

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2022年10月20日 (20.10.2022)



(10) 国际公布号  
**WO 2022/218288 A1**

(51) 国际专利分类号:

*A61K 47/68* (2017.01)     *A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)     *A61P 35/02* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)     *C07K 16/32* (2006.01)  
*A61K 49/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/086254

(22) 国际申请日: 2022年4月12日 (12.04.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110390274.6     2021年4月12日 (12.04.2021)     CN

(71) 申请人: 中国科学院上海有机化学研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区零陵路345号, Shanghai 200032 (CN)。

(72) 发明人: 王文元 (WANG, Wenyuan); 中国上海市浦东新区海科路100号13号楼222室, Shanghai 201210 (CN)。 王召印 (WANG, Zhaoyin); 中国上海市浦东新区海科路100号13号楼222室, Shanghai 201210 (CN)。 张琳 (ZHANG, Lin); 中国上海市浦东新区海科路100号13号楼222室, Shanghai 201210 (CN)。

(74) 代理人: 南京华讯知识产权代理事务所 (普通合伙) (NANJING CIPIC INTELLECTUAL PROPERTY FIRM (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国江苏省南京市江北新区研创园江淼路88号腾飞大厦B座20层2004室, Jiangsu 210031 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

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

(54) Title: METHOD FOR PREPARING ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

(54) 发明名称: 一种抗体药物偶联物的制备方法

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is a method for preparing an antibody-drug conjugate. Specifically, the preparation method comprises the following steps: (a) providing a mutant antibody comprising two reactive groups, wherein one of the reactive groups is free sulfhydryl (-SH), and the other is hydrocarbonylacylaryl; and (b) carrying out a reaction on the mutant antibody, a drug molecule A having a hydroxylamine (-O-NH<sub>2</sub>) group or modified with a hydroxylamine group, and a drug molecule B having a maleimide group or modified with a maleimide group according to any sequence so as to obtain the antibody-drug conjugate. The method provided in the present invention can efficiently prepare the antibody-drug conjugate with reduced drug resistance and improved efficacy by means of a one-pot method.

(57) 摘要: 本发明公开了一种抗体药物偶联物的制备方法。具体地, 该制备方法包括如下步骤: (a) 提供一种包含两个反应基团的突变抗体, 其中, 所述反应基团一个为游离巯基(-SH), 另一个为烃酰基芳基; (b) 按任意先后顺序, 将所述突变抗体与带有羟胺(-O-NH<sub>2</sub>)基团或修饰有羟胺基团的药物分子A和带有马来酰亚胺基团或修饰有马来酰亚胺基团的药物分子B反应, 从而得到所述抗体药物偶联物。本发明的方法可以通过一锅法高效制备耐药性降低、药效提高的抗体药物偶联物。

WO 2022/218288 A1

## 一种抗体药物偶联物的制备方法

### 5 技术领域

本发明属于生物医学领域，具体涉及一种双功能抗体药物偶联物的制备方法。

### 背景技术

10 恶性肿瘤是种高致死性疾病。传统的癌症治疗方式包括外科手术，化学治疗和物理治疗，治疗效果不太理想，肿瘤细胞容易产生耐药性且一旦复发转移其后果更为严重。靶向小分子药物和单克隆抗体是近年来兴起的肿瘤治疗方式，但是治疗病症相对局限以及长期使用易出现耐药现象而导致治疗效果下降。肿瘤免疫治疗是一种全身性治疗方法，其原理是通过外界的条件性辅助，增强患者体内免疫系统对  
15 功能，从而达到杀伤肿瘤细胞，缓解病症的目的。但是对于产生免疫耐受的肿瘤也常常收效甚微。由于当前任何一种疗法单一使用都有一定的局限性。

抗体偶联型药物(antibody drug conjugates, ADCs)就是集化疗药物的高效毒性和抗体免疫治疗的高度特异性而对病人进行高效低毒治疗的一类新型药物。ADCs是将具有抗肿瘤毒性的小分子抗癌药物和具有靶向特异性的单克隆抗体利用连接  
20 子共价偶联形成的复合药。这种免疫偶联物融合了小分子药物(300-1000Da, IC<sub>50</sub>在nmol以下)的高效抗肿瘤活性和单克隆抗体的高度选择性，稳定性和良好的药代动力特性。在选择好合适靶点后，就需要制备对该靶点有良好亲和力的抗体。但抗体150KD的分子量使ADCs很难透过毛细血管内皮层以及细胞外的间隙，导致其进入实体肿瘤部位的量远小于给药的剂量，因此早期的ADCs主要是针对血液瘤。为了  
25 使ADCs可以用于治疗实体瘤，目前尝试在保证抗体与抗原特异性结合的能力的前提下去除一些非必需的片段，降低ADCs的分子量，之后再与高效的小分子化合物偶联，从而达到治疗实体瘤的目的。至今为止，随着临床研究的不断深入，ADCs在长期使用中也会渐渐出现了耐药的状况。

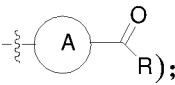
因此，肿瘤靶向治疗领域需要提供新的用于耐药性降低、药效提高的治疗药

物及其制备方法。

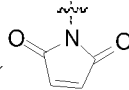
**发明内容**

本发明的目的是提供一种耐药性降低、药效提高的抗肿瘤药物及其制备方法。

5 本发明第一方面，提供了一种抗体药物偶联物的制备方法，包括步骤：

(a) 提供一种包含两个反应基团的突变抗体，其中，所述反应基团一个为游离巯基(-SH)，另一个为酰基芳基(  )；

(b) 按任意先后顺序，将所述突变抗体与带有羟胺(-O-NH<sub>2</sub>)基团或修饰有羟

胺基团的药物分子 A 和带有马来酰亚胺基团(  )或修饰有马来酰亚胺基团的药物分子 B 反应，从而得到所述抗体药物偶联物；

其中，当所述突变抗体与带有羟胺基团或修饰有羟胺基团的药物分子 A 反应时，反应温度 T1 为 37±10°C 且 pH 为 3-5；且

当所述突变抗体与带有马来酰亚胺基团或修饰有马来酰亚胺基团的药物分子 B 反应时，反应温度 T2 为 4±10°C 且 pH 为 5.1-6.5。

15 在另一优选例中，所述抗体选自下组：全长抗体、抗原结合片段、双特异性抗体或纳米抗体。

在另一优选例中，所述抗体选自下组：所述抗体选自靶向以下靶点的抗体：CCR4、CD3、CD19、CD20、CD30、CD22、EGFR、EpCAM、HER2、PD-1、PD-L1、VEGF、VEGFA、VEGFR2、C5 蛋白、CD2、IL-5、PCSK9、RSVF、

20 血小板糖蛋白 IIb/IIIa、RANK、DLL3、EDAR、CLL1、BMPRI1B、E16、STEAP1、0772P、MPF、NaPi2b、Sema 5b、PSCA hlg、ETBR、MSG783、STEAP2、TrpM4、CRIPTO、CD21、CD79b、FcRH2、B7-H4、HER2、NCA、MDP、IL20Rα、Brevican、EphB2R、ASLG659、PSCA、GEDA、BAFF-R、CD22、CD79a、CXCR5、HLA-DOB、P2X5、CD72、LY64、FcRH1、IRTA2、TENB2、PMEL17、TMEFF1、GDNF-Ra1、

25 Ly6E、TMEM46、Ly6G6D、LGR5、RET、LY6K、GPR19、GPR54、ASPHD1、酪氨酸酶、TMEM118、GPR172A、MUC16 和 CD33。

在另一优选例中，所述抗体选自靶向以下靶点的抗体：

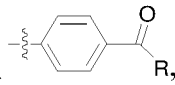
CCR4、CD3、CD19、CD20、CD30、CD22、EGFR、EpCAM、HER2、PD-1、PD-L1、VEGF、VEGFA、VEGFR2。

30 在另一优选例中，所述酰基芳基具有式  ，

其中，所述环 A 选自下组：取代或未取代的 C6-C10 的芳基、取代或未取代的包括 1-3 个选自 O、N、S 的 5-10 元杂芳基；

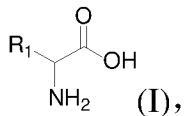
且 R 选自下组：取代或未取代的 C1-C4 烷基、取代或未取代的 C2-C4 烯基、取代或未取代的 C2-C4 炔基，

- 5 所述取代指基团上的一个或多个 H 独立地被选自下组的基团取代：卤素、C1-C4 烷基、C1-C4 烷氧基、C2-C4 烯基、C2-C4 炔基、-NO<sub>2</sub>、-CN 或-OH。

在另一优选例中，所述酰基芳基具有式 , 其中，R 为 C1-C4 烷基，优选地，R 为甲基、乙基或异丙基。

- 10 在另一优选例中，所述突变抗体为在野生型抗体中分别引入(替换或插入)能够产生游离巯基(-SH)和酰基芳基的天然氨基酸或非天然氨基酸而获得。

在另一优选例中，所述突变抗体包括具有式(I)的氨基酸，从而提供巯基：

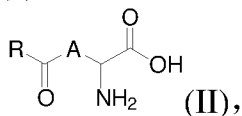


其中，R1 选自下组：巯基取代的 C1-C4 烷基、巯基取代的 C2-C4 烯基、巯基取代的 C2-C4 炔基。

- 15 在另一优选例中，所述 R1 为-CH<sub>2</sub>-SH 或 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-SH。

在另一优选例中，产生所述游离巯基的氨基酸为半胱氨酸。

在另一优选例中，所述突变抗体包括具有式(II)的氨基酸，从而提供所述酰基芳基：



- 20 所述 A 选自下组：取代或未取代的 C6-C10 的芳基、取代或未取代的包括 1-3 个选自 O、N、S 的 5-10 元杂芳基；

且 R 选自下组：取代或未取代的 C1-C4 烷基、取代或未取代的 C2-C4 烯基、取代或未取代的 C2-C4 炔基；且

- 25 所述取代指基团上的一个或多个 H 独立地被选自下组的基团取代：卤素、C1-C4 烷基、C1-C4 烷氧基、C2-C4 烯基、C2-C4 炔基、-NO<sub>2</sub>、-CN 或-OH。

在另一优选例中，所述 A 为苯基，且 R 为 C1-C4 烷基，优选地，R 为甲基、乙基或异丙基。

- 30 在另一优选例中，产生所述酰基芳基的氨基酸选自下组：对乙酰基苯丙氨酸、对丙酰基苯丙氨酸。在另一优选例中，所述突变抗体为在野生型抗体中将两个位点分别引入(替换或插入)半胱氨酸和对乙酰基苯丙氨酸而获得。

