

(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
2021年11月11日(11.11.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/223048 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/07 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/088564

(22) 国际申请日: 2020年5月3日(03.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 上海美雅珂生物技术有限责任公司(SHANGHAI MIRACOGEN INC.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江路1238弄3号4E, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 胡朝红(HU, Chaohong); 中国上海市浦东新区张江路1238弄3号4E, Shanghai 201203 (CN)。李虎(LI, Hu); 中国上海市浦东新区张江路1238弄3号4E, Shanghai 201203 (CN)。肖莉莉(XIAO, Lili); 中国上海市浦东新区张江路1238弄3号4E, Shanghai 201203 (CN)。刘文超(LIU, Wenchao); 中国上海市浦东新区张江路1238弄3号4E, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW)

OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街2号万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN)。

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

(54) Title: ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND PREPARATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗体药物偶联物及其制剂

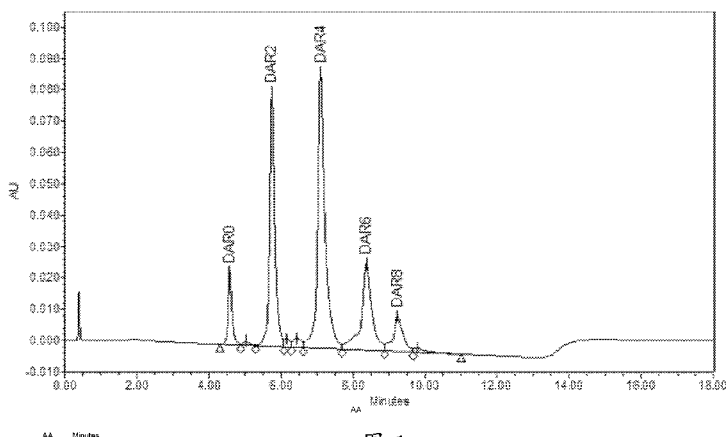


图 1

(57) Abstract: Provided are an anti-CD20 antibody-drug conjugate, a preparation comprising the antibody-drug conjugate, a composition comprising the antibody-drug conjugate, and a pharmaceutical use of the antibody-drug conjugate.

(57) 摘要: 提供一种抗 CD20 抗体药物偶联物, 包含该抗体药物偶联物的制剂, 包含该抗体药物偶联物的组合物, 以及该抗体药物偶联物的医药用途。

[见续页]

WO 2021/223048 A1

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

抗体药物偶联物及其制剂

技术领域

5 本发明涉及生物医药领域，具体涉及抗体药物偶联物，包含该抗体药物偶联物的制剂，包含该抗体药物偶联物的组合物，以及该抗体药物偶联物的医药用途。

背景技术

10 目前，非霍奇金淋巴瘤（NHL）的治疗包括传统的手术治疗、化疗、放疗、骨髓或造血干细胞移植、免疫及靶向治疗。传统化学药物治疗对 NHL 患者有一定的疗效，但其产生的系统性毒副作用大、耐受性差，且易复发，限制了患者的使用。靶向药物，尤其是抗体药物，因疗效显著且治疗过程中产生的系统性毒副作用小等优点备受关注。

15 近年来有多个 CD20 靶向的单抗药物被开发出来（如利妥昔单抗，Rituxan[®]），并且其抗肿瘤活性在临床试验中得到了验证。

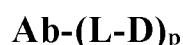
20 但是随着临床应用的深入，利妥昔单抗治疗的局限性逐渐显露出来，即在治疗过程中存在病人对药物的原发性和获得性耐药，导致利妥昔单抗治疗效果降低或无效。另外，现有 CD20 靶向单抗单药治疗肿瘤的有效率并不理想，需要与化疗药物联用以提高抗肿瘤效果，这无疑增大了毒性的风险。由此看来，以利妥昔单抗为代表的已上市 CD20 靶向单抗药物还远远不能满足临床实践中对复发或难治的 B 细胞 NHL（包括 DLBCL 和 FL 等）治疗的需求。

25 鉴于上述现有 CD20 靶向单抗药物存在的种种问题，提供疗效更好、毒副作用更低，且不容易产生耐药的治療手段，是开发 CD20 靶向 ADC 药物 ADC-1 的主要目的。

发明内容

30 本发명의发明人通过大量实验和创造性劳动，制备得到了抗 CD20 抗体药物偶联物，并证实其具有良好的生物学活性和制剂稳定性，由此完成了本发明。

为此，在本发明的第一方面，本发明提供了抗体药物偶联物，所述抗体药物偶联物具有式 I 所示的结构，



式I

其中：

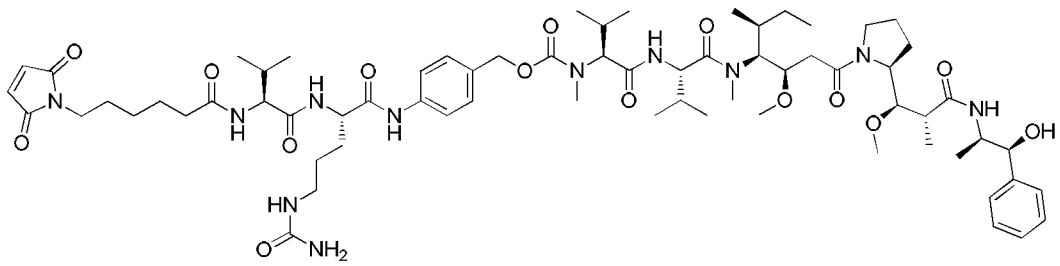
Ab 为抗 CD20 单抗，所述抗 CD20 单抗为任何靶向 CD20 的抗体，例如利妥昔单抗或其生物类似物；

- 5 D 为细胞毒剂，所述细胞毒剂为 Monomethyl auristatin E (MMAE)；
- L 为接头，用于连接所述抗 CD20 单抗和所述细胞毒剂，所述接头为 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB)；
- p 为 3.6-4.0。

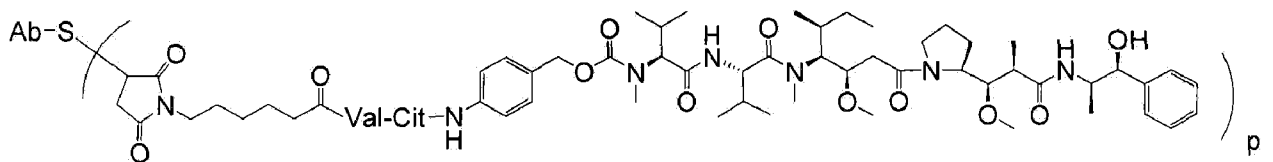
在一些实施方案中，p 为 3.7-3.9。

- 10 在一些实施方案中，p 为 3.8。

在一些实施方案中，式 I 中所述的 L-D 为 vc-MMAE，其结构如下式所示：



在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的结构如下式所示：



- 15 其中：

Ab 为抗 CD20 单抗，所述抗 CD20 单抗为任何靶向 CD20 的抗体，例如利妥昔单抗或其生物类似物，

p 为 3.6-4.0。

- 20 在一些实施方案中，p 为 3.7-3.9。
- 在一些实施方案中，p 为 3.8。

在本发明的第二方面，本发明提供了抗体药物偶联物制剂，其包括：

- 25 抗体药物偶联物，其浓度为 1-60 mg/mL (如 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL、6 mg/mL、7 mg/mL、8 mg/mL、9 mg/mL、10 mg/mL、13 mg/mL、15 mg/mL、17 mg/mL、19 mg/mL、20 mg/mL、25 mg/mL、30 mg/mL、35 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL、50 mg/mL、

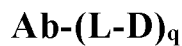
55 mg/mL或60 mg/mL) ;

5-35 mM (如5 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM或35mM) 的组氨酸缓冲液, pH 5.0-6.2 (如5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1或6.2) ;

5 2-10% (如2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%) 的蔗糖;
和

0.01-0.1% (如0.01%、0.015%、0.02%、0.025%、0.03%、0.031%、0.032%、0.033%、0.034%、0.035%、0.036%、0.037%、0.038%、0.039%、0.04%、0.045%、0.05%、0.055%、0.06%、0.065%、0.07%、0.08%、0.09%
10 或0.1%) 的吐温80;

所述抗体药物偶联物具有式II所示的结构,



式II

其中:

15 Ab为抗CD20单抗, 所述抗CD20单抗为任何靶向CD20的抗体, 例如利妥昔单抗或其生物类似物;

D为细胞毒剂, 所述细胞毒剂为 Monomethyl auristatin E (MMAE) ;

L为接头, 用于连接所述抗CD20单抗和所述细胞毒剂, 所述接头为6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB);

20 q为3.3-4.3 (如3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2或4.3) 。

在一些实施方案中, q为3.6-4.0。

在一些实施方案中, q为3.7-3.9。

在一些实施方案中, q为3.8。

25 在一些实施方案中, 所述抗体药物偶联物的浓度为1-20 mg/mL。

在一些实施方案中, 所述抗体药物偶联物的浓度为1-10 mg/mL。

在一些实施方案中, 所述抗体药物偶联物的浓度为3-7 mg/mL。

在一些实施方案中, 所述抗体药物偶联物的浓度为5 mg/mL。

在一些实施方案中, 所述组氨酸缓冲液的浓度为5-15 mM。

30 在一些实施方案中, 所述组氨酸缓冲液的浓度为8-12 mM。

在一些实施方案中, 所述组氨酸缓冲液的浓度为10 mM。

在一些实施方案中, 所述组氨酸缓冲液的pH为5.8-6.2。

在一些实施方案中, 所述组氨酸缓冲液的pH为5.6-6.0。

在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的pH为5.4-6.0。

在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的pH为5.4-6.2。

在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为3-9%。

在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为4-8%。

5 在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为5-7%。

在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为6%。

在一些实施方案中，所述吐温80的浓度为0.02-0.06%。

在一些实施方案中，所述吐温80的浓度为0.02-0.05%。

在一些实施方案中，所述吐温80的浓度为0.03-0.04%。

10 在一些实施方案中，所述吐温80的浓度为0.035%。

在一些实施方案中，所述制剂包括：

所述抗体药物偶联物，浓度为5 mg/mL；

10 mM组氨酸缓冲液，pH 5.8；

6%蔗糖；和

15 0.035%吐温80。

需要说明的是，“2-10%蔗糖”表示质量体积浓度（w/v%），指的是每1000 mL的所述抗体药物偶联物制剂中，蔗糖质量为20-100g。“0.01-0.1%吐温80”表示质量体积浓度（w/v%），其含义可以参照前述“2-10%蔗糖”进行类似的理解。

20 另外，“组氨酸缓冲液”的浓度指的是组氨酸和盐酸组氨酸的浓度，其pH是通过调整组氨酸和盐酸组氨酸比例得到的。

在一些实施方案中，pH为5.0-6.2（例如5.6-6.0）时，所述抗体药物偶联物制剂在25±2°C/60%±5%RH条件下可稳定6周。

25 在一些实施方案中，pH为5.0-6.2（例如5.6-6.0）时，所述抗体药物偶联物制剂在25°C条件下放置6周时，外观无色澄清。

在一些实施方案中，pH为5.0-6.2（例如5.6-6.0）时，所述抗体药物偶联物制剂在25°C条件下放置6周时，pH未发生变化。

在一些实施方案中，pH为5.0-6.2（例如5.6-6.0）时，所述抗体药物偶联物制剂在25°C条件下放置6周时，浓度未发生变化。

30 在一些实施方案中，pH为5.0-6.2（例如5.6-6.0）时，所述抗体药物偶联物制剂在25°C条件下放置6周时，SEC单体%含量的降低不超过2%（或者不超过1%）。

