(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 2 月 17 日 (17.02.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/033578 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 47/68 (2017.01) *C07K 16/32* (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/112462

(22) 国际申请日: 2021 年 8 月 13 日 (13.08.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010814877.X 2020年8月13日 (13.08.2020) CN

(71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (**CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。正大天晴药业集团南京顺欣制药有限公司(**NANJING SHUNXIN PHARMACEUTICALS CO., LTD. OF CHIATAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP**) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区福英路 1099 号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。

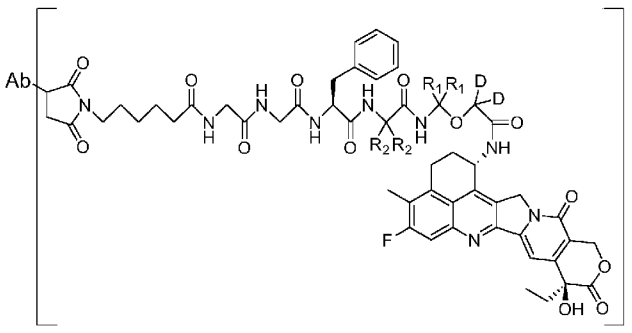
(72) 发明人: 张喜全 (**ZHANG, Xiquan**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 陈天玺(**CHEN, Tianxi**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 丰巍伟(**FENG, Weiwei**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 张兵(**ZHANG, Bing**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 唐小齐(**TANG, Xiaoqi**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 徐同杰(**XU, Tongjie**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 王晓金(**WANG, Xiaojin**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 盛化策(**SHENG, Huace**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 张正平(**ZHANG, Zhengping**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 王华(**WANG, Hua**); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。 高勇(**GAO, Yong**); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。

(74) 代理人: 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 (**BEIJING SUNHOPE INTELLECTUAL PROPERTY LTD.**); 中国北京市海淀区知春路9号坤讯大厦1106室, Beijing 100191 (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,

(54) **Title:** ANTIBODY DRUG CONJUGATE

(54) 发明名称: 抗体药物偶联物



VII

(57) **Abstract:** Provided is an antibody drug conjugate, specifically comprising a therapeutic antibody moiety, an intermediate linker moiety and a cytotoxic drug moiety which are linked. The therapeutic antibody moiety is an antibody against a HER2 target. The cytotoxic drug moiety is a camptothecin topoisomerase I inhibitor. The cytotoxic drug moiety or the linker-cytotoxic drug moiety is modified by means of deuterium substitution. The antibody drug conjugate can be used for the prevention or treatment of cancers.

(57) 摘要: 提供了一种抗体药物偶联物，具体包含相连接的治疗性抗体部分、中间接头部分和细胞毒药物部分，其中，治疗性抗体部分为针对HER2靶点的抗体，细胞毒药物部分为喜树碱类拓扑异构酶I抑制剂，对于细胞毒药物部分或者接头-细胞毒药物部分进行了氘取代的修饰。所述抗体药物偶联物可以用于癌症的预防或治疗。

WO 2022/033578 A1

[见续页]

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, 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)。

根据细则4.17的声明：

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

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))。

抗体药物偶联物

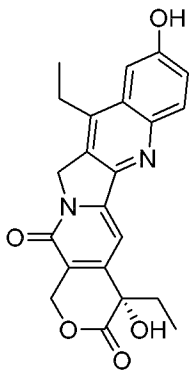
技术领域

本申请涉及抗体药物偶联物，其包含相连接的治疗性抗体部分、中间接头部分和细胞毒药物部分。本申请还涉及所述抗体药物偶联物在制备用于预防及治疗癌症的药物中的用途。

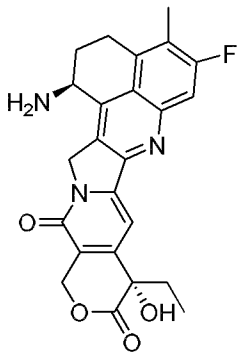
背景技术

抗体药物偶联物（Antibody-Drug Conjugate，ADC）是结合了治疗性抗体的高特异性和细胞毒药物的高杀伤活性的一类药物，其中治疗性抗体部分与细胞毒药物部分通过中间的接头部分连接。目前全球范围内已有至少八款ADC药物上市，其中brentuximab vedotin、polatuzumab vedotin与enfortumab vedotin的抗体部分分别针对靶点CD30、CD79b与Nectin-4，trastuzumab emtansine与trastuzumab deruxtecan的抗体部分针对HER2靶点，gemtuzumab ozogamicin与inotuzumab ozogamicin的抗体部分分别针对CD33和CD22靶点，sacituzumab govitecan的抗体部分针对TROP2靶点。作为细胞毒药物部分，brentuximab vedotin、polatuzumab vedotin与enfortumab vedotin采用作用于微管的奥利斯他汀类（auristatins）毒素分子，trastuzumab emtansine采用作用于微管的美登素类（maytansinoid）毒素分子，gemtuzumab ozogamicin与inotuzumab ozogamicin采用作用于DNA的卡奇霉素类（calicheamicins）毒素分子，最新上市的trastuzumab deruxtecan和sacituzumab govitecan均采用喜树碱类毒素分子。作为中间接头部分，trastuzumab emtansine采用不可断裂接头，上述ADC药物中的其余七个都采用可断裂的接头。

喜树碱（Camptothecin，CPT）类似物及衍生物通过结合于拓扑异构酶I而发挥抗肿瘤活性，其对很多肿瘤类型都表现出了显著的活性。为了克服CPT水溶性差的缺陷，有研究人员合成了多种CPT衍生物，其中盐酸伊立替康（CPT-11）为水溶性的前药，已获批用于转移性结直肠癌的治疗。然而CPT-11在体内必须经羧酸酯酶催化后才能转化为其活性形式SN-38（式I），这一转化效率极低，SN38本身则由于溶解性差而很难成药。依沙替康（式II）（英文通用名：exatecan）为另一种水溶性的CPT衍生物，曾被尝试开发为抗肿瘤药物，但至2004年已停止开发，其不需要通过利用酶进行活化，另外，与作为伊立替康药效本体的SN-38相比，依沙替康的拓扑异构酶I抑制活性更强。



I



II

ADC 类药物结合了细胞毒小分子的高效能和抗体对特定肿瘤细胞的高选择性的双重优点，当前仍然存在开发可以针对更多适应症的高效低毒的 ADC 药物的需求。

发明内容

在一个方面，本申请提供了含氘代修饰的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，具体涉及接头或者细胞毒药物部分的氘代修饰。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中Ab表示抗体部分，L表示接头部分，U表示细胞毒药物部分，n为选自1至10的整数或小数。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中Ab（抗体部分）可以特异性结合肿瘤抗原（包括肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原），肿瘤抗原可以选自本领域已知的任何肿瘤预防或治疗的靶点，例如可以选自HER2、EGFR、CD20、CD30、CD33、CD47、CD79b、VEGF、VEGFR、MET、RET、PD-1、PD-L1等。

在一些实施方案中，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中Ab（抗体部分）是可以修饰的，例如包括一个或多个氨基酸的改变、增加或减少。

在一些实施方案中，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab是能够特异性结合HER2的抗体。

在一些实施方案中，本申请提供的通式为Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的抗体部分Ab为曲妥珠单抗，其具有下表S1所示的序列。

表S1 曲妥珠单抗序列

重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO：40)
重链CDR1	GFNIKDTYIH (SEQ ID NO：44)
重链CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO：28)
重链CDR3	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO：29)
轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO：39)
轻链CDR1	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO：30)
轻链CDR2	SASFLYS (SEQ ID NO：33)
轻链CDR3	QQHYTTPPT (SEQ ID NO：32)

在一些实施方案中，本申请提供的通式为Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的抗体部分Ab为帕妥珠单抗，其具有下表S2所示的序列。

表S2 帕妥珠单抗序列

重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT DYTMDWVRQA PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARNL GPSFYFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO：37)
重链CDR1	GFTFTDYTMD (SEQ ID NO：45)
重链CDR2	DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO：46)
重链CDR3	NLGPSFYFDY (SEQ ID NO：47)
轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS IGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYIYPYTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO：38)
轻链CDR1	KASQDVSIGVA (SEQ ID NO：48)
轻链CDR2	SASYRYT (SEQ ID NO：49)
轻链CDR3	QQYYIYPYT (SEQ ID NO：50)

在一些实施方案中，本申请提供了一种具有通式 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分 Ab 包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 表位的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为包含 VH 和 VL 的 scFv，所述 VH 具有 K30 突变，和/或所述 VL 具有 F53 突变。在一些实施方案中，所述 VH 的序列中的第 30 位氨基酸从 K 突变为酸性氨基酸，例如 E。在一些实施方案中，所述 VL 的序列中的第 53 位氨基酸从 F 突变为中性氨基酸或碱性氨基酸，例如 Y、A、R。例如，scFv 可包含或者为在 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列中具有 K30 突变和/或 F53 突变的序列。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分 Ab 包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 表位的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv，所述第一抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：27、28 和 29 所示的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：30、34 和 32 所示的氨基酸序列；其中 SEQ ID NO：27 所示序列为 GFNIX$_2$DTYIH，X$_2$ 为 K 或 E；SEQ ID NO：34 所示序列为 SASX$_1$LYS，X$_1$ 为 F 或 Y。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分 Ab 包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 表位的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv，所述第一抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：43、28 和 29 所示的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：30、31 和 32 所示的氨基酸序列。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分 Ab 包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 表位的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv 且选自：

i. 所述第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含 SEQ ID NOs：41 和 42 所示的氨基酸序列；或

ii. 所述的第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含与 SEQ ID NOs：41 和 42 所示的氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

其中 SEQ ID NO：41 所示序列为：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIX$_2$DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS，X_2 为 K 或 E；

SEQ ID NO：42 所示序列为：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASX$_1$LYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK，X_1 为 F 或 Y。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分 Ab 包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 表位的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv，所述第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含根据 SEQ ID NOs：35 和 36 所示的氨基酸序列。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab包含单价且特异性地结合HER2表达细胞上的HER2的ECD4表位的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为scFv，所述第一抗原结合片段的VH和VL从N-末端到C-末端按照如下顺序排列：VH-linker-VL。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab还包含单价且特异性地结合HER2表达细胞上的HER2的ECD2表位的第二抗原结合片段，所述第二抗原结合片段为Fab。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab还包含单价且特异性地结合HER2表达细胞上的HER2的ECD2表位的第二抗原结合片段，所述第二抗原结合片段为Fab并且包含重链CDR1、重链CDR2、重链CDR3、轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3，所述重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3分别包含SEQ ID NOs：45、46和47所示的氨基酸序列，所述轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3分别包含SEQ ID NOs：48、49和50所示的氨基酸序列。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab还包含单价且特异性地结合HER2表达细胞上的HER2的ECD2表位的第二抗原结合片段，所述第二抗原结合片段为Fab并且包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含SEQ ID NOs：37和38所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，本申请提供的通式为Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的抗体部分Ab如表S3所示。

表S3 示例性抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的抗体部分

名称	说明	第一抗原结合片段 (根据 Kabat 编号系统)	第二抗原结合片段
/	含表位的结构域	ECD4	ECD2
	形式	scFV	Fab
	原始序列	曲妥珠单抗	帕妥珠单抗
1	序列取代	VL：F53Y	/
2	序列取代	VH：K30E	/
3	序列取代	VL：F53Y VH：K30E	/

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab包含与第一抗原结合片段和/或第二抗原结合片段可操作性连接的免疫球蛋白功能域，所述免疫球蛋白功能域包含：i. CL、CH1、CH2、或CH3中的一个或多个，或者ii. Fc。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab包含与第一抗原结合片段和/或第二抗原结合片段可操作性连接的免疫球蛋白功能域，所述免疫球蛋白功能域包含：i. CL、CH1、CH2、或CH3中的一个或多个，或者ii. Fc，其中所述CL、CH1、CH2、CH3、Fc分别衍生自人IgG的CL、CH1、CH2、CH3、Fc。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab包含与第一抗原结合片段和/或第二抗原结合片段可操作性连接的免疫球蛋白功能域，

所述免疫球蛋白功能域包含：i. CL、CH1、CH2、或CH3中的一个或多个，或者ii. Fc，其中所述CL、CH1、CH2，CH3或Fc具有修饰或不具有修饰；优选，所述CH3或Fc具有的修饰例如是根据Kabat编号系统的第435和/或第436位氨基酸的取代。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab包含与第一抗原结合片段和/或第二抗原结合片段可操作性连接的免疫球蛋白功能域，所述免疫球蛋白功能域包含：i. CL、CH1、CH2、或CH3中的一个或多个，或者ii. Fc，其中所述Fc是包含第一Fc多肽和第二Fc多肽的二聚Fc，第一抗原结合片段与第一Fc多肽可操作性的连接，第二抗原结合片段与第二Fc多肽可操作性的连接。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab包含与第一抗原结合片段和/或第二抗原结合片段可操作性连接的恒定区，所述恒定区可以是免疫球蛋白天然序列恒定区或突变的恒定区，例如天然的或突变的CL、CH1、CH2、和/或CH3功能域中的一个或多个，在一些实例中，这些功能域通过本领域常规的方式可操作地连接，恒定区可以源自人免疫球蛋白的恒定区，如源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4，在一些实例中，恒定区可以具有修饰以改善其介导效应子功能的能力。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab包含与第一抗原结合片段和/或第二抗原结合片段可操作性连接的免疫球蛋白功能域或骨架，例如Fc，该术语Fc包括天然序列Fc区和变体Fc区，Fc可以是人Fc如源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4，Fc可以具有修饰以改善其介导效应子功能的能力，例如，在一些实施方案中，所述骨架具有修饰如knob into hole、H435R、Y436F、去岩藻糖等，在一些实施方案中，以上所述骨架的knob into hole的突变位点包括例如Y349C、T366S、L368A、Y407V、S354C和T366W等。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab包含与第一抗原结合片段和/或第二抗原结合片段可操作性连接的骨架；在一些实施方案中，所述骨架为包含第一Fc多肽和第二Fc多肽的二聚Fc；在一些实施方案中，所述的二聚Fc具有修饰；在一些实施方案中，二聚Fc具有H435R和/或Y436F，该修饰可以处于第一Fc多肽、第二Fc多肽的任意一条多肽链上；在一些具体实施方案中，二聚Fc具有H435R和/或Y436F，该修饰仅发生在一条Fc多肽上，而不发生在另一条Fc多肽上；在一些实施方案中，二聚Fc具有knob-into-hole的突变位点，例如Y349C、T366S、L368A、Y407V、S354C和T366W等；在一些实施方案中，二聚Fc的一条链具有T366W和/或S354C，且另一条链具有Y407V、Y349C、T366S或/和L368A。

在一个方面，本申请提供了一种具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab为二价双特异性抗体，其包含：包含SEQ ID NO：11的序列的重链、包含SEQ ID NO：13的序列的重链和包含SEQ ID NO：15的序列的轻链。

在一些具体的实施方案中，本申请提供的通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的抗体 Ab 部分如表 S4 所示。

表S4 示例性抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的抗体部分

名称		说明	氨基酸序列
ExpiHer2-2/23C-HER2-2	第一抗原结合片段(scFV)	重链CDR1	GFNIEDTYIH (SEQ ID NO：43)
		重链CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO：28)
		重链CDR3	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO：29)
		重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO：35)
		轻链CDR1	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO：30)
		轻链CDR2	SASYLYS (SEQ ID NO：31)
		轻链CDR3	QQHYTTPPT (SEQ ID NO：32)

		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO：36)
	anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO：11)
	第二抗原结合片段(Fab)	重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO：37)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO：38)
	anti-Her2-domain2-HC-Fc		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO：13)
	anti-Her2-domain2-LC		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO：15)
Expi Her2-3/ 23C-HER2-3	第一抗原结合片段(scFV)	重链CDR1	GFNIEDTYIH (SEQ ID NO：43)
		重链CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO：28)
		重链CDR3	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO：29)
		重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO：35)
		轻链CDR1	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO：30)
		轻链CDR2	SASFLYS (SEQ ID NO：33)
		轻链CDR3	QQHYTTPPT (SEQ ID NO：32)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO：39)
	第二抗原结合片段	重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO：37)

	(Fab)	轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTF GQGTKVEIK (SEQ ID NO：38)
ExpiHer2-4/23C-HER2-4	第一抗原结合片段(scFV)	重链CDR1	GFNIKDTYIH (SEQ ID NO：44)
		重链CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO：28)
		重链CDR3	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO：29)
		重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO：40)
		轻链CDR1	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO：30)
		轻链CDR2	SASYLYS (SEQ ID NO：31)
		轻链CDR3	QQHYTTPPT (SEQ ID NO：32)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF GQGTKVEIK (SEQ ID NO：36)
	第二抗原结合片段(Fab)	重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO：37)
		轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTF GQGTKVEIK (SEQ ID NO：38)

在一个方面，本申请提供了通式为Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中细胞毒药物部分U与抗体部分Ab通过接头部分L偶联。本申请的接头部分L可以通过本领域已知的任何方法与抗体部分连接，优选接头部分与抗体部分通过巯基和/或氨基连接。在一些更优选的实施方案中，本申请的接头部分通过巯基与抗体部分相连。

在一个方面，本申请提供通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中细胞毒药物部分 U 与抗体部分 Ab 通过接头部分 L 偶联，所述接头部分可以是可切割的接头或者不可切割的接头；在一些实施方案中，本申请的接头部分为可切割的接头，例如可以是依赖低 pH 值降解型（包括腙键、碳酸酯键等）、蛋白酶解型（包括肽基键）或者依赖高谷胱甘肽浓度降解型（包括二硫键）等；在另一些实施方案中，本申请的接头部分为不可切割的接头，例如可以是马来酰亚氨基己酰基等。

在一个方面，本申请提供了一种通式为Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分Ab与一个或多个细胞毒药物部分U偶联，细胞毒药物例如可以选自生物碱类、抗代谢类、抗肿瘤抗生素类、烷化剂类及铂类等，优选的细胞毒药物为微管抑制剂类细胞毒药物（包括美登素类、奥利斯他汀类）或者作用于DNA的细胞毒药物（包括卡奇霉素类、duocarmycin类、PBD（pyrrolobenzodiazepine）类、拓扑异构酶I抑制剂类等）。

在一些具体实施方案中，本申请提供的通式为Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的细胞毒药物部分U为拓扑异构酶I抑制剂。

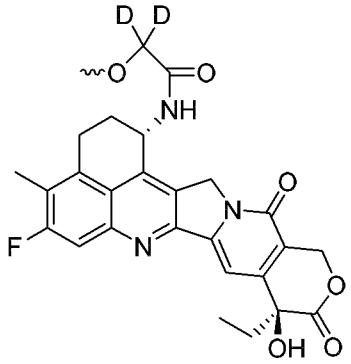
在一些具体实施方案中，本申请提供的通式为Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的细胞毒药物部分U为喜树碱类拓扑异构酶I抑制剂。

在一些优选的具体实施方案中，本申请提供的通式为Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的细胞毒药物部分U选自SN-38、SN-38衍生物、依沙替康或者依沙替康衍生物。

在一些实施方案中，本申请提供具有通式 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 Ab 表示抗体部分，L 表示接头部分，U 表示喜树碱类拓扑异构酶 I 抑制剂，n 为选自 1 至 10 的整数或小数，其中 L 部分和/或 U 部分存在氘代修饰。在一些实施方式中，n 为选自 2 至 10 的整数或小数，例如 2 至 9 的整数或小数、2 至 8 的整数或小数、3 至 9 的整数或小数、3 至 8 的整数或小数、4 至 9 的整数或小数、4 至 8 的整数或小数、5 至 9 的整数或小数或 5 至 8 的整数或小数。

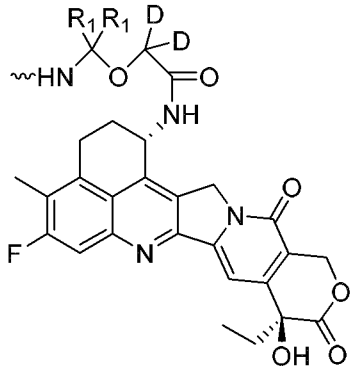
在一些实施方案中，本申请提供具有通式Ab-(L-U)n的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中Ab表示抗体部分，L表示接头部分，U表示喜树碱类拓扑异构酶I抑制剂，n为选自1至10的整数或小数，其中L部分和/或U部分存在氘代修饰，并且细胞毒药物部分U选自SN-38、SN-38衍生物、依沙替康或者依沙替康衍生物。

在一些实施方案中，本申请提供的通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物包含以下式 III 所示的结构：



III。

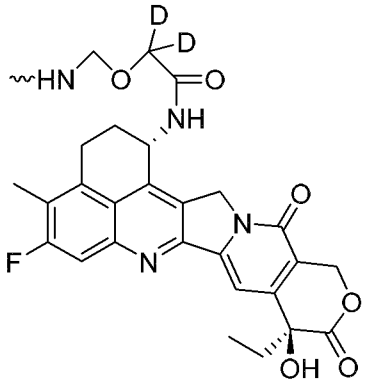
在一些实施方案中，本申请提供的通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物包含以下式 IV 所示的结构：



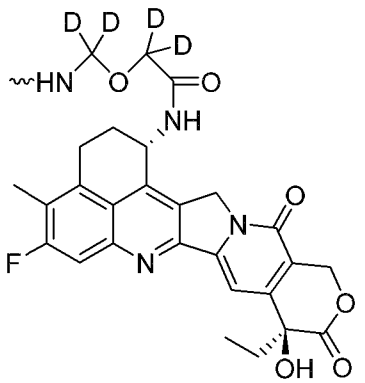
IV

其中，R_1 选自氢（H）或氘（D）。

在一些实施方案中，本申请提供的通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物包含以下式 IV-1 或 IV-2 所示的结构：

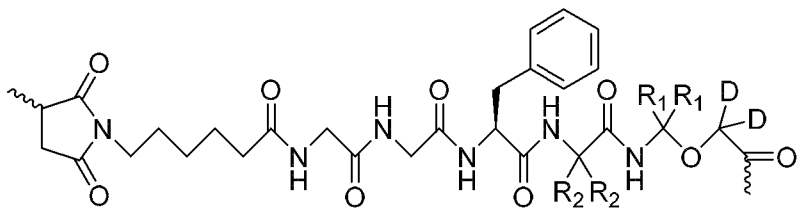


IV-1



IV-2。

在一些实施方案中，本申请提供的通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物包含以下式 V 所示的结构：



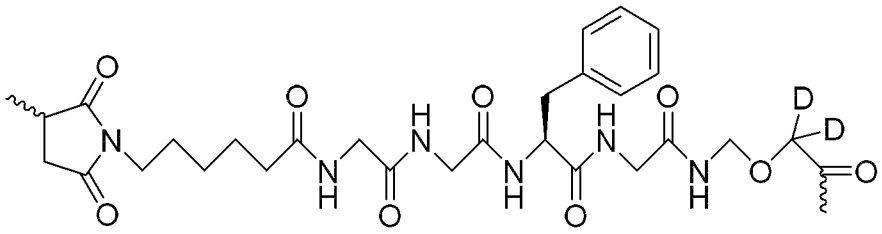
V

其中，R_1、R_2 分别独立地选自氢（H）或氘（D），

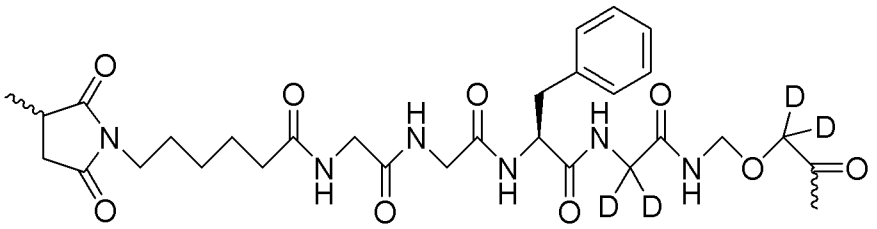
并且，该结构的左侧琥珀酰亚胺末端是与抗体部分的连接部位，右侧羰基末端是与细胞毒药物部分的

连接部位。

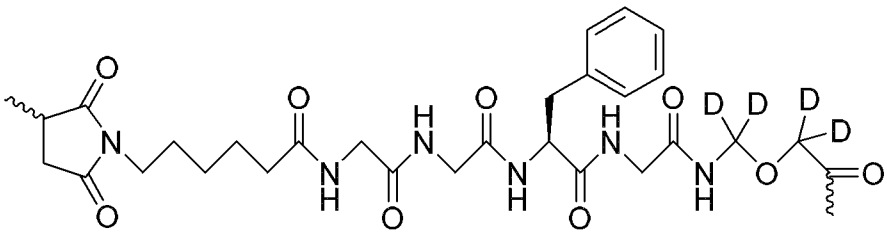
在一些实施方案中，本申请提供的通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物包含以下式 V-1、V-2、V-3 或 V-4 所示的结构，并且 V-1 至 V-4 所示结构分别以左侧琥珀酰亚胺末端与抗体部分连接，以右侧羰基末端与细胞毒药物部分连接：



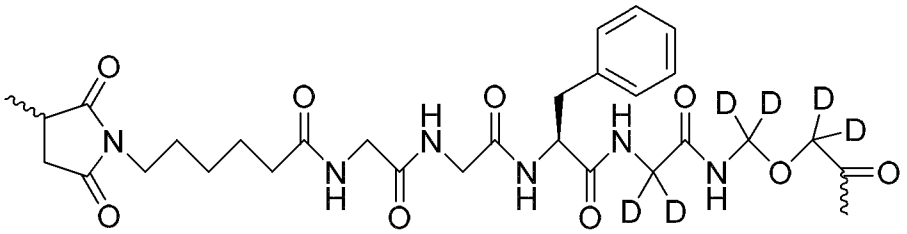
V-1



V-2

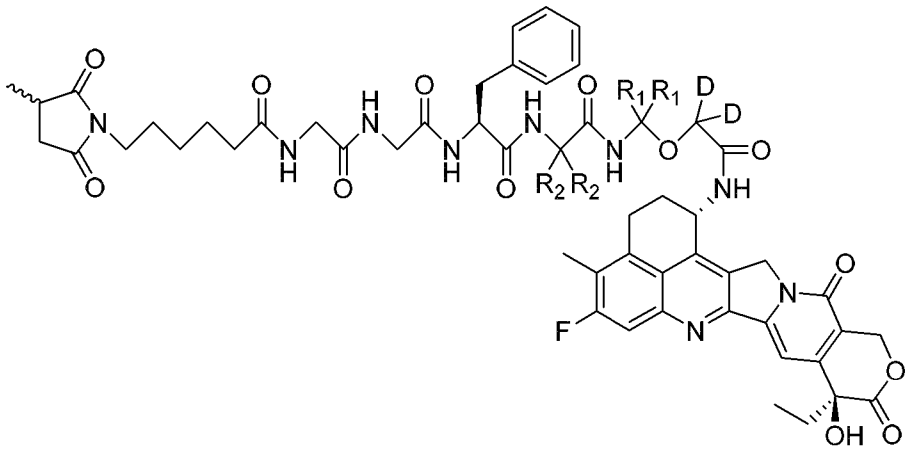


V-3



V-4。

在一些实施方案中，本申请提供的通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物包含以下式 VI 所示的结构：