在另一优选例中，所述突变抗体为靶向 HER2 的抗原结合片段(Fab)，所述抗原结合片段包括一重链和一轻链；

其中，所述重链的氨基酸序列为 SEQ ID No: 1；且

其中，所述轻链的氨基酸序列为 SEQ ID No: 2。

5 在另一优选例中，步骤(b)中的反应是通过“一锅法”进行的。即，当前一个反应完成后，将另一药物分子直接加入前一反应的反应液中，调节反应条件并进行反应。

在另一优选例中，所述方法还包括分离纯化的后处理步骤，优选地，所述分离纯化可使用选自下组的方法进行：萃取法、色谱法(如分子筛层析)、电泳，  
10 或其组合。

在另一优选例中，步骤(b)中，反应溶剂含有 pH 缓冲体系的水溶液，如醋酸钠缓冲液。

在另一优选例中，所述抗体与带有羟胺(-O-NH<sub>2</sub>)基团或修饰有羟胺基团的药物分子 A 的反应，包括一个或多个如下特征：

15 (1)pH 为 3.5-4.8，如 3.8、4.0、4.2 或 4.5；  
(2)所述反应的温度为 37±5°C、37±3°C、37±2°C或 37±1°C；  
(3)所述反应的时间为 1-36h，较佳地，6-24h,如 12h、16 或 18h；和/或  
(4)所述抗体与药物分子 A 的用量比为 1:1-50 当量，较佳地，1:5-30 当量，  
如 1:10 当量、1:15 当量、1:20 当量或 1:25 当量。

20 在另一优选例中，所述抗体与带有马来酰亚胺基团或修饰有马来酰亚胺基团的药物分子 B 的反应，包括一个或多个如下特征：

(1)pH 为 5.2-6.2，如 5.5、5.8 或 6.0；  
(2)所述反应的温度为 4±5°C、4±3°C、4±2°C或 4±1°C；  
(3)所述反应的时间为 1-36h，较佳地，6-24h,如 12h、16 或 18h；和/或  
25 (4)所述抗体与药物分子 B 的用量比为 1:1-50 当量，较佳地，1:2-30 当量，  
如 1:5 当量、1:10 当量、1:15 当量、或 1:20 当量。

在另一优选例中，所述药物分子 A 与药物分子 B 独立地选自下组：

示踪剂，如荧光素，放射元素标记的化合物等；有确定功能的化合物如细胞毒素、抗肿瘤药物、抗生素等，以及有确定功能的分子如核酸等。

30 例如，所述药物分子 A 与药物分子 B 可独立地选自靶向以下靶点(但并不限于)的药物：FoxO1、HDAC、DP-1、E2F、ABL、AMPK、BRK、BRSKI、BRSK2、BTK、CAMKK1、CAMKK $\alpha$ 、CAMKK $\beta$ 、Rb、Suv39HI、SCF、p19INK4D、GSK-3、

pi 8INK4、myc、细胞周期蛋白 E、CDK2、CDK9、CDG4/6、环化素 D、p16 INK4A、  
 cdc25A、BMI1、SCF、Akt、CHK1/2、C1 $\delta$ 、CK1 $\gamma$ 、C2、CLK2、CSK、DDR2、  
 DYRK1A/2/3、EF2K、EPH-A2/A4/B1/B2/B3/B4、EIF2A3、Smad2、Smad3、Smad4、  
 Smad7、p53、p21Cipl、PAX、Fyn、CAS、C3G、SOS、Tal、Raptor、RACK-1、  
 5 CRK、Rapl、Rac、KRas、NRas、HRas、GRB2、FAK、PI3K、spred、Spry、mTOR、  
 MPK、LKB1、PAK1/2/4/5/6、PDGFRA、PYK2、Src、SRPK1、PLC、PKC、PKA、  
 PKB $\alpha/\beta$ 、PKC $\alpha/\gamma/\delta$ 、PKD、PLK1、PRAK、PRK2、RIPK2、WAVE-2、TSC2、DAPK1、  
 BAD、IMP、C-TAK1、TAK1、TAO1、TBK1、TESK1、TGFBR1、TIE2、TLK1、  
 TrkA、TSSK1、TTBK1/2、TTK、Tpl2/cot1、MEK1、MEK2、PLDL Erkl、Erk2、  
 10 Erk5、Erk8、p90RSK、PEA-15、SRF、p27 KIP1、TIF1a、HMGN1、ER81、MKP-3、  
 c-Fos、FGF-R1、GCK、GSK3 $\beta$ 、HER4、HIPK1/2/3、IGF-1R、cdc25、UBF、LAMTOR2、  
 Stat1、StaO、CREB、JAK、Src、PTEN、NF- $\kappa$ B、HECTH9、Bax、HSP70、HSP90、  
 Apaf-1、Cyto c、BCL-2、Bcl-xL、Smac、XIAP、半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-3、  
 半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、CDC37、TAB、IKK、TRADD、TRAF2、R1P1、  
 15 FLIP、TAK1、JNK1/2/3、Lck、A-Raf、B-Raf、C-Raf、MOS、MLK1/3、MN1/2、  
 MSK1、MST2/3/4、MPSK1、MEKK1、MEK4、MEL、ASK1、MINK1、MKK1/2/3/4/6/7、  
 NE2a/6/7、NUAK1、OSR1、SAP、STK33、Syk、Lyn、PDK1、PHK、PIM1/2/3、  
 Ataxin-1、mTORC1、MDM2、p21 Waf1、细胞周期蛋白 D1、Lamln A、Tpl2、Myc、  
 连环蛋白、Wnt、IKK- $\beta$ 、IKK- $\gamma$ 、IKK- $\alpha$ 、IKK- $\epsilon$ 、ELK、p65RelA、IRAK1、IRA2、  
 20 IRAK4、IRR、FADD、TRAF6、TRAF3、MKK3、MKK6、ROCK2、RSK1/2、SGK  
 1、SmMLCK、SIK2/3、ULK1/2、VEGFR1、WNK1、YES1、ZAP70、MAP4K3、  
 MAP4K5、MAPK1b、MAPKAP-K2K3、p38 $\alpha/\beta/\delta/\gamma$ MAPK、Aurora A、Aurora B、  
 Aurora C、MCAK、Clip、MAPKAPK、FAK、MARK1/2/3/4、Mucl、SHC、CXCR4、  
 Gap-1、Myc、 $\beta$ -连环蛋白/TCF、Cbl、BRM、Mcl1、BRD2、BRD3、BRD4、AR、  
 25 RAS、ErbB3、EGFR、IRE1、HPK1、RIPK2 和 ER $\alpha$ ，包括其所有变体、突变体、  
 剪接变体、插入缺失体和融合体。

在另一优选例中，所述药物分子独立地为小分子药物。

在另一优选例中，所述药物分子独立地为抗肿瘤药物。

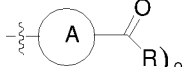
在另一优选例中，所述药物分子 A 与药物分子 B 为通过两种不同机制作用  
 30 的药物。

在另一优选例中，所述药物分子 A 与药物分子 B 独立地选自下组：

PARP1/2 抑制剂、诱导癌细胞 DNA 损伤的化疗药物、DNA 烷基化类疗药

物、DNA 或 RNA 合成抑制剂、EGFR、ALK 或 FGFR 酪氨酸受体激酶抑制剂、KRAS、MEK 或 ERK 肿瘤信号通路抑制剂。

在另一优选例中，所述药物分子 A 与药物分子 B 独立地选自下组：奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕尼、甲氨蝶呤、卡培他滨、吉西他滨、去氧氟尿苷、培美曲塞二钠、帕唑帕尼、伊马替尼、埃罗替尼、拉帕替尼、吉非替尼、凡德他尼、赫赛汀、紫杉醇、长春瑞滨、多西他赛、多柔比星、羟基喜树碱、丝裂霉素、表柔比星、吡柔比星、博来霉素、来曲唑、他莫西芬、氟维司群、曲谱瑞林、氟他胺、亮丙瑞林、阿那曲唑、异环磷酰胺、白消安、环磷酰胺、卡莫司汀、尼莫司汀、司莫司汀、氮芥、马法兰、瘤可宁、卡铂、顺铂、奥沙利铂、络铂、拓扑特肯、喜树碱、拓扑替康、依维莫司、西罗莫斯、特癌适、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、硫唑嘌呤、菌素 D、柔红霉素、阿霉素、米托蒽醌、争光霉素、普卡霉素或氨鲁米特。

本发明第二方面，提供了一种突变抗体，所述突变抗体包含两个反应基团，其中，所述反应基团一个为游离巯基(-SH)，另一个为酰基芳基().

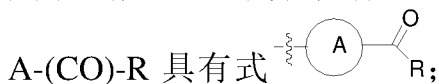
在另一优选例中，所述抗体选自下组：全长抗体、抗原结合片段、双特异性抗体或纳米抗体。

在另一优选例中，所述突变抗体为在野生型抗体中将两个位点分别替换为能够产生游离巯基(-SH)和酰基芳基的天然氨基酸或非天然氨基酸而获得。

在另一优选例中，所述氨基酸选自下组：L-氨基酸、D-氨基酸，或其组合。在另一优选例中，所述突变抗体具有式：



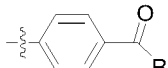
其中，所述 ab 代表抗体；



其中，所述环 A 选自下组：取代或未取代的 C6-C10 的芳基、取代或未取代的包括 1-3 个选自 O、N、S 的 5-10 元杂芳基；

且 R 选自下组：取代或未取代的 C1-C4 烷基、取代或未取代的 C2-C4 烯基、取代或未取代的 C2-C4 炔基，

所述取代指基团上的一个或多个 H 独立地被选自下组的基团取代：卤素、C1-C4 烷基、C1-C4 烷氧基、C2-C4 烯基、C2-C4 炔基、-NO<sub>2</sub>、-CN 或-OH。

在另一优选例中，所述酰基芳基具有式 ，其中，R 为 C1-C4

烷基，优选地，R 为甲基、乙基或异丙基。

在另一优选例中，所述突变抗体为在野生型抗体中将两个位点分别替换为半胱氨酸和对乙酰基苯丙氨酸而获得。

在另一优选例中，所述突变抗体通过基因工程方法制备得到。

5 在另一优选例中，所述突变抗体为靶向 HER2 的抗原结合片段，所述突变抗原结合片段包括一重链和一轻链；其中，

所述重链的氨基酸序列为 SEQ ID No: 1；且

所述轻链的氨基酸序列为 SEQ ID No: 2。

10 本发明第三方面，提供了如本发明第二方面所述的突变抗体的用途，用于制备抗体药物偶联物和/或抗体荧光偶联试剂。

在另一优选例中，所述抗体药物偶联物和/或抗体荧光偶联试剂是靶向肿瘤细胞的。

15 在另一优选例中，所述抗体药物偶联物和/或抗体荧光偶联试剂是所述抗原结合片段偶联两种不同的药物分子得到的双功能偶联药物。

本发明第四方面，提供了如本发明第一方面所述的制备方法制备的抗体药物偶联物，或其药学上可接受的盐。

20 本发明第五方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物包括：

如本发明第四方面所述的抗体药物偶联物，或其药学上可接受的盐；以及药学上可接受的载体。

25 本发明第六方面，提供了如本发明第四方面所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、或包含其的组合物的用途，用于制备一药物，所述药物用于选自下组的一种或多种用途：

