



(21)申請案號：113121305 (22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 03 月 30 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) C07D491/22 (2006.01)

A61K47/68 (2017.01) A61K31/4745 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01) A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/03/30 中國大陸 202210334522X

(71)申請人：大陸商映恩生物製藥（蘇州）有限公司（中國大陸）DUALITY BIOLOGICS
(SUZHOU) CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：朱忠遠 ZHU, ZHONG YUAN (CN)；鍾琛 ZHONG, CHEN (CN)；張禹 ZHANG, YU (CN)；周蘊華 ZHOU, YUN HUA (CN)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：14 共 153 頁

(54)名稱
B7H4 抗體藥物偶聯物及其用途

(57)摘要

本發明提供了與 B7H4 特異性結合的抗 B7H4 抗體藥物偶聯物和包含其的組成物，其中所述抗 B7H4 抗體藥物偶聯物結構如式(I-1)所示。本發明還提供了使用本發明的抗體藥物偶聯物的方法和用途。本發明的抗 B7H4 抗體藥物偶聯物具有更好的對腫瘤細胞的體外增殖的抑制活性以及更好的體內抑瘤效果。

指定代表圖：

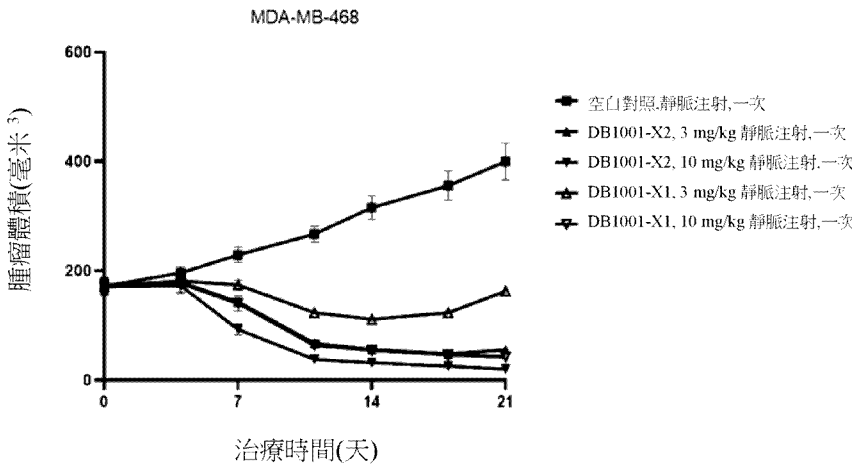
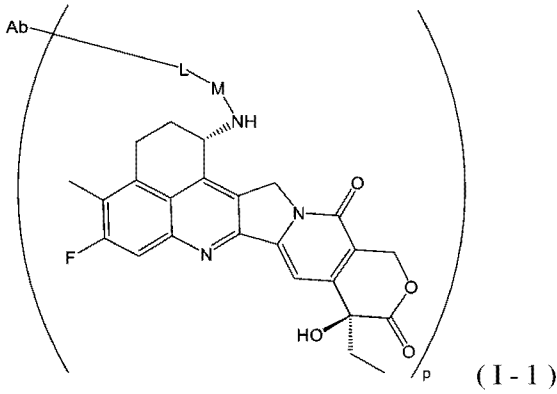


圖 1

特徵化學式：



【發明摘要】

【中文發明名稱】 B7H4 抗體藥物偶聯物及其用途

【中文】

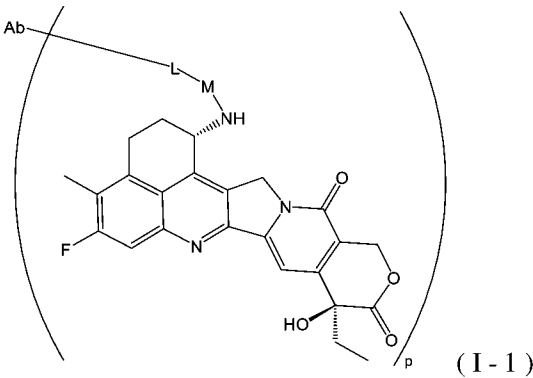
本發明提供了與B7H4特異性結合的抗B7H4抗體藥物偶聯物和包含其的組成物，其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(I-1)所示。本發明還提供了使用本發明的抗體藥物偶聯物的方法和用途。本發明的抗B7H4抗體藥物偶聯物具有更好的對腫瘤細胞的體外增殖的抑制活性以及更好的體內抑瘤效果。

【指定代表圖】 圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】 B7H4抗體藥物偶聯物及其用途

【技術領域】

【0001】 本申請主張申請日為2022/3/30的中國專利申請202210334522X的優先權。本申請引用上述中國專利申請的全文。

【0002】 本發明提供了與B7H4特異性結合的抗體藥物偶聯物和包含其的組成物。還提供了使用本發明的抗體藥物偶聯物的方法和用途。

【先前技術】

【0003】 免疫檢查點抑制劑是腫瘤研究最多的免疫治療形式。在腫瘤微環境中免疫檢查點分子往往被高表現，透過抑制T細胞活化以及誘導T細胞耗竭，從而腫瘤可以逃避免疫系統的攻擊。B7家族與TNF家族是兩類主要的共刺激分子家族，B7家族目前有10個分子，分別為CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、B7H1(PD-L1/CD274)、B7-DC(PD-L2/ CD273)、B7H2(ICOSL)、B7H3(CD276)、B7H4(B7S1/ B7x/ Vtcn1)、B7H5(VISTA)、B7H6以及B7H7(HHLA2)。B7家族的多個成員及其受體已經被證明是免疫檢查點，如PD-L1/PD1、CTLA4和VISTA等。

【0004】 B7H4是比較新的B7家族成員，雖然在mRNA位準在身體細胞內廣泛表現，但其蛋白位準的表現非常有限，僅在身體的部分導管上皮細胞上如乳腺導管和小葉、輸卵管上皮、子宮內膜等組織有低位準表現。相反，B7H4在多種腫瘤組織中大量表現，比如在乳腺癌特別是三陰性乳腺癌、卵巢癌和子宮內膜癌等腫瘤細胞上。從表現譜這一點上來講，B7H4可以被認為是一個高特異性的腫瘤相關抗原。另一方面，B7H4是一種新的免疫檢查點分子，體外實驗證明B7H4透過與其未知的T細胞表面受體相互作用，抑制T細胞的增殖、活化以及細胞因子的產生。腫瘤細胞透過高表現B7H4分子，以及腫瘤微環境裡高表現B7H4分子的抑制性巨噬細胞，抑制T細胞的活化從而實現免疫逃避。B7H4在腫瘤上的表現譜與PD-L1不重疊。透過抗體標靶B7H4的治療，以及阻斷B7H4的負調控作用重新活化免疫系統，是一種有前景的治療B7H4表現陽性腫瘤的手段。

【0005】 目前有多家製藥公司在研發針對B7-H4的單株抗體，或與藥物偶聯物，或雙特異性抗體。已經上市的抗體－藥物偶聯物有Adcetris和Kadcyla。目前有多家跨國製藥公司在研發針對B7-H4的單株抗體或其藥物偶聯物，提高患者自身對腫瘤的免疫系統反應，並達到對腫瘤細胞進行直接毒殺的目的。相關專利如W02013025779、US20140322129等。Medimmune、FivePrime

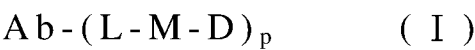
等公司的抗B7-H4單株抗體目前尚在臨床前開發；基因泰克公司的抗B7-H4抗體－藥物偶聯物也已處在臨床前開發階段。

【發明內容】

【0006】 本發明所要解決的技術問題是為了克服現有技術中抗B7H4抗體藥物偶聯物少的缺陷，而提供了一種抗B7H4抗體藥物偶聯物及其製備方法和應用。本發明的抗B7H4抗體藥物偶聯物相較現有技術具有選自以下組的一種或多種優勢效果：(1)更好的對腫瘤細胞的體外增殖的抑制活性；(2)更好的內吞效應；(3)更好的體內抑瘤效果；(4)與人和猴的B7H4親和力更好；(5)對B7H4更好的標靶性；(6)更好的旁觀者毒殺效應；(7)更好的血漿穩定性；(8)更好的安全性。

【0007】 本發明主要是透過以下技術手段解決上述技術問題的。

【0008】 一方面，本申請提供一種抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(I)所示：



其中，

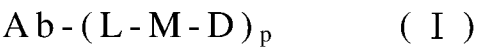
L和M是連接子單元；

D是細胞毒性藥物；

p表示平均連接數，且p選自1到10的整數或小數，優選3-8的整數或小數；

Ab為抗B7H4抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，和所述輕鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【0009】 一方面，本申請提供一種抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(I)所示：



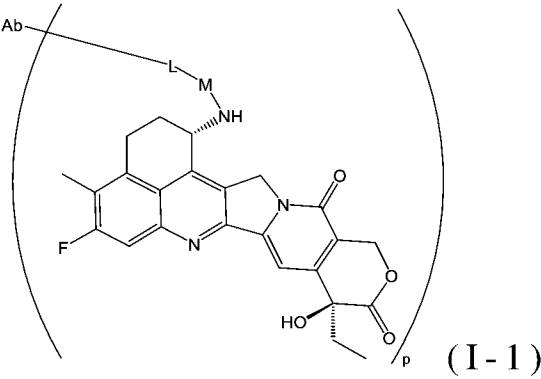
其中，
L和M是連接子單元；
-M-D是細胞毒性藥物；

p表示平均連接數，且p選自1到10的整數或小數，優選3-8的整數或小數；

Ab為抗B7H4抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，

和所述輕鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【0010】 一方面，本申請提供一種抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(I-1)所示：



其中，

M為-L²-L¹-C(O)-；

L²為-O-或-S-；

L¹為-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH₂-、C₃-C₆飽和的環烷基或3-6員飽和的雜環基，所述C₃-C₆飽和的環烷基和3-6員飽和的雜環基各自獨立地任選被一個或多個R^{2a}取代；

m選自1、2、3或4；所述的3-6員飽和的雜環基中的雜原子選自N、O和S，雜原子數為1-3個；

R^{1a}各自獨立地選自氫、鹵素、羥基、胺基和C₁-C₆烷基，所述C₁-C₆烷基任選被一個或多個R取代；

R^{1b} 和 R^{2a} 各自獨立地選自氫、鹵素、羥基、胺基和 C_1-C_6 烷基，
所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代；

R 各自獨立地為氫或鹵素；

L 是連接子單元；

p 表示平均連接數，且 p 選自1到10的整數或小數；

Ab 為抗B7H4抗體或其抗原結合片段。

【0011】 在一些實施方案中，所述平均連接數 p 優選為3到8中任一整數或小數。

【0012】 在本發明某些優選實施方案中，所述的如式(I-1)、(II-1)、(II-2)所示的化合物或其藥學上可接受的鹽中的某些基團如下定義，未提及的基團同本申請任一方案所述(簡稱“在一些實施方式中”)。

【0013】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中， R^{1a} 各自獨立地選自鹵素、羥基、胺基和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代， R 各自獨立地為氫或鹵素。

【0014】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，和所述輕鏈可變區包含胺基酸序列

分別如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【0015】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含：胺基酸序列如SEQ ID NO:7所示或與其具有至少95%、96%、97%、98%或99%相同性的重鏈可變區，和胺基酸序列如SEQ ID NO:8所示或與其具有至少95%、96%、97%、98%或99%相同性的輕鏈可變區。

【0016】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含胺基酸序列如SEQ ID NO:7所示的重鏈可變區，和胺基酸序列如SEQ ID NO:8所示的輕鏈可變區。

【0017】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體或抗原結合片段為鼠源抗體或其片段、嵌合抗體或抗原結合片段、人源化抗體或抗原結合片段、或全人抗體或抗原結合片段。

【0018】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段為人源化抗體或其片段。

【0019】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段選自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂、sdAb、雙抗體或線性抗體。

【0020】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體為單株抗體。

【0021】 在一些實施方式中，本發明所述抗體為IgG1形式的抗體、IgG2形式的抗體、IgG3形式的抗體或IgG4形式的抗體。

【0022】 在一些實施方式中，本發明所述抗體為IgG1形式的抗體。

【0023】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含：胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示或與其具有至少95%、96%、97%、98%或99%相同性的重鏈，和胺基酸序列如SEQ ID NO:10所示或與其具有至少95%、96%、97%、98%或99%相同性的輕鏈。

【0024】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示的重鏈，和胺基酸序列如SEQ ID NO:10所示的輕鏈。

【0025】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體為抗B7H4抗體DB1001。DB1001的胺基酸序列如序列表所示。在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述的M，其L²端與連接子單元L相連。

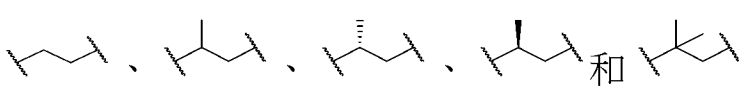
【0026】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH₂-；R^{1a}選自：氫、鹵素和C₁-C₆烷基；R^{1b}選

自：氫、鹵素和C₁-C₆烷基；例如R^{1a}選自：鹵素和C₁-C₆烷基；R^{1b}選自：氫、鹵素和C₁-C₆烷基。

【0027】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH₂-；R^{1a}為氫或-CH₃；R^{1b}選自：氫和-CH₃；例如R^{1a}為-CH₃；R^{1b}選自：氫和-CH₃。

【0028】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH₂-；m為1或2。

【0029】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹選自：

。其中結構片段的左側優選與L²相連。

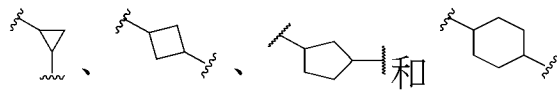
【0030】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為C₃-C₆飽和的環烷基或3-6員飽和的雜環基，所述C₃-C₆飽和的環烷基和3-6員飽和的雜環基各自獨立地任選被一個或多個R^{2a}取代，R^{2a}各自獨立地選自：氫、鹵素和C₁-C₆烷基。

【0031】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中，L²和

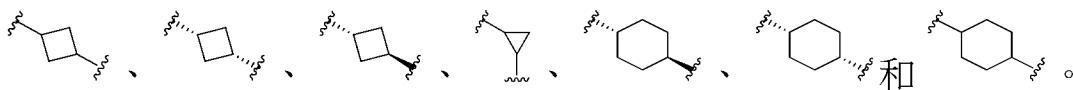
-C(O)-連接在C₃-C₆飽和的環烷基或3-6員飽和的雜環基的不同原子上。

【0032】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為任選被一個或多個R^{2a}取代的C₃-C₆飽和的環烷基；R^{2a}各自獨立地選自：氫、鹵素和C₁-C₆烷基。

【0033】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為C₃-C₆飽和的環烷基。例如，L¹為環丙基、環丁基、環戊基或環己基，優選為環丁基。

【0034】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為任選被1、2或3個R^{2a}取代的：；R^{2a}各自獨立地選自：氫、鹵素和C₁-C₆烷基。

【0035】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹選自：



【0036】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物,其中

M為-L²-L¹-C(O)-；

L^2 為 -O- ；

L^1 為 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ 或 C_3-C_6 飽和的環烷基，所述 C_3-C_6 飽和的環烷基任選被一個或多個 R^{2a} 取代；

m 選自 1 或 2 ；

R^{1a} 各自獨立地選自氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代；

R^{1b} 和 R^{2a} 各自獨立地選自氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代；

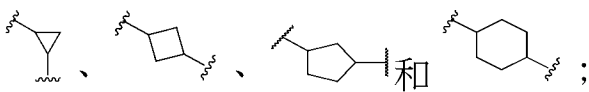
R 各自獨立地為氫或鹵素。

【0037】 在一些實施方式中，本發明所述的抗 B7H4 抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中

M 為 $-L^2-L^1-C(O)-$ ；

L^2 為 -O- ；

L^1 為 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ 或任選被 1、2 或 3 個 R^{2a} 取代的：



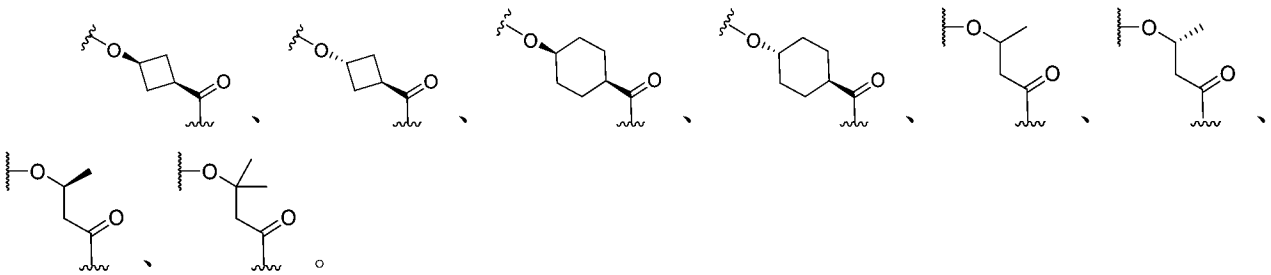
m 選自 1 或 2 ；

R^{1a} 各自獨立地選自鹵素和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代；

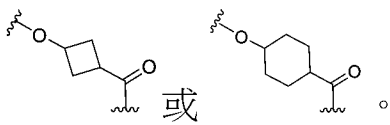
R^{1b} 和 R^{2a} 各自獨立地選自氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代；

R各自獨立地為氫或鹵素。

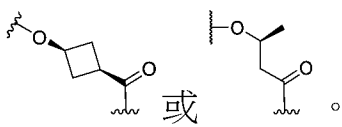
【0038】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述-M-選自：



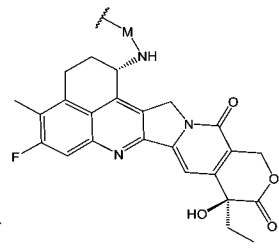
【0039】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述-M-為：



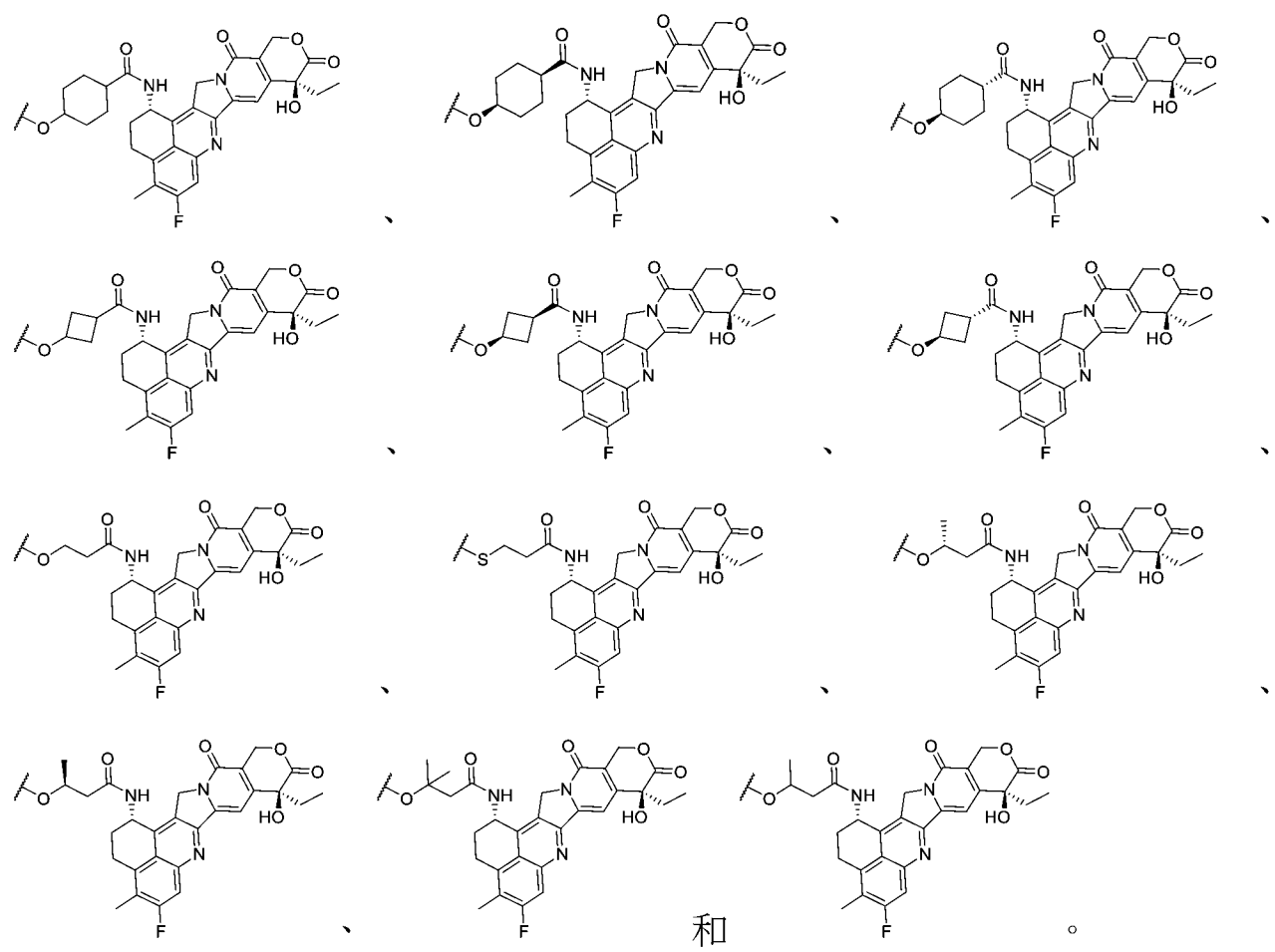
【0040】 在一些實施方式中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述-M-為：



【0041】 在一些實施方案中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶

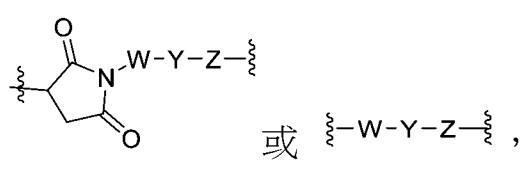


聯物，其中細胞毒性藥物  選自以下任一結構：



【0042】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述L為-L_a-L_b-L_c-，

所述-L_a-為



其中，W為-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-，Y為-(OCH₂CH₂)_{yn}-O_{yp}-，Z為-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}；

其中wn為1、2、3或6，

W 的 0 個 或 1 個 伸 甲 基 單 元 各 自 獨 立 地 被 -Cyr- 、
-N(R^{wx})C(O)- 、 -C(O)N(R^{wx})- 、 或 -C(O)- 替 代 ；

其中 y_n 為 0 、 4 或 8 ， y_p 為 0 或 1 ；

其中 z_n 為 1 、 2 或 3 ，

Z 的 1 個 伸 甲 基 單 元 各 自 獨 立 地 被 -Cyr- 、 -N(R^{zx})C(O)- 、
-C(O)N(R^{zx})- 、 或 -C(O)- 替 代 ；

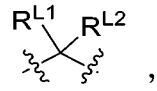
-Cyr- 為 3 到 10 員 飽 和 的 環 烷 基 ， 其 中 所 述 -Cyr- 是 未 取 代 的 或
獨 立 地 被 1 到 3 個 取 代 基 R^{cx} 取 代 ；

其 中 每 個 R^{wa} ， R^{wb} ， R^{za} ， R^{zb} ， R^{wx} ， R^{zx} , R^{cx} 各 自 獨 立 地 為 氫 、
鹵 素 、 -OR^r 或 被 R^r 任 選 取 代 的 C₁₋₆ 烷 基 ；

其 中 每 個 R^r 各 自 獨 立 地 為 氫 、 鹵 素 或 C₁₋₆ 烷 基 ；

所 述 -L_b- 由 2 到 7 個 胺 基 酸 構 成 的 胜 肽 殘 基 ， 所 述 -L_b- 的 胜 肽 殘
基 為 由 選 自 以 下 組 中 的 胺 基 酸 形 成 的 胜 肽 殘 基 ： 苯 丙 胺 酸 、 甘 胺 酸 、
丙 胺 酸 、 纈 胺 酸 、 瓜 胺 酸 、 離 胺 酸 、 絲 胺 酸 、 麩 胺 酸 、 和 天 冬 胺 酸 ；
優 選 地 ， -L_b- 表 示 由 2 到 4 個 胺 基 酸 構 成 的 胜 肽 殘 基 ， 所 述 -L_b- 的 胜
肽 殘 基 為 由 選 自 以 下 組 中 的 胺 基 酸 形 成 的 胜 肽 殘 基 ： 苯 丙 胺 酸 、 甘
胺 酸 、 丙 胺 酸 、 纈 胺 酸 、 瓜 胺 酸 和 離 胺 酸 ；

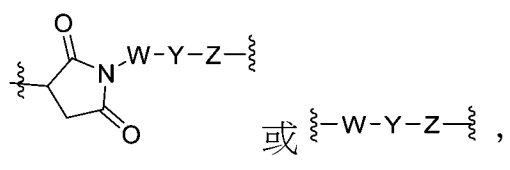
所 述 -L_c- 為



其中 R^{L1} 、 R^{L2} 各自獨立地選自以下組：氫、鹵素、-OH和 C_{1-6} 烷基。

【0043】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述L為-L_a-L_b-L_c-，

所述-L_a-為



其中，W為-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-，Y為-(OCH₂CH₂)_{yn}-O_{yp}-，Z為-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}；

其中wn為1、2、3或6，

W的0個或1個伸甲基單元各自獨立地被-Cyr-、-N(R^{wx})C(O)-、-C(O)N(R^{wx})-、或-C(O)-替代；

其中yn為0、4或8，yp為0或1；

其中zn為1、2或3，

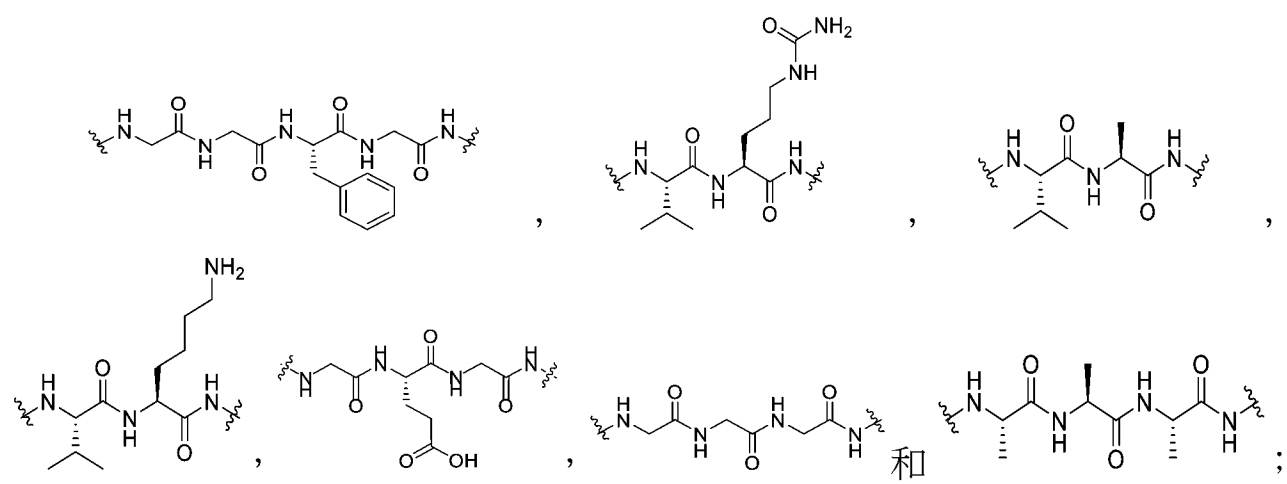
Z的1個伸甲基單元各自獨立地被-Cyr-、-N(R^{zx})C(O)-、-C(O)N(R^{zx})-、或-C(O)-替代；

-Cyr-為3到10員飽和的環烷基，其中所述-Cyr-是未取代的或獨立地被1到3個取代基R^{cx}取代；

其中每個 R^{wa} ， R^{wb} ， R^{za} ， R^{zb} ， R^{wx} ， R^{zx} ， R^{cx} 各自獨立地為氫、鹵素、 $-OR^r$ 或被 R^r 任選取代的 C_{1-6} 烷基；

其中每個 R^r 各自獨立地為氫、鹵素或 C_{1-6} 烷基；

所述 $-L_b-$ 選自以下組：

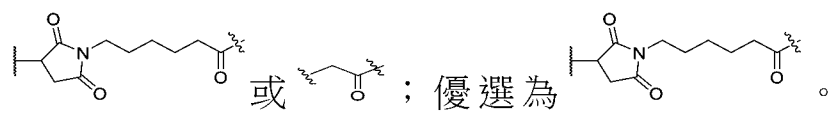


所述 $-L_c-$ 為

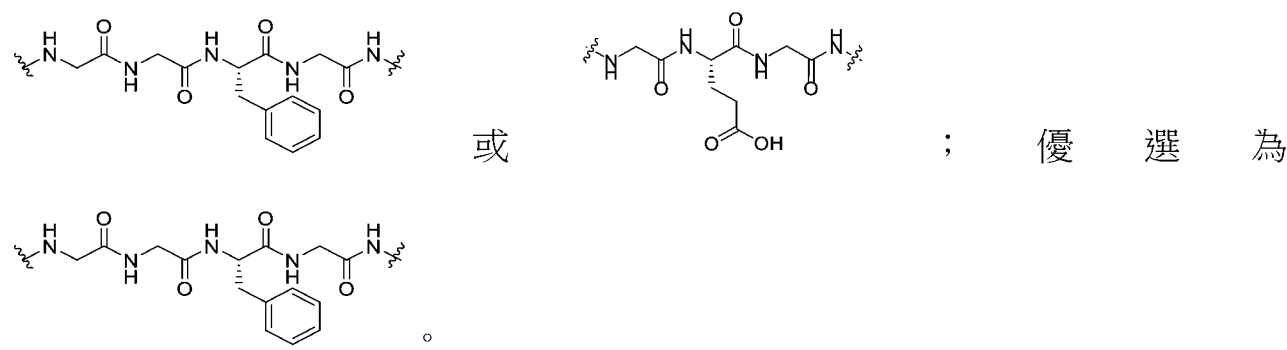


其中 R^{L1} 、 R^{L2} 各自獨立地選自以下組：氫、鹵素、 $-OH$ 和 C_{1-6} 烷基。

【0044】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述 $-L_a-$ 為



【0045】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述 $-L_b-$ 為

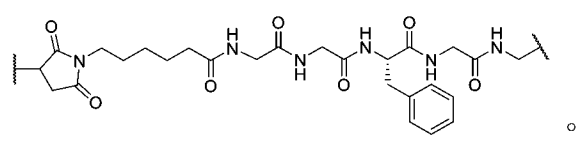


【0046】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述-L_c-為。

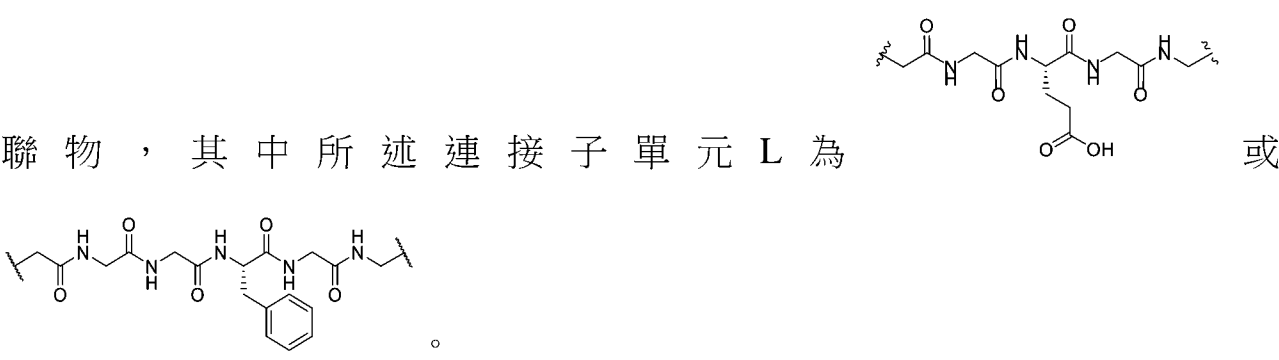
【0047】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述的連接子單元L，其L_a端與Ab相連，L_c端與M相連。

【0048】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物,其中所述的連接子單元L，其L_a端與Ab相連，L_c端與連接子單元M相連。

