

(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
2018 年 1 月 11 日 (11.01.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/006785 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 39/395 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/091586

(22) 国际申请日: 2017 年 7 月 4 日 (04.07.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610526367.6 2016 年 7 月 5 日 (05.07.2016) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 何开杰 (HE, Kaijie); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。叶鑫 (YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。梁金栋 (LIANG, Jindong); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。王亚里 (WANG, Yali); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。杨昌永 (YANG, Changyong); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。张连山 (ZHANG, Lianshan); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。孙飘扬 (SUN, Piaoyang); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层程伟, Beijing 100738 (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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(54) Title: EGFR ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: EGFR 抗体-药物偶联物及其在医药上的应用

(57) Abstract: Provided are an EGFR antibody-cytotoxic drug conjugate, or a pharmaceutically acceptable salt or solvent compound thereof, a pharmaceutical composition comprising the conjugate or the pharmaceutically acceptable salt or solvent compound thereof, and a use thereof as an anti-cancer drug, more particularly a use for preparing drugs for treating EGFR mediated diseases or symptoms.

(57) 摘要: 提供一种 EGFR 抗体-细胞毒性药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 以及包含前述偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物的药物组合物, 以及其作为抗癌药物的用途; 尤其在制备用于治疗 EGFR 介导的疾病或病症的药物中的用途。



WO 2018/006785 A1

EGFR 抗体-药物偶联物及其在医药上的应用

技术领域

- 5 本发明涉及一类全新结构的抗体-药物偶联物。具体地说，本发明涉及 EGFR 抗体变体-细胞毒性药物偶联物，包含所述偶联物的药物组合物，以及所述偶联物或药物组合物在医药上的应用。

背景技术

- 10 表皮生长因子受体(EGFR)是一个巨大的跨膜糖蛋白，分子量约为 170KDa，属于 ErbB 受体家族的一个成员。EGFR 受体本身是一种酪氨酸激酶，当与配体如 EGF、TNF- α 等结合后可形成二聚体，通过传递磷酸化作用激活下游信号(如 MAPK, PI3K, Stat 等通路)，从而维持细胞生长，促进细胞分裂增殖。由于 ErbB 家族受体的保守性，EGFR 还能与家族其他蛋白(如 Her2, Her3, Her4)形成异源二聚体，从而更广泛的调控细胞的生长。

- EGFR 的基因突变或过表达常见于多种表皮细胞起源的恶性肿瘤，如头颈癌，结直肠癌，肺癌，胰腺癌，皮肤癌等，被认为是导致这些癌症的驱动基因。因此针对 EGFR 为靶点的抗癌药物的研发一直以来是医学界的热点。目前为止，EGFR 的小分子酪氨酸激酶抑制剂(如吉非替尼(Gefitinib)，厄洛替尼(Erlotinib))
- 20 和 EGFR 单克隆抗体(如西妥昔单抗(Cetuximab)，帕尼单抗(Panitumumab)尼妥珠单抗(Nimotuzumab, EP0699755, EP0712863))等都已经上市，并在临床上取得了显著的效果。不过，这些 EGFR 靶向药物也并非完美，分别只适用于较小的病人群体。比如小分子抑制剂通常只对拥有特异的 EGFR 突变型的肺癌患者有效，且在使用一段时间后，常出现耐药性；EGFR 单抗通常只对下游 KRAS、
- 25 BRAF、PIK3CA 等基因没有产生突变的结直肠癌，头颈癌等病人群体比较有效。不仅如此，这些药物还会部分抑制普通细胞的 EGFR 正常生理功能，常伴随着皮疹，腹泻等靶点相关的副作用。因此能否找到一种能更有效的针对 EGFR 的新型抗癌药物，来克服现有 EGFR 靶向治疗造成的耐药性，扩大适应症，且减少正常组织靶点相关副作用，是我们急需攻克的一个难题。除此之外，抗体的稳定性，
- 30 药物活性也十分重要，有文献报道可以通过抗体恒定区和框架区的改造来提高抗体的稳定性或 ADCC、CDC 活性，如 CN1237076C、EP2203180 等。

- 抗体药物偶联物(Antibody-Drug Conjugate or ADC)，俗称为“生物导弹”，是一种利用单克隆抗体的特异性，将 ADC 分子蓄积到肿瘤微环境，并通过抗体-肿瘤抗原介导的内吞作用将毒素分子定向的输送到癌细胞内部来杀死癌细胞的革命性技术。相对于传统化疗，ADC 的毒素分子使用量大大降低，且较多的聚集于
- 35 病灶，对于正常组织的毒副作用更小；另外，ADC 主要是利用毒素分子直接结合

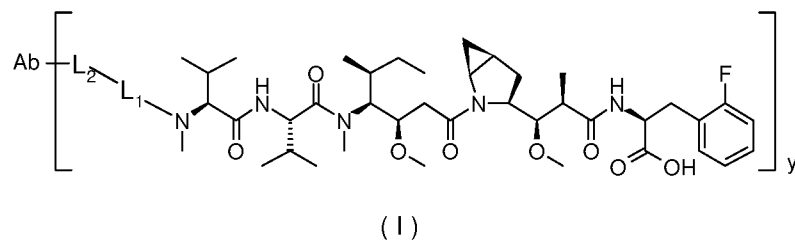
于微管束来抑制癌细胞的分裂和增殖，而与单克隆抗体通过抑制受体信号通路起作用的作用机理不同，因此，下游信号蛋白是否存在基因突变对 ADC 发挥抑制癌细胞的作用不会起到太大影响，所以从理论上讲，ADC 可以有比传统疗法更广的适应症，药效也更加强大。。ADC 相关文献有 WO2007008603、WO2013173393、
5 WO2005081711 、 WO2013173391 、 WO2013173392 、 WO2013173393 和 WO2012010287 等。

发明人的在先申请 PCT/CN2016/072129 涉及一类新的毒素分子及偶联物，但未公开特定的 EGFR 抗体的相关偶联物。

10 仍然需要寻找药效显著、毒副作用小的抗体偶联物；同时，在达到相同药效的情况下降低给药频率，提高依从性，减少治疗费用也是本领域需要解决的一个重要的问题。

发明内容

15 为了改进配体，特别是抗体和药物的偶联效果，本发明提供了一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



其中：

L_1 , L_2 是接头单元；

y 为 1-8，优选 2-5；

20 Ab 为抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段，所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段包含以下的 CDR 区：

LCDR1: RSSQNIVHSNGNTYLD

SEQ ID NO:7;

LCDR2: KVSNRFS

SEQ ID NO:8;

LCDR3: FQYSHVPWT

SEQ ID NO:9;

25 HCDR1: NYIY

SEQ ID NO: 10;

HCDR2: GINPTSGGSNFNEKFKT

SEQ ID NO: 11;

HCDR3: QGLWFSDSDGRGFDF;

SEQ ID NO: 12;

所述的 Ab 在重链上有 M258Y/S260T/T262E(YTE)三个位点突变。

30 在本发明一个优选的实施方案中，一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其中所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其片段。

在本发明一个优选的实施方案中，一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药

学上可接受的盐或溶剂化合物，其中所述人源化抗体重链可变区进一步包含人源 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 或其变体的重链 FR 区，优选包含人源 IgG1 重链 FR 区，和/或人源化抗体的轻链可变区进一步包含人源 κ 链或人源 κ 链变体的轻链 FR 区、或者人源 λ 链或人源 λ 链变体的轻链 FR 区。

5 在本发明一个优选的实施方案中，一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药
学上可接受的盐或溶剂化合物，其中所述的人源化抗体的重链恒定区包含人源
IgG1 或其变体、人源 IgG2 或其变体、人源 IgG3 或其变体或人源 IgG4 或其变体
的恒定区，优选包含人源 IgG1 或其变体的恒定区，和/或所述人源化抗体的轻链进
一步包含人源 κ 链或人源 κ 链变体的轻链恒定区、或人源 λ 链或人源 λ 链变体的
10 轻链恒定区。

在本发明一个优选的实施方案中，一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其中抗 EGFR 抗体包含：

轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIVHSNGNTYLDWYQQTPGKAPKLLIY
15 KVSNRFGVPSRFGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCFQYSHVPWTFGQGTKL
QITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 3;

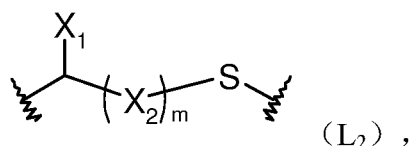
20 重链

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIYWVRQAPGGGLEWIGGINP
TSGGSNFKNEKFKTRVTITADESSTTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQGLWFDSDGR
GFD FWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
25 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 4.

30

在本发明一个优选的实施方案中，一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其中L₂如以下通式(L₂)所示：

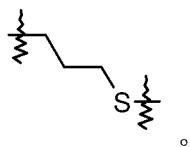


其中

35 X₁选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；
X₂选自烷基、环烷基和杂环基；

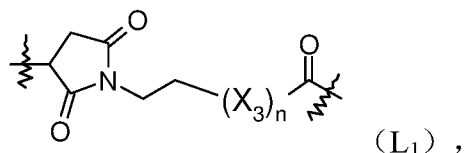
m 为 0-5, 优选 1-3; S 为硫原子。

在本发明一个优选的实施方案中, 一种通式 (L₂) 所示的化合物优选如下结构:



5

在本发明一个优选的实施方案中, 一种通式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其中 L1 为以下通式 (L₁) 所示的化合物:

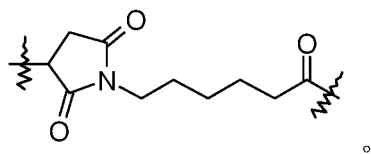


其中

10 X₃ 为烷基, 所述的烷基任选进一步被卤素、羟基、氰基、烷基的取代基所取代;

n 为 0-5, 优选 1-3。

15 在本发明一个优选的实施方案中, 一种通式 (L₁) 所示的化合物优选如下结构:

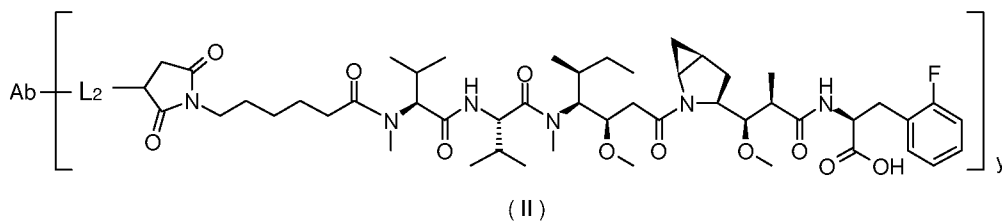


其中

20 X₃ 为烷基, 所述的烷基任选进一步被卤素、羟基、氰基、烷基的取代基所取代;

n 为 0-5, 优选 1-3。

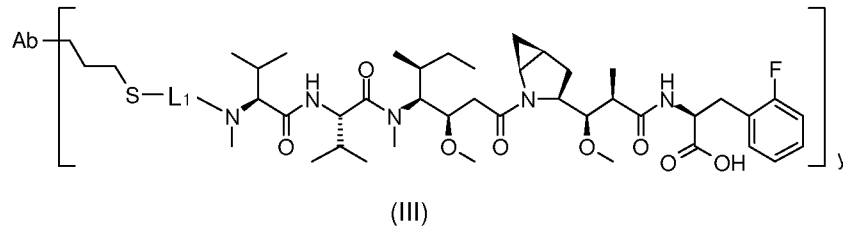
在本发明一个优选的实施方案中, 一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其选自通式(II)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



25

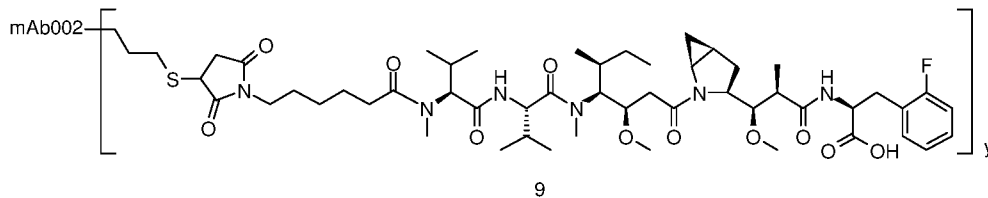
其中, Ab、L₂、y 如通式(I)中所定义。

在本发明一个优选的实施方案中，一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其选自通式(III)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



5 其中，Ab、L₁、y 如通式(I)中所定义。

在本发明一个优选的实施方案中，一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其具有如下的通式结构：



10 其中，mAb002 包括氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的轻链，和如 SEQ ID NO:4 所示的重链，y 如通式(I)中所定义。

本发明的另一方面涉及一种 EGFR 抗体，可用于制备如本发明通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，包含序列如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 及其变体所示的 LCDR1，LCDR2，LCDR3 区，及如 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 及其变体所示的 HCDR1，HCDR2，HCDR3 区，其特征在于，在重链上具有 M258Y/S260T/T262E(YTE)三个位点突变。

在本发明一个优选的实施方案中，提供一种 EGFR 抗体，可用于制备如本发明通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，所述 EGFR 抗体包括氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的轻链，和如 SEQ ID NO:4 所示的重链。

20 本发明的另一方面涉及一种药物组合物，其包含如本发明通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，和一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

25 本发明进一步提供一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或本发明所述的药物组合物，在制备用于治疗癌症的药物中的用途；优选所述癌症为高表达 EGFR 的癌症、在 EGFR 多肽上有突变的癌症和在 EGFR 信号通路下游基因中有突变的癌症；更优选为胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

本发明进一步提供一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐

或溶剂化合物，或如上所述包含其的药物组合物，在制备治疗哺乳动物癌症的药物的用途；优选所述癌症为高表达 EGFR 的癌症、在 EGFR 多肽上有突变的癌症和在 EGFR 信号通路下游基因中有突变的癌症；更优选为胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

