

一种抗表皮生长因子受体(EGFR)抗体-药物偶联物及其应用

本申请要求 2023 年 5 月 9 日提交的中国专利申请号 CN202310519224.2 以及 2023 年 10 月 10 日提交的中国专利申请号 CN202311314455.6 的优先权。

技术领域

本申请属于医药领域，其涉及一种抗体-药物偶联物(ADC)及其用途。具体而言，本申请涉及一种新型的抗表皮生长因子受体抗体-药物偶联物及其用于治疗与EGFR相关的疾病或病症的方法和用途。

背景技术

人表皮生长因子受体(也称为 HER-1 或 Erb-B1，且在本文中称为“EGFR”)是由 c-erbB 原癌基因编码的 170kDa 跨膜受体，且表现出固有的酪氨酸激酶活性(Modjtahedi 等人, Br. J. Cancer 73: 228-235(1996); Herbst 和 Shin, Cancer 94: 1593-1611(2002))。EGFR 为表皮生长因子受体家族成员之一，在细胞生长、发育和分化过程中发挥重要作用。EGFR 通过酪氨酸激酶介导的信号转导途径调节多种细胞过程，包括但不限于控制细胞增殖、分化、细胞存活、凋亡、血管生成、有丝分裂发生和转移的信号转导途径的激活(Atalay 等人, Ann. Oncology 14: 1346-1363 (2003); Tsao 和 Herbst, Signal 4: 4-9 (2003); Herbst 和 Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002); Modjtahedi 等人, Br. J. Cancer 73: 228-235 (1996))。

EGFR 在多种实体瘤中高表达，靶向 EGFR 的药物在过去三十年里诞生出多个明星药物，如奥希替尼。然而，由于小分子治疗常会引发靶点基因突变，导致治疗失败，则需要不断开发新一代针对抗突变的 EGFR 抑制剂小分子药物。而在抗体药物中，西妥昔单抗(Cetuximab)在 2004 年获批，对结直肠癌、鼻咽癌等有效。不过，西妥昔单抗也需要与化疗联用以增强治疗疗效。

因此，本领域亟需具有更高生物学活性的人源化抗表皮生长因子受体的药物，尤其是对 KRAS 突变体或 TKI 耐药等病人有疗效的药物，例如抗体-药物偶联物，以进一步提高疗效，降低副作用。作为重要的激酶靶点，针对 EGFR 的大分子药物开发也呈现出新型不同抗癌作用机制的药物分子。靶向 EGFR 的抗体-药物偶联物就是新一代靶向药物的开发热点之一。抗体-药物偶联物(Antibody-drug conjugates, ADC)由靶向肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原的单克隆抗体 (Antibody) 与具有抗癌高活性的小分子毒素 (Payload) 通过连接子 (Linker) 偶联组成。抗体-药物偶联物兼具单抗药物的高靶向性以及细胞毒素在肿瘤组织中高活性的双重优点，可协同发挥抗体药物及荷载小分子药物的优势以便更高效、更特异地杀伤肿瘤细胞。相较于单独的化疗药物，抗体-药物偶联物的毒副作用更低，较传统抗体类肿瘤药物具有更好的疗效。

发明概述

本申请涉及如本文所定义的式(I)的抗体-药物偶联物以及包含所述抗体-药物偶联物的药物组合物。本申请的特征在于治疗或预防与 EGFR 相关的疾病或病症的方法，其包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的如本文所定义的式(I)的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物。本申请的方法可用于治疗或预防与 EGFR 相关的疾病或病症。

本申请的第一个方面涉及一种抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述抗体-药物偶联物具有式(I)的结构：

TP-[L1-L2-L3-D]_k

(I)