A1) 预防和/或抑制肿瘤细胞增殖；

A2) 预防和/或抑制肿瘤生长；

A3) 预防和/或治疗癌症；

30 A4) 制备抗肿瘤药物；

A5) 制备肿瘤细胞增殖抑制剂；

A6) 肿瘤细胞成像、示踪。



在另一优选例中，所述肿瘤或肿瘤细胞为 HER2 高表达的肿瘤或肿瘤细胞。

在另一优选例中，所述肿瘤或肿瘤细胞选自下组：乳腺癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、胃癌、纤维肉瘤、膀胱癌、卵巢癌、腺癌、结肠癌、骨癌、脑癌、神经细胞瘤、头颈癌、直肠癌、结肠癌、家族性腺瘤性息肉性癌、遗传性非息肉性结直肠癌、食管癌、唇癌、喉癌、下咽癌、舌癌、唾液腺癌、腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、肾癌、肾实质癌、宫颈癌、子宫体癌、子宫内膜癌、绒毛膜癌、前列腺癌、睾丸癌、泌尿癌、黑素瘤、急性淋巴性白血病、慢性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病、慢性粒细胞白血病、肝细胞癌、胆囊癌、支气管癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤等。

10

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

## 15 附图说明

图1为一种本发明的双功能突变抗体的结构示意图；

图2为一种本发明的双偶联抗体药物偶联物的结构示意图；

图3为一锅法获得双机制肿瘤治疗抗体偶联药物反应方案1；

图4为一锅法获得双机制肿瘤治疗抗体偶联药物反应方案2；

20 图5显示了通过蛋白质质谱技术确认纯化获得的anti HER2 DualFab（抗HER2 双功能Fab）分子量符合理论值。

图6显示了免疫荧光验证纯化获得的anti HER2 DualFab的特异性。

图7显示了细胞活力测试验证纯化获得的anti HER2 DualFab的特异性。

图8显示了双偶联反应步骤的一个实施例。

25 图9显示了双偶联反应的反应液SDS-PAGE测试结及灰度分析。如图所示，在双偶联反应进行时，双偶联实验组与仅加入带有羟胺基团的Alexa 488的对照组和仅加入带有马来酰亚胺的Alexa 568的对照组相比，确认双偶联完成，并且根据荧光成像仪的结果进行灰度分析，表明两步偶联的比率达到了1:1。

图10为Alexa 488 Alexa 568 DualFab免疫荧光染色结果。

30 图11为Alexa 488 Alexa 568 DualFab处理SKBR3 0h、3h、6h、12h、18h及

24h 的荧光拍摄结果。

图12为实施例3的反应式。

## 具体实施方式

- 5 本发明人经过广泛而深入的研究，通过大量筛选和测试，提供了一种抗体偶联药物的制备方法。本发明在常规的野生型抗体上构建了同时具有巯基和酰基反应基团的突变抗体，修饰后的突变抗体能够通过马来酰亚胺连接子和羟胺连接子通过“一锅法”偶联两种药物分子。所述反应获得的抗体药物偶联物，对目标细胞(如肿瘤细胞)具有多种靶向抑制作用，从而可实现的多机制的靶向治疗。在此基础上
- 10 完成本发明。

## 术语

除非另有定义，否则本文中所用的全部技术术语和科学术语均具有如本发明所属领域普通技术人员通常理解相同含义。

- 15 如本文所用，在提到具体列举的数值中使用术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于 1%。例如，如本文所用，表述“约 100”包括 99 和 101 之间的全部值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

如本文所用，术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之，所述术语也包括“基本上由...构成”、或“由...构成”。

- 20 如本文所用，术语“室温”或“常温”是指温度为 4-40 °C，较佳地，25±5 °C。

如文本所用，术语“烷基”作为整体或另一基团的一部分，是指包含若干个碳原子的直链或支链烷基，其中“C1-C4 烷基”是指具有 1-4 个碳原子的直链或支链烷基，包括 1、2、3 或 4 个碳原子的烷基，烷基优选例如 C1-C2、C1-C3。典型的“烷基”包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、

25 异丁基。烷基还可以为亚烷基，如 1、2、3 或 4 个碳原子的亚烷基。

- 如文本所用，术语“烯基”是指具有至少 2 个碳原子和至少一个双键的直链或支链烃。烯基可包括任何数量的碳原子数，其中，“C2-C4 烯基”是指具有 2-4 个碳原子和至少一个双键的直链或支链烃，例如 C<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>。烯基可具有任何合适数量的双键，包括但不限于 1 或 2 个。烯基的实例包括但不限于乙
- 30 烯基(乙烯基团)、丙烯基、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、丁二烯基。烯基还可以为亚烯基，如 2、3 或 4 个碳原子的亚烯基。

如文本所用，术语“炔基”是指具有至少 2 个碳原子和至少一个三键的直链或支链烃。炔基可包括任何数量的碳原子，“C2-C4 炔基”是指具有 2-4 个碳原子和至少一个三键的直链或支链烃，例如 C<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>。炔基的实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、异丁炔基、仲丁炔基、丁二炔基。炔基还可以为亚炔基，如 2、3 或 4 个碳原子的亚炔基。

术语“芳基”是指芳香环状烃类化合物基团，其中，“C6-C10 芳基”是指包含 6、7、8、9 或 10 个环碳原子的芳香环状烃类化合物基团，具有 1-2 个环，尤其指单环和双环基团，如苯基、联苯基或萘基。凡含有两个或两个以上芳香环(双环等)，芳基基团的芳香环可由单键联接(如联苯)。“取代芳基”是指芳基中的一个或多个位置被取代，尤其是 1-3 个取代基，可在任何位置上取代。

如文本所用，术语“杂芳基”是指含有 1-3 个选自 N、O、S 原子的杂芳族体系，其中，“5-10 元杂芳基”是指含有 1-3 个选自 N、O、S 原子的 5-10 元杂芳族体系。杂芳基优选 5 至 10 元环，更优选为 5 元或 6 元，杂芳基包括但不限于吡咯基、吡唑基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、噻二唑基、异噻唑基、呋喃基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、三氮嗪基、三氮唑基及四氮唑基等。“杂芳基”可以是取代的或者未取代的，当被取代时，取代基可以位于 C 原子或杂原子上。

如本文所述，术语“多个”是指两个或以上，如 2、3、4、5 或 6。

如本文所用，“卤素”或“卤原子”指 F、Cl、Br、和 I。

如未特别说明，所述取代指各基团上的一个或多个 H 独立地被选自下组的基团取代：卤素、C1-C4 烷基、C1-C4 烷氧基、C2-C4 烯基、C2-C4 炔基、-NO<sub>2</sub>、-CN 或-OH。

### 突变抗体

本发明中，所述“野生型抗体”指在引入本发明的反应基团之前的抗体。所述抗体可以为任何所需的抗体，如全长抗体、抗原结合片段、双特异性抗体、纳米抗体等功能蛋白。

在不破坏(或在可接受程度内)所述抗体与靶标结合能力的情况下，引入所述两个反应基团(游离巯基和烃酰基芳基)对本领域技术人员而言是已知的或容易实现的。如可以通过插入、替换、修饰等方法引入反应基团。所述游离巯基和烃酰基芳基可为位于抗体分子中相同或不同的肽链上，如巯基位于轻链上，

烃酰基芳基位于重链上。

典型地，所述突变抗体为在野生型抗体中分别引入能够产生游离巯基(-SH)和烃酰基芳基的天然氨基酸或非天然氨基酸而获得。所述“引入”可以通过替换、插入或修饰获得。

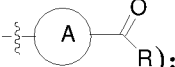
- 5 优选地，可通过在野生型抗体分子中将一个半胱氨酸替换一个已有的氨基酸，从而引入游离的巯基；而在另一位点将一个对乙酰基苯丙氨酸替换另一已有的氨基酸，从而引入乙酰基苯基。优选地，所述被替换的位点为远离与靶点结合的结构域的位置。

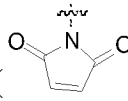
- 10 可参考本发明的实施例，上述突变抗体可以通过常用的基因工程的方法构建、表达获得，或通过化学方法合成。在突变抗体的肽链序列确定的情况下，通过基因工程的方法构建、表达从而获得所述突变抗体的方法是已知的。

- 15 例如，所述抗体可选自靶向以下靶点(但并不限于)的抗体：CCR4、CD3、CD19、CD20、CD30、CD22、EGFR、EpCAM、HER2、PD-1、PD-L1，VEGF、VEGFA、VEGFR2 等；以及与自身免疫疾病；哮喘、抗感染、血液病、心血管病、骨质疏松、多发性硬化症、阿尔兹海默症等疾病的相关蛋白，如 C5 蛋白、CD2、IL-5、PCSK9、RSVF、血小板糖蛋白IIb/IIIa、RANK等蛋白和多肽。

### 抗体药物偶联物的制备方法

本发明提供了一种抗体药物偶联物的制备方法，包括步骤：

- 20 (a)提供一种包含两个反应基团的突变抗体，其中，所述反应基团一个为游离巯基(-SH)，另一个为烃酰基芳基(); 和

(b)按任意先后顺序，将所述突变抗体与带有羟胺(-O-NH<sub>2</sub>)基团或修饰有羟胺基团的药物分子 A 和带有马来酰亚胺基团()或修饰有马来酰亚胺基团的药物分子 B 反应，从而得到所述抗体药物偶联物。