本发明进一步提供一种治疗哺乳动物癌症的方法，该方法包括对哺乳动物施用有效量的如通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或包含其的药物组合物；其中所述哺乳动物优选为人；所述癌症优选为高表达 EGFR 的癌症、在 EGFR 多肽上有突变的癌症和在 EGFR 信号通路下游基因中有突变的癌症；更优选为胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

本发明进一步提供一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或本发明所述的药物组合物，在制备用于治疗癌症的药物中的用途；优选所述癌症为在 EGFR 多肽上有突变的癌症，所述 EGFR 突变多肽至少包含一个选自以下的 EGFR 突变：L858R, L858R/T790M, L858R/T790M/C797S, Del19, Del19/T790M, Del19/T790M/C797S, T790M, G719X, L861Q, S768I, Exon 18 indel/E709X, Exon 19 insertion, Exon20 insertion, A763_Y764insFQEA, Exon 18–25 duplication 和 EGFR-RAD51 rearrangement；更优选为 EGFR 多肽上有突变的胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

本发明进一步提供一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或如上所述包含其的药物组合物，在制备治疗哺乳动物癌症的药物的用途；优选所述癌症为在 EGFR 多肽上有突变的癌症，所述 EGFR 突变多肽至少包含一个选自以下的 EGFR 突变：L858R, L858R/T790M, L858R/T790M/C797S, Del19, Del19/T790M, Del19/T790M/C797S, T790M, G719X, L861Q, S768I, Exon 18 indel/E709X, Exon 19 insertion, Exon20 insertion, A763_Y764insFQEA, Exon 18–25 duplication 和 EGFR-RAD51 rearrangement；更优选为 EGFR 多肽上有突变的胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

本发明进一步提供一种治疗哺乳动物癌症的方法，该方法包括对哺乳动物施用有效量的如通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或包含其的药物组合物；其中所述哺乳动物优选为人；优选所述癌症为在 EGFR 多肽上有突变的癌症，所述 EGFR 突变多肽至少包含一个选自以下的 EGFR

突变：L858R, L858R/T790M, L858R/T790M/C797S, Del19, Del19/T790M, Del19/T790M/C797S, T790M, G719X, L861Q, S768I, Exon 18 indel/E709X, Exon 19 insertion, Exon20 insertion, A763_Y764insFQEA, Exon 18–25 duplication 和 EGFR-RAD51 rearrangement; 更优选为 EGFR 多肽上有突变的胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌; 最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

本发明进一步提供一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 或本发明所述的药物组合物, 在制备用于治疗癌症的药物中的用途; 优选所述癌症为 EGFR 信号通路下游基因有突变的癌症, 所述下游基因至少包含一个选自以下的基因 Ras, B-Raf, PI3K, 其中所述的下游基因突变至少包含选自以下的突变: K-Ras G12V, K-Ras G13D, N-Ras Q61K, H-Ras G12S; B-Raf V600E, B-Raf G468A; PIK3CA H1047R, PIK3CB E633K 和 p110 γ E1021K; 更优选为 EGFR 信号通路下游基因有突变的胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌; 最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

本发明进一步提供一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 或如上所述包含其的药物组合物, 在制备治疗哺乳动物癌症的药物的用途; 优选所述癌症为 EGFR 信号通路下游基因有突变的癌症, 所述下游基因至少包含一个选自以下的基因 Ras, B-Raf, PI3K, 其中所述的下游基因突变至少包含选自以下的突变: K-Ras G12V, K-Ras G13D, N-Ras Q61K, H-Ras G12S; B-Raf V600E, B-Raf G468A; PIK3CA H1047R, PIK3CB E633K 和 p110 γ E1021K; 更优选为 EGFR 信号通路下游基因有突变的胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌; 最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

本发明进一步提供一种治疗哺乳动物癌症的方法, 该方法包括对哺乳动物施用有效量的如通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 或包含其的药物组合物; 其中所述哺乳动物优选为人; 优选所述癌症为 EGFR 信号通路下游基因有突变的癌症, 所述下游基因至少包含一个选自以下的基因 Ras, B-Raf, PI3K, 其中所述的下游基因突变至少包含选自以下的突变: K-Ras G12V, K-Ras G13D, N-Ras Q61K, H-Ras G12S; B-Raf V600E, B-Raf G468A; PIK3CA H1047R, PIK3CB E633K 和 p110 γ E1021K; 更优选为 EGFR 信号通路下游基因有突变的胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌; 最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

发明详述

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

- 5 当本发明中使用商品名时，申请人旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

- 术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，
10 最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、
15 2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、
20 2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。
25 30

- 术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 12 个碳原子，更优选包含 3 至 10 个碳原子，最优选包含 3 至 8 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。
35

术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至

20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ （其中 m 是整数 0 至 2）的杂原子，但不包括 -O-O-、-O-S- 或 -S-S- 的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子，其中 1~4 个是杂原子；更优选环烷基环包含 3 至 10 个环原子。单环杂环基的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代
5 吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

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

术语“键”指用 “—” 表示的共价键。

术语“羟基”指 -OH 基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

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

术语“药学上可接受的盐”是指本发明抗体-药物偶联物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性，本发明的抗体-药物偶联物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐，药学上可接受的盐的非限制性实例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、
25 甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

术语“溶剂化合物”指本发明的抗体-药物偶联物与一种或多种溶剂分子形成可药用的溶剂化合物，溶剂分子的非限制性实例包括水、乙醇、乙腈、异丙醇、DMSO、乙酸乙酯。

术语抗体-药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC)，指单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连。
30

术语“抗原或受体”指存在于目标细胞上可供配体识别和结合目标细胞。本发明中优选在增生性疾病，例如癌症的靶细胞和/或组织上表达的细胞表面抗原或受体。

本发明所述的“抗体”是指表现出所需生物学活性的任何形式的抗体。因此，
35 它以最广义使用，具体地说，包括但不限于全长抗体，抗体结合片段或衍生物。抗体的来源包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体（例如双特异

性抗体)。

术语“全长抗体”是指包含 4 条多肽链即 2 条重链和 2 条轻链通过二硫键相互交联形成多聚体的免疫球蛋白分子(例如 IgM)。每条重链包含重链可变区(简称 VH)和重链恒定区,重链恒定区包含 3 个结构域:CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含轻链可变区(简称 VL)和轻链恒定区,轻链恒定区包含 1 个结构域(CL1)。VH 区和 VL 区可进一步分为高变区,术语为互补决定区(CDR),各互补决定区之间穿插着更加保守的结构域,称为框架区(FR)。

术语“抗原结合片段或衍生物”包括任何一种自然发生的,酶催化获得的,合成的,或是通过基因工程得到的可与抗原特异性结合形成复合物的多肽或糖蛋白;通常包括亲本抗体的至少部分抗原结合区或可变区(例如一个或多个 CDR),其保留亲本抗体的至少某些结合特异性。“抗体结合片段或衍生物”可能由抗体衍生而来,例如通过适宜的标准技术包括蛋白水解或重组基因工程技术(包括对表达抗体可变区和部分恒定区的 DNA 进行操作和表达)对抗体全长进行改造而得。

“抗原结合片段或衍生物”包括但不限于:(i) Fab 片段;(ii) F(ab')₂ 片段;(iii) Fd 片段;(iv) Fv 片段;(v) 单链 Fv(scFv);(vi) dAb 片段;和(vii)模拟抗体高变区氨基酸残基的最小识别单元(如一个分离的互补决定区(CDR))。其它工程分子如双价抗体、三价抗体、四价抗体和微抗体也在“抗原结合片段或衍生物”范围内。

术语“EGFR”根据本发明尤其是指人表皮生长因子受体 1,也被称为 ErbB-1 或 HER1。EGFR 是包含细胞外配体结合结构域,膜-跨结构域和细胞内激酶结构域的受体酪氨酸激酶。结合其配体(例如表皮生长因子(EGF)及转化生长因子 α (TGF α))之后,EGFR 形成同源二聚体或与其他 ErbB 受体形成异源二聚体,和其激酶功能活化,导致细胞内结构域的几个酪氨酸的自磷酸化。抗-EGFR 抗体是能特异性结合 EGFR 的抗体。在特定实施方式中,抗-EGFR 抗体能干扰或抑制 EGFR 的活化,例如通过预防配体结合和/或受体二聚化。EGFR 活化后可将信号传递至下游效应因子,包括 PI3-K, RAS-RAF-MAPK P44/P42 和蛋白激酶 C 信号通路,最终可把信号传递至细胞核,调节细胞增殖。

本发明所述的抗体优选为针对靶细胞上细胞表面抗原的特异性抗体,非限制性实施例为尼妥珠单抗(Nimotuzumab,商品名泰欣生),是一个以表皮生长因子受体(EGFR)为靶点的单抗药物,可用于治疗恶性肿瘤的人源化单克隆抗体。EGFR 在多种实体瘤中过度表达,如头颈癌、肺癌、结直肠癌中,都存在 EGFR 过度表达现象。

术语“Ras 基因”是指人 Ras 基因家族,该家族包括 3 种功能性基因,即 H-ras、K-ras 和 N-ras 基因(Adjei, 2001, J. Nat. Cancer Instit. 93:1062-1073),均含有 1 个 5' 非编码外显子和 4 个编码外显子,编码的产物相对分子质量为均 21 000 的 G 蛋白单体,这些蛋白质具有三磷酸鸟嘌呤结合位点,在许多各种细胞内信号传递通路中起着重要作用。

术语“Raf 基因”是指 Raf 家族，包括三种细胞同系物，被分别称作 A-raf、B-raf 和 C-raf (也被称为 raf-1)。该基因编码高度保守的丝氨酸-苏氨酸-特异的蛋白质激酶，是 Ras 的效应因子之一，在调节细胞增殖的信号转导过程中起重要的调节作用。其中，B-Raf 具有如基因登记号 No. NP_004324 所示的完整氨基酸序列。

术语“PI3K 基因”是指磷脂酰肌醇-3-激酶基因 (phosphoinositide-3-kinase, 简称 PI3K, 也称为磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶), 属于原癌基因, 在本发明中, “PI3K”包括 PI3K 家族的所有成员, 所述 PI3K 家族包括 IA 类(例如 PI3K α 、 β 和 δ), IB 类(例如 PI3K γ)、II 类(例如 PI3K α 、 β 和 γ)和 III 类(例如 Vps34 酵母同源物)。

术语“细胞毒性药物”是指在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞, 但是由于缺乏特异性, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 也会导致正常细胞的凋亡, 导致严重的副作用。

术语“接头单元”在本发明中为 L1 和 L2, 指一端与抗体共价连接而另一端与细胞毒性药物相连的化学结构片段或键。

术语“载药量”是指分子中每个配体上加载的细胞毒性药物平均数量, 也可以表示为药物量和抗体量的比值, 药物载量的范围可以是每个配体 (Pc) 连接 1-8 个细胞毒性药物, 在本发明的实施方式中, 载药量表示为 y, 可用常规方法如 UV/可见光光谱法, 质谱, ELISA 试验和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个 ADC 分子的药物品均数量。

在本发明中, y 可能受连接位点数量的限制。本发明的一个实施方式中, 细胞毒性药物通过接头单元偶联在配体的 N 端氨基和/或赖氨酸残基的 ϵ -氨基上, 一般地, 偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制抗体细胞毒性药物偶联物的载量, 包括:

- (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比,
- (2) 控制反应时间和温度,
- (3) 选择不同的反应试剂。

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

术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物, 也可称为辅料。如片剂中的黏合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂; 半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分; 液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、

渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持

5 “干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射

10 液或微乳注入患者的血流中。或者，最好按可保持本发明化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的实例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌肉和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注

15 射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液，例如 1,3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的，可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

20 附图说明

图 1: 食蟹猴单次静脉注射 5 mg/kg 的尼妥珠单抗 (mAb001) 和尼妥珠单抗的 IgG1-YTE 变体 (mAb002) 后，两个剂量组动物平均药代动力学参数。

图 2: 比较本发明 ADC-9 相对于 ADC-8 和裸抗 mAb002 在裸鼠肺癌移植瘤 HCC827 模型上的体内药效。

25

具体实施方式

以下结合实施例进一步描述本发明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

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

30 剂。

实施例

化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或/和质谱(MS)来确定的。NMR 位移(δ)以 10^{-6} (ppm)的单位给出。NMR 的测定是用 Bruker AVANCE-400 核磁仪，测定溶剂为氘代二甲基亚砷(DMSO- d_6)，氘代氯仿($CDCl_3$)，氘代甲醇(CD_3OD)，内标为四

35 甲基硅烷(TMS)。

MS 的测定用 FINNIGAN LCQAd (ESI)质谱仪(生产商: Thermo, 型号: Finnigan

LCQ advantage MAX)。

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

手性 HPLC 分析测定使用 LC-10A vp (Shimadzu) 或者 SFC-analytical (Berger Instruments Inc.)。

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

柱层析一般使用烟台黄海硅胶 200~300 目硅胶为载体。

手性制备柱层析使用 Prep Star SD-1 (Varian Instruments Inc.) 或 SFC-multigram (Berger Instruments Inc.)。

激酶平均抑制率及 IC₅₀ 值的测定用 NovoStar 酶标仪(德国 BMG 公司)。

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

实施例若无特殊说明, 反应能够均在氩气氛或氮气氛下进行。

氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氩气或氮气气球。

氢气气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氢气气球。

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

氢化反应通常抽真空, 充入氢气, 反复操作 3 次。

微波反应使用 CEM Discover-S 908860 型微波反应器。

实施例若无特殊说明, 溶液是指水溶液。

实施例若无特殊说明, 反应的温度为室温, 为 20℃~30℃。

实施例中 pH=6.5 的 PBS 缓冲液的配制: 取 KH₂PO₄ 8.5g, K₂HPO₄·3H₂O 8.56g, NaCl 5.85g, EDTA 1.5g 置于瓶中, 定容至 2L, 超声波使其全部溶解, 摇匀即得。

实施例中 pH=4.5 的乙酸/乙酸钠缓冲液的配制: 取 9 g 无水乙酸钠置于瓶中, 加入纯化水, 定容至 2L, 摇匀后, 加入醋酸钠 4.9 mL, 摇匀即得。