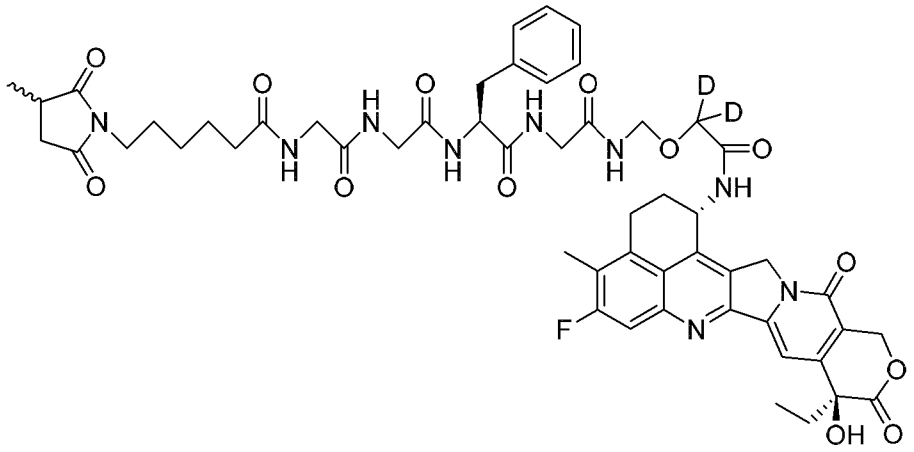


VI

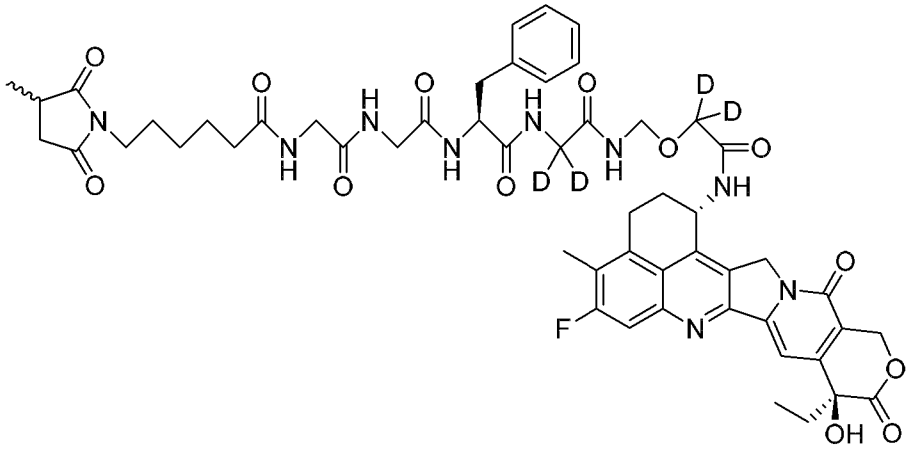
其中，

R_1、R_2 分别独立地选自氢（H）或氘（D）。

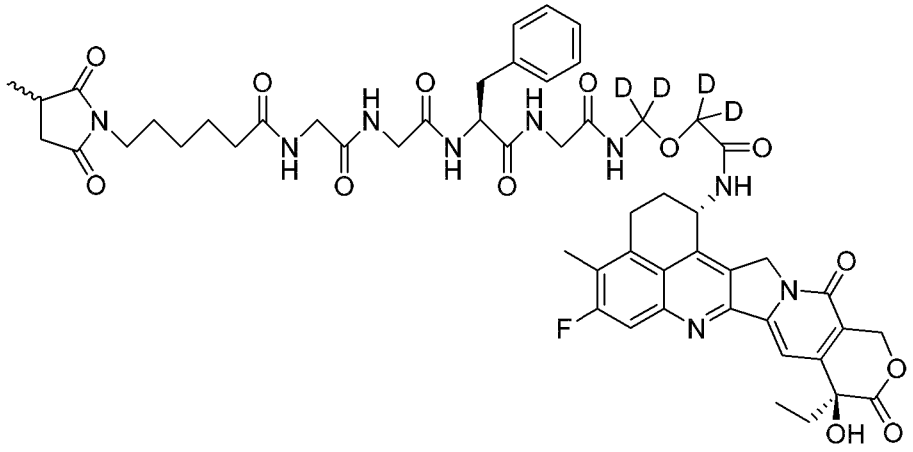
在一些实施方案中，本申请提供的通式为 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物包含以下式 VI-1、VI-2、VI-3 或 VI-4 所示的结构：



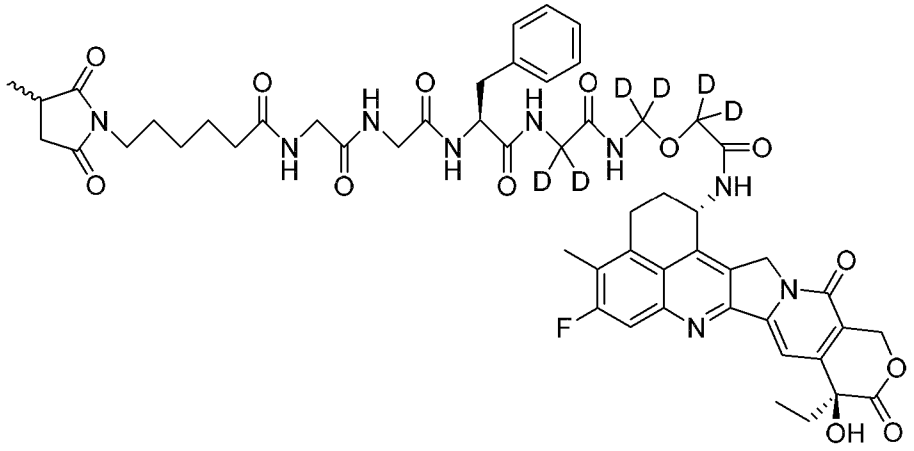
VI-1



VI-2

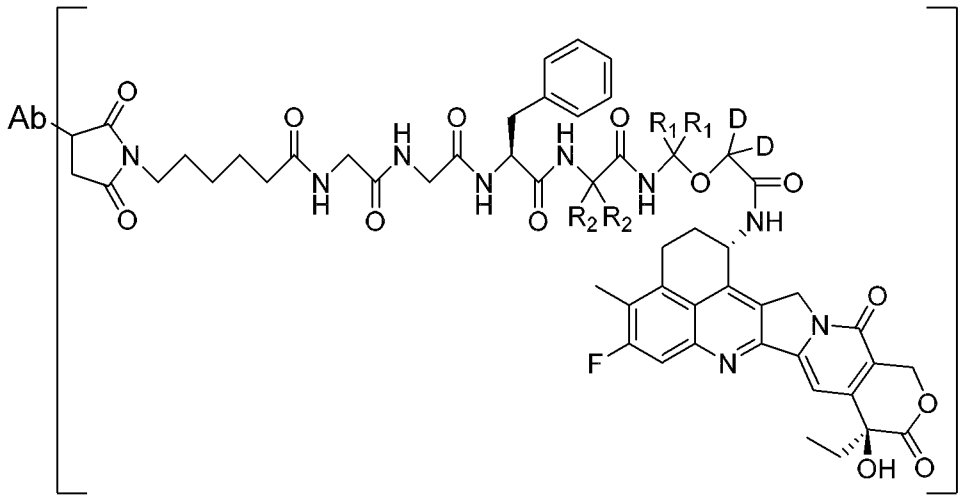


VI-3



VI-4。

在一些具体实施方案中，本申请提供式 VII 所示结构的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物：



VII

其中，

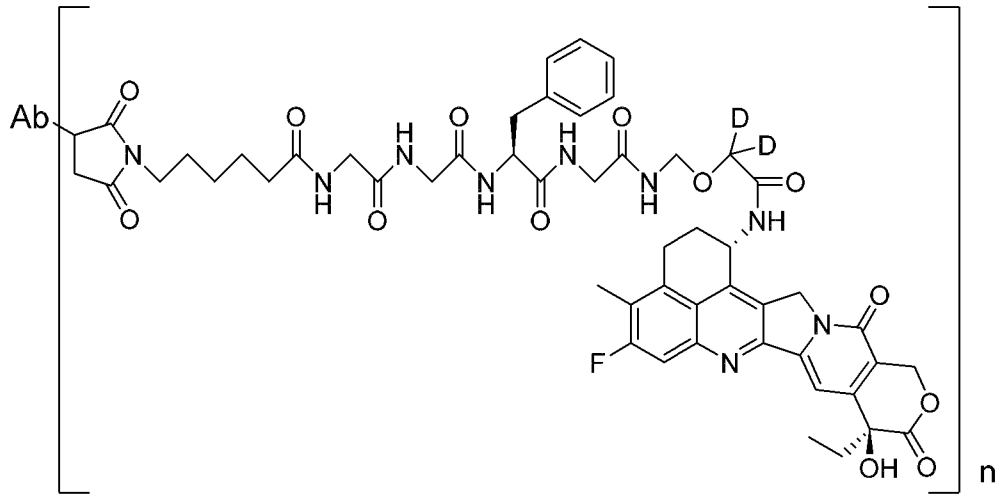
Ab 表示抗体部分，其包含第一抗原结合片段和第二抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv 并且包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含根据 SEQ ID NOs：43、28 和 29 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含根据 SEQ ID NOs：30、31 和 32 的氨基酸序列；

所述第二抗原结合片段为 Fab 并且包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含根据 SEQ ID NOs：45、46 和 47 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含根据 SEQ ID NOs：48、49 和 50 的氨基酸序列，

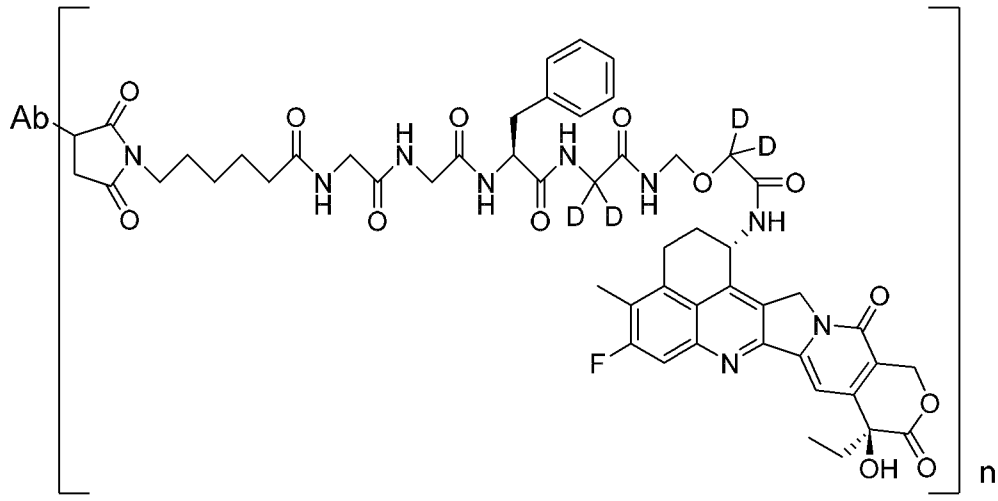
n 为选自 1 至 10 的整数或小数，

R_1、R_2 分别独立地选自氢（H）或氘（D）。

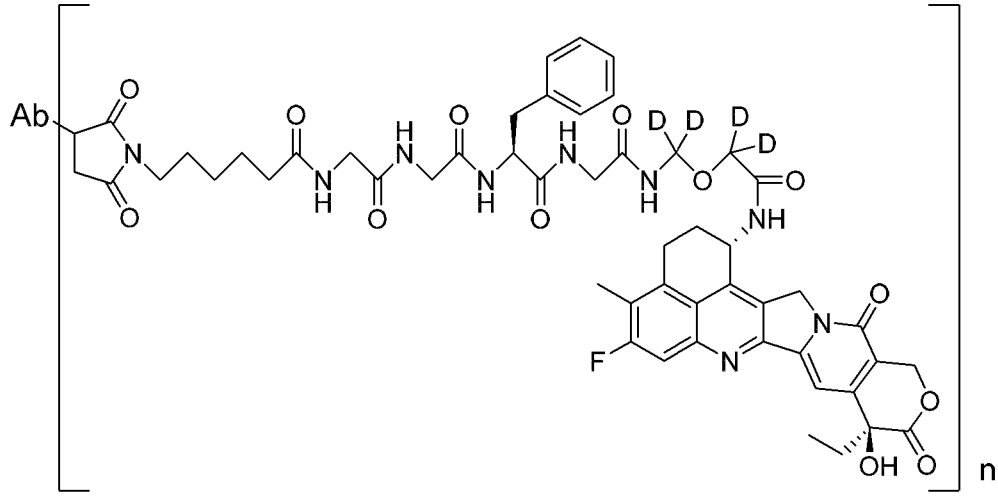
在一些具体实施方案中，本申请提供具有以下式 VII-1、VII-2、VII-3 或 VII-4 所示结构的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，



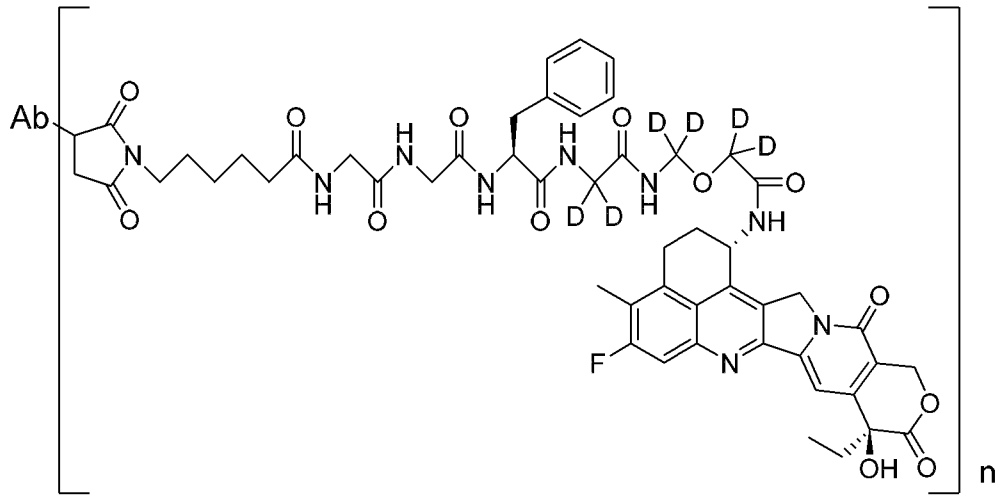
VII-1



VII-2



VII-3



VII-4

其中，

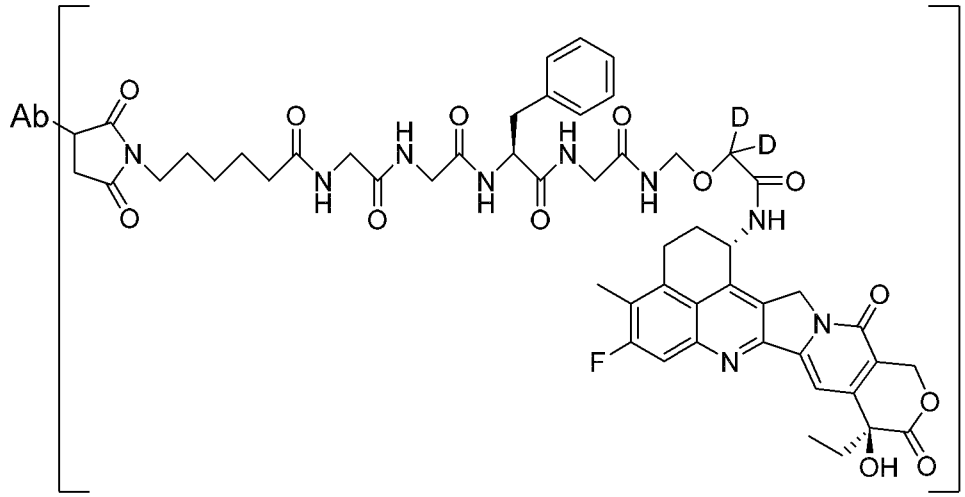
Ab 表示抗体部分，其包含第一抗原结合片段和第二抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv 并且包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含根据 SEQ ID NOs：43、28 和 29 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含根据 SEQ ID NOs：30、31 和 32 的氨基酸序列；

所述第二抗原结合片段为 Fab 并且包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含根据 SEQ ID NOs：45、46 和 47 的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含根据 SEQ ID NOs：48、49 和 50 的氨基酸序列，

n 为选自 1 至 10 的整数或小数。

在一个具体实施方案中，本申请提供具有式 VII-1 所示结构的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐

或溶剂化物，



VII-1

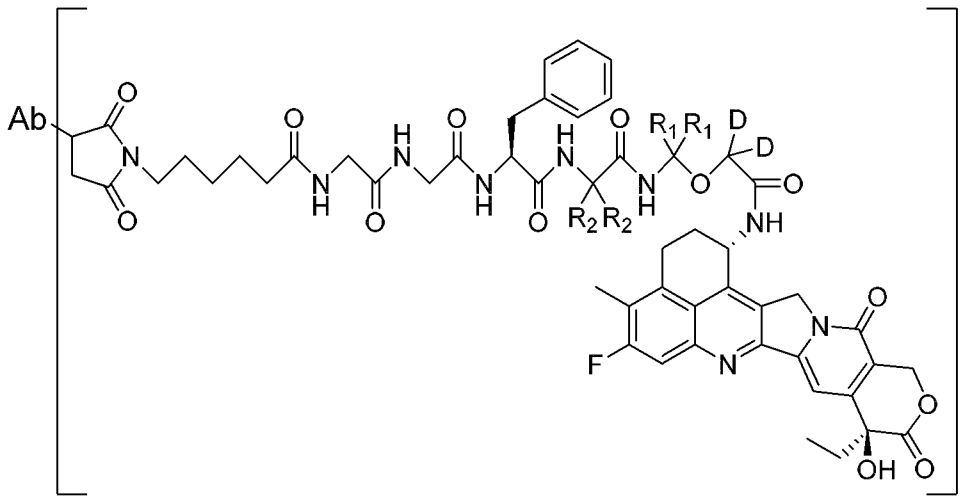
其中，

Ab表示抗体部分，其包含第一抗原结合片段和第二抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为scFv并且包含重链CDR1、重链CDR2、重链CDR3、轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3，所述重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3分别包含根据SEQ ID NOs：43、28和29的氨基酸序列，所述轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3分别包含根据SEQ ID NOs：30、31和32的氨基酸序列；

所述第二抗原结合片段为Fab并且包含重链CDR1、重链CDR2、重链CDR3、轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3，所述重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3分别包含根据SEQ ID NOs：45、46和47的氨基酸序列，所述轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3分别包含根据SEQ ID NOs：48、49和50的氨基酸序列，

n为选自1至10的整数或小数。

在一个具体实施方案中，本申请提供具有式 VII 所示结构的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，



VII

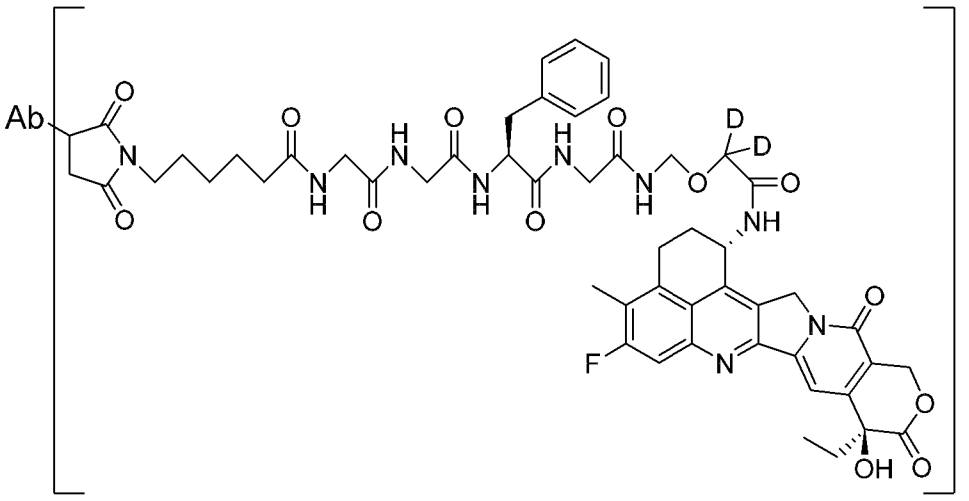
其中，

Ab为曲妥珠单抗，

n为选自1至10的整数或小数，

R_1、R_2 分别独立地选自氢（H）或氘（D）。

在一个具体实施方案中，本申请提供具有式 VII-1 所示结构的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，



VII-1

其中，

Ab为曲妥珠单抗，

n为选自1至10的整数或小数。

在一个方面，本申请提供了一种药物组合物，其包含根据本申请的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，以及可药用载体。

在一个方面，本申请提供了本申请的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

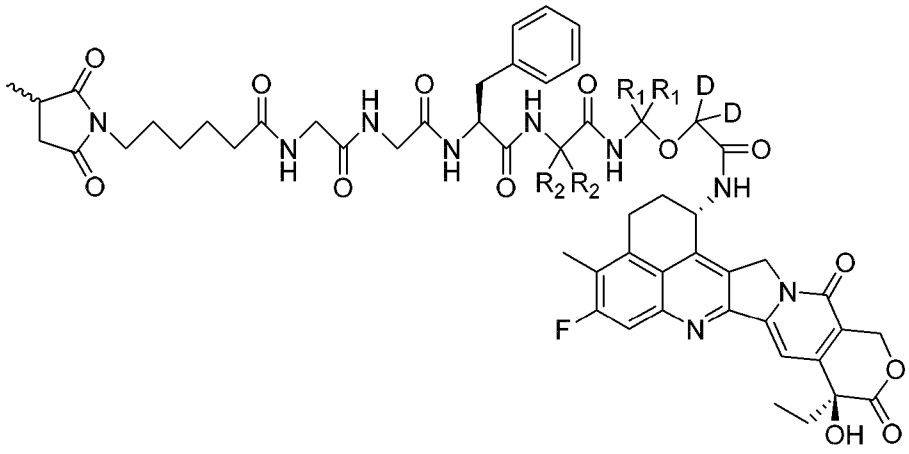
在一个方面，本申请提供了包含本申请的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物及可药用载体的药物组合物在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

在一个方面，本申请提供了用于预防或治疗癌症的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

在一个方面，本申请提供了一种治疗或预防癌症的方法，该方法包括向需要其的患者施用治疗有效量的本申请的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或者包含本申请的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物与可药用载体的药物组合物。

在一些实施方案中，本申请的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物可以用于预防或治疗 HER2 阳性癌症、HER2 阴性癌症（包括三阴性乳腺癌）以及按照免疫组织化学检测法检测显示 HER2 表达为 IHC2+的癌症。

在一些方面，本申请提供具有以下式 VI 所示结构的接头-药物中间体化合物，其用于得到将抗体与该中间体化合物连接而成的抗体药物偶联物：

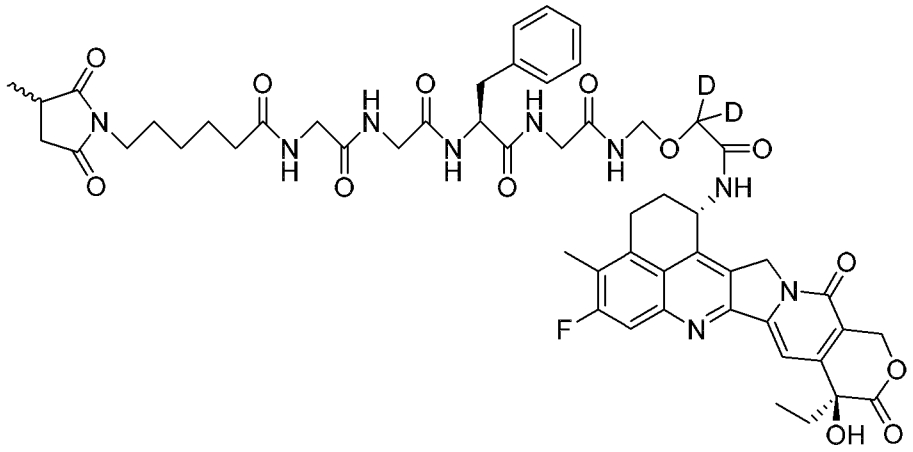


VI

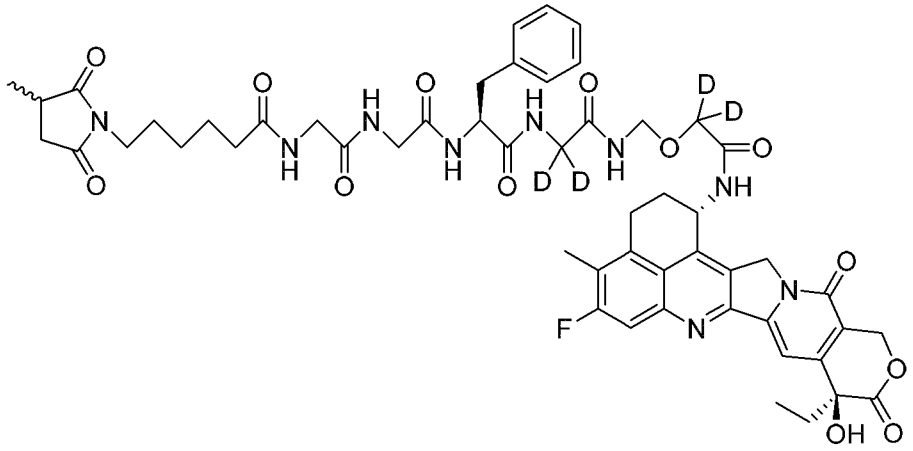
其中，

R_1、R_2 分别独立地选自氢（H）或氘（D）。

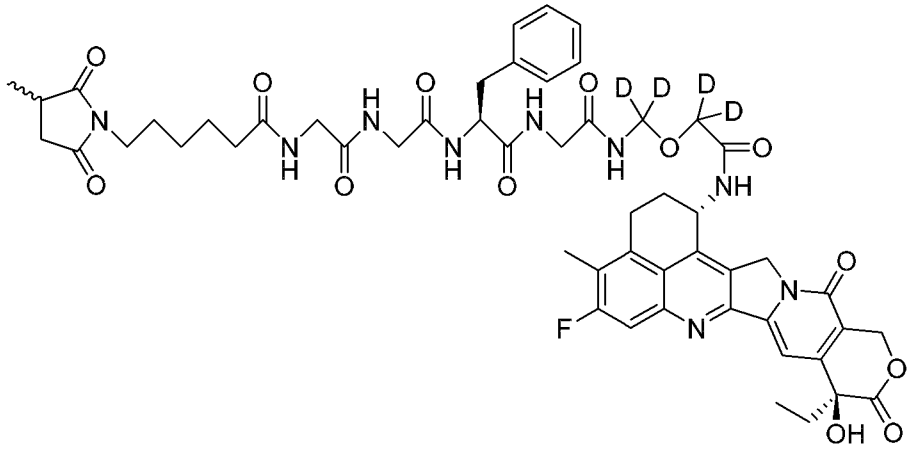
在一些方面，本申请提供具有以下式 VI-1、VI-2、VI-3 或 VI-4 所示结构的接头-药物中间体化合物，其用于得到将抗体与该中间体化合物连接而成的抗体药物偶联物：