- 25 本发明中，当所述突变抗体与带有羟胺基团或修饰有羟胺基团的药物分子 A 反应时，反应温度 T1 为 37±10°C且 pH 为 3-5。

本发明中，当所述突变抗体与带有马来酰亚胺基团或修饰有马来酰亚胺基团的药物分子 B 反应时，反应温度 T2 为 4±10°C且 pH 为 5.1-6.5。

- 30 如本文所用，所述“任意先后顺序”指所述突变抗体可以先与药物分子 A 反应，然后所得反应产物与药物分子 B 反应；或者，所述突变抗体先与药物分

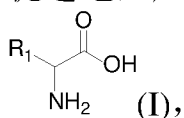
子 B 反应，然后所得反应产物与药物分子 A 反应，如图 3-4 所示。

突变抗体中的所述羟酰基芳基中的羰基与药物分子 B 的 -O-NH<sub>2</sub> 反应，生成 -C=N-O- 连接基团。

突变抗体中的 -SH 与药物分子 A 的马来酰亚胺基团反应。

- 5 本发明人发现，上述两组基团具有合适的反应性能，使得两个反应可以在 37°C 及以下的温度反应，只需调节温度和 pH 即可经一锅法完成两种药物分子的偶联。

优选地，产生所述游离巯基的氨基酸具有式

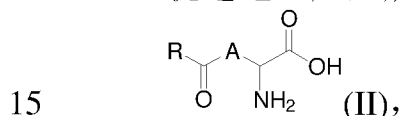


- 10 其中，R<sub>1</sub> 选自下组：巯基取代的 C1-C4 烷基、巯基取代的 C2-C4 烯基、巯基取代的 C2-C4 炔基。

在另一优选例中，所述 R<sub>1</sub> 为 -CH<sub>2</sub>-SH 或 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-SH。

更优选地，产生所述游离巯基的氨基酸为半胱氨酸。

优选地，产生所述羟酰基芳基的氨基酸具有式



所述 A 选自下组：取代或未取代的 C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 的芳基、取代或未取代的包括 1-3 个选自 O、N、S 的 5-10 元杂芳基；

且 R 选自下组：取代或未取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷基、取代或未取代的 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 烯基、取代或未取代的 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 炔基；且

- 20 所述取代指基团上的一个或多个 H 独立地被选自下组的基团取代：卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷氧基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 炔基、-NO<sub>2</sub>、-CN 或 -OH。

更优选地，产生所述羟酰基芳基的氨基酸选自下组：对乙酰基苯丙氨酸、对丙酰基苯丙氨酸。

- 25 本发明中，对于药物分子 A 和药物分子 B 的种类没有要求，可根据需要选择，例如可以为本领域常见的小分子药物、核酸、荧光分子等。本领域技术人员理解，对于一个已知的药物分子，在不破坏其活性结构的基础上，引入马来酰亚胺基团或羟胺基团的方法是本领域已知的。

- 30 典型地，所述药物分子 A 与药物分子 B 可独立地选自靶向以下靶点(但并不限于)的药物：FoxO1、HDAC、DP-1、E2F、ABL、AMPK、BRK、BRSK 1、BRSK2、BTK、CAMKK1、CAMKK $\alpha$ 、CAMKK $\beta$ 、Rb、Suv39HI、SCF、p19INK4D、

GSK-3、pi 8INK4、myc、细胞周期蛋白 E、CDK2、CDK9、CDG4/6、环化素 D、pl6 INK4A、cdc25A、BMI1、SCF、Akt、CHK1/2、C 1δ、CK1γ、C 2、CLK2、CSK、DDR2、DYRK1A/2/3、EF2K、EPH-A2/A4/B1/B2/B3/B4、EIF2A 3、Smad2、Smad3、Smad4、Smad7、p53、p21Cipl、PAX、Fyn、CAS、C3G、SOS、Tal、Raptor、RACK-1、

5 CRK、Rapl、Rac、KRas、NRas、HRas、GRB2、FAK、PI3K、spred、Spry、mTOR、MPK、LKBI、PAK 1/2/4/5/6、PDGFRA、PYK2、Src、SRPK1、PLC、PKC、PKA、PKBα/β、PKCα/γ/δ、PKD、PLK1、PRAK、PRK2、RIPK2、WAVE-2、TSC2、DAPK1、BAD、IMP、C-TAK1、TAK1、TAOI、TBK1、TESK1、TGFBFR1、TIE2、TLK1、TrkA、TSSK1、TTBK1/2、TTK、Tpl2/cot1、MEK1、MEK2、PLDL Erkl、Erk2、

10 Erk5、Erk8、p90RSK、PEA-15、SRF、p27 KIP1、TIF 1a、HMGN1、ER81、MKP-3、c-Fos、FGF-R1、GCK、GSK3β、HER4、HIPK1/2/3、IGF-1R、cdc25、UBF、LAMTOR2、Stat1、StaO、CREB、JAK、Src、PTEN、NF-κB、HECTH9、Bax、HSP70、HSP90、Apaf-1、Cyto c、BCL-2、Bcl-xL、Smac、XIAP、半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、CDC37、TAB、IKK、TRADD、TRAF2、R1P1、

15 FLIP、TAK1、JNK1/2/3、Lck、A-Raf、B-Raf、C-Raf、MOS、MLK1/3、MN 1/2、MSK1、MST2/3/4、MPSK1、MEKK1、ME K4、MEL、ASK1、MINK1、MKK 1/2/3/4/6/7、NE 2a/6/7、NUAK1、OSR1、SAP、STK33、Syk、Lyn、PDK1、PHK、PIM 1/2/3、Ataxin-1、mTORC1、MDM2、p21 Waf1、细胞周期蛋白 D1、Lamln A、Tpl2、Myc、连环蛋白、Wnt、IKK-β、IKK-γ、IKK-α、IKK-ε、ELK、p65RelA、IRAK1、IRA 2、

20 IRAK4、IRR、FADD、TRAF6、TRAF3、MKK3、MKK6、ROCK2、RSK1/2、SGK 1、SmMLCK、SIK2/3、ULK1/2、VEGFR1、WNK 1、YES1、ZAP70、MAP4K3、MAP4K5、MAPK1b、MAPKAP-K2K3、p38α/β/δ/γMAPK、Aurora A、Aurora B、Aurora C、MCAK、Clip、MAPKAPK、FAK、MARK 1/2/3/4、Mucl、SHC、CXCR4、Gap-1、Myc、β-连环蛋白/TCF、Cbl、BRM、Mcl1、BRD2、BRD3、BRD4、AR、

25 RAS、ErbB3、EGFR、IRE1、HPK1、RIPK2 和 ERα，包括其所有变体、突变体、剪接变体、插入缺失体和融合体。

在另一优选例中，所述药物分子 A 与药物分子 B 为两种不同机制作用的药物。

### 30 抗体药物偶联物

如本文所用，术语“抗体药物偶联物”、“抗体偶联药物”、“ADC”可互换使用。

本发明还提供了上述方法制备的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐。

通常，所述抗体药物偶联物为用于治疗或诊断的药物。其至少具备抗体、药物分子 A 和药物分子 B 的生物活性。此外，其还可实现不用机理药物联合用药时产生的协同效果，对细胞具有靶向给药能力，减小用药量、并降低药物的耐药性。

### 药物组合物及应用

本发明提供了一种药物组合物，其包括上述抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐作为活性成分，以及药学上可接受的载体。

10 特别地，本发明的方法可以制备各种靶向特定细胞的抗体药物偶联物。例如，可以靶向(但并不限于)肿瘤细胞、免疫细胞、炎症细胞等。进而使抗体或偶联的药物发挥作用，针对性的实现靶向治疗。

“药学上可接受的赋形剂”和“药学上可接受的载体”是指有助于活性剂的配制和/或施用和/或被个体吸收的物质，并且可以包含在本公开的组合物中而不引起对该个体的显著不利的毒理作用。药学上可接受的载体和赋形剂的非限制性实例包括水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸林格氏液、常规蔗糖、常规葡萄糖、粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、风味剂、盐溶液(例如林格溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物，诸如乳糖、直链淀粉或淀粉、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷和颜料等。这样的制剂可以被灭菌，并且如果需要，与不会有害地与本文提供的化合物反应或干扰本文提供的化合物的活性的辅助剂例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂和/或芳香物质等混合。本领域普通技术人员将认识到其他药物载体和赋形剂适用于公开的化合物。

在某些实施例中，本发明的药物组合物可以以固体或液体形式。

25 含有本发明活性成分的药物可以是适宜的口服剂型，例如片剂，药片，含片，水溶性或油性悬液，分散乳胶粉或颗粒，乳剂，硬或软胶囊或糖浆或酏剂。口服使用的药物可根据药物成分制造商的已知工艺方法来制备，这些组合物可包括下述一种或多种药剂，例如甜味剂，调味剂，着色剂和保护剂，以便提供优雅和美味的药品制剂。药片含有与非毒性药学上可接受的赋形剂混合的活性成分，这些赋形剂适合于生产片剂。这些赋形剂的例子有，惰性稀释剂，例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、钙磷酸盐或磷酸钠；制粒，崩解剂，例如，玉米淀粉或褐藻酸；结合剂，例如如淀粉、明胶或阿拉伯胶，以及润滑剂，例如硬脂酸

30

镁、硬脂酸或滑石粉。该药片可无涂层，也可有涂层，以延迟在胃肠道的降解和吸收，从而在较长时期内维持活性。

通过任意合适的途径，包括口服地、肠胃外地、通过吸入喷雾、局部地、直肠地、鼻地、含服地、阴道地或经由植入型药盒，可以将活性化合物施用给受试者。本文使用的术语“肠胃外的”包括皮下的、静脉内的、肌肉内的、关节内的、滑膜内的、胸骨内的、鞘内的、肝内的、病灶内的(intralesional)和颅内的注射或输注技术。优选地，口服地、腹膜内地或静脉内地施用所述组合物。

适合于口服施用的本发明的药物组合物典型地将是固体形式的离散单元，例如以片剂、胶囊、扁囊剂、粉末、颗粒、锭剂、贴片、栓剂、丸剂的形式，或以液体形式，例如液体制剂、可注射的或可输注的溶液或悬浮液。

向个体提供治疗有效量的化合物的精确量将取决于给药方式、疾病和/或病症的类型和严重程度以及个体的特征，例如一般健康状况、年龄、性别、体重和对药物的耐受性。本领域普通技术人员将能够根据这些和其他因素确定合适的剂量。当与其他治疗剂组合施用，任何其他治疗剂的“治疗有效量”将取决于所用药物的类型。合适的剂量对于批准的治疗剂是已知的，并且可以由本领域普通技术人员根据个体的状况、治疗的病症类型和通过以下使用的本发明化合物的量进行调整，例如，在文献中报道和在 Physician's Desk Reference (第 57 版, 2003)中推荐的剂量。优选地，应如此配制组合物，使得可以将 0.01-100 mg/kg 体重/天的抑制剂剂量施用给接受这些组合物的患者。在某些实施方案中，本发明的组合物提供了 0.01 mg 至 50 mg 的剂量。在其它实施方案中，提供了 0.1mg-25 mg 或 5 mg-40 mg 的剂量。

本发明的药物组合物或治疗剂的给药对象的实例包括哺乳动物(例如，人、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猫、狗、牛、绵羊、猴等)。

本发明还提供了一种药物组合物的制备方法，包括步骤：将药学上可接受的载体与本发明所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐进行混合，从而形成药物组合物。