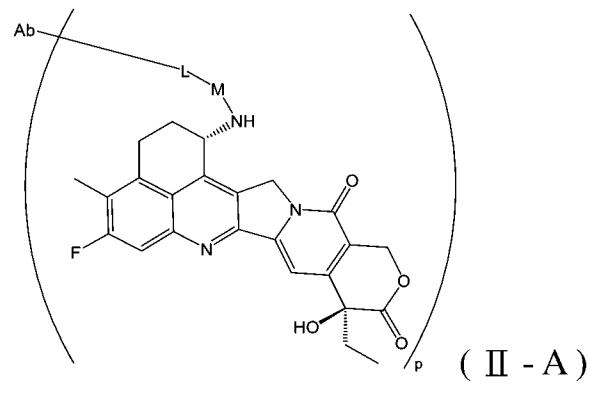
【0049】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述L為



【0050】 在一些實施方案中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶

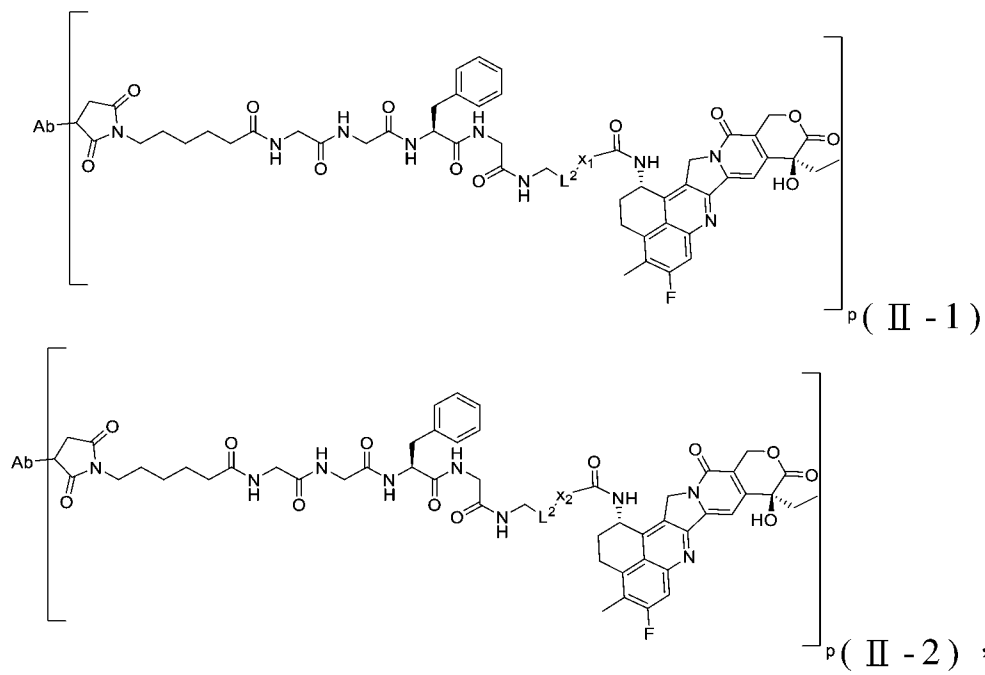


【0051】 在一些實施方案中，本發明所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物，其結構如式(Ⅱ-A)所示：



其中，p表示平均連接數，且p為1到10中任一整數或小數；優選為3到8中任一整數或小數；Ab、L和M分別如本發明任一實施方案所定義。

【0052】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物,其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(Ⅱ-1)或(Ⅱ-2)所示：



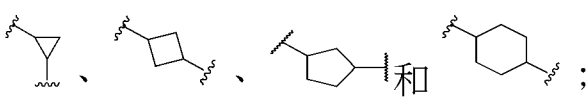
其中，

p表示平均連接數，且p選自1到10的整數或小數，優選3-8的整數或小數；

Ab如本文任一項所述的抗體或其抗原結合片段；

L²為-O-或-S-；優選為-O-；

X₁選自任選被1、2或3個R^{2a}取代的C₃-C₆飽和的環烷基；優選為任選被1、2或3個R^{2a}取代的：



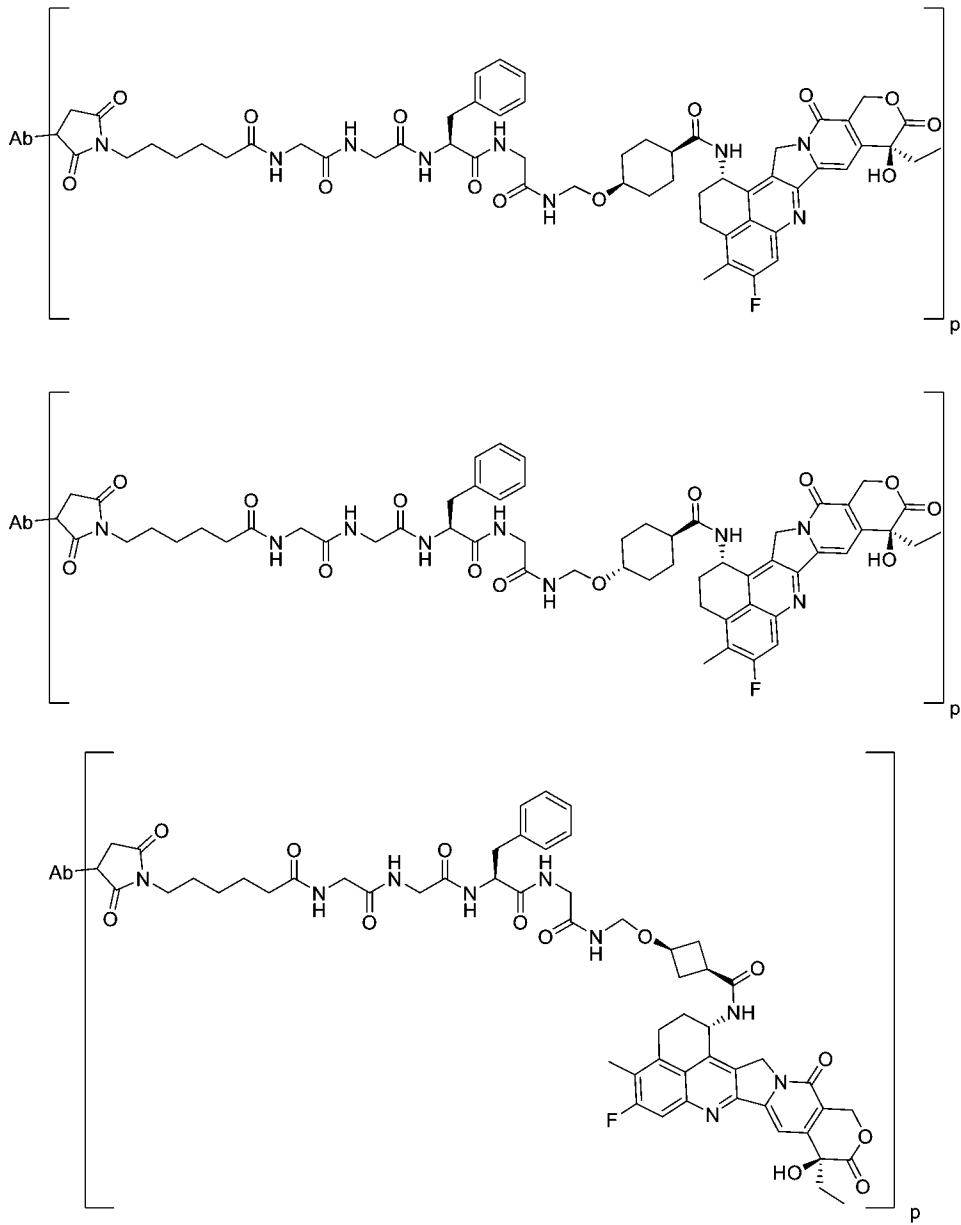
X₂選自-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH₂-；

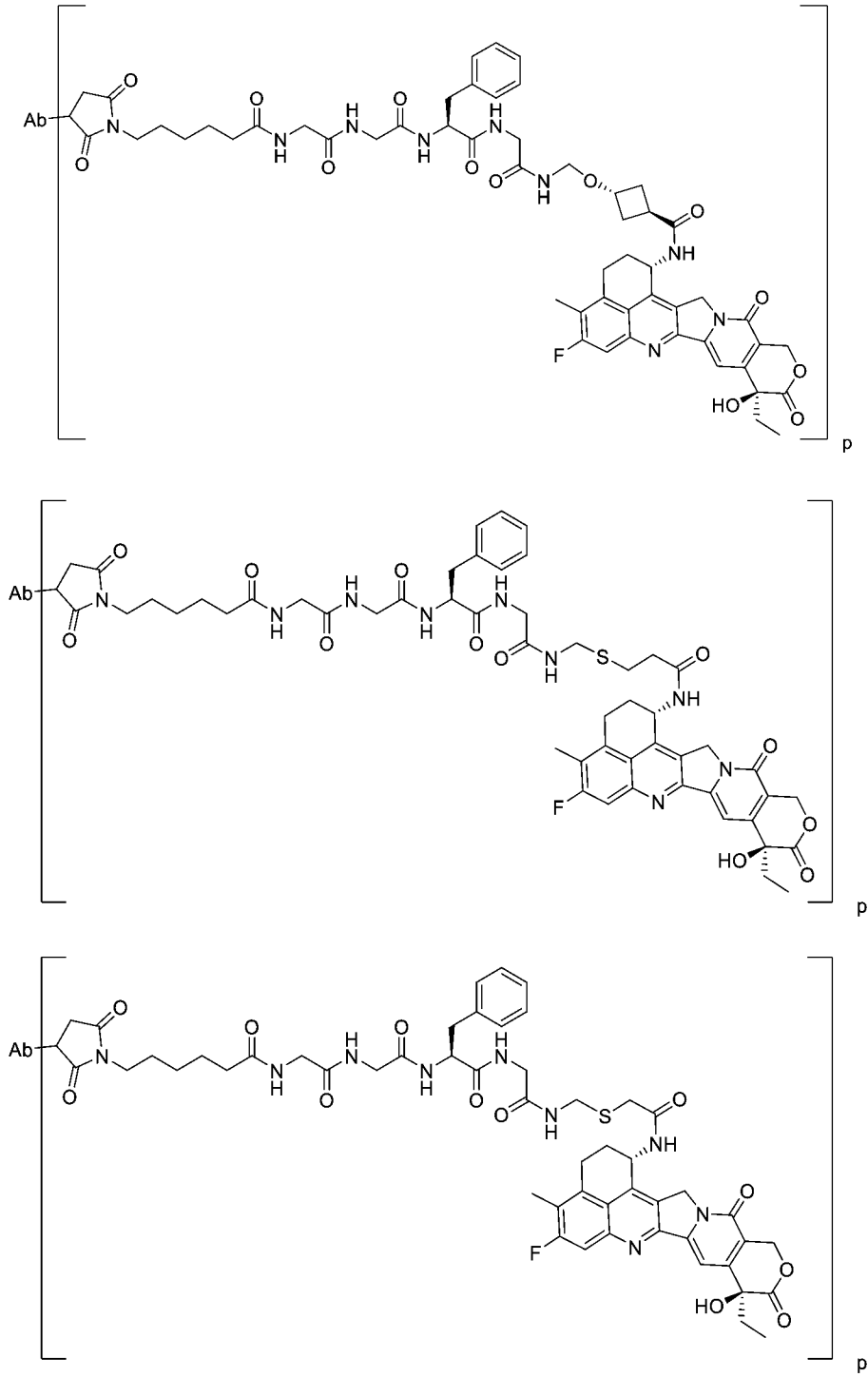
m選自1或2；

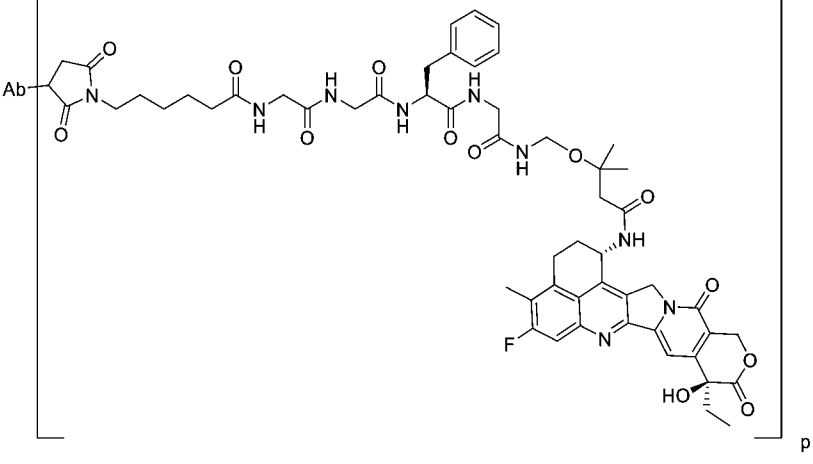
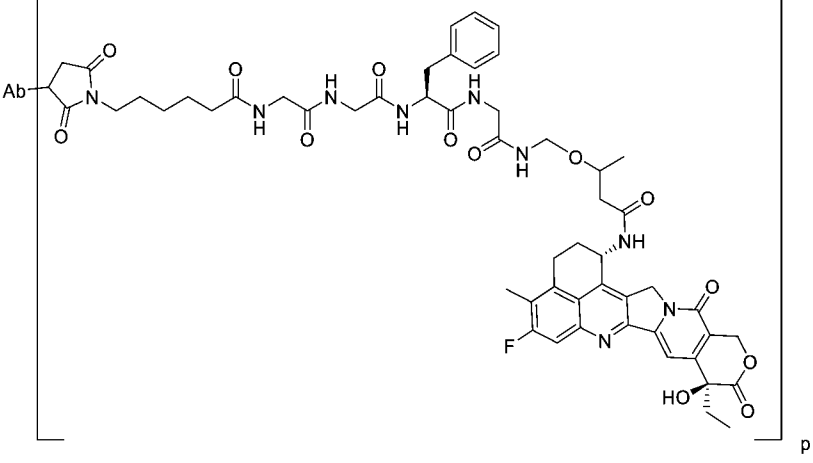
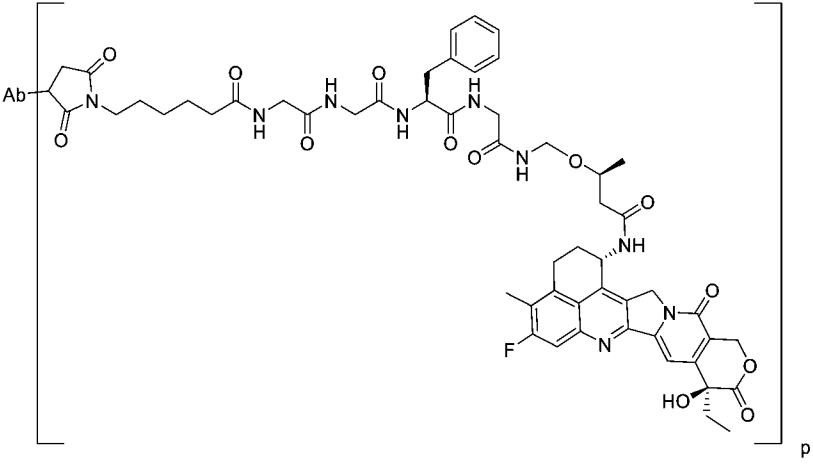
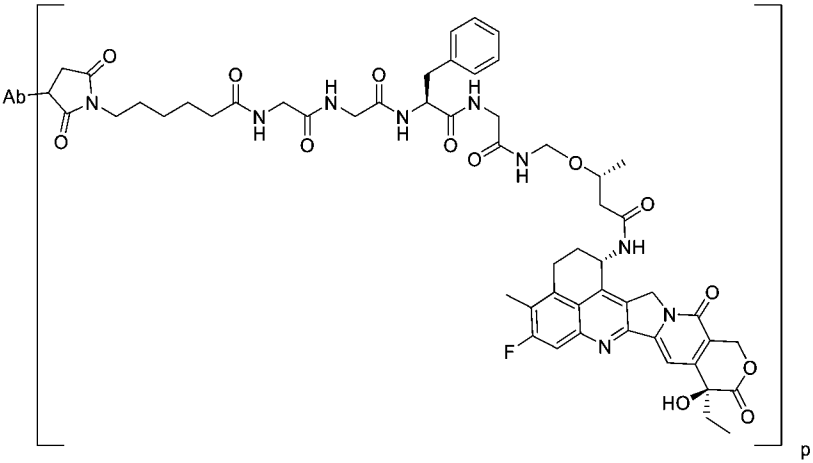
R^{1a}為氫、鹵素或被1、2或3個R任選取代的C₁-C₆烷基；優選為鹵素或被1、2或3個R任選取代的C₁-C₆烷基；R^{1b}或R^{2a}各自獨立可以為氫、鹵素或被1、2或3個R任選取代的C₁-C₆烷基；

R各自獨立地可以為氫或鹵素。

【0053】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物,其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物選自以下結構式：





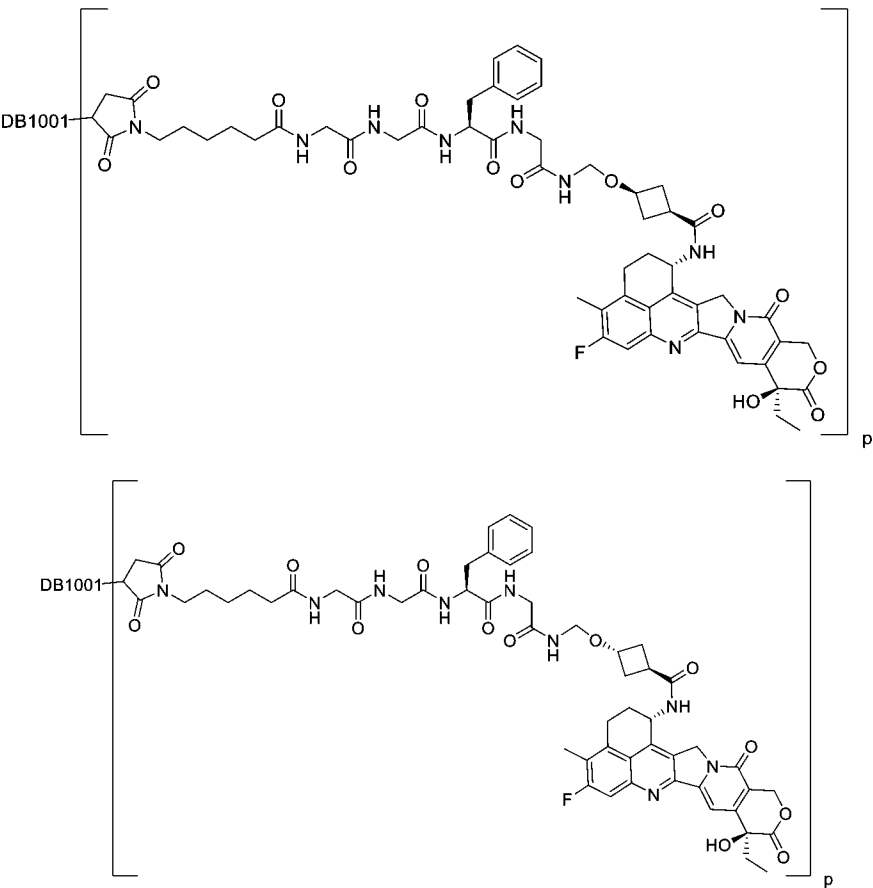


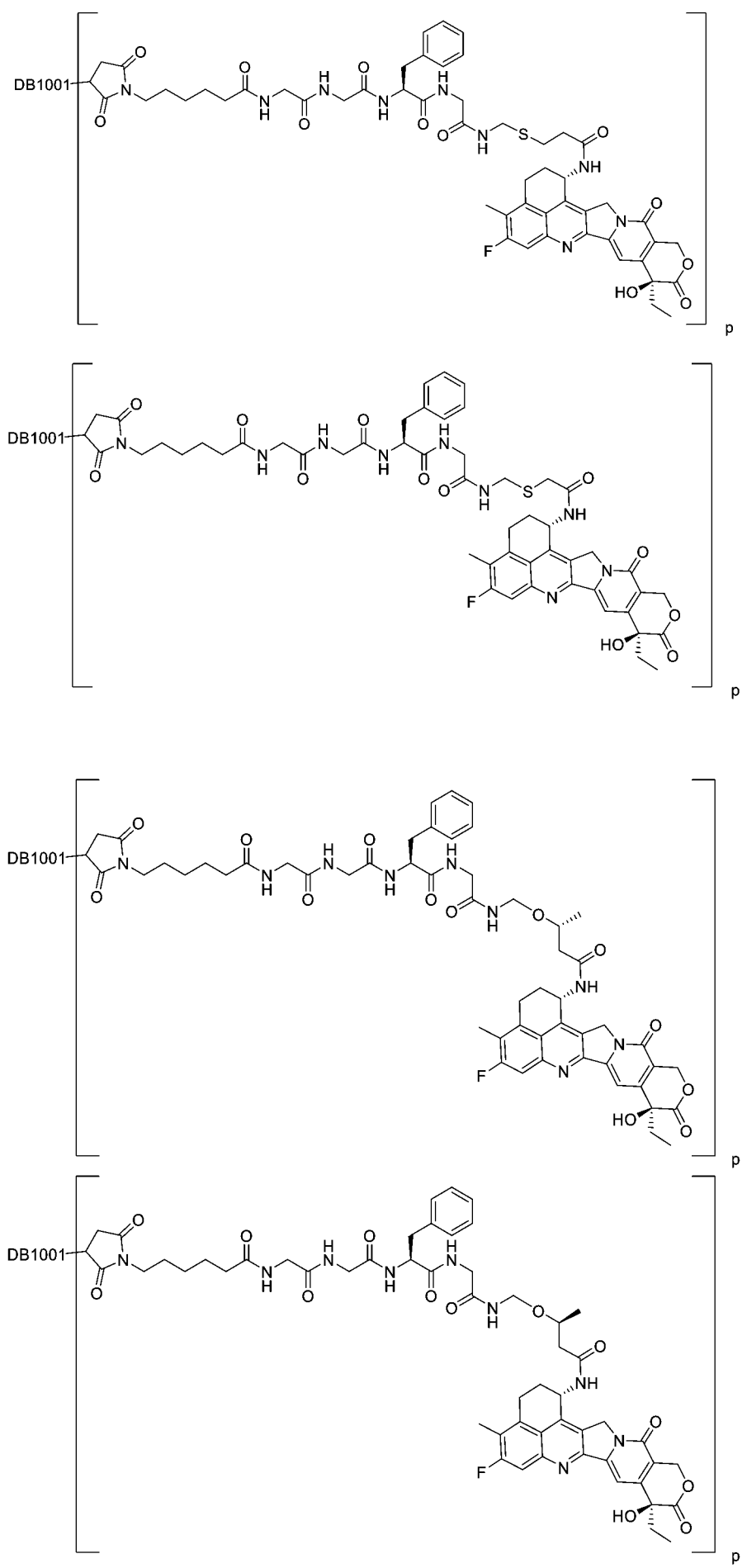
其中，

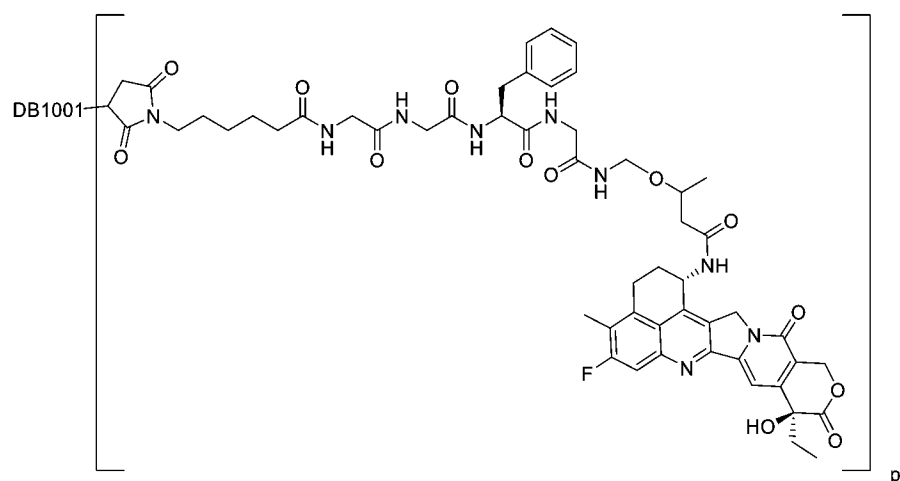
p表示平均連接數，且p選自1到10的整數或小數，優選3-8的整數或小數；

Ab如本文任一實施方案所述的抗B7H4抗體或其抗原結合片段。

【0054】 在又一個方面，本發明提供了一種抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物選自：







其中，

p表示平均連接數，且p選自1到10的整數或小數，優選3-8的整數或小數。所述DB1001的胺基酸序列如序列表所示。所述平均連續數p為3.89，或p為5.4。

【0055】 在一些實施方式中，本發明所述平均連接數p選自1到10的整數或小數。

【0056】 在一些實施方式中，本發明所述平均連接數p可以為2到8的整數或小數。例如，所述平均連接數p可以為3到8的整數或小數。例如，所述平均連接數p可以為1到2、2到3、3到4、4到5、5到6、6到7、7到8、8到9、9到10的整數或小數。

【0057】 在又一個方面，本發明提供了一種抗體藥物偶聯物的製備方法，其包括以下步驟：在還原劑的作用下，溶於緩衝液的所述抗體與溶於溶劑的所述連接子-細胞毒素混合，即得所述抗體藥物偶聯物。

【0058】 在又一個方面，本發明提供了一種藥物組成物，其包含如本文所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，和藥學上可接受的載劑或賦形劑。

【0059】 在又一個方面，本發明提供了如本文所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物或藥物組成物在製備用於治療和/或預防B7H4媒介的疾病或病症的藥物中的用途，優選地，所述疾病或病症為B7H4陽性表現的癌症。

【0060】 在又一個方面，本發明提供了一種治療和/或預防B7H4媒介的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用如本文所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物或藥物組成物，優選地，所述疾病或病症為B7H4高表現的癌症。

【0061】 在又一個方面，本發明提供了如本文所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物或藥物組成物，其用於治療和/或預防B7H4媒介的疾病或病症，優選地，所述疾病或病症為B7H4陽性表現的癌症。

【0062】 在一些實施方式中，本發明所述癌症選自乳腺癌、卵巢癌和子宮內膜瘤。

【0063】 在又一個方面，本發明提供了一種藥物組合，其包含如本文所述的抗體藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或本文所述的藥物組成物，以及一種或多種另外的治療劑。

【0064】 在又一個方面，本發明提供了一種套組，其包括如本文所述的抗體藥物偶聯物、或本文所述的藥物組成物。

術語定義

【0065】 除非另有說明，本發明的實施將採用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學和免疫學的常規技術，這些都在本領域的技術範圍內。

【0066】 為了可以更容易地理解本發明，某些科技術語具體定義如下。除非本文其它部分另有明確定義，否則本文所用的科技術語都具有本發明所屬領域普通技術人員通常理解的含義。關於本領域的定義及術語，專業人員具體可參考 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel)。胺基酸殘基的縮寫是本領域中所用的指代20個常用L-胺基酸之一的標準3字母和/或1字母代碼。本文(包括申請專利範圍)所用單數形式包括其對應的複數形式，除非文中另有明確規定。

【0067】 術語“約”通常是指在指定數值以上或以下0.5%-10%的範圍內變動，例如在指定數值以上或以下0.5%、1%、1.5%、2%、

2.5 %、3 %、3.5 %、4 %、4.5 %、5 %、5.5 %、6 %、6.5 %、7 %、7.5 %、8 %、8.5 %、9 %、9.5 %、或10 %的範圍內變動。

【0068】 術語“抗體”是指具有所需生物活性的任何形式的抗體。因此，其以最廣義使用，具體包括但不限於單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人源化抗體、全人抗體、嵌合抗體和駱駝源化單結構域抗體。

【0069】 術語“單株抗體”是指獲自基本均質抗體群的抗體，即組成該群的各個抗體除可少量存在的可能天然存在的突變之外是相同的。單株抗體是高度特異性的，針對單一抗原表位。相比之下，常規(多株)抗體製備物通常包括大量針對不同表位(或對不同表位有特異性)的抗體。修飾語“單株”表明獲自基本均質抗體群的抗體的特徵，且不得解釋為需要透過任何特定方法產生抗體。

【0070】 術語“全長抗體”，是指在天然存在時包含四條胜肽鏈的免疫球蛋白分子：兩條重(H)鏈(全長時約50-70kDa)和兩條輕(L)鏈(全長時約25kDa)透過二硫鍵互相連接。每一條重鏈由重鏈可變區(在本文中縮寫為VH)和重鏈恆定區(在本文中縮寫為CH)組成。重鏈恆定區由3個結構域CH1、CH2和CH3組成。每一條輕鏈由輕鏈可變區(在本文中縮寫為VL)和輕鏈恆定區組成。輕鏈恆定區由一個結構域CL組成。VH和VL區可被進一步細分為具有高可變性的互補決定區(CDR)和其間隔以更守恆的稱為框架區(FR)的區域。每一

個VH或VL區由按下列順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4從胺基末端至羧基末端排列的3個CDR和4個FR組成。重鏈和輕鏈的可變區含有與抗原相互作用的結合結構域。抗體的恆定區可媒介免疫球蛋白對宿主組織或因子(包括免疫系統的各种細胞(例如，效應細胞)和經典補體系統的第一組分(C1q))的結合。

【0071】 術語“CDR”是指抗體可變序列內的互補決定區。在重鏈和輕鏈的各個可變區中存在3個CDR，其對於各個重鏈和輕鏈可變區被命名為HCDR1、HCDR2和HCDR3或LCDR1、LCDR2和LCDR3。本發明的所述抗體的可變區CDR的精確胺基酸序列邊界可使用許多公知的方案的任何方案來確定，包括基於抗體的三維結構和CDR環的拓撲學的Chothia(Chothia等人.(1989)Nature 342:877-883；Al-Lazikani等人,“Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”,Journal of Molecular Biology,273,927-948(1997))基於抗體序列可變性的Kabat(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest，第4版，U.S. Department of Health and Human Services,National Institutes of Health(1987))，AbM(University of Bath)，Contact(University College London)，國際ImMunoGeneTics database(IMG) (1999 Nucleic Acids Research,27,209-212)，以及基於利用大量晶體結

構的近鄰傳播聚類(affinity propagation clustering)的North CDR定義。本發明抗體的CDR可以由本領域的技術人員根據本領域的任何方案(例如不同的指派系統或組合)確定邊界。

【0072】 術語抗體(“親代抗體”)的“抗原結合片段”包括抗體的片段或衍生物，通常包括親代抗體的抗原結合區或可變區(例如一個或多個CDR)的至少一個片段，其保持親代抗體的至少一些結合特異性。抗體結合片段的實例包括但不限於Fab，Fab'，F(ab')₂和Fv片段；雙抗體；線性抗體；單鏈抗體分子，例如scFv；由抗體片段形成的奈米抗體(nanobody)和多特異性抗體。當抗原的結合活性在莫耳濃度基礎上表示時，結合片段或衍生物通常保持其抗原結合活性的至少10%。優選結合片段或衍生物保持親代抗體的抗原結合親和力的至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更高。還預期抗體的抗原結合片段可包括不明顯改變其生物活性的守恆或非守恆胺基酸取代(稱為抗體的“守恆變異體”或“功能守恆變異體”)。

【0073】 術語“嵌合抗體”是具有第一抗體的可變結構域和第二抗體的恆定結構域的抗體，其中第一抗體和第二抗體來自不同物種。通常，可變結構域獲自齧齒動物等的抗體(“親代抗體”)，而恆定結構域序列獲自人抗體，使得與親代齧齒動物抗體相比，所得嵌合抗體在人受試者中誘導不良免疫反應的可能性較低。

【0074】 術語“人源化抗體”是指含有來自人和非人(例如小鼠、大鼠)抗體的序列的抗體形式。一般而言，人源化抗體包含基本所有的至少一個、通常兩個可變結構域，其中所有或基本所有的超變環相當於非人免疫球蛋白的超變環，而所有或基本所有的構架(FR)區是人免疫球蛋白序列的構架區。人源化抗體任選可包含至少一部分的人免疫球蛋白恆定區(Fc)。