其中：

TP 为选择性结合或识别 EGFR 的靶向部分；

L1 为延伸单元，其连接 TP 和 L2；

L2 为任选氨基酸残基或 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；

L3 为间隔元件；

D 为生物活性分子；

k 代表约 0.1 和约 10.0 之间的任意数值。

本申请的另一个方面涉及一种药物组合物，所述药物组合物包含式(I)的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，以及任选地，药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本申请的又一个方面涉及一种治疗与 EGFR 相关的疾病或病症的方法。所述方法包括向有此需要的受试者施用式(I)的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或包含其的药物组合物。所述与 EGFR 相关的疾病或病症选自表皮癌、结肠癌、直肠癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

本申请的再一个方面涉及式(I)的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或包含其的药物组合物在制备药物中的用途。

本申请进一步提供了相对于现有技术已知的抗 EGFR-ADC 具有改进的效力和/或抗肿瘤活性的抗体-药物偶联物和组合物。

本申请的细节在下面随附的说明中阐述。尽管与本文所述类似或等同的方法和材料可用于本申请的实践或测试中，但现在描述说明性方法和材料。根据说明书和权利要求书，本申请的其他特征、目的和优点将是显而易见的。在说明书和所附权利要求书中，单数形式也包括复数形式，除非上下文另有明确规定。除非另有定义，本文所用的所有技术和科学术语具有与本申请所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本说明书中引用的所有专利和出版物通过引用整体并入本文。

在整个本申请中引用的所有参考文献(包括文献参考文献、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请)的内容在此明确地通过引用整体并入本文。除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均符合本领域普通技术人员通常已知的含义。

5 附图说明

图 1 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物对 EGFR 阳性细胞 A549 和 SW480 的亲合力的图。(A) 抗 EGFR 抗体-药物偶联物 MAB07-LP62 (DAR4 或 DAR8)对 A549 细胞的亲和力。(B) 抗 EGFR 抗体-药物偶联物 MAB07-LP62 (DAR8)对 SW480 细胞的亲和力。注: MAB07 代表抗 EGFR 抗体,其氨基酸序列记载于序列表中; MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物; DAR 代表荷载药物:抗体比; IgG1 代表人 IgG1, κ 同种型对照。

图 2 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物随着孵育时间延长被 EGFR 阳性细胞 A549 内化的图。注: MAB07 代表抗 EGFR 抗体,其氨基酸序列记载于序列表中; MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物; DAR 代表荷载药物:抗体比; IgG1 代表:人 IgG1, κ 同种型对照。

图 3 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物 MAB07-LP62 (DAR8)的细胞杀伤活性的图。(A) MAB07-LP62 (DAR8)对 NCI-H1993 细胞系的细胞杀伤活性。(B) MAB07-LP62 (DAR8)对 EBC-1 细胞系的细胞杀伤活性。注: MAB07 代表抗 EGFR 抗体,其氨基酸序列记载于序列表中; MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物; DAR 代表荷载药物:抗体比。

图 4 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物对源自不同物种的 EGFR 的交叉结合活性的图。(A) MAB07-LP62 (DAR8)与人 EGFR ECD 的结合。(B) MAB07-LP62 (DAR8)与食蟹猴 EGFR ECD 的结合。(C) MAB07-LP62 (DAR8)与大鼠 EGFR ECD 的结合。(D) MAB07-LP62 (DAR8)与小鼠 EGFR ECD 的结合。注: MAB07 代表抗 EGFR 抗体,其氨基酸序列记载于序列表中; MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物; DAR 代表荷载药物:抗体比; IgG1 代表:人 IgG1, κ 同种型对照。

图 5 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人表皮癌细胞系 A431 皮下异种移植的 BALB/c 裸小鼠模型中的抗肿瘤活性的图。注: MAB07 代表抗 EGFR 抗体,其氨基酸序列记载于序列表中; MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物; Cetuximab-LP62 代表 Cetuximab 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物; IgG1-LP62 代表 IgG1 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物; DAR 代表荷载药物:抗体比。