本发明还提供了一种治疗方法，它包括步骤：给需要治疗的对象施用本发明中所述抗体药物偶联物，或其药学上可接受的盐，或施用本发明所述的药物组合物，用于选择性地抑制癌症(如 HER2 介导的癌症)。

30

### **本发明的主要优点包括：**

1. 本发明的提供了一种具有双偶联潜力的突变抗体,所述突变抗体包括能



与药物连接的两种反应基团(巯基和乙酰基芳基), 所述突变抗体可以具有单引入不可做到的两种反应的依次连续进行, 简单高效获得功能升级的抗体偶联物。同时引入两个反应基团, 偶联 2 个不同机制的药物, 产生双靶点药物。

2. 本发明的方法可以在 4-37°C 的常温下, 通过一锅法制备, 可保持抗体的结构 5 和功能, 且操作简单、安全高效, 设备要求低, 适合大规模生产。

3. 本发明的突变抗体提供了两种不同的反应基团, 反应时根据药物分子类型的不同, 反应位点是一一对应的, 制备得到的抗体药物偶联物结构一致, 纯度高。

4. 本发明的方法制备的抗体药物偶联物具有提高的药效、不易产生耐药性, 毒性低。

10 5. 本发明的方法制备的抗体药物偶联物具有优异的药效和药代动力学性质, 适于成药。

下面结合具体实施, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明 15 本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 例如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明, 否则百分比和份数按重量计算。

表 1 实验仪器

仪器	来源
振荡培养箱 ZQLY-180	上海知楚仪器有限公司, 中国
细胞培养箱	Thermo 公司, 美国
Orbitrap Q-Extractive HF mass spectrometer	Thermo 公司, 美国
Nanodrop 2000C	Thermo 公司, 美国
多功能酶标仪	Molecular Devices 公司, 美国
PCR 仪	Bio-Rad 公司, 美国
小型垂直蛋白电泳系统	Bio-Rad 公司, 美国
快速转印系统	Bio-Rad 公司, 美国
平核酸电泳系统	Bio-Rad 公司, 美国
全自动智能成像系统	Bio-Rad 公司, 美国
Sp8 共聚焦显微镜	Leica 公司, 德国
AKTA 蛋白纯化仪	GE Healthcare, 美国
Fusion-solo.6s.edge v.070	VILBER
HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg	GE Healthcare, 美国
HisTrap HP 5ml	GE Healthcare, 美国

表 2 试剂

试剂	来源	货号
L-半胱氨酸	Sigma-Aldrich	Cat# C6852
4-乙酰基-L-苯丙氨酸	爱玛特科技	Cat# A-0675
Alexa Fluor™ 488 羧胺	Invitrogen™	Cat# A30629

Alexa Fluor™ 568 C5 马来酰亚胺	Invitrogen™	Cat# A20341
柱式 DNA 胶回收试剂盒	上海生工	Cat# B518131
质粒 DNA 小提试剂盒	上海生工	Cat# B518191-0100
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	Thermo Fisher	Cat# 23227
ECL 化学发光检测试剂盒	上海翊圣	Cat# 36222ES76
Recombinant Human ErbB2/Her2 Fc Chimera	R&D	Cat# 1129-ER
Fast Silver Stain Kit	碧云天	Cat# P0017S
Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega	Cat# G7570
ECL 化学发光检测试剂盒	上海翊圣	Cat# 36222ES76
Fast Mutagenesis Kit V2	Vazyme	Cat# C214
PolyJet DNA Transfection	SignaGen Laboratories	Cat# SL100688

## 实施例 1

### 获得具有双偶联潜力的抗体片段

首先确定在抗 HER2 抗体轻链 124 位定点插入半胱氨酸，获得带有突变的  
5 轻链质粒。为使抗体片段具有良好巯基反应性，选择具有反应活性良好的对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)作为掺入目标氨基酸，之后构建对乙酰基苯丙氨酸正交体系。然后在抗 HER2 抗体 CH1 重链 121 位定点插入琥珀密码子，获得带有突变的 HC 质粒，最后和已经构建完成的对乙酰基苯丙氨酸对应的氨酰 tRNA 合成酶质粒以及突变 LC 质粒共转化获得DualFab(双功能的 Fab)的表达菌株(LC  
10 Q124C,HC A121X(X 为 4-乙酰基-L-苯丙氨酸)。

其中，所述重链的氨基酸序列为(SEQ ID No: 1):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFnIKDITYIHwVRQAPGKGLEWV  
ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW  
GGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSXSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
15 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTLEHHHHH\*

其中，所述轻链的氨基酸序列为(SEQ ID No: 2):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY  
SASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYYTPPTFGQGTK  
20 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDECLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  
SFNRGECLEHHHHH\*

利用 2YT 培养基进行培养扩增，OD 达到 0.6-0.8 时加入 1mM IPTG，0.2% 阿拉伯糖和 1mM 对乙酰基苯丙氨酸，16 度培养 24 小时，纯化获得目标分子

DualFab。送样蛋白质谱鉴定。

如图 5 所示。确认纯化获得的 anti HER2 DualFab 重轻链分子量符合理论值。

如图 6 所示。通过免疫荧光的实验方法确认 Dualfab 可以完全将 HER2 高表达的细胞和其他细胞区分开，体现出良好的特异性。

如图 7 所示。通过细胞活力测试实验表明，DualFab 与 trastuzumab(阳性对照)作用细胞 120 小时后，均对 HER2 高表达的 SKBR3 的细胞生长有特异性抑制而 HER2 低表达的 MCF-7 细胞的生长并没有受到影响。

## 10 实施例 2

### 通过分步偶联法获得双荧光素偶联物

如图8进行双偶联反应步骤。

将纯化获得的 DualFab 加入到 100mM pH 4.5 的醋酸钠缓冲液中，然后加入 20 当量的带有羟胺基团的 Alexa 488，37°C 16-18 小时。调节 pH 至 6.0，加入 10 当量带有马来酰亚胺的 Alexa 568，4°C 过夜。分子筛层析去除过量的小分子，收集洗脱液，浓缩获得双荧光素 DualFab 偶联物。

双偶联反应的反应液 SDS-PAGE 测试结及灰度分析如图 9 所示，在双偶联反应进行时，双偶联实验组与仅加入带有羟胺基团的 Alexa 488 的对照组和仅加入带有马来酰亚胺的 Alexa 568 的对照组相比，双偶联确实已完成，并且根据荧光照胶仪的结果进行灰度分析发现，两步偶联的比率为 1:1。之后利用免疫荧光染色验证 Alexa 488 Alexa 568 DualFab 双偶联物识别 HER2 的特异性。在细胞固定通透封闭之后，加入 Alexa 488 Alexa 568 DualFab 双偶联物 4°C 孵育过夜，洗涤后用含有 DAPI 的封片剂封片，拍照获得实验结果。

如图 10 所示：Alexa 488 Alexa 568 DualFab 双偶联物可以特异性的识别 HER2 高表达的细胞系 SKBR3。接下来利用双荧光素 DualFab 偶联物通过活细胞成像检测双偶联物的内吞情况。首先发现 Alexa 488 Alexa 568 DualFab 双偶联物在加入活细胞监测体系不久就特异的结合到 SKBR3 的细胞膜上，并且 Alexa 568 和 Alexa 488 的信号几乎是共定位。随着监测时间的增长，Alexa 488 Alexa 568 DualFab 双偶联物在 SKBR3 中的荧光信号不断由细胞膜累积到细胞质中，直观的展示了 ADCs 的内吞过程。

图 11 记录了在 0h, 3h, 6h, 12h, 18h 和 24h 不同时间点 Alexa 488 Alexa

568 DualFab 双偶联物在 SKBR3 中的内吞过程。在 0-3h 时, Alexa 488 Alexa 568 DualFab 双偶联物 仅是结合在 SKBR3 的膜上。随着时间的推移, 从 6h, 12h, 18h 到 24h, 随着黄色的箭头指示, Alexa 488 和 Alexa 568 的荧光信号不断由胞膜到胞质内累积。

5 以上实验结果表明本发明通过基因工程方法在抗体轻链中引入裸露的巯基, 在 CH1 重链部分引入带有功能性反应基团羰基的非自然氨基酸对乙酰基苯丙氨酸, 然后通过构建表达菌株在大肠杆菌中大量表达, 纯化后获得具有双偶联官能团的 Fab(DualFab), 可用来制备双机制或多机制的抗体偶联药物, 高效治疗肿瘤以及其他疾病。

10

### 实施例 3

#### 通过分步偶联法获得双功能抗肿瘤偶联物

将纯化获得的 DualFab 加入到 100mM pH 4.5 的醋酸钠缓冲液中, 然后加入 20 当量的带有羟胺基团的 NH<sub>2</sub>O-PEG4-vc-PAB-PBD, 37°C 16-18 小时。调节 pH 至 6.0, 加入 10 当量带有马来酰亚胺基团的 A-PEG4-vc-PAB-MMAE 连接子药物偶联物, 4°C 过夜。分子筛层析去除过量的小分子, 收集洗脱液, 浓缩获得双功能抗肿瘤偶联物。反应式如图 12 所示。

15

### 讨论

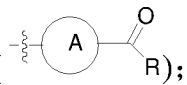
20 本发明的双偶联的方法可以通过一锅法在同一抗体上引入两种以上药物分子, 所制备的抗体药物偶联物可同时将两种不同机制的药物带入目标细胞, 起到优于协同用药的同时同空间的作用, 降低耐药出现的风险, 提高药效。

25 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

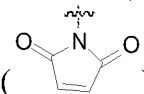
# 权 利 要 求 书

1、一种抗体药物偶联物的制备方法，其特征在于，包括步骤：

(a)提供一种包含两个反应基团的突变抗体，其中，所述反应基团一个为游

5 离巯基(-SH)，另一个为酰基芳基();

(b)按任意先后顺序，将所述突变抗体与带有羟胺(-O-NH<sub>2</sub>)基团或修饰有羟

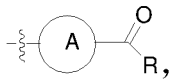
胺基团的药物分子 A 和带有马来酰亚胺基团()或修饰有马来酰亚胺基团的药物分子 B 反应，从而得到所述抗体药物偶联物；

10 其中，当所述突变抗体与带有羟胺基团或修饰有羟胺基团的药物分子 A 反应时，反应温度 T1 为 37±10°C且 pH 为 3-5；且

当所述突变抗体与带有马来酰亚胺基团或修饰有马来酰亚胺基团的药物分子 B 反应时，反应温度 T2 为 4±10°C且 pH 为 5.1-6.5。

2.如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述抗体选自下组：全长抗体、抗原结合片段、双特异性抗体或纳米抗体。