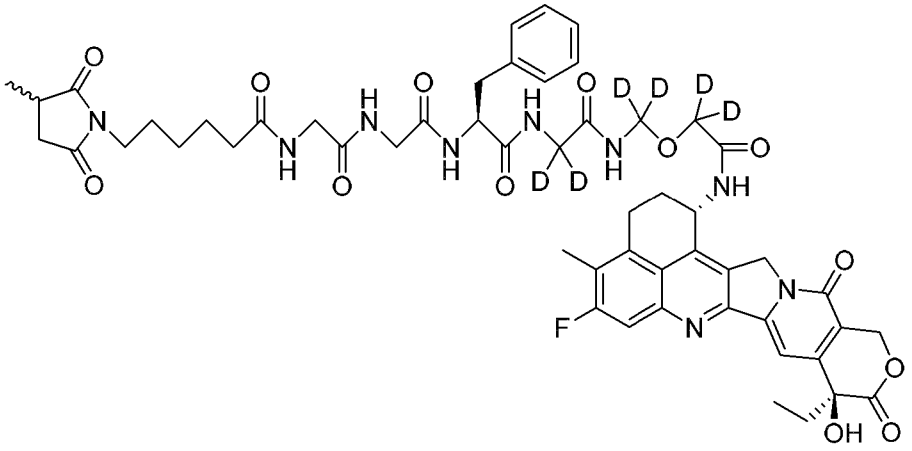
VI-1



VI-2

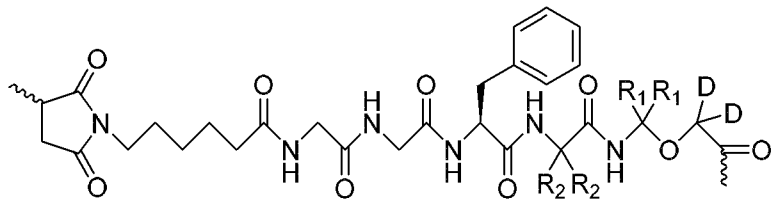


VI-3



VI-4。

在一些方面，本申请提供具有以下式 V 所示结构的接头化合物，其用于得到经由该接头将药物与抗体连接而成的抗体药物偶联物：

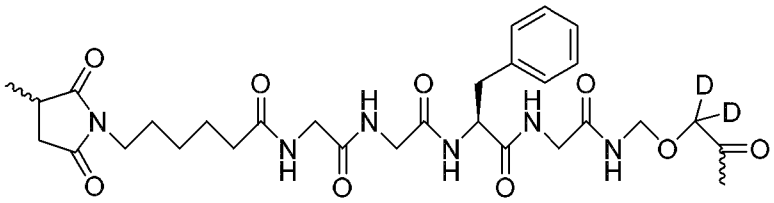


V

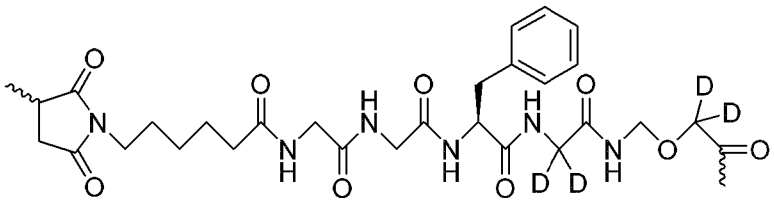
其中，R_1、R_2 分别独立地选自氢（H）或氘（D），

并且，该结构的左侧琥珀酰亚胺末端是与抗体部分的连接部位，右侧羰基末端是与细胞毒药物部分的连接部位。

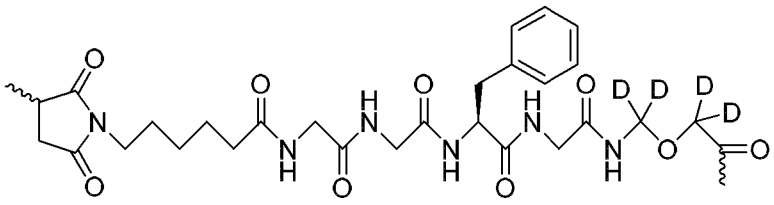
在一些方面，本申请提供具有以下式 V-1、V-2、V-3 或 V-4 所示结构的接头化合物，其用于得到经由该接头将药物与抗体连接而成的抗体药物偶联物，并且式 V-1 至 V-4 所示结构分别以左侧琥珀酰亚胺末端与抗体部分连接，以右侧羰基末端与细胞毒药物部分连接：



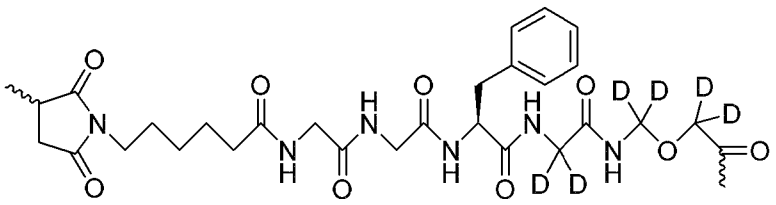
V-1



V-2

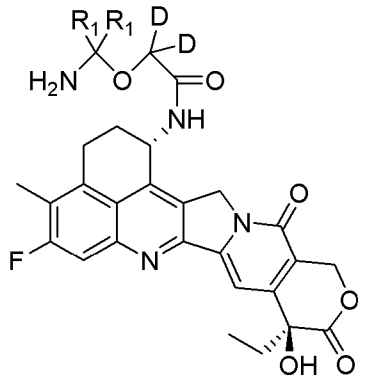


V-3



V-4。

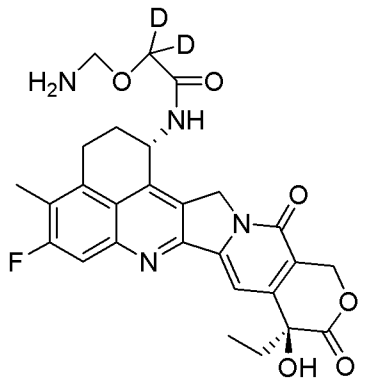
在一些方面，本申请提供了具有以下式IV(a)所示结构的化合物：



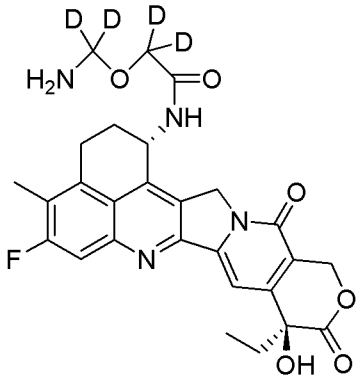
IV(a)

其中，R_1 选自氢（H）或氘（D）。

在一些方面，本申请提供了具有以下式 IV(a)-1 或 IV(a)-2 所示结构的化合物：

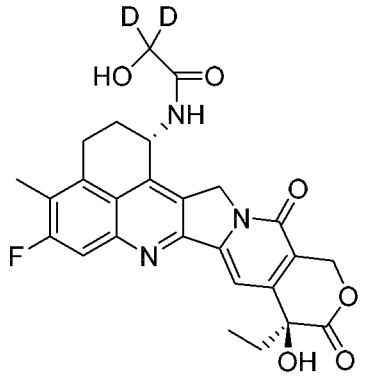


IV(a)-1



IV(a)-2。

在一些方面，本申请提供了具有以下式 III(a)所示结构的化合物：



III(a)。

本申请提供了药代动力学性质得以改善的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。药代动力学性质的改善将引起目标化合物毒性的降低、安全性和/或耐受性的提高、疗效的提高以及最终的治疗窗口的改善。

附图说明

图 1 为 anti-HER2 双特异性抗体（Expi HER2-1、Expi HER2-2、23C2 HER2-1 和 23C2 HER2-2）以及联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗对 BT474 肿瘤细胞的杀伤率；

图 2 为 anti-HER2 双特异性抗体、曲妥珠单抗、T-DM1、以及联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗对 NCI-N87 肿瘤细胞的杀伤率；

图 3 为 anti-HER2 双特异性抗体、曲妥珠单抗、T-DM1、以及联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗对 JIMT-1 肿瘤细胞的杀伤率；

图 4 为 anti-HER2 双特异性抗体、曲妥珠单抗、以及联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗对 BT474 肿瘤细胞的增殖抑制结果；

图 5 为 anti-HER2 双特异性抗体、PBS 溶媒对照、以及联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗（Per+Tra）对胃癌 N87 小鼠异种肿瘤移植模型的小鼠肿瘤体积变化的影响；

图 6 为 anti-HER2 双特异性抗体、PBS 溶媒对照、以及联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗对胃癌 N87 小鼠异种肿瘤药效中小鼠体重变化的影响；

图 7 为一些示例性的 anti-HER2 双特异性抗体的结构；其中用一条显示为黑色的链（第一 Fc 多肽）和另一条显示为灰色的链（第二 Fc 多肽）描绘二聚 Fc，而一个抗原结合结构域（第一抗原结合片段）显示为阴影线填充，另一个抗原结合结构域（第二抗原结合片段）显示为白色；第一抗原结合片段为 scFv，与第一 Fc 多肽融合，而第二抗原结合片段为 Fab，与第二 Fc 多肽融合；

图 8 为不同抗体的药物偶联物（单抗-DDDXD 与双抗-DDDXD）在 NCI-N87 肿瘤细胞中的内吞活性；

图 9 为不同抗体的药物偶联物（单抗-DDDXD 与双抗-DDDXD）在 SK-BR-3 肿瘤细胞中的内吞活性。

解释和定义

除非另有说明，本申请中所用的下列术语具有下列含义。一个特定的术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照本领域普通的含义去理解。参见如 Singleton 等，Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed.，J. Wiley & Sons（New York，NY 1994）；Sambrook 等，Molecular Cloning，A Laboratory Manual，Cold Springs Harbor Press（Cold Springs Harbor，NY 1989）；Davis 等，Basic Methods in Molecular Biology，Elsevier Science Publishing Inc.，New York, USA（2012）；Abbas 等，Cellular and Molecular Immunology，Elsevier Science Health Science div（2009）；何维等，医学免疫学（第 2 版），人民卫生出版社，2010 年。当本文中出现商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

术语“被取代”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧代（即=O）时，意味着两个氢原子被取代，氧代不会发生在芳香基上。

术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生，该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。某一基团“任选被取代”是指该基团可被取代的或未被取代的，例如，乙基“任选”被卤素取代，指乙基可以是未被取代的（CH_2CH_3）、单取代的（如 CH_2CH_2F）、多取代的（如 $CHFCH_2F$、CH_2CHF_2 等）或完全被取代的（CF_2CF_3）。本领域技术人员可理解，对于包含一个或多个取代基的任何基团，不会引入任何在空间上不可能存在和/或不能合成的取代或取代模式。

本文中的 C_{m-n}，是该部分具有给定范围中的整数个碳原子。例如“C_{1-6}”是指该基团可具有 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子、4 个碳原子、5 个碳原子或 6 个碳原子。

当任何变量（例如 R）在化合物的组成或结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。因此，例如，如果一个基团被 2 个 R 所取代，则每个 R 都有独立的选项。

当一个连接基团的数量为 0 时，比如-$(CH_2)_0$-，表示该连接基团为共价键。

当其中一个变量选自共价键时，表示其连接的两个基团直接相连，比如 A-L-Z 中 L 代表共价键时表示该结构实际上是 A-Z。

术语“卤”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“氰基”指-CN 基团。

术语“巯基”指-SH 基团。

术语“氨基”指-NH_2 基团。

术语“硝基”指-NO_2 基团。

术语“烷基”是指通式为 C_nH_{2n+1} 的烃基。该烷基可以是直链或支链的。例如，术语“C_{1-6} 烷基”指含有 1 至 6 个碳原子的烷基（例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、新戊基、己基、2-甲基戊基等）。类似地，烷氧基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基磺酰基和烷硫基的烷基部分（即烷基）具有上述相同定义。

术语“烷氧基”指-O-烷基。

术语“烷基氨基”指-NH-烷基。

术语“二烷基氨基”指-N(烷基)$_2$。

术语“烷基磺酰基”指-SO_2-烷基。

术语“烷硫基”指-S-烷基。

术语“烯基”是指由碳原子和氢原子组成的直链或支链的具有至少一个双键的不饱和脂肪族烃基。烯基的非限制性实例包括但不限于乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、异丁烯基、1,3-丁二烯基等。

术语“炔基”是指由碳原子和氢原子组成的直链或支链的具有至少一个三键的不饱和脂肪族烃基。炔基的非限制性实例包括但不限于乙炔基（-C≡CH）、1-丙炔基（-C≡C-CH_3）、2-丙炔基（-CH_2-C≡CH）、1,3-丁二炔基（-C≡C-C≡CH）等。

术语“环烷基”指完全饱和的并且可以以单环、桥环或螺环存在的碳环。除非另有指示，该碳环通常为 3 至 10 元环。环烷基非限制性实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、降冰片基（双环[2.2.1]

庚基）、双环[2.2.2]辛基、金刚烷基等。

术语“环烯基”是指不完全饱和的并且可以以单环、桥环或螺环存在的非芳族碳环。除非另有指示，该碳环通常为 5 至 8 元环。环烯基的非限制性实例包括但不限于环戊烯基、环戊二烯基、环己烯基、环己二烯基、环庚烯基、环庚二烯基等。

术语“杂环基”是指完全饱和的或部分不饱和的（但不是完全不饱和的杂芳族）并且可以以单环、桥环或螺环存在的非芳族环。除非另有指示，该杂环通常为含有 1 至 3 个独立地选自硫、氧和/或氮的杂原子（优选 1 或 2 个杂原子）的 3 至 7 元环。杂环基的非限制性实例包括但不限于环氧乙烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、吡咯烷基、N-甲基吡咯烷基、二氢吡咯基、哌啶基、哌嗪基、吡唑烷基、4H-吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基、四氢噻吩基等。

术语“杂环烷基”是指完全饱和的并且可以以单环、桥环或螺环存在的环状基团。除非另有指示，该杂环通常为含有 1 至 3 个独立地选自硫、氧和/或氮的杂原子（优选 1 或 2 个杂原子）的 3 至 7 元环。3 元杂环烷基的实例包括但不限于环氧乙烷基、环硫乙烷基、环氮乙烷基，4 元杂环烷基的非限制性实例包括但不限于叶丁啶基、噁丁环基、噻丁环基，5 元杂环烷基的实例包括但不限于四氢呋喃基、四氢噻吩基、吡咯烷基、异噁唑烷基、噁唑烷基、异噻唑烷基、噻唑烷基、咪唑烷基、四氢吡唑基，6 元杂环烷基的实例包括但不限于哌啶基、四氢吡喃基、四氢噻喃基、吗啉基、哌嗪基、1,4-噻噁烷基、1,4-二氧六环基、硫代吗啉基、1,3-二噻烷基、1,4-二噻烷基，7 元杂环烷基的实例包括但不限于氮杂环庚烷基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基。优选具有 5 或 6 个环原子的单环杂环烷基。

术语“芳基”是指具有共轭的π电子体系的全碳单环或稠合多环的芳香环基团。例如，芳基可以具有 6-20 个碳原子、6-14 个碳原子或 6-12 个碳原子。芳基的非限制性实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基和 1,2,3,4-四氢化萘等。

术语“杂芳基”是指单环或稠合多环体系，其中含有至少一个选自 N、O、S 的环原子，其余环原子为 C，并且具有至少一个芳香环。优选的杂芳基具有单个 4 至 8 元环，尤其是 5 至 8 元环，或包含 6 至 14 个，尤其是 6 至 10 个环原子的多个稠合环。杂芳基的非限制性实例包括但不限于吡咯基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、噁唑基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、喹啉基、异喹啉基、四唑基、三唑基、三嗪基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、异吲哚基等。

“衍生物”：母体化合物分子中的原子或原子团被其它原子或原子团取代形成的化合物称为母体化合物的衍生物。

本申请中所标记合成的化合物的任何原子若没有特别指定，可代表该原子的任何一种稳定的同位素。除非特别说明，当结构中某一位置被定义为H即氢（H-1）时，该位置仅含天然存在的同位素。同样，除非特别说明，当结构中某一位置被定义为D即氘（H-2）时，该位置含同位素量至少比天然存在的同位素量（0.015%）大3340倍（即至少含50.1%氘同位素），当所标记合成的化合物的结构中某一个或多个位置被定义为D即氘（H-2）时，该结构所示的化合物的含量可至少为52.5%、至少为60%、至少为67.5%、至少为75%、至少为82.5%、至少为90%、至少为95%、至少为97%、至少为98.5%、至少为99%、至少为99.5%。本申请中所标记合成的化合物的氘代率是指标记合成的同位素含量与天然存在的同位素量的比值。本申请中所标记合成的化合物的每个指定氘原子的氘代率可至少为3500倍（52.5%）、至少为4000倍（60%）、至少为4500倍(67.5%）、至少为5000倍（75%）、至少为5500倍（82.5%）、至少为6000倍（90%）、至少为6333.3倍（95%）、至少为6466.7倍（97%）、至少为6566.7倍（98.5%）、至少为6600倍（99%）、至少为6633.3倍（99.5%）。本申请中的同位素体（isotopologues）是指在化学结构方面仅有同位素组成上不同的化合物。本申请中所标记合成的化合物具有相同的化学结构、仅在其分子的原子组成中同位素的变化。因此，本申请中所标记合成的在特定位置含氘化合物也同样会含非常少的该位置的氢同位素体，本申请中所标记合成的化合物中的某位置的氢同位素体的量取决许多因素，其中包括氘代试剂（D_2O、D_2、$NaBD_4$、$LiAlD_4$等）的氘同位素纯度以及引入氘同位素合成方法的有效性。然而，如前所述这种某位置的氢同位素体的量总数将少于49.9%。本申请中所标记合成的化合物中的某位置的氢同位素体的量总数将少于47.5%、40%、32.5%、25%、17.5%、10%、5%、3%、1%或0.5%。

本申请中，任何未指定为氘的各原子以其天然同位素丰度存在。

术语“治疗”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以预防、改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状，且包括：(i) 预防疾病或疾病状态在哺乳动物中出现，特别是当这类哺乳动物易患有该疾病状态，但尚未被诊断为已患有该疾病状态时；(ii) 抑制疾病或疾病状态，即遏制其发展；(iii) 缓解疾病或疾病状态，即使该疾病或疾病状态消退。

术语“治疗有效量”意指(i) 治疗或预防特定疾病、病况或障碍，(ii) 减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状，或(iii) 预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作

的本申请化合物的用量。构成“治疗有效量”的本申请化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待被治疗的哺乳动物的年龄而改变，但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本公开内容而确定。

术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

作为药学上可接受的盐，例如，可以提及金属盐、铵盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐，与有机酸形成的盐、与碱性或者酸性氨基酸形成的盐等。

术语“溶剂化物”是指化合物与溶剂分子缔合形成的物质。

术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。

术语“药学上可接受的辅料”是指对有机体无明显刺激作用，而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些辅料。合适的辅料是本领域技术人员熟知的，例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等。

本申请的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在，并且所有这样的形式包含于本申请的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能垒互变的不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体（也称为质子转移互变异构体）包括经由质子迁移的互变，如酮-烯醇及亚胺-烯胺异构化。质子互变异构体的具体实例是咪唑部分，其中质子可在两个环氮间迁移。价互变异构体包括通过一些成键电子的重组的互变。

术语“抗体”：以其最广义使用，特别涵盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、至少由两种完整抗体所形成的多特异性抗体（例如双特异性抗体）、多功能抗体以及抗体片段，只要它们具有所需的生物学活性。

术语“人源化抗体”：是指一种抗体，包含来源于非人源抗体的 CDR 区，并且该抗体分子的其它部分来源于一种或多种人抗体。

术语“突变体”用于指包含如下从肽的氨基酸序列衍生出的氨基酸序列的肽：用不同于原始肽的氨基酸置换一个或两个或更多个氨基酸，缺失一个或两个或更多个野生型氨基酸，插入在野生型中不存在的一个或两个或更多个氨基酸，和/或将在野生型中不存在的氨基酸添加至野生型的氨基端（N 端）和/或羧基端（C 端）（在下文中，被统称为“突变”）。在本申请中，“插入”也可以被包括在“添加”中。

术语“CDR”(互补决定区)，也称为“高变区”，是指在序列上高度可变和/或形成结构限定的环的抗体可变结构域的每个区域。天然四链抗体通常包含六个 CDR，三个在重链可变区中，三个在轻链可变区中。

术语“可变区”：抗体结构单元由两对多肽链构成，每一对具有一条重链和一条轻链，每条链的 N 端结构域限定约 100 至 110 个或更多个氨基酸的主要负责抗原识别的区域为可变区。

术语“Fab”是指含有轻链的恒定结构域(CL）和重链的第一恒定结构域(CH1）连同分别在轻链和重链上的可变结构域 VL（轻链可变区）和 VH（重链可变区）。可变结构域包含参与抗原结合的互补决定区（CDR）。

术语“scFv”包括抗体的 VH 和 VL 结构域，其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一些实施方案中，scFv 还包含介于 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，其使得 scFv 能够形成抗原结合所需的结构。

术语“ECD”为胞外结构域。HER 受体是属于人表皮生长因子受体（HER）家族的受体蛋白酪氨酸激酶并且包括 EGFR、HER2、HER3 和 HER4 受体，HER2 受体通常包含可结合 HER 配体的胞外结构域、亲脂性跨膜结构域、保守性胞内酪氨酸激酶结构域和带有几个可以磷酸化的酪氨酸残基的羧基端信号传导结构域，HER2 的胞外结构域包括四个结构域，分别为 ECD1、ECD2、ECD3 和 ECD4。

术语“抗体部分”：是指抗体药物偶联物中的抗体部分，在某些特定的方案中，其与中间接头部分通过特定官能团连接，该抗体部分可以与抗原特异性结合。

术语“接头部分”：是指抗体药物偶联物中将抗体部分与细胞毒药物部分相连接的部分，可以是可切割的或者不可切割的，可切割接头是指可以在靶细胞内断裂，从而释放细胞毒药物。

术语“细胞毒药物部分”：是指抗体药物偶联物中的细胞毒药物部分，在某些特定的方案中，其与中间接头部分通过官能团连接，在肿瘤细胞内，会游离出细胞毒药物分子，从而发挥抗肿瘤效果。

术语“曲妥珠单抗”：通用名 Trastuzumab，是一种重组的人源化单克隆抗体，选择性地作用于人表皮生长因子受体-4（HER4）的胞外部位，可以用于治疗 HER2 阳性的癌症，其一个实例是以商品名 HERCEPTIN® 上市的治疗性单克隆抗体产品。

术语“帕妥珠单抗”：通用名 Pertuzumab，是一种重组的人源化单克隆抗体，选择性地作用于人表皮生

长因子受体-2（HER2）的胞外部位，可以用于治疗 HER2 阳性的癌症。

术语“HER2”：是 EGFR 家族的第二个成员，具有酪氨酸激酶活性，其中 HER2 表达水平可以按照免疫组织化学检测法进行检测，HER2 阳性指 IHC3+，HER2 阴性指 IHC1+/0，对于 IHC2+的情况应该再进行 ISH 检测以进一步明确。

术语“癌症”：指哺乳动物中特征通常在于不受调控的细胞生长的生理病状。

术语“三阴性乳腺癌”：是指雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体 2 表达都为阴性的乳腺癌。

在本文中，除非另有说明，术语“包含、包括和含有（comprise、comprises 和 comprising）”或其等同物（contain、contains、containing、include、includes、including）为开放式表述，意味着除所列出的要素、组分和步骤外，还可涵盖其它未指明的要素、组分和步骤。

在本文中，除非另有说明，本文所使用的表示成分的量、测量值或反应条件的所有数字应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。当与百分比相连时，术语“约”可以表示例如±0.1%、优选±0.05%、更优选±0.01%。

除非上下文另有明确指示，单数术语涵盖复数的指示对象，反之亦然。类似地，除非上下文另有明确指示，词语“或”意在包括“和”。

在本文中，序列之间的同一性百分比（同源性程度）可以通过例如使用万维网（例如 www.ncbi.nlm.nih.gov）上通常用于此目的的免费可用的计算机程序（例如具有默认设置的 BLASTp 或 BLASTn）对两个序列进行比较来确定。

具体实施方式

为清楚起见，进一步用实施例来阐述本申请，但是实施例并非限制本申请的范围。本申请所使用的试剂通常是市售的，无需进一步纯化即可使用。

本申请实施例中采用的曲妥珠单抗（Trastuzumab）和帕妥珠单抗（Pertuzumab）都是按照抗体的常规方法进行制备的，先进行载体构建，转染真核细胞之后纯化表达，曲妥珠单抗的序列参考WHO DRUG INFORMATION INN RL78，帕妥珠单抗的序列参考WO0100245的实施例部分。DS-8201为第一三共公司市售制剂Enhertu的活性成分，其结构同本申请制备的Trastuzumab-DXD（结构见实施例15）。

实施例 1 anti-Her2 scFv-Fc 及其变体的构建、表达、纯化

构建anti-Her2 scFv-Fc时，Fc部分采用人IgG1，anti-Her2臂可变区序列是基于Herceptin®单抗的序列，通过设计的linker 1（即，$(GGGGS)_3$）将Herceptin®单抗的轻、重链可变区串联并形成anti-Her2 scFv-Fc（SEQ ID NO：1），其氨基酸序列如下：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

另外在 anti-Her2 scFv-Fc 序列上构建点突变，构建以下变体：

anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc（SEQ ID NO：3）：衍生自野生型 anti-Her2 scFv-Fc，VL 区具有 F53Y 突变；其氨基酸序列如下：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

anti-Her2-scFv-VL-F53A-Fc（SEQ ID NO：5）：衍生自野生型 anti-Her2 scFv-Fc，VL 区具有 F53A 突变；其氨基酸序列如下：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASALYSGVPSRFSGSRSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

anti-Her2-scFv-VL-F53R-Fc（SEQ ID NO：7）：衍生自野生型 anti-Her2 scFv-Fc，VL 区具有 F53R 突变；其氨基酸序列如下：
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASRLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc（SEQ ID NO：9）：衍生自野生型 anti-Her2 scFv-Fc，VH 区具有 K30E 突变；其氨基酸序列如下：
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

合成 anti-Her2 scFv-Fc 及其变体的 DNA 序列（SEQ ID NOs：2、4、6、8 和 10）并且分别克隆到 pcDNA3.1 表达载体中。通过使用 ExpiCHO™ 表达试剂盒（Thermo Fisher，目录号 A29133）将 anti-Her2 scFv-Fc 或其变体的表达载体共转染到 ExpiCHO 细胞（CHO-S，Thermo 公司）中。使细胞在 ExpiCHO 表达培养基中于 37℃、含有 8% CO_2 的湿润气氛的培养箱中并在以 130 rpm 旋转的有轨摇床平台上培养。收集培养上清，使用蛋白 A 磁珠（Genscript，目录号 L00273）进行蛋白纯化。通过 UV-Vis 分光光度计（NanoDrop lite, Thermo Scientific）测量蛋白浓度。

表 1：anti-Her2 scFv-Fc 及其变体的序列信息

名称	氨基酸序列 (SEQ ID NO)	编码 DNA 序列 (SEQ ID NO)	可变区突变位点
anti-Her2 scFv-Fc	1	2	无
anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc	3	4	F53Y
anti-Her2-scFv-VL-F53A-Fc	5	6	F53A
anti-Her2-scFv-VL-F53R-Fc	7	8	F53R
anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc	9	10	K30E

实施例 2 anti-Her2 scFv-Fc 及其变体的聚集体验证以及与人 Her2 抗原结合检测

表达纯化的 anti-Her2 scFv-Fc 及其变体通过 Biacore T200（GE 公司）测定待测分子与人 Her2 蛋白的亲和力，实验过程描述如下：

用偶联 Anti-hIgG 的芯片捕获一定量的 anti-Her2 scFv-Fc 或其变体，然后于芯片表面流经抗原人源 HER2 蛋白（Sino Biological，目录号 10004-H08H），利用 Biacore T200 实时检测反应信号，从而获得结合和解离曲线。实验中用到的缓冲液为 Biacore 通用缓冲液（137 mM NaCl，2.7 mM KCl，10 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，1.8 mM KH_2PO_4，0.05%表面活性剂 P20（GE，目录号 BR-1000-54），pH 7.4）。Anti-hIgG（利用人类抗体捕获试剂盒捕获，GE，目录号 29-2346-00）偶联至 CM5 芯片表面反应值达到 9000 RU 左右，捕获 anti-Her2 scFv-Fc 或其变体后反应值为约 200 RU，然后检测不同浓度的人源 HER2 蛋白（100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM）与 anti-Her2 scFv-Fc 或其变体相互作用的信号值。流动池的流速为 50 μl/min，结合时间 240 s，解离时间 1400 s，用 3 M $MgCl_2$（GE 公司）再生 60 s，基线平稳。根据 biacore evaluation software 中 affinity and kinetics 1：1 结合模式运算获得结果。anti-Her2 scFv-Fc 或变体与抗原人 Her2 蛋白的亲和力见表 2。与 anti-Her2 scFv-Fc（KD=0.77 nM）相比，F53A 突变对变体 anti-Her2-scFv-VL-F53A-Fc（KD=1.26 nM）与抗原人 Her2 蛋白的结合亲和力影响较大；变体 anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc（KD=0.8 nM）对抗原人 Her2 蛋白的结合亲和力与 anti-Her2 scFv-Fc（KD=0.77 nM）类似，变体 anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc 对抗原人 Her2 蛋白的结合的 KD=0.54 nM。可知 F53Y、K30E 突变的引入不会降低对抗原人 Her2 蛋白的结合亲和力。