图 6 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人非小细胞肺癌细胞系 NCI-H1993 皮下异种移植的 BALB/c 裸小鼠模型中的抗肿瘤活性的图。注: MAB07 代表抗 EGFR 抗体,其氨基酸序列记载于序列表中; MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物; MAB07-VC-MMAE 代表 MAB07 与连接子-毒素 MC-VC-PABC-MMAE 偶联形成的抗体-药物偶联物; MAB07-GGFG-DXD 代表 MAB07 与连接子-毒素 GGFG-DXD 偶联形成的抗体-药物

偶联物；A 1.3 代表实施例 1 中的毒素化合物 A 1.3，其为游离的载荷药物；DAR 代表载荷药物：抗体比。

图 7 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人非小细胞肺癌细胞系 EBC-1 皮下异种移植的 BALB/c 裸小鼠模型中的抗肿瘤活性的图。注：MAB07 代表抗 EGFR 抗体，其氨基酸序列记载于序列表中；MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物；MAB07-VC-MMAE 代表 MAB07 与连接子-毒素 MC-VC-PABC-MMAE 偶联形成的抗体-药物偶联物；MAB07-GGFG-DXD 代表 MAB07 与连接子-毒素 GGFG-DXD 偶联形成的抗体-药物偶联物；A 1.3 代表实施例 1 中的毒素化合物 A 1.3，其为游离的载荷药物；DAR 代表载荷药物：抗体比。

图 8 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在 HuPrime®肺癌 LU3075 皮下异种移植的雌性 BALB/c 裸小鼠模型中的抗肿瘤作用的图。注：MAB07 代表抗 EGFR 抗体，其氨基酸序列记载于序列表中；MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物；且 DAR 代表载荷药物：抗体比。

图 9 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人肺癌 LD1-0025-200717 PDX 移植瘤 NCG 小鼠模型中的抗肿瘤作用的图。注：MAB07 代表抗 EGFR 抗体，其氨基酸序列记载于序列表中；MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物；斯鲁利单抗(serplulimab)为抗 PD-1 抗体，其氨基酸序列记载于序列表中；IgG1 代表人 IgG1， κ 同种型对照；IgG1-LP62 代表 IgG1 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物，DAR 值为 8；且 DAR 代表载荷药物：抗体比。

图 10 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在 PBMC 免疫系统人源化小鼠人结肠癌 HT-29 细胞异体移植的 NCG 小鼠模型中的抗肿瘤活性的图。注：MAB07 代表抗 EGFR 抗体，其氨基酸序列记载于序列表中；MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物；斯鲁利单抗(serplulimab)为抗 PD-1 抗体，其氨基酸序列记载于序列表中；且 DAR 代表载荷药物：抗体比。

图 11 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人头颈鳞癌 LD1-2023-411020 PDX 移植瘤 NCG 小鼠模型中的抗肿瘤作用的图。注：MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物；DAR 代表载荷药物：抗体比。

图 12 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人胃癌 LD1-0017-411335PDX 移植瘤 NU/NU 小鼠模型中的抗肿瘤作用的图。注：MAB07 代表抗 EGFR 抗体，其氨基酸序列记载于序列表中；MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物；A 1.3 代表实施例 1 中的毒素化合物 A 1.3，其为游离的载荷药物；且 DAR 代表载荷药物：抗体比。

图 13 是显示抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人食管癌 KYSE-150 细胞系皮下异种移植 NOD/SCID 小鼠模型中的抗肿瘤作用的图。注：IgG1 代表人 IgG1， κ 同种型对照；MAB07 代表抗 EGFR 抗体，其氨基酸序列记载于序列表中；MAB07-LP62 代表 MAB07 与 LP62 偶联形成的抗体-药物偶联物；且 DAR 代表载荷药物：抗体比。

发明详述

本公开提供了一种新型抗 EGFR 抗体-药物偶联物。所述抗 EGFR 抗体-药物偶联物表现出对 EGFR 阳性细胞的良好亲和力，能够有效地内化入 EGFR 阳性细胞，甚至对于抗 EGFR 抗体或 EGFR 小分子抑制剂不敏感的肿瘤细胞也表现出良好的细胞杀伤作用。进一步，所述抗 EGFR 抗体-药物偶联物在各种肿瘤模型(包括奥希替尼和/或 Enhertu 耐药肿瘤模型)中表现出优异的肿瘤抑制活性。