15 3.如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述酰基芳基具有式

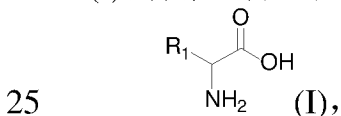


其中，所述环 A 选自下组：取代或未取代的 C6-C10 的芳基、取代或未取代的包括 1-3 个选自 O、N、S 的 5-10 元杂芳基；

20 且 R 选自下组：取代或未取代的 C1-C4 烷基、取代或未取代的 C2-C4 烯基、取代或未取代的 C2-C4 炔基，

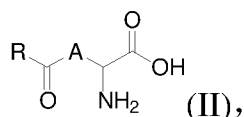
所述取代指基团上的一个或多个 H 独立地被选自下组的基团取代：卤素、C1-C4 烷基、C1-C4 烷氧基、C2-C4 烯基、C2-C4 炔基、-NO<sub>2</sub>、-CN 或-OH。

4.如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述突变抗体包括具有式 (I)的氨基酸，从而提供巯基：



其中，R1 选自下组：巯基取代的 C1-C4 烷基、巯基取代的 C2-C4 烯基、巯基取代的 C2-C4 炔基。

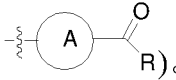
5.如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述突变抗体包括具有式 (II)的氨基酸，从而提供所述酰基芳基：



所述 A 选自下组：取代或未取代的 C6-C10 的芳基、取代或未取代的包括 1-3 个选自 O、N、S 的 5-10 元杂芳基；

且 R 选自下组：取代或未取代的 C1-C4 烷基、取代或未取代的 C2-C4 烯基、取代或未取代的 C2-C4 炔基；且

所述取代指基团上的一个或多个 H 独立地被选自下组的基团取代：卤素、C1-C4 烷基、C1-C4 烷氧基、C2-C4 烯基、C2-C4 炔基、-NO<sub>2</sub>、-CN 或-OH。

6. 一种突变抗体，所述突变抗体包含两个反应基团，其中，所述反应基团一个为游离巯基(-SH)，另一个为酰基芳基().

7. 如权利要求 6 所述的突变抗体的用途，其特征在于，用于制备抗体药物偶联物和/或抗体荧光偶联试剂。

8. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的抗体药物偶联物，或其药学上可接受的盐。

9. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包括：

如权利要求 8 所述的抗体药物偶联物，或其药学上可接受的盐；以及药学上可接受的载体。

10. 如权利要求 4 所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、或包含其的组合物的用途，其特征在于，用于制备一药物，所述药物用于选自下组的一种或多种用途：