在一些实施方案中，pH为5.0-6.2（例如5.6-6.0）时，所述抗体药物偶

联物制剂在25°C条件下放置6周时, SEC高聚体%含量的升高不超过2%(或者不超过1%)。

在一些实施方案中, pH为5.0-6.2(例如5.6-6.0)时, 所述抗体药物偶联物制剂在25°C条件下放置6周时, DAR值未出现明显变化。

5 在一些实施方案中, pH为5.0-6.2(例如5.6-6.0)时, 所述抗体药物偶联物制剂在40°C条件下放置4周时, 外观无色澄清。

在一些实施方案中, pH为5.0-6.2(例如5.6-6.0)时, 所述抗体药物偶联物制剂在40°C条件下放置4周时, pH未发生变化。

10 在一些实施方案中, pH为5.0-6.2(例如5.6-6.0)时, 所述抗体药物偶联物制剂在40°C条件下放置4周时, 浓度未发生变化。

在一些实施方案中, pH为5.0-6.2(例如5.6-6.0)时, 所述抗体药物偶联物制剂在40°C条件下放置4周时, SEC单体%含量的降低不超过5%(或者不超过4%)。

15 在一些实施方案中, pH为5.0-6.2(例如5.6-6.0)时, 所述抗体药物偶联物制剂在40°C条件下放置4周时, SEC高聚体%含量的升高不超过5%(或者不超过4%)。

在一些实施方案中, pH为5.0-6.2(例如5.6-6.0)时, 所述抗体药物偶联物制剂在40°C条件下放置4周时, DAR值未出现明显变化。

20 需要说明的是, 术语“无明显变化”或“无变化”指的是无统计学上的明显变化。

另外, 需要说明的是, 上述“抗体药物偶联物”指的是含有相同或不同DAR值的ADC分子的组合物。

25 具体地, 本发明提供了包含多个抗CD20 ADC分子的组合物。在某些情况下, 本文所述的组合物中的每个ADC包含相同数目的一个或多个药物分子。在其他情况下, 本文所述的组合物中的每个ADC包含不同数目的一个或多个药物分子。

本文所述的抗体药物偶联物中, 每个抗CD20抗体可以偶联有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多药物分子(优选2个、4个、6个或8个, 更优选为2个或4个)。

30 上述药物抗体比(DAR)是指偶联到抗CD20抗体的抗癌药物的分子数。本文所述的ADC中包含的抗癌药物的分子数通常是整数, 当本文所述的ADC中包含的抗癌药物的分子数(例如, 式I中的p, 或者式II中的q)是分数时, 该分数指的是包含多个ADC分子的组合物中, 每个抗CD20抗体的平

均抗癌药物分子数量。

在本发明的第三方面，本发明提供了前述抗体药物偶联物制剂的制备方法，包括：

5 将抗CD20单抗和还原剂进行还原反应，获得被还原的抗CD20单抗，
所述抗CD20单抗为任何靶向CD20的抗体，例如利妥昔单抗或其生物类似物；

将所述被还原的抗CD20单抗和vcMMAE进行偶联反应；

淬灭所述偶联反应；

10 将所述淬灭后的偶联反应产物进行缓冲液置换，获得所述抗体药物偶联物制剂，所述抗体药物偶联物制剂包括：

15 所述抗体药物偶联物的浓度为1-60 mg/mL（如1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL、6 mg/mL、7 mg/mL、8 mg/mL、9 mg/mL、10 mg/mL、13 mg/mL、15 mg/mL、17 mg/mL、19 mg/mL、20 mg/mL、25 mg/mL、30 mg/mL、35 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL、50 mg/mL、55 mg/mL或60 mg/mL）；

5-35 mM（如5 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM或35 mM）的组氨酸缓冲液，pH 5.0-6.2（如5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1或6.2）；

20 和
2-10%（如2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%）的蔗糖；

0.01-0.1%（如0.01%、0.015%、0.02%、0.025%、0.03%、0.031%、0.032%、0.033%、0.034%、0.035%、0.036%、0.037%、0.038%、0.039%、0.04%、0.045%、0.05%、0.055%、0.06%、0.065%、0.07%、0.08%、0.09%或0.1%）吐温80。

25 在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的浓度为1-20 mg/mL。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的浓度为1-10 mg/mL。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的浓度为3-7 mg/mL。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的浓度为5 mg/mL。

在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的浓度为5-15 mM。

30 在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的浓度为8-12 mM。

在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的浓度为10 mM。

在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的pH为5.8-6.2。

在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的pH为5.6-6.0。

在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的pH为5.4-6.0。

在一些实施方案中，所述组氨酸缓冲液的pH为5.4-6.2。

在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为3-9%。

在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为4-8%。

5 在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为5-7%。

在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为6%。

在一些实施方案中，所述吐温80的浓度为0.02-0.06%。

在一些实施方案中，所述吐温80的浓度为0.02-0.05%。

在一些实施方案中，所述吐温80的浓度为0.03-0.04%。

10 在一些实施方案中，所述吐温80的浓度为0.035%。

在一些实施方案中，所述还原剂为DTT。

在一些实施方案中，所述制备方法包括：

1) 取10毫克的抗CD20单抗，使用15 mL的30KD 超滤装置置换到还原缓冲液 (25mM 硼酸钠, pH8.0, 25mM NaCl, 5 mM EDTA)中，共三次置换；
15 终体积约为1 mL,转移至新的Eppendorf离心管（称重）中，并称重；检测蛋白浓度，计算蛋白总量；

2) 向抗体中加入2.0-3.0 倍摩尔数的DTT，室温保温2小时，连续混匀；使用15 ml的30KD 超滤装置置换到偶联缓冲液（50mM Tris, pH7.2, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA）中，共三次置换；取浓缩液，以A₂₈₀（在280nm
20 波长处的吸光度）测定蛋白浓度，并称重，计算蛋白总量；取10μl样品，以Ellman's方法测定自由巯基数；

并以下列公式计算其自由巯基的摩尔浓度（其中，A₄₁₂表示在412nm波长处的吸光度）：

$$C_{\text{thiol}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14150} \text{ (M)}$$

25 b: 比色皿光路长度（通常1cm）

根据自由巯基的摩尔浓度和总蛋白溶液体积计算自由巯基摩尔数；

3) 向还原后的抗体中加入 1.0-1.5 倍于自由巯基摩尔数的vc-MMAE（溶于DMSO），混匀后室温反应2小时，间断混匀；向反应体系中加入20倍于所投入之vc-MMAE摩尔数的N-乙酰半胱氨酸于反应液中，
30 混匀，静置5分钟；

4) 使用15 ml的30KD 超滤装置置换到偶联物储存液（10 mM 组氨酸（Histidine），6% 蔗糖（Sucrose），0.035% PS80, pH5.8）中，共三次置换，即得到所述抗体药物偶联物制剂，于4°C保存。

在本发明的第四方面，本发明提供了组合物，其含有前述抗体药物偶联物，或者前述抗体药物偶联物制剂，或者前述方法制备的抗体药物偶联物制剂。

5 在一些实施方案中，所述组合物还含有至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

10 在一些实施方案中，所述组合物中还包含已知的用于治疗肿瘤的化疗药物，所述化疗药物例如为阿霉素 (Adriamycin)、环磷酰胺和紫杉烷类 [紫杉醇 (Taxol) 和多西他赛 (Taxotere)、卡培他滨 (Xeloda)、吉西他滨 (Gemzar)、长春瑞滨 (Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂 (瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康 (camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌 (Novantrone)、泼尼松、长春新碱 (Oncovin)、多柔比星、强的松等，或它们的组合。

15 在一些实施方案中，所述组合物中还包含免疫抑制剂，所述免疫抑制剂选自：(1) 糖皮质激素类，如可的松和强的松；(2) 微生物代谢产物，如环孢菌素和藤霉素等；(3) 抗代谢物，如硫唑嘌呤和6-巯基嘌呤等；(4) 多克隆和单克隆抗淋巴细胞抗体，如抗淋巴细胞球蛋白和OKT3等；(5) 烷化剂类，如环磷酰胺。具体地，所述免疫抑制剂例如为甲基强的松龙，强的松，硫唑嘌呤，普乐可复，赛尼哌，舒莱，环孢菌素，他克莫司，雷帕霉素，霉酚酸酯，咪唑立宾，环磷酰胺，芬戈莫德等。

20 在本发明的第五方面，本发明提供了前述抗体药物偶联物，或者前述抗体药物偶联物制剂，或者前述方法制备的抗体药物偶联物制剂，或者前述组合物在制备预防和/或治疗表达CD20的癌症或免疫疾病的药物中的用途。

25 在一些实施方案中，所述表达CD20的癌症为淋巴瘤或白血病。

25 在一些实施方案中，所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤、B细胞非霍奇金淋巴瘤、滤泡性非霍奇金淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤或弥漫大B细胞淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述白血病为慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、B细胞幼淋巴细胞性白血病或急性淋巴细胞性白血病。

30 在一些实施方案中，所述表达CD20的免疫疾病为类风湿性关节炎、肉芽肿性多血管炎、Wegener氏肉芽肿、显微镜多血管炎或多发性硬化。

在一些实施方案中，所述类风湿性关节炎为经至少一种TNF拮抗剂治疗失败的严重活动性类风湿性关节炎。

优选地，在一些实施方案中，所述表达CD20的癌症为CD20阳性B细胞

性淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述CD20阳性B细胞性淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性CD20阳性B细胞性淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤。

5 在一些实施方案中，所述淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性非霍奇金淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述非霍奇金淋巴瘤为弥漫大B细胞淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述非霍奇金淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性弥漫大B细胞淋巴瘤。

10 在本发明的第六方面，本发明提供了预防和/治疗表达CD20的癌症或免疫疾病的方法，其包括给予有需要的受试者预防和/或治疗有效量的前述抗体药物偶联物，或者前述抗体药物偶联物制剂，或者前述方法制备的抗体药物偶联物制剂，或者前述的组合物。

在一些实施方案中，所述表达CD20的癌症为淋巴瘤或白血病。

15 在一些实施方案中，所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤、B细胞非霍奇金淋巴瘤、滤泡性非霍奇金淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤或弥漫大B细胞淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述白血病为慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、B细胞幼淋巴细胞性白血病或急性淋巴细胞性白血病。

20 在一些实施方案中，所述表达CD20的免疫疾病为类风湿性关节炎、肉芽肿性多血管炎、Wegener氏肉芽肿、显微镜多血管炎或多发性硬化。

在一些实施方案中，所述类风湿性关节炎为经至少一种TNF拮抗剂治疗失败的严重活动性类风湿性关节炎。

优选地，在一些实施方案中，所述表达CD20的癌症为CD20阳性B细胞性淋巴瘤。

25 在一些实施方案中，所述CD20阳性B细胞性淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性CD20阳性B细胞性淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性非霍奇金淋巴瘤。

30 在一些实施方案中，所述非霍奇金淋巴瘤为弥漫大B细胞淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述非霍奇金淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性弥漫大B细胞淋巴瘤。

在一些实施方案中，受试者为NHL PDX模型时，给予有需要的受试者

的给药剂量为0.3-10 mg/kg (如0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg)。

在一些实施方案中,受试者为NHL PDX模型时,给予有需要的受试者的给药剂量为0.3-3 mg/kg、1-3 mg/kg、1-10 mg/kg或3-10 mg/kg。

5 在一些实施方案中,受试者为人时,给予有需要的受试者的给药剂量为0.1-5 mg/kg (如0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg或5 mg/kg)。