实施例中磷酸盐缓冲液(pH=7.0)的配制: 0.2M 的 Na₂HPO₄ 61mL 中加入 0.2M 的 NaH₂PO₄ 39mL 摇匀得 0.2M pH=7 的缓冲液。

实施例中的反应进程的监测采用薄层色谱法(TLC), 反应所使用的展开剂的体系有: A: 二氯甲烷和甲醇体系, B: 正己烷和乙酸乙酯体系, C: 石油醚和乙酸乙酯体系, D: 丙酮, 溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节。

纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂体系包括:

A: 二氯甲烷和甲醇体系, B: 正己烷和乙酸乙酯体系, C: 二氯甲烷和丙酮体系, 溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节, 也可以加入少量的三乙胺和醋

酸等碱性或酸性试剂进行调节。

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

- 5 本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1、mAb001 抗体的构建和表达

- 10 mAb001 抗体，为尼妥珠单抗 (Nimotuzumab, EGFR 抗体)，可以和 EGFR 靶标特异性结合。可按抗体常规方法进行制备：如可进行载体构建后，转染真核细胞如 HEK293 细胞 (Life Technologies Cat. No. 11625019)，纯化表达。

序列如下：

mAb001 的轻链氨基酸序列：

- 15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSQNIVHSNGNTYLDWYQQTPGKAPKLLIY
KVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCFQYSHVPWTFGQGTKL
QITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG
EC SEQ ID NO: 1;

20

mAb001 的重链氨基酸序列：

- QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIYWVRQAPGQGLEWIGGINP
TSGGSNFNEKFKTRVTITADESSTAYMELSSLRSEDATFYFCTRQGLWFDSDGR
GFDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
25 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSV
30 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 2。

其 CDR 区序列如下：

- LCDR1: RSSQNIVHSNGNTYLD SEQ ID NO:7;
LCDR2: KVSNRFS SEQ ID NO:8;
35 LCDR3: FQYSHVPWT SEQ ID NO:9;
HCDR1: NYYIY SEQ ID NO: 10;
HCDR2: GINPTSGGSNFNEKFKT SEQ ID NO: 11;
HCDR3: QGLWFDSDGRGFDF SEQ ID NO: 12。

实施例 2、mAb002 抗体的构建和表达

mAb002 抗体为尼妥珠单抗通过点突变获得的尼妥珠单抗修饰 IgG1-YTE 变体。

- 5 设计引物 PCR 搭建抗体 VH/VK 基因片段，再与表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组，构建抗体全长表达载体 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。质粒原始形式为 IgG1，通过点突变获得 IgG1-YTE 抗体形式即 M258Y/S260T/T262E(YTE)三个位点突变。最终 mAb002 抗体序列如 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示。质粒经过测序验证后通过领域内熟知的方法
- 10 提取并进行 293 细胞瞬转表达获得含有目的抗体蛋白的培养上清供分离纯化。

mAb002 的抗体序列：

mAb002 轻链氨基酸序列：

- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIVHSNGNTYLDWYQQTPGKAPKLLIY
KVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCFQYSHVPWTFGQGTKL
15 QITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC SEQ ID NO: 3;

mAb002 重链氨基酸序列：

- 20 QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIYWVRQAPGQGLEWIGGINP
TSGGSNFKNEKFKTRVTITADESSTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQGLWFDSDGR
GFDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDV
25 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 4。

- 30 注：双下划线即代表 YTE 突变位点。

在实施例中设计的轻重链 DNA 序列如下：

mAb002 轻链 DNA 序列：

- ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTCTTAAGGGTGTC
CAGTGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCTTCTGTCTGCCTCTGTG
35 GGCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGTCTTCTCAGAACATCGTTCACTC
CAACGGCAACACCTACCTGGATTGGTATCAGCAGACCCCCGAAAGGCCC
CCAAGCTGCTTATCTACAAGGTGTCTAACCGATTTTCTGGAGTGCCCTCTC
GGTTCTCTGGCTCTGGGTCCGGCACCGACTTCACCTTCACCATCAGCTCTC
TGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCTTCCAGTACTCTCACGTG

CCTTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTCCAAATAACCCGGACCGTGGC
TGCCCCATCAGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCTGACGAGCAGCTGAAGTCTGG
CACCGCATCAGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCAA
AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAATTCACAGGA
5 GTCAGTGACCGAGCAAGACTCTAAGGACTCTACCTACTCTCTTTCTTCTAC
ACTTACCTTGTCTAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCG
AGGTTACCCACCAGGGCCTGTCTTCTCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGG
GGTGAATGCTGA SEQ ID NO: 5;

10 注：下划线部分为信号肽

mAb002 重链 DNA 序列：

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGCGATTCTTAAGGGTGTCC
AGTGCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGG
CTCTTCTGTGAAAGTCTCCTGCAAAGCCTCAGGCTATACCTTCACCAACTA
15 CTACATCTACTGGGTGCGGCAGGCTCCCGGGCAGGGCTTGGAGTGGATCG
GCGGCATCAACCCACCTCTGGCGGCTCTAACTTCAACGAGAAGTTCAAA
ACACGGGTGACCATCACCGCCGACGAGTCTTCTACAACCGCCTACATGGA
GCTGTCTAGCCTGCGGTCTGAGGACACCGCCTTCTACTTCTGCACAAGACA
GGGCTGTGGTTCGACTCTGACGGACGGGGCTTCGACTTCTGGGGCCAGG
20 GCACCACCGTGACCGTGTCTTCTGCTTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAATC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTC
AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
25 GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCC
ACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCCAAAACCCAAGGACACCCTCTACATCACCCGGGAGCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
30 TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACC
AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA
35 ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
40 CGGGTAAATGA SEQ ID NO: 6。

注：下划线部分为信号肽

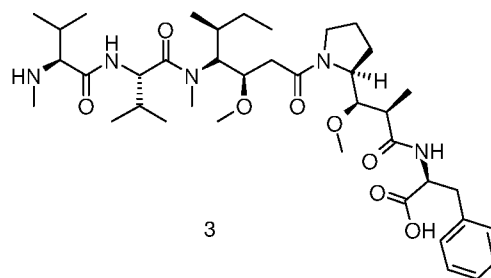
mAb002 抗体纯化分析：

将上述细胞培养上清高速离心去除杂质后上 Protein A 柱亲和层析。用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线。用 100mM 乙酸钠 pH3.0 洗脱目的蛋白，用 1M Tris-HCl 中和。洗脱样品适当浓缩后进一步利用 PBS 平衡好的凝胶层析柱 Superdex200 (GE) 进行分子筛提纯，合并收集抗体单体所在吸收峰样品。通过领域内熟知的超滤方法可以对样品进行浓缩或者缓冲液置换，获得最终合适浓度的样品。

10

实施例 3

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4R,5S)-4-((S)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸



15

本实施例化合物采用专利申请“WO2005081711”公开的方法制备而得。

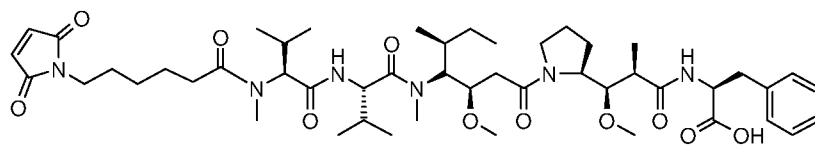
MS m/z (ESI): 732.8[M+1]

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.30-7.19 (m, 5H), 4.71-4.69 (m, 2H), 4.16-4.15 (m, 1H), 4.07-4.06 (m, 1H), 3.86-3.84 (m, 1H), 3.70-3.66 (m, 3H), 3.52-3.48 (m, 1H), 3.41-3.40 (m, 1H), 3.34 (s, 4H), 3.28 (s, 1H), 3.27-3.26 (m, 1H), 3.22 (s, 2H), 3.13 (s, 1H), 2.95-2.88 (m, 2H), 2.67-2.65 (m, 3H), 2.47-2.45 (m, 2H), 2.33-2.31 (m, 1H), 2.19-2.18 (m, 2H), 2.08-2.05 (m, 1H), 1.89-1.86 (m, 2H), 1.78-1.76 (m, 2H), 1.57-1.52 (m, 2H), 1.43-1.38 (m, 2H), 1.30-1.261 (m, 1H), 1.21-1.19 (dd, 2H), 1.15-1.11 (m, 3H), 1.07-0.97 (m, 13H), 0.88-0.85 (m, 3H)。

25

实施例 4

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4R,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-N,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸



4

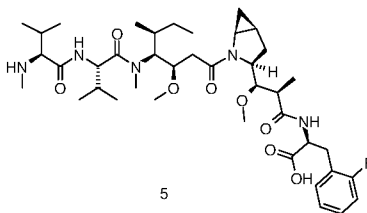
本实施例化合物采用专利申请“WO2005081711”公开的方法制备而得。

MS m/z (ESI): 925.8[M+1]

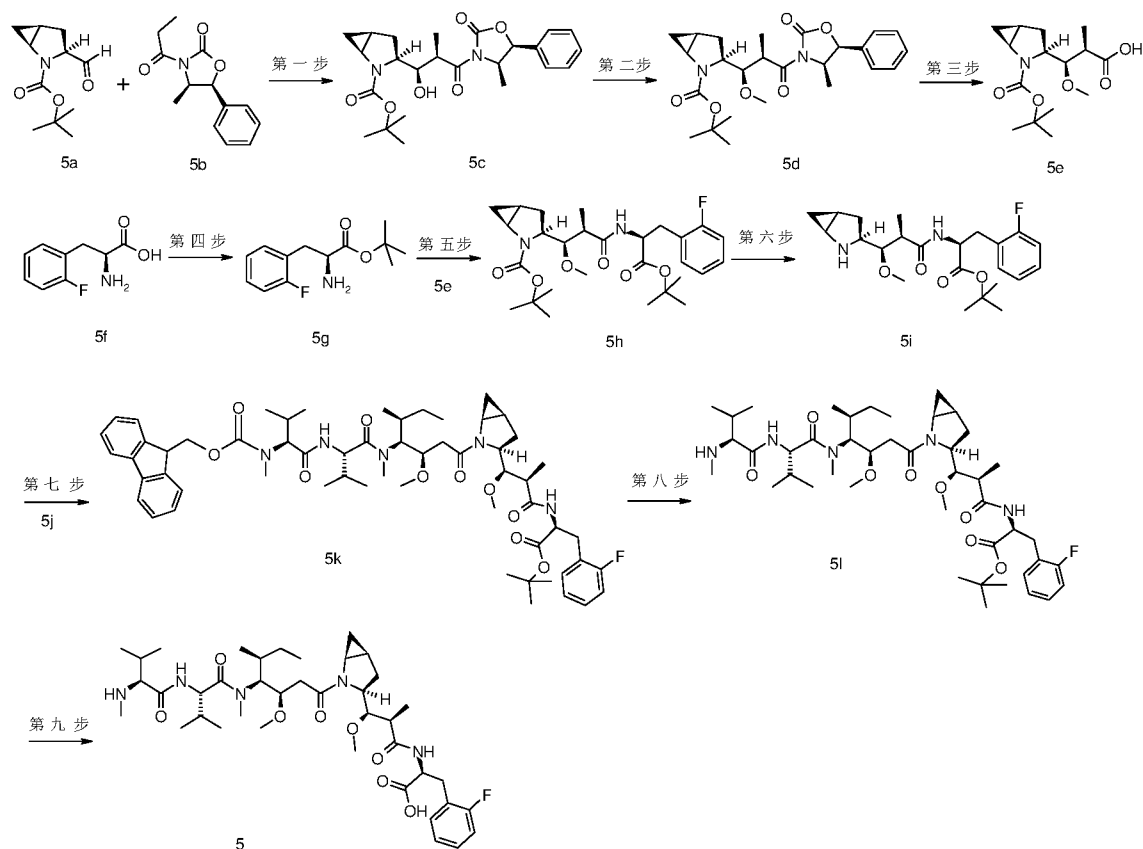
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.54-8.51 (m, 1H), 8.35-8.34 (m, 1H), 8.13-8.11 (m, 1H),
 5 7.22-7.19 (m, 5H), 7.00-6.99 (m, 2H), 4.73-4.68 (m, 1H), 4.62-4.58 (m, 2H), 4.45-4.40
 (m, 1H), 3.98-3.94 (m, 2H), 3.74-3.72 (m, 1H), 3.62-3.59 (m, 1H), 3.45-3.43 (m, 1H),
 3.38-3.35 (m, 2H), 3.27-3.26 (m, 1H), 3.23 (s, 1H), 3.18-3.14 (m, 4H), 3.05-3.03 (m,
 2H), 2.96-2.94 (m, 1H), 2.90-2.89 (m, 1H), 2.83-2.81 (m, 3H), 2.35-2.28 (m, 2H),
 2.24-2.19 (m, 2H), 2.00-1.98 (m, 2H), 1.78-1.72 (m, 2H), 1.51-1.43 (m, 5H), 1.25-1.21
 10 (m, 11H), 0.92-0.70 (m, 18H)。

实施例 5

(S)-2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲基氨基)
 15 (基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基
 -2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸



5



第一步

(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **5c**

- 5 将原料(4*R*,5*S*)-4-甲基-5-苯基-3-丙酰基噁唑烷酮 **5b** (1.96 g, 9.26 mmol, 采用公知的方法“*Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(50), 15512-15520”制备而得)溶于 25 mL 二氯甲烷中, 氩气氛下, 降温至 0℃。反应液于 0℃下滴加三乙胺(1.49 mL, 10.93 mmol), 再滴加三氟甲磺酸二丁硼(9.7 mL, 9.72 mmol), 于 0℃下搅拌 50 分钟, 干冰丙酮浴下将反应液降温至-75℃, 加入(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-甲酰基-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **5a** (2.16 g, 9.26 mmol, 采用专利申请“US20100249190”公开的方法制备而得)溶于 7 mL 二氯甲烷的溶液, 于-75℃下搅拌 1.5 小时, 于 0℃搅拌 2 小时, 于室温搅拌 1 小时。反应结束后, 加入 36 mL 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)和甲醇(V/V=1:3)的混合液。于 0℃下加入 36 mL 甲醇和双氧水(30%) (V/V=2:1)的混合液, 于室温搅拌 1 小时。减压浓缩除去有机相, 加入少量水, 用乙醚(50 mL×3)萃取, 依次用 5%碳酸氢钠溶液, 饱和氯化钠溶液(150 mL)洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物, 得标题产物 **5c** (2.4 g, 白色泡沫状固体), 产率 58.5%。
- 10 15