为了清楚起见而不是作为限制，发明详述分为以下小节：

1.定义；

2.抗体-药物偶联物；

3.使用方法；

4.药物配制品；以及

5.制品和试剂盒。

1. 定义

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

术语“EGFR”是指人表皮生长因子受体(也称为 HER-1 或 Erb-B1)是由 c-erbB 原癌基因编码的 170kDa 跨膜受体，且表现出固有的酪氨酸激酶活性(Modjtahedi 等人，Br. J. Cancer 73: 228-235(1996); Herbst 和 Shin, Cancer 94: 1593-1611(2002))。SwissProt 数据库登录项 P00533 提供了人 EGFR 的序列。EGFR 通过酪氨酸激酶介导的信号转导途径调节多种细胞过程，包括但不限于控制细胞增殖、分化、细胞存活、凋亡、血管生成、有丝分裂发生和转移的信号转导途径的激活(Atalay 等人，Ann.Oncology 14: 1346-1363(2003); Tsao 和 Herbst, Signal 4: 4-9(2003); Herbst 和 Shin, Cancer 94: 1593-1611(2002); Modjtahedi 等人，Br.J.Cancer 73: 228-235(1996))。

术语“抗体”以其最广泛的含义使用，并且涵盖多种抗体结构，这些抗体结构包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)、全长抗体及其抗原结合片段，只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。术语“抗体部分”是指全长抗体或其抗原结合片段。

全长抗体包含两条重链和两条轻链。重链和轻链的可变区负责抗原结合。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“V_H”和“V_L”。两条链中的可变区通常包含三个高度可变的环，称为互补决定区(CDR)(包括 LC-CDR1、LC-CDR2 和 LC-CDR3 的轻链(LC)CDR, 包括 HC-CDR1、HC-CDR2 和 HC-CDR3 的重链(HC) CDR)。本文公开的抗体和抗原结合片段的 CDR 边界可以通过以下惯例来定义或鉴定：Kabat、Chothia 或 Al-Lazikani (Al-Lazikani 1997; Chothia

1985; Chothia 1987; Chothia 1989; Kabat 1987; Kabat 1991)。重链或轻链的三个 CDR 被插入称为框架区 (FR) 的侧翼区段之间, 它们比 CDR 更为高度保守, 并形成了支持高变环的支架。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合, 但是表现出多种效应子功能。根据抗体重链恒定区的氨基酸序列将抗体分类。抗体的五种主要类别或同种型是 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 5 分别以存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链为特征。几种主要抗体类别分为亚类, 例如 IgG1 (γ 1 重链)、IgG2 (γ 2 重链)、IgG3 (γ 3 重链)、IgG4 (γ 4 重链)、IgA1 (α 1 重链) 或 IgA2 (α 2 重链)。

如本文所用的术语“抗原结合片段”是指抗体片段, 其包括例如双特异抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、二硫键稳定的 Fv 片段 (dsFv)、(dsFv)₂、双特异性 dsFv (dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双特异抗体 (ds 双特异抗体)、单链 Fv (scFv)、scFv 二聚体 (二价双抗体)、10 由抗体的包含一个或多个 CDR 的部分形成的多特异性抗体、骆驼化的单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体或与抗原结合但不包含完整的抗体结构的任何其他抗体片段。抗原结合片段能够与亲本抗体或亲本抗体片段 (例如, 亲本 scFv) 结合的相同抗原结合。在一些实施方案中, 抗原结合片段可包含来自特定人抗体的一个或多个 CDR, 所述 CDR 嫁接到来自一个或多个不同人抗体的框架区。