A1) 预防和/或抑制肿瘤细胞增殖；

A2) 预防和/或抑制肿瘤生长；

A3) 预防和/或治疗癌症；

A4) 制备抗肿瘤药物；

A5) 制备肿瘤细胞增殖抑制剂；和/或

A6) 肿瘤细胞成像、示踪。

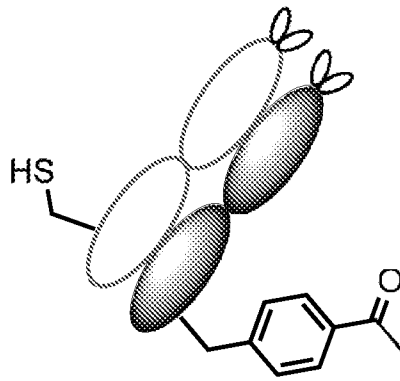


图 1

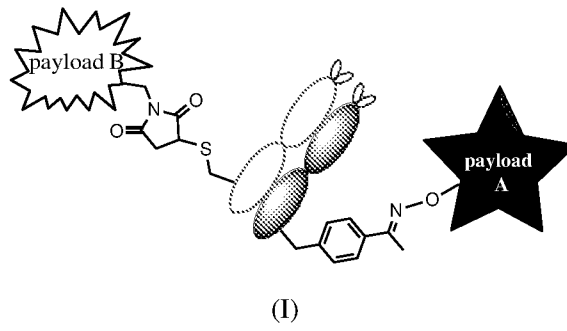


图 2

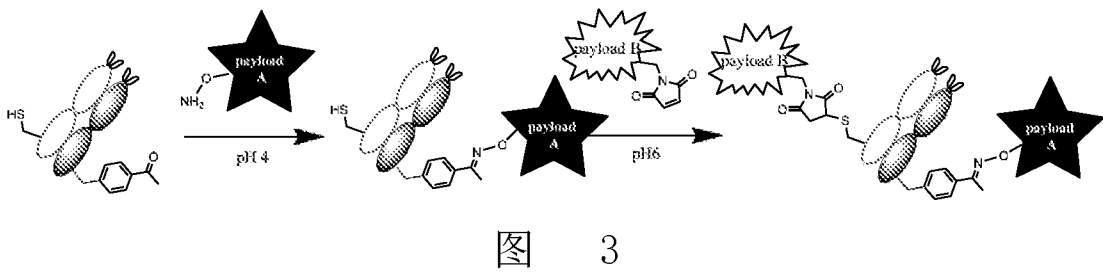


图 3

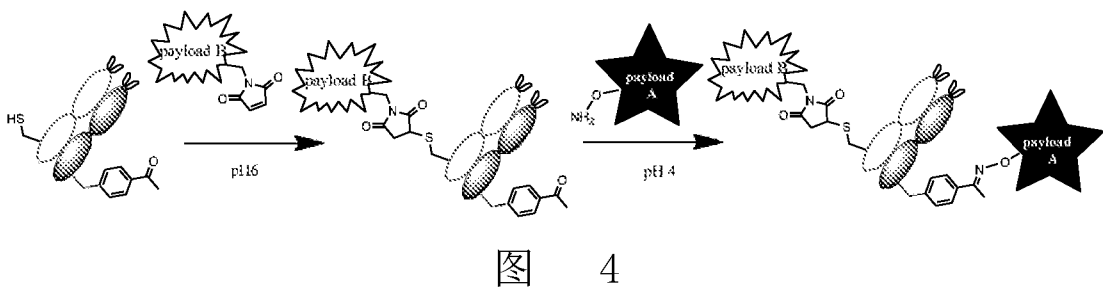


图 4

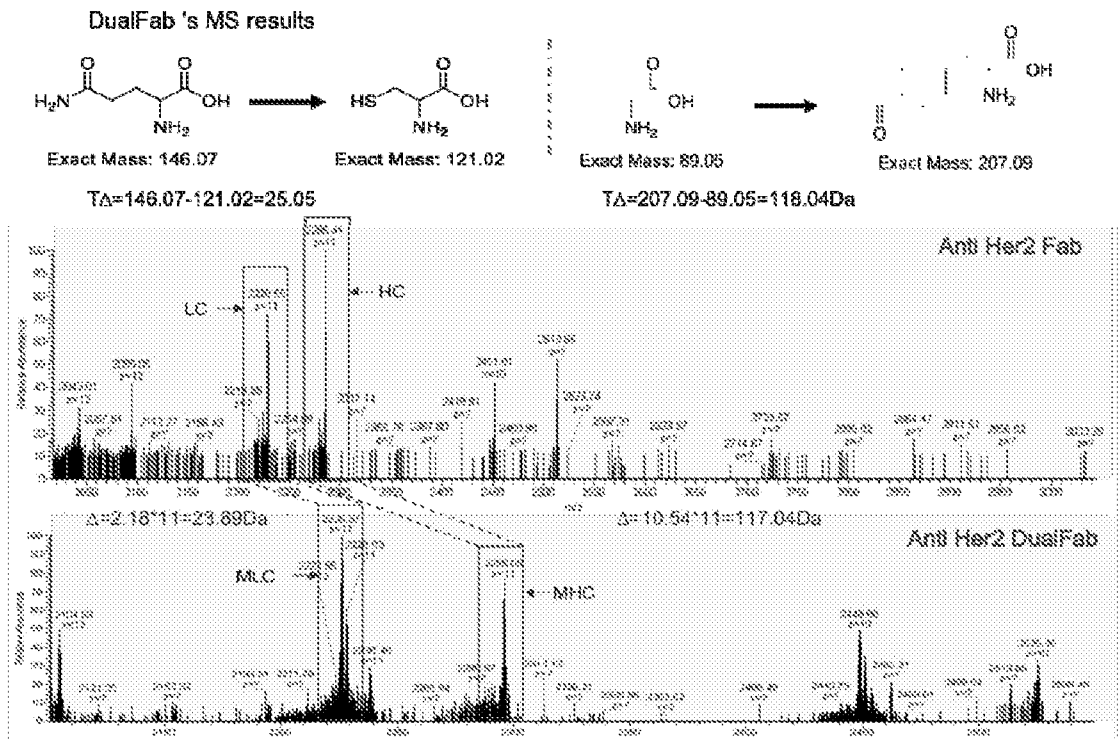


图 5



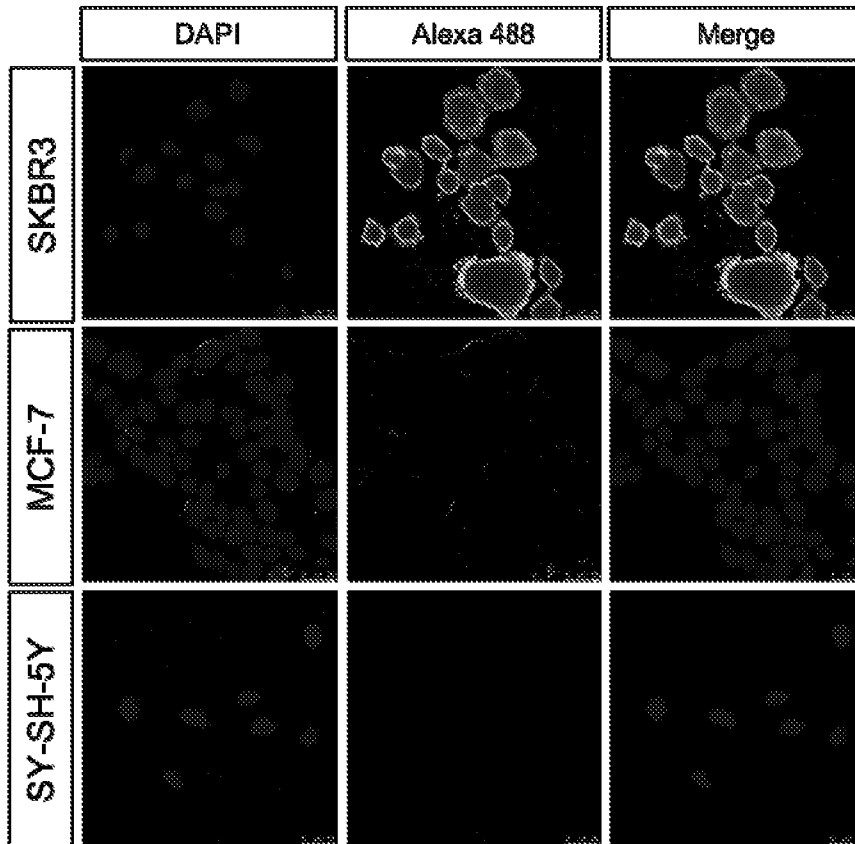


图 6

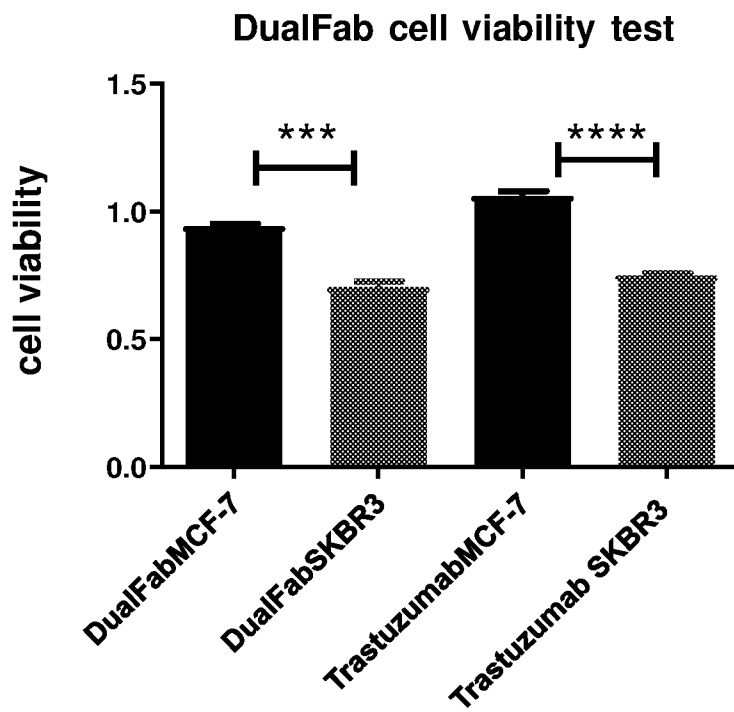


图 7

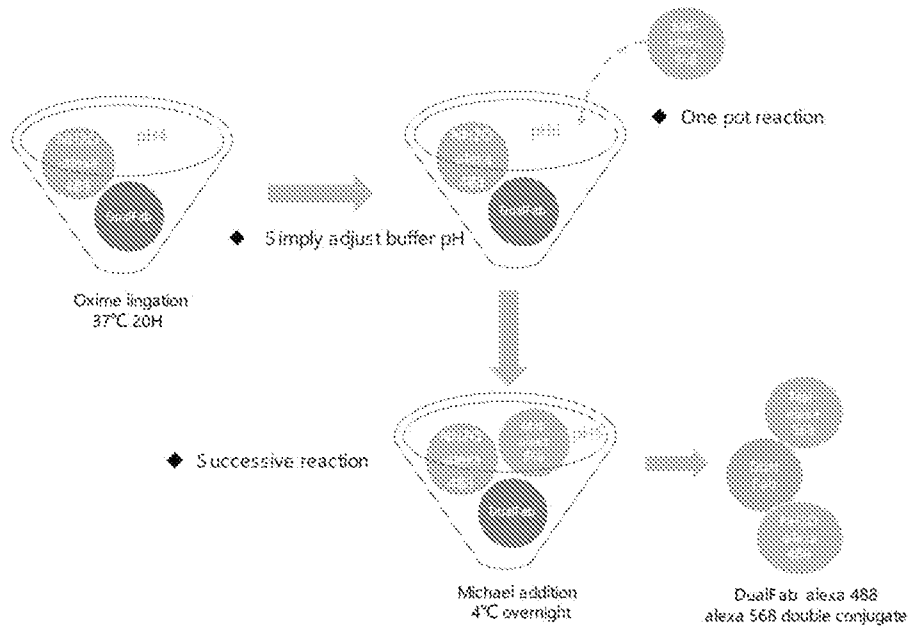
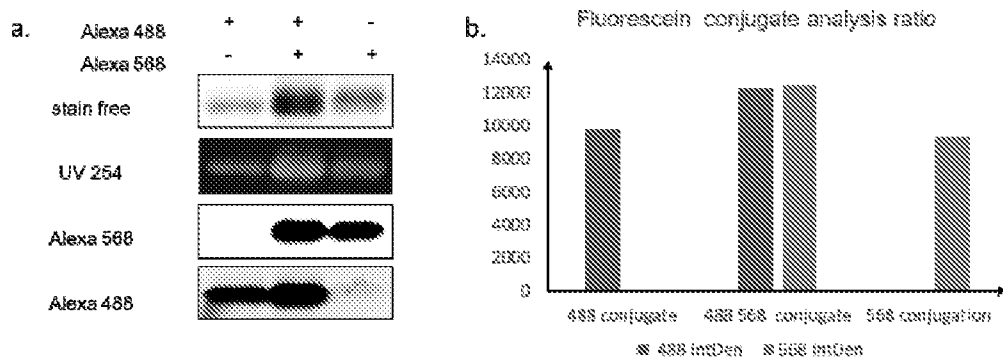