在一些实施方案中,向有需要的受试者每1、2、3、4、5或6周给予一次预防和/或治疗有效量的前述抗体药物偶联物,或者前述抗体药物偶联物制剂,或者前述方法制备的抗体药物偶联物制剂,或者前述的组合物。

10 在一些实施方案中,向有需要的受试者每18-24天给予一次预防和/或治疗有效量的前述抗体药物偶联物,或者前述抗体药物偶联物制剂,或者前述方法制备的抗体药物偶联物制剂,或者前述的组合物。

在一些实施方案中,还包括向有需要的受试者给予另外的用于治疗肿瘤的化疗药物或免疫抑制剂。

15 在一些实施方案中,所述化疗药物例如为阿霉素(Adriamycin)、环磷酰胺和紫杉烷类[紫杉醇(Taxol)和多西他赛(Taxotere)]、卡培他滨(Xeloda)、吉西他滨(Gemzar)、长春瑞滨(Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂(瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康(camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌(Novantrone)、泼尼松、长春新碱(Oncovin)、多柔比星、强的松等,或它们的组合。

20 在一些实施方案中,所述免疫抑制剂选自:(1)糖皮质激素类,如可的松和强的松;(2)微生物代谢产物,如环孢菌素和藤霉素等;(3)抗代谢物,如硫唑嘌呤和6-巯基嘌呤等;(4)多克隆和单克隆抗淋巴细胞抗体,如抗淋巴细胞球蛋白和OKT3等;(5)烷化剂类,如环磷酰胺。具体地,所述免疫抑制剂例如为甲基强的松龙,强的松,硫唑嘌呤,普乐可复,赛尼哌,舒莱,环孢菌素,他克莫司,雷帕霉素,霉酚酸酯,咪唑立宾,环磷酰胺,芬戈莫德等。

25 在本发明的第七方面,本发明提供了前述抗体药物偶联物,或者前述抗体药物偶联物制剂,或者前述方法制备的抗体药物偶联物制剂,或者前述组合物,其用于预防和/治疗表达CD20的癌症或免疫疾病。

30 在一些实施方案中,所述表达CD20的癌症为淋巴瘤或白血病。

在一些实施方案中,所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤、B细胞非霍奇金淋巴瘤、滤泡性非霍奇金淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤或弥漫大B细胞淋巴瘤。

在一些实施方案中,所述白血病为慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、

B细胞幼淋巴细胞性白血病或急性淋巴细胞性白血病。

在一些实施方案中，所述表达CD20的免疫疾病为类风湿性关节炎、肉芽肿性多血管炎、Wegener氏肉芽肿、显微镜多血管炎或多发性硬化。

5 在一些实施方案中，所述类风湿性关节炎为经至少一种TNF拮抗剂治疗失败的严重活动性类风湿性关节炎。

优选地，在一些实施方案中，所述表达CD20的癌症为CD20阳性B细胞性淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述CD20阳性B细胞性淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性CD20阳性B细胞性淋巴瘤。

10 在一些实施方案中，所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性非霍奇金淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述非霍奇金淋巴瘤为弥漫大B细胞淋巴瘤。

15 在一些实施方案中，所述非霍奇金淋巴瘤为抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性弥漫大B细胞淋巴瘤。

在一些实施方案中，受试者为NHL PDX模型时，其给药剂量为0.3-10 mg/kg（如0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg）。

在一些实施方案中，受试者为NHL PDX模型时，其给药剂量为0.3-3 mg/kg、1-3 mg/kg、1-10 mg/kg或3-10 mg/kg。

20 在一些实施方案中，受试者为人时，其给药剂量为0.1-5 mg/kg（如0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg或5 mg/kg）。

有益效果：

25 1、ADC-1是由Rituximab生物类似物MAB801通过vcMMAE偶联而成的ADC，通过与肿瘤细胞表面CD20受体的结合、内吞、释放MMAE，以杀伤CD20阳性的非霍奇金淋巴瘤（NHL）细胞，从而控制肿瘤的生长和引起肿瘤消退；

30 2、ADC-1在多种CD20表达的NHL细胞株、以及多种CD20表达的人NHL PDX肿瘤模型中均表现了显著的抑制肿瘤细胞生长的药效作用，尤其对Rituxan®耐药的NHL PDX模型也表现出明显的肿瘤生长抑制作用；

3、ADC-1的制备工艺中，整个反应过程只需在一个容器里顺序完成，无需中间纯化步骤，优于其他制备工艺；

4、ADC-1的制备工艺中，整个工艺过程只需一次超滤纯化步骤，无

需层析工艺，优于其他制备工艺；

5、ADC-1具有良好的制剂稳定性。

附图说明

5 图 1 为本发明实施例的 ADC-1 的 HIC-HPLC 图谱，其中，Minutes 表示分钟；

图 2 为本发明实施例的 ADC-1 与 Rituxan[®]在 Daudi 细胞株中代表性的细胞杀伤作用曲线，其中，Inhibition 表示抑制率，Concentration 表示浓度；

10 图 3 为本发明实施例的 ADC-1 与 Rituxan[®]在 Jeko-1 细胞株中代表性的细胞杀伤作用曲线，其中，Inhibition 表示抑制率，Concentration 表示浓度；

15 图 4 为本发明实施例的 ADC-1 与 Rituxan[®]在 Raji 细胞株中代表性的细胞杀伤作用曲线，其中，Inhibition 表示抑制率，Concentration 表示浓度；

图 5 为本发明实施例的 ADC-1 与 Rituxan[®]在 Ramos 细胞株中代表性的细胞杀伤作用曲线，其中，Inhibition 表示抑制率，Concentration 表示浓度；

20 图 6 为本发明实施例的 ADC-1 和 Rituxan[®]对 CD20 阳性人淋巴瘤 (NHL) PDX 模型 LYM#004 肿瘤体积的影响示意图；

图 7 为本发明实施例的 ADC-1 和 Rituxan[®]对 CD20 阳性人淋巴瘤 (NHL) PDX 模型 LYM#013 肿瘤体积的影响示意图；

图 8 为本发明实施例的 ADC-1 和 Rituxan[®]对 CD20 阳性人淋巴瘤 (NHL) PDX 模型 LYM#016 肿瘤体积的影响示意图；

25 图 9 为 pH 对活性物质 ADC-1 (10 mM 组氨酸缓冲体系) 的 SEC 稳定性的影响示意图，其中，ADC-1 在 10 mM 组氨酸不同 pH 体系中，左图表示 ADC-1 在 25 度 6 周和 40 度 4 周的 SEC 单体含量变化趋势，右图表示 ADC-1 在 25 度 6 周和 40 度 4 周的 SEC 高聚体含量变化趋势。

30 具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件

进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

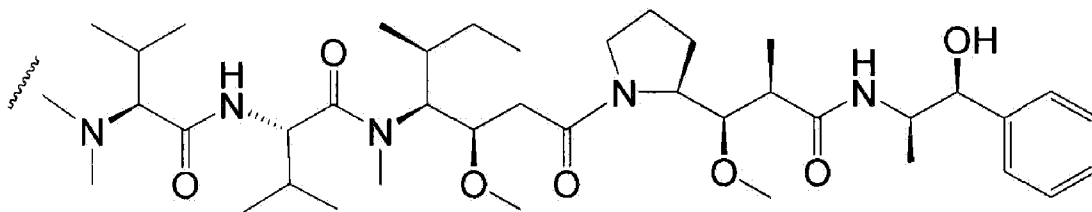
5 在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

10 除非另有说明，在本发明中，任何浓度范围，百分比范围，比例范围或数值范围应理解为包括所述范围内的任何整数数值，以及在适当时包括所述范围内的分数数值。

15 在本发明中，术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体的轻链可分为 κ 和 λ 两类。重链可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 五种，依据重链的不同可将抗体分为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE 五类。在轻链和重链内，可变区
20 和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和补体系统的组分 C1q 的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为骨架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至
25 各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))，或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

30 适用于本发明的抗体为靶向 CD20 的抗体，所述抗 CD20 单抗为任何靶向 CD20 的抗体，例如利妥昔单抗或其生物类似物。其中，生物类似物指的是序列与利妥昔单抗相同、理化性质以及生物活性，临床安全性有效性也与利妥昔一致的抗体产品。

在本发明中，MMAE 的结构为：



在本发明中，药物抗体比（drug：antibody ratio，DAR）或药物载荷（loading）由 p 或 q 表示，即式 I：Ab-(L-D)_p 或式 II：Ab-(L-D)_q 的分子中每个抗体的平均药物模块（即细胞毒剂）数，可以为整数，也可以为分数。通式 I 的 ADC 包括偶联有一定范围（3.6-4.0 个）药物模块的抗体的集合，通式 II 的 ADC 包括偶联有一定范围（3.3-4.3 个）药物模块的抗体的集合。来自偶联反应的 ADC 制备物中每个抗体的平均药物模块数可以通过常规手段来验证，诸如质谱、ELISA 测定法、HIC 和 HPLC。还可以测定 ADC 在 p 或 q 方面的定量分布。在有些情况中，将 p 或 q 为某数值的同质 ADC 从具有其它药物载荷的 ADC 中分离、纯化和验证可以通过诸如反相 HPLC 或电泳的手段来实现。

在某些实施方案中，在偶联反应中少于理论最大值的药物模块偶联至抗体。一般而言，抗体不包含许多游离的和反应性的半胱氨酸硫醇基，其可连接药物模块；事实上，抗体中的大多数半胱氨酸硫醇基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中，可以在部分或完全还原性条件下用还原剂诸如二硫苏糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)还原抗体以产生反应性半胱氨酸硫醇基。

本发明的抗体药物偶联物可以与已知的用于治疗肿瘤的化疗药物或免疫抑制剂联用，所述化疗药物例如为阿霉素(Adriamycin)、环磷酰胺和紫杉烷类[紫杉醇(Taxol)和多西他赛(Taxotere)]、卡培他滨(Xeloda)、吉西他滨(Gemzar)、长春瑞滨(Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂(瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康(camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌(Novantrone)、泼尼松、长春新碱(Oncovin)、多柔比星、强的松等，或它们的组合；所述免疫抑制剂选自：（1）糖皮质激素类，如可的松和强的松；（2）微生物代谢产物，如环孢菌素和藤霉素等；（3）抗代谢物，如硫唑嘌呤和6-巯基嘌呤等；（4）多克隆和单克隆抗淋巴细胞抗体，如抗淋巴细胞球蛋白和OKT3等；（5）烷化剂类，如环磷酰胺。具体地，所述免疫抑制剂例如为甲基强的松龙，强的松，硫唑嘌呤，普乐可复，赛尼哌，舒莱，环孢菌素，他克莫司，雷帕霉素，霉酚酸酯，咪唑立宾，环磷酰胺，芬戈莫德等。

在本发明中，“治疗”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预，可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。

5 在有些实施方案中，本发明的抗体或抗体药物偶联物用于延迟疾病或病症的发生，或用于减缓疾病或病症的进展。用于评估疾病的成功治疗和改善的上述参数可以容易的通过内科医师所熟悉的常规规程来测量。对于癌症治疗，可通过例如评估疾病进展前时间 (TTP)和/或测定反应率(RR)来测量功效。

10 在本发明中，“受试者”指脊椎动物。在某些实施方案中，脊椎动物指哺乳动物。哺乳动物包括，但不限于，牲畜(诸如牛)、宠物(诸如猫、犬、和马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。在某些实施方案中，哺乳动物指人。

15 在本发明中，“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。本发明的物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还涵盖该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量会低于治疗有效量。在癌症的情况中，药物的治疗有效量可减少癌细胞数；缩小肿瘤体积；抑制(即一定程度的减缓，优选停止)