15 如本文所用, 术语“CDR”或“互补决定区”旨在意指在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些特定区已经描述于: Kabat 等人, J. Biol. Chem., 252:6609-6616 (1977); Kabat 等人, 美国卫生与公共服务部, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991); Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Al-Lazikani B.等人, J. Mol. Biol., 273: 927-948 (1997); MacCallum 等人, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996); Abhinandan 和 Martin, Mol. Immunol., 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M.P.等人, Dev. Comp.Immunol., 27: 55-77 (2003); 以及 Honegger 和 Plückthun, J. Mol. Biol., 309:657-670 (2001), 其中定义包括当彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而, 应用任一定义来指代抗体或移植的抗体或其变体的 CDR 旨在落入如本文定义和使用的术语的范围内。涵盖如上述每篇参考文献定义的 CDR 的氨基酸残基列于下表 1 中作为比较。CDR 预测算法和接口是本领域已知的, 包括例如 Abhinandan 和 Martin, 20 Mol. Immunol., 45: 3832-3839 (2008); Ehrenmann F.等人, Nucleic Acids Res., 38: D301-D307 (2010); 和 Adolf-Bryfogle J.等人, Nucleic Acids Res., 43: D432-D438 (2015)。在本段中引用的参考文献的内容通过引用以其整体并入本文, 以用于本申请中并且可能包含在本文的一项或多项权利要求中。

表 1: CDR 定义

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	IMGT ⁴	AHo ⁵
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

¹ 残基编号遵循 Kabat 等人的命名法 (同上)。

² 残基编号遵循 Chothia 等人的命名法 (同上)。

³ 残基编号遵循 MacCallum 等人的命名法 (同上)。

⁴ 残基编号遵循 Lefranc 等人的命名法 (同上)。

⁵ 残基编号遵循 Honegger 和 Plückthun 的命名法 (同上)。

5 表述“如 Kabat 中的可变结构域残基编号”或“如 Kabat 中的氨基酸位置编号”及其变体是指用于上文 Kabat 等人的抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这个编号系统, 实际直链氨基酸序列可以含有对应于可变结构域的 FR 或高变区 (HVR) 的缩短或插入的更少的或另外的氨基酸。例如, 重链可变结构域可以包含在 H2 的残基 52 之后的单个氨基酸插入 (根据 Kabat 的残基 52a) 以及在重链 FR 残基 82 之后的插入残基 (例如, 根据 Kabat 的残基 82a、82b 和 82c 等)。可以通过在抗体序列与“标准”Kabat 编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的 Kabat 编号。

10 除非本文另有说明, 否则涵盖全长抗体的 CDR 的氨基酸残基是根据上文 Kabat 等人的 Kabat 命名法定义的, 并且免疫球蛋白重链例如 Fc 区中的残基编号是如上文 Kabat 等人所述的 EU 索引的编号, 除了涵盖任何共有序列的 CDR 的氨基酸残基是根据 Kabat 命名法定义的, 15 其中修饰基于实验条件。“如 Kabat 所述的 EU 索引”是指人 IgG1 EU 抗体的残基编号。

“框架”或“FR”残基是除了本文定义的 CDR 残基以外的那些可变结构域残基。

“人源化”形式的非人 (例如啮齿动物) 抗体是嵌合抗体, 其含有衍生自非人抗体的最小序列。大多数情况下, 人源化抗体是人免疫球蛋白 (受体抗体), 其中来自受体高变区 (HVR) 的残基被来自非人物种 (例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类) 的具有所希望的抗原特异性、20 亲和力和容量的高变区 (供体抗体) 的残基替换。在一些实例中, 人免疫球蛋白的框架区 (FR) 残基被相应的非人残基替换。另外, 人源化抗体可以包括未在受体抗体或供体抗体中发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常, 人源化抗体将包括至少一个、并且典型地两个可变结构域中的基本上全部, 其中全部或基本上全部的高变环对应于非人类免疫球蛋白的那些, 并且全部或基本上全部的 FR 是人类免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将任25 选地包括免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分, 典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。有关进一步的细节, 参见 Jones 等人, *Nature*, 321: 522-525, (1986); Riechmann 等人, *Nature*, 332:323-329 (1988); 和 Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.* 2:593-596 (1992)。