MS m/z (ESI): 345.1 [M-100+1]

第二步

- 20 (1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **5d**

将原料 **5c** (1.4 g, 3.15 mmol)溶于 20 mL 二氯甲烷, 加入 1.4 g 碾碎的分子筛, 氩气氛下, 于 0℃ 下加入 1,8-双二甲氨基萘(1.75 g, 8.19 mmol), 三甲基氧鎓四氟硼酸盐(1.16 g, 7.87 mmol), 反应避光, 于室温搅拌 40 小时。反应结束后, 过滤, 滤饼用二氯甲烷洗涤, 滤液用饱和氯化铵溶液(50 mL×4)洗去过量 1,8-双二甲氨基萘, 再用饱和氯化钠溶液(120 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物, 得到标题产物 **5d** (400 mg, 白色固体), 产率 27.8%。

MS m/z (ESI): 459.4 [M+1]。

第三步

10 (2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **5e**

将原料 **5d** (400 mg, 0.87 mmol)溶于 24 mL 四氢呋喃, 氩气氛下, 降温至 0℃, 缓慢滴加 30%的双氧水(0.34 mL/0.38 g, 3.31 mmol), 再加入一水合氢氧化锂(62 mg, 1.48 mmol), 反应体系于室温反应 20 小时。反应结束后, 向反应液中加入亚硫酸钠固体(440 mg, 3.48 mmol), 于室温搅拌 1 小时, 加入 10 mL 水, 减压浓缩掉有机相, 所得残余物用二氯甲烷萃取(40 mL×2)。水相在冰浴下滴加 2*N* 盐酸至反应液 pH 为 3~4, 用乙酸乙酯萃取(25 mL×3), 乙酸乙酯层依次用水(50 mL), 饱和氯化钠溶液(50 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得标题产物 **5e** (230 mg, 无色液体), 收率 88.0%。

20 MS m/z (ESI): 200.1 [M-100+1]。

第四步

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氟苯基)丙酸 **5g**

将原料((*S*)-2-氨基-3-(2-氟苯基)丙酸 **5f** (400 mg, 2.18 mmol, 采用公知的方法 “*Advanced Synthesis & Catalysis*, 2012, 354(17), 3327-3332”制备而得)溶于 10 mL 乙酸叔丁酯, 加入高氯酸(300 mg(70%), 3.3 mmol), 于室温下搅拌 16 小时。反应完毕后加入 6 mL 水, 分液, 有机相用饱和碳酸氢钠溶液(5 mL)洗涤。水相用饱和碳酸氢钠溶液调节至 pH=8, 二氯甲烷(5 mL×3)萃取, 合并有机相, 依次用水(3 mL), 饱和氯化钠溶液(5 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得粗品标题产物 **5g** (390 mg, 黄色油状物), 产品不经纯化直接进行下一步反应。

30 第五步

(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙基-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **5h**

将原料 **5e** (100 mg, 0.334 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=5:1)混合溶剂中, 加入反应物粗品 **5g** (80 mg, 0.334 mmol)。再加入 *N,N*-二异丙基乙基胺(0.29 mL, 1.67 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(152.3 mg, 0.40 mmol)。反应体系在氩气氛下, 于室温搅拌 1 小时。反应结束后,

加 10 mL 水搅拌，分层，二氯甲烷层用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩。用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物 **5h** (173 mg，无色液体)，收率 99.5%。

MS m/z (ESI): 521.2 [M+1]。

5

第六步

(S)-叔丁酯 2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **5i**

将原料 **5h** (173 mg, 0.33 mmol)溶于 2 mL 二氧六环中，加入 5.6M 的氯化氢二氧六环溶液(0.21 mL, 1.16 mmol)，氩气氛下，于室温搅拌 1 小时，置于 0℃冰箱内 12 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，加入 5 mL 二氯甲烷稀释，加入 10 mL 饱和碳酸氢钠溶液，搅拌 10 分钟。体系分层，水层用二氯甲烷萃取(5 mL×3)。合并二氯甲烷层，用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩，得到粗品标题产品 **5i** (77 mg，黄色液体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

15 MS m/z (ESI): 421.2 [M+1]。

第七步

(S)-叔丁酯 2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-仲丁基)-1-(9H-茛-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)

20

丙酸 **5k**

将粗品 **5i** (77 mg, 0.183 mmol)，(5S,8S,11S,12R)-11-((S)-仲丁基)-1-(9H-茛-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **5j** (116.8 mg, 0.183 mmol，采用专利申请“WO 2013072813”公开的方法制备而得)溶于 6 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=5:1)混合溶剂中，加入 N,N-二异丙基乙基胺(0.16 mL, 0.915 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(84 mg, 0.22 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 1 小时。反应结束后，加入 10 mL 水搅拌，分层。二氯甲烷层用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩。用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得到标题产品 **5k** (190.5 mg，黄色粘稠物)，收率 100%。

30 MS m/z (ESI): 1040.6 [M+1]。

第八步

(S)-叔丁酯 2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **5l**

35

将原料 **5k** (190.5 mg, 0.183 mmol)溶于 1.5 mL 二氯甲烷中，加入 2 mL 二乙胺。反应体系在氩气氛下，于室温搅拌 3 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，得

到粗品标题产品 **5l** (150 mg, 黄色粘稠物), 产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 818.5 [M+1]。

第九步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **5**

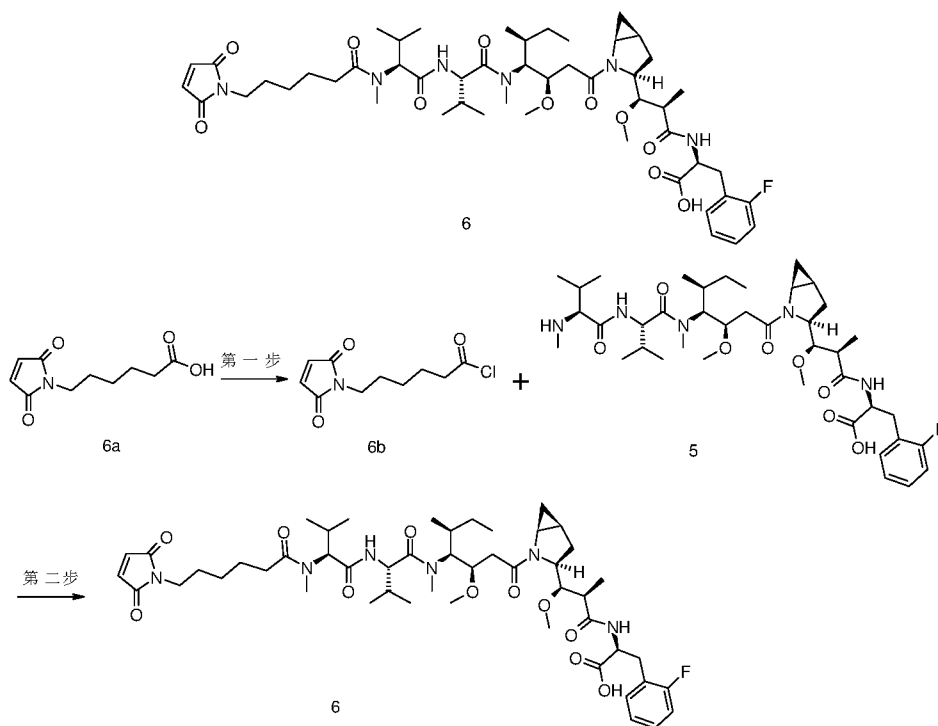
将粗品 **5l** (150 mg, 0.183 mmol)溶于 1 mL 二氧六环中, 加入 5.6*M* 的氯化氢二氧六环溶液 3 mL, 氩气氛下, 于室温搅拌 12 小时。反应结束后, 将反应液减压浓缩, 用乙醚带旋溶剂。所得残余物用高效液相色谱法纯化得标题产品 **5** (28 mg, 白色粉末固体), 收率 20%。

MS m/z (ESI): 762.7 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.38-7.18(m, 2H), 7.13-7.01(m, 2H), 4.80-4.67(m, 2H), 4.30-4.15(m, 1H), 4.13-4.01(m, 1H), 3.96-3.83(m, 2H), 3.75-3.60(m, 2H), 3.42-3.11(m, 9H), 3.06-2.95(m, 1H), 2.70-2.58(m, 4H), 2.28-2.01 (m, 4H), 1.88-1.70(m, 3H), 1.57-1.25 (m, 4H), 1.22-0.95(m, 18H), 0.92-0.80(m, 4H), 0.78-0.65(m, 1H)。

实施例 6

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸



第一步

6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰氯 **6b**

在原料 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酸 **6a** (1.5 g, 7.10 mmol, 采用公知的方法“*Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56(24), 9955-9968”制备而得)中滴入一滴 *N,N*-二甲基甲酰胺, 氩气氛下, 干冰浴降温后, 缓慢滴入 15 mL 草酰氯, 滴加时剧烈搅拌, 滴完于室温反应 1 小时。反应结束后, 将反应液减压浓缩, 用二氯甲烷溶解所得残留物, 减压浓缩, 得到粗品标题产物 **6b**, 产品不经纯化直接进行下一步反应。

第二步

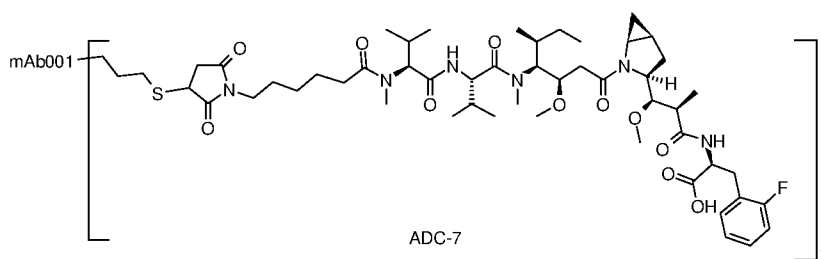
(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **6**

将原料 **5** (25 mg, 0.033 mmol)溶于 3 mL 二氯甲烷中, 加入 *N,N*-二异丙基乙基胺(0.029 mL, 0.164 mmol), 反应体系在氩气氛下, 冰浴下滴加预制的 **6b** (11.3 mg, 0.049 mmol)的二氯甲烷溶液, 于室温反应 3 小时。反应结束后, 加入 5 mL 水, 搅拌 20 分钟, 分液, 有机层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 残留物用高效液相色谱法纯化得标题产物 **6** (7 mg, 黄色粘稠物), 收率 22.4%。

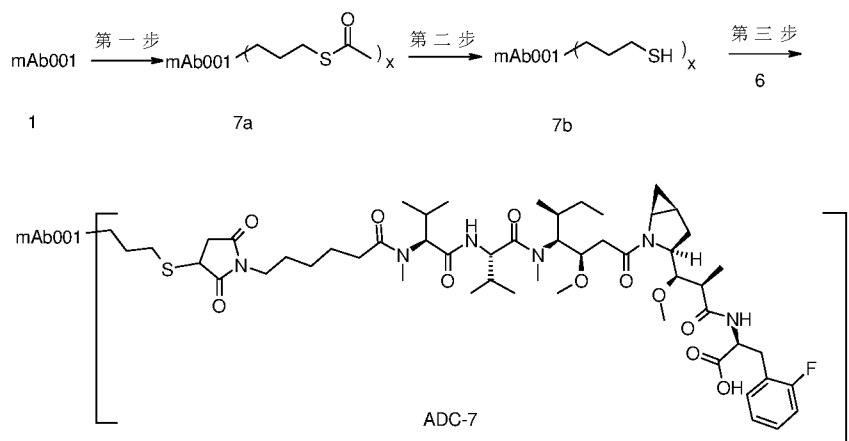
MS *m/z* (ESI): 955.4 [*M*+1]

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.36-7.30(m, 1H), 7.29-7.21(m, 1H), 7.17-7.02(m, 2H), 6.83-6.79(m, 2H), 4.81-4.71(m, 2H), 4.69-4.55 (m, 2H), 4.25-4.15(m, 1H), 4.13-4.04(m, 1H), 3.96-3.85(m, 2H), 3.70-3.61(m, 1H), 3.55-3.46(m, 3H), 3.40-3.21 (m, 4H), 3.18-3.10(m, 2H), 3.07-2.96(m, 4H), 2.67-2.56(m, 2H), 2.54-2.34(m, 3H), 2.29-2.17(m, 2H), 2.10-1.99(m, 1H), 1.89-1.57(m, 7H), 1.52-1.28(m, 6H), 1.21-1.11 (m, 4H), 1.07-0.96(m, 6H), 0.95-0.81(m, 12H), 0.80-0.69(m, 1H)。

实施例 7 ADC-7 的制备



25



第一步

将硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯(1.61 mg, 12.2 μmol), 溶解于 3.0 mL 乙腈溶液, 备用; 向含抗体 mAb001 的 pH=4.3 的乙酸/乙酸钠缓冲液(10.22 mg/ml, 30 mL, 2.04 mmol)加入上述预制的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯的乙腈溶液, 然后滴加 1.2 mL 的氰基硼氢化钠(49.86 mg, 793 μmol)的水溶液, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 2 小时。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 溶液), 除去未反应的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯以及氰基硼氢化钠, 再浓缩到浓度约为 10mg/ml, 得到标题产物 **7a** 的 PBS 缓冲溶液(约 35 mL), 直接进行下一步反应。