【0075】 在本申請中，術語“鹵素”通常是指氟、氯、溴、碘，例如可以是氟、氯。

【0076】 在本申請中，術語“烷基”通常是指烷除去氫原子所衍生的殘基。烷基可以是取代的或非取代的，替代或者非替代的。術語“烷基”通常指飽和的直鏈或支鏈脂肪族烴基，其具有從母體烷的相同碳原子或兩個不同的碳原子上除去氫原子所衍生的殘基，其可以為包含1至20個碳原子的直鏈或支鏈基團，例如含有1至12個碳原子，例如含有1至6個碳原子的鏈烷基。烷基的非限制性實例包括但不限於甲基、乙基、丙基、丙基、丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，替代或者非替代的，例如當被取代時，取代基可以在任何可使用的連接點上被取代，所述取代基可以獨立地任選選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基和氧代基中的一個或多個取代基所取代，

例如可以是氫、氘、氚、氟、鹵素、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{SO}_2\text{H}$ 或 C_{1-6} 脂肪族基團。例如當被環烷基取代時，為環烷基烷基。

【0077】 在本申請中，術語“伸烷基”通常指飽和的直鏈或支鏈脂肪族烴基，其具有2個從母體烷的相同碳原子或兩個不同的碳原子上除去兩個氫原子所衍生的殘基，其可以為包含1至20個碳原子的直鏈或支鏈基團，例如，術語“伸甲基”可以是指1個碳原子的基團除去兩個氫原子所衍生的殘基。伸甲基可以是取代的或非取代的，替代或者非替代的；例如含有1至12個碳原子，例如含有1至6個碳原子的伸烷基。伸烷基的非限制性實例包括但不限於伸甲基($-\text{CH}_2-$)、1,1-伸乙基($-\text{CH}(\text{CH}_3)-$)、1,2-伸乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1,1-伸丙基($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$)、1,2-伸丙基($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$)、1,3-伸丙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1,4-伸丁基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)和1,5-伸丁基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)等。伸烷基可以是取代的或非取代的，替代或者非替代的，例如當被取代時，取代基可以在任何可使用的連接點上被取代，所述取代基可以獨立地任選選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基和氧代基中的一個或多個取代基所取代，例如可以是

氫、氘、氚、氟、鹵素、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{SO}_2\text{H}$ 或 C_{1-6} 脂肪族基團。伸甲基或伸烷基可以是取代的或非取代的。

【0078】 術語“烷氧基”指 $-\text{O}-$ (烷基)和 $-\text{O}-$ (非取代的環烷基)，其中烷基或環烷基的定義如本文所述。烷氧基的非限制性示例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、環丙氧基、環丁氧基、環戊氧基、環己氧基。烷氧基可以是任選取代的或非取代的，當被取代時，取代基優選為一個或多個以下基團，其獨立地選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基。

【0079】 在本申請中，術語“烯基”通常是指含有一個或多個雙鍵的直鏈或支鏈烴基。烯基的示例性實例包括烯丙基、高烯丙基、乙烯基、巴豆基、丁烯基、戊烯基和己烯基等。具有一個以上雙鍵的 C_{2-6} 鏈烯基的示例性實例包括丁二烯基、戊二烯基、己二烯基和己三烯基以及它們的支化形式。不飽和鍵(雙鍵)的位置可以是在碳鏈的任何一個位置。烯基可以是取代的或非取代的。

【0080】 在本申請中，術語“伸烯基”通常是指具有從烯烴的碳原子上除去兩個氫原子所衍生的殘基。例如，可以是伸烯丙基、伸

乙烯基、伸丁烯基、伸戊烯基和伸己烯基等。伸烯基可以是取代的或非取代的。

【0081】 在本申請中，術語“炔基”通常是指不飽和直鏈或支鏈炔基，例如乙炔基、1-丙炔基、炔丙基、丁炔基等。炔基可以是取代的或非取代的。

【0082】 在本申請中，術語“伸炔基”通常是指具有從炔烴的碳原子上除去兩個氫原子所衍生的殘基。例如，可以是伸乙炔基、伸丙炔基、伸炔丙基、伸丁炔基等。伸炔基可以是取代的或非取代的。

【0083】 在本申請中，術語“芳基”通常是指具有芳環上除去氫原子所衍生的殘基。術語“芳環”可以指具有共軛的 π 電子體系的6至14員全碳單環或稠合多環(也就是共享毗鄰碳原子對的環)，可以為6至10員，例如苯和萘。所述芳環可以稠合於雜芳基、雜環基或環烷基環上，其中與母體結構連接在一起的環為芳基環。芳基可以是取代的或非取代的，當被取代時，取代基可以為一個或多個以下基團，其獨立地選自以下組：烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、和雜環烷硫基。芳基可以是取代的或非取代的。

【0084】 在本申請中，術語“雜芳基”通常是指具有從雜芳環的碳原子上除去氫原子所衍生的殘基。術語“雜芳環”指包含1至4個雜

原子、5至14個環原子的雜芳族體系，其中雜原子可以選自以下組：氧、硫和氮。雜芳基可以為5至10員，可以為5員或6員，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述雜芳基環可以稠合於芳基、雜環基或環烷基環上，其中與母體結構連接在一起的環為雜芳基環。雜芳基可以是任選取代的或非取代的，當被取代時，取代基可以為一個或多個以下基團，其獨立地選自以下組：烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、和雜環烷硫基。雜芳基可以是取代的或非取代的。

【0085】 在本申請中，術語“環烷基”指飽和或部分不飽和單環或多環環狀烴取代基，環烷基環包含3至20個碳原子，優選包含3至12個碳原子，優選包含3至10個碳原子，優選包含3至8個碳原子，更優選包含3至6個碳原子。單環環烷基的非限制性示例包括環丙烷基、環丁烷基、環戊烷基、環戊烯基、環己烷基、環己烯基、環己二烯基、環庚烷基、環庚三烯基、環辛烷基等；多環環烷基包括螺環、稠環和橋環的環烷基。環烷基可以是取代的或非取代的，當被取代時，取代基可以在任何可使用的連接點上被取代，所述取代基優選獨立地任選選自氫原子、鹵素、烷基、烷氧基、鹵代烷基、羥

基、羥烷基、氰基、胺基、硝基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代。

【0086】 在本申請中，術語“部分不飽和的”通常是指環狀結構中環分子間至少含一個雙鍵或三鍵。術語“部分不飽和”涵蓋帶有多處不飽和的環狀結構，但並非意在包括本申請所定義的芳環或雜芳環。術語“不飽和的”表示部分具有一個或多個不飽和度。

【0087】 在本申請中，術語“雜環基”指飽和或部分不飽和單環或多環環狀輕取代基，其包含3至20個環原子，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或硫的雜原子，其餘環原子為碳。優選包含3至12個環原子，其中1~4個是雜原子；更優選包含3至8個環原子，其中1-3是雜原子；更優選包含3至6個環原子，其中1-3個是雜原子；最優選包含5或6個環原子，其中1-3個是雜原子。單環雜環基的非限制性示例包括吡咯烷基、四氫吡喃基、呋啶基、嗎啉基、硫代嗎啉基和高呋嗪基的等。多環雜環基包括螺環、稠環和橋環的雜環基。所述雜環基環可以稠合於芳基、雜芳基或環烷基環上，其與母體結構連接在一起的環為雜環基。雜環基可以是取代的或非取代的，當被取代時，取代基可以在任何可使用的連接點上被取代，所述取代基優選獨立地任選選自氫原子、鹵素、烷基、烷氧基、鹵代烷基、羥基、羥烷基、氰基、胺基、硝基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代。

【0088】 在本申請中，術語“成環原子”通常是指環狀結構上包含的原子。例如，成環原子可以是苯環上的碳原子，可以是吡啶環上的氮原子。當成環原子上連接氫原子時，成環原子可以是取代的或非取代的。

【0089】 在本申請中，術語“各自獨立地”通常是指變量適用於任何一種情況，而不考慮在相同化合物中具有相同或不同定義的變量存在與否。例如其中的變量可以是指化合物的取代基種類、數量或化合物中原子的種類等。例如，在化合物中出現2次R並且R被定義為“獨立地碳或氮”時，兩個R可以均為碳，兩個R可以均為氮，或一個R可以為碳而另一個R為氮。

【0090】 在本申請中，術語“任選”或“任選地”通常意味著隨後所描述的事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生地場合。例如，“任選被烷基取代的雜環基團”意味著烷基可以但不必須存在，該說明可以包括雜環基團被烷基取代的情形和雜環基團不被烷基取代的情形。

【0091】 在本申請中，術語“取代的”通常指基團中的一個或多個氫原子，例如為最多5個，例如為1～3個氫原子彼此獨立地被對應數目的取代基取代。取代基僅處在它們的可能的化學位置，本領域技術人員能夠在不付出過多努力的情況下確定(透過實驗或理論)

可能或不可能的取代。例如，具有游離氫的胺基或羥基與具有不飽和(如烯屬)鍵的碳原子結合時可能是不穩定的。

【0092】 在本申請中，術語0個或多個(例如，0個或1個以上、0個或1個、0個)伸甲基單元被“替代”通常指當所述結構包含1個或多個伸甲基單元時，所述一個或多個伸甲基單元可以不被替代，或被一個或多個不是伸甲基的基團(例如-NHC(O)-、-C(O)NH-、-C(O)-、-OC(O)-、-C(O)O-、-NH-、-O-、-S-、-SO-、-SO₂-、-PH-、-P(=O)H-、-NHSO₂-、-SO₂NH-、-C(=S)-、-C(=NH)-、-N=N-、-C=N-、-N=C-或-C(=N₂)-)所替代。

【0093】 在本申請中，基團X與基團Y的“連接”通常可以處於任一定向，任一定向通常是指在基團X用於連接體Y和基團Z時，所述基團X的兩個或更多個連接位點可以任意地與基團Y或基團Z連接。

【0094】 在本申請中，術語“化合物”通常指具有兩種或兩種以上不同員素的物質。例如，本申請的化合物可以是有機化合物，例如本申請的化合物可以是分子量500以下的化合物，可以是分子量1000以下的化合物，也可以是分子量1000以上的化合物，也可以是10000以上、100000以上的化合物。在本申請中，化合物還可以是透過化學鍵相連的化合物，例如可以是一個或多個分子量1000以下的分子透過化學鍵與生物大分子相連的化合物，所述生物大分子可以是高聚糖、蛋白、核酸、多肽等。例如本申請的化合物可以包

括蛋白質與一個或多個分子量1000以下的分子相連的化合物，可以是包括蛋白質與一個或多個分子量10000以下的分子相連的化合物，可以是包括蛋白質與一個或多個分子量100000以下的分子相連的化合物。

【0095】 在本申請中，如本領域技術人員可知的，“烷基”、“烯基”、“環烷基”等之類的術語可以在名稱前加一個標識表示在特定情況下基團中存在的原子數，例如， C_1-C_4 烷基， C_3-C_7 環烷氧基， C_1-C_4 烷基羰基胺基等，“C”後所跟下標數字表示在基團中存在的碳原子數。例如， C_3 烷基是指具有三個碳原子的烷基(例如，正丙基，異丙基)； C_{1-10} 中，基團的成員可具有落入1-10範圍內的任何數目的碳原子。

【0096】 基團中的一個或多個氫原子，例如為最多5個，例如為1~3個氫原子彼此獨立地被對應數目的取代基取代。取代基僅處在它們的可能的化學位置，本領域技術人員能夠在不付出過多努力的情況下確定(透過實驗或理論)可能或不可能的取代。例如，具有游離氫的胺基或羥基與具有不飽和(如烯屬)鍵的碳原子結合時可能是不穩定的。

【0097】 在本申請中，本申請的化合物或配體-藥物偶聯物包含其互變異構物、內消旋體、外消旋體、對映異構物、和/或非對映異構物。在本申請中，術語“非對映異構物”通常是指具有兩個或更多

個掌性中心並且其分子不是彼此的鏡像的立體異構物。非對映異構物可以具有不同的物理性質，例如、熔點、沸點、波譜性質和反應性。在本申請中，術語“互變異構物”或“互變異構形式”可互換使用，通常是指可透過低能壘(low energy barrier)互相轉化的不同能量的結構異構物。例如，質子互變異構物(proto tautomer)(也稱為質子移變互變異構物(prototropic tautomer))包括透過質子遷移進行的互相轉化，諸如酮-烯醇異構化和仲胺-烯胺異構化。價鍵互變異構物(valence tautomer)包括透過一些成鍵電子的重組進行的互相轉化。在本申請中，術語“內消旋體”通常是指分子內含有不對稱性的原子，但具有對稱因素而使分子內總旋光度為零。術語“外消旋體”或“外消旋混合物”是指由等莫耳量的兩種對映異構物物質構成的組成物。

【0098】 在本申請中，術語化合物或配體-藥物偶聯物的“異構物”通常包含化合物的互變異構物、內消旋體、外消旋體、對映異構物非對映異構物。

【0099】 術語“配體-藥物偶聯物”通常是指配體透過穩定的連接單元與具有生物活性的細胞毒性藥物相連。在本申請中“配體-藥物偶聯物”可以為抗體-藥物偶聯物(antibody drug conjugate，ADC)，所述ADC可以是指把單株抗體或者抗體片段透過穩定的連接單元與具有生物活性的細胞毒性藥物相連。

【0100】 在本申請中，術語“配體”通常指能識別和結合目標細胞相關的抗原或受體的大分子化合物。配體的作用可以是將藥物呈遞給與配體結合的目標細胞群，這些配體包括但不限於蛋白類激素、凝集素、生長因子、抗體或其他能與細胞、受體和/或抗原結合的分子。在本申請中，配體可以表示為 **Pc**，配體抗原透過配體上的雜原子與連接單元形成連接鍵。配體可以為抗體或其抗原結合片段 (**Ab**)，所述抗體可以選自嵌合抗體、人源化抗體、全人抗體或鼠源抗體；所述抗體可以是單株抗體。

【0101】 術語“細胞毒性藥物”通常指毒性藥物，所述細胞毒性藥物可以在腫瘤細胞內具有較強破壞其正常生長的化學分子。細胞毒性藥物可以在足夠高的濃度下殺死腫瘤細胞。所述“細胞毒性藥物”可以包括毒素，如細菌、真菌、植物或動物來源的小分子毒素或酶活性毒素，放射性同位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 或 Lu 的放射性同位素)，毒性藥物，化療藥物，抗生素和核溶酶，例如，可以是毒性藥物，包括但不限於喜樹鹼衍生物，例如，可以是喜樹鹼衍生物依沙替康(化學名：(1*S*,9*S*)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1*H*,12*H*-苯并[*de*]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-*b*]喹啉-10,13(9*H*,15*H*)-二酮)。

【0102】 術語“連接子單元”或“連接子結構”通常指指一端與配體連接而另一端與細胞毒性藥物相連的化學結構片段或鍵，也可以連接其他連接子後再與細胞毒性藥物相連。所述直接或間接連接配體可以是指所述基團透過共價鍵直接連接配體，也可以是透過連接子結構連接配體。例如，可以使用包含酸不穩定連接子結構(例如脙)、蛋白酶敏感(例如肽酶敏感)連接子結構、光不穩定連接子結構、二甲基連接子結構、或含二硫化物連接子結構的化學結構片段或鍵作為連接子結構。

【0103】 術語某個結構“任選地與其它分子部分相連接”通常是指該結構不與任何其它化學結構相連接，或者該結構與一個或多個不同於該結構的其它化學結構(例如本申請所述的配體)相連接(例如，透過化學鍵連接、或透過連接子結構連接)。

【0104】 術語“載藥量”通常是指每個配體上加載的細胞毒性藥物平均數量，也可以表示為細胞毒性藥物和抗體量的比值，細胞毒性藥物載量的範圍可以是每個配體(Ab)連接0-12個，例如1-10個細胞毒性藥物。在本申請的實施方式中，載藥量表示為Na，示例性的可以為1，2，3，4，5，6，7，8，9，10的均值。可用常規方法如UV/可見光光譜法，質譜，ELISA試驗和HPLC特徵鑒定偶聯反應後每個ADC分子的載藥量。在本申請中，本申請的化合物的某些原子可能以一種以上的同位素形式出現。例如，氫可能以氕(^1H)、氘

(^2H)和氚(^3H)的形式存在，碳可能以三種不同的同位素(^{12}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C)自然存在。可併入本申請化合物中的同位素示例還包括但不限於 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{129}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I ，或者類似的同位素。因此，相對於這些同位素的自然豐度，本申請的化合物可富集在一種或多種這些同位素中。如本領域技術人員所知，此類同位素富集化合物可用於多種用途。例如，用重同位素如氘(^2H)替代可能會提供某些治療優勢，這可以是由於更高的代謝穩定性。例如，氘(^2H)的自然豐度約為0.015%。因此，自然界中大約每6500個氫原子，就有一個氘原子。因此，本申請的含氘化合物在一個或多個位置(視情況而定)的氘豐度大於0.015%。除非另有指明，否則本申請所述的結構還可以包括僅在是否存在一個或多個同位素富集原子方面存在差別的化合物。舉例而言，除了氫原子被氘或氚所取代，或碳原子被碳13或碳14所取代之外，其餘部分均與本申請結構一致的化合物均在本申請的範圍之內。

【0105】 在本申請中，術語“藥物組成物”通常是指含有一種或多種本申請所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，以及其他組分例如生理學/可藥用的載劑和賦形劑。藥物組成物可以是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。常規的藥物組成物的製備可以見中國藥典。藥物組成物可以用於肌肉和皮下給藥的無菌注射水或油混懸浮液

的形式。可按已知技術，用上述那些適宜的分散劑或濕潤劑和懸浮劑配製該混懸浮液。無菌注射製劑也可以是在無毒腸胃外可接受的稀釋劑或溶劑中製備的無菌注射溶液或混懸浮液，例如1,3-丁二醇中製備的溶液。此外，可方便地用無菌固定油作為溶劑或懸浮介質。例如，可使用包括合成甘油單或二酯在內的任何調和固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以製備注射劑。

【0106】 在本申請中，術語“藥學上可接受的鹽”或“可藥用的鹽”通常是指本申請化合物或配體-藥物偶聯物的鹽，或本申請中所述的化合物的鹽，這類鹽用於哺乳動物體內時可以具有安全性和/或有效性，且可以具有應有的生物活性，本申請抗體-抗體藥物偶聯化合物可以與酸形成鹽，藥學上可接受的鹽的非限制性實例包括：鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、琥珀酸鹽、抗壞血酸鹽、草酸鹽、硝酸鹽、梨酸鹽、磷酸氫鹽、磷酸二氫鹽、水楊酸鹽、檸檬酸氫鹽、酒石酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽。

【0107】 在本申請中，術語“藥學上可接受的載劑”通常是指給予治療劑，例如抗體或多肽、基因和其它治療劑的載劑或載劑。該術語指本身不誘導對接受組成物的個體有害的抗體產生並且可以給予而不產生過度毒性的任何藥物載劑。合適的載劑可以是大的、代

謝緩慢的大分子，例如蛋白質、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚胺基酸、胺基酸共聚物、脂質聚集物和滅活的病毒顆粒。本領域技術人員熟知這些載劑。治療組成物中藥學上可接受的載劑可包括液體，例如水、鹽水、甘油和乙醇。這些載劑中也可存在輔助物質，例如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝物質等。

【0108】 在本申請中，術語“治療(treatment)”和“治療(treating)”通常是指獲得有益或希望的結果的方法，所述有益或希望的結果包括但不限於治療益處。治療益處包括但不限於根除、抑制、減少或改善所治療的潛在障礙。另外，治療益處是透過根除抑制、減少或改善與潛在的障礙相關的一種或多種生理症狀實現的，從而在患者中觀察到改善，但是患者仍然可能患有潛在障礙。

【0109】 在本申請中，術語“預防(prevention)”和“預防(preventing)”通常是指獲得有益或希望的結果的方法，所述有益或希望的結果包括但不限於預防益處。為了預防益處，可以向處於患上特定疾病的風險的患者或向報告具有疾病的一種或多種生理症狀的患者施用藥物組成物，即使尚未診斷出該疾病。

【0110】 在本申請中，術語“受試者”或“患者”通常是指人類(即，任何年齡組的男性或女性，例如，小兒對象(例如，嬰兒、兒童、青少年)或成人對象(例如，年輕人、中年人或老年人))和/或其他靈長類動物(例如，食蟹猴、恆河猴)；哺乳動物，包括商業上相

關的哺乳動物，如牛、豬、馬、綿羊、山羊、貓和/或犬；和/或鳥類，包括商業上相關的鳥類，如雞、鴨、鵝、鵪鶉和/或火雞。

【0111】 術語“治療有效量”、“治療有效劑量”和“有效量”是指本發明配體-藥物偶聯物單獨或與其它治療藥物組合給予細胞、組織或受試者時，有效預防或改善一種或多種疾病或病況的症狀或該疾病或病況的發展的量。治療有效劑量還指足以導致症狀改善的劑量，例如治療、治癒、預防或改善相關醫學病況或者提高這類病況的治療、治癒、預防或改善的速度的量。當對個體施用單獨給予的活性成分時，治療有效劑量僅是指該成分。當組合施用時，治療有效劑量是指引起治療效果的活性成分的綜合量，不論是組合、依次給予還是同時給予。治療劑的有效量將導致診斷標準或參數提高至少10%，通常至少20%，優選至少約30%，更優選至少40%，最優選至少50%。

【0112】 術語“癌症”在本文中用於指表現出異常高位準的增殖和生長的一組細胞。癌症可能是良性的(也稱為良性腫瘤)，惡性前或惡性。癌細胞可以是實體癌細胞或白血病癌細胞。本文使用的術語“腫瘤”是指包含癌症的一個或多個細胞。術語“腫瘤生長”在本文中用於指代包含癌症的一種或多種細胞的增殖或生長，其導致癌症的大小或程度的對應增加。

抗B7H4抗體

【0113】 術語“B7-H4”或“B7H4”指人B7蛋白質家族的成員，也稱為CD276，是具有四個Ig樣胞外結構域的I型跨膜蛋白。B7-H4是抗原呈遞細胞或癌細胞表面表現的免疫檢查點蛋白之一，對T細胞的功能活化有抑制作用。術語“B7-H4”包括由細胞天然表現的B7-H4的任何變異體或同種型。本發明的抗體可與得自非人物種的B7-H4交叉反應。作為另一種選擇，該抗體也可以是人B7-H4特異性的，可不表現出與其他物種的交叉反應性。B7-H4或其任何變異體或同種型可從天然表現它們的細胞或組織中分離而得，或使用本領域通用以及本文所述的那些技術透過重組技術產生。優選地，抗B7-H4抗體標靶具有正常糖基化模式的人源B7-H4。

【0114】 本發明術語“抗B7H4抗體”、“抗B7H4”、“B7H4抗體”或“結合B7H4的抗體”是指能夠以足夠的親合力結合B7H4蛋白或其片段以致所述抗體可以用作標靶B7H4中的診斷劑和/或治療劑。

【0115】 在一些方案中，在本發明的藥物偶聯物、組成物、用途或方法中使用的抗體的CDR序列包括來自於PCT/CN2021/102952中描述的抗體PR008199的CDR序列。在一些方案中，在本發明的藥物偶聯物、組成物或用途中使用的抗體的可變區序列包括來自於PCT/CN2021/102952中描述的抗體PR008199的可變區序列。在一些方案中，在本發明的藥物偶聯物、組成物、用途或方法中使用的抗體的胺基酸序列包括來自於

PCT/CN2021/102952 中描述的抗體 PR008199 的全長胺基酸序列。

【0116】 本發明所述的抗 B7H4 抗體 DB1001 (PR008199) 或其抗原結合片段參考 PCT/CN2021/102952 中描述製備。在一些方案中，在本發明的藥物偶聯物、組成物、用途或方法中使用的抗體的 CDR 序列包含胺基酸序列分別如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和包含胺基酸序列分別如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些方案中，在本發明的藥物偶聯物、組成物或用途中使用的抗體的可變區序列包括胺基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的重鏈可變區，和胺基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的輕鏈可變區。在一些方案中，在本發明的藥物偶聯物、組成物、用途或方法中使用的抗體包括胺基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的重鏈，和胺基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示的輕鏈。在一些方案中，在本發明的藥物偶聯物、組成物、用途或方法中使用的抗體為抗 B7H4 抗體 DB1001。

【0117】 抗 B7H4 抗體 DB1001 的可變區胺基酸序列如下，CDR 區依照 IMGT 編號規則確定。

【0118】 DB1001 重鏈可變區：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWV
RQAPGKGLEWVAVISYDASNEY YADSVKGRFIISRDNSKDT
LYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGTLVTV
SS(SEQ ID NO:7)

HCDR1: SFGMH(SEQ ID NO:1)
HCDR2: VISYDASNEY YADSVKG(SEQ ID NO:2)
HCDR3: GGALRWYFAY(SEQ ID NO:3)

【0119】 DB1001輕鏈可變區：

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQK
PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSED
FAVYYCQQYRSWPPLTFGGGGTKVEIK(SEQ ID NO:8)

LCDR1: RASQSISSNLG(SEQ ID NO:4)
LCDR2: GASTRAT(SEQ ID NO:5)
LCDR3: QQYRSWPPLT(SEQ ID NO:6)

【0120】 DB1001重鏈胺基酸序列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWV
RQAPGKGLEWVAVISYDASNEY YADSVKGRFIISRDNSKDT
LYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK(SEQ ID NO:9)

【0121】 DB1001輕鏈胺基酸序列

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQK
PGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYRSWPPLTF
GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID
NO:10)

【0122】 可採用用於產生抗體的任何合適方法來產生本發明的
抗體。任何合適形式的B7H4都可用作產生抗體的免疫原(抗原)。透
過舉例而非限制，任何B7H4變異體或其片段都可用作免疫原。在一
些實施方式中，產生鼠源的單株抗人B7H4抗體的融合瘤細胞可透過
本領域公知的方法產生。來源於齧齒動物(如小鼠)的抗體在體內用
作治療藥物時可能引起不需要的抗體免疫原性，重複使用導致人體
產生針對治療性抗體的免疫反應，這類免疫反應至少導致喪失治療
功效，而嚴重的則導致潛在致死過敏反應。降低齧齒動物抗體的免
疫原性的一種方法包括嵌合抗體的產生，其中將小鼠可變區與人恆
定區融合 (Liu 等 (1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA

84:3439-43)。然而，嵌合抗體中的完整齧齒動物可變區的保留仍可能在患者中引起有害的免疫原性。將齧齒動物可變結構域的互補決定區(CDR)環移植到人構架上(即人源化)已被用於進一步將齧齒動物序列減至最低(Jones等(1986)Nature 321 :522；Verhoeyen等(1988)Science 239:1534)。

【0123】 在一些實施方式中，本發明的嵌合或人源化抗體可基於所製備的鼠單株融合瘤抗體的序列來製備。編碼重鏈和輕鏈免疫球蛋白的DNA可以從目標鼠融合瘤中獲得，並且使用標準分子生物學技術進行工程改造以包含非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。

【0124】 在一些實施方式中，本發明所述的嵌合B7H4抗體，可使用本領域已知的方法將融合瘤來源的免疫球蛋白重鏈和輕鏈可變區與人IgG恆定區有效連接(參見例如屬於Cabilly等人的美國專利No.4,816,567)，獲得嵌合型重鏈和嵌合型輕鏈來製備。在一些實施方式中，本發明的嵌合抗體包含的恆定區可選自任何人IgG亞型，如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，優選IgG4。

【0125】 在一些實施方式中，本發明的嵌合B7H4抗體可由嵌合型輕鏈與嵌合型重鏈表現質體“混合和匹配”轉染表現細胞獲得，此類“混合和匹配”的抗體的B7H4結合可使用上述結合測定和其它常規結合測定(例如，ELISA)來進行測試。

【0126】 本發明所述的人源化抗體，可以使用本領域已知的方法將鼠源CDR區插入人種系框架區。參見Winter等人的美國專利 No. 5,225,539 及 Queen 等人的美國專利 No. 5,530,101；5,585,089；5,693,762和6,180,370。

【0127】 在一些實施方式中，胺基酸變化包括胺基酸缺失、插入或置換。在一些實施方式中，本發明的抗B7H4抗體或其抗原結合片段包括具有已透過胺基酸缺失、插入或置換突變的，但仍與上述抗體(特別地在上述序列中描繪的CDR區中)有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的胺基酸序列的那些抗體。在一些實施方式中，本發明的抗體與具體序列中描繪的CDR區相比較時，在CDR區中已透過胺基酸缺失、插入或置換的胺基酸突變不超過1、2、3、4或5個。

【0128】 在一些實施方式中，可在本文中所提供抗體的Fc區中引入一個或多個胺基酸修飾，以此產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置處包含胺基酸修飾(例如置換)的人Fc區序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

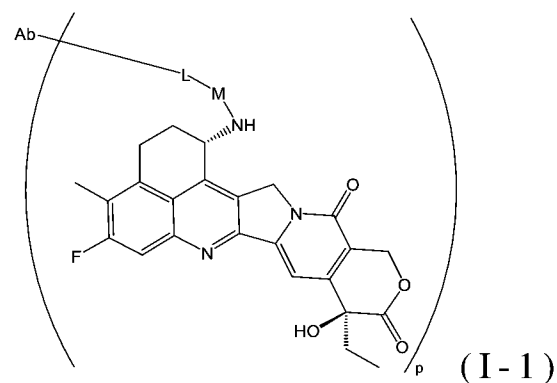
【0129】 在一些實施方式中，可能需要產生經半胱胺酸工程改造的抗體，例如“硫代MAb”，其中抗體的一或多個殘基經半胱胺酸殘基置換。

【0130】 在一些實施方式中，本文中所提供的抗體可進一步經修飾為含有本領域中已知且輕易獲得的其他非蛋白質部分。適合抗體衍生作用的部分包括，但不限於，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性實例包括，但不限於，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/馬來酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚環氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多員醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

藥物偶聯物

【0131】 本申請提供了一種抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物形式，其可以具有選自以下組的一種或多種效果：(1)具有對腫瘤細胞的體外增殖的抑制活性；(2)具有標靶抑制性；(3)具有血漿穩定性；(4)具有體內抑瘤效果；(5)具有旁觀毒殺效應(Bystander Effect)；(6)具有抗轉運體轉運能力；(7)具有體內腫瘤標靶能力；和(8)具有良好的體內安全性。

【0132】 本申請提供一種抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(I-1)所示：



其中，

M 為 -*L*²-*L*¹-*C*(*O*)-；

*L*² 為 -*O*- 或 -*S*-；

*L*¹ 為 -(*C*(*R*^{1a})(*R*^{1b}))_{*m*}-*CH*₂-、*C*₃-*C*₆飽和的環烷基或3-6員飽和的雜環基，所述*C*₃-*C*₆飽和的環烷基和3-6員飽和的雜環基各自獨立地任選被一個或多個*R*^{2a}取代；

m 選自 1、2、3 或 4；

R^{1a} 各自獨立地選自氫、鹵素、羥基、胺基和*C*₁-*C*₆烷基，所述*C*₁-*C*₆烷基任選被一個或多個*R*取代；優選為鹵素或被1、2或3個*R*任選取代的*C*₁-*C*₆烷基；

R^{1b}和*R*^{2a}各自獨立地選自氫、鹵素、羥基、胺基和*C*₁-*C*₆烷基，所述*C*₁-*C*₆烷基任選被一個或多個*R*取代；

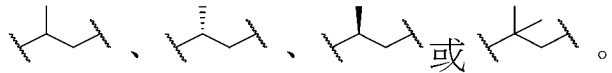
R 各自獨立地為氫或鹵素；

L 是連接子單元；

p 表示平均連接數，且*p* 選自 1 到 10 的整數或小數，優選 3-8 的整數或小數；

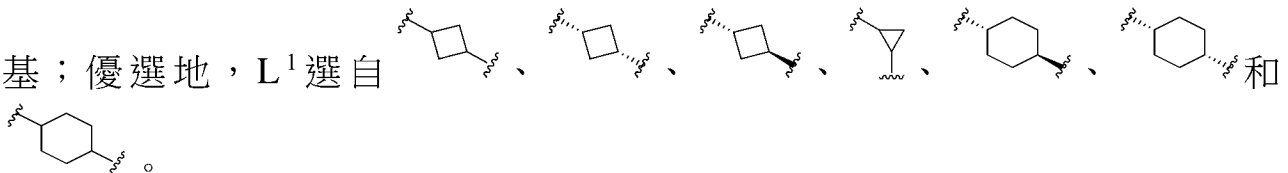
Ab為抗B7H4抗體或其抗原結合片段。

【0133】 在一些實施方式中，抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，和所述輕鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；優選地，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含：胺基酸序列如SEQ ID NO:7所示的重鏈可變區，和胺基酸序列如SEQ ID NO:8所示的輕鏈可變區；更優選地，本發明所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含：胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示的重鏈，和胺基酸序列如SEQ ID NO:10所示的輕鏈。