20 癌细胞浸润到周围器官中；抑制(即一定程度的减缓，优选停止)肿瘤转移；一定程度的抑制肿瘤生长；和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。

25 对于疾病的预防或治疗，本发明的抗体药物偶联物的适宜剂量(在单独地或联合一种或多种其它别的治疗剂诸如化疗剂地使用)会取决于待治疗疾病的类型、抗体药物偶联物的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体药物偶联物是出于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床病史和对抗体药物偶联物的反应性、及主治医师的判断。合适的是，一次性或通过一系列治疗将抗体药物偶联物施用于患者。抗体药物偶联物的例示剂量的范围可以是

30 约 0.1 mg/kg 至约 5 mg/kg。如此，可以对患者施用一剂或多剂约 0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1.0 mg/kg、3.0 mg/kg 或 5 mg/kg(或其任意组合)的抗体药物偶联物。

“药学上可接受的载体”在用于本发明时包括药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒

的。通常，生理学可接受的载体是 pH 缓冲水溶液。生理学可接受载体的例子包括缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量(少于约 10 个残基)多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖，蔗糖，海藻糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖醇，诸如甘露醇或山梨醇；成盐反荷离子，诸如钠；和/或非离子表面活性剂，诸如 TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和 PLURONICS™。

5 在本发明中，20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见
10 Immunology-A Synthesis (第 2 版, E.S. Golub 和 D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其通过引用合并入本文。

下面结合具体实施例对本发明进行进一步的解释说明。

15 实施例 1 抗体 MAB801 (用于抗体偶联药物 ADC-1 的裸抗部分) 的生产细胞株构建

通过 LC/MS/MS 分析市售药物美罗华 (Rituxan[®], 利妥昔单抗), 确定了抗体轻重链的氨基酸序列, 根据专利 (Anderson-1998, 专利号: US5736137A) 序列信息, 进一步确认了轻链和重链的全基因序列, 通过基因合成分别获得了 MAB801 的轻链和重链基因 DNA, 再利用双质粒载体
20 表达系统 (来源于 Invitrogen 公司), 分别构建的轻链 (Light Chain, LC) 和重链 (Heavy Chain, HC) 基因表达质粒, 两个质粒共转染哺乳动物宿主细胞 CHO DG44 (来源于 Invitrogen 公司), 经过两步加压筛选得到了同时整合有轻链和重链基因序列的细胞群, 评估细胞群的抗体表达能力符合要求, 利用半固体培养基进行了单细胞克隆的筛选, 将获得的单细胞克隆
25 经过批次补料实验筛选出抗体表达量最高的克隆细胞株, 并以此细胞株为基础制备了 MAB801 的生产细胞库。

对所述单克隆细胞株进行基因测序, 测序结果表明, 编码 MAB801 轻链和重链的序列与市售的利妥昔单抗完全一致。

30 实施例 2 抗体 MAB801 的制备(用于抗体偶联药物 ADC-1 的裸抗部分)

MAB801 的制备采用目前在抗体领域中广泛使用的流加细胞培养工艺。该工艺, 从工作细胞库细胞种子复苏开始, 包括的主要步骤有摇瓶接

种，摇瓶细胞扩增，反应器逐级细胞扩增培养，然后接种到生产反应器中做流加培养。接着通过纯化工艺，包括发酵液澄清处理(深层过滤)、Protein A亲和层析、低 pH 病毒灭活及深层过滤、PB 孵育、阴离子交换层析、阳离子交换层析、除病毒过滤、以及切向流超滤渗滤等步骤后，过滤分装而成。

5 测试结果表明，生产出的利妥昔单抗生物类似药(biosimilar)的分子量等理化指标与利妥昔单抗高度相似。

实施例 3 ADC-1—靶向 CD20 抗体偶联物的制备方法

10 1) 取 10 毫克的 MAB801 抗体，使用 15 mL 的 30KD 超滤装置置换到还原缓冲液 (25 mM 硼酸钠, pH8.0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA) 中，共三次置换；终体积约为 1 mL,转移至新的 Eppendorf 离心管 (称重) 中，并称重;检测蛋白浓度，计算蛋白总量。

15 2) 向抗体中加入 2.5 倍摩尔数的 DTT，室温保温 2 小时，连续混匀；使用 15ml 的 30KD 超滤装置置换到偶联缓冲液 (50 mM Tris, pH7.2, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) 中，共三次置换。取浓缩液，以 A₂₈₀ 测定蛋白浓度，并称重，计算蛋白总量；取 10μl 样品，以 Ellman's 方法测定自由巯基数；

并以下列公式计算其自由巯基的摩尔浓度：

$$20 \quad C_{\text{thiol}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14150} \quad (\text{M})$$

b: 比色皿光路长度 (通常 1 cm)

根据自由巯基的摩尔浓度和总蛋白溶液体积计算自由巯基摩尔数。

25 3) 向还原后的抗体中加入 1.1 倍于自由巯基摩尔数的 vc-MMAE (溶于 DMSO)，混匀后室温反应 2 小时，间断混匀。向反应体系中加入 20 倍于所投入之 vc-MMAE 摩尔数的 N-乙酰半胱氨酸于反应液中，混匀，静置 5 分钟。

4) 使用 15 ml 的 30KD 超滤装置置换到偶联物储存液 (10 mM 组氨酸 (Histidine), 6% 蔗糖 (Sucrose), 0.035% PS80, pH5.8) 中，共三次置换，即得到抗体药物偶联物 ADC-1 于 4°C 保存，其中，活性成分

-抗体药物偶联物的浓度为 5 mg/mL。

实施例 4 ADC-1 中药物/抗体比例的测定

将制备好的抗体药物偶联物 ADC-1 经过 HIC-HPLC 分析 (Ouyang-2013) 以测定药物/抗体比例 (drug antibody ratio, DAR), 见图 1, 根据图谱峰面积计算得到平均载药数 DAR 为 3.8。

实施例 5 ADC-1 对 CD20 表达的 NHL 细胞的体外杀伤活性

为了研究 ADC-1 对 CD20 表达的 NHL 细胞的杀伤作用, 选用了 4 种 CD20 表达的 NHL 细胞株 Daudi, Jeko-1, Raji 和 Ramos, 采用细胞增殖抑制法, 使用 PrestoBlue[®] 检测试剂, 测定了 ADC-1 及市售参比药物 Rituxan[®] 对以上 4 株细胞的杀伤作用, 研究结果如表 2 和图 2、图 3、图 4 和图 5 所示。

表 2: ADC-1 与 Rituxan[®] 在 4 种 CD20 表达的 NHL 细胞株中的杀伤作用

细胞株	组织来源	CD20 表达水平	IC ₅₀ (Mean±SD, ng/mL)	
			ADC-1	Rituxan [®]
Daudi	淋巴瘤	高表达	155.4±43.8	ND
Jeko-1	淋巴瘤	高表达	23.1±4.4	ND
Raji	淋巴瘤	高表达	140.8±26.4	ND
Ramos	淋巴瘤	高表达	39.6±8.9	ND

注: CD20 表达水平参考文献 Barth-2015, Law-2004。IC₅₀ 值为 2 块 96 孔板中计算出的 IC₅₀ 的平均值; ND 表示最高增殖抑制百分比 (inhibition%) 小于 50%, 因而 IC₅₀ 值无法计算。

实验结果显示, ADC-1 对 4 种 CD20 表达的 NHL 细胞株均有显著的细胞杀伤作用, 且效果都明显优于市售参比药物 Rituxan[®]。

实施例 6 ADC-1 在 NHL PDX 模型中的抑瘤效果

人源性肿瘤组织异种移植模型 (PDX 模型) 是利用人的原代肿瘤组织在免疫缺陷小鼠中建立的肿瘤模型, 最大程度上保留了原代肿瘤的异质性、分子多样性和组织学特性, 对药物的临床治疗效果具有较高的预测价值, 近年来越来越多地被应用于癌症研究 (Hidalgo-2014)。为了有效地评估

ADC-1 在未来临床适应症中的药效，分别在 3 个 CD20 表达的人淋巴瘤 (NHL) PDX 模型中进行了实验。在所有实验中，均同时使用市售 CD20 靶点单抗药物 Rituxan[®]作为参比药物来比较肿瘤抑制活性。在这 3 个 NHL PDX 模型中，有 2 个对 Rituxan[®]耐药。

5 研究中使用的 3 个 PDX 模型信息如表 3 所示。

表 3: 体内药效学实验所用的 PDX 模型信息

模型号	性别	年龄	病理诊断	实验所用代数	CD20 IHC	Rituxan [®] 耐药
LYM#004	女	53	弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (非-GCB 样型)	P7	阳性	是
LYM#013	女	13	(肠系膜)弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (GCB)	P6	阳性	是
LYM#016	女	83	外周 B 细胞淋巴瘤-弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (GCB)	P6	阳性	否

1、ADC-1 在 CD20 阳性 NHL PDX 模型 LYM#004 中的疗效研究

10 LYM#004 是一个 Rituxan[®]耐药的 DLBCL PDX 模型，实验结果如图 6 所示。ADC-1 按 1、3 和 10 mg/kg 剂量给药后，Day 18 时 T/C (%) 分别为 45.90% (P>0.05)、4.46% (P<0.001) 和 2.05% (P<0.001)，TGI% 分别为 54.10%、95.54%和 97.95%。ADC-1 按 3 mg/kg 给药后，Day 18 时所有肿瘤部分消退；ADC-1 按 10 mg/kg 给药后，Day 18 时分别有 5/8 的肿瘤部分消退，及 3/8 的肿瘤完全消退。Rituxan[®]按 3 和 10 mg/kg 剂量给药后，Day 18 的 T/C (%) 分别为 50.76% (P>0.05) 和 51.50% (P>0.05)，TGI% 分别为 49.24%和 48.50%。

20 实验结果表明，ADC-1 (3 和 10 mg/kg) 具有显著抑制肿瘤生长的活性，ADC-1 (1 mg/kg) 和参比药物 Rituxan[®] (3 和 10 mg/kg) 均无显著抗肿瘤活性。荷瘤小鼠对 ADC-1 和 Rituxan[®]均有很好的耐受性。

2、ADC-1 在 CD20 阳性 NHL PDX 模型 LYM#013 中的疗效研究

LYM#013 是一个 Rituxan[®]耐药的 DLBCL PDX 模型，实验结果如图 7 所示。ADC-1 按 0.3、1 和 3 mg/kg 剂量给药后，Day 28 时 T/C (%) 分别为 31.90% (P<0.05)、0.00% (P<0.001) 和 0.00% (P<0.001)，TGI% 分别为 68.10%、100.00% 和 100.00%，分别有 2/8、0/8 和 0/8 的肿瘤部分消退，及 0/8、8/8 和 8/8 的肿瘤完全消退。Rituxan[®]按 3 mg/kg 剂量给药后，Day 28 时 T/C (%) 为 79.86% (P>0.05)，TGI% 为 20.14%。

实验结果表明，ADC-1 (0.3、1 和 3 mg/kg) 具有显著抑制肿瘤生长的作用，且有一定的剂量依赖性，而参比药物 Rituxan[®] (3 mg/kg) 无显著抗肿瘤活性。荷瘤小鼠对 ADC-1 和 Rituxan[®]均有很好的耐受性。