“人抗体”是具有氨基酸序列的抗体, 该氨基酸序列对应于由人产生的抗体的氨基酸序列和/或已经使用本文公开的任何用于制备人抗体的技术制备。人抗体的此定义特别排除了包含30 非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术 (包括噬菌体展示文库) 产生人抗体。Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。也可用于制备人单克隆抗体的是在 Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第 77 页 (1985); Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991) 中描述的方法。另请参见 van Dijk 和 van de Winkel, *Curr.Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)。人35 抗体可以通过将抗原施用至已被修饰以响应抗原攻击而产生这种抗体但其内源基因座已失效

的转基因动物(例如已免疫的 xenomice)来制备(参见,例如,有关 XENOMOUSE™技术的美国专利号 6,075,181 和 6,150,584)。关于通过人 B 细胞杂交瘤技术产生的人抗体,还参见例如 Li 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562 (2006)。

将“关于本文鉴定的多肽和抗体序列的氨基酸序列同一性百分比(%)”或“同源性”定义为在对齐序列(考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分)后,候选序列中与所比较多肽中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的,可以用本领域技术中的多种方式来实现比对,例如使用公众可得的计算机软件,例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR) 或 MUSCLE 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括需要在被比较序列的全长范围实现最大比对的任何算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序 MUSCLE 生成氨基酸序列同一性%值(Edgar, R.C., Nucleic Acids Research 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., BMC Bioinformatics 5(1):113, 2004)。

“同源的”是指两个多肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性或序列同一性。当两个比较序列中两个的一个位置被相同的碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如,如果两个 DNA 分子中的每一个的一个位置被腺嘌呤占据,则该分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分比是两个序列共享的匹配或同源位置数除以比较的位置数乘以 100 的函数。例如,如果两个序列中 10 个位置中的 6 个是匹配或同源的,那么两个序列是 60%同源的。举例来说, DNA 序列 ATTGCC 和 TATGGC 具有 50%的同源性。通常,当两个序列比对以给出最大同源性时进行比较。

术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的一部分,其相对于免疫球蛋白的另一部分,即可变结构域,具有更保守的氨基酸序列,其包含抗原结合位点。恒定结构域包含重链的 C_H1、C_H2 和 C_H3 结构域(统称为 C_H)和轻链的 CHL(或 C_L)结构域。

任何哺乳动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”都可以根据其恒定结构域的氨基酸序列指定为两种明显不同的类型之一,分别称为 kappa (“κ”) 和 lambda (“λ”)。

“CH1 结构域”(也称为“H1”结构域的“C1”)通常从约氨基酸 118 至约氨基酸 215 (EU 编号系统)。

“铰链区”通常定义为 IgG 中对应于人 IgG1 的 Glu216 至 Pro230 的区域(Burton, Molec.Immunol., 22:161-206 (1985))。其他 IgG 同种型的铰链区可以通过将第一个和最后一个形成重链间 S-S 键的半胱氨酸残基置于相同位置而与 IgG1 序列比对。

人 IgG Fc 区(也称为“C2”结构域)的“CH2 结构域”通常从约氨基酸 231 至约氨基酸 340。CH2 结构域是独特的,因为其不与另一个结构域紧密配对。而是,两个 N 连接的支链碳水化合物链插入完整天然 IgG 分子的两个 CH2 结构域之间。据推测,碳水化合物可以提供结构域-结构域配对的替代物并有助于稳定 CH2 结构域。Burton, Molec Immunol., 22:161-206 (1985)。

“CH3 结构域”(也称为“C2”结构域)包含 Fc 区中靠 CH2 结构域 C 末端的残基区域(即从约氨基酸残基 341 至抗体序列的 C 末端(典型地在 IgG 的氨基酸残基 446 或 447 处))。