第二步

向 **7a** 的 PBS 缓冲溶液(35.0 mL)中加入约 0.4mL 的 2.0M 盐酸羟胺溶液, 加毕, 置于水浴振荡器, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 30 分钟, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱纯化, 得到标题产物 mAb001-丙硫醇 **7b** 的 PBS 缓冲溶液(浓度 5.38 mg/ml, 55 mL)。

第三步

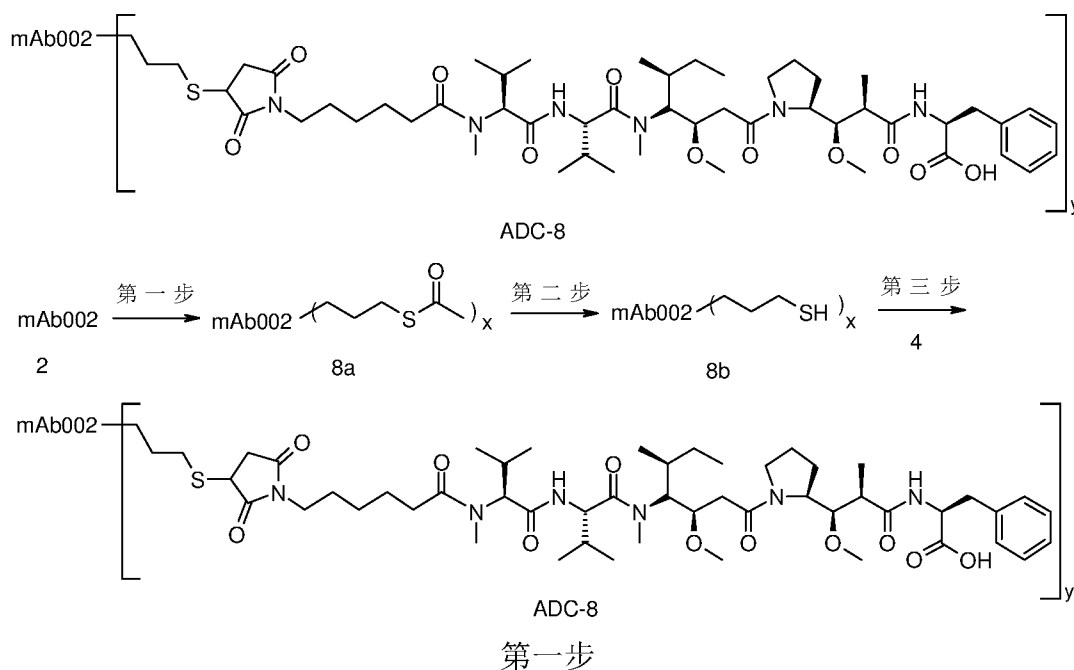
将化合物 **6** (4.32 mg, 4.52 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中, 加入 mAb001-丙硫醇 PBS 缓冲溶液 **7b** (5.38 mg/mL, 11 mL)中, 置于水浴振荡器中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 4 小时后停止反应。

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 溶液), 得到粗品标题产物 **7** 的 PBS 缓冲液(2.92 mg/mL, 20 mL), 进一步离心浓缩至 5.5 mL 左右, 再用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 溶液), 得到标题结构式产物 **7** 的 PBS 缓冲液(4.25 mg/mL, 11.6 mL), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰: 150186.98($M_{\text{Ab}}+0D$)、151374.09($M_{\text{Ab}}+1D$)、152287.22 ($M_{\text{Ab}}+2D$)、153353.26($M_{\text{Ab}}+3D$)、154501.80($M_{\text{Ab}}+4D$)、155575.57($M_{\text{Ab}}+5D$)。

平均值: $y=2.2$ 。

实施例 8 ADC-8 的制备



将硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯(0.7 mg, 5.3 μmol), 溶解于 0.9 mL 乙腈溶液, 备用; 向含抗体 mAb002 的 pH=4.3 的乙酸/乙酸钠缓冲液(10.13 mg/ml, 9.0 mL, 0.95 mmol)加入上述预制的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯的乙腈溶液, 然后滴加 1.0 mL 的氰基硼氢化钠(14.1 mg, 224 μmol)的水溶液, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 2 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得标题产物 **8a** 溶液, 浓缩到约 10mg/ml 后直接进行下一步反应。

第二步

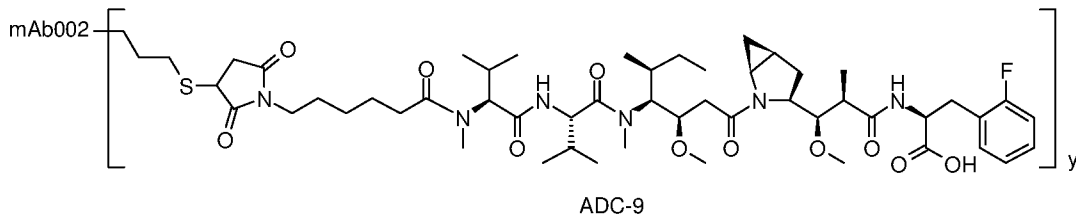
向 **8a** 溶液(10.0 mL)中加入 0.3 mL 的 2.0M 盐酸羟胺溶液, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 30 分钟后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 溶液)后得标题产物 mAb002-丙硫醇 **8b** 溶液(浓度 6.2 mg/ml, 14 mL)。

第三步

将原料 **4** (1.1 mg, 1.2 μmol)溶解于 0.3 mL 乙腈中, 加入 **8b** 溶液 (6.2 mg/mL, 3.0 mL)中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的含 0.05M 的 PBS 溶液), 在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题结构式产物 **8** 的 PBS 缓冲液(3.5 mg/mL, 4.8mL), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰: 150332.9($M_{\text{Ab}}+0D$)、1514911.2($M_{\text{Ab}}+1D$)、152374.3($M_{\text{Ab}}+2D$)、153530.1 ($M_{\text{Ab}}+3D$)、154450.7($M_{\text{Ab}}+4D$)。
平均值: $y=2.0$ 。

实施例 9 ADC-9 的制备



将原料 **6** (1.1 mg, 1.2 μ mol) 溶解于 0.3 mL 乙腈中, 加入 **8b** 溶液 (6.2 mg/mL, 3.0 mL) 中, 于 25 $^{\circ}$ C 下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化 (洗脱相: pH 为 6.5 的含 0.05M 的 PBS 溶液), 在无菌条件下通过 0.2 μ m 滤器过滤后得标题结构式产物 **9** 的 PBS 缓冲液 (3.4 mg/mL, 4.7 mL), 于 4 $^{\circ}$ C 冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰: 150336.6 ($M_{Ab}+0D$)、151530.5 ($M_{Ab}+1D$)、152436.1 ($M_{Ab}+2D$)、153625.1 ($M_{Ab}+3D$)、154607.5 ($M_{Ab}+4D$)。

平均值: $y=2.0$ 。

10 生物学评价

测试例 1: HCC827 细胞增殖实验

一、试验目的:

检测本发明样品对 HCC827 细胞增殖的抑制作用。

二、试验材料:

15 本发明样品: ADC-9

阳性对照药: ADC-8

HCC827 细胞: 中科院细胞库, 货号#TCHu153;

CCK-8: Cell Counting Kit-8, 购于 Dojindo, 货号: CK04;

FBS: Fetal Bovine Serum, 购于 Gibco, 货号: 10099-141;

20 RPMI1640: 购于 Hyclone, 货号: SH30809.01B;

VICTOR 3 多功能酶标仪 (PerkinElmer 公司)。

三、试验方法:

1. 96 孔板中, 每孔加入 100 μ l 含 5000 个 HCC827 细胞的 10%FBS 的 RPMI1640 培养基, 培养板放在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 16h。

25 2. 将样品用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基进行三倍梯度稀释, 共稀释 10 个点, 起始稀释浓度为 10 μ g/ml。

3. 将前一天铺好的 HCC827 细胞培养板从培养箱取出, 丢弃上层培养液, 加入含稀释样品的培养基 100 μ l/孔。每个浓度设置两个复孔, 同时设置不加任何药物的对照孔。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下连续培养细胞。

30 4. 72 小时后, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液显色, 放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育显色 2 小时, 在酶标仪上读取 OD₄₅₀, 经 Graphpad Prism 5 软件处理后即可得 IC₅₀。

四、试验结果：

本发明样品的生物活性由上述分析所得，计算所得的 IC_{50} 值列于下表 1：

表 1. 本发明样品对 HCC827 细胞的增殖抑制的 IC_{50}

样品编号	IC_{50} (HCC827)/ng/ml
ADC-9	92
ADC-8	148.7

结论：本发明优选样品对 HCC827 细胞具有明显的增殖抑制活性。

5

测试例 2: Lovo 细胞增殖实验

一、试验目的：

检测本发明样品对 Lovo 细胞增殖的抑制作用。

二、试验材料：

10 本发明样品：ADC-9

阳性对照药：ADC-8

Lovo 细胞：中科院细胞库，货号#TCHu82；

CCK-8: Cell Counting Kit-8，购于 Dojindo，货号：CK04；

FBS: Fetal Bovine Serum，购于 Gibco，货号：10099-141；

15 DMEM/F12: 购于 Hyclone，货号：SH30023.01；

VICTOR 3 多功能酶标仪(PerkinElmer 公司)。

三、试验方法：

1. 96 孔板中，每孔加入 100 μ l 含 4000 个 Lovo 细胞的 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基，培养板放在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 16h。

20 2. 将样品用含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基进行三倍梯度稀释，共稀释 10 个点，起始稀释浓度为 100 μ g/ml。

3. 将前一天铺好的 Lovo 细胞培养板从培养箱取出，丢弃上层培养液，加入含稀释样品的培养基 100 μ l/孔。每个浓度设置两个复孔，同时设置不加任何药物的对照孔。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下连续培养细胞。

25 4. 72 小时后，每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液显色，放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育显色 2 小时，在酶标仪上读取 OD₄₅₀，经 Graphpad Prism 5 软件处理后即可得 IC_{50} 。

四、试验结果：

本发明样品的生物活性由上述分析所得，计算所得的 IC_{50} 值列于下表 2：

30

表 2. 本发明样品对 Lovo 细胞的增殖抑制的 IC_{50}

样品编号	IC_{50} (Lovo)/ng/ml
ADC-9	934
ADC-8	2202

结论：本发明优选样品对 Lovo 细胞具有明显的增殖抑制活性。

测试例 3：HCC827-Del19/T790M/C797S (DTC) 细胞增殖实验

一、试验目的：

5 检测本发明样品对 HCC827-DTC 细胞增殖的抑制作用。

二、试验材料：

本发明样品：ADC-9

对照药：mAb002, AZD-9291

HCC827 细胞：中科院细胞库，货号#TCHu153；

10 HCC827-DTC 细胞：在 293T 细胞中（ATCC，CRL-3216）转染 pCDH-EGFR Del19/T790M/C797S (DTC)， Δ R8.9 和 VSVG，48 小时后收集病毒上清，0.45 μ m 滤膜过滤弃掉细胞碎片，50000g 离心 2 小时重悬，将病毒进行 10 倍浓缩。在前一天铺板的 HCC827 细胞中加入浓缩病毒，同时加入 8 μ g/ml polybrene，24 小时后更换新鲜培养基，48 小时后加入 2 μ g/ml puromycin 进行筛选，得到 HCC827-DTC 细胞。

CCK-8：Cell Counting Kit-8，购于 Dojindo，货号：CK04；

FBS：Fetal Bovine Serum，购于 Gibco，货号：10099-141；

RPMI1640：购于 Hyclone，货号：SH30809.01B；

VICTOR 3 多功能酶标仪(PerkinElmer 公司)。

20 三、试验方法：

1. 96 孔板中，每孔加入 100 μ l 含 5000 个 HCC827-DTC 细胞的 10%FBS 的 RPMI1640 培养基(puromycin 2 μ g/ml)，培养板放在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 16h。

2. 将样品用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基进行梯度稀释，共稀释 10 个点。
25 抗体和 ADC 起始稀释浓度为 10 μ g/ml (66.7nM)，进行 3 倍稀释。AZD-9291 起始稀释浓度为 2500nM，进行 4 倍稀释。

3. 将前一天铺好的 HCC827-DTC 细胞培养板从培养箱取出，丢弃上层培养液，加入含稀释样品的培养基 100 μ l/孔。每个浓度设置两个复孔，同时设置不加任何药物的对照孔。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下连续培养细胞。

30 4. 72 小时后，每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液显色，放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育显色 2 小时，在酶标仪上读取 OD₄₅₀，经 Graphpad Prism 5 软件处理后即可得 IC₅₀。

四、试验结果：

本发明样品的生物活性由上述分析所得，计算所得的 IC₅₀ 值列于下表 3：

35 表 3. 本发明样品对 HCC827-DTC 细胞的增殖抑制的 IC₅₀

样品编号	IC ₅₀ (HCC827-DTC)/nM
------	----------------------------------

ADC-9	0.22
mAb002	>66.7
AZD-9291	1856

结论：非小细胞肺癌 HCC827 细胞在表达 EGFR-DTC 基因之后，对 AZD-9291 产生明显耐药性；裸抗 mAb002 对该细胞也只有部分抑制效果。但是本发明样品 ADC-9 对耐药株 HCC827-DTC 有很强的增殖抑制活性。

5

测试例 4: H1975-L858R/T790M/C797S (LTC) 细胞增殖实验

一、试验目的：

检测本发明样品对 H1975-LTC 细胞增殖的抑制作用。

二、试验材料：

10

本发明样品：ADC-9

对照药：mAb002, AZD-9291

H1975 细胞：中科院细胞库，货号#TCHu193；

15

H1975-LTC 细胞：293T 细胞（ATCC，CRL-3216）转染 pCDH-EGFR L858R/T790M/C797S (LTC)， Δ R8.9 和 VSVG，48 小时后收集病毒上清，0.45 μ m 滤膜过滤弃掉细胞碎片，50000g 离心 2 小时重悬，将病毒进行 10 倍浓缩。在前一天铺板的 H1975 细胞中加入浓缩病毒，同时加入 8 μ g/ml polybrene，24 小时后更换新鲜培养基，48 小时后加入 2 μ g/ml puromycin 进行筛选，得到 H1975-LTC 细胞。