10

3、ADC-1 在 CD20 阳性 NHL PDX 模型 LYM#016 中的疗效研究

LYM#016 是一个 DLBCL PDX 模型，实验结果如图 8 所示。ADC-1 按 0.3、1 和 3 mg/kg 剂量给药后，Day 14 时 T/C (%) 分别为 37.76% (P>0.05)、4.27% (P<0.01) 和 1.91% (P<0.01)，TGI% 分别为 62.24%、95.73% 和 98.09%。ADC-1 按 1 mg/kg 给药后，Day 14 时所有肿瘤部分消退；ADC-1 按 3 mg/kg 给药后，Day 14 时分别有 6/8 的肿瘤部分消退，及 2/8 的肿瘤完全消退。Rituxan[®]按 3 mg/kg 剂量给药后，Day 14 时 T/C (%) 为 30.98% (P>0.05)，TGI% 为 69.02%。

实验结果表明，ADC-1 (1 和 3 mg/kg) 具有显著抑制肿瘤生长的作用，而 ADC-1 (0.3 mg/kg) 及参比药物 Rituxan[®] (3 mg/kg) 无显著抗肿瘤活性。荷瘤小鼠对 ADC-1 和 Rituxan[®]均有很好的耐受性。

20

ADC-1 在 CD20 阳性的 3 种人源性淋巴瘤 (NHL) PDX 模型中的体内药效试验结果汇总如表 4。

25

表 4: ADC-1 (i.v., q4d×4) 在 CD20 阳性的人淋巴瘤 PDX 模型中体内药效结果

药效模型	受试物	剂量	统计日期	相对肿瘤增殖率	肿瘤生长抑制率	肿瘤消退情况		抑瘤活性
		(mg/kg)		T/C(%)	TGI%	部分消	完全消	

						退	退			
L YM#004	Vehicle (ADC-1 溶媒)	/	Day 18	100	0	/	/	/		
	ADC-1	1		45.90 (P>0.05)	54.10	/	/	+++ +		
		3		4.46 (P<0.001)	95.54	8/8	0/8			
		10		2.05 (P<0.001)	97.95	5/8	3/8			
	Rituxan®	3		50.76 (P>0.05)	49.24	/	/	+		
		10		51.50 (P>0.05)	48.50	/	/			
	L YM#013	Vehicle (ADC-1 溶媒)		/	Day 28	100	0	/	/	/
		ADC-1		0.3		31.90 (P<0.05)	68.10	2/8	0/8	+++ +
1			0 (P<0.001)	100.00		0/8	8/8			
3			0 (P<0.001)	100.00		0/8	8/8			
Rituxan®		3	79.86	20.14		/	/	+		

				(P>0.05)				
LYM#016	Vehicle (ADC-1 溶媒)	/	Day 14	100	0	/	/	/
	ADC-1	0.3		37.76 (P>0.05)	62.24	/	/	+++ +
		1		4.27 (P<0.01)	95.73	8/8	0/8	
		3		1.91 (P<0.01)	98.09	6/8	2/8	
	Rituxan®	3		30.98 (P>0.05)	69.02	/	/	++

注：“/”表示不适用。肿瘤体积 (Tumor Volume, TV) 的计算公式为： $TV = l \times w^2 / 2$ 。其中 l、w 分别代表肿瘤测量长和宽。根据测量结果计算出相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV)， $RTV = V_f / V_0$ 。其中 V_0 为分组给药时 (即 Day 0) 测量所得肿瘤体积， V_f 为最后一天测量的肿瘤体积。相对肿瘤增殖率 $T/C(\%) = (\text{给药组 RTV} / \text{Vehicle 组 RTV}) \times 100\%$ 。肿瘤生长抑制率 $TGI\% = (\text{Vehicle 组平均肿瘤体积} - \text{给药组平均肿瘤体积}) / \text{Vehicle 组平均肿瘤体积} \times 100\%$ 。“++++”表示 $T/C(\%) \geq 0$ 且 $\leq 10\%$ ，“+++”表示 $T/C(\%) > 10\%$ 且 $\leq 20\%$ ，“++”表示 $T/C(\%) > 20\%$ 且 $\leq 40\%$ ，“+”表示 $T/C(\%) > 40\%$ 。ADC-1 及 Rituxan® 抑瘤活性的强弱划分是根据在该模型中最高剂量的 T/C(%) 值。

综上，体内药效试验结果显示，在人淋巴瘤 (NHL) 的 3 个 PDX 模型 (所有模型均为 DLBCL) 中，ADC-1 均表现出显著的肿瘤生长抑制效果，且荷瘤鼠对 ADC-1 显示出很好的耐受性。值得指出的是，这 3 个 DLBCL PDX 模型中有 2 个对 Rituxan® 耐药。

15

实施例 7 pH 对 ADC-1 制剂稳定性的影响

本申请的发明人基于对 ADC-1 的制剂处方研究和以往经验, 最终确定制剂处方为 5 mg/mL 抗体药物偶联物 (不含缓冲液等其他成分的裸的抗体药物偶联物), 10 mM 组氨酸缓冲液 (pH5.8)、6%蔗糖、0.035%吐温 80 (PS80)。

5 为了考察 ADC-1 在 10 mM 组氨酸溶液中不同的 pH 对其质量的影响, 将其换液至待考察处方 F1~F4 (pH: 5.8~7.0) 中, 置于 25±2°C/60%±5%RH 和 40±2°C/75%±5%RH 条件下分别考察 6 周和 4 周, 于设定的时间点取样分析, 检测项包括外观、pH、蛋白浓度、SEC、iCIEF 和 HIC, 如样品出现较明显乳光, 将不进行后续相关分析。具体实验设计见表 5。

10 表 5: pH (5.8~7.0) 对 ADC-1 (10mM 组氨酸缓冲液) 稳定性影响实验设计

处方	pH	T0	25±2°C/60%±5%RH		40±2°C/75%±5%RH		
			2W	6W	1W	2W	4W
F1	5.8	√	√	√	√	√	√
F2	6.2	√	√	√	√	√	√
F3	6.7	√	√	√	√	√	√
F4	7.0	√	√	√	√	√	√

注: W 表示周, 即 2W 为 2 周; √表示检测。

实验结果表明: 当 ADC-1 在 10 mM 的组氨酸缓冲液中, 其稳定性随着 pH 的升高而降低。

15 在 25°C 条件下放置 6 周, 所有样品均为无色澄清溶液, pH、浓度未发生变化; iCIEF 纯度下降, 酸性峰含量增加, 变化速度随 pH 升高而加快; SEC 纯度呈现下降趋势, 高聚体 (HMW) 含量增加, 变化速度随 pH 升高而加快; DAR 值未出现明显变化。

20 在 40°C 条件下放置 4 周, 样品稳定性呈相同趋势, 但变化幅度加剧; 当 pH 为 6.7、7.0 时, 40°C 一周其外观就发生变化, 出现乳光, 乳光程度随 pH 升高而加剧, UV 检测结果由于颗粒物的存在 (乳光) 读数失真导致计算所得蛋白含量偏离实际值; SEC 纯度降低, 高聚体、低分子量片段 (LMW) 含量均增加, 变化速度随 pH 升高而加快; iCIEF 纯度降低, 酸性峰含量增加, 碱性峰含量降低, 变化速度随 pH 升高而加快。

25 样品随 pH 变化的 SEC 纯度的趋势图见图 9。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 本领域技术人员将

会理解，根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求 书

1. 抗体药物偶联物，所述抗体药物偶联物具有式I所示的结构，



式I

5

其中：

Ab 为抗 CD20 单抗，所述抗 CD20 单抗为任何靶向 CD20 的抗体，例如利妥昔单抗或其生物类似物；

D 为细胞毒剂，所述细胞毒剂为 Monomethyl auristatin E (MMAE)；

10 L 为接头，用于连接所述抗 CD20 单抗和所述细胞毒剂，所述接头为 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB)；

p 为 3.6-4.0，优选 3.7-3.9，更优选 3.8。

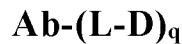
2. 抗体药物偶联物制剂，其包括：

15 抗体药物偶联物，其浓度为 1-60 mg/mL（例如浓度为 1-20mg/mL，或者 1-10mg/mL，或者 3-7mg/mL，或者 5mg/mL）；

5-35 mM 组氨酸缓冲液（例如 5-15 mM，或者 8-12 mM，或者 10 mM 组氨酸缓冲液），pH 5.0-6.2（例如 pH 5.8-6.2，或者 pH 5.4-6.0，或者 pH 5.4-6.2，或者 pH 5.6-6.0）；

20 2-10% 蔗糖（例如 3-9%，或者 4-8%，或者 5-7%，或者 6% 蔗糖）；和 0.01-0.1% 吐温 80（0.02-0.06%，0.02-0.05%，0.03-0.04% 或者 0.035% 吐温 80）；

所述抗体药物偶联物具有式II所示的结构，



式II

25

其中：

Ab 为抗 CD20 单抗，所述抗 CD20 单抗为任何靶向 CD20 的抗体，例如利妥昔单抗或其生物类似物；

D 为细胞毒剂，所述细胞毒剂为 Monomethyl auristatin E (MMAE)；

30 L 为接头，用于连接所述抗 CD20 单抗和所述细胞毒剂，所述接头为 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB)；

q 为 3.3-4.3（例如 3.6-4.0，或者 3.7-3.9，或者 3.8）。

优选地，所述制剂包括：

所述抗体药物偶联物，其浓度为5 mg/mL；
10 mM组氨酸缓冲液，pH 5.8；
6%蔗糖；和
0.035%吐温80。

5

3. 权利要求2所述的抗体药物偶联物制剂的制备方法，包括：

步骤1：将抗CD20单抗和还原剂进行还原反应，获得被还原的抗CD20单抗，所述抗CD20单抗为任何靶向CD20的抗体，例如利妥昔单抗或其生物类似物；

10 步骤2：将所述被还原的抗CD20单抗和vcMMAE进行偶联反应；

步骤3：淬灭所述偶联反应；

步骤4：将所述淬灭后的偶联反应产物进行缓冲液置换，获得所述抗体药物偶联物制剂，所述抗体药物偶联物制剂包括：

15 1-60 mg/mL所述抗体药物偶联物（例如1-20 mg/mL，或者1-10 mg/mL，或者3-7mg/mL，或者5 mg/mL所述抗体药物偶联物），

5-35 mM组氨酸缓冲液（例如5-15 mM，或者8-12 mM，或者10 mM组氨酸缓冲液），pH 5.0-6.2（例如pH5.8-6.2，或者pH5.4-6.0，或者pH5.4-6.2，或者5.6-6.0），

20 2-10%蔗糖（例如3-9%，或者4-8%，或者5-7%，或者6%蔗糖），和
0.01-0.1%吐温80（例如0.02-0.06%，0.02-0.05%，0.03-0.04%或者0.035%吐温80）。

4. 权利要求3的制备方法，其中，所述方法包括：

25 1) 取10毫克的抗CD20单抗，使用15 mL的30KD 超滤装置置换到还原缓冲液（25mM 硼酸钠，pH8.0，25mM NaCl，5 mM EDTA）中，共三次置换；终体积约为1 mL，转移至新的Eppendorf离心管（称重）中，并称重；检测蛋白浓度，计算蛋白总量；

30 2) 向抗体中加入2.0-3.0 倍摩尔数的DTT，室温保温2小时，连续混匀；使用15 ml的30KD 超滤装置置换到偶联缓冲液（50mM Tris，pH7.2，150 mM NaCl，5 mM EDTA）中，共三次置换；取浓缩液，以A₂₈₀（在280nm波长处的吸光度）测定蛋白浓度，并称重，计算蛋白总量；取10μl样品，以Ellman's方法测定自由巯基数；

并以下列公式计算其自由巯基的摩尔浓度：

$$C_{\text{thio}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14150} \text{ (M)}$$

b: 比色皿光路长度 (通常1cm)