本文中的术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义免疫球蛋白重链的 C 末端区域，包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可以变化，但是通常将人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。可以例如抗体的生产或纯化期间或通过对编码抗体重链的核酸进行重组工程化来去除 Fc 区的 C 末端赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 447）。因此，完整抗体的组合物可以包括去除了所有 K447 残基的抗体群体，没有去除 K447 残基的抗体群体以及具有带有和不带有 K447 残基的抗体混合物的抗体群体。用于本文所述抗体的合适天然序列 Fc 区包括人 IgG1、IgG2（IgG2A、IgG2B）、IgG3 和 IgG4。

“Fc 受体”或“FcR”描述结合抗体的 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然人 FcR。此外，优选的 FcR 是结合 IgG 抗体（ γ 受体）并包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体的 FcR，包括等位基因变体和这些受体的剪接形式，Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA（“活化受体”）和 Fc γ RIIB（“抑制受体”），它们具有相似的氨基酸序列，主要区别在于其胞质结构域。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序（ITAM）。抑制性受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序（ITIM）。（参见 M. Daëron, *Annu.Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)。FcR 综述于 Ravetch 和 Kinet, *Annu.Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)；Capel 等人, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994)；和 de Haas 等人, *J. Lab.Clin. Med.* 126: 330-41 (1995)。本文的术语“FcR”涵盖其他 FcR，包括将来鉴定的 FcR。

如本文所用，术语“特异性结合”、“特异性识别”和“对……有特异性”是指可测量和可再现的相互作用，例如靶标与抗体或抗体部分之间的结合，其决定了在异质分子（包括生物分子）群体存在时靶标的存在。例如，特异性识别靶标（可以是表位）的抗体或抗体部分是与所述靶标结合的抗体或抗体部分，其亲和力、亲合力、就绪性和/或持续时间长于与其他靶标的结合。在一些实施方案中，抗体与不相关靶标的结合程度小于例如通过放射免疫测定法（RIA）测量的抗体与靶标的结合程度的约 10%。在一些实施方案中，特异性结合靶标的抗体的解离常数 (K_D) $\leq 10^{-5}$ M、 $\leq 10^{-6}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-9}$ M、 $\leq 10^{-10}$ M、 $\leq 10^{-11}$ M、或 $\leq 10^{-12}$ M。在一些实施方案中，抗体特异性结合对从不同物种的蛋白中为保守的蛋白的表位。在一些实施方案中，特异性结合可以包括但不要求排他结合。抗体或抗原结合结构域的结合特异性可以通过本领域已知的方法通过实验确定。这类方法包括但不限于 Western 印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-、EIA-、BIACORETM-检验和肽扫描。

如本文所用，术语“细胞毒剂”是指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括：放射性同位素，例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、C⁶⁰ 和 Lu 的放射性同位素；化疗剂；和毒素，诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素，包括其合成类似物和衍生物。

“连接子”、“连接子单元”或“连接物”是指包含使抗体或靶向部分与药物模块共价连接的共价键或原子链的化学模块。

如本文所用，术语“抗体-药物偶联物”、“抗体偶联物”、“偶联物”、“免疫偶联物”和“ADC”

可以互换使用，且是指连接于抗体(例如抗 EGFR 抗体)的化合物或其衍生物，且定义为以下通式：Ab-(L-D)_k，其中 Ab=抗体部分(即抗体或抗原结合片段)，L=连接子部分，D=药物部分，且 k=每一抗体部分偶联的药物部分数目。

在目前已经市售的抗体-药物偶联物中，抗体和连接子的偶联方式主要有两种：(1)赖氨酸是抗体中最常见的连接位点，其 ε-氨基可以与连接子的活化羧基反应，形成酰胺键。目前已有可以实现定点偶联的技术，即以活化基团活化连接子的羧基，再与抗体中特定的赖氨酸 ε-氨基形成酰胺键，完成偶联。(2)抗体半胱氨酸的巯基(SH)，都是以二硫键的形式存在。打开抗体中的二硫键，可以提供多个自由的巯基作为偶联位点。与抗体巯基进行偶联，一种方法是抗体上自由的巯基与马来酰亚胺发生 Michael 加成反应，也可以是特定的底物与抗体上自由的巯基通过两次 Michael 加成反应，形成一个结构独特的硫桥键。