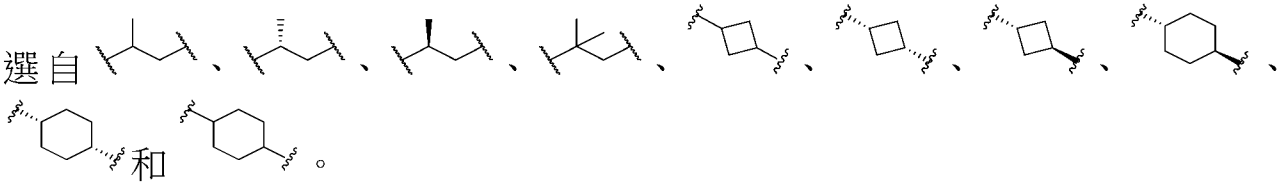
【0134】 在一些實施方式中，在式(I-1)、(II-1)和(II-2)中， L^1 為 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ ， R^{1a} 選自：鹵素、羥基、胺基和被R任選取代的 C_1-C_6 烷基， R^{1b} 選自：氫、鹵素、羥基、胺基和被R任選取代的 C_1-C_6 烷基， m 選自1、2、3或4，R各自獨立地可以為氫或鹵素；優選地， R^{1a} 選自：鹵素和 C_1-C_6 烷基， R^{1b} 選自：氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基， m 選自1或2；優選地， R^{1a} 為 $-CH_3$ ； R^{1b} 選自：氫和 $-CH_3$ ， m 選自1或2；優選地， L^1 選自：。

【0135】 在一些實施方式中，在式(I-1)、(II-1)和(II-2)中， L^1 為 C_3-C_6 飽和的環烷基或3-6員飽和的雜環基，所述 C_3-C_6 飽和的環

烷基和3-6員飽和的雜環基各自獨立地任選被一個或多個 R^{2a} 取代， R^{2a} 各自獨立地選自：氫、鹵素、羥基、胺基和 C_1-C_6 烷基；優選地， L^1 為任選被一個或多個 R^{2a} 取代的 C_3-C_6 飽和的環烷基， R^{2a} 各自獨立地選自：氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基；優選地， L^1 為 C_3-C_6 飽和的環烷基；優選地， L^1 選自



【0136】 在一些實施方式中，在式(I-1)、(II-1)和(II-2)中， L^1

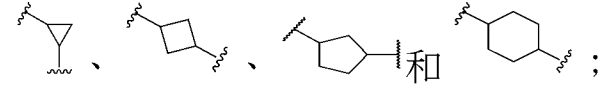


【0137】 在一些實施方式中，在式(I-1)、(II-1)和(II-2)中， M

為 $-L^2-L^1-C(O)-$ ；

L^2 為 $-O-$ 或 $-S-$ ；優選為 $-O-$ ；

L^1 為 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ 或 C_3-C_6 飽和的環烷基，所述 C_3-C_6 飽和的環烷基任選被一個或多個 R^{2a} 取代；優選地， L^1 為任選被1、2或3個 R^{2a} 取代的：

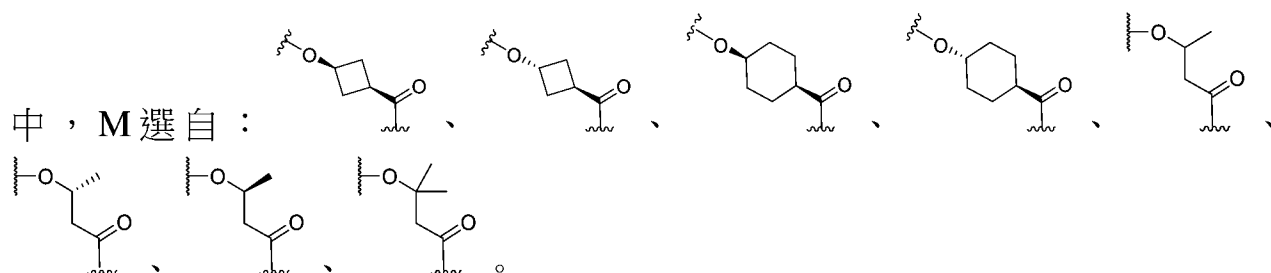


m 選自1或2；

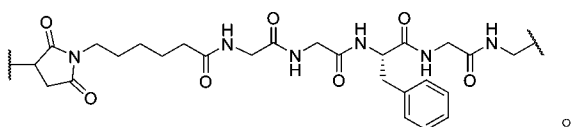
R^{1a} 各自獨立地選自鹵素和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代；

R^{1b} 和 R^{2a} 各自獨立地選自氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代； R 各自獨立地為氫或鹵素。

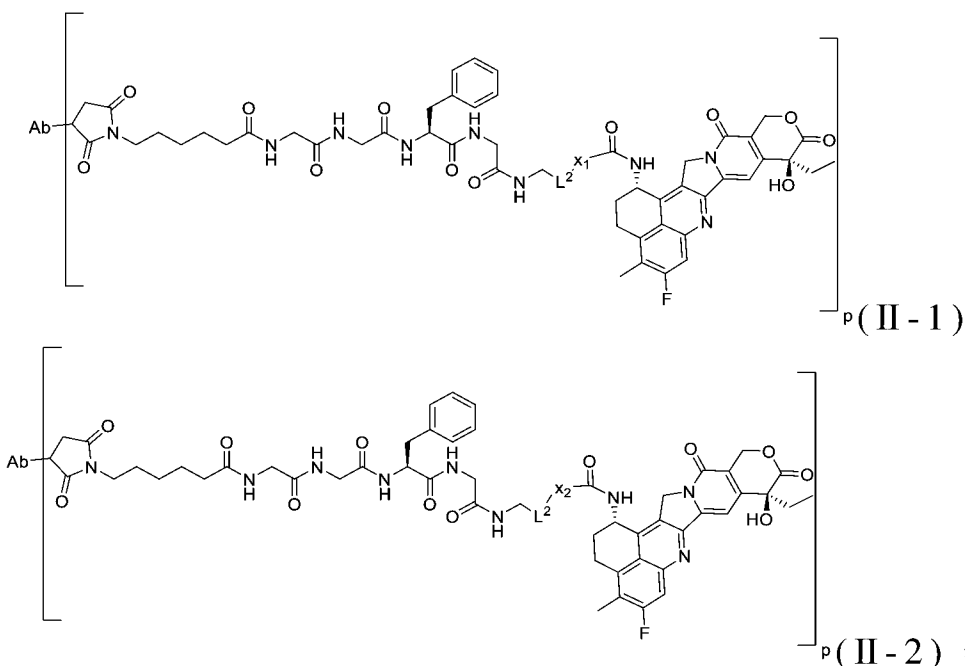
【0138】 在一些優選地實施方式中，在式(I-1)、(II-1)和(II-2)



【0139】 在一些特別優選地實施例中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述L為



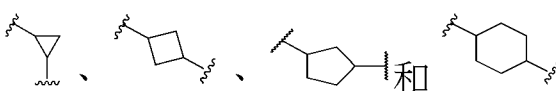
【0140】 在一些實施方式中，本發明所述抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(II-1)或(II-2)所示：



其中，

L^2 為 -O- 或 -S- ； 優選地， L^2 為 -O- ；

X_1 選自任選被 1、2 或 3 個 R^{2a} 取代的 C_3-C_6 飽和的環烷基； 優選

為任選被 1、2 或 3 個 R^{2a} 取代的：  ；

X_2 選自 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ ；

m 選自 1 或 2 ；

R^{1a} 為鹵素或被 1、2 或 3 個 R 任選取代的 C_1-C_6 烷基；

R^{1b} 或 R^{2a} 各自獨立可以為氫、鹵素或被 1、2 或 3 個 R 任選取代的 C_1-C_6 烷基；

R 各自獨立地可以為氫或鹵素；

p 表示平均連接數，且 n 選自 1 到 10 的整數或小數， 優選 3-8 的整數或小數；

Ab 為抗 B7H4 抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含胺基酸序列分別如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述輕鏈可變區包含胺基酸序列分別如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3； 優選地，本發明所述抗 B7H4 抗體或其抗原結合片段包含：胺基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的重鏈可變區，和胺基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的輕鏈可變區； 更優選地，本發明所述抗 B7H4 抗體或其抗原結合片段

包含：胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示的重鏈，和胺基酸序列如SEQ ID NO:10所示的輕鏈。

【0141】 在一些實施方式中，本發明所述平均連接數 p 可以為2到8的整數或小數。例如，所述平均連接數 p 可以為3到8的整數或小數。例如，所述平均連接數 p 可以為1到2、2到3、3到4、4到5、5到6、6到7、7到8、8到9、9到10的整數或小數。

藥物組成物和藥物製劑

【0142】 在又一個方面，本發明提供了一種藥物組成物，其包含如本文所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，和藥學上可接受的載劑或賦形劑。

【0143】 應理解，本發明提供的抗B7H4抗體藥物偶聯物或、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，或其藥物組成物可以整合製劑中合適的運載體、賦形劑和其他試劑以聯合給藥，從而提供改善的轉移、遞送、耐受性等。

【0144】 術語“藥物組成物”指這樣的製劑，其允許包含在其中的活性成分的生物學活性有效的形式存在，並且不包含對施用所述製劑的受試者具有不可接受的毒性的另外的成分。

【0145】 可以透過將具有所需純度的本發明的抗B7H4抗體藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽與一種或多種任選的藥用佐劑 (Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A.編

輯(1980))混合來製備包含本文所述的抗B7H4抗體的藥物製劑，優選地以水溶液或凍乾製劑的形式。

【0146】 本發明的藥物組成物或製劑還可以包含一種或多種其它活性成分，所述活性成分是被治療的特定適應證所需的，優選具有不會不利地影響彼此的互補活性的那些活性成分。在一些實施方式中，其它的活性成分為化療劑、免疫檢查點抑制劑、生長抑制劑、抗生素或已知的各種抗腫瘤或抗癌劑，所述活性成分以對於目的用途有效的量合適地組合存在。在一些實施方式中，本發明的藥物組成物還包含編碼抗B7H4抗體的多核苷酸的組成物。

【0147】 在又一個方面，本發明提供了一種藥物組合，其包含如本文所述的抗體藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或本文所述的藥物組成物，以及一種或多種另外的治療劑。

【0148】 在又一個方面，本發明提供了一種套組，其包括如本文所述的抗體藥物偶聯物或、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物或本文所述的藥物組成物，優選其進一步包括給藥裝置。

醫藥用途

【0149】 在又一個方面，本發明提供了如本文所述的抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，或本文所述的藥物組成物在製備用於治療和/或預防B7H4媒介的疾病或病症的藥物中的用途，優選地，所述疾病或病症為B7H4陽性表現的癌症。

【0150】 在又一個方面，本發明提供了如本文所述的抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，或本文所述的藥物組成物，其用於治療和/或預防B7H4媒介的疾病或病症，優選地，所述疾病或病症為B7H4陽性表現的癌症。

【0151】 在又一個方面，本發明提供了一種治療和/或預防B7H4媒介的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用如本文所述的抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，或本文所述的藥物組成物，優選地，所述疾病或病症為B7H4高表現的癌症。

【0152】 在一些實施方式中，所述癌症選自乳腺癌、卵巢癌和子宮內膜瘤。

【0153】 在一些實施方式中，本發明給藥方式包括但不限於口服、靜脈內、皮下、肌內、動脈內、關節內(例如在關節炎關節中)、透過吸入、氣霧劑遞送或腫瘤內給予等。

【0154】 在一些實施方式中，本發明提供了向受試者聯合施用治療有效量的一種或多種療法(例如治療方式和/或其它治療劑)。在一些實施方式中，所述療法包括手術治療和/或放射療法。

【0155】 在一些實施方式中，本發明提供的方法或用途還包括向個體施用一種或多種療法(例如治療方式和/或其它治療劑)。可以

單獨或與療法中的其它治療劑組合使用本發明的抗體藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽。例如，可以與至少一種另外的治療劑共施用。

【0156】 本發明的積極進步效果在於：

【0157】 本發明抗B7H4抗體藥物偶聯物中，抗B7H4抗體或其抗原結合片段透過連接子單元與具有生物活性的細胞毒性藥物相連，抗體藥物偶聯物轉移至腫瘤細胞後，連接子被切斷，游離出細胞毒性藥物H-M-D。例如，本發明抗體藥物偶聯物DB1001-X1轉移至細胞後，游離出小分子化合物P-II-3；本發明抗體藥物偶聯物DB1001-X2轉移至細胞後，游離出小分子化合物P-III-30。本發明細胞毒性藥物對NCI-N87細胞、JIMT-1細胞、Colo205細胞和MDA-MB-231細胞具有明顯增強的增殖抑制活性，能發揮優異的抗腫瘤作用。

【0158】 本發明抗B7H4抗體藥物偶聯物對B7H4陽性表現MDA-MB-468細胞具有較好的內吞效應，且優於參照ADC-1。

【0159】 本申請抗體藥物偶聯物對B7H4陽性表現的人小細胞肺癌細胞MDA-MB-468、人乳腺細胞癌SKBR3、人乳腺細胞癌MX-1、子宮內膜癌細胞RL95-2具有顯著的增殖抑制活性。

【0160】 本發明抗B7H4抗體藥物偶聯物對能阻斷B7H4陽性細胞對不同供體來源T細胞的抑制，且優於參照ADC-1。

【0161】 本發明抗B7H4抗體藥物偶聯物在體外人、大鼠和猴血漿中具有良好的穩定性。同時，由於細胞毒性藥物P-III-30的低血漿濃度和短半衰期，P-III-30的全身暴露量較低，從而具有較高的安全性。

【0162】 本發明抗B7H4抗體藥物偶聯物對MDA-MB-468荷瘤小鼠、乳腺癌細胞MX-1荷瘤小鼠、乳腺癌細胞MCF-7荷瘤小鼠、子宮內膜癌細胞RL95-2荷瘤小鼠、卵巢癌細胞OVCAR-3荷瘤小鼠具有顯著的抗腫瘤活性。

【0163】 因此，本發明在B7H4的陽性表現疾病(例如癌症)方面有著良好的應用前景。

【圖式簡單說明】

【0164】 圖1：抗體藥物偶聯物對MDA-MB-468荷瘤小鼠藥效評價。

【0165】 圖2：抗體藥物偶聯物在人、食蟹猴、和小鼠B7H4轉染的HEK293T細胞的種屬交叉反應。

【0166】 圖3：抗體藥物偶聯物和過表現人B7家族蛋白細胞的結合特異性。

【0167】 圖4：抗體藥物偶聯物在MDA-MB-468細胞不同時間點內吞產生螢光訊號的積分面積。

【0168】 圖5：抗體藥物偶聯物在MDA-MB-468細胞的內吞效率。

【0169】 圖6：抗體藥物偶聯物，單抗，荷載分子(細胞毒素)對腫瘤細胞MX-1體外增殖抑制效率(3D細胞培養法)。

【0170】 圖7：抗體藥物偶聯物，單抗，荷載分子(細胞毒素)對腫瘤細胞RL95-2體外增殖抑制效率(3D細胞培養法)。

【0171】 圖8：抗體藥物偶聯物，單抗，荷載分子(細胞毒素)對腫瘤細胞JIMT-1體外增殖抑制效率(3D細胞培養法)。

【0172】 圖9：抗體藥物偶聯物對PBMC來源的T細胞活化。

【0173】 圖10：抗體藥物偶聯物對PBMC來源的T細胞活化。

【0174】 圖11：抗體藥物偶聯物在人、猴、大鼠體外血漿培育21天後荷載分子(細胞毒素)釋放率。

【0175】 圖12：抗體藥物偶聯物對乳腺癌MX-1荷瘤小鼠藥效評價。

【0176】 圖13：抗體藥物偶聯物對子宮內膜癌RL95-2荷瘤小鼠藥效評價。

【0177】 圖14：抗體藥物偶聯物對卵巢癌OVCAR-3荷瘤小鼠藥效評價。

【實施方式】

具體實施方式

樣品檢測

【0178】 1. ADC DAR值分析方法 – HIC-HPLC(疏水層析法)

高效液相層析儀：沃特世e2965高效液相層析系統。

層析管柱：MabPac™ HIC-Butyl 5µm 4.6×100mm(廠家：Thermo)；

流動相A：1.5 M (NH4)₂SO₄ + 50 mM K₂HPO₄ (pH 7.0)；

流動相B：50 mM K₂HPO₄ (pH 7.0)/異丙醇(75:25 V/V)；

按照以下洗提程序進行洗提，

時間	流動相 B
0-2 min	0%-10%
2-22 min	10%-65%
22-24 min	65%-100%
24-26 min	100%-0%
26-30 min	0%

檢測條件：設置流動相流速為1 ml/min，檢測波長為280 nm，柱溫30℃。

【0179】 2. SEC純度分析 – SEC-HPLC(分子排阻層析法)

高效液相層析儀：1260安捷倫液相層析儀。

層析管柱：Waters Xbridge BEH200 SEC (7.8×300 mm, 3.5 µm)

流動相：50mM NaH₂PO₄ + 200 mM精胺酸(pH 6.80) +10%異丙醇

時間	流動相
----	-----

0-30 min	100%
----------	------

檢測條件：設置流動相流速為0.5 ml/min，檢測波長為280 nm，柱溫30°C。

【0180】 本發明包括所敘述特定實施方式的所有組合。本發明的進一步實施方式及可應用性的完整範疇將自下文所提供的詳細描述變得顯而易見。然而，應理解，儘管詳細描述及特定實施例指示本發明的優選實施方式，但僅以說明的方式提供這些描述及實施例，因為本發明的精神及範疇內的各種改變及修改將自此詳細描述對熟悉此項技術者變得顯而易見。出於所有目的，包括引文在內的本文所引用的所有公開物、專利及專利申請將以引用的方式全部併入本文。

實施例

【0181】 提供以下實施例以證明並進一步解釋本發明的一些優選的實施方式和方面，不應被解釋為限制其範圍。

實施例1、抗B7H4抗體

【0182】 本發明的抗體參照PCT/CN2021/102952製備，其中，抗B7H4抗體DB1001(PR008199)的可變區胺基酸序列如下，CDR區依照Kabat編號規則確定。

【0183】 DB1001重鏈可變區：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWV
RQAPGKGLEWVAVISYDASNEY YADSVKGRFIISRDNSKDT
LYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGTLVTV
SS(SEQ ID NO:7)

HCDR1: SFGMH(SEQ ID NO:1)
HCDR2: VISYDASNEY YADSVKG(SEQ ID NO:2)
HCDR3: GGALRWYFAY(SEQ ID NO:3)

【0184】 DB1001輕鏈可變區：

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQK
PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSED
FAVYYCQQYRSWPPLTFGGGGTKVEIK(SEQ ID NO:8)

LCDR1: RASQSISSNLG(SEQ ID NO:4)
LCDR2: GASTRAT(SEQ ID NO:5)
LCDR3: QQYRSWPPLT(SEQ ID NO:6)

【0185】 根據以上序列，設計引物PCR搭建得到VH/VK基因片
段，獲得可變區。抗體可變區再與恆定區基因片段進行同源重組，
建構DB1001完整抗體序列。經過轉染CHO細胞後，按照常規表現
純化方法得到抗體DB1001。

【0186】 DB1001重鏈胺基酸序列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWV
RQAPGKGLEWVAVISYDASNEY YADSVKGRFIISRDNSKDT
LYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGTLVTV

SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK(SEQ ID NO:9)

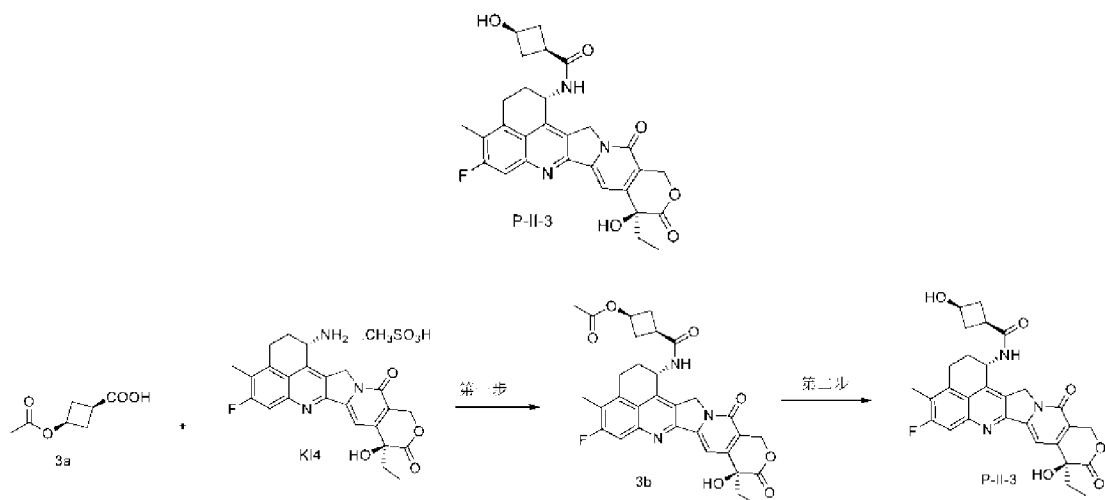
【0187】 DB1001輕鏈胺基酸序列

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQK
PGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYRSWPPLTF
GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC9SEQ ID
NO:10)

實施例2、抗B7H4抗體藥物偶聯物(ADC)的製備

2.1、細胞毒素(payload)的製備

製備例1



【0188】 第一步：

在氮氣保護下，在0℃下向KI4 (900 mg，1.69 mmol)，HATU (691 mg，1.88 mmol)，3a (320 mg，2.00 mmol) 的DMF(18 mL) 溶液中加入DIEA (500 mg，3.87 mmol)。並在25℃攪拌3小時。TLC (EA) 顯示原料反應完全。將反應液滴加到320 mL去離子水中，過濾，得灰色固體850 mg，產率：87%

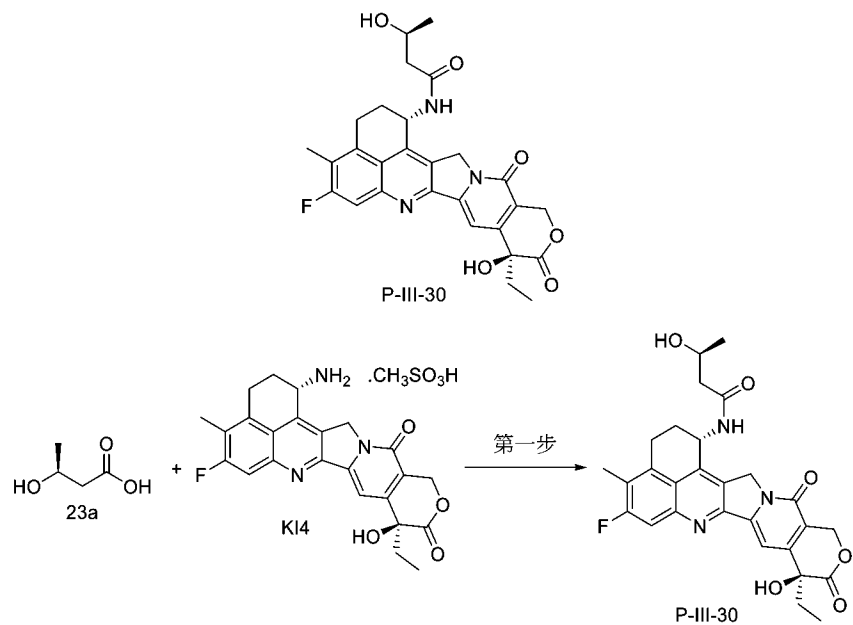
【0189】 第二步：

向3b (100 mg，0.174 mmol)的MeOH/DCM (1/1，3 mL)中加入NaHCO₃ (42 mg，0.50 mmol)固體並在25℃攪拌3小時，TLC(EA)顯示反應完全，將反應液過濾，低溫旋轉乾燥後，用aq.HCl (0.5 M，10 mL)製漿後過濾，經prep-HPLC(0.1%TFA)製備後凍乾得到15毫克灰色固體。產率：16%。

【0190】 MS m/z (ESI)：534 [M+1]；

¹H-NMR (400 MHz , DMSO-D) : 8.45(d, 1H), 7.81 (d, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.52 (m, 1H), 5.58-5.56 (m, 1 H), 5.44 (s, 2H), 5.14 (dd, 2 H), 3.96 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.19 (m, 2H), 2.53-2.28 (m, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.20-2.00(m, 4H), 1.95-1.80 (m, 2H), 0.89 (t, 3H) 。

製備例2



【0191】 第一步

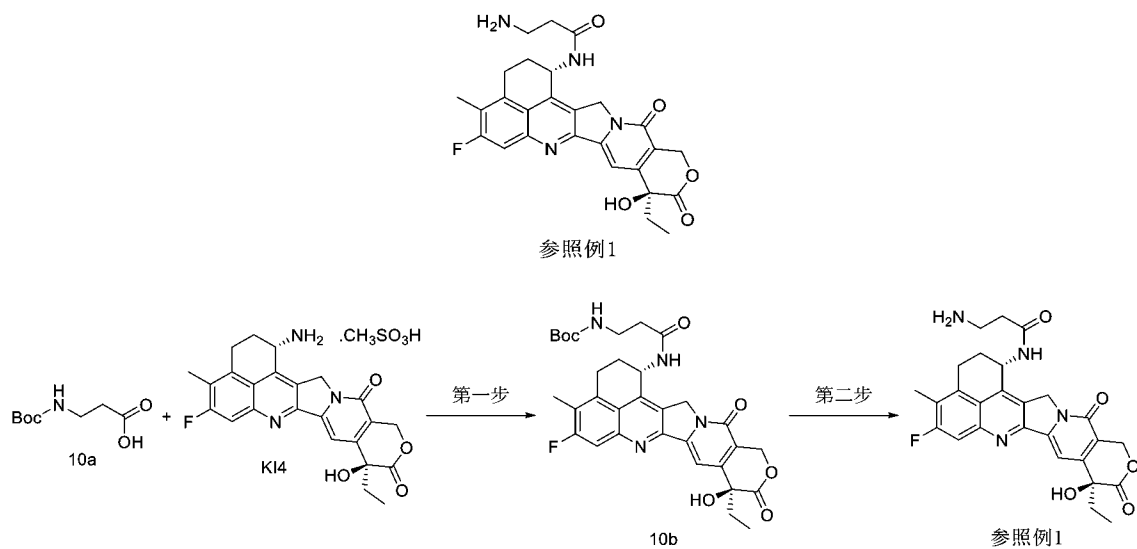
氮氣保護下，向KI4(100 mg , 0.19 mmol) , HATU(85.7 mg , 0.23 mmol) , 23a(21.5 mg , 0.21 mmol)的DMF(2 mL)溶液中滴加DIEA(60.6 mg , 0.47 mmol) , 加完後在0 °C反應2 小時。LCMS 顯示原料反應完全。將反應液滴加到20 mL水中攪拌，析出固體後過濾，得60.2 mg灰色固體P-III-30，產率：61%。MS-ESI: m/z 522.2 [M+H]⁺ 。

示反應結束。將反應液滴入處於攪拌狀態下的水(50 mL)中，加完後靜置5分鐘，過濾，濾餅凍乾後得20 mg 灰色固體25，產率：40%。

【0194】 MS-ESI: m/z 534.3 [M+H]⁺；

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.26 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.59 – 5.50 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.15 (d, J = 18.8 Hz, 1H), 4.98 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 3.28 – 3.16 (m, 1H), 3.15 – 3.02 (m, 1H), 2.74 – 2.52 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.24 – 2.04 (m, 4H), 1.92 – 1.79 (m, 4H), 0.86 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

參照例1



【0195】 第一步

取KI4 (50 mg，0.094 mmol)，26a (18 mg，0.094 mmol)，HATU (39 mg，0.103 mmol)加入DMF (3 mL)中，氮氣置換後加入DIEA (48 mg，0.376 mmol)，25℃下反應1.5小時後LCMS顯示反應結束。將反應液滴入處於攪拌狀態下的水(50 mL)中，加完

後靜置5分鐘，過濾，濾餅凍乾後得30 mg 灰色固體26b，產率：52%。

MS-ESI: m/z 607.4 [M+H]⁺。

【0196】 第二步

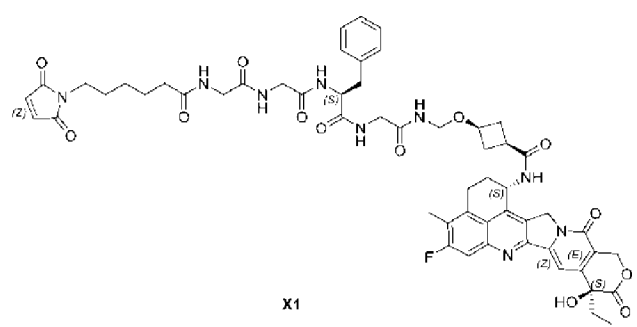
取26b (30 mg，0.049 mmol)溶於DCM (2 mL)中，N₂置換後降溫至0℃，加入TFA (0.5 mL)，0℃下反應1.5小時後LCMS顯示反應結束。將反應液低溫旋轉乾燥，用DCM帶一次後加乙腈和水凍乾得20 mg 黃色固體，產率：80%。

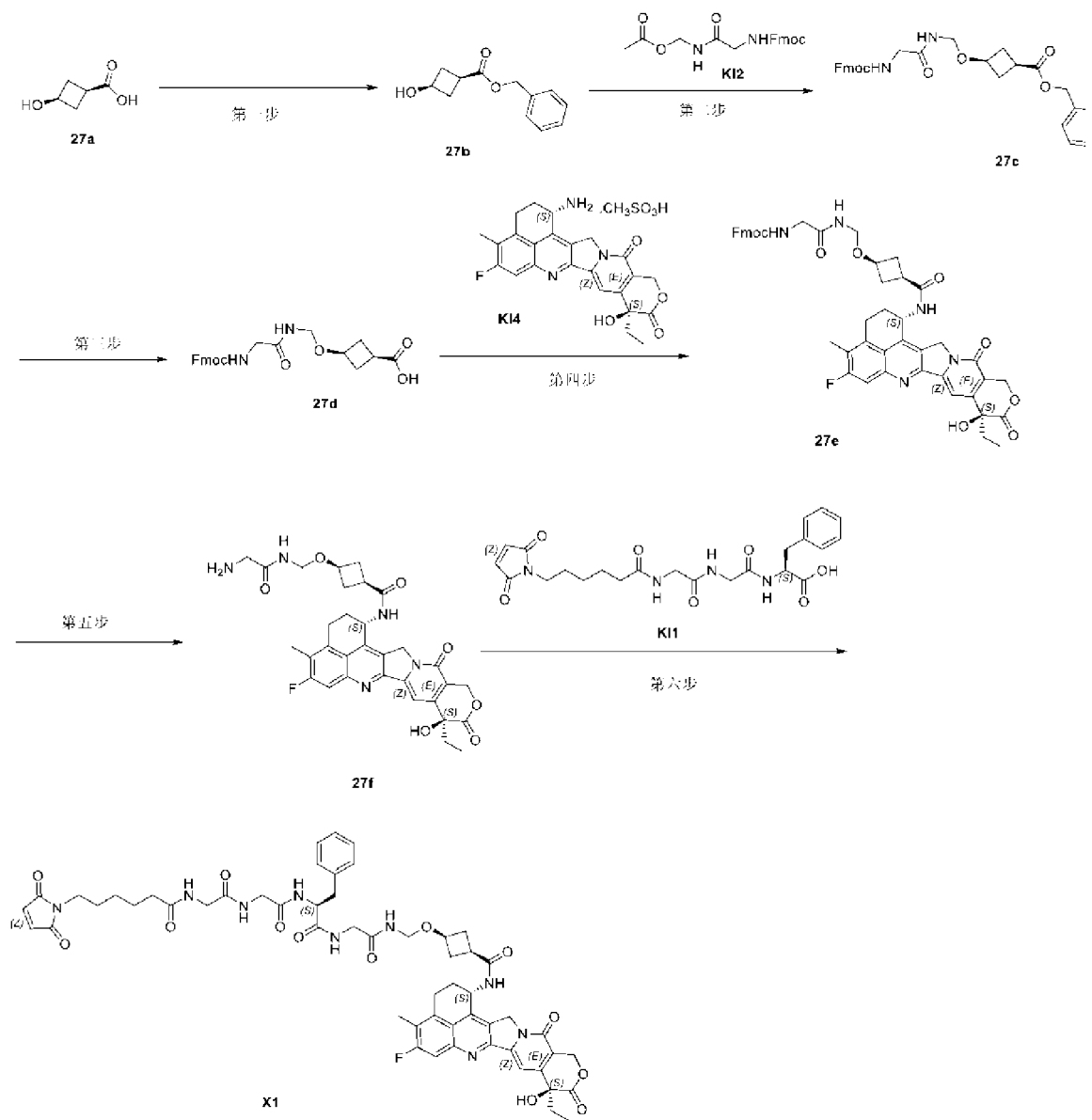
【0197】 MS-ESI: m/z 507.1 [M+H]⁺；

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.67 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.86 – 7.66 (m, 4H), 7.32 (s, 1H), 6.56 (brs, 1H), 5.63 – 5.54 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.29 (d, J = 18.9 Hz, 1H), 5.22 (d, J = 18.9 Hz, 1H), 3.23 – 3.15 (m, 2H), 3.13 – 3.03 (m, 2H), 2.57 – 2.51 (m, 2H), 2.43 – 2.38 (m, 3H), 2.27 – 2.08 (m, 2H), 1.94 – 1.78 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

