月26日	PH	12020552179	A1	2021年6月28日
				CN	112601539	A	2021年4月2日
				KR	20210029783	A	2021年3月16日
				TW	202016129	A	2020年5月1日
				WO	2019243833	A1	2019年12月26日
				BR	112020025985	A2	2021年3月23日
				IL	279489	D0	2021年1月31日
				JP	2021527701	A	2021年10月14日
				SG	11202012413T	A	2021年1月28日
				US	2022089643	A1	2022年3月24日
				AU	2019289199	A1	2021年2月11日
				EP	3810167	A1	2021年4月28日
				US	2019389906	A1	2019年12月26日
				KR	20210025603	A	2021年3月9日
				EP	3810169	A1	2021年4月28日
				CN	112566651	A	2021年3月26日
				CA	3101427	A1	2019年12月26日
				IL	279488	D0	2021年1月31日
				BR	112020025715	A2	2021年4月6日
				SG	11202012415P	A	2021年1月28日
				CA	3101164	A1	2019年12月26日
				AU	2019289200	A1	2021年2月11日
				JP	2021527702	A	2021年10月14日
				US	2021269480	A1	2021年9月2日