采用凝胶色谱柱对 anti-Her2 scFv-Fc 或其变体的各组分进行分离，各组分按照分子量由大到小的顺序依次被洗出。色谱柱为 ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column 200Å、1.7 μm、4.6 * 300 mm 规格的凝

胶色谱柱，柱温 25℃。流动相为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液-200 mmol/L 氯化钠，pH 7.0（称取二水合磷酸二氢钠 2.33 g、十二水合磷酸氢二钠 12.53 g、氯化钠 11.69 g，加入约 800 ml 超纯水，搅拌至充分溶解，加超纯水至 1000 ml，混匀后经 0.22 μm 滤膜过滤）。用流动相将样品稀释至 10 mg/ml 作为供试品溶液，精密量取 2 μl 注入液相色谱仪（若样品浓度低于 10 mg/ml，则调整进样体积进样 20 μg 蛋白），在 280 nm 波长处检测。流速为 0.30 ml/min，等度洗脱 15 min。数据处理，采用面积归一化法对结果进行定量分析。分别计算聚集体、免疫球蛋白单体和低分子量杂质的峰面积百分比，其中主峰前为聚集体，主峰为免疫球蛋白单体，主峰后为低分子量杂质。anti-Her2 scFv-Fc 或其变体主峰与聚集体含量比例见表 2。变体 anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc 与 anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc 显著降低聚集体，聚集体从 anti-Her2 scFv-Fc 的 6.31%分别降低到 4.94%、3.39%。

表 2：anti-Her2 scFv-Fc 及其变体的聚集体含量及与抗原 Her2 的结合亲和力

名称	anti-Her2 scFv-Fc	anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc	anti-Her2-scFv-VL-F53A-Fc	anti-Her2-scFv-VL-F53R-Fc	anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc
聚集体	6.31%	4.94%	6.96%	7.83%	3.39%
单体	93.43%	94.83%	92.80%	91.90%	96.32%
低分子片段	0.25%	0.24%	0.23%	0.26%	0.28%
抗原 Her2（KD）	0.77 nM	0.8 nM	1.26 nM	未测	0.54 nM

实施例3 anti-Her2双特异性抗体的构建、表达、纯化

以 Knobs-into-holes（Ridgway, et al., 1996）Fc 工程改造产生作为人 IgG1 的 anti-Her2 双特异性抗体。其中一条重链的 Fc 区序列设计有 H435R、Y436F 突变（Jendeberg et al., 1997）降低 Fc 对蛋白 A 的亲和力，有利于在蛋白 A 亲和纯化中去除双特异性抗体组装过程中形成的同源二聚体（专利 US5945311A）。从实施例 2 中可知，anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc 突变、anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc 突变可以显著降低 anti-Her2-scFv 聚集体，同时未降低对 Her2 抗原亲和力，本实施例中 anti-Her2 双特异性抗体的一条 anti-Her2 臂的抗原结合结构域为 scFv（VH-linker-VL 结构）形式，可变区序列包含突变 K30E（b-anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc，SEQ ID NO：21）、突变 F53Y（b-anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc，SEQ ID NO：23）或者同时包含这两个点突变 anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc（SEQ ID NO：11）。本实施例中 anti-Her2 双特异性抗体的另一条 anti-Her2 臂的抗原结合结构域为 Fab 形式，包括 anti-Her2-domain2-HC-Fc（SEQ ID NO：13）和 anti-Her2-domain2-LC（SEQ ID NO：15）；另外以 scFv（VH-linker-VL 结构或 VL-linker-VH 结构）不含突变构建 anti-Her2 双特异性抗体作为对照。

表 3：anti-Her2 双特异性抗体的序列信息

名称	组成	氨基酸序列 (SEQ ID NO)	核苷酸序列 (SEQ ID NO)
Expi Her2-1	anti-Her2-scFv-VL-VH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAA EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMT WPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO：17)	18

	anti-Her2-domain2-HC-Fc-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMD WVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTL SVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFY FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG (SEQ ID NO：19)	20
	anti-Her2-domain2-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWY QQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO：15)	16
Expi Her2-2	anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK GEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO：11)	12
	anti-Her2-domain2-HC-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMD WVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTL SVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFY FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO：13)	14
	anti-Her2-domain2-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWY QQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO：15)	16

Expi Her2-3	b-anti-Her2-scFv-VH-K30E-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK GEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO：21)	22
	anti-Her2-domain2-HC-Fc	SEQ ID NO：13	14
	anti-Her2-domain2-LC	SEQ ID NO：15	16
Expi Her2-4	b-anti-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK GEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO：23)	24
	anti-Her2-domain2-HC-Fc	SEQ ID NO：13	14
	anti-Her2-domain2-LC	SEQ ID NO：15	16
Expi Her2-5	anti-Her2-scFv-VH-VL-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK GEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO：25)	26
	anti-Her2-domain2-HC-Fc	SEQ ID NO：13	14
	anti-Her2-domain2-LC	SEQ ID NO：15	16

合成 anti-Her2 双特异性抗体的 DNA 序列（SEQ ID NOs：12、14 和 16）并且分别克隆到 pcDNA3.1 表达载体中。通过使用 CHOgro®高产表达系统（货号：MIR 6270）将 anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc（SEQ ID NO：11）、anti-Her2-domain2-HC-Fc（SEQ ID NO：13）和 anti-Her2-domain2-LC（SEQ ID NO：15）的表达载体按转染比率 1：1：1.5 共转染到 ExpiCHO 细胞中。转染密度为 6×10^6 cells/ml。培养基为

CHOgro®表达培养基（货号 MIR 6200，厂家 Mirus）。连续培养至转染后第 10 天离心收集细胞培养上清。使用蛋白 A 磁珠（Genscript，目录号 L00273）进行蛋白纯化。通过 UV-Vis 分光光度计（NanoDrop lite，Thermo Scientific）测量蛋白浓度。此样品命名为 Expi Her2-2。参照该方法，表达纯化得到其它双特异性抗体 Expi Her2-1、Expi Her2-3、Expi Her2-4、Expi Her2-5。

实施例 4 岩藻糖敲除双特异性抗体的制备与验证

通过敲除岩藻糖表达相关基因 FUT8 可以提高 IgG1 与 FcgRIIIa 的相互作用，进而增强抗体的 ADCC 作用（Shields et al.，2002；Yamane-Ohnuki et al., 2004）。在本实施例中，用敲除 FUT8-的 CHO-S 细胞（命名为 CHO FUT8-/-细胞）制备岩藻糖敲除 anti-Her2 双特异性抗体。合成 anti-Her2 双特异性抗体的 DNA 序列（SEQ ID NOs：12、14 和 16）并且分别克隆到 pcDNA3.1 表达载体中。通过使用 CHOgro®高产表达系统（货号：MIR 6270）将 anti-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc、anti-Her2-domain2-HC-Fc 和 anti-Her2-domain2-LC 的表达载体按转染比率 1：1：1.5 共转染到敲除 FUT8-的 CHO-S 细胞中。转染密度为 6×10^6 cells/ml。培养基为 CHOgro®表达培养基（货号 MIR 6200，厂家 Mirus）。连续培养至转染后第 10 天离心收集细胞培养上清。使用蛋白 A 磁珠（Genscript，目录号 L00273）进行蛋白纯化。通过 UV-Vis 分光光度计（NanoDrop lite，Thermo Scientific）测量蛋白浓度。此样品命名为 23C2 Her2-2。参照此方法，将 Expi Her2-1、Expi Her2-3、Expi Her2-4 和 Expi Her2-5 的序列在 CHO FUT8-/-细胞中表达，对应获得岩藻糖敲除 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-1、23C2 Her2-3、23C2 Her2-4 和 23C2 Her2-5。

使用 GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒（Waters, Milford, Mass., USA）对 CHO FUT8-/-细胞和 CHO-S 细胞表达的 anti-Her2 双特异性抗体样品进行处理，将 N-糖从蛋白上释放，再对 N-糖进行标记，经色谱柱分离，采用 FLR 检测器（Waters, Milford, Mass., USA）进行分析，可得到 N-糖的结构和含量，糖型含量比例见表 4，正常 anti-Her2 双特异性抗体 Expi HER2-2 中不含岩藻糖比例为 21.85%，敲除 FUT8-的 CHO-S 细胞表达的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 不含岩藻糖比例为 99.40%。

表 4：anti-Her2 双特异性抗体的糖型含量分析

成分名称 (Component name)	含量(%)	
	Expi HER2-2	23C2 HER2-2
A1(M3B)	1.81	9.84
A1G(4)1	0.16	0.17
A2	1.14	70.33
A2[3]G(4)1	/	2.34
A2[6]G(4)1	/	4.19
A2[3]BG(4)1	/	0.11
A2G(4)2	/	0.55
A2G(4)2S(3)1	/	0.21
A2G(4)2S(3,3)2	/	0.46
F(6)A1G(4)1	/	/
F(6)A1[3]G(4)1S(3)1	/	/
F(6)A1	12.77	/
F(6)A2	60.69	0.60
F(6)A2[3]G(4)1	1.20	/
F(6)A2[6]G(4)1	0.70	/
F(6)A2G(4)2	/	/
F(6)A2G(4)2S(3)1	/	/
M3	/	0.26
M4	/	0.07
M4A1G(4)1	/	0.36
M4 D1	/	0.08
M5	12.31	5.67
M5A1G(4)1	/	0.05
M6 D1	2.11	0.75
M6 D3	0.73	0.18
M7 D1	0.80	0.44
M8	0.20	0.15

去岩藻糖化糖型（De-Fucosylated Glycans）	21.85	99.40
双唾液酸修饰糖型（Di-Sialylated Glycans）	/	0.46
高甘露糖糖型（High Mannose Glycans）	20.07	7.24
单唾液酸修饰糖型（Mono-Sialylated Glycans）	0.18	0.21
非唾液酸修饰糖型（Non-Sialylated Glycans）	99.82	99.33

实施例 5 双特异性抗体的聚集体验证

本实施例涉及 anti-her2 双特异性抗体 23C2 Her2-1、23C2 Her2-2、23C2 Her2-3、23C2 Her2-4、23C2 Her2-5 的聚集体验证。

采用凝胶色谱柱对 anti-her2 双特异性抗体进行分离，验证聚集体含量，各组分按照分子量由大到小的顺序依次被洗出。色谱柱为 ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column 200Å、1.7 μm、4.6 * 300 mm 规格的凝胶色谱柱，柱温 25℃。流动相为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液-200 mmol/L 氯化钠，pH 7.0（称取二水合磷酸二氢钠 2.33 g、十二水合磷酸氢二钠 12.53 g、氯化钠 11.69 g，加入约 800 ml 超纯水，搅拌至充分溶解，加超纯水至 1000 ml，混匀后经 0.22 μm 滤膜过滤）。用流动相将样品稀释至 10 mg/ml 作为供试品溶液，精密量取 2 μl 注入液相色谱仪（若样品浓度低于 10 mg/ml，则调整进样体积进样 20 μg 蛋白），在 280 nm 波长处检测。流速为 0.30 ml/min，等度洗脱 15 min。数据处理，采用面积归一化法对结果进行定量分析。分别计算聚集体、免疫球蛋白单体和低分子量杂质的峰面积百分比，其中主峰前为聚集体，主峰为免疫球蛋白单体，主峰后为低分子量杂质。

表 5：anti-Her2 双特异性抗体的聚集体含量

样品名称	聚集体	单体	低分子片段
23C2 Her2-2	8.51%	91.02%	0.47%
23C2 Her2-1	19.55%	80.05%	0.40%

结果表明，将 scFV 组装成双特异性抗体，得到的双特异性抗体仍然会产生大量的聚集体，而通过引入突变则可以降低双特异性抗体的聚集体的含量，与未含突变的 23C2 Her2-1 相比，23C2 Her2-2 的聚集体含量可以降低至 8.51%（表 5）。

实施例 6 anti-Her2 双特异性抗体的抗原结合检测

表达纯化的 anti-Her2 双特异性抗体通过 Biacore T200（GE 公司）测定待测分子与 HER2 蛋白的亲和力，实验过程描述如下：

用偶联 Anti-hIgG 的芯片捕获一定量的 anti-Her2 双特异性抗体，然后于芯片表面流经人源 Her2（Sino Biological，目录号 10004-H08H），利用 Biacore T200 实时检测反应信号，从而获得结合和解离曲线。实验中用到的缓冲液为 Biacore 通用缓冲液（137 mM NaCl，2.7 mM KCl，10 mM $Na_2HPO_4{\cdot}12H_2O$，1.8 mM KH_2PO_4，0.05%表面活性剂 P20，pH 7.4）。Anti-hIgG（利用人类抗体捕获试剂盒捕获，GE，目录号 29-2346-00）偶联至 CM5 芯片表面反应值达到 9000RU 左右，捕获 anti-Her2 双特异性抗体后反应值为约 200RU，然后分别检测不同浓度的 Her2 蛋白（100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM）与 anti-Her2 双特异性抗体相互作用的信号值。流动池的流速为 50 μl/min，结合时间 240 s，解离时间 1400 s，用 3M $MgCl_2$（GE）再生 60 s，基线平稳。

根据 biacore evaluation software 运算获得结果。anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-2 以及对照曲妥珠单抗和帕妥珠单抗与抗原 Her2 结合亲和力见表 6，anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-2 对抗原 Her2 结合的 KD 为 6.11E-10M，曲妥珠单抗与抗原 Her2 结合的 KD 为 1.22E-09 M，帕妥珠单抗与抗原 Her2 结合的 KD 为 2.35E-09M，anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-2 比曲妥珠单抗与帕妥珠单抗对抗原 Her2 有更高的亲和力。

表 6：anti-Her2 双特异性抗体对人 Her2 抗原的亲和力

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
23C2 Her2-2	1.79E+05	1.09E-04	6.11E-10
曲妥珠单抗对照样品	1.73E+05	2.12E-04	1.22E-09
帕妥珠单抗对照样品	1.15E+05	2.69E-04	2.35E-09

实施例 7 anti-Her2 双特异性抗体的抗原结合检测

参照实施例 6 的实验过程，可通过 Biacore T200（GE）测定表达纯化的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-1、23C2 Her2-2、23C2 Her2-3、23C2 Her2-4、23C2 Her2-5 与 HER2 蛋白的亲和力。

anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-1 与抗原人 Her2 蛋白的亲和力测定结果见表 7。结合表 6 和表 7 的结果可知，引入 F53Y、K30E 突变可以提高 anti-Her2 双特异性抗体对抗原人 Her2 蛋白的结合亲和力。

表 7：anti-Her2 双特异性抗体对人 Her2 抗原的亲和力

样品名称	23C2 Her2-1
抗原 Her2 KD	4.02 nM

实施例 8 anti-Her2 双特异性抗体对 Her2 阳性靶细胞 BT474 的杀伤

通过人 PBMC（外周血单个核细胞）提供 NK 细胞来研究 anti-Her2 双特异性抗体对靶细胞（BT474 Her2+++，来源：中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）的杀伤作用，根据 EC50 大小评价 anti-Her2 双特异性抗体的体外活性。

具体实验过程如下：BT474 细胞使用含 2% FBS（胎牛血清）的 1640 实验培养基调整细胞密度至 3×10^5 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板（eppendorf，货号：0030730199）。使用 1640 实验培养基配制不同浓度（分别为 1000 ng/ml、333 ng/ml、111 ng/ml、37 ng/ml、12.3 ng/ml、4.11 ng/ml、1.37 ng/ml、0.46 ng/ml、0.15 ng/ml、0.05 ng/ml）的 anti-Her2 双特异性抗体，将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。人 PBMC 使用 1640 实验培养基调整细胞密度至 1.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μl。设置给药组（靶细胞+效应细胞+抗体）、靶细胞组（BT474 细胞）、效应细胞组（人 PBMC）、靶细胞+效应细胞组、空白对照组（培养基）和裂解液对照组、靶细胞最大释放组（靶细胞+裂解液），效靶比为 10：1。在检测前 45min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μl/孔裂解液（Promega，货号 G182A）。45min 后使用 CytoTox96®非放射性细胞毒性检测试剂盒（cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay，Promega，G1780）检测细胞裂解率。

$$裂解率(\%)=(OD_{给药组}-OD_{靶细胞+效应细胞组})/(OD_{靶细胞最大释放组}-OD_{靶细胞组})\times100\%$$

图 1 显示了 anti-Her2 双特异性抗体对 BT474 Her2+++肿瘤细胞的杀伤率。ADCC 增强的 anti-Her2 双特异性抗体（图 1 中表示为 23C2 HER2-1 和 23C2 HER2-2）对 BT474 肿瘤细胞的杀伤优于联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗，优于 CHO-S 表达的 anti-Her2 双特异性抗体（Expi HER2-1 和 Expi HER2-2）；其中曲妥珠单抗+帕妥珠单抗（1:1）联用的 EC50 为 8.627 ng/ml，Expi HER2-1 的 EC50 为 38.05 ng/ml，Expi HER2-2 优于 Expi HER2-1，其 EC50 为 35.17 ng/ml；ADCC 增强的 23C2 HER2-1 的 EC50 为 4.728 ng/ml，ADCC 增强的 23C2 HER2-2 优于 ADCC 增强的 23C2 HER2-1，其 EC50 为 3.658 ng/ml。

实施例 9 anti-Her2 双特异性抗体对 Her2 阳性靶细胞 NCI-N87 的杀伤

通过人 PBMC（外周血单个核细胞）提供 NK 细胞来研究 anti-Her2 双特异性抗体对靶细胞（NCI-N87 Her2++，来源：中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）的杀伤作用，根据 EC50 大小评价 anti-Her2 双特异性抗体的体外活性。

具体实验过程如下：NCI-N87 细胞使用含 2% FBS（胎牛血清）的 1640 实验培养基调整细胞密度至 3×10^5 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板（eppendorf，货号：0030730199）。使用实验培养基配制不同浓度（分别为 8.1nM、2.7nM、0.9nM、0.3nM、0.1nM、0.03nM、0.01nM、0.003nM、0.001nM、0.0004nM）的 anti-Her2 双特异性抗体或对照药，将不同浓度的抗体或对照药加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。人 PBMC 使用实验培养基调整细胞密度至 1.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μl。设置给药组（靶细胞+效应细胞+抗体或对照药）、靶细胞组（NCI-N87 细胞）、效应细胞组（人 PBMC）、靶细胞+效应细胞组、空白对照组（培养基）和裂解液对照组、靶细胞最大释放组（靶细胞+裂解液），效靶比为 10：1。在检测前 45min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μl/孔裂解液（Promega，货号 G182A）。45min 后使用 CytoTox96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒（cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay，Promega，G1780）检测细胞裂解率。以曲妥珠单抗、T-DM1（曲妥珠单抗-美坦新偶联物，商品名 Kadcyla®）、曲妥珠+帕妥珠（1:1）、Expi HER2-1 作为对照药。

$$裂解率(\%)=(OD_{给药组}-OD_{靶细胞+效应细胞组})/(OD_{靶细胞最大释放组}-OD_{靶细胞组})\times100\%$$

图 2 显示了 anti-Her2 双特异性抗体对 NCI-N87 肿瘤细胞的杀伤率。ADCC 增强的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 对 NCI-N87 肿瘤细胞的杀伤优于联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗、曲妥珠单抗、T-DM1 以及 Expi HER2-1；其中 ADCC 增强的 23C2 HER2-2 的 EC50 为 0.02447 nM，曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用 EC50 为 0.08267 nM，Expi HER2-1 的 EC50 为 0.1048 nM，T-DM1 的 EC50 为 0.07392 nM，曲妥珠单抗的 EC50 为 0.07468 nM。

实施例10 anti-Her2双特异性抗体对曲妥珠耐药细胞JIMT-1的杀伤

通过人 PBMC（外周血单个核细胞）提供 NK 细胞来研究 anti-Her2 双特异性抗体对靶细胞（JIMT-1，来源：AddexBio，Catalog#：C0006005）的杀伤作用，根据 EC50 大小评价 anti-Her2 双特异性抗体的体外活性。

具体实验过程如下：JIMT-1 细胞使用含 2% FBS（胎牛血清）的 1640 实验培养基调整细胞密度至 3×10^5 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板（eppendorf，货号：0030730199）。使用实验培养基配制不同浓度（分别为 8.1nM、2.7nM、0.9nM、0.3nM、0.1nM、0.03nM、0.01nM、0.003nM、0.001nM、0.0004nM）的 anti-Her2 双特异性抗体或对照药，将不同浓度的抗体或对照药加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。人 PBMC 使用实验培养基调整细胞密度至 1.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μl。设置给药组（靶细胞+效应细胞+抗体或对照药）、靶细胞组（BT474 细胞）、效应细胞组（人 PBMC）、靶细胞+效应细胞组、空白对照组（培养基）和裂解液对照组、靶细胞最大释放组（靶细胞+裂解液），效靶比为 20：1。在检测前 45min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μl/孔裂解液（Promega，货号 G182A）。45min 后使用 CytoTox96®非放射性细胞毒性检测试剂盒（cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay，Promega，G1780）检测细胞裂解率。以曲妥珠单抗、T-DM1、曲妥珠+帕妥珠（1:1）、Expi HER2-1 作为对照药。

$$裂解率(\%)=(OD_{给药组}-OD_{靶细胞+效应细胞组})/(OD_{靶细胞最大释放组}-OD_{靶细胞组})\times100\%$$

图 3 显示了 anti-Her2 双特异性抗体对 JIMT-1 肿瘤细胞的杀伤率。ADCC 增强的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 对 JIMT-1 肿瘤细胞的杀伤优于联用的曲妥珠单抗+帕妥珠单抗、曲妥珠单抗、T-DM1、Expi HER2-1；其中 ADCC 增强的 23C2 HER2-2 的 EC50 为 0.01006 nM，曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联用的 EC50 为 0.06727 nM，Expi HER2-1 的 EC50 为 0.08066 nM，T-DM1 的 EC50 为 0.08357 nM，曲妥珠单抗的 EC50 为 0.07443nM，此外，anti-Her2 双特异性抗体 23C2 HER2-2 具有更高的细胞裂解率。

实施例11 anti-Her2双特异性抗体对BT474 Her2+++肿瘤细胞的增殖抑制

将 23C2 Her2-2、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗使用含 2% FBS（胎牛血清，厂家 GIBCO，货号：10099-141）的 DMEM/F12 培养基（GIBCO，货号 11330-032）稀释至终浓度为 3.2 μg/ml，然后按照 1：1 的比例梯度稀释 9 个浓度（1.6 μg/ml、0.8 μg/ml、0.4 μg/ml、0.2 μg/ml、0.1 μg/ml、0.05 μg/ml、0.025 μg/ml、0.0125 μg/ml、0.00625 μg/ml）。取对数生长期 BT474 Her2+++细胞，调整密度至 1×10^5 cells/ml 进行铺板，每孔加入 100 μl，并设置无细胞空白孔作为对照。加入上述梯度稀释的样品，每孔 50 μl。于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养 5 天。弃掉培养液，加入 CCK-8（日本同仁化学，货号：CK04）工作液，每孔 100 μl，孵育显色 4~5 小时后置于酶标仪中（厂家 Thermo，型号：VarioskanFlash），以 630 nm 为参比波长，读取并记录波长 450 nm 下孔板的吸光度值。计算肿瘤细胞增殖抑制率。

结果见图 4，ADCC 增强的 anti-Her2 双特异性抗体 23C2 Her2-2 对 BT474 肿瘤细胞增殖抑制率为 78.38%，优于曲妥珠增殖抑制率（54.12%）以及曲妥珠+帕妥珠联用的增殖抑制率（53.7%）。

实施例 12 anti-Her2 双特异性抗体对 NCI-N87 Her2++胃癌裸小鼠异种移植瘤抑制作用

通过 NCI-N87 Her2++胃癌细胞（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）在小鼠异种肿瘤移植模型中评价 anti-Her2 双特异性抗体体内药效。准备 NCI-N87 Her2++胃癌细胞，浓度 5×10^7 个/ml *0.1ml/只，在无菌条件下，接种于裸小鼠（来自常州卡文斯实验动物有限公司，裸鼠，14-17g，雄性，饲养环境：SPF 级）右侧腋窝下。裸小鼠移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径，待肿瘤生长至 100-250mm^3 后将动物分成 5 组：

组 1：对照（Control）
组 2：Expi Her2-1，10mg/kg
组 3：23C2 Her2-2，5mg/kg
组 4：23C2 Her2-2，10mg/kg
组 5：Per+Tra（曲妥珠单抗+帕妥珠单抗），5mg/kg+5mg/kg

各给药组按相应剂量静脉注射给药，每周 2 次，连续给药 3 周（6 次）左右。除组 5 联用组两个药物的给药体积分别为 5 ml/kg，其余各组给药体积均为 10 ml/kg。组 1 同时 i.v.给予 10ml/kg PBS（Hyclone；货号：sh30256.01）。联用组给药时，给完帕妥珠单抗后至少 30min 再给曲妥珠单抗。

使用测量瘤径的方法，动态观察被试物抗肿瘤的效应，每周测 2-3 次瘤体积，同时称鼠重，记录数据；每日观察小鼠一般表现。

检测指标：

肿瘤体积（tumor volume，TV），计算公式为：$TV=1/2\times a\times b^2$，其中 a、b 分别表示肿瘤的长和宽。

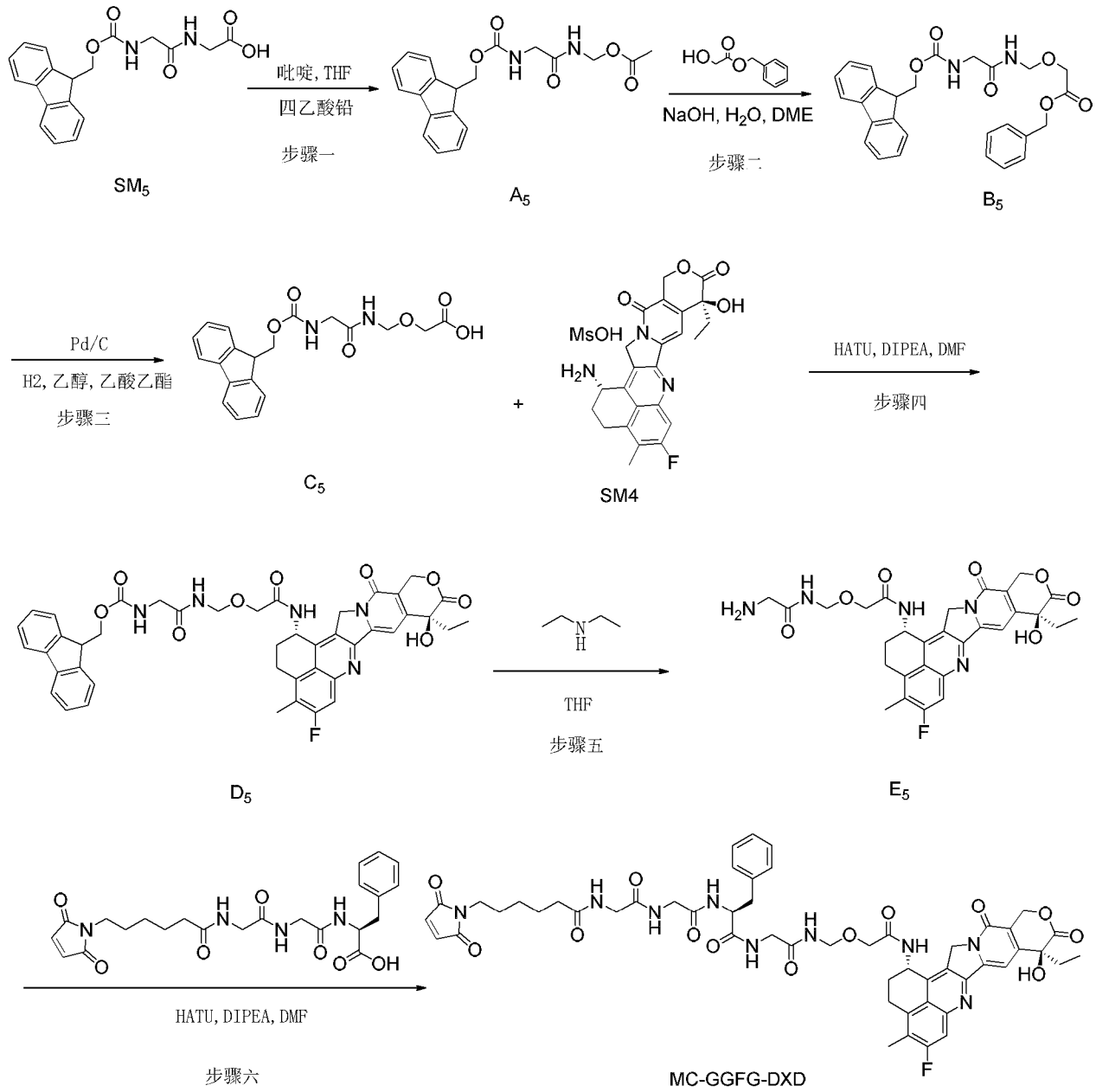
本实验从 d0 天开始给药，共给药 6 次（d0、d3、d7、d10、d14、d17 天）。至实验 d21 天，无动物死亡。各组小鼠平均体重呈增长趋势（图 6）。药物无明显毒性作用。