2.2、連接子-細胞毒素 (linker-payload) 的製備

連接子-細胞毒素 X1





【0198】 第一步

氮氣保護下，向 27a (5.00 g，43.0 mmol)，NaHCO₃ (10.9 g，129 mmol) 的 DMF (50 mL) 溶液中滴加苄溴 (11.0 g，64.6 mmol)，並在 25℃ 反應 17 小時。TLC (PE/EA= 2/1) 顯示反應完全，將反應液加入到 500 mL 水中，用 EA (250 mL) 萃取兩遍，分液後經飽和氯化鈉水溶液 (500 mL) 洗滌，無水 Na₂SO₄ 乾燥，濃縮通過管柱 (PE:EA=3:2) 得 5.1 g 無色液體，產率：57.1%。

【0199】 第二步

氮氣保護下，向KI2 (4.00 g, 10.9 mmol), TsOH(800 mg, 4.65 mmol) 的THF(30 mL)溶液中，在0℃下，滴加27b (4.50 g, 21.8 mmol)的THF (10 mL) 溶液，並在25℃反應2小時。TLC (PE/EA = 1/2)顯示反應完全，將反應液加入到200 mL水中，用EA (200 mL) 萃取兩次分液，無水Na₂SO₄乾燥，濃縮通過管柱 (PE/EA=3/2)得白色固體1.56g，產率：26%。

【0200】 第三步

氮氣環境下，在0℃下，向27c (800mg, 1.55mmol)的EtOH (8 mL)和EA (8 mL)混合溶液中加入Pd/C (80 mg)，在0℃攪拌2.5小時。LCMS顯示反應完全。反應液經矽藻土過濾，用EA(200 mL)洗滌濾餅濃縮後用THF (20 mL)溶解旋轉乾燥得白色固體600 mg，產率：91%

【0201】 第四步

氮氣保護下，在0℃下，向27d (220mg, 0.515mmol)，HY-13631A (250 mg, 0.47mmol)和HATU (214mg, 0.56mmol) 的DMF(6 mL)溶液中加入DIEA (152mg, 1.18mmol)，並在0℃反應2小時。LCMS顯示反應完全。將反應液加入檸檬酸水溶液(pH = 4)(150 mL)中，過濾，並用175 mL水洗滌濾餅，濾乾，用油泵拉乾得棕色固體260 mg，產率：66%。

【0202】 第五步

氮氣保護下，在0℃下，向27e (260 mg, 0.309 mmol)的DCM(30 mL)溶液中滴加二乙胺(8 mL)，並在0℃反應3小時。LCMS顯示反應完全。將反應液加入0℃的石油醚溶液(600 mL)中，有固體析出，靜置待固體吸附於瓶底後，倒出溶液，用油泵拉乾，得棕色固體90mg，產率：47.1%。

【0203】 第六步

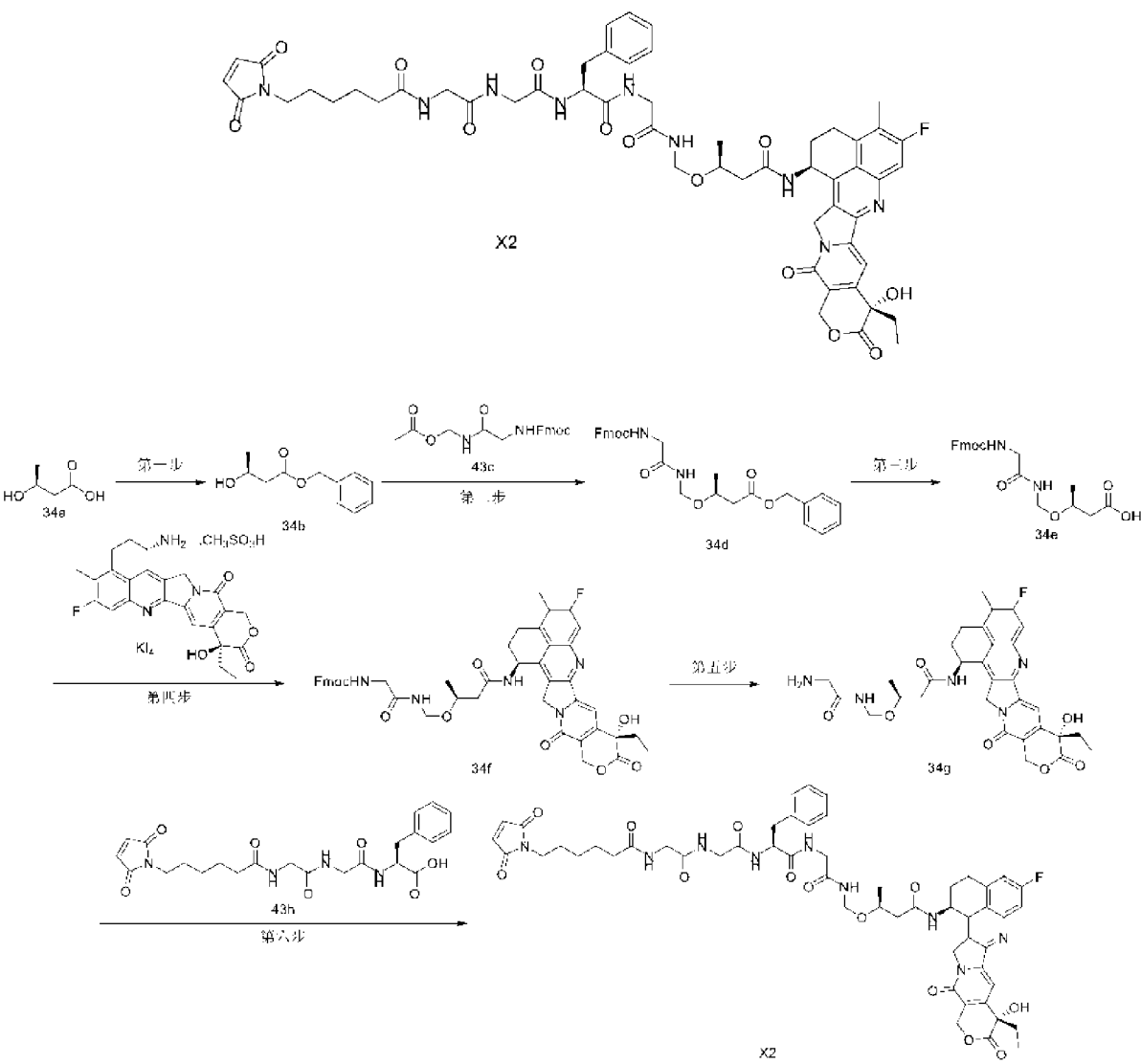
氮氣保護下，在0℃下，向27f (90 mg, 0.13 mmol)，KI-1 (92 mg, 0.19 mmol) 和DIEA(50 mg, 0.39 mmol)的DMF(2.5 mL)溶液中加入HATU (74 mg, 0.19 mmol)並在0℃反應2小時。LCMS顯示基本反應結束。在0℃下，將反應液加入PH=4的檸檬酸水溶液(30 mL)中，有絮狀固體析出，過濾，經製備板(DCM/MecOH=10/1)得9.2 mg淡黃色固體X1，產率：6%。

【0204】 MS m/z (ESI) : 1074 [M+1]

H-NMR (400 MHz, MeOD) : 7.65 (d, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.30-7.21(m, 5H), 6.79 (s, 2H), 5.69-5.65 (m, 1 H), 5.57 (d, 1H), 5.43-5.10 (m, 3H), 4.70 (d, 2H), 4.48-4.39 (m, 2H), 4.10-4.05 (m, 1H), 4.01-3.75 (m, 5H), 3.46 (t, 2H), 3.22-3.15 (m, 2H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.37-2.20 (m, 6H), 2.10-2.02 (m, 2H), 2.00-1.92 (m, 2H) 1.68-1.57 (m, 6H), 1.01 (t, 3H)

第 76 頁，共 122 頁(發明說明書)

連接子-細胞毒素 X2



【0205】 第一步

將34a (5 g , 48.0 mmol)、K₂CO₃ (19.9 g , 144.0 mmol) 溶於DMF(20 mL)中，滴加苄溴(12.3 g , 72.0 mmol)，25℃下反應17小時。TLC (PE/EA = 3/1)檢測原料反應完全。將反應液加入水(200 mL)中、用EA (250 mL)萃取分液，用飽和NaCl洗滌，無水Na₂SO₄乾燥後濃縮通過管柱(PE:EA = 2:1)得8.7 g無色液體34b，產率93%。MS-ESI: m/z 195.1 [M+H]⁺。

【0206】 第二步

取34c (7.3 g, 19.8 mmol)、TsOH (1.46 g, 8.5 mmol)溶於THF (20 mL)中，氮氣保護並降溫至0℃，滴加43b (7.7 g, 39.6 mmol)的THF (10 mL)溶液，加完後0℃反應2小時。TLC(PE/EA = 2/1)顯示原料大部分反應。將反應液倒入100 mL水中，DCM(100 mL)萃取，分液並用飽和NaCl洗滌，無水Na₂SO₄乾燥後通過管柱(PE/EA = 1/1)，得3.9 g無色稠狀物34d，產率：39%。MS-ESI: m/z 503.3 [M+H]⁺。

【0207】 第三步

氮氣環境下，在0℃下，向34d (1.9 g, 3.78 mmol)的EtOH (100 mL)和EA (100 mL)混合溶液中加入Pd/C(1 g, 10 wt.%)，在0℃反應3小時。TLC(PE/EA = 2/1)顯示反應完全。反應液經矽藻土過濾，用EA/EtOH(1:1, 100 mL×3)洗滌濾餅，濾液濃縮，並用THF(50 mL×3)溶解旋轉乾燥並重複三次得1 g灰色固體34e，產率：64%。MS-ESI: m/z 435.2 [M+Na]⁺。

【0208】 第四步

在氮氣保護下，0℃下向34e (426 mg, 1.03 mmol)，KI4 (500 mg, 0.94 mmol)和HATU (429 mg, 1.13 mmol)的DMF (20 mL)溶液中滴加DIEA (303 mg, 2.35 mmol)，加完後在0℃反應2小時。LCMS顯示反應結束。將反應液滴到300 mL水中，攪拌後靜置5分

鐘，過濾，濾餅用DCM/MeOH(10:1，100 mL)的溶液溶解後，乾燥旋轉乾燥拌樣，管柱層析(EA:MeOH = 30:1)得600 mg黃色固體34f，產率：77%。MS-ESI: m/z 830.3 [M+H]⁺。

【0209】 第五步

氮氣保護下，在0℃下，向34f (150 mg，0.18 mmol)的DCM(5 mL)溶液中滴加二乙胺(5 mL)，並在0℃反應2小時。LCMS顯示反應完全。將石油醚溶液(100 mL×6)加入反應液中，有固體析出，靜置待固體沉澱後，倒出溶液，再用油泵拉乾，得120 mg白色粉末34g，LCMS顯示產物含量為70%，產率：76%。MS-ESI: m/z 608.3 [M+H]⁺。

【0210】 第六步

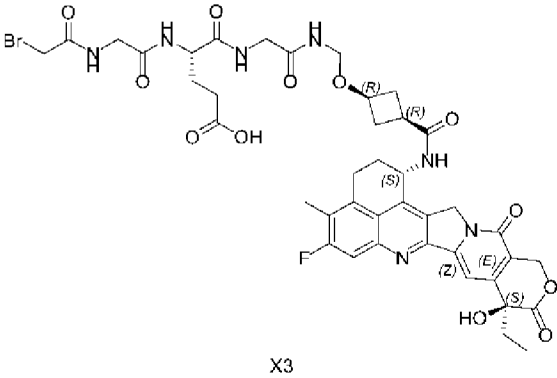
在氮氣保護下，向34g (60 mg，0.099 mmol)、43h (51 mg，0.108 mmol)、和DIEA (32 mg，0.25 mmol)的DMF (1 mL)溶液中在0℃下加入HATU (45 mg，0.118 mmol)的DMF (1 mL)溶液，並在0℃下反應2小時。LCMS顯示原料反應完全。將反應液直接過反相管柱，洗提劑((MeCN/MeOH=1/1)：H₂O=60%：40%)，純化得14.8 mg黃色固體X2，產率14%。

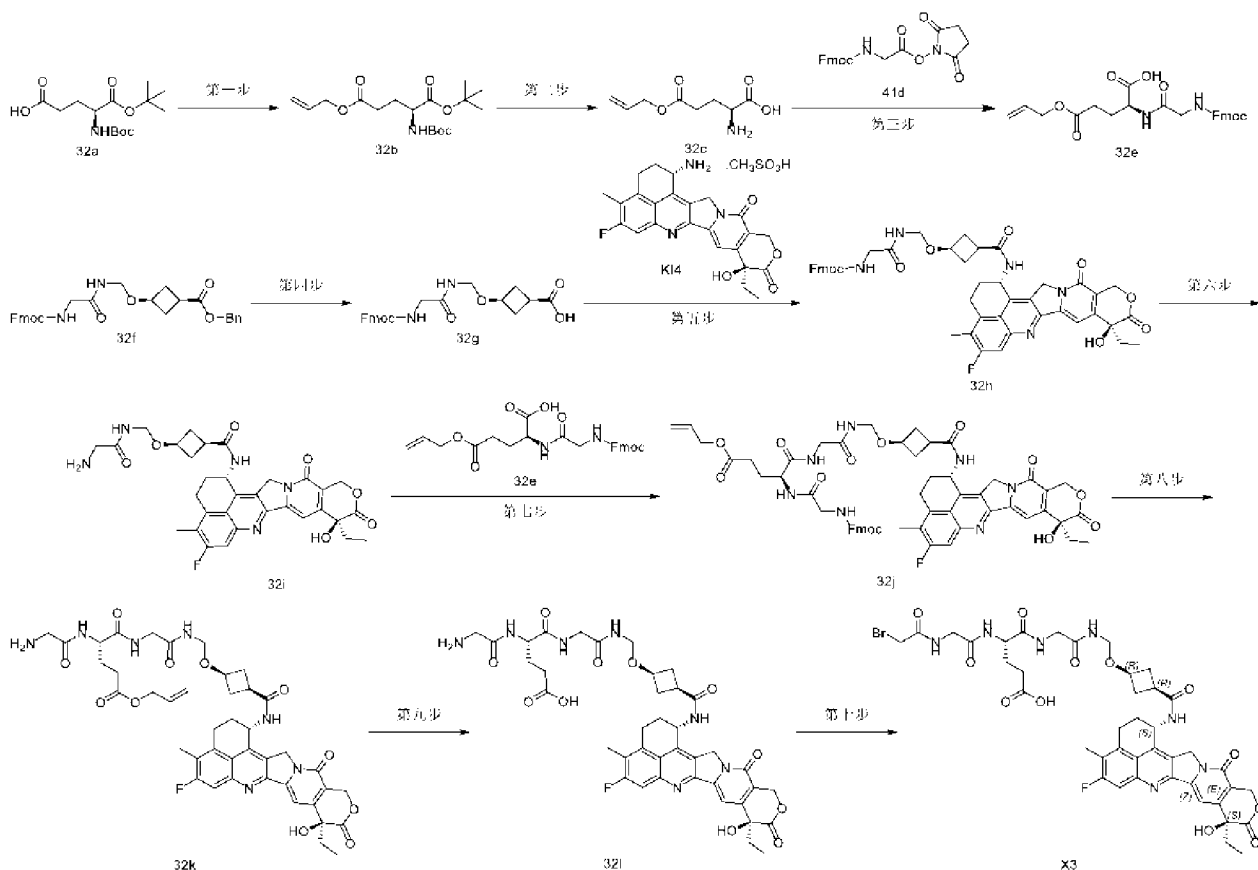
【0211】 MS-ESI: m/z 1062.4 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.69 – 7.61 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 2H), 7.16 – 7.09 (m, 3H), 6.76 (s, 2H), 5.70 –

5.64 (m, 1H), 5.60 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.40 – 5.31 (m, 2H), 5.26 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 4.65 – 4.50 (m, 7H), 4.25 – 4.16 (m, 1H), 3.87 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 3.83 – 3.76 (m, 3H), 3.72 (d, J = 17.0 Hz, 2H), 3.44 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.25 – 3.17 (m, 2H), 3.10 – 3.02 (m, 1H), 2.92 – 2.83 (m, 1H), 2.45 – 2.39 (m, 5H), 2.32 – 2.20 (m, 5H), 1.97 – 1.89 (m, 2H), 1.63 – 1.50 (m, 4H), 1.34 – 1.20 (m, 6H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

連接子-細胞毒素 X3





【0212】 第一步

向 32a (2.00 g , 6.6 mmol) , K₂CO₃(1.82 g , 13.2 mmol) 的 MeCN(20 mL) 中加入溴丙烯(960 mg , 7.92 mmol) , 在 20℃ 下攪拌 5 小時。TLC(PE/EA = 1/2) 顯示反應結束。將反應液倒入水 100 mL 中 , 將 pH 值調至 5 , 用 EA(100 mL) 萃取三次 , 無水硫酸鈉乾燥 , 旋轉乾燥通過管柱純化(PE/EA = 2/1) 得 1.83 g 白色固體 32b , 產率 : 81 % 。

【0213】 第二步

向32b (1.38 g, 4.02 mmol)的DCM (10 mL)中加入TFA (10 mL), 在25°C下攪拌17小時。TLC (PE/EA = 1/3)顯示反應結束。將反應液旋轉乾燥得0.91 g黃色粘狀物32c, 產率不計。

【0214】 第三步

向32c (910 mg, 4.87 mmol), NaHCO₃ (613 mg, 7.3 mmol)的DME/H₂O (20 mL/10 mL)中加入41d (1.92 g, 4.87 mmol), 在25°C下攪拌3小時。TLC (DCM/MeOH = 1/1)顯示反應結束。將反應液倒入水100 mL中, 用aq.HCl(1 N)將pH值調至5, 用EA(150 mL)萃取兩次, 無水硫酸鈉乾燥, 旋轉乾燥通過管柱純化(DCM/MeOH = 20/1)得1.53 g白色固體32e, 產率: 67%。MS-ESI: m/z 467.4 [M+H]⁺。

【0215】 第四步

向32f (3 g, 5.83 mmol)的MeOH (50 mL)中加入Pd/C(600 mg), 在25°C在氫氣球下攪拌5小時。TLC (EA)顯示反應結束。將反應液過濾旋轉乾燥得1.9 g白色固體32g, 產率: 77%。

【0216】 第五步

向32g(789 mg, 1.86 mmol), KI4(900 mg, 1.69 mmol), 三乙胺(342 mg, 3.38 mmol)的DMF(10 mL)中加入HATU(707 mg, 1.86 mmol), 在0 °C下攪拌3.5小時。TLC(EA)顯示反應結束。將反應液倒入H₂O (80 mL), 用EA (100 mL)萃取兩次, 無水硫酸

鈉乾燥，旋轉乾燥通過管柱純化(EA)得1.186 g 白色固體32h，產率：83%。MS-ESI: m/z 842.3 $[M+H]^+$ 。

【0217】 第六步

將32h(1.186 g，1.41 mmol)的DCM/二乙胺(20 mL，20/1)在25℃下攪拌17小時。TLC(DCM/MeOH = 10/1)顯示反應結束。將反應液倒入石油醚(200 mL)中過濾得768 mg 白色固體32i，產率：88%。MS-ESI: m/z 620.3 $[M+H]^+$ 。

【0218】 第七步

向32i (676 mg，1.09 mmol)，32e (508 mg，1.09 mmol)，DIEA (423 mg，3.27 mmol)的DMF(10 mL)中加入HATU(414 mg，1.09 mmol)，在20℃下攪拌17小時。TLC(PE/EA = 1/5)顯示反應結束。將反應液倒入水中(30 mL)過濾，濾餅通過管柱純化(DCM/MeOH = 50/1) 511 mg 白色固體32j，產率：44%。MS-ESI: m/z 1068.3 $[M+H]^+$ 。

【0219】 第八步

將32j (482 mg，0.451 mmol)的二乙胺/DCM(10 mL，1/5)的溶液在10℃下攪拌17小時。TLC(EA)顯示反應結束。將反應液倒入PE(300 mL)中過濾得301 mg 白色固體32k，產率不計。

【0220】 第九步

向 32k (301 mg, 0.356 mmol), Pd(PPh₃)₄ (82 mg, 0.071 mmol) 的 THF (5 mL) 中加入嗎啡啉 (93 mg, 1.07 mmol), 在 25°C 下攪拌 5 小時。LCMS 顯示反應結束。將反應液製備得 108 mg 白色固體 321, 產率: 38%。MS-ESI: m/z 806.3 [M+H]⁺。

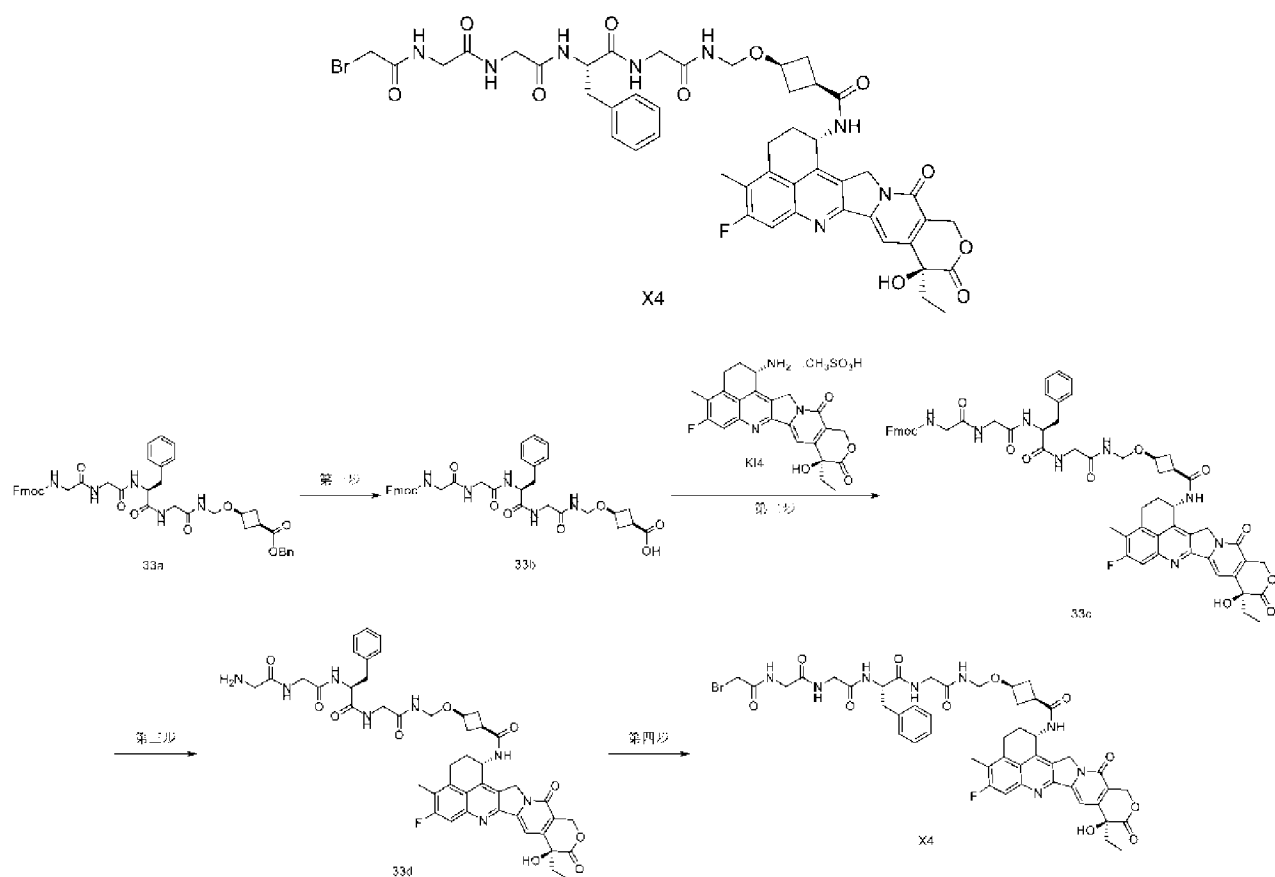
【0221】 第十步

向 321 (108 mg, 0.134 mmol), 三乙胺 (41 mg, 0.402 mmol) 的 THF (2 mL) 和 DMF (2 mL) 中加入溴乙醯溴 (27 mg, 0.134 mmol), 在 0°C 下攪拌 1 小時。TLC (DCM/MeOH = 10/1) 顯示反應結束。將反應液直接製備得 15 mg 白色固體 X3, 產率: 12%。

【0222】 MS-ESI: m/z 926.3 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.11 (s, 1H), 8.54 – 8.42 (m, 3H), 8.27 – 8.16 (m, 2H), 7.78 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.61 – 5.51 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 – 5.05 (m, 2H), 4.56 – 4.42 (m, 2H), 4.32 – 4.22 (m, 1H), 3.96 – 3.87 (m, 3H), 3.79 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.70 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.25 – 3.08 (m, 2H), 2.61 – 2.53 (m, 2H), 2.45 – 2.36 (m, 4H), 2.36 – 2.22 (m, 3H), 2.20 – 2.03 (m, 4H), 1.99 – 1.68 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

連接子-細胞毒素 X4



【0223】 第一步

向 33a (2.00 g , 2.58 mmol) 的 MeOH (20 mL) 中加入 Pd/C(400 mg , 10 wt.%), 在 20℃ 下攪拌 5 小時。TLC (EA) 顯示反應結束。將反應液過濾旋轉乾燥得 1.3 g 白色固體 33b, 產率: 74%。

【0224】 第二步

向 33b (0.55 g , 0.802 mmol), KI4 (427 mg , 0.802 mmol) 和 DIPEA (310 mg , 2.40 mmol) 的 DMF (5 mL) 中加入 HATU (305 mg , 0.802 mmol), 在 0℃ 下攪拌 2 小時。TLC (DCM/MeOH = 1/10) 顯示反應結束。將反應液倒入水 (40 mL) 中, 過濾得粗產物, 經過管柱純化 (DCM/MeOH = 20/1) 得 360 mg 黃色固體 33c, 產率 41%。

【0225】 第三步

向33c (360 mg, 0.326 mmol)的DCM (10 mL)中加入二乙胺 (2 mL)。在25℃下攪拌17小時。TLC (DCM/MeOH = 5/1)顯示反應結束。將反應液倒入PE(100Ml)中，過濾得205 mg白色固體33d，產率：71%。MS-ESI: m/z 881.3 $[M+H]^+$ 。

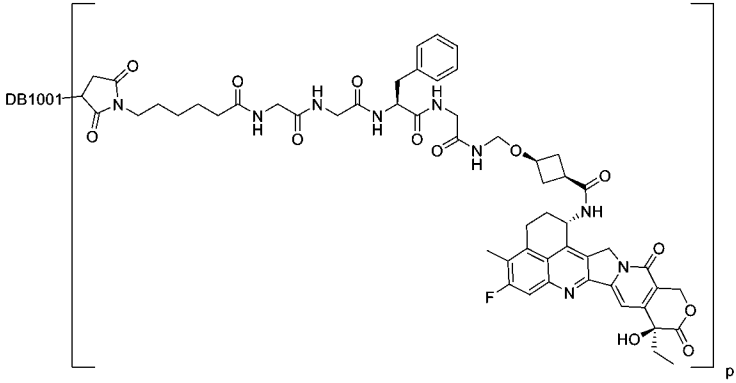
【0226】 第四步

向33d (205 mg, 0.233 mmol)和三乙胺(118 mg, 1.17 mmol)的DMF (1 mL)和水(1 mL)中加入溴乙醯溴(94 mg, 0.446 mmol)的THF (2 mL)溶液，並在0度攪拌1小時，反應液直接製備得15 mg白色固體X4，產率：6%。

【0227】 MS-ESI: m/z 1001.2 $[M+H]^+$ 。

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.57 – 8.50 (m, 1H), 8.50 – 8.43 (m, 2H), 8.35 – 8.29 (m, 1H), 8.19 – 8.12 (m, 2H), 7.80 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.27 – 7.14 (m, 7H), 6.53 (s, 1H), 5.59 – 5.51 (m, 1H), 5.44 – 5.39 (m, 2H), 5.20 – 5.07 (m, 2H), 4.56 – 4.44 (m, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.80 – 3.68 (m, 5H), 3.41 (s, 1H), 3.21 – 3.12 (m, 2H), 2.83 – 2.74 (m, 1H), 2.58 – 2.55 (m, 3H), 2.39 (s, 4H), 2.18 – 2.03 (m, 4H), 1.93 – 1.78 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

2.3、抗B7H4抗體藥物偶聯物的製備**抗體藥物偶聯物ADC DB1001-X1的製備**

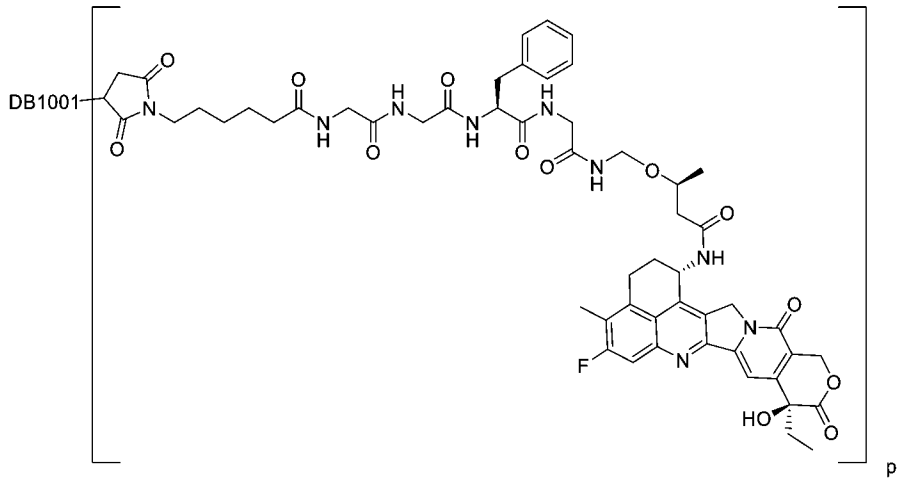


【0228】 用超純水分別配製還原劑和保護劑如下：2 mg/ml TCEP (Tris-2- carboxyethyl-phosphine，廠家：Thermo)水溶液和100 mmol/L EDTA (乙二胺四乙酸二鈉廠家：Sigma)水溶液。

【0229】 取160 mg 17.99 mg/ml的DB1001 (PR08199)單抗置於600 ml離心瓶，加入30mM His-HAc, pH5.5緩衝液稀釋抗體濃度至10 mg/ml，按照反應液總體積5%加入100 mM EDTA水溶液，震盪混勻後加入2 mg/ml TCEP水溶液進行抗體還原，TCEP與抗體的莫耳比2.3:1，震盪混勻後置於製冷型恆溫混勻儀上反應，37℃，2h。按照藥物與抗體終濃度莫耳比12:1加入前述Linker-payload的DMA溶液，按照反應液總體積10%補充DMA，震盪混勻後置於製冷型恆溫混勻儀上反應，4℃，1h。用超濾管(MWCO 30KD，廠家：密理博)置換樣品保存buffer，先用含有10% DMSO的30mM His-HAc, pH5.5緩衝液超濾3次，再用無DMSO的30mM His-HAc, pH5.5超濾6次，得到抗體藥物偶聯物DB1001-X1 125.6 mg，濃度12.854 mg/mL，產率78.5%。