根据自由巯基的摩尔浓度和总蛋白溶液体积计算自由巯基摩尔数;

5 3) 向还原后的抗体中加入 1.0-1.5 倍于自由巯基摩尔数的 vc-MMAE (溶于DMSO), 混匀后室温反应2小时, 间断混匀; 向反应体系中加入20倍于所投入之vc-MMAE摩尔数的N-乙酰半胱氨酸于反应液中, 混匀, 静置5分钟;

10 4) 使用15 ml的30KD 超滤装置置换到偶联物储存液 (10 mM 组氨酸 (Histidine), 6% 蔗糖 (Sucrose), 0.035% PS80, pH5.8) 中, 共三次置换, 即得到所述抗体药物偶联物制剂, 于4°C保存;

优选地, 所述制备方法包括:

15 1) 取10毫克的抗CD20单抗, 使用15 mL的30KD 超滤装置置换到还原缓冲液 (25 mM 硼酸钠, pH8.0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA) 中, 共三次置换; 终体积约为1 mL, 转移至新的Eppendorf离心管 (称重) 中, 并称重; 检测蛋白浓度, 计算蛋白总量;

20 2) 向抗体中加入2.5 倍摩尔数的DTT, 室温保温2小时, 连续混匀; 使用15 ml的30KD 超滤装置置换到偶联缓冲液 (50mM Tris, pH7.2, 150mM NaCl, 5 mM EDTA) 中, 共三次置换; 取浓缩液, 以A₂₈₀测定蛋白浓度, 并称重, 计算蛋白总量; 取10μl样品, 以Ellman's方法测定自由巯基数;

并以下列公式计算其自由巯基的摩尔浓度:

$$C_{\text{thio}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14150} \text{ (M)}$$

b: 比色皿光路长度 (通常1 cm)

根据自由巯基的摩尔浓度和总蛋白溶液体积计算自由巯基摩尔数;

25 3) 向还原后的抗体中加入 1.1倍于自由巯基摩尔数的vc-MMAE(溶于DMSO), 混匀后室温反应2小时, 间断混匀; 向反应体系中加入20倍于所投入之vc-MMAE摩尔数的N-乙酰半胱氨酸于反应液中, 混匀, 静置5分钟;

30 4) 使用15 mL的30KD 超滤装置置换到偶联物储存液 (10 mM 组氨酸 (Histidine), 6% 蔗糖 (Sucrose), 0.035% PS80, pH5.8) 中, 共三次置换, 即得到所述抗体药物偶联物制剂, 于4°C保存, 其中, 活性成分-抗体药物偶联物的浓度为5 mg/mL。

5. 组合物，其含有权利要求1所述的抗体药物偶联物，或者权利要求2所述的抗体药物偶联物制剂，或者权利要求3-4任一项所述的方法制备的抗体药物偶联物制剂，任选地，还含有至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

5

6. 权利要求1所述的抗体药物偶联物，或者权利要求2所述的抗体药物偶联物制剂，或者权利要求3-4任一项所述的方法制备的抗体药物偶联物制剂，或者权利要求5所述的组合物在制备预防和/或治疗表达CD20的癌症或免疫疾病的药物中的用途。

10

7. 权利要求6所述的用途，其中，所述表达CD20的癌症或免疫疾病为淋巴瘤（例如，非霍奇金淋巴瘤，B细胞非霍奇金淋巴瘤，滤泡性非霍奇金淋巴瘤，小淋巴细胞性淋巴瘤，弥漫大B细胞淋巴瘤）、白血病（例如，慢性淋巴细胞白血病，毛细胞白血病，B细胞幼淋巴细胞性白血病，急性淋巴细胞性白血病）、类风湿性关节炎（例如，经至少一种TNF拮抗剂治疗失败的严重活动性类风湿性关节炎）、肉芽肿性多血管炎、Wegener氏肉芽肿、显微镜多血管炎或多发性硬化；

15

优选地，所述表达CD20的癌症为CD20阳性B细胞性淋巴瘤，优选抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性CD20阳性B细胞性淋巴瘤，

20

更优选地，所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤，优选抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性非霍奇金淋巴瘤，

进一步优选地，所述非霍奇金淋巴瘤为弥漫大B细胞淋巴瘤，优选抗CD20单抗（例如，利妥昔单抗）耐药性弥漫大B细胞淋巴瘤。

25

8. 预防和/或治疗表达CD20的癌症或免疫疾病的方法，其包括给予有需要的受试者预防和/或治疗有效量的权利要求1所述的抗体药物偶联物，或者权利要求2所述的抗体药物偶联物制剂，或者权利要求3-4任一项所述的方法制备的抗体药物偶联物制剂，或者权利要求5所述的组合物。

30

9. 权利要求8所述的方法，其中，所述表达CD20的癌症或免疫疾病为淋巴瘤（例如，非霍奇金淋巴瘤，B细胞非霍奇金淋巴瘤，滤泡性非霍奇金淋巴瘤，小淋巴细胞性淋巴瘤，弥漫大B细胞淋巴瘤）、白血病（例如，慢性淋巴细胞白血病，毛细胞白血病，B细胞幼淋巴细胞性白血病，急性淋巴细

胞性白血病)、类风湿性关节炎(例如,经至少一种TNF拮抗剂治疗失败的严重活动性类风湿性关节炎)、肉芽肿性多血管炎、Wegener氏肉芽肿、显微镜多血管炎或多发性硬化;

5 优选地,所述表达CD20的癌症为CD20阳性B细胞性淋巴瘤,优选抗CD20单抗(例如,利妥昔单抗)耐药性CD20阳性B细胞性淋巴瘤,

更优选地,所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤,优选抗CD20单抗(例如,利妥昔单抗)耐药性非霍奇金淋巴瘤,

进一步优选地,所述非霍奇金淋巴瘤为弥漫大B细胞淋巴瘤,优选抗CD20单抗(例如,利妥昔单抗)耐药性弥漫大B细胞淋巴瘤。

10

10 权利要求8所述的方法,其中,受试者为人时,给予有需要的受试者的给药剂量为0.1-5 mg/kg(如0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg);

15 或者,受试者为NHL PDX模型时,给予有需要的受试者的给药剂量为0.3-10 mg/kg(如0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、10mg/kg),优选0.3-3 mg/kg、1-3 mg/kg、1-10 mg/kg或3-10 mg/kg。

20 11. 权利要求1所述的抗体药物偶联物,或者权利要求2所述的抗体药物偶联物制剂,或者权利要求3-4任一项所述的方法制备的抗体药物偶联物制剂,或者权利要求5所述的组合物,其用于预防和/治疗表达CD20的癌症或免疫疾病。

25 12. 权利要求11所述的抗体药物偶联物,或者抗体药物偶联物制剂,或者组合物,其中,所述表达CD20的癌症或免疫疾病为淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤,B细胞非霍奇金淋巴瘤,滤泡性非霍奇金淋巴瘤,小淋巴细胞性淋巴瘤,弥漫大B细胞淋巴瘤)、白血病(例如,慢性淋巴细胞白血病,毛细胞白血病,B细胞幼淋巴细胞性白血病,急性淋巴细胞性白血病)、类风湿性关节炎(例如,经至少一种TNF拮抗剂治疗失败的严重活动性类风湿性关节炎)、肉芽肿性多血管炎、Wegener氏肉芽肿、显微镜多血管炎或多
30 发性硬化;

优选地,所述表达CD20的癌症为CD20阳性B细胞性淋巴瘤,优选抗CD20单抗(例如,利妥昔单抗)耐药性CD20阳性B细胞性淋巴瘤,

更优选地,所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤,优选抗CD20单抗(例如,利

妥昔单抗) 耐药性非霍奇金淋巴瘤,

进一步优选地, 所述非霍奇金淋巴瘤为弥漫大B细胞淋巴瘤, 优选抗CD20单抗(例如, 利妥昔单抗) 耐药性弥漫大B细胞淋巴瘤。

5 13. 权利要求11所述的抗体药物偶联物, 或者抗体药物偶联物制剂, 或者组合物, 其中:

受试者为人时, 其给药剂量为0.1-5 mg/kg (如0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg);

10 或者, 受试者为NHL PDX模型时, 其给药剂量为0.3-10 mg/kg (如0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg), 优选0.3-3 mg/kg、1-3 mg/kg、1-10 mg/kg或3-10 mg/kg。

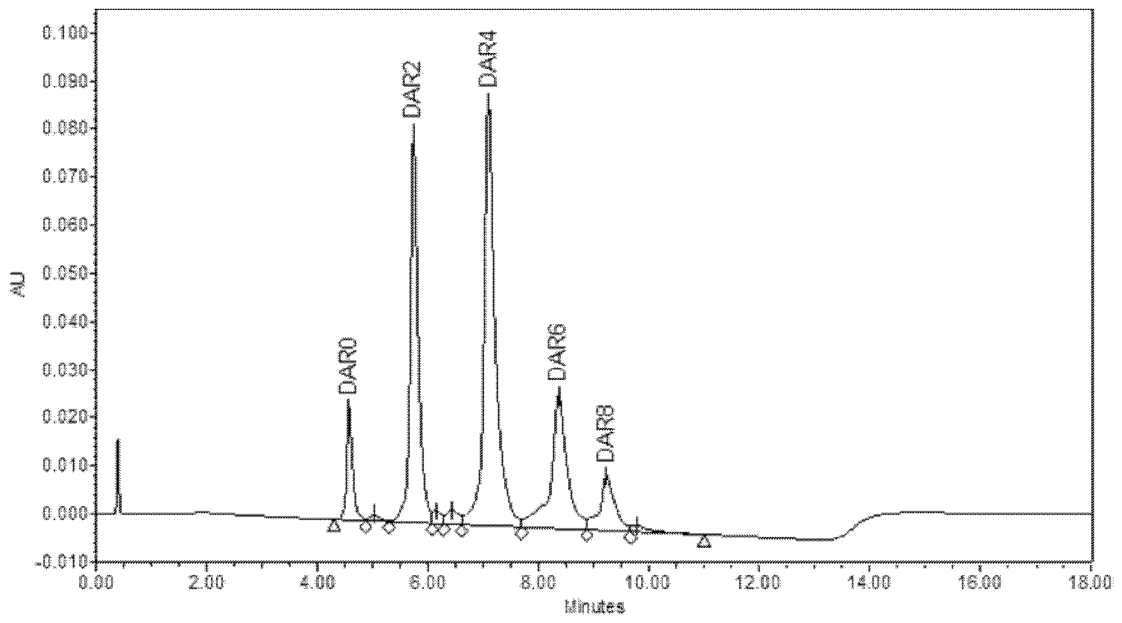
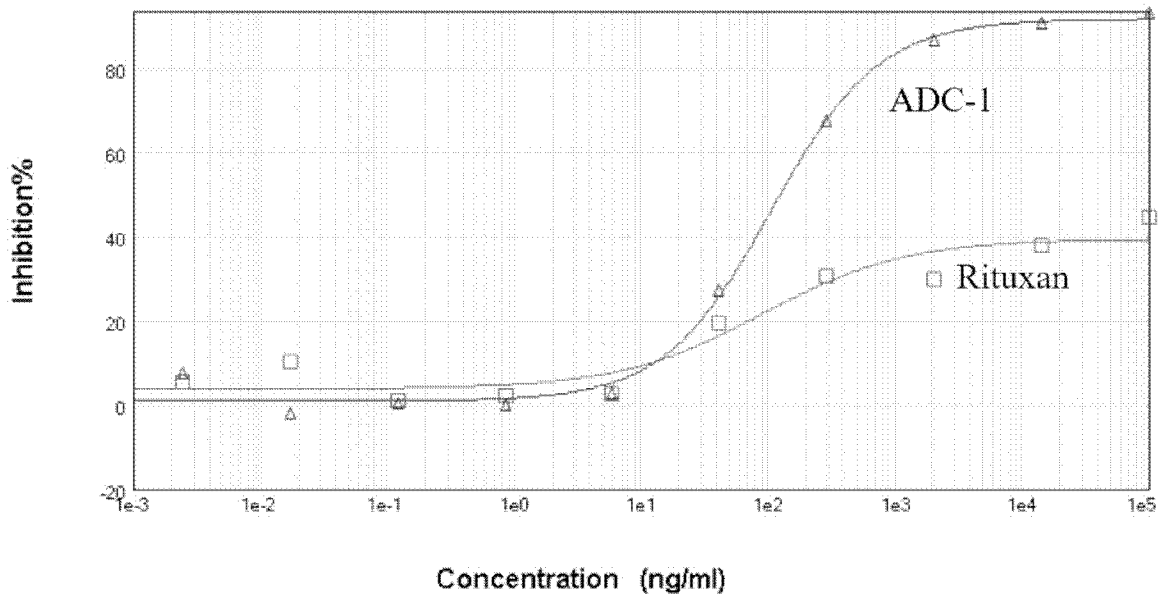