至 d21 天，组 2（10mg/kg）、组 3（5mg/kg）、组 4（10mg/kg）、Per+Tra 联用组（5mg/kg+5mg/kg）的各测试样品对 NCI-N87 胃癌裸小鼠异种移植瘤体积的影响见表 8 与图 5，23C2 Her2-2 组（10mg/kg）对 NCI-N87 胃癌裸小鼠异种移植瘤抑制优于 Expi Her2-1（10mg/kg）与 Per+Tra 联用组（5mg/kg+5mg/kg）。

表 8：anti-HER2 双抗对 NCI-N87 胃癌裸小鼠异种移植瘤体积的影响（mean±SD）

组别	剂量 (mg/kg)	给药途径	动物数(只)		TV（mm^3）							
			d0	d21	d0	d3	d6	d9	d12	d15	d18	d21
Control	-	i.v.	6	6	204 ±40	284 ±58	363 ±78	481± 109	586± 161	724± 261	808± 241	863± 251
Expi Her2-1	10	i.v.	6	6	204 ±23	235 ±46	207 ±35	179± 30	195± 24	204± 44	195± 50	178± 35
23C2 Her2-2	5	i.v.	6	6	204 ±31	246 ±37	250 ±47	277± 67	318± 79	348± 86	353± 84	358± 101
23C2 Her2-2	10	i.v.	6	6	204 ±44	201 ±39	154 ±39	136± 33	151± 35	173± 46	165± 35	144± 29
Per+Tra	5+5	i.v.	6	6	204 ±34	224 ±48	199 ±59	202± 65	205± 45	231± 93	218± 94	218± 91

实施例13 MC-GGFG-DXD的合成



步骤一 A5（乙酸({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酰基}氨基)甲酯）的合成

称取 20g SM5（N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酰甘氨酸）加入到 1L 的三口烧瓶中，加入 300 ml 四氢呋喃和 100 ml 甲苯，搅拌均匀，加入 30 g 四乙酸铅和 5.4 g 吡啶。升温到 65℃反应 4 小时。降温到室温，过滤掉固体。在温度 40℃下，将有机相浓缩干。将 300 ml 乙酸乙酯和 300 ml 水加入到浓缩干的有机相中。

搅拌 20 分钟。分离出乙酸乙酯相。将 100 ml 饱和氯化钠溶液加入到乙酸乙酯相中，搅拌 20 分钟。分离出乙酸乙酯相并浓缩干。进行硅胶柱层析（石油醚：乙酸乙酯=1：1）得到 13g A5。产率 63%。ESI-MS:m/z=391.1 $[M+Na]^+$。

步骤二 B5（[({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酰基}氨基)甲氧基]乙酸苄酯）的合成

称取 1.0g A5 加入到 250 ml 单口烧瓶中，加入 15 ml DME（乙二醇二甲醚），加入 0.897g 乙醇酸苄酯，放入冰水浴降温到 0℃。将 0.27 ml 水和 0.108g NaOH 配成溶液。将配好的 NaOH 溶液加入到反应液中。在 0℃下反应 1 小时，向反应液中加入 0.078 g 冰醋酸。加入 100 ml 水和 100 ml 乙酸乙酯，室温搅拌 20 分钟，分离出有机相并浓缩干。硅胶柱层析（石油醚：乙酸乙酯=1：1）得到 0.68g B5。产率 53%。ESI-MS:m/z=497.1 $[M+Na]^+$。

步骤三 C5（[({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酰基}氨基)甲氧基]乙酸）的合成

称取 0.68g B5 加入 250 ml 氢化瓶中，加入 20 ml 乙醇和 10 ml 乙酸乙酯，加入 0.34 g 湿钯碳（钯含量 10%）。用氢气球通入氢气。室温反应 1 小时。用硅藻土过滤掉钯碳。在 40℃下将滤液浓缩干。得到 425mg C5。产率 77%。ESI-MS:m/z=407.1 $[M+Na]^+$。

步骤四 D5（[({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酰基}氨基)甲氧基]乙酰基-N-[(2-{[(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']吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-2-氧代乙氧基)甲基]甘氨酰胺）的合成

称取 50mg SM4（伊沙替康甲磺酸盐）和 50mg C5 加入到 100 ml 单口烧瓶中，加入 2ml DMF（N,N-二甲基甲酰胺），降温到 0℃，加入 54mg HATU（2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯）和 30 mg DIEA（N,N-二异丙基乙胺）。恢复到室温。室温反应 3 小时。加入 100 ml 二氯甲烷和 100 ml 水。搅拌 20 分钟。分离出有机相并浓缩干。硅胶柱层析（二氯甲烷：甲醇=10：1）得到 88mg D5。产率 84%。ESI-MS:m/z=802.4 $[M+H]^+$。

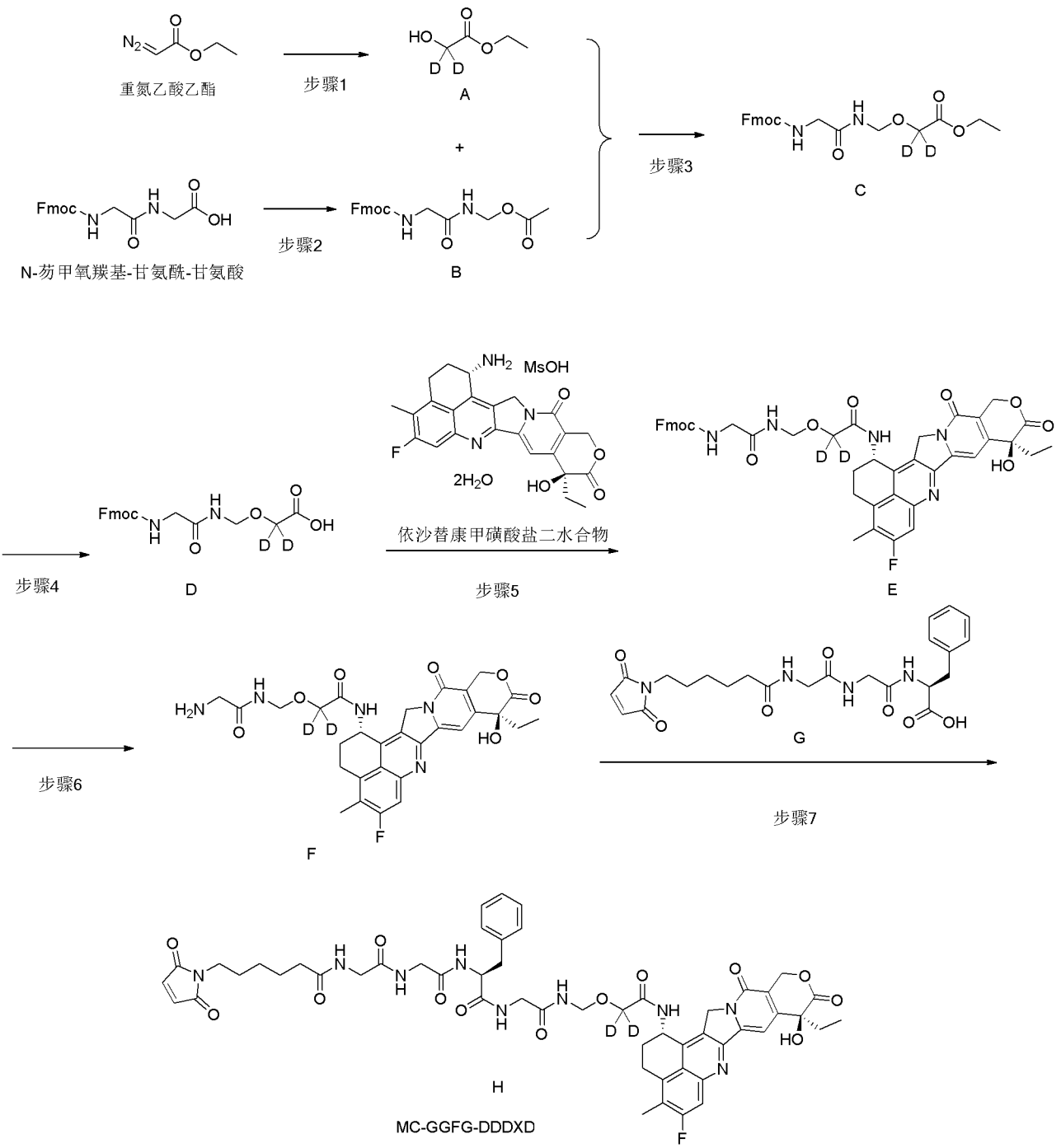
步骤五 E5({[（甘氨酰基）氨基]甲氧基}乙酰基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6'7']吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-2-氧代乙氧基)甲基]甘氨酰胺）的合成

称取 78mg D5 加入到 100 ml 单口烧瓶中，加入 4 ml 四氢呋喃，降温到 0℃，加入 78 mg 乙二胺。恢复到室温。反应 5 小时。在 40℃下将反应液浓缩干。得到 55mg E5。产率 98%。ESI-MS:m/z=580.3 $[M+H]^+$。

步骤六 MC-GGFG-DXD 合成

称取 55mg E5 加入到 100 mg 单口烧瓶中，加入 2ml N,N-二甲基甲酰胺，加入 48mg MC-GGF-OH（马来酰亚胺己酰甘氨酰甘氨酰苯丙氨酸），降温到 0℃。加入 54mg HATU，加入 30mg DIEA。恢复到室温。反应 1 小时。加入 100ml 乙酸乙酯和 100ml 水，搅拌 20 分钟。分离出有机相。在 40℃下将其浓缩干。硅胶柱层析（乙酸乙酯：甲醇=10：1）得到 26mg MC-GGFG-DXD。产率 27%。ESI-MS: m/z=1034.51（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) 8.62 (1H, t, J=6.5Hz), 8.50 (1H, d, J=9.0Hz), 8.29 (1H, t, J=6.0Hz), 8.12 (1H, d, J=8.0Hz), 8.06 (1H, t, J=6.0Hz), 8.00 (1H, t, J=6.0Hz), 7.76(1H, d, J=11Hz), 7.30(1H, s), 7.25~7.15 (5H, m), 6.90 (2H,s), 6.52 (1H,brs), 5.61~5.57 (1H,m), 5.42~5.40 (2H, m), 5.19~5.16 (2H, m), 4.64 (2H, d, J=7.0Hz), 4.49~4.44 (1H, m), 4.05~4.01 (2H, m), 3.76~3.51 (6H, m), 3.37~3.32(2H, m), 3.21~3.11 (2H, m), 3.02 (1H,dd,J=4.5,14.0), 2.77 (1H,dd,J=9.5,13.5), 2.37 (3H, s), 2.21~2.15(2H, m), 2.09 (2H, t, J=7.5Hz), 1.91~1.81 (2H, m), 1.49~1.42 (4H, m), 1.20~1.14 (2H, m), 0.87 (3H, t, J=6.5Hz)。

实施例 14 氘代 MC-GGFG-DXD（MC-GGFG-DDDXD）、氘代 DXD（DDDXD）以及 DXD 的合成



步骤一 中间体 A 的合成

在氮气保护下将 80g 重氮乙酸乙酯加入到 3L 单口瓶中，加入 800ml 二氯甲烷和 800ml 1%氘代乙酸溶液（8g 氘代乙酸溶于 800 ml 氘水）。将反应液置于遮光条件下室温下搅拌 75 小时。分液收集有机相，水相用二氯甲烷萃取 2 次（200 ml*2），合并有机相。用 200 ml 氘水洗有机相，得到的有机相用无水硫酸钠干燥，过滤除掉硫酸钠，将滤液 20℃减压浓缩至干，得到 49.25g 中间体 A。产率 66%。^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.27 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 2H)。

步骤二 中间体 B 的合成

称取 50g N-芴甲氧羰基-甘氨酰-甘氨酸加入到 2L 的圆底烧瓶中，加入 750ml 四氢呋喃和 150ml 冰醋酸，于 40℃下搅拌 20 分钟，加入 100g 四乙酸铅，升温到 80℃后继续反应 3 小时。降温到室温，抽滤，滤饼用 250ml 乙酸乙酯洗涤。将滤液浓缩至干。加入 330ml 二氯甲烷和 670ml 乙酸乙酯溶解得到有机相。有机相用 30%碳酸氢钾水溶液洗 3 次（500ml*3）。有机相用无水硫酸钠干燥，过滤。将滤液减压浓缩至干，加入 100ml 二氯甲烷溶解，再加入 100ml 正己烷，室温搅拌至析出固体，然后加入 300ml 正己烷和二氯甲烷的混合溶液（正己烷:二氯甲烷=1:1），搅拌过夜。过滤，滤饼于 40℃真空烘箱中干燥 4 小时，得到 37.3 克中间体 B。产率 72%。LCMS (ESI) m/z: 391.09 $[M+Na]^+$。

步骤三 中间体 C 的合成

称取 78g 中间体 B 加入 3000 ml 单口烧瓶中，向其中加入 800ml 二氯甲烷，以及加入 45g 化合物 A。将 3000 ml 单口烧瓶放入冰水浴降温到 0℃。将 16g 叔丁醇锂溶于 400ml 二氯甲烷中配成叔丁醇锂溶液。将叔丁醇锂溶液加入到 3000 ml 圆底烧瓶中。0℃下反应 3 小时。移至室温，加入 800ml 水搅拌。分液，收集有机相。水相用 400ml 二氯甲烷萃取。合并有机相。有机相用 800ml 饱和食盐水洗 1 次，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩。硅胶柱层析（石油醚:乙酸乙酯=3:1）得到 61 g 中间体 C。产率 70%。LCMS (ESI) m/z: 437.34 $[M+Na]^+$。

步骤四 化合物 D 的合成

将 31.2 g 化合物 C 加入到 270 mL 氘代甲醇和 70 mL 重水中，冰浴下搅拌，随后加入 5.5g NaOH，移至室温搅拌过夜。向反应液中加入 300 mL 乙酸乙酯和 300 mL 水萃取，水层加入 20 mL 冰醋酸调节 pH 至 2-3，有固体析出，抽滤得 20.3 g 化合物 D。收率 69.8 %。LCMS (ESI) *m/z*: 409.08 $[M + Na]^+$。

步骤五 化合物 E 的合成

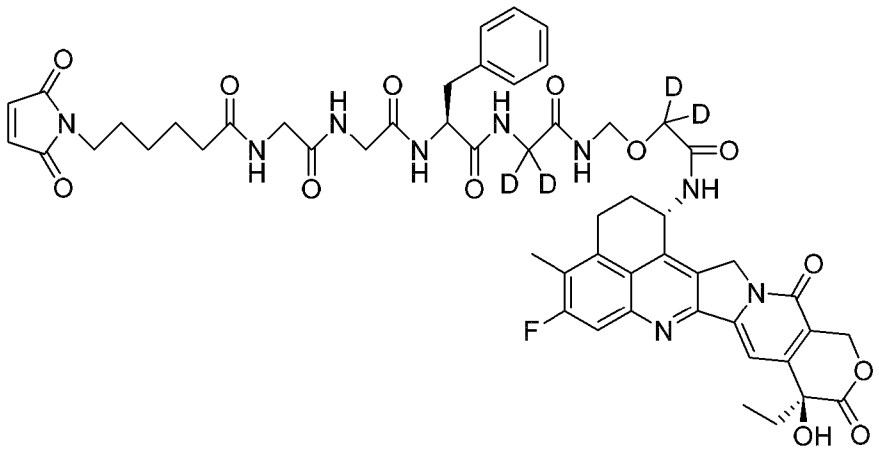
称取 2.0 g 依沙替康甲磺酸盐二水合物和 1.63 g 化合物 D，加入到 100ml 圆底烧瓶中。加入 40ml N,N-二甲基甲酰胺，搅拌。降温到 0℃。依次加入 2.0 g 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和 1.82 g N,N-二异丙基乙基胺。0℃反应 3h。将反应液倒入 120ml 冰水中。搅拌 1h。过滤。将滤饼用二氯甲烷溶解。柱层析（100-200 目硅胶 100 g，二氯甲烷：甲醇=30：1，2L）。得到 2.6 g 化合物 E。产率 92%。LCMS (ESI) *m/z*: 804.84 $[M +H]^+$。

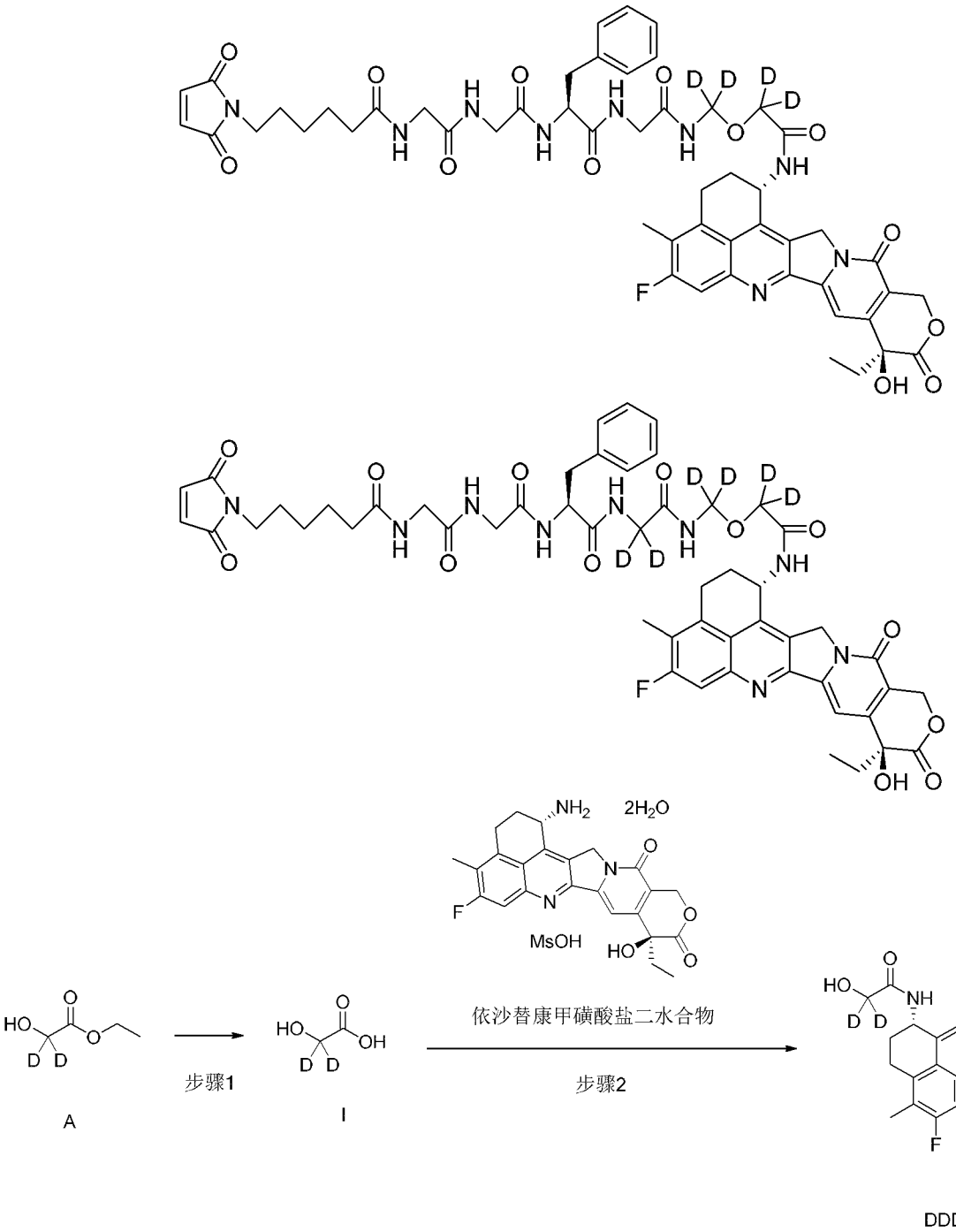
步骤六 化合物 F 的制备

称取 0.38g 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯加入到 100ml 圆底烧瓶中。将 20ml 四氢呋喃加入到圆底烧瓶中，搅拌。降温到 0℃。称取 2.0 g 化合物 E，用 20ml 四氢呋喃配成溶液。将配好的化合物 E 的溶液缓慢加入到 100ml 圆底烧瓶中。将反应液自然升温到室温，反应 3h。氮气保护下过滤。得到 1.45 g 化合物 F。产率 98%。LCMS (ESI) *m/z*: 582.39 $[M +H]^+$。

步骤七 化合物 H 的制备

称取 1.00 g 化合物 F 和 0.97 g 化合物 G 加入到 100ml 圆底烧瓶中，加入 10ml N,N-二甲基甲酰胺。降温到-20℃，加入 0.34g 1-羟基苯并三唑与 0.49g 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐。-20℃下反应 3h。向反应液中加入 20ml DCM 与 20ml 水搅拌 0.5h，静置，分液，收集有机相。有机相用无水硫酸钠干燥，过滤。将滤液减压浓缩至干。硅胶柱层析（二氯甲烷：甲醇=15：1）得到 400mg 化合物 H。收率约 22%。MS m/s: 1037.08 $[M+H]^+$。H-NMR(500MHz, DMSO-d6) 8.62 (1H, t, J=6.5), 8.49 (1H, d, J=8.5), 8.29 (1H, t, J=5.5), 8.12 (1H, d, J=8.0), 8.06 (1H, t, J=5.5), 8.00 (1H, t, J=5.5), 7.74 (1H, d, J=10.5), 7.30 (1H, s), 7.27~7.12 (5H, m), 6.98 (2H, s), 6.51 (1H, brs), 5.61~5.58(1H, m), 5.45~5.37 (2H, m), 5.22~5.13 (2H, m), 4.64 (2H, d, J=6.5),4.49~4.45 (1H, m), 3.76~3.57 (6H, m), 3.37~3.32 (2H, m), 3.24~3.09 (2H, m), 3.02 (1H, dd, J=4.5,14.0), 2.77 (1H, dd, J=9.5,13.5), 2.36 (3H,s), 2.23~2.14 (2H, m) 2.09 (2H, t, J=7.5), 1.91~1.79 (2H, m), 1.49~1.42 (4H, m), 1.20~1.14(2H, m), 0.87 (3H, t, J=7.5)。





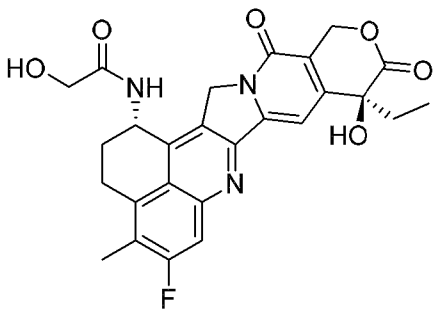
步骤一 中间体 I 的合成

将 0.85g 化合物 A 加入到 9ml 氘代甲醇和 1ml 重水中，冰浴下搅拌，随后加入 0.32g 氢氧化钠，室温搅拌过夜。反应液 40℃减压浓缩得化合物 I，不经纯化直接投下一步。

步骤二 化合物 J（DDDXD）的合成

将 0.30g 依沙替康甲磺酸盐二水合物和 0.056g 中间体 I 加入到 3ml N,N-二甲基甲酰胺中。冰浴下搅拌，随后加入 0.32g 1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐和 0.22g N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 4 h。反应液用液相制备得 0.18 g 化合物 J。收率 64.3%。LC-MS (ESI) m/z: 496.37 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) 8.39 (d, J = 8.9Hz, 1H), 7.70 (d, J = 10.9Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.58~5.54 (m, 1H), 5.47 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.17~5.02 (m, 2H), 3.24~3.03 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.25~2.09 (m, 2H), 1.92~1.80 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3Hz, 3H)。

另外，参照专利 WO2014057687 说明书中的 Example 76 公开的方法制备 DXD。



DXD

实施例 15 抗体药物偶联物的制备

试剂：

溶液 A：pH7.4 PBS 缓冲液

溶液 B：10mM TCEP（三(2-羧基乙基)膦盐酸盐）水溶液

溶液 C：DMSO（二甲基亚砜）

溶液 D：组氨酸缓冲液（含 0.89mg/ml L-组氨酸和 4.04mg/ml 盐酸 L-组氨酸一水合物）

溶液 E：700mg/ml 蔗糖溶液（用溶液 D 配制）

溶液 F：20mg/ml 吐温 80（用溶液 D 配制）

抗体：曲妥珠单抗、23C2 Her2-2

linker-payload（接头-细胞毒药物部分）：MC-GGFG-DXD、MC-GGFG-DDDXD

表 9. 实验条件及组别：

抗体（N1）：TCEP（N2）	抗体（N1）：化合物（N3）
1:6/1:6.6	1:11.6/1:9.6

序号	组别
1	曲妥珠单抗饱和偶联 MC-GGFG-DXD（N1：N2=1：6，N1：N3=1:11.6）
2	曲妥珠单抗饱和偶联 MC-GGFG-DDDXD（N1：N2=1：6，N1：N3=1:11.6）
3	23C2 Her2-2 饱和偶联 MC-GGFG-DXD（N1：N2=1：6.6，N1：N3=1:9.6）
4	23C2 Her2-2 饱和偶联 MC-GGFG-DDDXD（N1：N2=1：6.6，N1：N3=1:9.6）