【0230】 經HIC檢測，抗體藥物偶聯物DB1001-X1的載藥量(DAR)為3.89，SEC純度為100%。

抗體藥物偶聯物ADC DB1001-X2的製備



【0231】 用超純水分別配製還原劑和保護劑如下：2 mg/ml TCEP (Tris-2- carboxyethyl-phosphine，廠家：Thermo)水溶液和100 mmol/L EDTA(乙二胺四乙酸二鈉廠家：Sigma)水溶液。

【0232】 將 Linker-payload X2 溶 於 乾 燥 的 DMA(N,N-Dimethylacetamide，二甲基乙醯胺，廠家：國藥集團)，配製成10 mg/mL的linker-payload DMA溶液。

【0233】 取160 mg 17.99 mg/ml的DB1001(PR08199)單抗置於600 ml離心瓶，加入30mM His-HAc, pH5.5緩衝液稀釋抗體濃度至10 mg/ml，按照反應液總體積5%加入100 mM EDTA水溶液，震盪混勻後加入2 mg/ml TCEP水溶液進行抗體還原，TCEP與抗體的莫耳比2.3:1，震盪混勻後置於製冷型恆溫混勻儀上反應，37℃，2 h。按照藥物與抗體終濃度莫耳比12:1加入前述Linker-payload

的DMA溶液，按照反應液總體積10%補充DMA，震盪混勻後置於製冷型恆溫混勻儀上反應，4℃，1 h。用超濾管(MWCO 30KD，廠家：密理博)置換樣品保存buffer，先用含有10% DMSO的30mM His-HAc，pH5.5緩衝液超濾3次，再用無DMSO的30mM His-HAc，pH5.5超濾6次，得到抗體藥物偶聯物DB1001-X2 128.3 mg，濃度10.522 mg/mL，產率80.18%。

【0234】 經HIC檢測，抗體藥物偶聯物DB1001-X2的載藥量(DAR)為5.4，SEC純度為98.1%。

參照ADC-1的製備

【0235】 參照WO2020244657A1中化合物34(hu2F7-依喜替康)，製備參照ADC-1。

實施例3. 小分子化合物(細胞毒素)的體外增殖抑制測試

3.1、小分子化合物(細胞毒素)對腫瘤細胞體外增殖抑制測試

【0236】 測試目的

為了檢測藥物化合物，對NCI-N87，JIMT-1和MBA-MB-231腫瘤細胞體外增殖的抑制活性。以不同濃度的化合物體外處理細胞，經6天培養後，採用CTG (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay，Promega，貨號：G7558)試劑對細胞的增值進行檢測，根據IC₅₀值評價該化合物的體外活性。

【0237】 1、細胞培養：NCI-N87 / JIMT-1 / MBA-MB-231 用10% FBS RPMI-1640培養基培養。

【0238】 2、細胞準備：取對數生長期的NCI-N87 / JIMT-1 / MBA-MB-231 細胞，用PBS洗滌1次之後，加入2-3 ml胰蛋白酶消化2-3 min，待細胞消化完全後，加入10-15 ml細胞培養液，將經過消化的細胞洗提下來，1000 rpm離心5 min，棄上清液，接著加入10-20 ml細胞培養液將細胞重新懸浮，製成單細胞懸浮液。

【0239】 3、細胞平盤培養：將 NCI-N87 / JIMT-1 / MBA-MB-231單細胞懸浮液混勻，用細胞培養液分別調整活細胞密度至 6×10^4 cells/ml，將密度調整過後的細胞懸浮液混勻，以50 μ L/孔加入96孔細胞培養盤。將培養盤在培養箱培養18小時(37°C，5% CO₂)。

【0240】 4、化合物準備：用DMSO溶解化合物，配製成初始濃度為10 mM的存儲液。

小分子化合物共8個濃度，分別為：300，100，30，10，3，1，0.3，0.1 nM。

【0241】 5、加入樣品操作：向培養盤中加入配置的不同濃度的待測樣品，每個樣品兩複孔。將培養盤在培養箱培育6天(37°C，5% CO₂)。

【0242】 6、顯色操作：取出96孔細胞培養盤，向每孔加入50 μl CTG試劑，室溫培育10分鐘。

【0243】 7、培養盤讀取操作：取出96孔細胞培養盤，置於酵素標示讀取儀中，用酵素標示讀取儀測定化學發光。

【0244】 數據分析：用Microsoft Excel，Graphpad Prism 5對數據進行處理分析。

表1 本申請中的小分子化合物對腫瘤細胞體外增殖抑制的IC₅₀值

化合物編號	NCI-N87	JIMT-1	MDA-MB-231
	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)
製備例 3	-	23.1	-
P-II-3	9.558	5.0	9.4

【0245】 結論：根據表1的結果，本申請藥物偶聯物的毒素對NCI-N87細胞、JIMT-1和MDA-MB-231細胞具有明顯增強的增殖抑制活性。

3.2、小分子化合物(細胞毒素)對腫瘤細胞體外增殖抑制測試

【0246】 測試目的

為了檢測藥物化合物，對NCI-N87細胞和Colo205腫瘤細胞體外增殖的抑制活性。以不同濃度的化合物體外處理細胞，經6天培養後，採用CTG (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability

Assay，Promega，貨號：G7558)試劑對細胞的增值進行檢測，根據IC₅₀值評價該化合物的體外活性。

【0247】 1、細胞培養：NCI-N87 / Colo205 用 10% FBS RPMI-1640 培養基培養。

【0248】 2、細胞準備：取對數生長期的NCI-N87 / Colo205 細胞，用PBS洗滌1次之後，加入2-3 ml 胰蛋白酶消化2-3 min，待細胞消化完全後，加入10-15 ml細胞培養液，將經過消化的細胞洗提下來，1000 rpm離心5 min，棄上清液，接著加入10-20 ml 細胞培養液將細胞重新懸浮，製成單細胞懸浮液。

【0249】 3、細胞平盤培養：將NCI-N87 / Colo205單細胞懸浮液混勻，用細胞培養液分別調整活細胞密度至 6×10^4 cells/ml，將密度調整過後的細胞懸浮液混勻，以50 μ l/孔加入96孔細胞培養盤。將培養盤在培養箱培養18小時(37°C，5% CO₂)。

【0250】 4、化合物準備：用DMSO溶解化合物，配製成初始濃度為10 mM 的存儲液。

小分子化合物共8個濃度，分別為：300，100，30，10，3，1，0.3，0.1 nM。

【0251】 5、加入樣品操作：向培養盤中加入配置的不同濃度的待測樣品，每個樣品兩複孔。將培養盤在培養箱培育6天(37°C，5% CO₂)。

【0252】 6、顯色操作：取出96孔細胞培養盤，向每孔加入50 μl CTG試劑，室溫培育10分鐘。

【0253】 7、培養盤讀取操作：取出96孔細胞培養盤，置於酵素標示讀取儀中，用酵素標示讀取儀測定化學發光。

【0254】 數據分析：用Microsoft Excel，Graphpad Prism 5 對數據進行處理分析。

表2 本申請中的小分子化合物對NCI-N87和Colo205細胞體外增殖抑制的IC₅₀值

化合物編號	Abs-IC50 (nM)	
	P-III-30	參照例 1
Colo205	102.9	>1000
NCI-N87	6.5	>300

【0255】 結論：根據表2的結果，本申請藥物偶聯物的毒素對NCI-N87和Colo205細胞具有明顯的增殖抑制活性，且顯著優於參照例1。

實施例4. 抗體藥物偶聯物的細胞內吞活性

【0256】 測試目的

檢測本申請針對B7H4靶標的抗體藥物偶聯物，在B7H4表現的MDA-MB-468細胞上的內吞效應。將細胞和固定濃度的抗體藥物偶聯物(ADC)和內吞指示試劑pHrodo 進行共培育，透過觀察不同時

間點細胞內伴隨抗體藥物偶聯物進入細胞的pHrodo所產生的螢光訊號來評價抗體藥物偶聯物內吞能力。

【0257】 實驗方法

1、細胞培養：MDA-MB-468細胞使用10% FBS Leibovitz's L-15 培養基培養。

2、細胞準備：取對數生長期的MDA-MB-468細胞，用PBS洗滌1次之後，消化2-3 min，待細胞消化完全後，加入10-15 ml 細胞培養液，將經過消化的細胞洗提下來，1000 rpm離心5 min,棄上清液，加入細胞培養液將細胞重新懸浮製成單細胞懸浮液並調整活細胞密度至 3×10^5 cells/ml。

3、細胞平盤培養：以50 μ l/孔加入96孔細胞培養盤。將培養盤在培養箱培養48小時(37°C，5% CO₂)。

4、加入樣品操作：將待測抗體藥物偶聯物與Fab-pHrodo共同培育形成複合物，濃度為120 nM，以5倍梯度稀釋調整濃度，以50 μ l/孔加到細胞。共8個濃度，每個濃度設置兩個複孔。

5、細胞培養：將培養盤在培養箱培育48小時(37°C)。

6、培養盤讀取操作：到達對應時間點，取出96孔細胞培養盤，將細胞消化後透過FACS讀取細胞數量及螢光數值。

表3 本申請抗體藥物偶聯物在MDA-MB-468細胞不同時間點內吞產生螢光訊號

樣品濃度	螢光數值 (DB1001-X2)		螢光數值 (DB1001-X1)	
30nM	343	327	334	374
6nM	219	235	282	219
1.2nM	119	130	143	139
0.24nM	103	105	122	121
0.048nM	97.8	104	106	114
0.0096nM	97.1	98.2	104	107
0.00192nM	96.6	97.4	109	102
0.000384nM	98.2	98.1	103	96.6

【0258】 結論：根據表3的結果，本申請針抗體藥物偶聯物對B7H4高表現的MDA-MB-468細胞具有內吞效應。

實施例5：抗體藥物偶聯物對腫瘤細胞體外增殖抑制測試

【0259】 採用CellTiter-Glo®化學發光細胞活率檢測法(即CTG方法)評估 anti-B7H4 ADC DB1001-X1、DB1001-X2在B7H4陽性表現的細胞MDA-MB-468和B7H4陰性表現的MDA-MB-231中培育處理7天，對細胞增殖的抑制作用。

【0260】 收集對數生長期細胞，以2000個細胞/孔的密度平盤培養，細胞盤放入37℃、5% CO₂培養箱培養過夜。實驗第二天，將DB1001-X1、DB1001-X2用完全培養基按5倍稀釋，獲得9個濃度梯度(以300nM的最高濃度開始)藥物後，50 μL/孔加入細胞培養盤

中，完全培養基作為空白對照，設置2個複孔；繼續於37°C培養箱內培育7天。培育結束，取出細胞培養盤，平衡至室溫後，每孔加入50 μL CTG檢測試劑(Promega, Cat#: G7573)，震盪混勻後放置於暗處靜置10分鐘後，利用酵素標示讀取儀檢測讀取訊號值。應用GraphPad Prism軟體，使用非線性回歸模型繪製S型劑量-反應曲線並計算IC₅₀值。細胞存活率計算公式=(Lum_{待測藥}-Lum_{空白對照})/(Lum_{溶劑空白對照}-Lum_{空白對照})×100%。

【0261】 實驗結果如下表所示：

表4：抗體偶聯藥物體外增殖抑制活性

細胞	藥物	IC ₅₀ (nM)
MDA-MB-468	DB1001-X1	30.3
	DB1001-X2	50.7
MDA-MB-321	DB1001-X1	>200
	DB1001-X2	>200

【0262】 實驗結論：根據表4的結果，本申請抗體藥物偶聯物DB1001-X1和DB1001-X2對B7H4陽性表現的MDA-MB-468具有顯著增強的增殖抑制活性。

實施例6：抗體藥物偶聯物對細胞MDA-MB-468荷瘤小鼠藥效評價

【0263】 為研究DB1001-X1、DB1001-X2對體內形成腫瘤的抑制作用，在小鼠體內用B7H4陽性表現的細胞MDA-MB-468形成移植瘤後，評估DB1001-X1、DB1001-X2的抗腫瘤效果。

1. 受試藥物及材料

【0264】 空白對照組(對照組)：生理鹽水

DB1001-X1(治療組)：3mg/kg

DB1001-X1(治療組)：10mg/kg

DB1001-X2(治療組)：3mg/kg

DB1001-X2(治療組)：10mg/kg

2. 配製方法：所有樣品均用生理鹽水稀釋配製。

3. 試驗動物：6-8周齡的雌性CB-17 SCID小鼠，購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。

4. 試驗方法：

【0265】 將 10×10^6 個MDA-MB-468細胞接種於6-8周齡的雌性NOD/SCID小鼠右側背部皮下，當腫瘤長至約 172mm^3 ，對荷瘤小鼠進行StudyDirector™隨機分組，並於當天(第0天)開始透過靜脈(i.v.)注射DB1001-X1或DB1001-X2，共注射1次，採用劑量分別為3 mg/kg 和10 mg/kg。每週測量2次瘤體積和體重，記錄數據。

【0266】 溶媒對照組或治療組每組5隻小鼠。透過測量腫瘤體積計算抑瘤率。

【0267】 腫瘤體積的計算公式為： $V = 0.5 a \times b^2$ ， a 和 b 分別表示腫瘤的長徑和短徑。化合物的抑瘤療效用T/C（%）評價。T/C（%）的百分比值是一項反應腫瘤生長抑制的指標，T和C分別表示給藥組和對照組在某一天的平均腫瘤體積。腫瘤生長抑制率用下列公式計算： $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ，其中 T_i 為某一天某給藥組的平均腫瘤體積， T_0 為此給藥組在開始給藥時的平均腫瘤體積； V_i 為某一天(與 T_i 同一天)溶媒對照組的平均腫瘤體積， V_0 為溶媒對照組在開始給藥時的平均腫瘤體積。受試物組和Vehicle組的組間顯著性分析透過one-way ANOVA法進行。

表5 各組不同時間點的瘤體積¹(mm³)

組別	1	2	3	4	5
天數	空白對照組	DB1001-X2 , 3 mg/kg	DB1001-X2 , 10 mg/kg	DB1001-X1 , 3 mg/kg	DB1001-X1 , 10 mg/kg
0 ²	17 1 ± 11	172 ± 11	170 ± 14	172 ± 12	172 ± 16
4	19 6 ± 12	179 ± 10	173 ± 14	181 ± 11	177 ± 17
7	22 9 ±	143 ± 8	93 ± 11	174 ± 9	140 ± 14

	15				
11	26 7 ± 15	67 ± 3	38 ± 1	123 ± 8	63 ± 4
14	31 5 ± 22	56 ± 3	32 ± 1	111 ± 8	55 ± 4
18	35 6 ± 27	48 ± 2	25 ± 1	123 ± 8	46 ± 4
21	40 0 ± 34	55 ± 3	20 ± 0	163 ± 6	42 ± 7

註：

1. 腫瘤體積用平均值 ± 標準誤表示；

2. 開始給藥後的天數。

表6 受試物對MDA-MB-468細胞皮下異種移植腫瘤模型的抑瘤藥效評價
(基於給藥後21天腫瘤體積計算得出)

組別	腫瘤體積 (mm ³) ¹	T/C (%) ²	TGI (%) ²	p值 ³
空白對照組,	400 ± 34	--	--	--
DB1001-X2, 3 mg/kg	55 ± 3	13.78	151.33	0.002
DB1001-X2, 10 mg/kg	20 ± 0	4.97	165.84	0.002
DB1001-X1, 3 mg/kg	163 ± 6	40.69	103.95	0.008
DB1001-X1, 10 mg/kg	42 ± 7	10.62	156.50	0.002

1. 腫瘤體積用平均值 ± 標準誤表示；

第 99 頁，共 122 頁(發明說明書)

2. 腫瘤生長抑制由T/C ($T/C (\%) = T_{21} / V_{21} \times 100$)和TGI ($TGI (\%) = [1 - (T_{21} - T_0) / (V_{21} - V_0)] \times 100$) 反應；
3. p 值根據腫瘤體積計算 ($p < 0.05$ 代表有統計學差異， $p < 0.01$ 代表有顯著性差異)。

【0268】 實驗結果如圖1及表5和表6所示。抗體藥物偶聯物DB1001-X1和DB1001-X2單次給藥後表現出顯著增強的劑量依賴性抑瘤活性。

實施例7. 抗體藥物偶聯物的種屬交叉

【0269】 測試目的

檢測抗體藥物偶聯物DB1001-X2在人、食蟹猴、和小鼠B7H4轉染的HEK293T細胞的種屬交叉反應。

【0270】 實驗方法

- 1、所有細胞株於37°C，5% CO₂條件下培養於完全培養基。
- 2、收穫處於對數生長期的細胞並用台盼藍排斥法檢測細胞活力，確保細胞活力在90%以上，1000 r/min離心5 min後，棄上清液。使用PBS洗滌細胞一次，用FACS Buffer重新懸浮製成單細胞懸浮液並調整細胞密度至 5×10^6 cells/mL；
- 3、向96孔盤中分別加入50 μ L的細胞懸浮液，使受試品工作液最高濃度為100 nM，依次3倍稀釋，共8個濃度；混勻後，放置於4°C，培育40min。
- 4、使用FACS Buffer洗滌細胞3次，每次400 μ L，1000 r/min速度下，離心5 min，最後使用100 μ L FACS Buffer重新懸浮細胞；

- 5、加入2 μL的PE標記的二抗（PE anti-human IgG Fc Antibody），混勻後，放於4℃避光培育40 min；
- 6、使用FACS Buffer洗滌細胞3次，每次400 μL，1000 r/min速度下，離心5 min，最後使用250 μL FACS Buffer重新懸浮細胞；
- 7、流式細胞儀檢測螢光值。

結果表7 DB1001-X2和人，猴，小鼠B7H4的親和力

細胞株	DB1001-X2	
	EC ₅₀ (nM)	MFI.Max
人B7H4-293T	2.18	10312
猴B7H4-293T	5.36	10869
小鼠B7H4-293T	不結合	不結合

【0271】 如表7和圖2所示，DB1001-X2與人和食蟹猴的B7-H4有相似的親和力，但與小鼠的B7-H4沒有結合。

【0272】 以下實施例中，Isotype ADC是指：抗體為陰性對照抗體，連接子-細胞毒素為X2，參照DB1001-X2製備。

實施例8. 抗體藥物偶聯物的標靶特異性

【0273】 測試目的

透過流式檢測抗體藥物偶聯物DB1001-X2和過表現人B7家族蛋白細胞的結合特異性。

【0274】 實驗方法

1、建立穩定表現人PD-L1(B7-H1), PD-L2(B7-DC), ICOSLG(B7-H2), CD276(B7-H3), B7H4, VISTA(B7-H5), CD80(B7-1), CD86(B7-2)的HEK293T單株細胞株, 及穩定表現人B7-H7 (HHLA2)的CHO-K1單株細胞株;

2、所有細胞株於37°C, 5% CO₂條件下培養於完全培養基;

3、收穫處於對數生長期的細胞並用台盼藍排斥法檢測細胞活力, 確保細胞活力在90%以上, 1000 r/min離心5 min後, 棄上清液。使用PBS洗滌細胞一次, 用FACS Buffer重新懸浮製成單細胞懸浮液並調整細胞密度至 5×10^6 cells/mL;

4、向96孔盤中分別加入50 μ L的細胞懸浮液, 使受試品工作液濃度為100 nM或者300 nM, 共1個濃度; 混勻後, 放置於4°C, 培育40 min;

5、使用FACS Buffer洗滌細胞3次, 每次400 μ L, 1000 r/min速度下, 離心5 min, 最後使用100 μ L FACS Buffer重新懸浮細胞;

6、加入2 μ L的PE標記的二抗(PE anti-human IgG Fc Antibody), 混勻後, 放於4°C避光培育40 min;

7、使用FACS Buffer洗滌細胞3次, 每次400 μ L, 1000 r/min速度下, 離心5 min, 最後使用250 μ L FACS Buffer重新懸浮細胞;

8、流式細胞儀檢測螢光值。

【0275】 實驗結果

如圖3所示, DB1001-X2與人B7-H4結合, 但未檢測到與其他B7家族蛋白B7-H1、B7-DC、B7-H2、B7-H3、B7-H5、B7-1、B7-2和B7-H7結合。

【0276】 實驗結論

DB1001-X2能與人B7-H4蛋白特異性結合，與其他B7家族蛋白無交叉反應。

實施例9：抗體藥物偶聯物的細胞內吞活性**【0277】 測試目的**

檢測本申請針對B7H4靶標的抗體藥物偶聯物與其他針對B7H4的抗體藥物偶聯物相比，在表現B7H4的MDA-MB-468細胞上的內吞效率。將細胞和固定濃度的抗體藥物偶聯物和內吞指示試劑Incucyte® Fabfluor-pH進行共培育，透過連續觀察24小時活細胞的螢光訊號變化來評價抗體藥物偶聯物的內吞能力。

【0278】 實驗方法

1、細胞培養：MDA-MB-468細胞使用10% FBS Leibovitz's L-15培養基培養。

2、細胞準備：取對數生長期的MDA-MB-468細胞，用PBS洗滌1次之後，消化2-3 min，待細胞消化完全後，加入10-15 ml 細胞培養液，將經過消化的細胞洗提下來，1000 rpm 離心5 min,棄上清液，加入細胞培養液將細胞重新懸浮製成單細胞懸浮液並調整活細胞密度至 1×10^5 cells/ml。

3、細胞平盤培養：以50 μ L/孔加入96孔細胞培養盤。將培養盤放在培養箱培養過夜(37 $^{\circ}$ C，5% CO₂)。

4、標記待測抗體藥物偶聯物：將供試品儲液稀釋為240 nM的4×工作液(終濃度60 nM)，將Incucyte® Fabfluor-pH儲液稀釋為720 nM的4×工作液(終濃度180 nM)，將兩者充分混合，37℃避光培育15分鐘。

5、擷取分析圖像：轉移標記後的供試品工作液至實驗盤的對應孔中，將實驗盤轉移至Incucyte活細胞分析設備中，設置掃描拍照程序，使用Incucyte活細胞分析系統獲取圖像。以1小時的間隔進行定量，持續24小時。分析結果表示為：總螢光面積(μm²/圖像)。

【0279】 實驗結果

如圖4所示，本申請抗體藥物偶聯物DB1001-X2和對照抗體藥物偶聯物參照ADC-1在MDA-MB-468細胞不同時間點內吞產生螢光訊號的積分面積。圖5為本申請抗體藥物偶聯物DB1001-X2和對照抗體藥物偶聯物在MDA-MB-468細胞的內吞效率比較。

表8 抗體偶聯物在MDA-MB-468的內吞

	總螢光面積 (μm ² /圖像)	與空白對照的倍數
DB1001-X2	14318.1	2.4
參照ADC-1	8300.4	1.4
空白對照(細胞+染料)	5856.4	1.0

【0280】 實驗結論

根據表8、圖4和圖5的結果，本申請抗體藥物偶聯物在表現B7H4的MDA-MB-468細胞具有內吞效應，且優於參照ADC-1。

實施例10：抗體藥物偶聯物對腫瘤細胞體外增殖抑制測試(2D細胞培養法)

【0281】 測試目的

採用CellTiter-Glo®化學發光細胞活率檢測法(即CTG方法)檢測本申請針對B7H4靶標的抗體藥物偶聯物與其他針對B7H4的抗體藥物偶聯物相比，對B7H4表現的人乳腺細胞癌SKBR3體外增殖的抑制作用。

【0282】 實驗方法

收集對數生長期細胞，以15000個細胞/孔的密度平盤培養，細胞盤放入37°C、5% CO₂培養箱培養過夜。實驗第二天，將受試品用完全培養基按3倍稀釋，獲得6個濃度梯度(以100nM的最高濃度開始)藥物後，50μL/孔加入細胞培養盤中，完全培養基作為空白對照，設置3個複孔；繼續於37°C培養箱內培育3天。培育結束，取出細胞培養盤，平衡至室溫後，每孔加入50μL CTG檢測試劑(Promega, Cat#: G7573)，震盪混勻後放置於暗處靜置10分鐘後，利用酵素標示讀取儀檢測讀取訊號值。應用GraphPad Prism軟體，使用非線性回歸模型繪製S型劑量-反應曲線並計算IC₅₀值。細胞存活率計算公式=
$$\frac{(\text{Lum}_{\text{待測藥}} - \text{Lum}_{\text{空白對照}})}{(\text{Lum}_{\text{溶劑空白對照}} - \text{Lum}_{\text{空白對照}})} \times 100\%$$
。

【0283】 實驗結論

根據實驗結果，本申請抗體藥物偶聯物DB1001-X2對B7H4表現的人乳腺癌細胞SKBR3具有顯著的增殖抑制活性。

實施例11：抗體藥物偶聯物對腫瘤細胞體外增殖抑制測試(3D細胞培養法)

【0284】 測試目的

採用CellTiter-Glo®化學發光細胞活率檢測法(即CTG方法)評估 anti-B7H4 ADC DB1001-X2 及 anti-B7H4 單抗 DB1001 對 3D培養條件下B7H4高表現的人乳腺癌細胞MX-1，B7H4低表現的子宮內膜癌細胞RL95-2，及B7H4陰性表現的乳腺癌細胞JIMT-1的增殖抑制作用。

【0285】 實驗方法

收集對數生長期細胞，加入細胞培養液將細胞重新懸浮製成單細胞懸浮液並調整活細胞密度至 1×10^5 cells/ml，將3.5mL細胞懸浮液和6.5mL的1%甲基纖維素混合均勻，儘量避免產生氣泡，在96孔盤中每孔加入90 μ L細胞懸浮液，在37°C、5% CO₂培養箱培養過夜。實驗第二天，用完全培養基稀釋受試品得到10倍溶液，每孔加入10 μ L受試品溶液，最高終濃度為100nM，9個濃度，3倍稀釋，完全培養基作為空白對照，設置3個複孔；繼續於37°C培養箱內培育6天。培育結束，取出細胞培養盤，平衡至室溫後，每孔加入100 μ L CTG檢測試劑(Promega, Cat#: G7573)，震盪混勻後放置於暗處

靜置10分鐘後，把細胞盤放置於室溫30分鐘以穩定發光訊號，用EnVision讀取Luminescence。應用GraphPad Prism軟體，使用非線性回歸模型繪製S型劑量-反應曲線並計算IC₅₀值。細胞存活率計算公式=(Lum_{待測藥}-Lum_{空白對照})/(Lum_{溶劑空白對照}-Lum_{空白對照})×100%。

【0286】 Isotype ADC：抗體為陰性對照抗體，連接子-細胞毒素為X2，參照DB1001-X2製備。

【0287】 實驗結果

表9：抗體偶聯藥物對腫瘤細胞株增殖抑制活性

細胞株	DB1001-X2		DB1001		Isotype ADC		P-III-30	
	IC50 (nM)	Max inh.(%)	IC50 (nM)	Max inh.(%)	IC50 (nM)	Max inh.(%)	IC50 (nM)	Max inh.(%)
MX-1	52.396	55.47%	>100	5.78%	>100	7.69%	1.768	84.47%
RL95-2	69.436	60.44%	>100	0.65%	>100	41.56%	0.843	95.07%
JIMT-1	>100	2.53%	>100	1.25%	>100	-4.04%	24.270	70.98%

【0288】 實驗結論

如表9以及圖6、圖7和圖8所示，DB1001-X2對高表現和低表現B7H4的腫瘤細胞株都有強的體外毒殺作用，對不表現B7H4的細胞沒有毒殺作用，說明這種毒殺作用是依賴於B7H4表現的。

實施例12：抗體藥物偶聯物對T細胞活化

【0289】 測試目的

檢測本申請針對B7H4靶標的抗體藥物偶聯物與其他針對B7H4的抗體藥物偶聯物相比，阻斷B7H4對T細胞的抑制，活化T細胞產生IFN- γ 的能力。

【0290】 1、實驗方法收集對數生長的293T-OS8-humanB7H4細胞(康源博創公司)，300g離心5分鐘。

【0291】 2、把細胞重新懸浮至 1×10^5 cell/ml，按照 1×10^4 /100 μ L/孔的密度平盤培養，培養過夜。

【0292】 3、使用美天妮T細胞分離套組(Miltenyi, CaT# 130-096-535)按說明書的方法分離健康供體1(上海妙順，貨號PB100C-W，批號A10Z983077)和健康供體2的PBMC(上海妙順，貨號PB050C-W，批號P122010104C)得到人原代T細胞。

【0293】 4、配製2 $\times$ 終濃度的待測受試品，終濃度為0.02 nM。

【0294】 5、移除實驗孔內的培養基，然後將供體1和供體2的人原代T細胞按照 2×10^5 /100 μ L / 孔的密度加入含有293T-OS8-humanB7H4細胞的實驗孔中。

【0295】 6、隨後加入100 μ L /孔待測抗體，設置兩個重複。

【0296】 7、培養3天後，收集上清液，ELISA方法檢測IFN- γ 的濃度。

【0297】 Isotype ADC：抗體為陰性對照抗體，連接子-細胞毒素為X2，參照DB1001-X2製備。

【0298】 實驗結果

表10抗體藥物偶聯物活化T細胞分泌IFN-γ

	IFN-γ 供體 1 (pg/ml)	IFN-γ 供體 2 (pg/ml)	IFN-γ 平均值 (pg/ml)
空白對照	1914.7	2407.6	2161.1
Isotype ADC	2030.4	2111.3	2070.8
DB1001-X2	6491.1	5914.4	6202.8
參照 ADC-1	4164.0	3645.6	3904.8

【0299】 實驗結論

如表10、圖9和圖10所示，DB1001-X2能阻斷B7H4陽性細胞對不同供體來源T細胞的抑制，且顯著優於參照ADC-1。

實施例13：抗體藥物偶聯物旁觀者毒殺

【0300】 測試目的

檢測本申請針對B7H4靶標的抗體藥物偶聯物與其他針對B7H4的抗體藥物偶聯物相比，內吞後釋放的小分子藥物從B7H4陽性的細胞擴散到附近B7H4表現陰性的細胞，並對其產生細胞毒殺的旁觀者效應。

【0301】 將不帶標記的過表現 B7H4 的 HT29 細胞 (HT29-B7H4) 和轉染螢光素酶的不表現 B7H4 的 HT29 細胞 (HT29-Luc2) 按照比例混合，和受試品共培育一段時間後，加入螢光素酶底物，活細胞產生的螢光素酶催化底物產生螢光素，透過螢光素的數值來檢測螢光素酶的含量，即反應活細胞數。

【0302】 實驗方法

1、收集對數生長期細胞，加入含2%血清1640培養基重新懸浮細胞，調整HT29-B7H4和HT29-Luc2的細胞數目，分別加入45 μ L 細胞至96孔盤中，使兩細胞比例分別為3：1，即HT29-B7H4細胞數11250個/孔，HT29-Luc2細胞數3750個/孔，在37°C、5% CO₂ 培養箱培養過夜。

2、配製10 $\times$ 濃度的受試品溶液，在96孔盤的細胞中每孔加入10 μ L藥物溶液，使受試品終濃度為100 nM，3個複孔。檢測day0的冷光值。

3、將已加藥的96孔盤中的細胞置於37°C、5% CO₂條件下繼續培養7天，之後進行Bright-Glo分析。

4、每孔加入等體積的Bright-Glo溶液，在定軌搖床上振動15分鐘使細胞裂解。然後在多功能酵素標示讀取儀上讀取冷光值。

5、數據分析：使用GraphPad Prism7軟體分析數據，得出劑量-效應曲線，計算EC50。

【0303】
$$\text{Fold change} = (\text{Lum 待測藥} - \text{Lum 培養液對照}) / (\text{Lum NC} - \text{Lum 培養液對照})。$$

【0304】 實驗結論，DB1001-X2對和B7H4陽性細胞一起培育的B7H4陰性細胞有很好的旁觀者毒殺效應。

實施例14：抗體藥物偶聯物在人、大鼠、猴體外血漿的穩定性

【0305】 測試目的

抗體藥物偶聯物在體外和人、鼠、猴血漿培育21天，在不同時間點取樣，用液相層析和質譜測量血漿中釋放的小分子毒素(細胞毒性藥物)的量，來評估抗體藥物偶聯物的血漿穩定性。