图 8



Conjugate ratio :Alexa 488 / Alexa 568 = 1:1

图 9

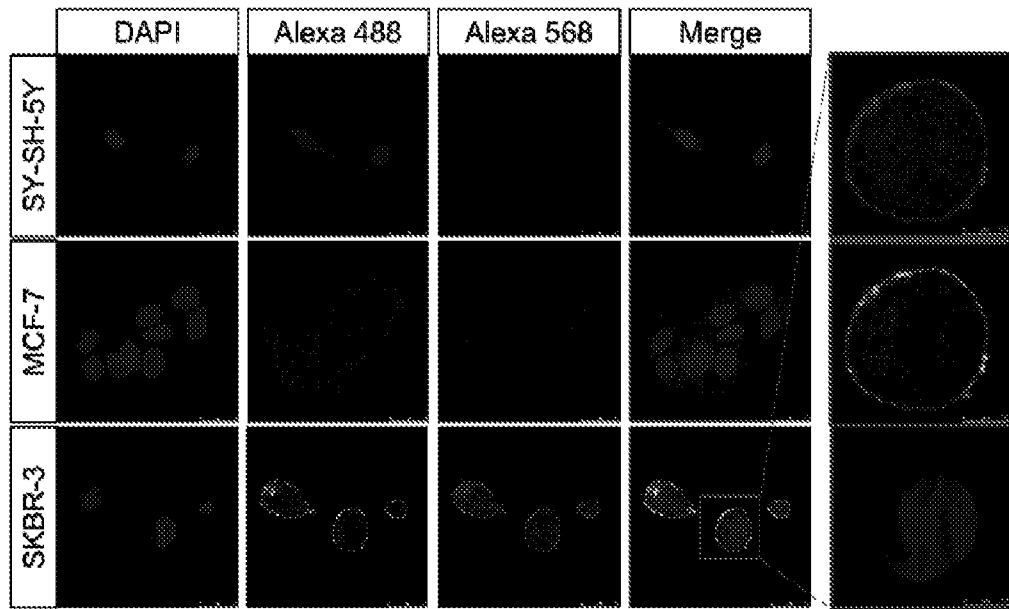


图 10

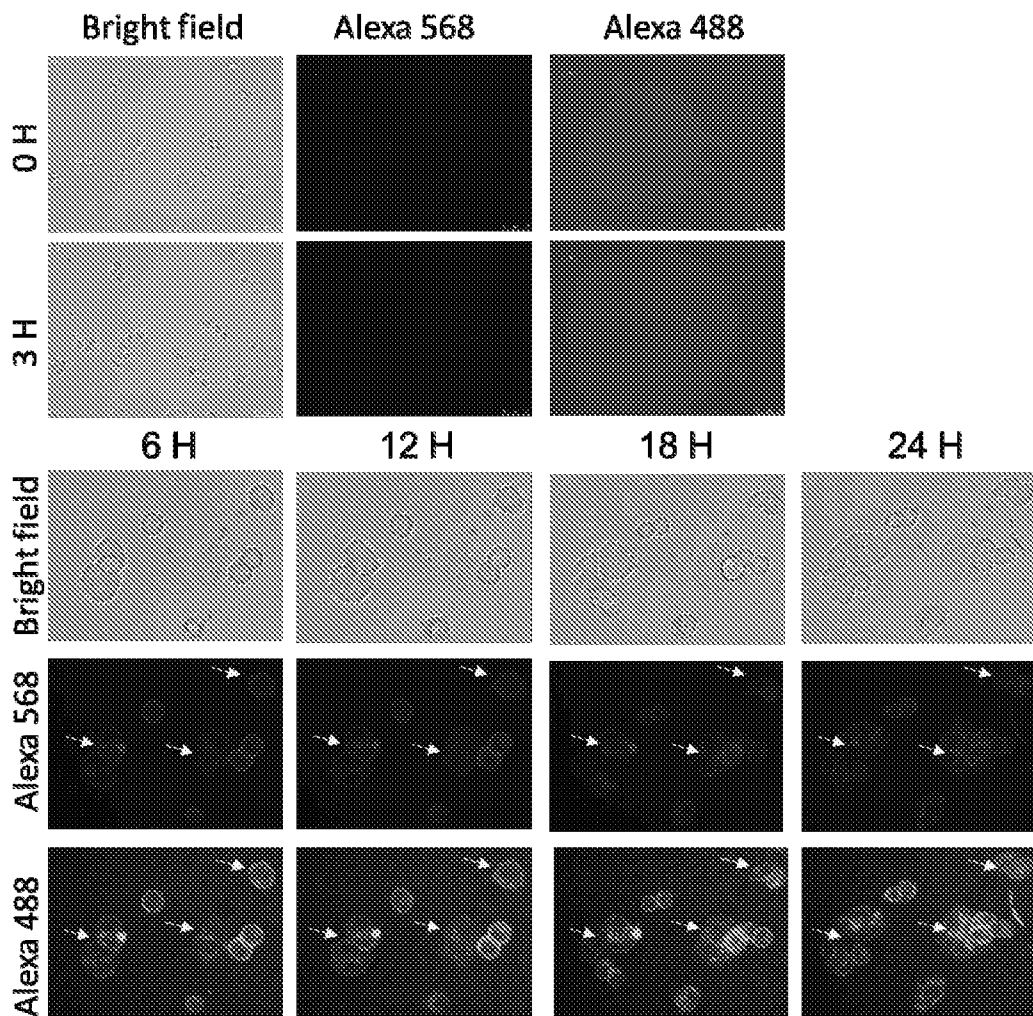


图 11

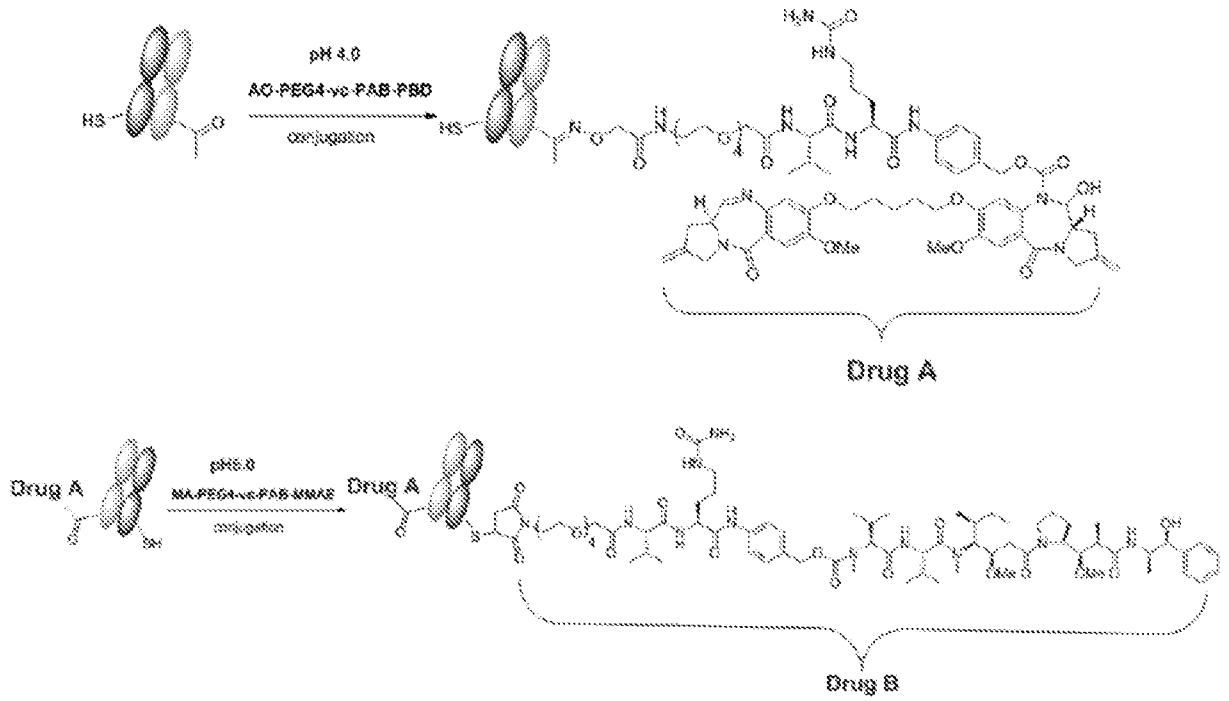


图 12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/086254

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 47/68(2017.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; C07K 16/32(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P; C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方; 读秀学术; Springer; ISI Web of Science; 中国专利生物序列检索; NCBI; EMBL; STNext; 中国科学院, 上海有机化学研究所, 抗体偶联药物, 半胱氨酸, 对乙酰基苯丙氨酸, 巯基, 硫醇基, 马来酰亚胺, 曲妥珠单抗, description, amino acid sequence search, HER2, Q124C, A121X, Chinese academy of science, Shanghai institute of organic chemistry, antibody-drug conjugates, ADC, Cysteine, Cys, p-Acetyl-phenylalanine, pAcPhe, pAcF, pAF, sulfhydryl, Maleimide, trastuzumab		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	ZHANG, Lin et al. "A Simple and Efficient Method to Generate Dual Site-Specific Conjugation ADCs with Cysteine Residue and An Unnatural Amino Acid" <i>Bioconjugate Chemistry</i> , 20 May 2021 (2021-05-20), page 1096 left-hand column last paragraph, page 1098 figure 3, page 1100 left-hand column paragraph 3	1-10
X	Jun Y. Axup et al. "Synthesis of Site-specific Antibody-Drug Conjugates Using Unnatural Amino Acids" <i>PNAS</i> , Vol. 109, No. 40, 02 October 2012 (2012-10-02), pages 16101-16106, in particular page 16102, left-hand column, paragraph 1 and right-hand column, paragraph 2, page 16104, left-hand column, paragraph 2, page 16105, right-hand column, paragraphs 1-5	6-9
Y	TW 201139666 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD) 16 November 2011 (2011-11-16) description page 31 last 2 paragraphs, page 77 paragraph 4, page 79 last paragraph, page 81 last paragraph, page 86 embodiment 3	1-5, 7, 10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>21 June 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>04 July 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/086254

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Jun Y. Axup et al. "Synthesis of Site-specific Antibody-Drug Conjugates Using Unnatural Amino Acids" <i>PNAS</i> , Vol. 109, No. 40, 02 October 2012 (2012-10-02), pages 16101-16106, in particular page 16102, left-hand column, paragraph 1 and right-hand column, paragraph 2, page 16104, left-hand column, paragraph 2, page 16105, right-hand column, paragraphs 1-5	1-5, 7, 10
A	CN 112601522 A (SYNTHIS LLC) 02 April 2021 (2021-04-02) entire document	1-10
A	WO 2021031930 A1 (UNIV SHENYANG PHARMACEUTICAL) 25 February 2021 (2021-02-25) entire document	1-10

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

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/CN2022/086254</b>
---

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
TW	201139666	A1	16 November 2011	EP	2554669	A1	06 February 2013
				WO	2011118739	A1	29 September 2011
				JP	WO2011118739	A1	04 July 2013
				US	2016039937	A1	11 February 2016
				US	2012009621	A1	12 January 2012
-----							
CN	112601522	A	02 April 2021	None			
-----							
WO	2021031930	A1	25 February 2021	CN	113330029	A	31 August 2021
				AU	2020332026	A1	14 April 2022
				KR	20220045047	A	12 April 2022
-----							



<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 47/68(2017.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; C07K 16/32(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P; C07K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方; 读秀学术; Springer; ISI Web of Science; 中国专利生物序列检索; NCBI; EMBL; STNext: 中国科学院, 上海有机化学研究所, 抗体偶联药物, 半胱氨酸, 对乙酰基苯丙氨酸, 巯基, 硫醇基, 马来酰亚胺, 曲妥珠单抗, 说明书氨基酸序列检索, HER2, Q124C, A121X, Chinese academy of science, Shanghai institute of organic chemistry, antibody-drug conjugates, ADC, Cysteine, Cys, p-Acetyl-phenylalanine, pAcPhe, pAcF, pAF, sulfhydryl, Maleimide, trastuzumab</p>														
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>ZHANG, Lin 等. "A Simple and Efficient Method to Generate Dual Site-Specific Conjugation ADCs with Cysteine Residue and An Unnatural Amino Acid" Bioconjugate Chemistry, 2021年5月20日 (2021 - 05 - 20), 第1096页左栏最后一段、第1098页图3、第1100页左栏第3段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Jun Y. Axup 等. "Synthesis of Site-specific Antibody-Drug Conjugates Using Unnatural Amino Acids" PNAS, 第109卷, 第40期, 2012年10月2日 (2012 - 10 - 02), 第16101-16106页, 尤其是第16102页左栏第1段和右栏第2段、第16104页左栏第2段、第16105页右栏第1-5段</td> <td>6-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>TW 201139666 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD) 2011年11月16日 (2011 - 11 - 16) 说明书第31页最后两段、第77页第4段、第79页最后一段、第81页最后一段、第86页实施例3</td> <td>1-5、7、10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	ZHANG, Lin 等. "A Simple and Efficient Method to Generate Dual Site-Specific Conjugation ADCs with Cysteine Residue and An Unnatural Amino Acid" Bioconjugate Chemistry, 2021年5月20日 (2021 - 05 - 20), 第1096页左栏最后一段、第1098页图3、第1100页左栏第3段	1-10	X	Jun Y. Axup 等. "Synthesis of Site-specific Antibody-Drug Conjugates Using Unnatural Amino Acids" PNAS, 第109卷, 第40期, 2012年10月2日 (2012 - 10 - 02), 第16101-16106页, 尤其是第16102页左栏第1段和右栏第2段、第16104页左栏第2段、第16105页右栏第1-5段	6-9	Y	TW 201139666 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD) 2011年11月16日 (2011 - 11 - 16) 说明书第31页最后两段、第77页第4段、第79页最后一段、第81页最后一段、第86页实施例3	1-5、7、10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
PX	ZHANG, Lin 等. "A Simple and Efficient Method to Generate Dual Site-Specific Conjugation ADCs with Cysteine Residue and An Unnatural Amino Acid" Bioconjugate Chemistry, 2021年5月20日 (2021 - 05 - 20), 第1096页左栏最后一段、第1098页图3、第1100页左栏第3段	1-10												
X	Jun Y. Axup 等. "Synthesis of Site-specific Antibody-Drug Conjugates Using Unnatural Amino Acids" PNAS, 第109卷, 第40期, 2012年10月2日 (2012 - 10 - 02), 第16101-16106页, 尤其是第16102页左栏第1段和右栏第2段、第16104页左栏第2段、第16105页右栏第1-5段	6-9												
Y	TW 201139666 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD) 2011年11月16日 (2011 - 11 - 16) 说明书第31页最后两段、第77页第4段、第79页最后一段、第81页最后一段、第86页实施例3	1-5、7、10												
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:                  "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件                  "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利                  "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)                  "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件                  "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件                  "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件                  "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性                  "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性                  "&amp;" 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年6月21日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年7月4日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)                  中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>杨凤娇</p> <p>电话号码 (86-512)88995733</p>												

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	Jun Y. Axup 等. "Synthesis of Site-specific Antibody-Drug Conjugates Using Unnatural Amino Acids" PNAS, 第109卷, 第40期, 2012年10月2日 (2012 - 10 - 02), 第16101-16106页, 尤其是第16102页左栏第1段和右栏第2段、第16104页左栏第2段、第16105页右栏第1-5段	1-5、7、10
A	CN 112601522 A (辛瑟斯治疗股份有限公司) 2021年4月2日 (2021 - 04 - 02) 全文	1-10
A	WO 2021031930 A1 (UNIV SHENYANG PHARMACEUTICAL) 2021年2月25日 (2021 - 02 - 25) 全文	1-10

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/086254

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
TW	201139666	A1	2011年11月16日	EP	2554669	A1	2013年2月6日
				WO	2011118739	A1	2011年9月29日
				JP	W02011118739	A1	2013年7月4日
				US	2016039937	A1	2016年2月11日
				US	2012009621	A1	2012年1月12日
-----				-----			
CN	112601522	A	2021年4月2日	无			
-----				-----			
WO	2021031930	A1	2021年2月25日	CN	113330029	A	2021年8月31日
				AU	2020332026	A1	2022年4月14日
				KR	20220045047	A	2022年4月12日
-----				-----			