图 1

Daudi 细胞杀伤



□ Rituxan { Sample 1: Inhibition% vs Conc. } Weighting: Fixed
△ ADC-1 { Sample 2: Inhibition% vs Conc. } Weighting: Fixed

图 2

Jeko-1 细胞杀伤

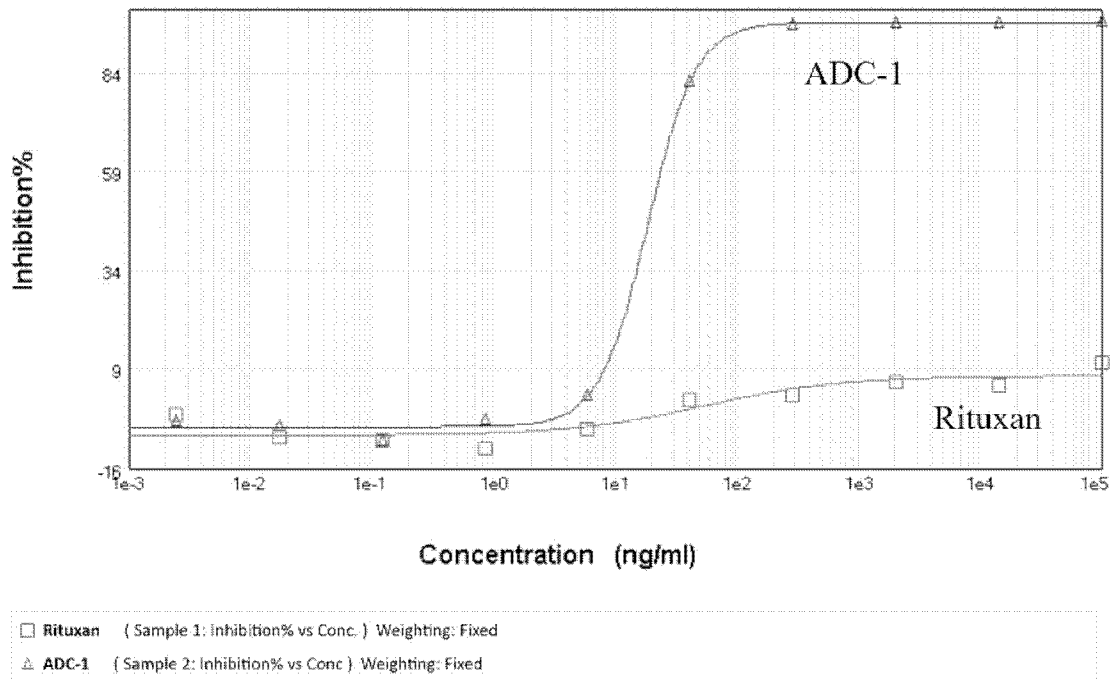


图3

Raji 细胞杀伤

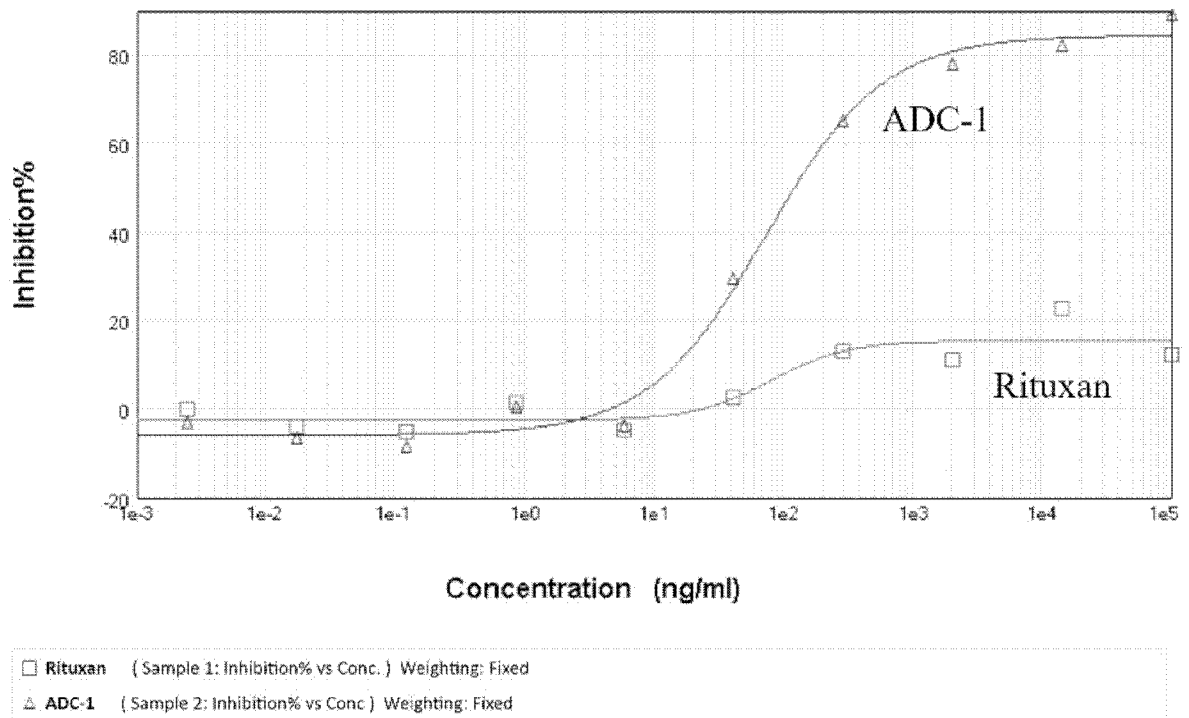


图4

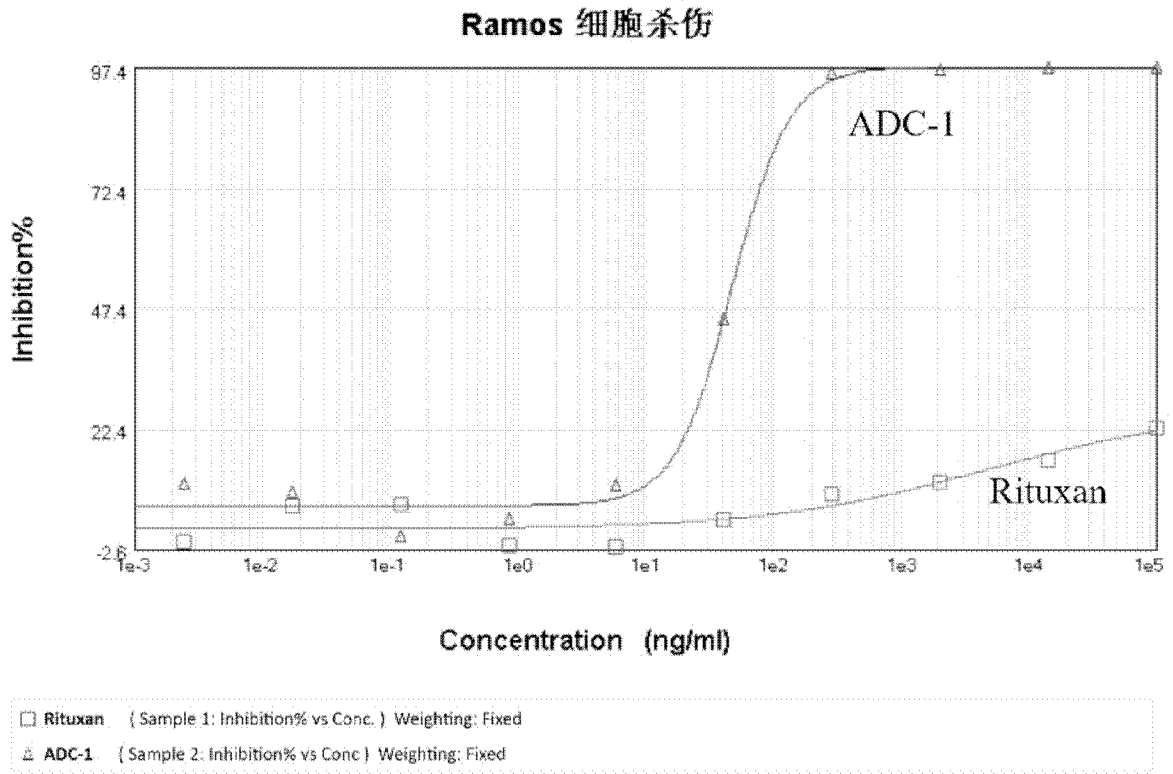


图5

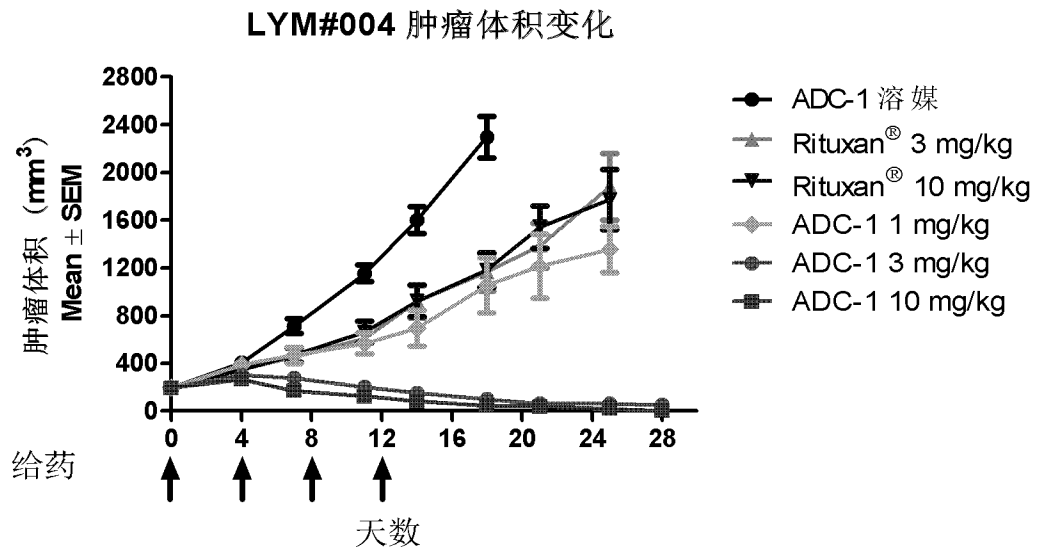


图6

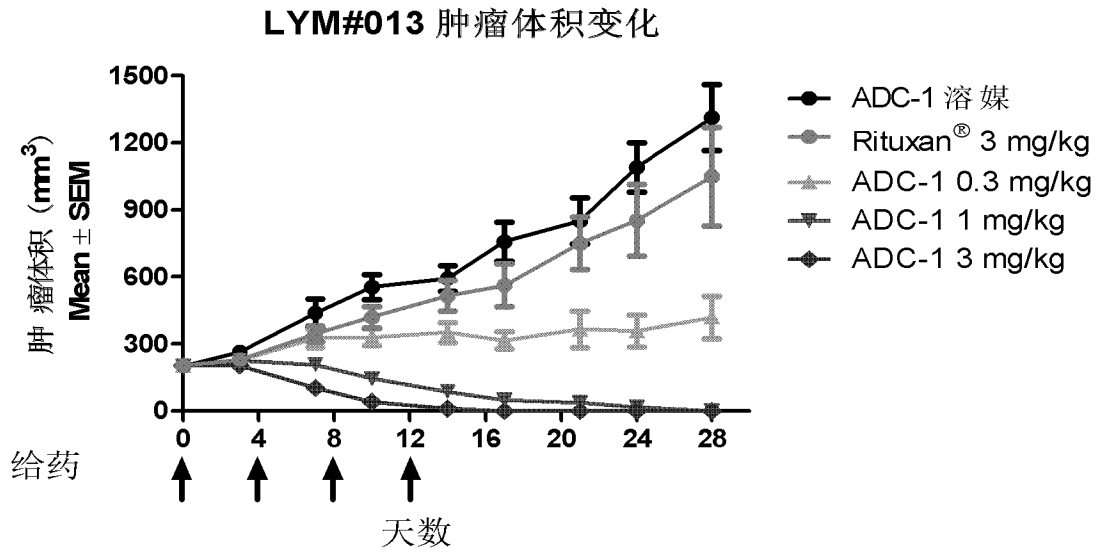


图 7

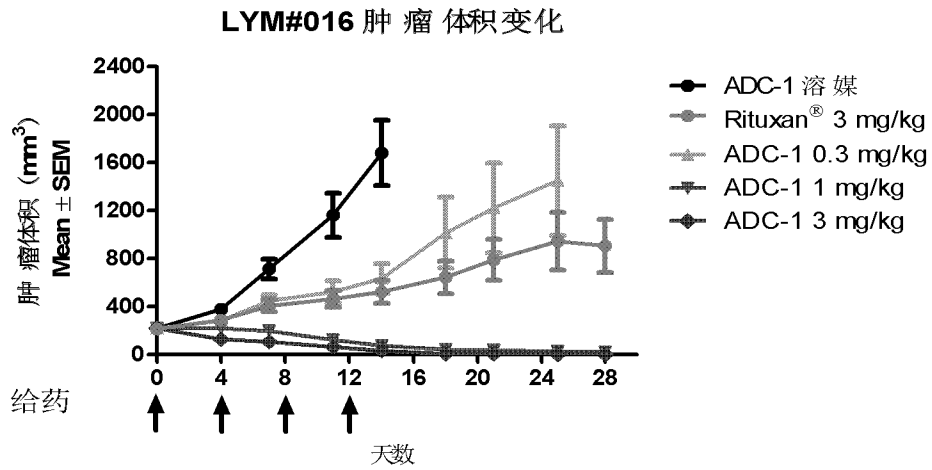


图 8

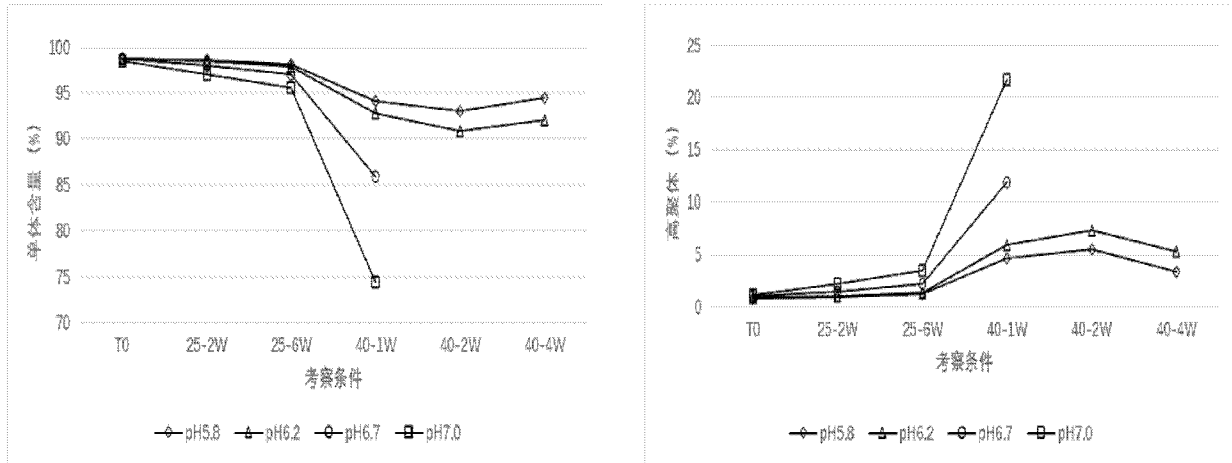


图9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/088564

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 19/00(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; A61K 38/07(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) C07K; A61K; 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, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI and Keywords: 抗体偶联药物, ADC, CD20抗体, Monomethyl auristatin E, MMAE, 甲基奥利斯达汀E, 细胞毒剂, 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯氧羰基, MC-vc-PAB, antibody drug conjugate, ADC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEGHADAD, A. A. et al. "A Developed Antibody-Drug Conjugate RituximabvcMMAE shows a Potent Cytotoxic Activity against CD20-positive Cell Line" <i>Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology</i> , Vol. 46, No. S1, 05 November 2018 (2018-11-05), the abstract, Materials and methods, page S6, left column, paragraph 1, and figure 1	1-7, 11-13
Y	CN 103254317 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 21 August 2013 (2013-08-21) claims 1-10, and embodiments	1-7, 11-13
A	LAW, C. L. et al. "Efficient Elimination of B-lineage Lymphomas by Anti-CD20-Auristatin Conjugates" <i>Clinical Cancer Research</i> , Vol. 10, No. 23, 01 December 2004 (2004-12-01), ISSN: 1078-0432, the abstract, and Materials and Methods	1-7, 11-13
A	PAN, L. Q. et al. "Sortase A-Generated Highly Potent Anti-CD20-MMAE Conjugates for Efficient Elimination of B-Lineage Lymphomas" <i>Small</i> , Vol. 13, No. 6, 15 February 2017 (2017-02-15), ISSN: 1078-0432, the abstract, and p. 2, right column, paragraph 1	1-7, 11-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 19 January 2021		Date of mailing of the international search report 18 February 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.

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

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

1. Claims Nos.: **8-10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) - Methods for the treatment of the human or animal body by therapy
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/088564

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103254317	A	21 August 2013	CN	103254317	B	13 August 2014
CN	103145847	A	12 June 2013	CN	103145847	B	21 May 2014

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 19/00(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; A61K 38/07(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI和关键词: 抗体偶联药物, ADC, CD20抗体, Monomethyl auristatin E, MMAE, 甲基奥利斯达汀E, 细胞毒剂, 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基, MC-vc-PAB, antibody drug conjugate, ADC</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>MEGHADAD, A. A. 等. "A developed antibody - drug conjugate rituximabvcMMAE shows a potent cytotoxic activity against CD20-positive cell line" ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE, AND BIOTECHNOLOGY, 第46卷, 第S1期, 2018年 11月 5日 (2018 - 11 - 05), 摘要, Materials and methods, 第S6页左栏第一段, 图1</td> <td>1-7, 11-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103254317 A (浙江大学) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21) 权利要求1-10, 实施例</td> <td>1-7, 11-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>LAW, C.L. 