【0306】 實驗方法

將DB1001-X2用人、大鼠或食蟹猴血清稀釋到終濃度150 µg/mL，在37℃下培育持續21天，中間取樣時間點為T0，2小時，8小時，1天，4天，7天，14天，21天。血漿樣品用乙腈按體積比1：1沉澱，離心取上清液，然後透過LC-MS/MS(液相：Thermo Vanquish；三重四極桿質譜：Thermo TSQ Quantis)進行分析。使用細胞毒性藥物P-Ⅲ-30濃度計算抗體藥物偶聯物釋放速率。

【0307】 實驗結果

見表11和圖11，培育21天後，150 µg/mL的DB1001-X2的荷載分子(細胞毒素)P-Ⅲ-30在人、大鼠和猴血漿中釋放率不到1%。

表11 細胞毒性藥物P-Ⅲ-30在人、大鼠和猴血漿21天後的釋放率

	人血漿	食蟹猴血漿	大鼠血漿
--	-----	-------	------

P- III -30釋放率(%)	0.66	0.68	0.26
------------------	------	------	------

【0308】 實驗結論

DB1001-X2在體外人、大鼠和猴血漿中具有良好的穩定性。

實施例15：抗體偶聯藥物的藥代動力學

【0309】 測試目的

食蟹猴靜脈給予DB1001-X2，每3周給藥1次，共給藥2次。研究其毒代動力學特徵，為後續研究提供參考。實驗方法

【0310】 4隻食蟹猴，雌、雄各半，分組時體重2.2~3.6 kg，共分2組，分別為DB1001-X2低劑量組、DB1001-X2高劑量組，給藥劑量分別設置為30、80 mg/kg，每3周給藥1次，共給藥2次，給藥容積 5 mL/kg。

【0311】 採樣時間：首次給藥前及給藥結束後5 min、0.5 h、2 h、4 h、8 h、24 h、48 h、72h、120 h、168 h、336 h、504 h各採集1次TK血樣；末次給藥結束後5 min、0.5 h、2 h、4 h、8 h、24 h、48 h及解剖前各採集1次TK血樣。採樣方法：前肢靜脈或其它適宜靜脈，採集約0.5 mL全血。

【0312】 血樣處理：採集血液後，置於以 EDTA·K2 作為抗凝劑的貼有標籤的採血管中。將樣品管輕輕顛倒數次以確保混勻後，即刻放入濕冰中保存。並在採集後1 h 內，4 °C 3800 rpm離心10 min，吸取並分裝血漿 100 µL/管(2 管)，暫存於乾冰中，4 h 內

轉移至超低溫冰箱(-60 °C及以下)，在試驗記錄中記錄全血採集、收集血漿的時間。

【0313】 所有樣本採集完成後，乾冰條件下運送至檢測部門。

【0314】 樣本分析：使用建立的 ELISA 法方法分析血清中總抗體及 ADC 藥物的血藥濃度。使用已有的 LC-MS/MS 方法分析血漿中細胞毒性藥物 P-Ⅲ-30 的血藥濃度。

【0315】 實驗結果見表 12。

表 12

Analytes	Doses mpk	T _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} (μ g/mL)	AUC _{0-t} (h.ng/mL)
Total Abs	30	157.5	0.083	794377	51521254
	80	232	0.083	2088878	174105639
DB1001-X2	30	164.9	0.083	828689	51863287
	80	218.5	0.292	2242292	183899767
P-Ⅲ-30	30	155	2	4.87	236
	80	150.5	2	12.9	875

【0316】 實驗結論

根據表 12 的結果，在 DB1001-X2 和總抗體之間沒有觀察到藥代動力學差異，這表明 DB1001-X2 在體內血漿中穩定性好。同時，在劑量為 30 mg/kg 和 80 mg/kg 的食蟹猴中，檢測到 P-Ⅲ-30 的低血漿濃度，這表明由於 DB1001-X2 的穩定性和 P-Ⅲ-30 的短全身半衰期，P-Ⅲ-30 的全身暴露量較低，從而具有較高的安全性。

實施例16：抗體藥物偶聯物對人高表現B7H4的乳腺癌細胞MX-1荷瘤小鼠藥效評價

【0317】 為研究DB1001-X2對體內形成腫瘤的抑制作用，在小鼠體內用B7H4陽性高表現的人乳腺癌細胞MX-1形成移植瘤後，評估DB1001-X2的抗腫瘤效果。

【0318】 1. 受試藥物及材料

空白對照組(對照組)：生理鹽水

DB1001-X2(治療組)：1mg/kg

DB1001-X2(治療組)：3mg/kg

【0319】 2. 配製方法：所有樣品均用生理鹽水稀釋配製。

【0320】 3. 試驗動物：6-8周齡的雌性BALB/c Nude小鼠，購自集萃藥康生物科技有限公司。

【0321】 4. 試驗方法：

將 5×10^6 個MX-1細胞接種於6-8周齡的雌性BALB/c Nude小鼠右側背部皮下，當腫瘤長至約 160.82 mm^3 ，對荷瘤小鼠進行StudyDirector™隨機分組，並於當天(第0天)開始透過靜脈(i.v.)注射受試品，每兩週一次，共注射2次，DB1001-X2採用劑量分別為1mg/kg 和3mg/kg，ISO-ADC採用劑量為3 mg/kg。試驗終點時間為分組後第27天，每週測量2次瘤體積和體重，記錄數據。

【0322】 對照組或治療組每組5隻小鼠。透過測量腫瘤體積計算抑瘤率。

【0323】 腫瘤體積的計算公式為： $V = 0.5 a \times b^2$ ， a 和 b 分別表示腫瘤的長徑和短徑。化合物的抑瘤療效用T/C (%) 評價。T/C (%) 的百分比值是一項反應腫瘤生長抑制的指標，T和C分別表示給藥組和對照組在某一天的平均腫瘤體積。腫瘤生長抑制率用下列公式計算： $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ，其中 T_i 為某一天某給藥組的平均腫瘤體積， T_0 為此給藥組在開始給藥時的平均腫瘤體積； V_i 為某一天(與 T_i 同一天)溶媒對照組的平均腫瘤體積， V_0 為溶媒對照組在開始給藥時的平均腫瘤體積。

【0324】 兩組樣本之間比較採用獨立樣本T檢驗(T-Test)，數據使用SPSS進行分析， $P < 0.05$ 為具有顯著性差異。作圖軟體為GraphPad Prism。

表13. 受試物對MX-1細胞皮下異種移植腫瘤模型的抑瘤藥效評價
(基於給藥後27天腫瘤體積計算得出)

組別	腫瘤體積 (mm ³) ¹	T/C (%) ²	TGI (%) ²	<i>p</i> 值 ³
空白對照組,	3319.54 ± 119.76	-	-	-
DB1001-X2, 1 mg/kg	1521.41 ± 281.89	45.83	54.17	0.0000800
DB1001-X2, 3 mg/kg	154.12 ± 60.47	4.64	95.36	1.44e-8

- 1. 腫瘤體積用平均值 ± 標準誤表示；
- 2. 腫瘤生長抑制由T/C ($T/C (\%) = T_{27} / V_{27} \times 100$)和TGI ($TGI (\%) = [1 - (T_{27} - T_0) / (V_{27} - V_0)] \times 100$) 反應；
- 3. *p*值根據腫瘤體積計算($p < 0.05$ 代表有統計學差異， $p < 0.01$ 代表有顯著性差異)。

【0325】 實驗結果如圖12及表13所示，抗體藥物偶聯物DB1001-X2給藥後表現出顯著的劑量依賴性抑瘤活性。

實施例17：抗體藥物偶聯物對人B7H4陽性的乳腺癌細胞MCF-7荷瘤小鼠藥效評價

【0326】 為比較DB1001-X2與同類競品對體內形成腫瘤的抑制作用，在小鼠體內用B7H4陽性表現的人乳腺癌細胞MCF-7形成移植瘤後，評估DB1001-X2、DB1001-BM-ADC1、DB1001-BM-ADC2、DB1001-Dxd的抗腫瘤效果。

【0327】 1. 受試藥物及材料

空白對照組(對照組)：生理鹽水

DB1001-X2(治療組)：3mg/kg

【0328】 2. 配製方法：所有樣品均用生理鹽水稀釋配製。

【0329】 3. 試驗動物：6-7周齡的雌性NCG小鼠，來自江蘇集萃藥康生物科技股份有限公司。

【0330】 4. 試驗方法：

收集對數生長期的MCF-7細胞(接種代次為N+12)，去除培養液並用PBS洗兩次後接種(荷瘤前及荷瘤後細胞存活率分別為：96.03%及94.81%)，接種量： 1×10^7 cells/75 μ L/隻(1:1添加基質膠)。接種後第19天，平均腫瘤體積達到107.44 mm³時，挑選50隻小鼠根據腫瘤體積隨機分成10組，每組5隻。分組當天定義為D0天，

並於分組當天D0天開始給藥。分剩小鼠安樂處理。受試品共注射1次，採用劑量為3 mg/kg。每週測量2次瘤體積和體重，記錄數據。

【0331】 溶媒對照組或治療組每組5隻小鼠。試驗終點時間為分組後第25天，透過測量腫瘤體積計算抑瘤率。

【0332】 腫瘤體積的計算公式為： $V = 0.5 a \times b^2$ ， a 和 b 分別表示腫瘤的長徑和短徑。化合物的抑瘤療效用T/C (%) 評價。T/C (%) 的百分比值是一項反應腫瘤生長抑制的指標，T和C分別表示給藥組和對照組在某一天的平均腫瘤體積。腫瘤生長抑制率用下列公式計算： $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ，其中 T_i 為某一天某給藥組的平均腫瘤體積， T_0 為此給藥組在開始給藥時的平均腫瘤體積； V_i 為某一天(與 T_i 同一天)溶媒對照組的平均腫瘤體積， V_0 為溶媒對照組在開始給藥時的平均腫瘤體積。

【0333】 兩組樣本之間比較採用獨立樣本T檢驗(T-Test)，數據使用SPSS進行分析， $P < 0.05$ 為具有顯著性差異。作圖軟體為GraphPad Prism。

【0334】 實驗結果：本發明抗體藥物偶聯物DB1001-X2單次給藥後表現出顯著的劑量依賴性抑瘤活性。

實施例18：抗體藥物偶聯物對人低表現B7H4的子宮內膜癌細胞RL95-2荷瘤小鼠藥效評價

【0335】 為研究DB1001-X2對體內形成腫瘤的抑制作用，在小鼠體內用B7H4陽性低表現的人子宮內膜癌細胞RL95-2形成移植瘤後，評估DB1001-X2的抗腫瘤效果。

【0336】 1. 受試藥物及材料

空白對照組(對照組)：磷酸鹽緩衝液(DPBS)

DB1001-X2(治療組)：1 mg/kg

DB1001-X2(治療組)：3 mg/kg

DB1001-X2(治療組)：10 mg/kg

【0337】 2. 配製方法：所有樣品均用磷酸鹽緩衝液(DPBS)稀釋配製。

【0338】 3. 試驗動物：6-8周齡的雌性BALB/c Nude小鼠，購自浙江維通利華實驗動物技術有限公司。

【0339】 4. 試驗方法：

收集對數生長期的RL95-2細胞，在每隻小鼠的右側頸背部皮下接種 5×10^6 個RL95-2細胞，接種體積為0.2 mL，細胞懸浮液為PBS加基質膠(體積比為1:1)。體內藥效實驗在細胞接種後第20天，腫瘤平均體積達到134 mm³時，根據腫瘤體積隨機化分組給藥，每組5隻小鼠。分組當天定義為D0天，並於分組當天D0天開始給藥。受試品每兩周注射一次，採用劑量為3 mg/kg，共注射2次，試驗終點時間為分組後第28天，每週測量2次瘤體積和體重，記錄數據。

【0340】 腫瘤體積的計算公式為： $V = 0.5 a \times b^2$ ， a 和 b 分別表示腫瘤的長徑和短徑。化合物的抑瘤療效用T/C（%）評價。T/C（%）的百分比值是一項反應腫瘤生長抑制的指標，T和C分別表示給藥組和對照組在某一天的平均腫瘤體積。腫瘤生長抑制率用下列公式計算： $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ，其中 T_i 為某一天某給藥組的平均腫瘤體積， T_0 為此給藥組在開始給藥時的平均腫瘤體積； V_i 為某一天(與 T_i 同一天)溶媒對照組的平均腫瘤體積， V_0 為溶媒對照組在開始給藥時的平均腫瘤體積。

【0341】 統計分析，基於分組後第28天數據，利用GraphPad Prism軟體進行統計學分析評估組間差異。三組或多組間比較用one-way ANOVA(Dunnett多重比較檢驗和Tukey多重比較檢驗)進行分析， $p < 0.05$ 認為有顯著性差異。

表14. 受試物對RL95-2細胞皮下異種移植腫瘤模型的抑瘤藥效評價
(基於給藥後28天腫瘤體積計算得出)

組別	腫瘤體積 (mm ³) ¹	T/C (%) ²	TGI (%) ²	<i>p</i> 值 ³
空白對照組,	1050 ± 197			
DB1001-X2, 1 mg/kg	593 ± 79	57.86	49.92	*
DB1001-X2, 3 mg/kg	258 ± 33	24.06	86.52	****
DB1001-X2, 10 mg/kg	74 ± 5	7.05	106.59	****

- 1. 腫瘤體積用平均值 ± 標準誤表示；
- 2. 腫瘤生長抑制由T/C (T/C (%) = $T_{28} / V_{28} \times 100$)和TGI (TGI (%) = $[1 - (T_{28} - T_0) / (V_{28} - V_0)] \times 100$) 反應；

3. p 值根據腫瘤體積計算($p < 0.05$ 代表有統計學差異， $p < 0.01$ 代表有顯著性差異)。

【0342】 實驗結果如圖 13 及表 14 所示，抗體藥物偶聯物 DB1001-X2 給藥後表現出顯著的劑量依賴性抑瘤活性。

實施例 19：抗體藥物偶聯物對人低表現 B7H4 的卵巢癌細胞 OVCAR-3 荷瘤小鼠藥效評價

【0343】 為研究 DB1001-X2 對體內形成腫瘤的抑制作用，在小鼠體內用 B7H4 陽性低表現的人卵巢癌細胞 OVCAR-3 形成移植瘤後，評估 DB1001-X2 的抗腫瘤效果。

【0344】 1. 受試藥物及材料

空白對照組(對照組)：生理鹽水

DB1001-X2(治療組)：1 mg/kg

DB1001-X2(治療組)：3 mg/kg

DB1001-X2(治療組)：10 mg/kg

【0345】 2. 配製方法：所有樣品均用生理鹽水稀釋配製。

【0346】 3. 試驗動物：6-8 周齡的雌性 BALB/c Nude 小鼠，購自集萃藥康生物科技有限公司。

【0347】 4. 試驗方法：

將 1×10^7 個 OVCAR-3 細胞接種於 6-8 周齡的雌性 BALB/c Nude 小鼠右側背部皮下，細胞重新懸浮在 1：1 的 PBS 與基質膠中 (0.2 ml/隻)，當腫瘤長至約 142.85 mm^3 ，對荷瘤小鼠進行

StudyDirector™隨機分組，並於當天(第0天)開始透過靜脈(i.v.)注射受試品，每兩週一次，共注射2次，DB1001-X2採用劑量分別為1 mg/kg，3 mg/kg和10 mg/kg。試驗終點時間為分組後第27天，每週測量2次瘤體積和體重，記錄數據。

【0348】 對照組或治療組每組5隻小鼠。透過測量腫瘤體積計算抑瘤率。

【0349】 腫瘤體積的計算公式為： $V = 0.5 a \times b^2$ ， a 和 b 分別表示腫瘤的長徑和短徑。化合物的抑瘤療效用T/C (%) 評價。T/C (%) 的百分比值是一項反應腫瘤生長抑制的指標，T和C分別表示給藥組和對照組在某一天的平均腫瘤體積。腫瘤生長抑制率用下列公式計算： $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ，其中 T_i 為某一天某給藥組的平均腫瘤體積， T_0 為此給藥組在開始給藥時的平均腫瘤體積； V_i 為某一天(與 T_i 同一天)溶媒對照組的平均腫瘤體積， V_0 為溶媒對照組在開始給藥時的平均腫瘤體積。

【0350】 兩組樣本之間比較採用獨立樣本T檢驗(T-Test)，數據使用SPSS進行分析， $P < 0.05$ 為具有顯著性差異。作圖軟體為GraphPad Prism。

表15. 受試物對OVCAR-3細胞皮下異種移植腫瘤模型的抑瘤藥效
評價

(基於給藥後27天腫瘤體積計算得出)

組別	腫瘤體積 (mm ³) ¹	T/C (%) ²	TGI (%) ²	<i>p</i> 值 ³
空白對照組,	1144.84 ± 144.07			
DB1001-X2, 1 mg/kg	390.93 ± 85.40	34.15	65.85	0.0132
DB1001-X2, 3 mg/kg	122.94 ± 17.80	10.74	89.26	0.0000534
DB1001-X2, 10 mg/kg	47.72 ± 7.95	4.17	95.83	5.14e-10

- 1. 腫瘤體積用平均值 ± 標準誤表示；
- 2. 腫瘤生長抑制由T/C (T/C (%) = T₂₇/ V₂₇ ×100)和TGI (TGI (%) = [1-(T₂₇-T₀)/ (V₂₇-V₀)] ×100) 反應；
- 3. *p* 值根據腫瘤體積計算(*p* < 0.05代表有統計學差異，*p* < 0.01代表有顯著性差異)。

【0351】 實驗結果如圖 14 及表 15 所示，抗體藥物偶聯物 DB1001-X2給藥後表現出顯著的劑量依賴性抑瘤活性。

【0352】 雖然以上描述了本發明的具體實施方式，但是本領域的技術人員應當理解，這些僅是舉例說明，在不背離本發明的原理和實質的前提下，可以對這些實施方式做出多種變更或修改。因此，本發明的保護範圍由所附申請專利範圍限定。

【符號說明】

【0353】 無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="zh"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="[P23431014T]
SEQ.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0"
productionDate="2023-04-14">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>113121305</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-03-30</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>P23431014T</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>CN</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>202210334522X</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-03-30</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">大陸商映恩生物製藥(蘇州)有限公司
</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>DUALITY BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">B7H4抗體藥物偶聯物及其用途</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>10</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q2">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SFGMH</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 2" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>VISYDASNEYADSVKG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGALRWYFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RASQSISSNLG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GASTRAT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql2">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQYRSWPPLT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

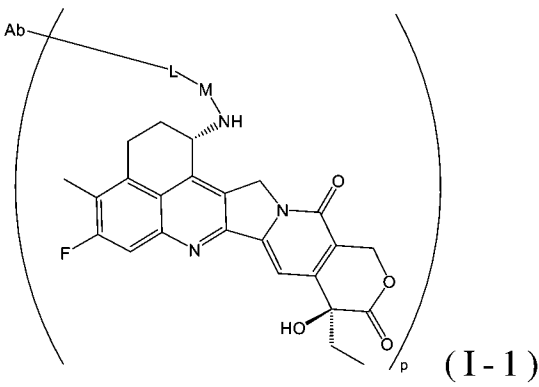
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDASNEYAD
SVKGRF I ISRDNSKDTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="ql6">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYRSWPPLTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>449</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..449</INSDFeature_location>

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q18">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSFGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDASNEYAD
SVKGRF I ISRDNSKDTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAKGGALRWYFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_seq
uence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>215</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..215</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q20">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

<NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
 </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISSNLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQYRSWPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDS
eq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(I-1)所示：



其中，

M為-L²-L¹-C(O)-；

L²為-O-或-S-；

L¹為-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH₂-、C₃-C₆飽和的環烷基或3-6員飽和的雜環基，所述C₃-C₆飽和的環烷基和3-6員飽和的雜環基各自獨立地任選被一個或多個R^{2a}取代；

m選自1、2、3或4；所述的3-6員飽和的雜環基中的雜原子選自N、O和S，雜原子數為1-3個；

R^{1a}各自獨立地選自氫、鹵素、羥基、胺基和C₁-C₆烷基，所述C₁-C₆烷基任選被一個或多個R取代；

R^{1b}和R^{2a}各自獨立地選自氫、鹵素、羥基、胺基和C₁-C₆烷基，所述C₁-C₆烷基任選被一個或多個R取代；

R各自獨立地為氫或鹵素；

L是連接子單元；

p表示平均連接數，且p選自1到10的整數或小數；

Ab為抗B7H4抗體或其抗原結合片段。

【請求項2】 如請求項1所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,和所述輕鏈可變區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【請求項3】 如請求項1或2所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含：胺基酸序列如SEQ ID NO:7所示或與其具有至少95%、96%、97%、98%或99%相同性的重鏈可變區，和胺基酸序列如SEQ ID NO:8所示或與其具有至少95%、96%、97%、98%或99%相同性的輕鏈可變區。

【請求項4】 如請求項1或2所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段為鼠源抗體或其片段、嵌合抗體或其片段、人源化抗體或其片段。

【請求項5】 如請求項1或2所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗

B7H4 抗體或其抗原結合片段選自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂、sdAb、雙抗體或線性抗體。

【請求項6】 如請求項1或2所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗體為IgG1形式的抗體、IgG2形式的抗體、IgG3形式的抗體或IgG4形式的抗體。

【請求項7】 如請求項1或2所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體或其抗原結合片段包含：胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示或與其具有至少95%、96%、97%、98%或99%相同性的重鏈，和胺基酸序列如SEQ ID NO: 10所示或與其具有至少95%、96%、97%、98%或99%相同性的輕鏈。

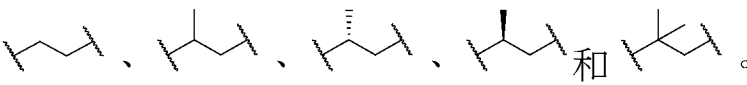
【請求項8】 如請求項1-7中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中p為3-8的整數或小數。

【請求項9】 如請求項1-7中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH₂-；R^{1a}選自：氫、鹵素和C₁-C₆烷基；R^{1b}選自：氫、鹵素和C₁-C₆烷基。

【請求項10】 如請求項9所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中L¹為

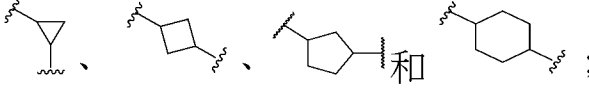
$-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ ； R^{1a} 為 $-CH_3$ ； R^{1b} 選自：氫和 $-CH_3$ 。

【請求項11】 如請求項1-10中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中 L^1 為 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH_2-$ ； m 為1或2。

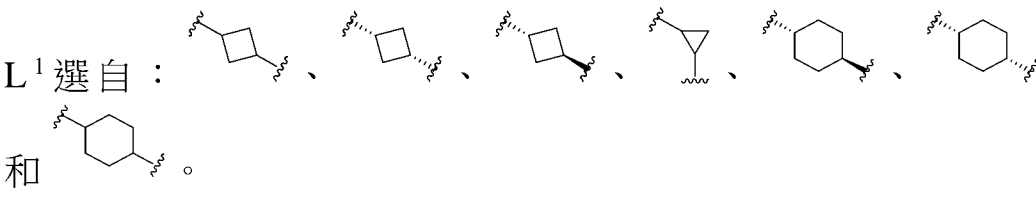
【請求項12】 如請求項1-11中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中 L^1 選自：。

【請求項13】 如請求項1-7中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中 L^1 為 C_3-C_6 飽和的環烷基或3-6員飽和的雜環基，所述 C_3-C_6 飽和的環烷基和3-6員飽和的雜環基各自獨立地任選被一個或多個 R^{2a} 取代， R^{2a} 各自獨立地選自：氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基。

【請求項14】 如請求項13所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中 L^1 為任選被一個或多個 R^{2a} 取代的 C_3-C_6 飽和的環烷基； R^{2a} 各自獨立地選自：氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基。

【請求項15】 如請求項14所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中 L^1 為任選被1、2或3個 R^{2a} 取代的：； R^{2a} 各自獨立地選自：氫、鹵素和 C_1-C_6 烷基。

【請求項16】 如請求項1-15中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中



【請求項17】 如請求項1-16中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中

M為-L²-L¹-C(O)-；

L²為-O-；

L¹為-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-CH₂-或C₃-C₆飽和的環烷基，所述C₃-C₆飽和的環烷基任選被1、2或3個R^{2a}取代；
m選自1或2；

R^{1a}各自獨立地選自氫、鹵素和C₁-C₆烷基，所述C₁-C₆烷基任選被一個或多個R取代；

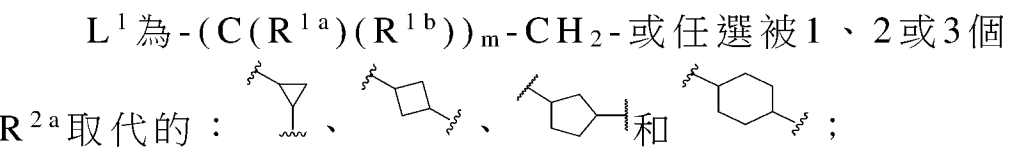
R^{1b}和R^{2a}各自獨立地選自氫、鹵素和C₁-C₆烷基，所述C₁-C₆烷基任選被一個或多個R取代；

R各自獨立地為氫或鹵素。

【請求項18】 如請求項17中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中

M為-L²-L¹-C(O)-；

L²為-O-；



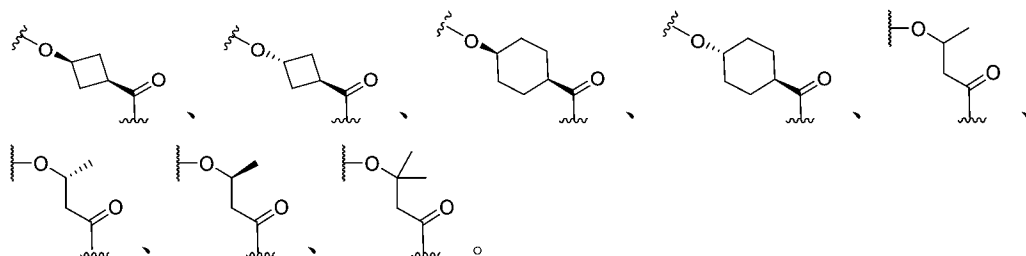
m選自1或2；

R^{1a} 各自獨立地選自鹵素和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任選被一個或多個 R 取代；

R^{1b} 和 R^{2a} 各自獨立地選自氫、鹵素和 C_1 - C_6 烷基，
所述 C_1 - C_6 烷基任選被一個或多個R取代；

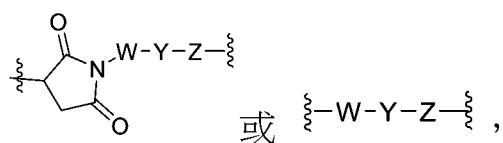
R各自獨立地為氫或鹵素。

【請求項19】 如請求項1-18中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物,其中所述-M-選自:



【請求項20】 如請求項1-19中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物,其中所述L為-L_a-L_b-L_c- ,

所述-L_a-為



其中，W為 $-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-$ ，Y為 $-(OCH_2CH_2)_{yn}-O_{yp}-$ ，Z為 $-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}-$ ；

其中 w_n 為 1、2、3 或 6，

W的0個或1個伸甲基單元各自獨立地被-Cyr-、
-N(R^{wx})C(O)-、-C(O)N(R^{wx})-、或-C(O)-替代；

其中 y_n 為 0、4 或 8， y_p 為 0 或 1；

其中 z_n 為 1、2 或 3，

Z 的 1 個伸甲基單元各自獨立地被 -Cyr-、
-N(R^{zx})C(O)-、-C(O)N(R^{zx})-、或 -C(O)- 替代；

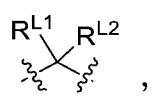
-Cyr- 為 3 到 10 員飽和的環烷基，其中所述 -Cyr- 是未取代的或獨立地被 1 到 3 個取代基 R^{cx} 取代；

其中每個 R^{wa} ， R^{wb} ， R^{za} ， R^{zb} ， R^{wx} ， R^{zx} ， R^{cx} 各自獨立地為氫、鹵素、-OR^r 或被 R^r 任選取代的 C₁₋₆ 烷基；

其中每個 R^r 各自獨立地為氫、鹵素或 C₁₋₆ 烷基；

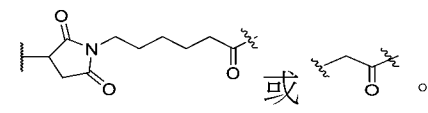
所述 -L_b- 表示由 2 到 4 個胺基酸構成的胜肽殘基，所述 -L_b- 的胜肽殘基為由選自以下組中的胺基酸形成的胜肽殘基：苯丙胺酸、甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、瓜胺酸和離胺酸；

所述 -L_c- 為

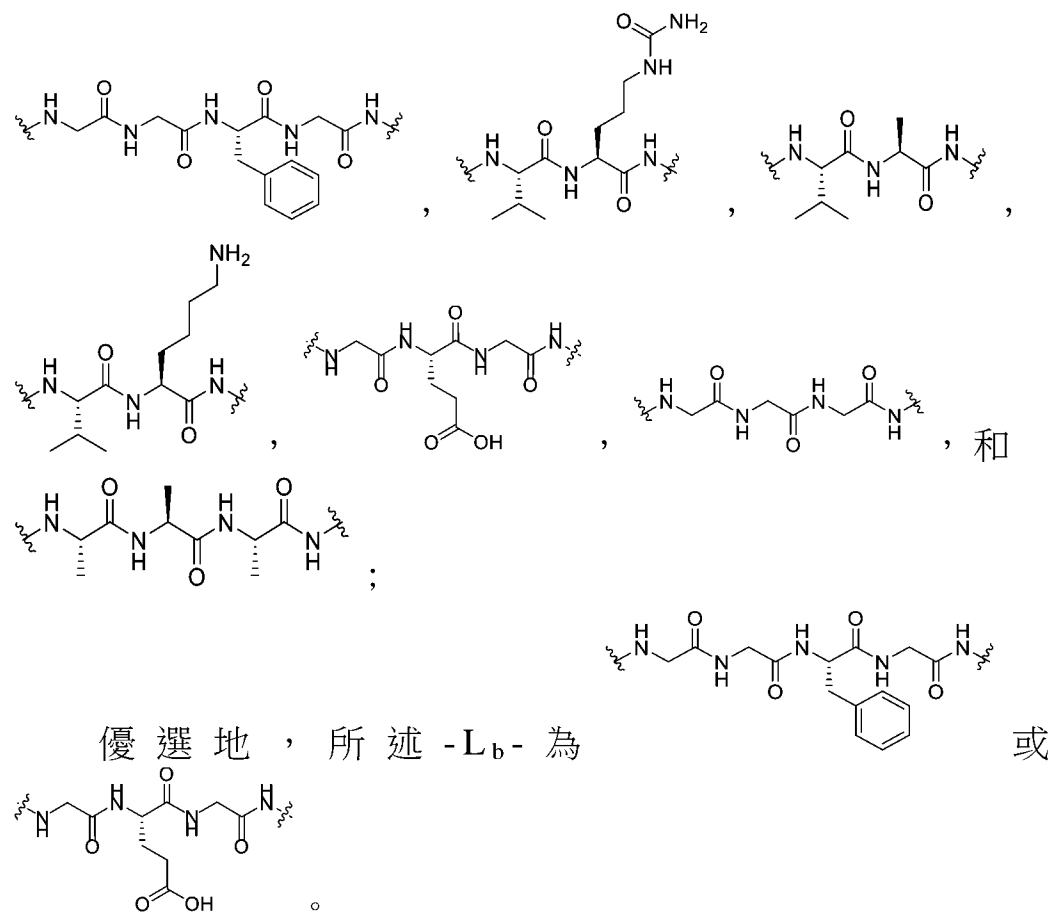


其中 R^{L1} 、 R^{L2} 各自獨立地選自以下組：氫、鹵素、-OH 和 C₁₋₆ 烷基。

【請求項21】 如請求項 20 所述的抗 B7H4 抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物,其中所述 -L_a- 為



【請求項22】 如請求項 20 所述的抗 B7H4 抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述 -L_b- 選自以下組：