CCK-8：Cell Counting Kit-8，购于 Dojindo，货号：CK04；

FBS：Fetal Bovine Serum，购于 Gibco，货号：10099-141；

20

RPMI1640：购于 Hyclone，货号：SH30809.01B；

VICTOR 3 多功能酶标仪(PerkinElmer 公司)。

三、试验方法：

25

1. 96 孔板中，每孔加入 100 μ l 含 5000 个 H1975-LTC 细胞的 10%FBS 的 RPMI1640 培养基(puromycin 2 μ g/ml)，培养板放在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 16h。

2. 将样品用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基进行梯度稀释，共稀释 10 个点。抗体和 ADC 起始稀释浓度为 10 μ g/ml (66.7nM)，进行 3 倍稀释。AZD-9291 起始稀释浓度为 2500nM，进行 4 倍稀释。

30

3. 将前一天铺好的 H1975-LTC 细胞培养板从培养箱取出，丢弃上层培养液，加入含稀释样品的培养基 100 μ l/孔。每个浓度设置两个复孔，同时设置不加任何药物的对照孔。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下连续培养细胞。

4. 72 小时后，每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液显色，放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育显色 2 小时，在酶标仪上读取 OD₄₅₀，经 Graphpad Prism 5 软件处理后即可得 IC₅₀。

四、试验结果：

本发明样品的生物活性由上述分析所得，计算所得的 IC_{50} 值列于下表 4：

表 4. 本发明样品对 H1975-LTC 细胞的增殖抑制的 IC_{50}

样品编号	IC_{50} (H1975-LTC)/nM
ADC-9	5.96
mAb002	No inhibition
AZD-9291	>2500

结论：非小细胞肺癌 H1975 细胞在表达 EGFR-LTC 基因之后，对 AZD-9291 产生明显耐药性；裸抗 mAb002 对该细胞也几乎没有任何抑制效果。但是本发明样品 ADC-9 对耐药株 H1975-LTC 有很强的增殖抑制活性。

测试例5：EGFR抗体食蟹猴药代动力学测试

一、试验目的：

比较 mAb002 相对于尼妥珠单抗(mAb001)在食蟹猴体内的药代动力学变化。

二、试验材料：

本发明样品：mAb002 (尼妥珠单抗的 IgG1-YTE 变体)

阳性对照药：mAb001，尼妥珠单抗注射液，购于百泰生物，货号 0120131240

PBS: 购于生工生物，货号 PD0100

BSA: 购于 Amresco，货号 0332

Proclin300: 购于 Supelco，货号 48912-U

EGFR: 购于 Sino Biological，货号 10001-H08H

Anti-Human IgG (Fc) -过氧化物酶: 购于 Sigma，货号 A0170

人 IgG: 购于 R&D; 货号 1-001-A

酶标仪: 购于 Thermo Scientific，型号 Multiskan FC，货号 EQP-LI-030

三、试验方法：

ELISA是一个常用于生物血清样本检测药代动力学的方法。本研究采用ELISA方法检测食蟹猴血清中待测抗体的浓度。

2组食蟹猴（每组3只）分别采用恒流泵静脉推注5 mg/kg的mAb001和mAb002抗体，于给药前（0 h）及给药结束后5 min（ ± 10 s）、2 h（ ± 2 min）、4 h（ ± 5 min）、8 h（ ± 5 min）、1 d（ ± 10 min）、2 d（ ± 10 min）、3 d（ ± 10 min）、5 d（ ± 10 min）、7 d（ ± 10 min）、10 d（ ± 10 min）、13 d（ ± 10 min）、17 d（ ± 10 min）、21 d（ ± 10 min）、28 d（ ± 10 min）从下肢隐静脉采集约1 mL全血，将血液样本于室温静置1 h~2 h至充分凝结后，4℃ 4000 g离心5 分钟分离得到血清。

采用 EGFR 包被微孔板，以捕获稀释后血清样本中的待测抗体。检测抗体为 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体（针对 Fc 段）。HRP 催化 TMB 底物产生可溶性蓝色化合物，盐酸溶液终止反应，并于工作波长 450 nm、参比波长 620 nm 处检测吸光

值，OD 值的大小与样品中的待测抗体的浓度正相关。采用 SoftMax Pro v5.4.1 软件，分别对待测抗体浓度对数值（X 轴）和 OD 值（Y 轴）绘制标准曲线，并进行四参数 Logistic 模型拟合，采用权重 $1/y$ 的加权方式得到曲线参数。未知样品通过其 OD 值于标准曲线回归计算得到样品血药浓度。

5 四、实验结果：

食蟹猴单次静脉注射 5 mg/kg 的 mAb001 和 mAb002 后，两个剂量组动物平均药代动力学参数见下表 5 和图 1。

表 5

药代参数	单位	mAb002			mAb001		
		Mean	SD	% CV	Mean	SD	% CV
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	141	16.1	11.4	137	22.7	16.6
$AUC_{(0-28d)}$	$\mu\text{g}\cdot\text{day/mL}$	428	35.6	8.32	263	69.1	26.3
$T_{1/2}$	day	4.64	0.821	17.7	2.65	1.66	62.5
CI	mL/day/kg	11.7	0.936	8.02	19.9	5.67	28.4
$MRT_{(0-t)}$	day	4.28	0.268	6.26	2.51	0.840	33.4
Vss	mL/kg	52.2	5.75	11.0	50.5	17.8	35.2

10 mAb002 组与 mAb001 组平均 C_{max} 基本一致，说明进入动物体内的药量基本一致，但 mAb002 组较 mAb001 组在食蟹猴体内的药代动力学特征存在明显差异，表现为 $AUC_{(0-28d)}$ 高、末端消除半衰期长、清除率低、平均滞留时间长，说明经过突变后的抗体 mAb002 (尼妥珠单抗的 IgG1-YTE 变体) 的猴药代特性得到了显著提升。

15

测试例 6: EGFR-ADC 体内药效实验

一、试验目的：

比较本发明 ADC-9 相对于 ADC-8 和裸抗 mAb002 在裸鼠肺癌移植瘤 HCC827 模型上的体内药效。

20

二、试验材料：

本发明样品：ADC-9

ADC-8

mAb002

HCC827 细胞：中科院细胞库，货号#TCHu153；

25

受试动物：裸小鼠，SPF，16-20 g，♀，北京维通利华实验动物技术有限公司。

三、试验方法：

1 裸小鼠实验室环境适应三天，随机分成 5 组，每组 9 只。

2 肿瘤细胞移植

裸小鼠右肋部皮下接种HCC827细胞（ $5\times 10^6+50\%$ matrigel/mouse），接种后第7天，肿瘤长至 $202.07\pm 6.22\text{ mm}^3$ （d1）开始给药。

5 3 给药剂量及方法

给药途径腹腔注射（ip），一周一次，共3次，具体给药方案见表1。

4 移植瘤体积及裸小鼠体重测定

每周测定2次瘤体积，称量体重并记录数据。

5 数据统计

10 使用 Excel 统计软件：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；SEM 值以 STDEV/SQRT 计算；组间差异 P 值以 TTEST 计算。

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

相对体积（RTV）= V_T/V_0

抑瘤率(%)= $(C_{RTV}-T_{RTV})/C_{RTV}(\%)$

15 其中 V_0 、 V_T 分别为实验开始时及实验结束时的肿瘤体积。 C_{RTV} 、 T_{RTV} 分别为实验结束时的空白对照组(Blank)及实验组的相对肿瘤体积。

四、实验结果：

抑瘤效果见下表6和图2

表6

分组	剂量 每只小鼠	平均肿瘤体积（mm ³ ）		平均肿瘤体积（mm ³ ）		%抑瘤率 D34	p (vs 空白对照)
		D0	SEM	D34	SEM		
空白对照	-	201.58	7.57	1583.22	101.68	-	-
mAb002	0.1mg	202.80	5.71	1011.74	174.05	37.73%*	0.018617
ADC-8	0.03mg	201.35	6.54	807.75	173.77	48.96%**	0.004488
ADC-9	0.03mg	202.95	5.03	580.34	136.17	65.33%**	0.000121
ADC-9	0.1mg	202.79	5.07	9.69	9.69	99.4%**	0.000000

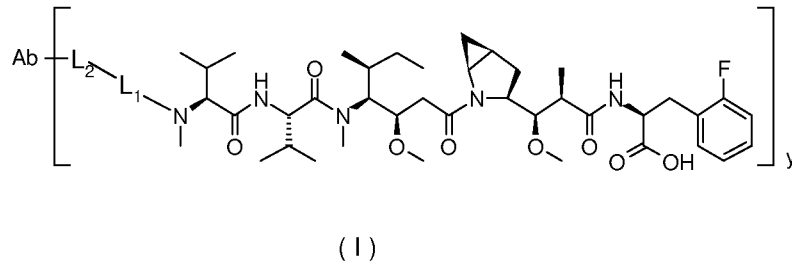
20

本次实验结果显示 mAb002 (尼妥珠单抗的 IgG1-YTE 变体，见实施例 2)，ADC-8(见实施例 8)和 ADC-9（见实施例 9）对小鼠肺癌移植瘤 HCC827 都有显著的抑瘤效果。其中 ADC-9 在同剂量(0.1mg/只)或更低剂量(0.03mg/只)下，都显示出比裸抗 mAb002 (0.1mg/只)更明显的抑瘤效果，说明 ADC-9 相比裸抗在药效上的优势。另外，不同的 ADC 在相同剂量下(0.03mg/只)进行对比，ADC-9 显示出比 ADC-8 更好的药效，在给药 34 天的抑瘤率分别为 65.33% vs. 48.96%，说明带有毒素化合物 6 (原形为化合物 5)的 ADC 比带有毒素化合物 4 (MC-MMAF，其原形为化合物 3) 的 ADC 显示出更强的抑瘤活性。

25

权利要求书:

1. 一种通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



5 其中:

L_1 , L_2 是接头单元;

y 为 1-8, 优选 2-5;

Ab 为抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段, 所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段包含以下的 CDR 区:

- | | | |
|----|--------------------------|----------------|
| 10 | LCDR1: RSSQNIVHSNGNTYLD | SEQ ID NO:7; |
| | LCDR2: KVSNRFS | SEQ ID NO:8; |
| | LCDR3: FQYSHVPWT | SEQ ID NO:9; |
| | HCDR1: NYIY | SEQ ID NO: 10; |
| | HCDR2: GINPTSGGSNFNEKFKT | SEQ ID NO: 11; |
| 15 | HCDR3: QGLWFSDSDGRGFDF; | SEQ ID NO: 12; |
- 其中所述的 Ab 在重链上具有 M258Y/S260T/T262E(YTE)三个位点突变。

20 2. 如权利要求 1 所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其中所述的抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其片段。

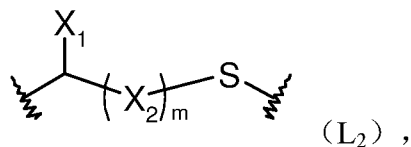
25 3. 如权利要求 1 所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其中所述人源化抗体的重链可变区进一步包含人源 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 或其变体的重链 FR 区, 优选包含人源 IgG1 的重链 FR 区, 和/或人源化抗体的轻链可变区进一步包含人源 κ 链或人源 κ 链变体的轻链 FR 区、或者人源 λ 链或人源 λ 链变体的轻链 FR 区。

30 4. 如权利要求 1 所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其中所述人源化抗体的重链包含人源 IgG1 或其变体、人源 IgG2 或其变体、人源 IgG3 或其变体或人源 IgG4 或其变体的恒定区, 优选包含人源 IgG1 或其变体的恒定区, 和/或所述人源化抗体的轻链进一步包含人源 κ 链或人源 κ 链变体的轻链恒定区、或人源 λ 链或人源 λ 链变体的轻链恒定区。

5. 如权利要求 1 所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其中抗 EGFR 抗体包括氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的轻链，和如氨基酸序列 SEQ ID NO:4 所示的重链。

5

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其中 L_2 如以下通式 (L_2) 所示:



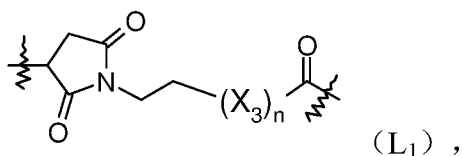
其中

10 X_1 选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基;

X₂选自烷基、环烷基和杂环基;

m 为 0-5, 优选 1-3; S 为硫原子。

7. 如权利要求 1-5 任一项所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其中 L_1 为以下通式 (L_1) 所示的化合物:

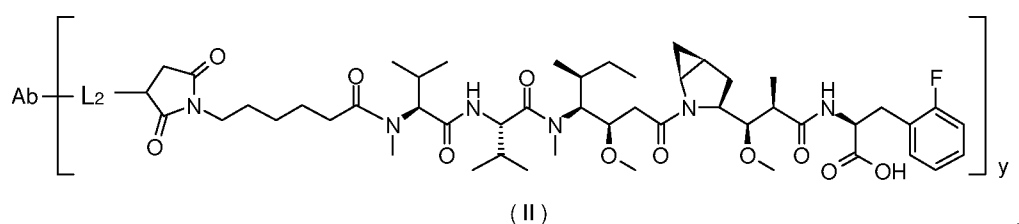


其中

X₃ 为烷基，所述的烷基任选进一步被卤素、羟基、氰基、烷基的取代基所取代；

20 n 为 0-5, 优选 1-3。

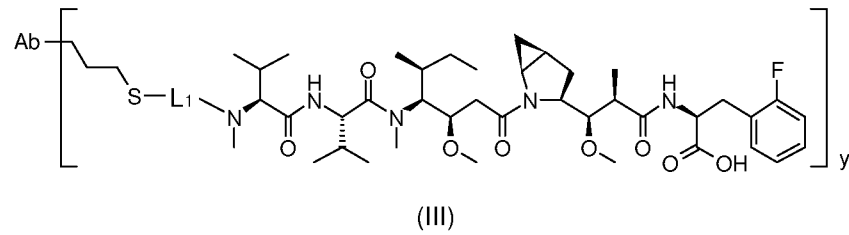
8. 如权利要求 1-5 任一项所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其选自通式(II)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