实验流程：

1、抗体置换

a、将 30KD 的超滤离心管用溶液 A 充分润湿；

b、将抗体置换到溶液 A 中；

c、加入适量溶液 A 调节抗体浓度为 5mg/ml（23C2 Her2-2）和 7.5mg/ml（曲妥珠单抗）。

2、抗体还原

a、计算抗体摩尔量，记为 N1；

b、向抗体溶液中加入适量溶液 B，使反应体系 TCEP 摩尔量为 N2；

c、铝箔包扎，置于旋转培养仪上低速（20rpm）震摇，37℃避光反应 1h。

3、偶联

a、取适量 linker-payload，用 DMSO 溶解，终浓度为 10mg/ml；

b、向抗体溶液中加入 DMSO，使抗体浓度为 5wt%，再加入适量 linker-payload 溶液，使摩尔浓度为 N3；

c、铝箔包扎，置于旋转培养仪上低速（20rpm）震摇，20℃避光反应 2h。

4、偶联终止

a、用溶液 D 将超滤离心管润湿；

b、将抗体置换至溶液 D 中，加入适量溶液 E、F 并调节蔗糖和吐温 80 的浓度分别为 90mg/ml 和 0.3mg/ml，-80℃冻存。

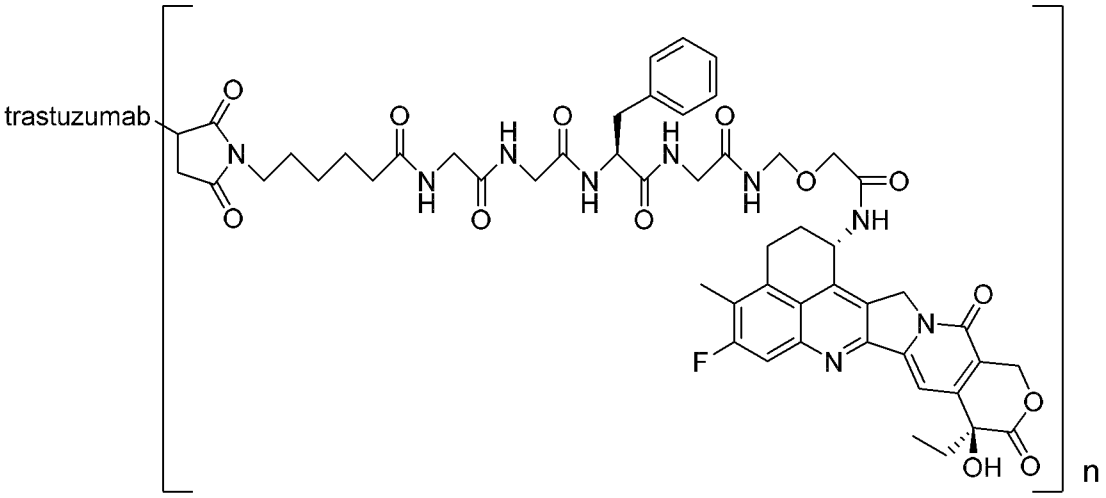
抗体药物偶联物的 DAR 值（每一分子抗体的药物平均连接数）测定

采用 LC-MS 方法测定 DAR 值。取 50μg 制备得到的 ADC 样品，加入 1μl 糖苷酶 PNGase F（瑞安生物，中国），在 37℃孵育 20 小时。实验中的质谱仪为高分辨的 Xevo G2-XS（Waters，美国）。将样品浓度调至 5μM，采用直接进样法，采集正离子模式下的质谱数据。采集的非变性质谱数据采用软件 UNIFI 1.8.2.169（Waters，美国）进行分析处理。

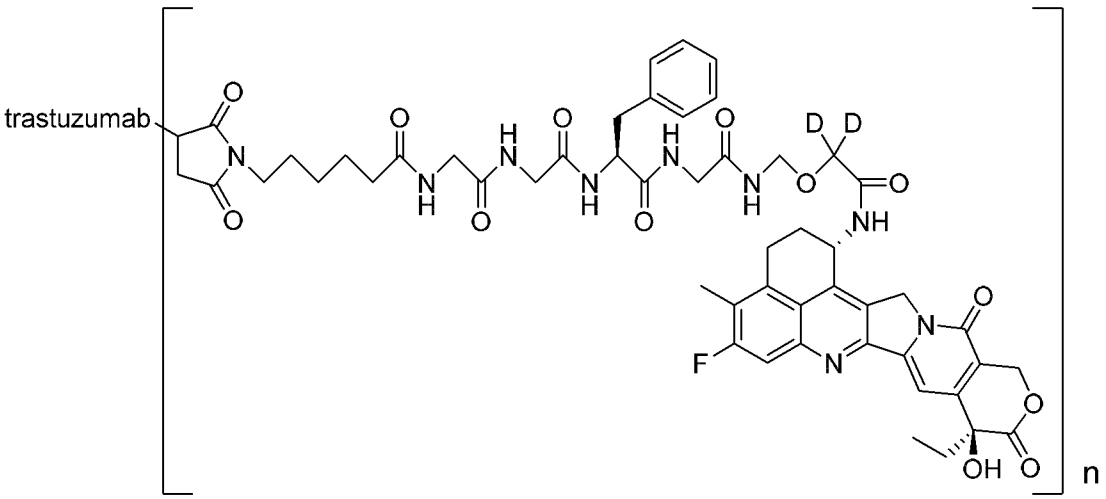
抗体药物偶联物的蛋白浓度测定

采用 lowry 法检测蛋白浓度。使用曲妥珠单抗、23C2 Her2-2 作为标准品。用酶标仪测定标准品和制备得到的 ADC 样品在 OD650 波长的吸光度值，拟合标准曲线，将样品吸光度值带入标准曲线，计算蛋白浓度。

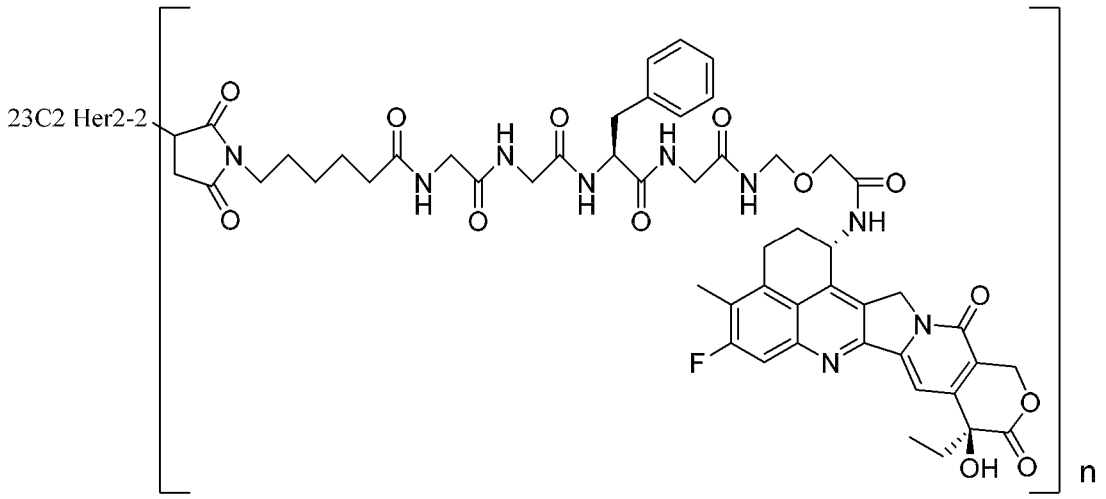
通过以上方法制备并测定如下抗体药物偶联物：



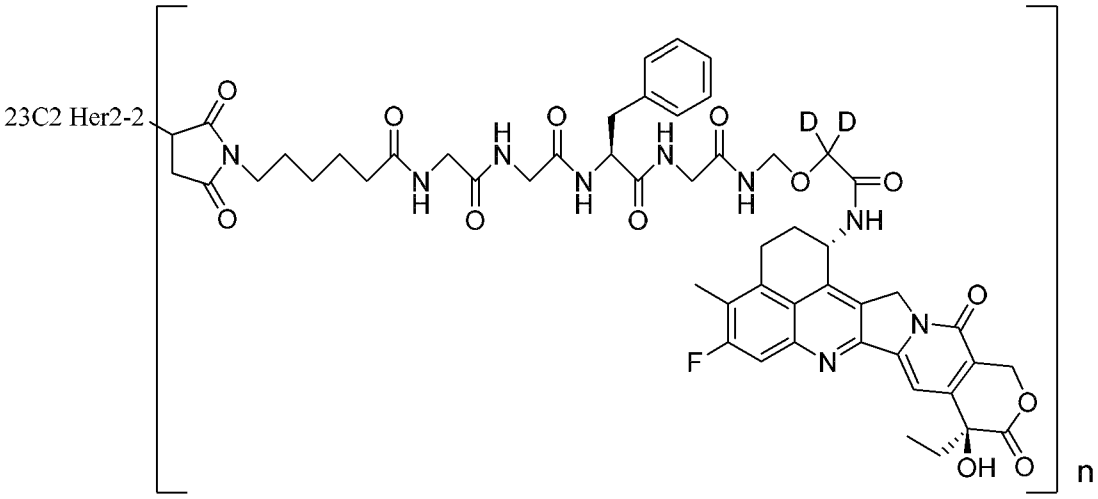
Trastuzumab-DXD，抗体浓度：4.25mg/ml，DAR：7.6。



Trastuzumab-DDDXD，抗体浓度：4.29mg/ml，DAR：7.7。



23C2 Her2-2-DXD，抗体浓度：4.35mg/ml，DAR：5.7。



23C2 Her2-2-DDDXD，抗体浓度：4.16mg/ml，DAR：5.8。

实施例 16 氘代 DXD（DDDXD）体外酶活性

1、试剂材料准备

a、配制 1%琼脂糖电泳胶；

b、配制 gelred 泡染溶液，避光保存；

c、拓扑异构酶 I 工作溶液配制：用超纯水和缓冲液配制。

2、样品配制

a、用 DMSO 复溶并稀释化合物（DDDXD），化合物浓度从 200μM 开始，10 倍稀释，设置 5 个梯度。

3、反应体系

a、阳性对照：15μl 超纯水+2μl 10×DNA Topoismerasel Buffer+2μl 0.1%BSA+1μl pBR322DNA；

b、阴性对照：14μl 超纯水+2μl 10×DNA Topoismerasel Buffer+2μl 0.1%BSA+1μl pBR322DNA+1μl 拓扑异构酶 I 工作溶液；

c、样品组：12μl 超纯水+2μl 10×DNA Topoismerasel Buffer+2μl 0.1%BSA+1μl pBR322DNA+1μl 拓扑异构酶 I 工作溶液+2μl 化合物。

4、实验流程

a、将上述反应体系置于 37℃水浴 30min；

b、每管体系中加入 2μl loading buffer 终止反应；

c、电压 2-2.5V/cm 下琼脂糖凝胶电泳 1.5h；

d、将电泳后的凝胶用 gelred 避光泡染 1.5h，凝胶成像仪拍照。

实施例 17 抗体药物偶联物的抗原结合检测

参考实施例 6 的方法，测得 Trastuzumab、23C2 HER2-2、Trastuzumab-DDDXD 与 23C2 HER2-2-DDDXD 与 HER2 蛋白的亲和力如下表 10 所示：

样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Trastuzumab	1.23E+05	1.12E-04	9.16E-10
23C2 HER2-2	1.73E+05	6.06E-05	3.49E-10
Trastuzumab-DDDXD	1.28E+05	1.19E-04	9.25E-10
23C2 HER2-2-DDDXD	1.28E+05	3.26E-05	2.55E-10

结果显示，anti-Her2 双抗相对曲妥珠单抗有更强的抗原结合活性，anti-Her2 双抗 ADC 相对曲妥珠单抗 ADC 有更强的抗原结合活性。

实施例 18 抗体药物偶联物的内吞实验

实验方法：取 1 瓶对数生长期的细胞（NCI-N87 细胞和 SK-BR-3 细胞），分别调整细胞密度至 2.5×10^6 cells/ml，20 μl/孔加入 96 孔板。将实施例 15 制得的 ADC 样品 Trastuzumab-DDDXD 和 23C2 HER2-2-DDDXD 分别预稀释至浓度为 40μg/ml，标记为 S1，其后进行 3 倍梯度稀释，获得相应的样品 S1-S9。另外以 DS-8201、以及 control IgG1（一种非 HER2 靶点特异性的 IgG1；义翘神州，货号 HG1K）与 DDDXD 的偶联物 IgG1-DDDXD 作为对照。把梯度稀释的样品溶液以及标记的内吞试剂（sartorius，90564）加到细胞板中，每孔加 20 μl，37℃孵育 15 min。取出 96 孔细胞培养板，以 20 μl/孔分别加入上述两种细胞，将细胞培养板置于 37℃，继续孵育 2 h。取出 96 孔细胞培养板，置于流式细胞仪，测定信号强度。

针对 NCI-N87 与 SK-BR-3 两种 HER2 阳性细胞的内吞实验结果见图 8 和图 9，结果表明：anti-Her2 双抗 ADC 的内吞均强于曲妥珠单抗 ADC。

实施例 19 氘代 DXD 以及抗体药物偶联物的细胞活性

将 DXD 和 DDDXD 分别使用培养基预稀释至 140000 ng/ml，标记为 S1，后进行五倍梯度稀释，获得各自对应的参比样品 S1-S9，药物终浓度范围是 35000 ng/ml~0.0896 ng/ml，共 9 个浓度。取对数生长期 HER2 阳性肿瘤细胞 NCI-N87，调整密度至 1×10^5 cells/ml 进行铺板，每孔加入 100 μl，并设置无细胞空白孔作为对照。加入梯度稀释的上述两种样品，每孔 50 μl。于 37℃、5% CO_2 二氧化碳培养箱中培养 5 天。弃掉培养液，加入 CCK-8（日本同仁化学，货号：CK04）工作液，每孔 100 μl，孵育显色 4~5 小时后置于酶标仪中（厂家 Thermo，型号：VarioskanFlash），以 630 nm 为参比波长，读取并记录波长 450 nm 下孔板的吸光度值。计算肿瘤细胞增殖抑制率。

NCI-N87 细胞实验结果见下表 11：

样品	IC_{50}（nM）
DXD	4.45
DDDXD	4.01

DDDXD 比 DXD 表现出更强的肿瘤细胞增殖抑制活性。

将待测抗体和实施例 15 制得的抗体药物偶联物分别使用培养基预稀释至 20 μg/ml，标记为 S1，后进行五倍梯度稀释，获得各自对应的样品 S1~S9。药物终浓度范围是 5000 ng/ml ~ 0.0128 ng/ml，共 9 个浓度。取对数生长期 HER2 阳性肿瘤细胞（NCI-N87、BT474 和 SK-BR-3），各自调整密度至 2×10^4 cells/ml 进行铺板，每孔加入 100 μl，并设置无细胞空白孔作为对照。加入梯度稀释的样品，每孔 50 μl。于 37℃、5% CO_2 二氧化碳培养箱中培养。弃掉培养液，加入 CTG 检测液（Promega，货号：G7572），每孔 100 μl，孵育显色 10 min 后置于多功能读板（厂家 Thermo，型号：VarioskanFlash），读取化学发光值。计算肿瘤细胞增殖抑制率。

NCI-N87 细胞实验结果见下表 12：

样品	抑制率%
Trastuzumab	34.51
Trastuzumab-DDDXD	70.81
23C2 HER2-2	75.73
23C2 HER2-2-DDDXD	90.08

BT474 细胞实验结果见下表 13：

样品	抑制率%
Trastuzumab	67.91
Trastuzumab-DDDXD	47.82
23C2 HER2-2	75.56
23C2 HER2-2-DDDXD	73.76

SK-BR-3 细胞实验结果见下表 14：

样品	抑制率%
Trastuzumab	20.36
Trastuzumab-DDDXD	67.15
23C2 HER2-2	62.89
23C2 HER2-2-DDDXD	75.56

由以上结果可知，anti-Her2 双抗 ADC 的细胞杀伤能力优于曲妥珠单抗 ADC。

实施例 20 体外肝微粒体稳定性评价

每个孵育体系包含磷酸缓冲液（PBS，pH7.4）、肝微粒体蛋白、底物（待测样品的乙腈溶液）和NADPH，采用37℃水浴进行孵育，分别在反应0、5、15、30和60 min后加入同体积冰冷乙腈终止反应。阴性对照采用相应种属的热失活肝微粒体进行孵育。采用LC/MS/MS方法检测底物原形的剩余含量。

实施例21 抗体药物偶联物体内药代动力学实验

参考Yoko Nagai, et al，Comprehensive Preclinical Pharmacokinetic Evaluations of Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a), a HER2-targeting antibody-drug conjugate, in Cynomolgus Monkeys，Xenobiotica，2019, 49（9）, 1086-1096中所述的方法，测定本申请的抗体药物偶联物的体内代谢途径以及药代动力学参数。

实施例 22 抗体药物偶联物对 JIMT-1 Her2 阳性乳腺癌裸小鼠异种移植瘤抑制作用

准备 JIMT-1 乳腺癌细胞，浓度 2×10^7/ml*0.1ml/只，在无菌条件下，接种于裸小鼠右侧腋窝下。皮下

移植瘤接种后待肿瘤体积至 100-300mm^3 左右将动物随机分成 3 组：模型组：溶媒（包含：L-组氨酸 0.89mg/ml、L-组氨酸盐酸盐 4.04mg/ml、聚山梨酯 80 0.3mg/ml、蔗糖 90mg/ml），6 只；23C2 Her2-2-DXD 组：1.68 mg/kg, qw, i.v. 6 只；23C2 Her2-2-DDDXD 组：1.59 mg/kg, qw, i.v. 6 只。每周测 2-3 次瘤体积，同时称鼠重，记录数据；每日观察动物表现。

相对体重（relative weight，RWt）计算公式为：

$$RWC(\%) = \frac{W_t}{W_{to}} \times 100\% - 100\%$$

其中 Wt_0 为分笼给药时（即 d0）的动物体重，Wt 为每一次测量时的动物体重。

抑瘤率（tumor growth inhibition,TGI）计算公式为：

$$TGI(\%) - \left(1 - \frac{TW}{TW_0}\right) \times 100\%$$

其中 TW 为给药组瘤重，TW_0 为模型组瘤重。

体重见下表 15：

组别	剂量 mg/kg	给药频次	给药途径	动物数		相对体重变化率（%）Mean±SD			
				d0	d24	d6	d12	d18	d24
模型组	-	qw	i.v.	6	6	5.8±3.1	9.1±3.9	9.6±3.8	15.8±5.4
23C2 Her2-2-DXD	1.68	qw	i.v.	6	6	6.7±6.6	9.9±5.6	10.2±4.3	14.5±4.7
23C2 Her2-2-DDDXD	1.59	qw	i.v.	6	6	8.8±3.5	11.5±5.0	12.4±2.9	15.0±5.4

药效见下表 16：

组别	剂量 mg/kg	给药频次	给药途径	动物数		瘤重 Mean±SD	TGI（%）
				d0	d24		
模型组	-	qw	i.v.	6	6	0.594±0.166	-
23C2 Her2-2-DXD	1.68	qw	i.v.	6	6	0.189±0.072	68.2%
23C2 Her2-2-DDDXD	1.59	qw	i.v.	6	6	0.145±0.056	75.6%

结果显示：23C2 Her2-2-DXD与23C2 Her2-2-DDDXD在人乳腺癌细胞JIMT-1小鼠异种移植瘤模型上均有显著药效，并且23C2 Her2-2-DDDXD相对23C2 Her2-2-DXD抑瘤效力更强。

根据本申请所公开的内容，虽然根据优选实施方案对本申请的方法进行了描述，但对本领域技术人员而言，在不背离本申请的概念、精神和范围的情况下，可对在此所述的产品、要素、方法以及所述方法的步骤或步骤的顺序进行改变或重新组合。

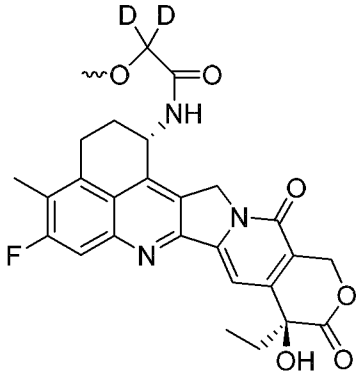
为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们的公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。本文所引用的所有文献的公开内容通过引用结合于此，引用程度为，他们提供示例性的，程序上和其他的细节补充本文所述内容。

权利要求书

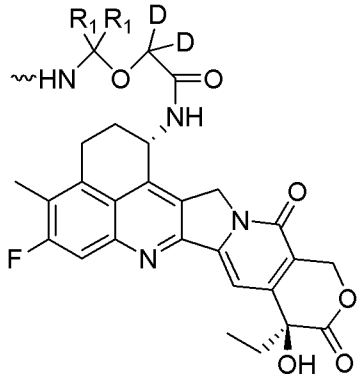
1. 具有通式 Ab-(L-U)n 的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 Ab 表示抗体部分，L 表示接头部分，U 表示细胞毒药物部分，n 为选自 1 至 10 的整数或小数，其中，U 为喜树碱类拓扑异构酶 I 抑制剂，并且 L 部分和/或 U 部分具有氘代修饰。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 U 选自 SN-38、SN-38 衍生物、依沙替康或者依沙替康衍生物。

3. 根据权利要求 1-2 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体药物偶联物包含以下式 III 或式 IV 所示的结构：



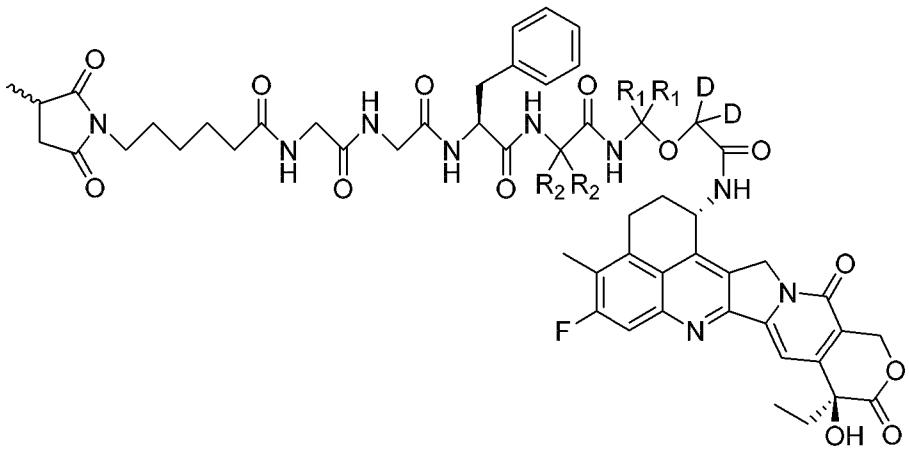
III，或者



IV

在式 IV 中，R_1 选自氢（H）或氘（D）。

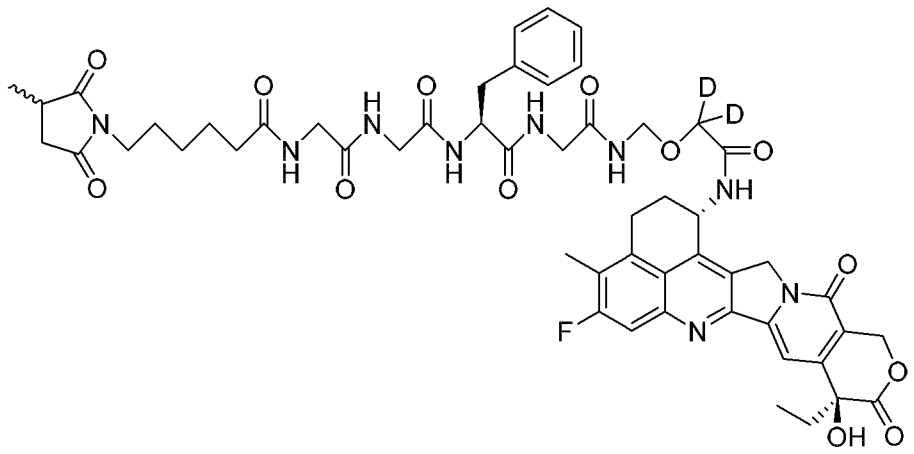
4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体药物偶联物包含以下式 VI 所示的结构：



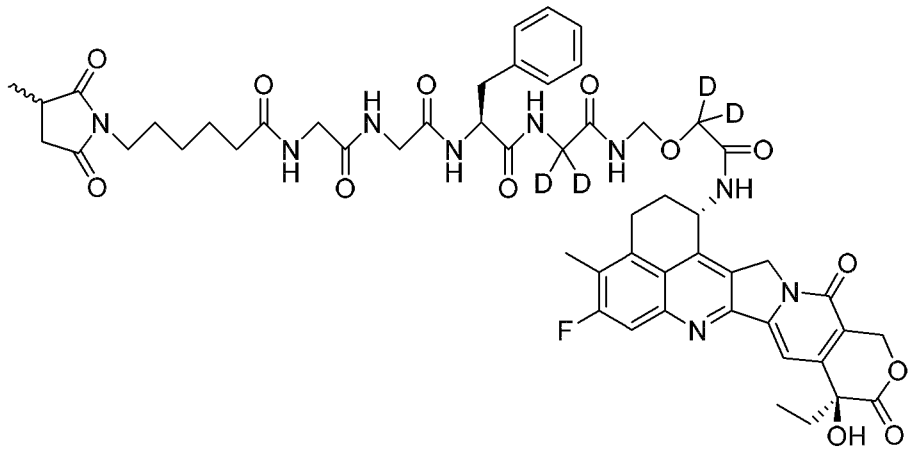
VI

其中，R_1、R_2 分别独立地选自氢（H）或氘（D）。

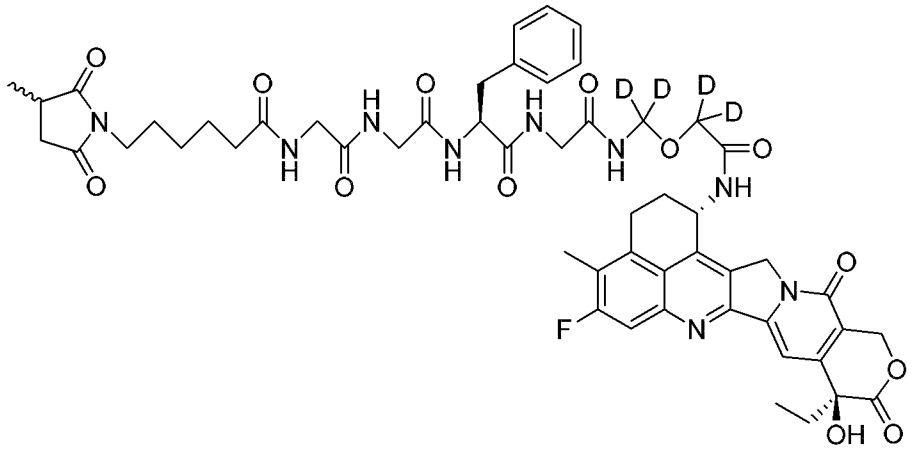
5. 根据权利要求 4 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述式 VI 为以下 VI-1、VI-2、VI-3 或 VI-4 所示的结构：



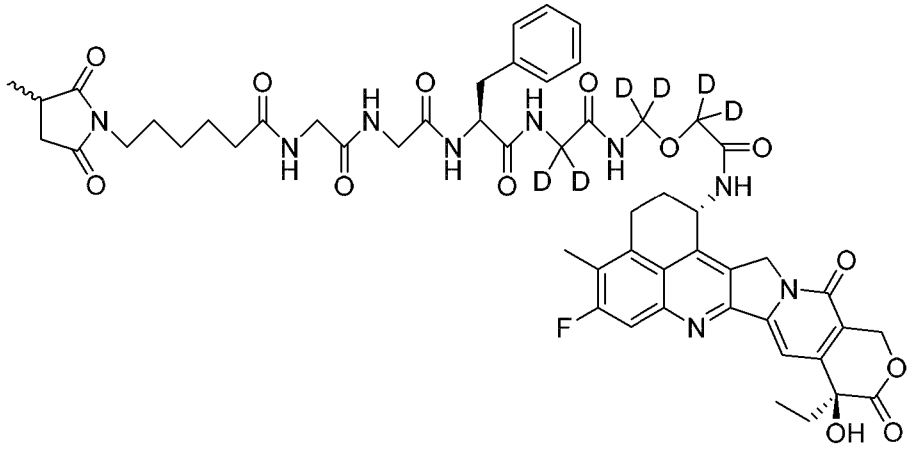
VI-1



VI-2



VI-3，或者



VI-4。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 Ab 是能够特异性结合 HER2 的抗体。

7. 根据权利要求 6 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述 Ab 包含单价且特

异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD4 表位的第一抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为 scFv 并且包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：27、28 和 29 所示的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：30、34 和 32 所示的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 7 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述第一抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：43、28 和 29 所示的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：30、31 和 32 所示的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 7 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述第一抗原结合片段选自：

i. 所述第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含 SEQ ID NOs：41 和 42 所示的氨基酸序列；或

ii. 所述第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含与 SEQ ID NOs：41 和 42 所示的氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 7-9 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述第一抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO：35 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO：36 所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 9-10 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述第一抗原结合片段的 VH 和 VL 从 N-末端到 C-末端按照如下顺序排列：VH-linker-VL。