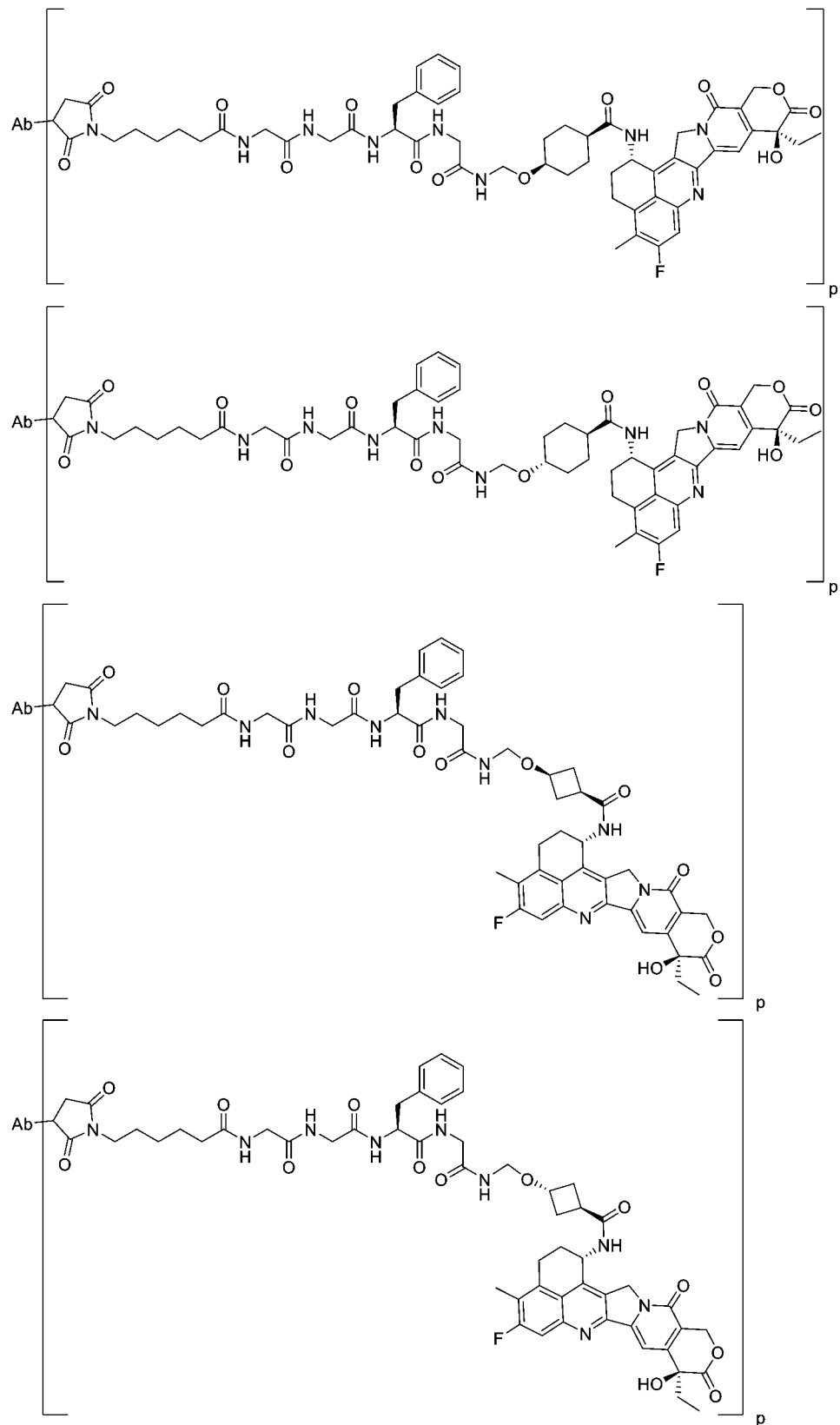
【請求項23】 如請求項20所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述 $-L_c-$ 為 *CC*。

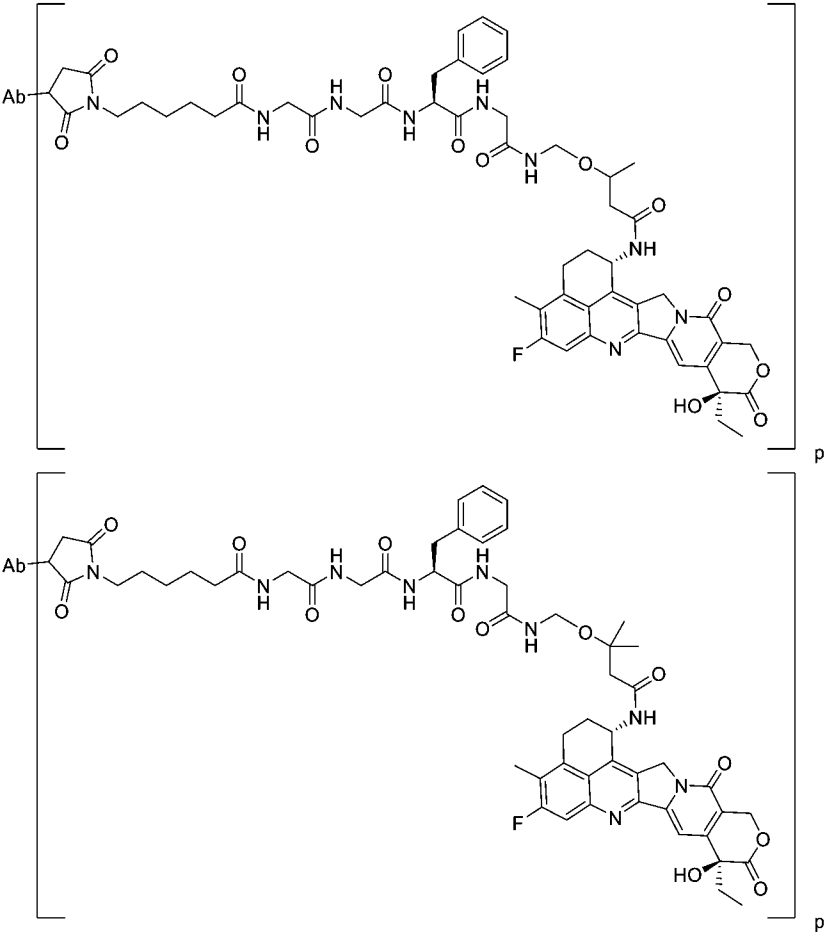
【請求項24】 如請求項20-23中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物,其中所述L為

Structure 12: *C1CC(=O)N(CCCCCC(=O)NCC(=O)N[C@@H](Cc2ccccc2)C(=O)NCC(=O)N)C1=O

【請求項25】 如請求項1-24中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物結構如式(Ⅱ-1)或(Ⅱ-2)所示：

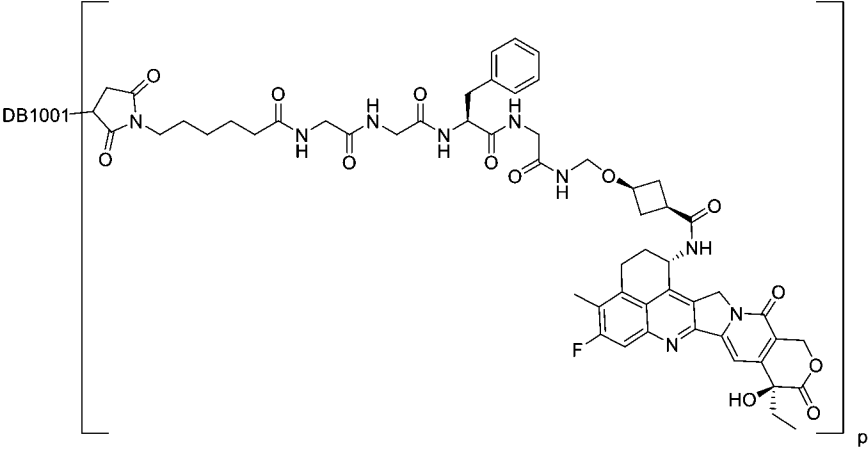
【請求項26】 如請求項1-25中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物選自以下結構式：

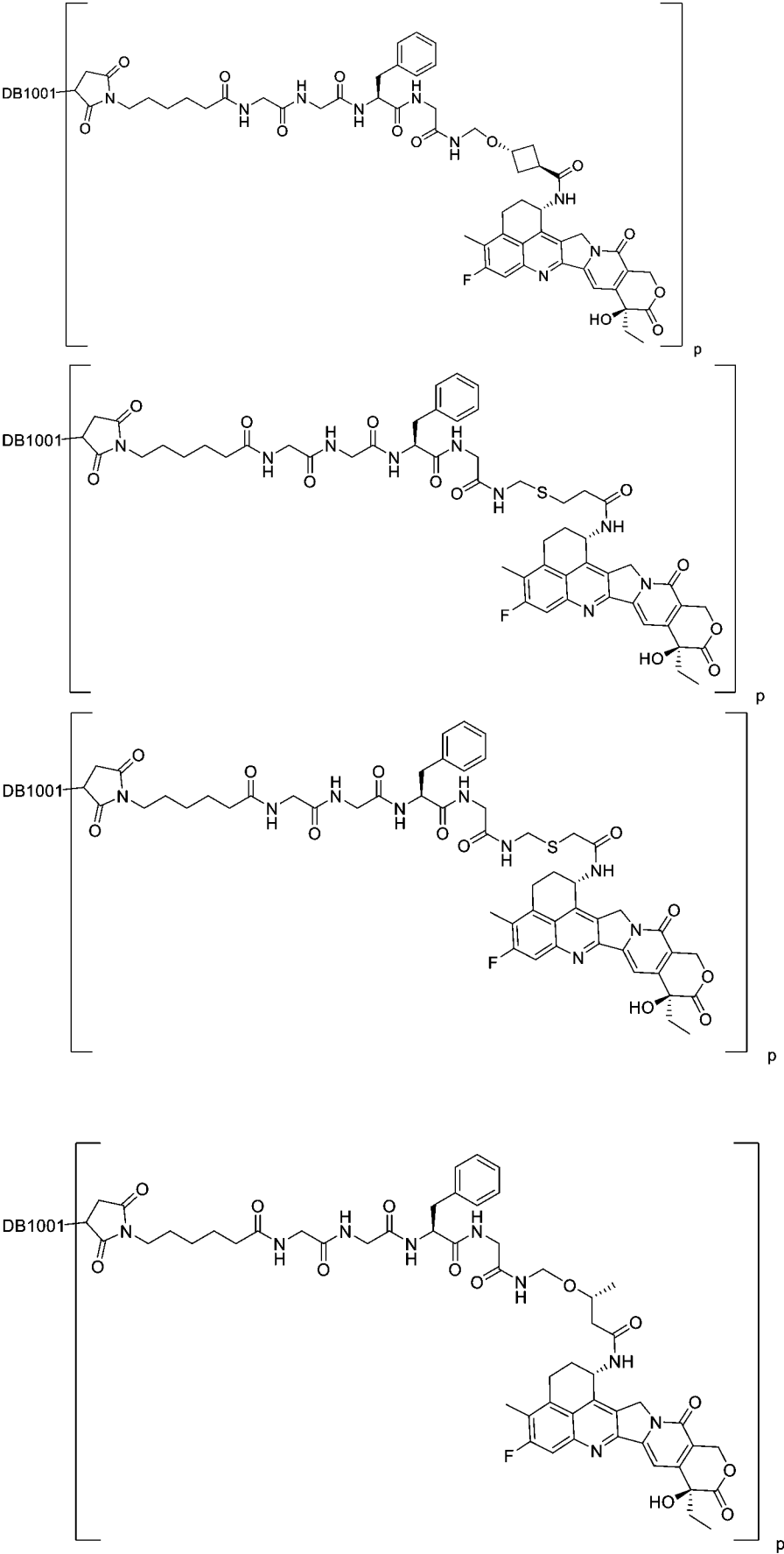


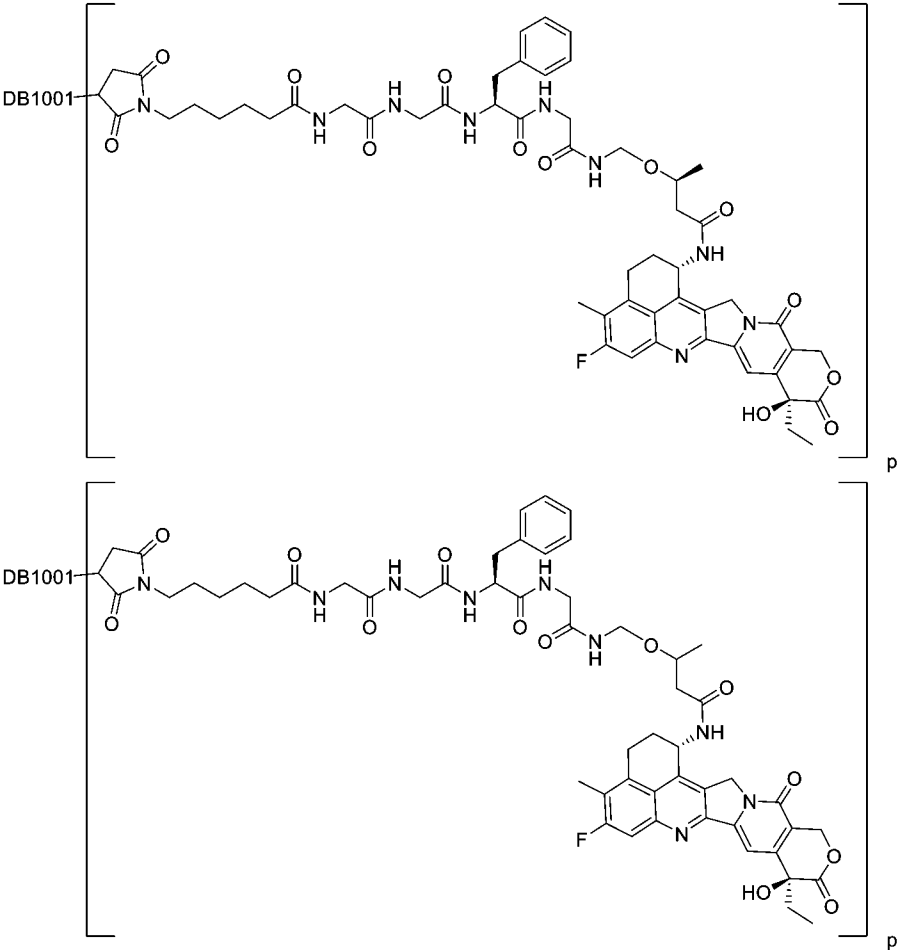


其中，
p如請求項1或8所述；
Ab如請求項1-7中任一項所述。

【請求項27】 一種抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，其中所述抗B7H4抗體藥物偶聯物選自：







其中，

p 表示平均連接數，且 p 選自 1 到 10 的整數或小數，
優選 3-8 的整數或小數。

- 【請求項28】 一種藥物組成物，其包含如請求項 1-27 中任一項所述的抗 B7H4 抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物，和藥學上可接受的載劑或賦形劑。
- 【請求項29】 如請求項 1-27 中任一項所述的抗 B7H4 抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物或請求項 28 所述的藥物組成物在製備用於治療和 / 或預防 B7H4 媒介的疾病或病症的藥物中的用途，優選地，所述疾病或病症為 B7H4 陽性表現的癌症；更優選地，所述癌症選自乳腺癌、卵巢癌和子宮內膜瘤。

【請求項30】 一種治療和/或預防B7H4媒介的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用如請求項1-27中任一項所述的抗B7H4抗體藥物偶聯物、其異構物、其藥學上可接受的鹽或其混合物或請求項28所述的藥物組成物，優選地，所述疾病或病症為B7H4陽性表現的癌症；更優選地，所述癌症選自乳腺癌、卵巢癌和子宮內膜瘤。

|(發明圖式)|

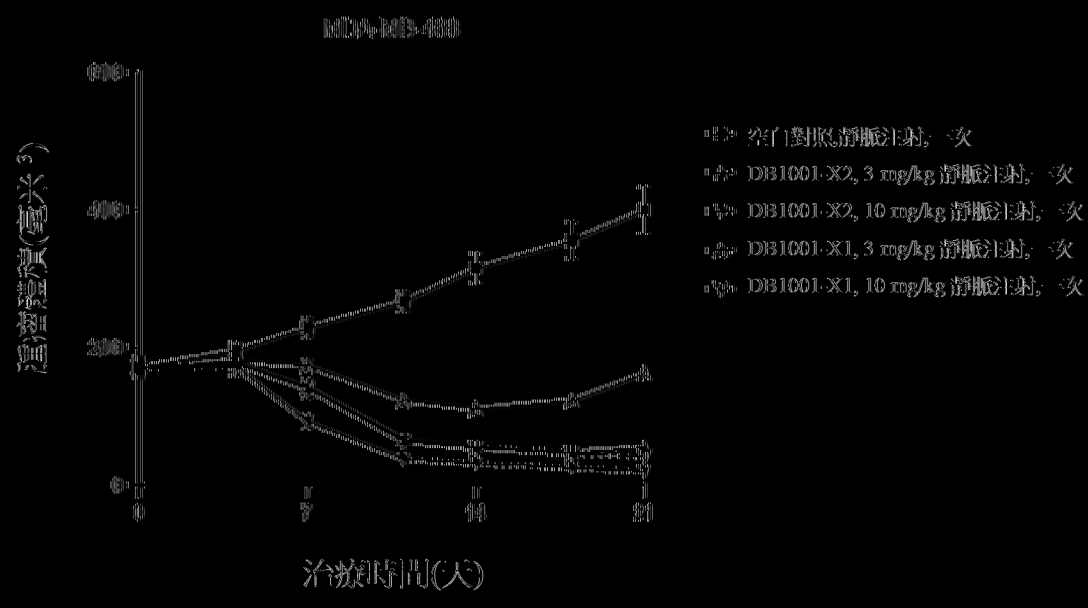


圖 1

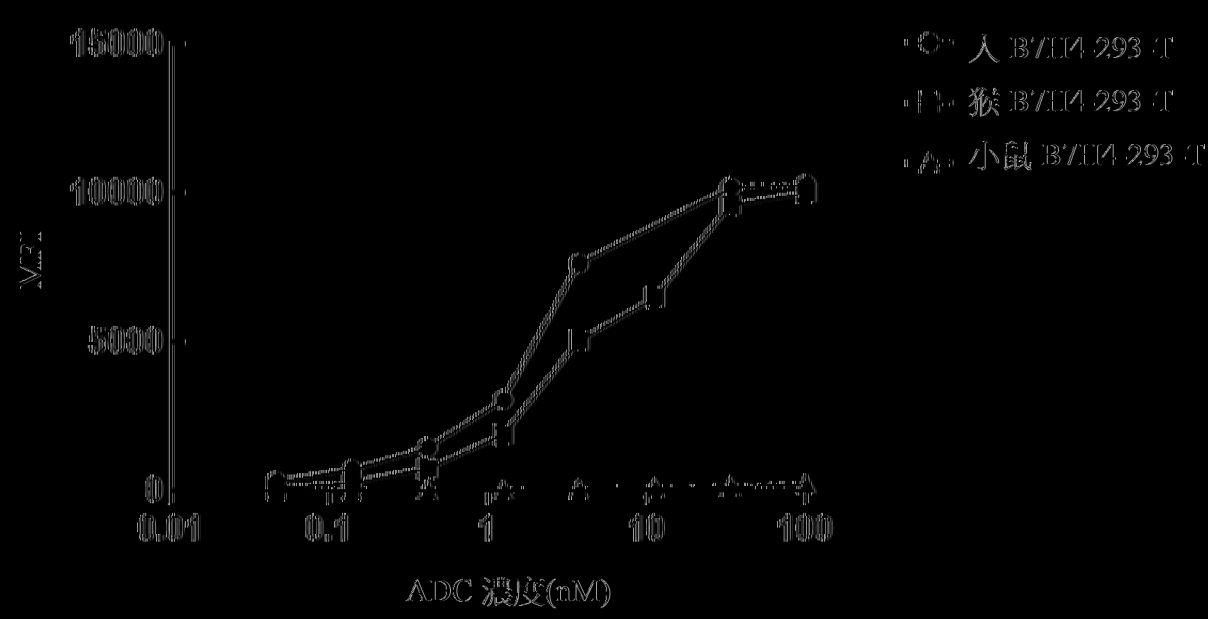


圖 2

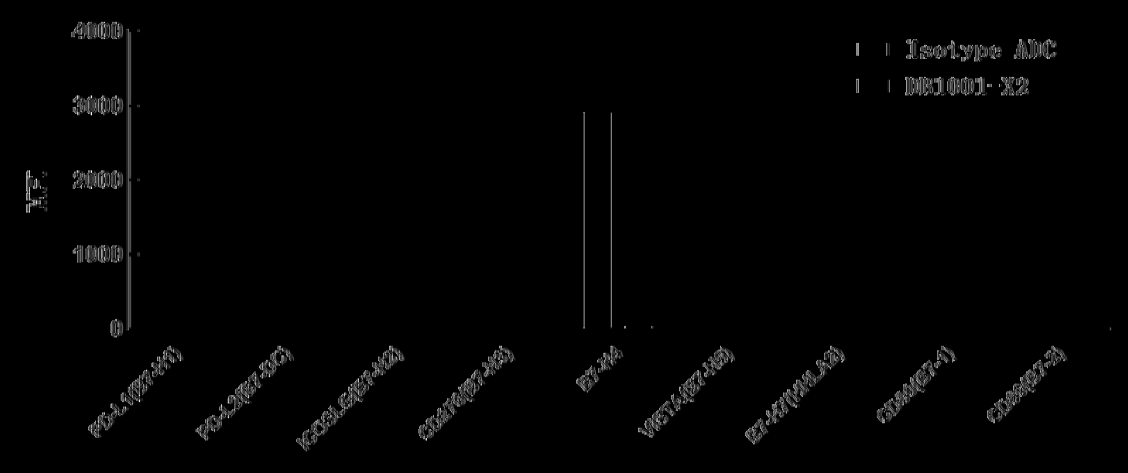


圖 3

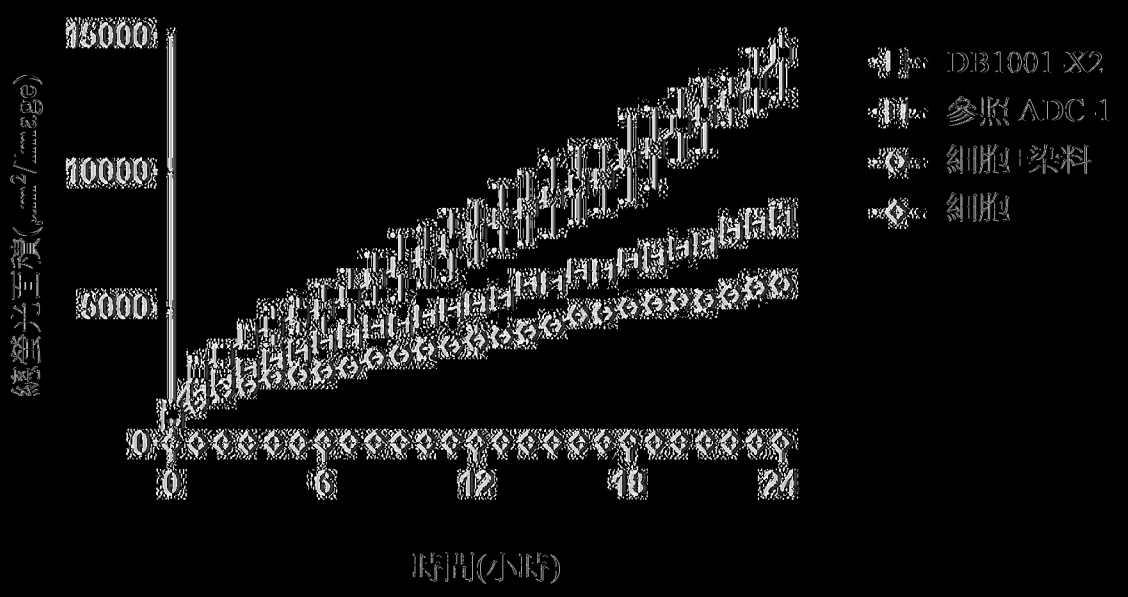


圖 4

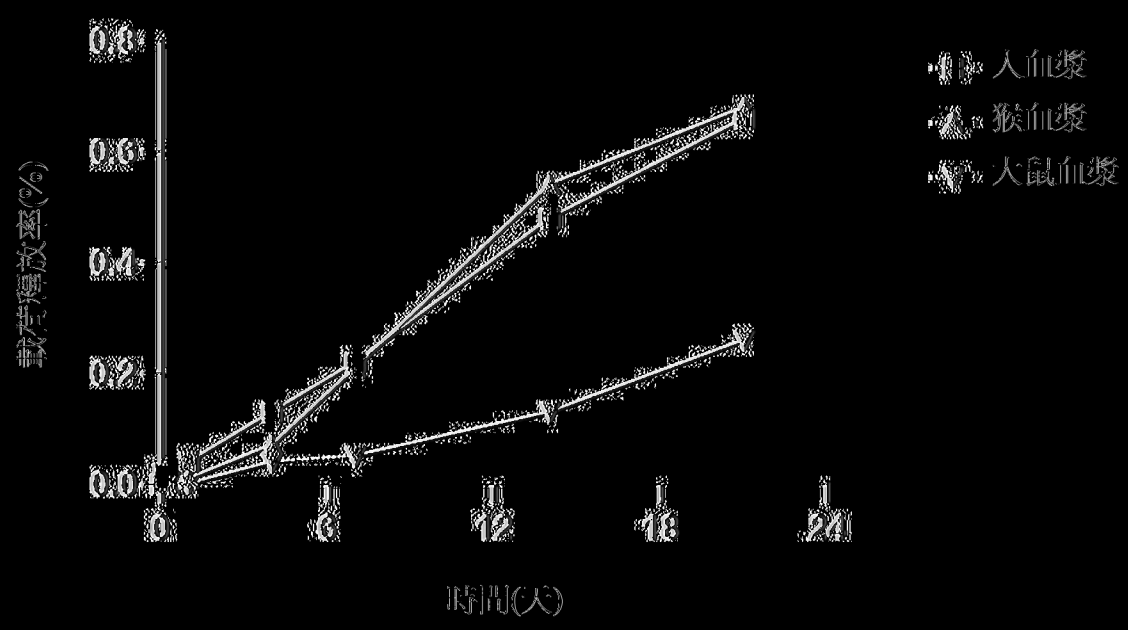


圖 11

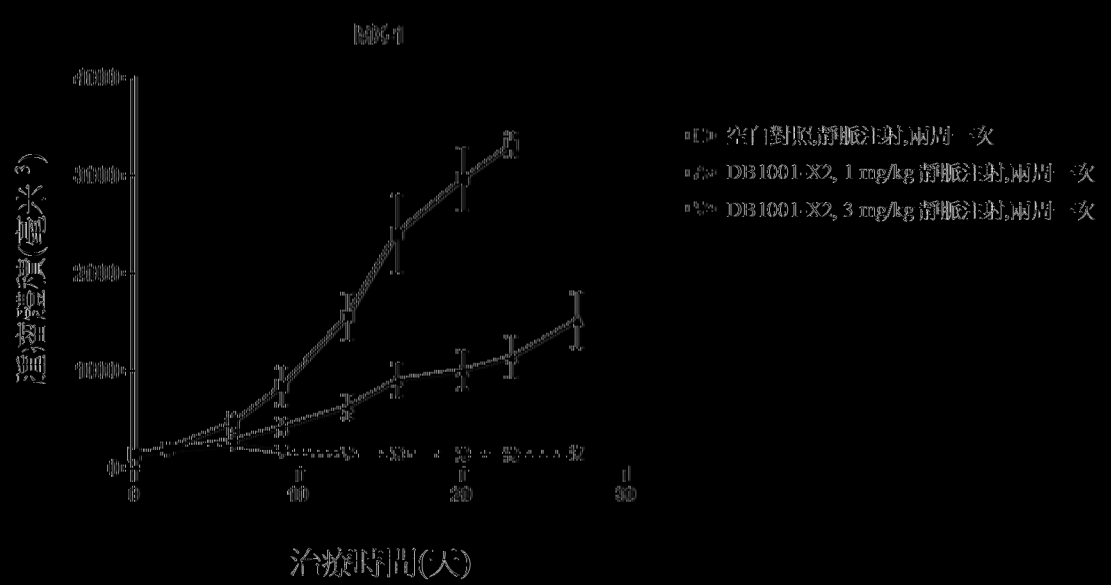


圖 12

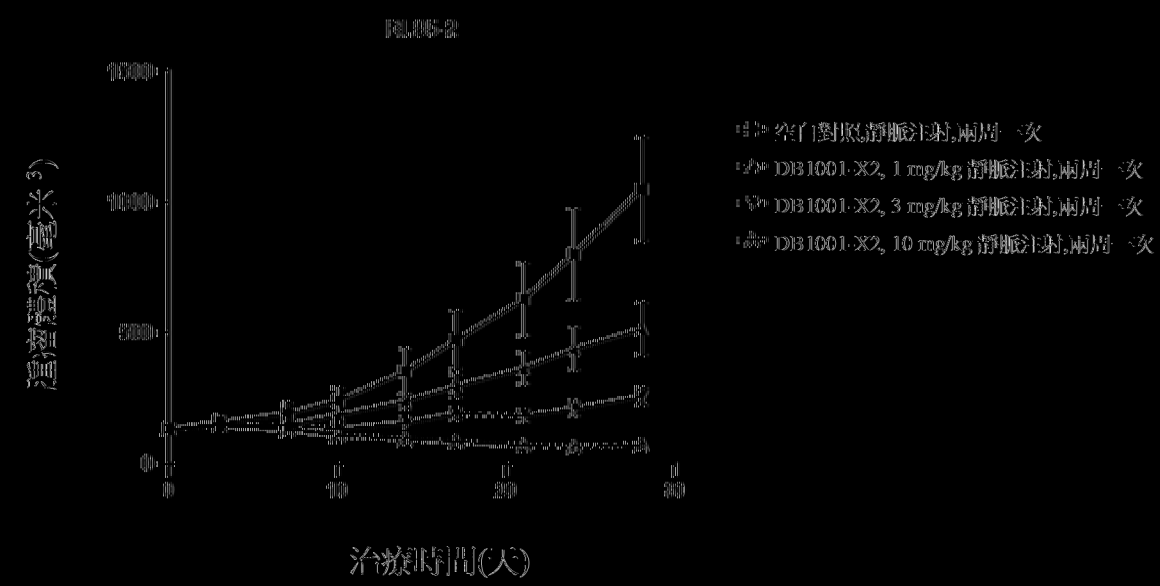


圖 13

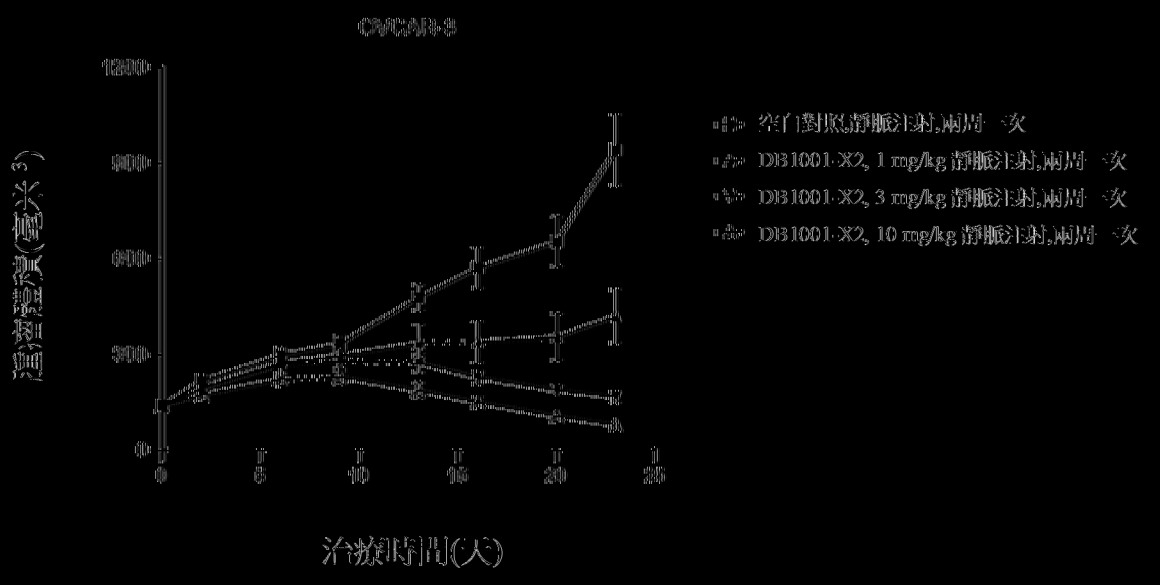


圖 14