其中, Ab、L₂、y 如权利要求 1 中所定义。

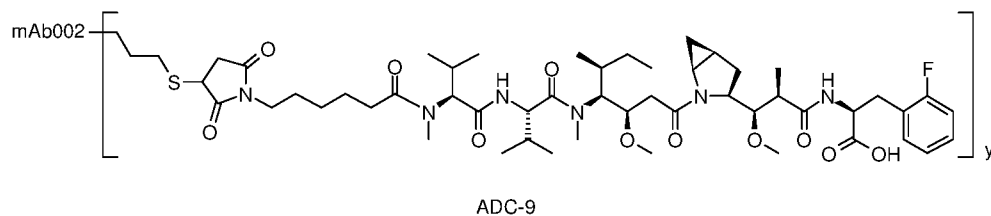
9. 如权利要求 1-5 任一项所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可

接受的盐或溶剂化合物，其选自通式(III)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



5 其中，Ab、L₁、y 如权利要求 1 中所定义。

10. 如权利要求 1-5 任一项所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为如下式所示的化合物：



10 其中，mAb002 包括氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的轻链，和如 SEQ ID NO:4 所示的重链，y 如权利要求 1 中所定义。

11. 一种 EGFR 抗体，包含序列如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 及其变体所示的 LCDR1, LCDR2, LCDR3 区，及如 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、
15 SEQ ID NO:12 及其变体所示的 HCDR1, HCDR2, HCDR3 区，其特征在于，在重链上具有 M258Y/S260T/T262E(YTE)三个位点突变；优选的，所述 EGFR 抗体包括氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的轻链，和如 SEQ ID NO:4 所示的重链。

12. 一种药物组合物，其包含如权利要求 1 所述的通式(I)所示的抗体-药物偶
20 联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，和一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

13. 如权利要求 1 所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的
25 盐或溶剂化合物，或如权利要求 12 所述的药物组合物，在制备用于治疗癌症的药物中的用途；所述癌症包括高表达 EGFR 的癌症、在 EGFR 多肽上有突变的癌症和在 EGFR 信号通路下游基因中有突变的癌症；所述癌症优选为胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；更优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

14. 一种治疗癌症的方法，包括给予所需患者治疗有效量的根据权利要求 1 所述的通式(I)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或如权利要求 12 所述的药物组合物；所述癌症优选为高表达 EGFR 的癌症、在 EGFR 多肽上有突变的癌症和在 EGFR 信号通路下游基因中有突变的癌症；更优选为胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌或结直肠癌、头颈癌。

15. 一种如权利要求 14 所述的方法，其中所述的癌症优选为在 EGFR 多肽上有突变的癌症，所述 EGFR 突变多肽至少包含一个选自以下的 EGFR 突变：L858R, L858R/T790M, L858R/T790M/C797S, Del19, Del19/T790M, Del19/T790M/C797S, T790M, G719X, L861Q, S768I, Exon 18 indel/E709X, Exon 19 insertion, Exon20 insertion, A763_Y764insFQEA, Exon 18-25 duplication 和 EGFR-RAD51 rearrangement；更优选为 EGFR 多肽上有突变的胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

16. 一种如权利要求 14 所述的方法，其中所述的癌症优选为 EGFR 信号通路下游基因有突变的癌症，所述下游基因至少包含一个选自以下的基因 Ras, B-Raf, PI3K，其中所述的下游基因突变至少包含选自以下的突变：K-Ras G12V, K-Ras G13D, N-Ras Q61K, H-Ras G12S; B-Raf V600E, B-Raf G468A; PIK3CA H1047R, PIK3CB E633K 和 p110 γ E1021K；更优选为 EGFR 信号通路下游基因有突变的胃癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌；最优选为肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌或头颈癌。

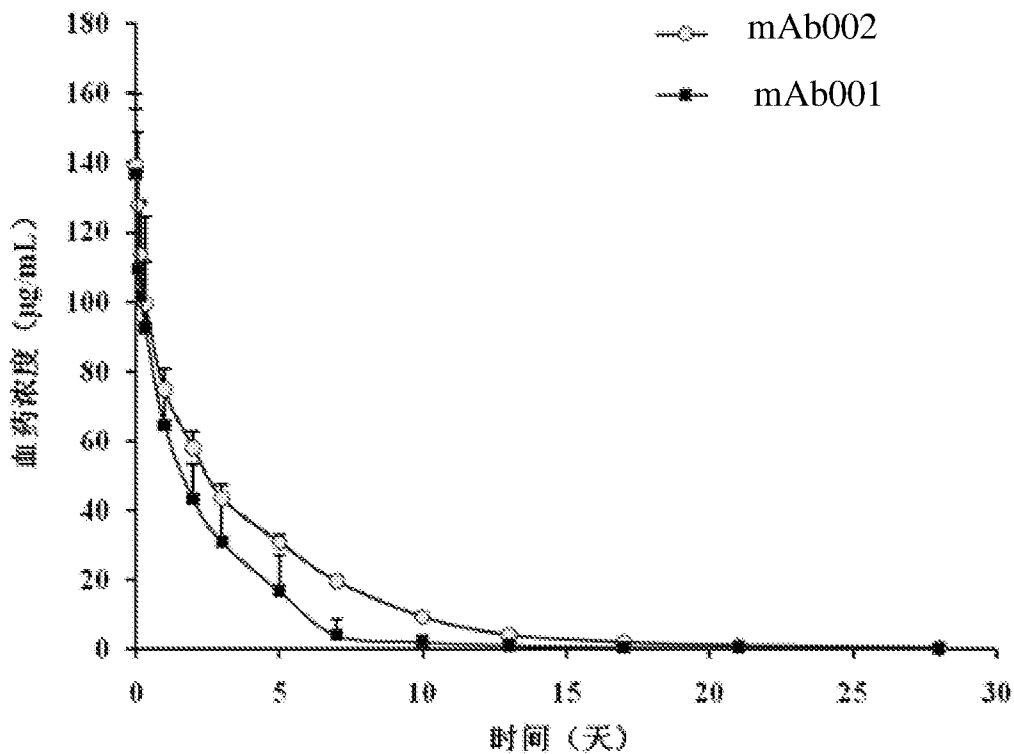


图 1

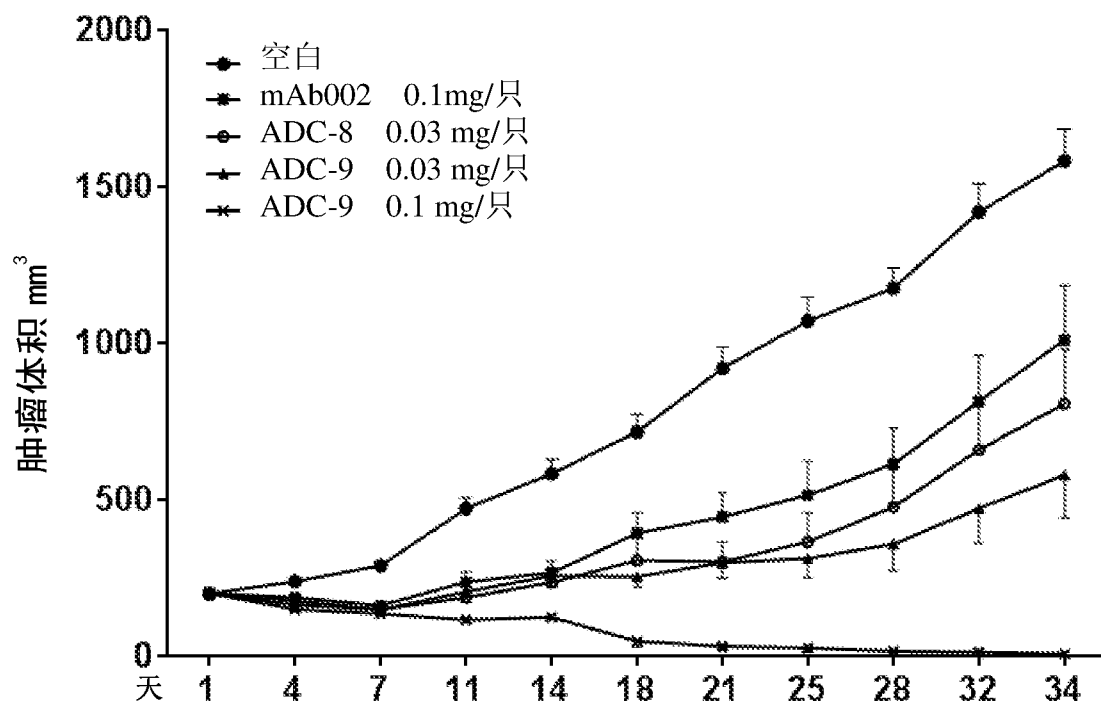


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/091586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; C07K 16/28 (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 39/-; A61P 35/-; C07K 16/-

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)

VEN, CNTXT, WOTXT, EPTXT, CNKI, CNABS, ISI Web of Knowledge, Google, PubMed, NCBI, EBI, STN: JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; HE, Kaijie; EGFR antibody, drug conjugate, nimotuzumab, THERACIM hR3[®], YTE variant, CDR, maytansine, biotoxin, DM-1, DM-4, maytansinoid derivative, antibody-drug conjugate, ADC, M258Y/S260T/T262E, drug molecules, monoclonal antibody, linker, tumor, cancer, immuno, SEQ ID NOs: 3-4 and 7-12

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103333179 A (BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.), 02 October 2013 (02.10.2013), claims 9-16, 21 and 24, and description, paragraph [0078]	1-16
Y	CN 103826661 A (SEATTLE GENETICS INC.), 28 May 2014 (28.05.2014), claims 1-52, and description, paragraphs [0015] and [0112]	1-10, 12-16
Y	CN 103429261 A (CEPHALON (AUSTRALIA) PTY LTD), 04 December 2013 (04.12.2013), claims 1-2	1-16
Y	US 5891996 A (CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR), 06 April 1999 (06.04.1999), abstract, and figures 1-2	11
A	WO 2005081711 A2 (SEATTLE GENETICS, INC.), 09 September 2005 (09.09.2005), claims 4-18	1-16
A	WO 2015177360 A1 (SYNTHON BIOPHARMACEUTICALS B.V.), 26 November 2015 (26.11.2015), the whole document	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 07 September 2017 (07.09.2017)	Date of mailing of the international search report 27 September 2017 (27.09.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LAO, Fang Telephone No.: (86-10) 61648326

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/091586

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103333246 A (BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.), 02 October 2013 (02.10.2013), claims 1 and 8	1-16
A	WO 2016065456 A1 (FORMATION BIOLOGICS INC.), 06 May 2016 (06.05.2016), claims 1 and 5, and description, page 9, paragraph 2	1-16
A	WO 2016064749 A2 (IGENICA BIOTHERAPEUTICS, INC.), 28 April 2016 (28.04.2016), claims 1 and 16, and description, paragraph [0023]	1-16
A	CN 103781494 A (MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.), 07 May 2014 (07.05.2014), the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/091586

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 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 filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
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 in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/091586

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.: 14-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] claims 14-16 set forth a treatment method for diseases complying with PCT Rule 39(iv), and therefore, this report is made based on the use of antibody-drug conjugate as shown in general formula (I) in preparing anticancer drugs.
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/CN2017/091586

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103333179 A	02 October 2013	US 2015151003 A1 WO 2014094353 A1 CN 103333179 B US 2014178414 A1 US 2014178415 A1 US 2016200737 A1 US 9345786 B2 US 8877706 B2	04 June 2015 26 June 2014 16 June 2017 26 June 2014 26 June 2014 14 July 2016 24 May 2016 04 November 2014
CN 103826661 A	28 May 2014	CA 2833477 A1 KR 20140122167 A RU 2013151600 A NZ 615839 A AU 2017203928 A1 WO 2012143497 A2 WO 2012143497 A3 JP 2014512375 A AU 2012244675 B2 SG 194567 A1 AU 2012244675 A1 EP 2699268 A2 IL 228841 A RU 2610336 C2 IN 201308497 P1 JP 6088488 B2 MX 2013012253 A HK 1192463 A0 MX 334544 B	26 October 2012 17 October 2014 27 May 2015 27 November 2015 06 July 2017 26 October 2012 21 March 2013 22 May 2014 29 June 2017 30 December 2013 28 November 2013 26 February 2014 28 November 2013 09 February 2017 20 May 2016 01 March 2017 28 February 2014 22 August 2014 04 November 2015
CN 103429261 A	04 December 2013	BR 112013016235 A2 JP 2014503209 A JP 6147670 B2 AU 2011349049 B2 US 9505826 B2 JP 2017055771 A WO 2012083370 A1 EP 2654790 A1 US 2013281677 A1 AU 2011349049 A1 CA 2824279 A1 KR 20140003494 A MX 2013007392 A HK 1191216 A0 ZA 201305123 A IL 227081	22 November 2016 13 February 2014 14 June 2017 11 August 2016 29 November 2016 23 March 2017 28 June 2012 30 October 2013 24 October 2013 02 May 2013 28 June 2012 09 January 2014 30 November 2013 25 July 2014 24 September 2014 29 August 2013
US 5891996 A	06 April 1999	US 6506883 B2 CA 2163151 C JP 3585303 B2 CA 2163151 A1 DE 69525593 D1 JP H08291200 A EP 0712863 B1	14 January 2003 10 April 2001 04 November 2004 19 May 1996 04 April 2002 05 November 1996 27 February 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/091586