等. "Efficient elimination of B-lineage lymphomas by anti-CD20-auristatin conjugates" Clinical Cancer Research, 第10卷, 第23期, 2004年 12月 1日 (2004 - 12 - 01), ISSN: 1078-0432, 摘要, Materials and methods</td> <td>1-7, 11-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PAN, L.Q. 等. "Sortase A - Generated Highly Potent Anti - CD20 - MMAE Conjugates for Efficient Elimination of B - Lineage Lymphomas" SMALL, 第13卷, 第6期, 2017年 2月 15日 (2017 - 02 - 15), ISSN: 1078-0432, 摘要, 第2页右栏第一段</td> <td>1-7, 11-13</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	MEGHADAD, A. A. 等. "A developed antibody - drug conjugate rituximabvcMMAE shows a potent cytotoxic activity against CD20-positive cell line" ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE, AND BIOTECHNOLOGY, 第46卷, 第S1期, 2018年 11月 5日 (2018 - 11 - 05), 摘要, Materials and methods, 第S6页左栏第一段, 图1	1-7, 11-13	Y	CN 103254317 A (浙江大学) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21) 权利要求1-10, 实施例	1-7, 11-13	A	LAW, C.L. 等. "Efficient elimination of B-lineage lymphomas by anti-CD20-auristatin conjugates" Clinical Cancer Research, 第10卷, 第23期, 2004年 12月 1日 (2004 - 12 - 01), ISSN: 1078-0432, 摘要, Materials and methods	1-7, 11-13	A	PAN, L.Q. 等. "Sortase A - Generated Highly Potent Anti - CD20 - MMAE Conjugates for Efficient Elimination of B - Lineage Lymphomas" SMALL, 第13卷, 第6期, 2017年 2月 15日 (2017 - 02 - 15), ISSN: 1078-0432, 摘要, 第2页右栏第一段	1-7, 11-13
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	MEGHADAD, A. A. 等. "A developed antibody - drug conjugate rituximabvcMMAE shows a potent cytotoxic activity against CD20-positive cell line" ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE, AND BIOTECHNOLOGY, 第46卷, 第S1期, 2018年 11月 5日 (2018 - 11 - 05), 摘要, Materials and methods, 第S6页左栏第一段, 图1	1-7, 11-13															
Y	CN 103254317 A (浙江大学) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21) 权利要求1-10, 实施例	1-7, 11-13															
A	LAW, C.L. 等. "Efficient elimination of B-lineage lymphomas by anti-CD20-auristatin conjugates" Clinical Cancer Research, 第10卷, 第23期, 2004年 12月 1日 (2004 - 12 - 01), ISSN: 1078-0432, 摘要, Materials and methods	1-7, 11-13															
A	PAN, L.Q. 等. "Sortase A - Generated Highly Potent Anti - CD20 - MMAE Conjugates for Efficient Elimination of B - Lineage Lymphomas" SMALL, 第13卷, 第6期, 2017年 2月 15日 (2017 - 02 - 15), ISSN: 1078-0432, 摘要, 第2页右栏第一段	1-7, 11-13															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 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</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 1月 19日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 2月 18日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p>		<p>授权官员</p> <p>王翔宇</p> <p>电话号码 62411992</p>															

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
A	CN 103145847 A (浙江大学) 2013年 6月 12日 (2013 - 06 - 12) 权利要求1-8, 说明书第5、12-18段	1-7, 11-13

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 8-10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv) — 处置人体或者动物体的治疗方法
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/088564

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103254317	A	2013年 8月 21日	CN	103254317	B	2014年 8月 13日
CN	103145847	A	2013年 6月 12日	CN	103145847	B	2014年 5月 21日