12. 根据权利要求 6-11 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体部分 Ab 还包含单价且特异性地结合 HER2 表达细胞上的 HER2 的 ECD2 表位的第二抗原结合片段，所述第二抗原结合片段为 Fab。

13. 根据权利要求 12 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述第二抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：45、46 和 47 所示的氨基酸序列，所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含 SEQ ID NOs：48、49 和 50 所示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 12-13 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述第二抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含 SEQ ID NOs：37 和 38 的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 6-14 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体部分 Ab 包含与第一抗原结合片段和/或第二抗原结合片段可操作性连接的免疫球蛋白功能域，所述免疫球蛋白功能域包含：i. CL、CH1、CH2、或 CH3 中的一个或多个，或者 ii. Fc。

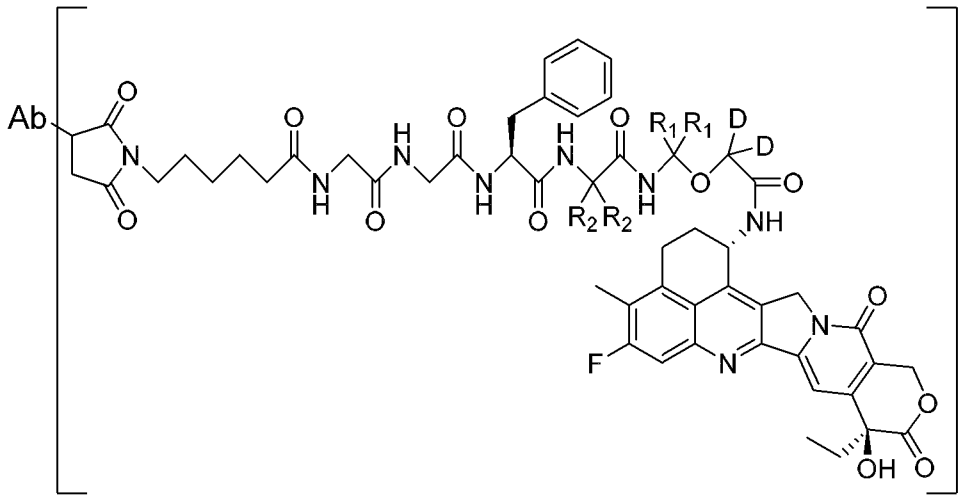
16. 根据权利要求 15 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述 CL、CH1、CH2、CH3、Fc 分别衍生自人 IgG 的 CL、CH1、CH2、CH3、Fc。

17. 根据权利要求 16 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述 CL、CH1、CH2，CH3 或 Fc 具有修饰或不具有修饰；优选，所述 CH3 或 Fc 具有的修饰是根据 Kabat 编号系统的第 435 和/或第 436 位氨基酸的取代。

18. 根据权利要求 15-17 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述 Fc 是包含第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽的二聚 Fc，所述第一抗原结合片段与第一 Fc 多肽可操作性的连接，所述第二抗原结合片段与第二 Fc 多肽可操作性的连接。

19. 根据权利要求 6-18 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中抗体部分 Ab 为二价双特异性抗体，其包含：SEQ ID NO：11 所示序列的重链、SEQ ID NO：13 所示序列的重链和 SEQ ID NO：15 所示序列的轻链。

20. 根据权利要求1-5任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体药物偶联物具有以下式VII所示的结构：



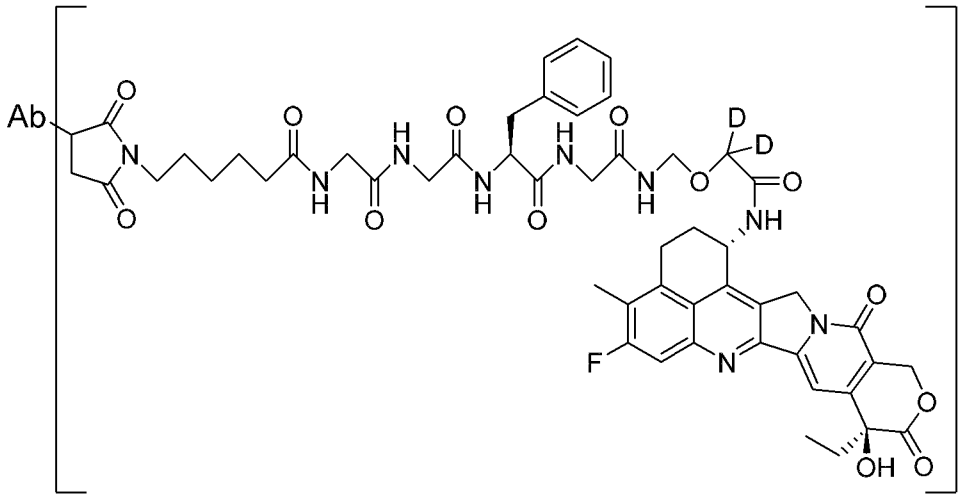
VII

其中，Ab表示抗体部分，其包含第一抗原结合片段和第二抗原结合片段，所述第一抗原结合片段为scFv并且包含重链CDR1、重链CDR2、重链CDR3、轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3，所述重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3分别包含SEQ ID NOs：43、28和29所示的氨基酸序列，所述轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3分别包含SEQ ID NOs：30、31和32所示的氨基酸序列，所述第二抗原结合片段为Fab并且包含重链CDR1、重链CDR2、重链CDR3、轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3，所述重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3分别包含SEQ ID NOs：45、46和47所示的氨基酸序列，所述轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3分别包含SEQ ID NOs：48、49和50所示的氨基酸序列，

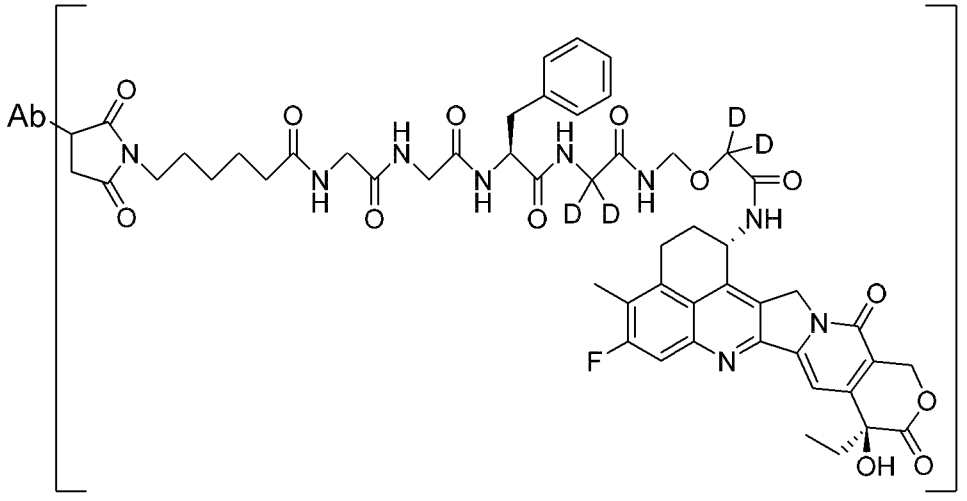
n为选自1至10的整数或小数，

R_1、R_2分别独立地选自氢（H）或氘（D）。

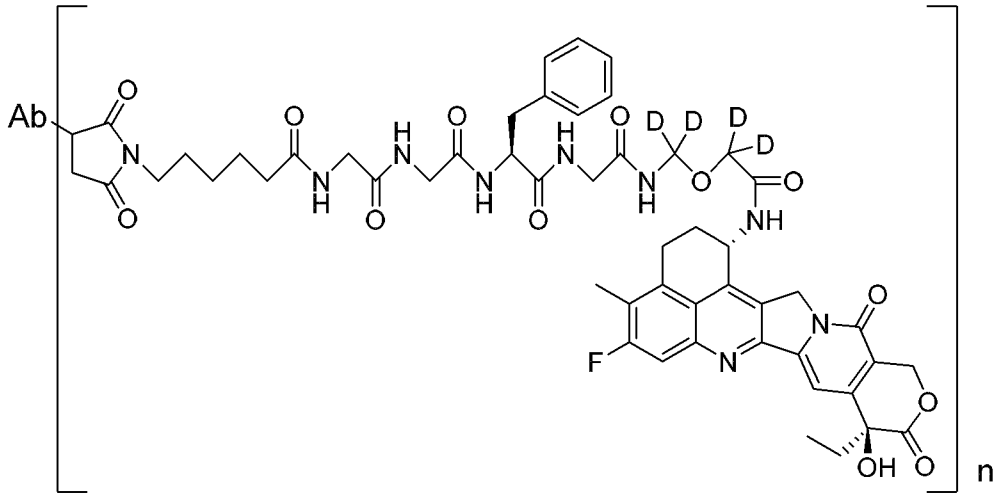
21. 根据权利要求 20 所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中式 VII 为以下 VII-1、VII-2、VII-3 或 VII-4 所示的结构：



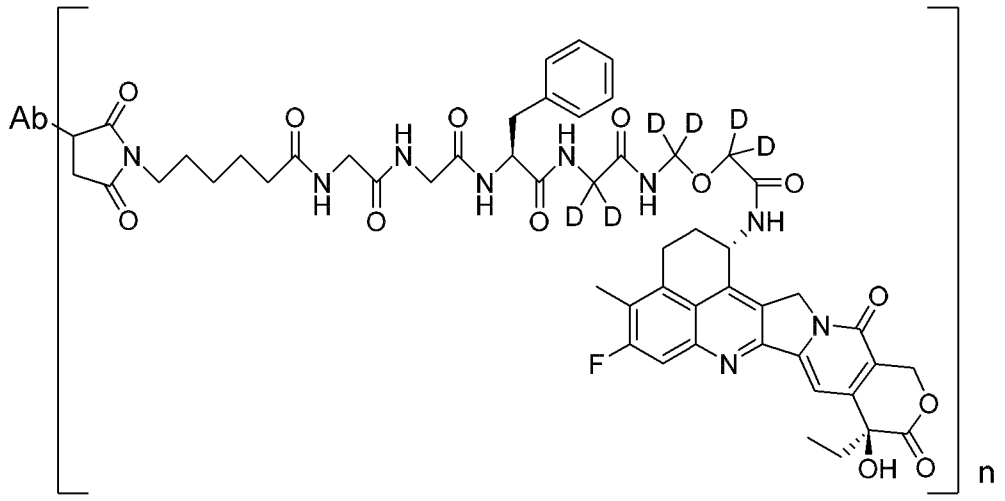
VII-1



VII-2



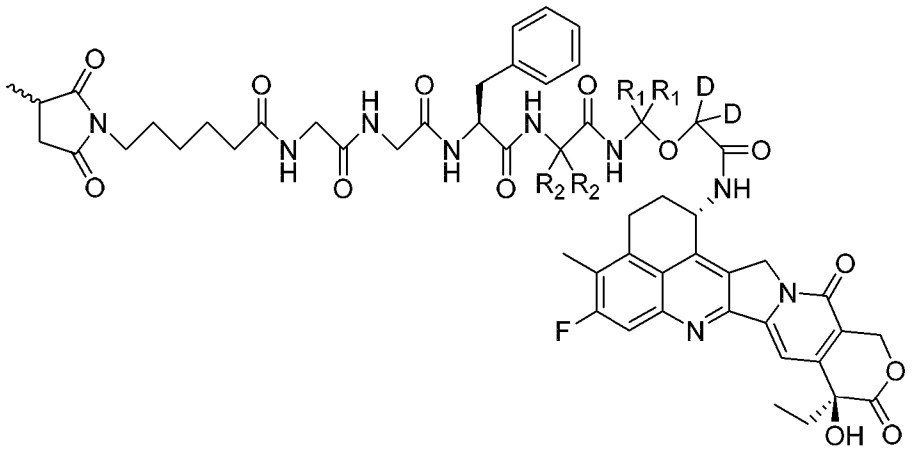
VII-3，或者



VII-4。

22. 权利要求 1-21 任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途；优选地，所述癌症为 HER2 阳性癌症、HER2 阴性癌症以及按照免疫组织化学检测法检测显示 HER2 表达为 IHC2+的癌症。

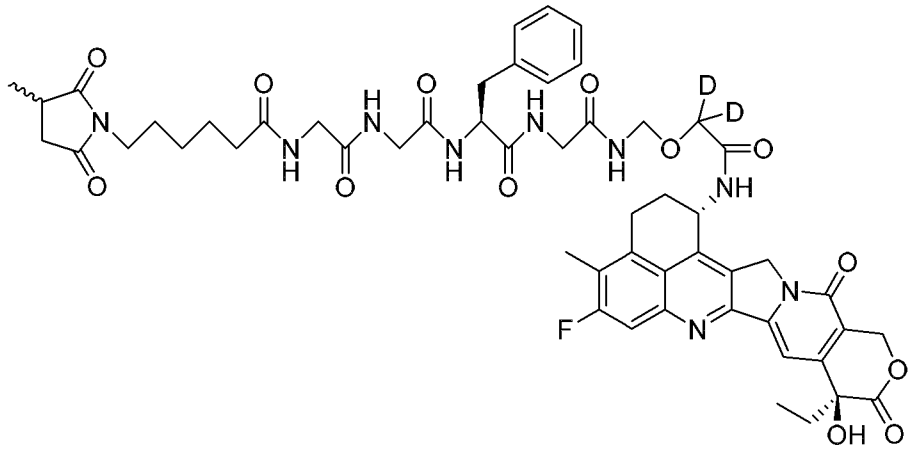
23. 式VI所示结构的接头-药物中间体化合物：



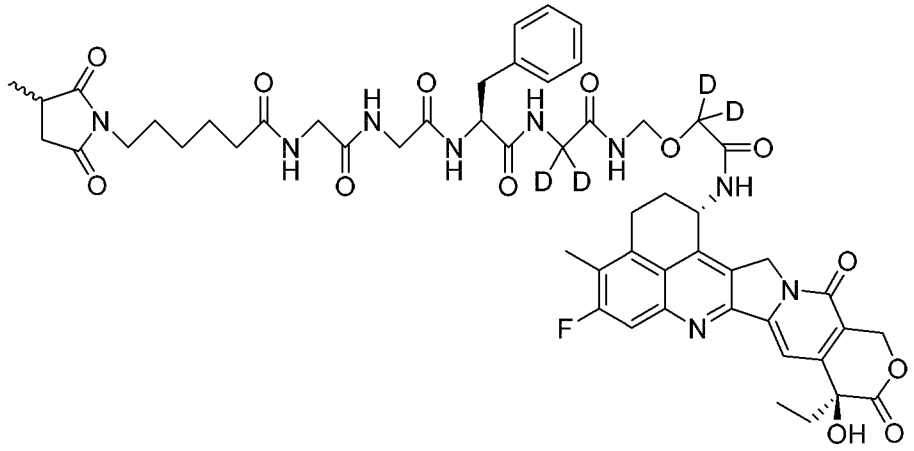
VI

其中，R_1、R_2 分别独立地选自氢（H）或氘（D）。

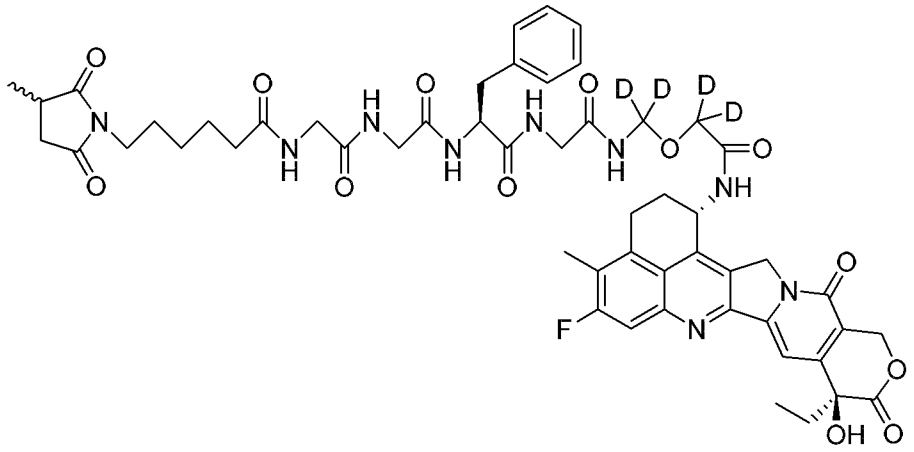
24. 根据权利要求 23 所述的接头-药物中间体化合物，其中，式 VI 为以下 VI-1、VI-2、VI-3 或 VI-4 所示的结构：



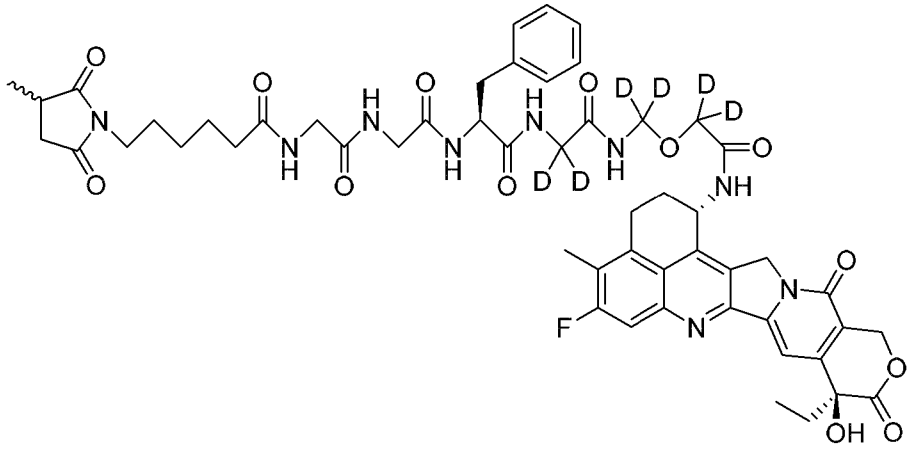
VI-1



VI-2

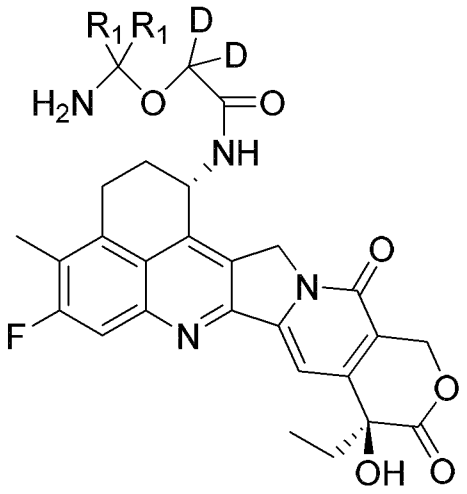


VI-3，或者



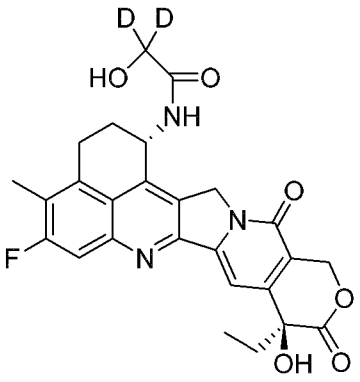
VI-4。

25. 以下式 IV(a)或式 III(a)所示结构的化合物：



IV(a)

其中，R_1 选自氢（H）或氘（D）；或者



III(a)。

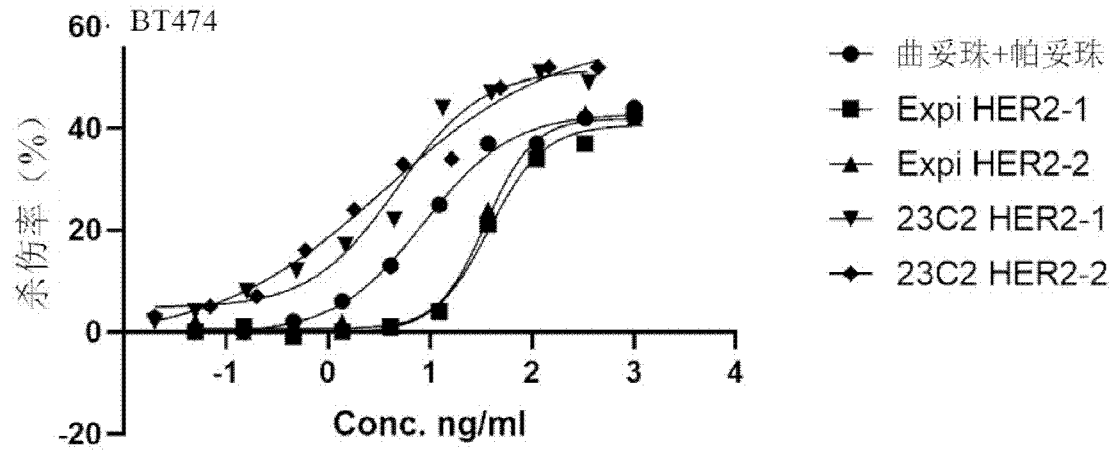

BT474
杀伤率（%）
60
40
20
0
-20
-1
0
1
2
3
4
Conc. ng/ml
曲妥珠+帕妥珠
Expi HER2-1
Expi HER2-2
23C2 HER2-1
23C2 HER2-2

图 1

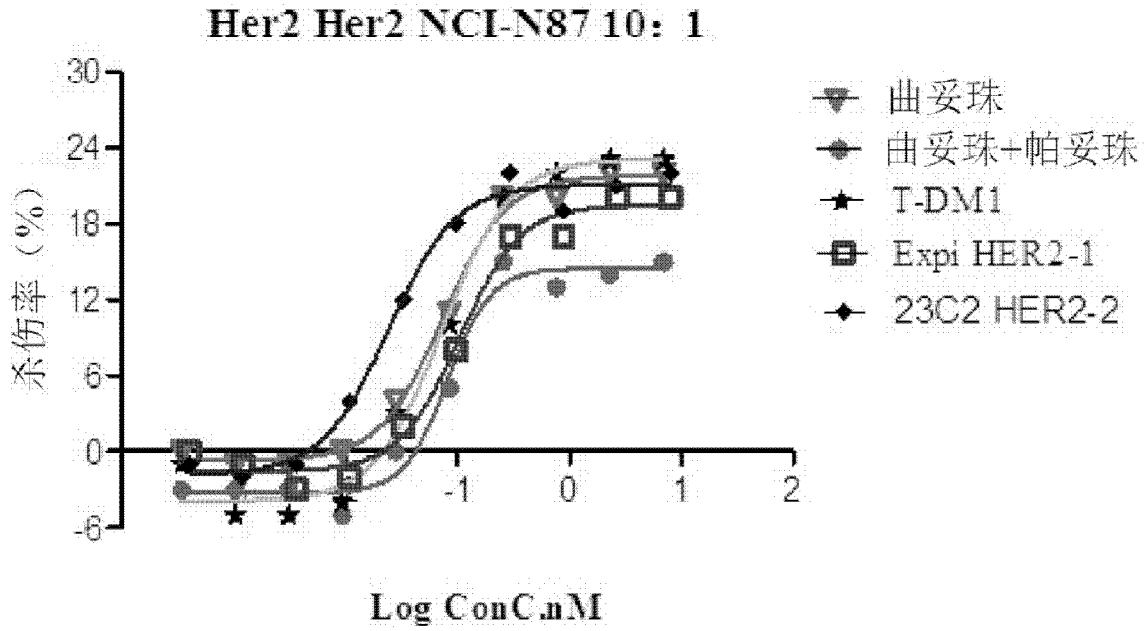

Her2 Her2 NCI-N87 10：1
杀伤率（%）
30
24
18
12
6
0
-6
-1
0
1
2
Log ConC.nM
曲妥珠
曲妥珠+帕妥珠
T-DM1
Expi HER2-1
23C2 HER2-2

图 2

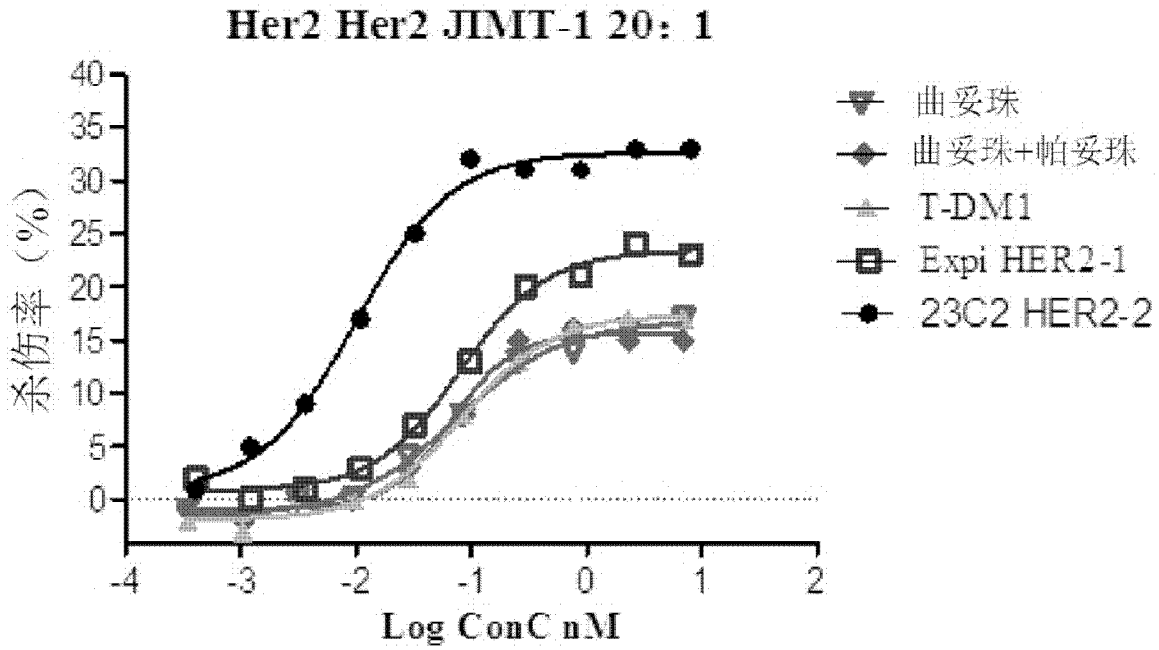

Her2 Her2 JIMT-1 20：1
杀伤率（%）
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log ConC nM
曲妥珠
曲妥珠+帕妥珠
T-DM1
Expi HER2-1
23C2 HER2-2