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2005081711 A2	09 September 2005	CN 1130193 A	04 September 1996
		US 2002065398 A1	30 May 2002
		ES 2173149 T3	16 October 2002
		CN 1054609 C	19 July 2000
		EP 0712863 A1	22 May 1996
		CA 2332183 A1	19 May 1996
		CN 1938046 B	19 March 2014
		KR 20140015148 A	06 February 2014
		IL 175247 A	30 April 2013
		ES 2557389 T3	25 January 2016
		ES 2456325 T3	22 April 2014
		EP 2478912 A1	25 July 2012
		JP 5551661 B2	16 July 2014
		AU 2004316290 C1	02 February 2012
		KR 20060111473 A	27 October 2006
		EP 2486933 A1	15 August 2012
		EP 2489364 A1	22 August 2012
		BR PI0416028 A	02 January 2007
		EP 2260858 A2	15 December 2010
		WO 2005081711 A3	23 November 2006
		ES 2534185 T3	20 April 2015
		CN 104998273 A	28 October 2015
		KR 20130119004 A	30 October 2013
		HK 1151984 A1	10 March 2017
		CN 1938046 A	28 March 2007
		AU 2004316290 B2	18 August 2011
		AU 2004316290 A1	08 June 2006
		IL 244159 A	30 March 2017
		IL 215981 A	31 March 2016
		EP 2260858 B1	30 March 2016
		EP 1725249 B1	08 January 2014
		EP 2489364 B1	07 January 2015
		EP 1725249 A2	29 November 2006
		EP 2486933 B1	28 October 2015
		EP 2478912 B1	31 August 2016
		JP 5020636 B2	15 September 2012
		JP 2007514652 A	07 June 2007
		KR 1192496 B1	18 October 2012
		KR 1438983 B1	05 September 2014
		KR 1520209 B1	13 May 2015
		CA 2543888 C	19 January 2016
		HK 1173684 A1	11 September 2015
		US 2008226657 A1	18 September 2008
		US 7964567 B2	21 June 2011
		US 7745394 B2	29 June 2010
		US 2005238649 A1	27 October 2005
		US 7498298 B2	03 March 2009
		US 7964566 B2	21 June 2011
		US 2008248051 A1	09 October 2008
		SG 122200 A1	29 June 2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/091586

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2015177360 A1	26 November 2015	SG 122200 B	30 June 2009
		CN 103394083 B	18 July 2017
		MX 2006005083 A1	01 October 2006
		MX 300303 B	15 June 2012
		ZA 200603619 A	29 October 2008
		IN 200602111 PI	17 August 2007
		MX 2016015176 A	23 March 2017
		SG 11201609372U A	29 December 2016
		US 2017080103 A1	23 March 2017
		KR 20170005128 A	11 January 2017
		AU 2015261768 A1	03 November 2016
		EP 3151865 A1	12 April 2017
		CA 2947238 A1	26 November 2015
		CN 106456794 A	22 February 2017
		IN 201617035832 A	10 March 2017
CN 103333246 A	02 October 2013	US 2014178412 A1	26 June 2014
		US 9314536 B2	19 April 2016
		WO 2014094355 A1	26 June 2014
		CN 103333246 B	16 September 2015
WO 2016065456 A1	06 May 2016	None	
WO 2016064749 A2	28 April 2016	WO 2016064749 A3	17 November 2016
CN 103781494 A	07 May 2014	EP 3090759 A1	09 November 2016
		US 8691231 B2	08 April 2014
		KR 20140048230 A	23 April 2014
		BR 112014000158 A2	07 February 2017
		WO 2013006547 A9	21 February 2013
		US 2012308576 A1	06 December 2012
		CA 2840088 A1	10 January 2013
		AU 2012279132 A1	14 March 2013
		TW I583700 B	21 May 2017
		WO 2013006547 A3	18 April 2013
		WO 2013006547 A2	10 January 2013
		TW 201313739 A	01 April 2013
		CN 103781494 B	18 May 2016
		IL 229951 A	27 February 2014
		IN 201400194 PI	08 July 2016
		ID 201504833 A	30 October 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/091586

A. 主题的分类

A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/28(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 39/-; A61P 35/-; C07K 16/-

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))

VEN, CNTXT, WOTXT, EPTXT, CNKI, CNABS, ISI Web of Knowledge, Google, PubMed, NCBI, EBI, STN; 江苏恒瑞医药股份有限公司, 何开杰, EGFR抗体, 药物偶联物, 泰欣生, 尼妥珠, THERACIM hr3®, YTE变体, CDR, 药物分子, 美登素, 连接器, 生物毒素, DM-1, DM-4, 肿瘤, 癌症, maytansinoid derivative, antibody-drug conjugate, ADC, M258Y/S260T/T262E, drug molecules, monoclonal antibody, linker, tumor, cancer, immuno, SEQ ID NOs: 3-4, 7-12

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
Y	CN 103333179 A (百奥泰生物科技广州有限公司) 2013年 10月 2日 (2013 - 10 - 02) 权利要求9-16, 21, 24, 说明书第[0078]段	1-16
Y	CN 103826661 A (西雅图基因公司) 2014年 5月 28日 (2014 - 05 - 28) 权利要求1-52, 说明书第[0015], [0112]段	1-10, 12-16
Y	CN 103429261 A (塞法隆澳大利亚股份有限公司) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 权利要求1-2	1-16
Y	US 5891996 A (CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR) 1999年 4月 6日 (1999 - 04 - 06) 摘要, 图1-2	11
A	WO 2005081711 A2 (SEATTLE GENETICS, INC.) 2005年 9月 9日 (2005 - 09 - 09) 权利要求4-18	1-16
A	WO 2015177360 A1 (SYNTHON BIOPHARMACEUTICALS B. V.) 2015年 11月 26日 (2015 - 11 - 26) 全文	1-16

☒ 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

2017年 9月 7日

国际检索报告邮寄日期

2017年 9月 27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (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

劳芳

电话号码 (86-10) 61648326

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 103333246 A (百奥泰生物科技广州有限公司) 2013年 10月 2日 (2013 - 10 - 02) 权利要求1, 8	1-16
A	WO 2016065456 A1 (FORMATION BIOLOGICS INC.) 2016年 5月 6日 (2016 - 05 - 06) 权利要求1, 5, 说明书第9页第2段	1-16
A	WO 2016064749 A2 (IGENICA BIOTHERAPEUTICS, INC.) 2016年 4月 28日 (2016 - 04 - 28) 权利要求1, 16, 说明书第[0023]段	1-16
A	CN 103781494 A (梅里麦克制药股份有限公司) 2014年 5月 7日 (2014 - 05 - 07) 全文	1-16

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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☒ 含在申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
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申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 14-16
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求14-16属于PCT细则第39(iv)的疾病的治疗方法，因此本报告基于通式(I)所示的抗体-药物偶联物在制备抗肿瘤药物中的用途而作出。
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/CN2017/091586

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	103333179	A	2013年 10月 2日	US	2015151003	A1	2015年 6月 4日
				WO	2014094353	A1	2014年 6月 26日
				CN	103333179	B	2017年 6月 16日
				US	2014178414	A1	2014年 6月 26日
				US	2014178415	A1	2014年 6月 26日
				US	2016200737	A1	2016年 7月 14日
				US	9345786	B2	2016年 5月 24日
				US	8877706	B2	2014年 11月 4日
CN	103826661	A	2014年 5月 28日	CA	2833477	A1	2012年 10月 26日
				KR	20140122167	A	2014年 10月 17日
				RU	2013151600	A	2015年 5月 27日
				NZ	615839	A	2015年 11月 27日
				AU	2017203928	A1	2017年 7月 6日
				WO	2012143497	A2	2012年 10月 26日
				WO	2012143497	A3	2013年 3月 21日
				JP	2014512375	A	2014年 5月 22日
				AU	2012244675	B2	2017年 6月 29日
				SG	194567	A1	2013年 12月 30日
				AU	2012244675	A1	2013年 11月 28日
				EP	2699268	A2	2014年 2月 26日
				IL	228841	A	2013年 11月 28日
				RU	2610336	C2	2017年 2月 9日
				IN	201308497	P1	2016年 5月 20日
				JP	6088488	B2	2017年 3月 1日
				MX	2013012253	A	2014年 2月 28日
				HK	1192463	A0	2014年 8月 22日
				MX	334544	B	2015年 11月 4日
CN	103429261	A	2013年 12月 4日	BR	112013016235	A2	2016年 11月 22日
				JP	2014503209	A	2014年 2月 13日
				JP	6147670	B2	2017年 6月 14日
				AU	2011349049	B2	2016年 8月 11日
				US	9505826	B2	2016年 11月 29日
				JP	2017055771	A	2017年 3月 23日
				WO	2012083370	A1	2012年 6月 28日
				EP	2654790	A1	2013年 10月 30日
				US	2013281677	A1	2013年 10月 24日
				AU	2011349049	A1	2013年 5月 2日
				CA	2824279	A1	2012年 6月 28日
				KR	20140003494	A	2014年 1月 9日
				MX	2013007392	A	2013年 11月 30日
				HK	1191216	A0	2014年 7月 25日
				ZA	201305123	A	2014年 9月 24日
				IL	227081		2013年 8月 29日
US	5891996	A	1999年 4月 6日	US	6506883	B2	2003年 1月 14日
				CA	2163151	C	2001年 4月 10日
				JP	3585303	B2	2004年 11月 4日
				CA	2163151	A1	1996年 5月 19日
				DE	69525593	D1	2002年 4月 4日
				JP	H08291200	A	1996年 11月 5日
				EP	0712863	B1	2002年 2月 27日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/091586

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	1130193	A	1996年 9月 4日
							US	2002065398	A1	2002年 5月 30日
							ES	2173149	T3	2002年 10月 16日
							CN	1054609	C	2000年 7月 19日
							EP	0712863	A1	1996年 5月 22日
							CA	2332183	A1	1996年 5月 19日
WO	2005081711	A2	2005年 9月 9日				CN	1938046	B	2014年 3月 19日
							KR	20140015148	A	2014年 2月 6日
							IL	175247	A	2013年 4月 30日
							ES	2557389	T3	2016年 1月 25日
							ES	2456325	T3	2014年 4月 22日
							EP	2478912	A1	2012年 7月 25日
							JP	5551661	B2	2014年 7月 16日
							AU	2004316290	C1	2012年 2月 2日
							KR	20060111473	A	2006年 10月 27日
							EP	2486933	A1	2012年 8月 15日
							EP	2489364	A1	2012年 8月 22日
							BR	PI0416028	A	2007年 1月 2日
							EP	2260858	A2	2010年 12月 15日
							WO	2005081711	A3	2006年 11月 23日
							ES	2534185	T3	2015年 4月 20日
							CN	104998273	A	2015年 10月 28日
							KR	20130119004	A	2013年 10月 30日
							HK	1151984	A1	2017年 3月 10日
							CN	1938046	A	2007年 3月 28日
							AU	2004316290	B2	2011年 8月 18日
							AU	2004316290	A1	2006年 6月 8日
							IL	244159	A	2017年 3月 30日
							IL	215981	A	2016年 3月 31日
							EP	2260858	B1	2016年 3月 30日
							EP	1725249	B1	2014年 1月 8日
							EP	2489364	B1	2015年 1月 7日
							EP	1725249	A2	2006年 11月 29日
							EP	2486933	B1	2015年 10月 28日
							EP	2478912	B1	2016年 8月 31日
							JP	5020636	B2	2012年 9月 15日
							JP	2007514652	A	2007年 6月 7日
							KR	1192496	B1	2012年 10月 18日
							KR	1438983	B1	2014年 9月 5日
							KR	1520209	B1	2015年 5月 13日
							CA	2543888	C	2016年 1月 19日
							HK	1173684	A1	2015年 9月 11日
							US	2008226657	A1	2008年 9月 18日
							US	7964567	B2	2011年 6月 21日
							US	7745394	B2	2010年 6月 29日
							US	2005238649	A1	2005年 10月 27日
							US	7498298	B2	2009年 3月 3日
							US	7964566	B2	2011年 6月 21日
							US	2008248051	A1	2008年 10月 9日
							SG	122200	A1	2006年 6月 29日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/091586

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)
				SG	122200	B	2009年 6月 30日
				CN	103394083	B	2017年 7月 18日
				MX	2006005083	A1	2006年 10月 1日
				MX	300303	B	2012年 6月 15日
				ZA	200603619	A	2008年 10月 29日
				IN	200602111	P1	2007年 8月 17日
WO	2015177360	A1	2015年 11月 26日	MX	2016015176	A	2017年 3月 23日
				SG	11201609372U	A	2016年 12月 29日
				US	2017080103	A1	2017年 3月 23日
				KR	20170005128	A	2017年 1月 11日
				AU	2015261768	A1	2016年 11月 3日
				EP	3151865	A1	2017年 4月 12日
				CA	2947238	A1	2015年 11月 26日
				CN	106456794	A	2017年 2月 22日
				IN	201617035832	A	2017年 3月 10日
CN	103333246	A	2013年 10月 2日	US	2014178412	A1	2014年 6月 26日
				US	9314536	B2	2016年 4月 19日
				WO	2014094355	A1	2014年 6月 26日
				CN	103333246	B	2015年 9月 16日
WO	2016065456	A1	2016年 5月 6日	无			
WO	2016064749	A2	2016年 4月 28日	WO	2016064749	A3	2016年 11月 17日
CN	103781494	A	2014年 5月 7日	EP	3090759	A1	2016年 11月 9日
				US	8691231	B2	2014年 4月 8日
				KR	20140048230	A	2014年 4月 23日
				BR	112014000158	A2	2017年 2月 7日
				WO	2013006547	A9	2013年 2月 21日
				US	2012308576	A1	2012年 12月 6日
				CA	2840088	A1	2013年 1月 10日
				AU	2012279132	A1	2013年 3月 14日
				TW	I583700	B	2017年 5月 21日
				WO	2013006547	A3	2013年 4月 18日
				WO	2013006547	A2	2013年 1月 10日
				TW	201313739	A	2013年 4月 1日
				CN	103781494	B	2016年 5月 18日
				IL	229951	A	2014年 2月 27日
				IN	201400194	P1	2016年 7月 8日
				ID	201504833	A	2015年 10月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)