图 3

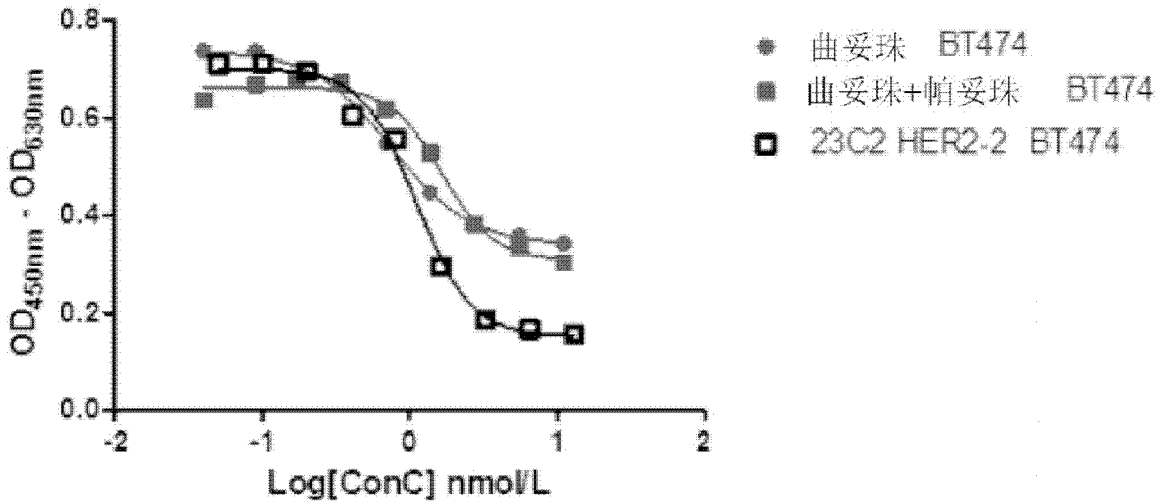

OD450nm - OD630nm
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-2
-1
0
1
2
Log[ConC] nmol/L
曲妥珠 BT474
曲妥珠+帕妥珠 BT474
23C2 HER2-2 BT474

图 4

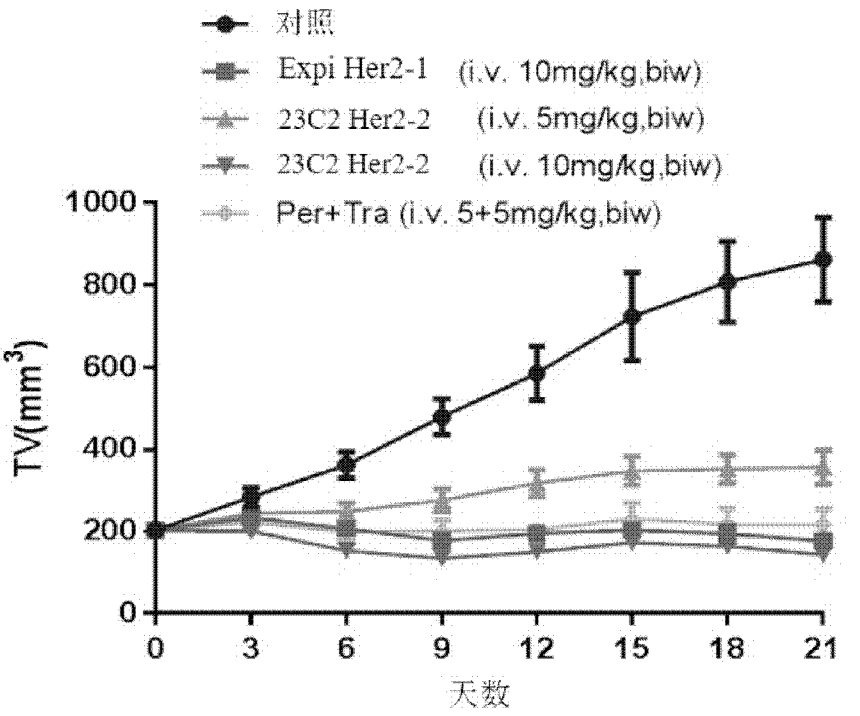

对照
Expi Her2-1 (i.v. 10mg/kg,biw)
23C2 Her2-2 (i.v. 5mg/kg,biw)
23C2 Her2-2 (i.v. 10mg/kg,biw)
Per+Tra (i.v. 5+5mg/kg,biw)
TV(mm3)
1000
800
600
400
200
0
0 3 6 9 12 15 18 21
天数

图 5

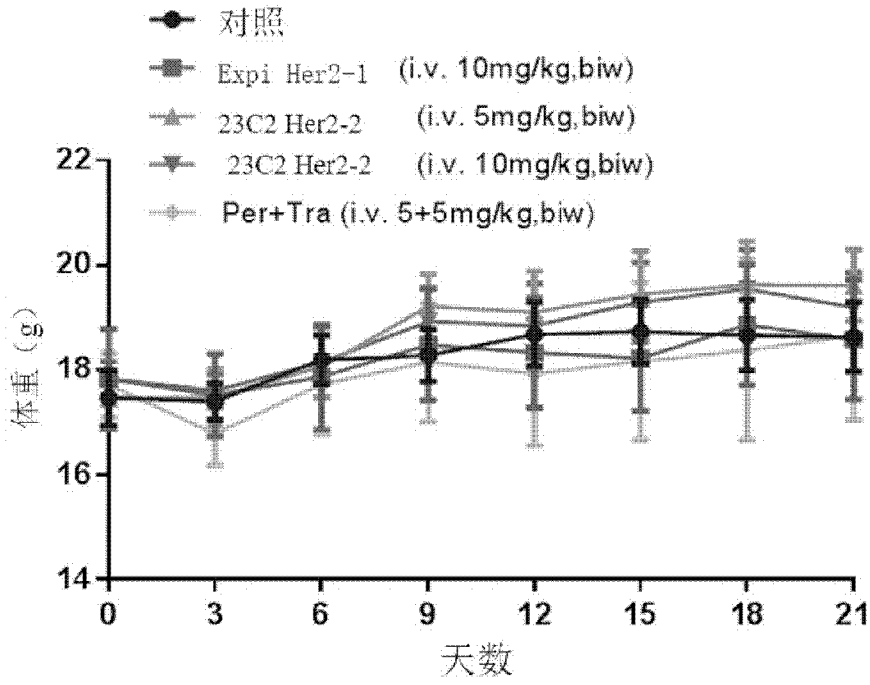

对照
Expi Her2-1 (i.v. 10mg/kg,biw)
23C2 Her2-2 (i.v. 5mg/kg,biw)
23C2 Her2-2 (i.v. 10mg/kg,biw)
Per+Tra (i.v. 5+5mg/kg,biw)
体重（g）
22
20
18
16
14
0 3 6 9 12 15 18 21
天数

图 6

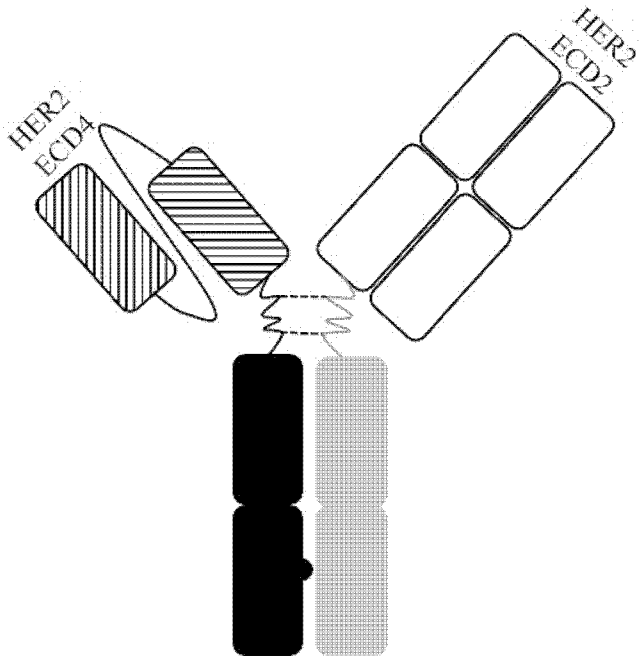

HER2
ECD4
HER2
ECD2

图 7

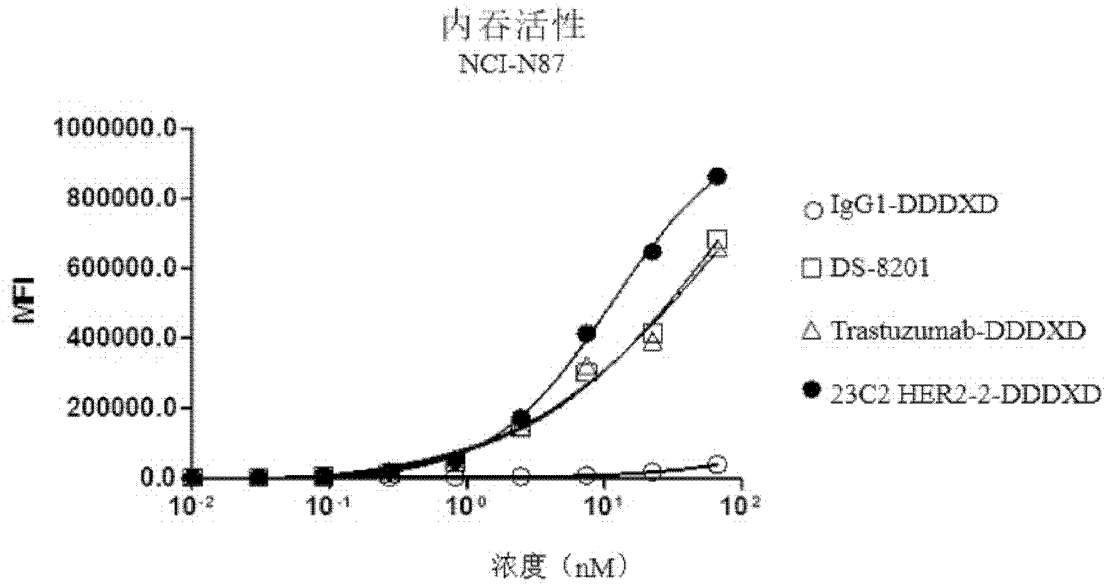

内吞活性
NCI-N87
MFI
1000000.0
800000.0
600000.0
400000.0
200000.0
0.0
10-2
10-1
100
101
102
浓度（nM）
IgG1-DDDXD
DS-8201
Trastuzumab-DDDXD
23C2 HER2-2-DDDXD

图 8

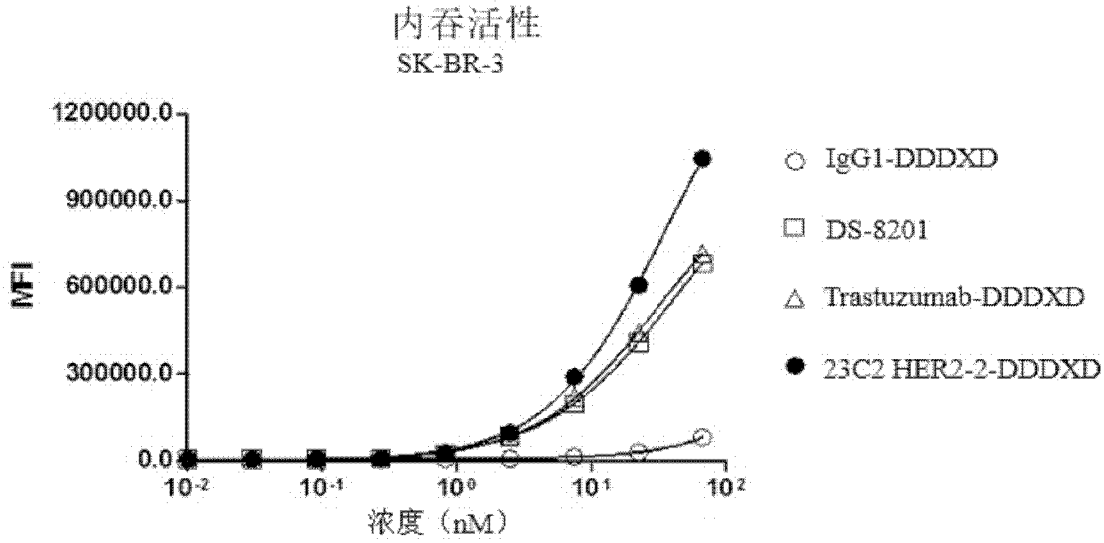

内吞活性
SK-BR-3
MFI
1200000.0
900000.0
600000.0
300000.0
0.0
10-2
10-1
100
101
102
浓度（nM）
IgG1-DDDXD
DS-8201
Trastuzumab-DDDXD
23C2 HER2-2-DDDXD

图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/112462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/68(2017.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; C07K 16/32(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 , NCBI, baidu, STN, genbank, China Patent Biological Sequence Search System, 正大天晴药业集团股份有限公司, 张喜全, 喜树碱, SN-38, 依喜替康, exatecan, camptothecin, 氘, deuteration, deuterium, 偶联物, conjugate, HER2, ECD4, ECD2, 胞外域II, 胞外域IV, SEQ ID NOs: 11, 13, 15, 27-32, 35, 36, 41-43, 45-50

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020063676 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 02 April 2020 (2020-04-02) claims 1-3, 28, 45	1-6, 22-25
Y	WO 2020063676 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 02 April 2020 (2020-04-02) claims 1-3, 28, 45	7-21
Y	CN 105829347 A (GENENTECH INC. ROCHE INC.) 03 August 2016 (2016-08-03) claim 1, description page 1 paragraphs 7-9, page 61 paragraph 517, page 88 paragraph 748 - page 89 paragraph 749	7-21
A	WO 2020063673 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 02 April 2020 (2020-04-02) claims 1-28	1-25
A	WO 2019034176 A1 (SICHUAN BAILI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 21 February 2019 (2019-02-21) claims 1-14	1-25

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 October 2021	**03 November 2021**
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/CN2021/112462

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105829346 A (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) 03 August 2016 (2016-08-03) claims 1-27	1-25
A	CN 104755494 A (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) 01 July 2015 (2015-07-01) claims 1-49	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/112462

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/112462

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020063676	A1	02 April 2020	AU	2019349207	A1	08 April 2021
				CA	3114137	A1	02 April 2020
				TW	202027795	A	01 August 2020
				CN	112512591	A	16 March 2021
				KR	20210066833	A	07 June 2021
CN	105829347	A	03 August 2016	KR	20160099087	A	19 August 2016
				EP	3083696	A1	26 October 2016
				US	2017029529	A1	02 February 2017
				US	10584178	B2	10 March 2020
				CA	2925677	A1	25 June 2015
				BR	112016010706	A2	05 December 2017
				WO	2015091738	A1	25 June 2015
				CN	112062853	A	11 December 2020
				EP	3327038	B1	23 September 2020
				RU	2016129517	A	25 January 2018
				JP	2017501706	A	19 January 2017
				EP	3083696	B1	14 February 2018
				MX	2016008098	A	11 January 2017
				JP	6510532	B2	08 May 2019
				CN	105829347	B	08 September 2020
				HK	1223115	A1	21 July 2017
				US	2020291131	A1	17 September 2020
				EP	3327038	A2	30 May 2018
				JP	2019141066	A	29 August 2019
				EP	3327038	A3	13 June 2018
WO	2020063673	A1	02 April 2020	TW	202028242	A	01 August 2020
				AU	2019351427	A1	15 April 2021
				KR	20210068457	A	09 June 2021
				CN	112543771	A	23 March 2021
				CA	3114474	A1	02 April 2020
WO	2019034176	A1	21 February 2019	CN	109106951	A	01 January 2019
CN	105829346	A	03 August 2016	AU	2015212265	B2	02 January 2020
				PH	12016500904	A1	11 July 2016
				KR	102238848	B1	09 April 2021
				EP	3101032	A4	06 September 2017
				RU	2683780	C2	02 April 2019
				CN	105829346	B	23 August 2019
				JP	2017095457	A	01 June 2017
				JP	2017105789	A	15 June 2017
				KR	101916553	B1	07 November 2018
				RU	2016123597	A	02 March 2018
				TW	201613649	A	16 April 2016
				SG	11201603960 X	A	28 July 2016
				SG	10201800210 T	A	27 February 2018
				WO	2015115091	A1	06 August 2015
				IL	245252	D0	30 June 2016
				JP	2020097617	A	25 June 2020
				AU	2020200596	A1	20 February 2020
				US	2020385486	A1	10 December 2020
				LT	3101032	T	25 March 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/112462

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		KR	102190548	B1	14 December 2020
		EP	3101032	B1	16 January 2019
		JP	2019112403	A	11 July 2019
		CA	2928794	C	13 August 2019
		IL	278891	D0	31 January 2021
		US	2019077880	A1	14 March 2019
		TW	I722422	B	21 March 2021
		JP	6665325	B2	13 March 2020
		KR	20210040181	A	12 April 2021
		US	10155821	B2	18 December 2018
		KR	20180122038	A	09 November 2018
		CA	2928794	A1	06 August 2015
		PL	3101032	T3	31 July 2019
		MX	2016006498	A	04 August 2016
		IL	245252	A	30 June 2019
		ES	2727351	T3	15 October 2019
		HU	E044389	T2	28 October 2019
		JP	5998289	B2	28 September 2016
		IL	266790	D0	31 July 2019
		JP	2017036285	A	16 February 2017
		EP	3466976	A1	10 April 2019
		US	2016333112	A1	17 November 2016
		DK	3101032	T3	29 April 2019
		JP	6466895	B2	06 February 2019
		ZA	201602802	B	27 September 2017
		PT	3101032	T	03 April 2019
		JP	WO2015115091	A1	23 March 2017
		EP	3101032	A1	07 December 2016
		JP	6046301	B1	14 December 2016
		SI	3101032	T1	28 February 2019
CN 104755494 A	01 July 2015	KR	20200026323	A	10 March 2020
		HU	E039000	T2	28 December 2018
		LT	2907824	T	11 June 2018
		TW	201811746	A	01 April 2018
		PH	12015500667	B1	18 May 2015
		TW	202033499	A	16 September 2020
		KR	101841818	B1	26 March 2018
		TW	201420117	A	01 June 2014
		AU	2013328111	A1	12 March 2015
		HR	P20200353	T1	12 June 2020
		SG	10201804788 X	A	30 July 2018
		JP	6715888	B2	01 July 2020
		CA	2885800	A1	17 April 2014
		JP	2018188455	A	29 November 2018
		EP	3342785	A1	04 July 2018
		JP	6030267	B1	24 November 2016
		JP	2020180124	A	05 November 2020
		MX	2019004502	A	21 August 2019
		PL	3342785	T3	07 September 2020
		HR	P20180870	T1	13 July 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/112462

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		ES	2773710	T3	14 July 2020
		JP	2016196484	A	24 November 2016
		LT	3342785	T	10 February 2020
		KR	102087017	B1	10 March 2020
		KR	20210038728	A	07 April 2021
		KR	102237639	B1	07 April 2021
		MX	2015003903	A	17 July 2015
		HU	E048748	T2	28 August 2020
		PL	2907824	T3	31 August 2018
		CY	1120363	T1	10 July 2019
		TW	201920098	A	01 June 2019
		NZ	705394	A	26 October 2018
		MX	364484	B	29 April 2019
		DK	2907824	T3	23 July 2018
		CA	3021435	A1	17 April 2014
		EP	2907824	B1	11 April 2018
		WO	2014057687	A1	17 April 2014
		TW	I615152	B	21 February 2018
		IL	271760	D0	27 February 2020
		CN	104755494	B	07 September 2018
		KR	20190135559	A	06 December 2019
		JP	6371452	B2	08 August 2018
		AU	2013328111	B2	02 November 2017
		JP	5953378	B2	20 July 2016
		JP	2018008982	A	18 January 2018
		RU	2018128384	A	02 October 2018
		US	2016279259	A1	29 September 2016
		US	10195288	B2	05 February 2019
		EP	3342785	B1	25 December 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/112462

A. 主题的分类

A61K 47/68(2017.01)i；A61K 47/54(2017.01)i；C07K 16/32(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 , NCBI, baidu, STN, gen-bank, 中国专利生物序列检索系统, 正大天晴药业集团股份有限公司, 张喜全, 喜树碱, SN-38, 依喜替康, exate-can, camptothecin, 氘, deuteration, deuterium, 偶联物, conjugate, HER2, ECD4, ECD2, 胞外域II, 胞外域IV, SEQ ID NOs：11，13，15，27-32，35，36，41-43，45-50

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2020063676 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司 等) 2020年 4月 2日 (2020-04-02) 权利要求1-3，28，45	1-6，22-25
Y	WO 2020063676 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司 等) 2020年 4月 2日 (2020-04-02) 权利要求1-3，28，45	7-21
Y	CN 105829347 A (豪夫迈．罗氏有限公司) 2016年 8月 3日 (2016-08-03) 权利要求1，说明书第1页第7-9段，第61页第517段，第88页第748段-第89页第749段	7-21
A	WO 2020063673 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司 等) 2020年 4月 2日 (2020-04-02) 权利要求1-28	1-25
A	WO 2019034176 A1 (四川百利药业有限责任公司) 2019年 2月 21日 (2019-02-21) 权利要求1-14	1-25
A	CN 105829346 A (第一三共株式会社) 2016年 8月 3日 (2016-08-03) 权利要求1-27	1-25
A	CN 104755494 A (第一三共株式会社) 2015年 7月 1日 (2015-07-01) 权利要求1-49	1-25

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 10月 12日	2021年 11月 3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

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/112462

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

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

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/112462

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)
WO	2020063676	A1	2020年 4月 2日	AU	2019349207	A1	2021年 4月 8日
				CA	3114137	A1	2020年 4月 2日
				TW	202027795	A	2020年 8月 1日
				CN	112512591	A	2021年 3月 16日
				KR	20210066833	A	2021年 6月 7日
CN	105829347	A	2016年 8月 3日	KR	20160099087	A	2016年 8月 19日
				EP	3083696	A1	2016年 10月 26日
				US	2017029529	A1	2017年 2月 2日
				US	10584178	B2	2020年 3月 10日
				CA	2925677	A1	2015年 6月 25日
				BR	112016010706	A2	2017年 12月 5日
				WO	2015091738	A1	2015年 6月 25日
				CN	112062853	A	2020年 12月 11日
				EP	3327038	B1	2020年 9月 23日
				RU	2016129517	A	2018年 1月 25日
				JP	2017501706	A	2017年 1月 19日
				EP	3083696	B1	2018年 2月 14日
				MX	2016008098	A	2017年 1月 11日
				JP	6510532	B2	2019年 5月 8日
				CN	105829347	B	2020年 9月 8日
				HK	1223115	A1	2017年 7月 21日
				US	2020291131	A1	2020年 9月 17日
				EP	3327038	A2	2018年 5月 30日
				JP	2019141066	A	2019年 8月 29日
				EP	3327038	A3	2018年 6月 13日
WO	2020063673	A1	2020年 4月 2日	TW	202028242	A	2020年 8月 1日
				AU	2019351427	A1	2021年 4月 15日
				KR	20210068457	A	2021年 6月 9日
				CN	112543771	A	2021年 3月 23日
				CA	3114474	A1	2020年 4月 2日
WO	2019034176	A1	2019年 2月 21日	CN	109106951	A	2019年 1月 1日
CN	105829346	A	2016年 8月 3日	AU	2015212265	B2	2020年 1月 2日
				PH	12016500904	A1	2016年 7月 11日
				KR	102238848	B1	2021年 4月 9日
				EP	3101032	A4	2017年 9月 6日
				RU	2683780	C2	2019年 4月 2日
				CN	105829346	B	2019年 8月 23日
				JP	2017095457	A	2017年 6月 1日
				JP	2017105789	A	2017年 6月 15日
				KR	101916553	B1	2018年 11月 7日
				RU	2016123597	A	2018年 3月 2日
				TW	201613649	A	2016年 4月 16日
				SG	11201603960X	A	2016年 7月 28日
				SG	10201800210T	A	2018年 2月 27日
				WO	2015115091	A1	2015年 8月 6日
				IL	245252	D0	2016年 6月 30日
				JP	2020097617	A	2020年 6月 25日
				AU	2020200596	A1	2020年 2月 20日
				US	2020385486	A1	2020年 12月 10日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/112462

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)
		LT	3101032	T	2019年 3月 25日
		KR	102190548	B1	2020年 12月 14日
		EP	3101032	B1	2019年 1月 16日
		JP	2019112403	A	2019年 7月 11日
		CA	2928794	C	2019年 8月 13日
		IL	278891	D0	2021年 1月 31日
		US	2019077880	A1	2019年 3月 14日
		TW	I722422	B	2021年 3月 21日
		JP	6665325	B2	2020年 3月 13日
		KR	20210040181	A	2021年 4月 12日
		US	10155821	B2	2018年 12月 18日
		KR	20180122038	A	2018年 11月 9日
		CA	2928794	A1	2015年 8月 6日
		PL	3101032	T3	2019年 7月 31日
		MX	2016006498	A	2016年 8月 4日
		IL	245252	A	2019年 6月 30日
		ES	2727351	T3	2019年 10月 15日
		HU	E044389	T2	2019年 10月 28日
		JP	5998289	B2	2016年 9月 28日
		IL	266790	D0	2019年 7月 31日
		JP	2017036285	A	2017年 2月 16日
		EP	3466976	A1	2019年 4月 10日
		US	2016333112	A1	2016年 11月 17日
		DK	3101032	T3	2019年 4月 29日
		JP	6466895	B2	2019年 2月 6日
		ZA	201602802	B	2017年 9月 27日
		PT	3101032	T	2019年 4月 3日
		JP	WO2015115091	A1	2017年 3月 23日
		EP	3101032	A1	2016年 12月 7日
		JP	6046301	B1	2016年 12月 14日
		SI	3101032	T1	2019年 2月 28日
CN 104755494 A	2015年 7月 1日	KR	20200026323	A	2020年 3月 10日
		HU	E039000	T2	2018年 12月 28日
		LT	2907824	T	2018年 6月 11日
		TW	201811746	A	2018年 4月 1日
		PH	12015500667	B1	2015年 5月 18日
		TW	202033499	A	2020年 9月 16日
		KR	101841818	B1	2018年 3月 26日
		TW	201420117	A	2014年 6月 1日
		AU	2013328111	A1	2015年 3月 12日
		HR	P20200353	T1	2020年 6月 12日
		SG	10201804788X	A	2018年 7月 30日
		JP	6715888	B2	2020年 7月 1日
		CA	2885800	A1	2014年 4月 17日
		JP	2018188455	A	2018年 11月 29日
		EP	3342785	A1	2018年 7月 4日
		JP	6030267	B1	2016年 11月 24日
		JP	2020180124	A	2020年 11月 5日
		MX	2019004502	A	2019年 8月 21日
		PL	3342785	T3	2020年 9月 7日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/112462

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)
		HR	P20180870	T1	2018年 7月 13日
		ES	2773710	T3	2020年 7月 14日
		JP	2016196484	A	2016年 11月 24日
		LT	3342785	T	2020年 2月 10日
		KR	102087017	B1	2020年 3月 10日
		KR	20210038728	A	2021年 4月 7日
		KR	102237639	B1	2021年 4月 7日
		MX	2015003903	A	2015年 7月 17日
		HU	E048748	T2	2020年 8月 28日
		PL	2907824	T3	2018年 8月 31日
		CY	1120363	T1	2019年 7月 10日
		TW	201920098	A	2019年 6月 1日
		NZ	705394	A	2018年 10月 26日
		MX	364484	B	2019年 4月 29日
		DK	2907824	T3	2018年 7月 23日
		CA	3021435	A1	2014年 4月 17日
		EP	2907824	B1	2018年 4月 11日
		WO	2014057687	A1	2014年 4月 17日
		TW	I615152	B	2018年 2月 21日
		IL	271760	D0	2020年 2月 27日
		CN	104755494	B	2018年 9月 7日
		KR	20190135559	A	2019年 12月 6日
		JP	6371452	B2	2018年 8月 8日
		AU	2013328111	B2	2017年 11月 2日
		JP	5953378	B2	2016年 7月 20日
		JP	2018008982	A	2018年 1月 18日
		RU	2018128384	A	2018年 10月 2日
		US	2016279259	A1	2016年 9月 29日
		US	10195288	B2	2019年 2月 5日
		EP	3342785	B1	2019年 12月 25日