如本文所用的氨基酸三字母代码和单字母代码如 J. boil. Chem. 1968, 243, 3558. 中所述。

如本文所用，术语“卤素”是指氟、氯、溴或碘。

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

如本文所用，术语“卤代烷基”是指烷基被一个或多个卤素取代，其中烷基如上所定义。

如本文所用，术语“氰基”是指-CN。

如本文所用，术语“磺酸基”是指基团-SO₃H。

如本文所用，术语“羧基”是指-C(O)OH。

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

术语“烯基”是指分子中含有至少一个碳碳双键的烷基化合物，其中烷基的定义如上所述，其具有2至10个(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个)碳原子(即C₂₋₁₀烯基)。所述烯基优选具有2至6个碳原子的烯基(即C₂₋₆烯基)。烯基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选选自烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

术语“炔基”是指分子中含有至少一个碳碳三键的烷基化合物，其中烷基的定义如上所述，其具有2至10个(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个)碳原子(即C₂₋₁₀炔基)。所述炔基优选具有2至6个碳原子的炔基(即C₂₋₆炔基)。炔基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选选自烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

如本文所用，术语“氟代烷基”是指烷基被一个或多个氟原子取代，其中烷基如上所定义。

本发明还包括各种氟化形式的式(I)。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氟原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氟化形式的式(I)。在制备氟代形式的式(I)时可使用市售的氟代起始物质，或它们可使用常规技术采用氟代试剂合成，氟代试剂的非限制性实例包括：氟代硼烷、三氟代硼烷四氢呋喃溶液、氟代氢化锂铝、氟代碘乙烷和氟代碘甲烷等。

如本文所用，术语“DAR”是指荷载药物:抗体比，其代表每个抗体上加载的细胞毒性药物平均数量，也可以表示为药物量和抗体量的比值，药物载量的范围可以是每个抗体(Ab)连接0-12个，优选1-10个细胞毒性药物(D)。在本发明的实施方案中，DAR表示为k，示例而非限制性地，其可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10的均值。可用常规方法如UV/可见光光谱法、质谱、ELISA试验和HPLC特征鉴定偶联反应后每个ADC分子的药物平均数量。

本发明的一个实施方案中，细胞毒性药物通过连接子单元偶联在抗体打开的链间半胱氨酸-SH上和/或定点突变的半胱氨酸巯基-SH上。一般而言，偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于或等于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量，包括：

- (1) 控制连接子-荷载药物、还原剂试剂和单抗的摩尔比，
- (2) 控制反应时间、pH值和温度，
- (3) 选择不同的反应试剂及含量。

如本文所用，术语“溶剂化物”或“溶剂合物”是指本发明的配体(或靶向部分)-药物偶联物与一种或多种溶剂分子形成可药用的溶剂化物，溶剂分子的非限制性实例包括水、乙醇、乙腈、异丙醇、DMSO、乙酸乙酯和二甲基乙酰胺（DMAC）等。

短语“药学上可接受的盐”在用于本文时指抗体-药物偶联物的药学上可接受的有机或无机盐。例示性的盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和扑酸盐(即 1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。药学上可接受的盐可能牵涉包含另一种分子，诸如乙酸盐离子、琥珀酸盐离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是稳定母体化合物电荷的任何有机或无机模块。另外，药学上可接受的盐可以在其结构中具有超过一种带电荷原子。在多种带电荷原子作为药学上可接受的盐的组成部分的情况中可以具有多种抗衡离子。因此，药学上可接受的盐可具有一种或多种带电荷原子和/或一种或多种抗衡离子。

“药学上可接受的溶剂合物”是指一个或多个溶剂分子和 ADC 或其盐的结合。形成药学上可接受的溶剂合物的溶剂的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

如本文所用，“治疗（treatment 或 treating）”是用于获得有益的或所希望的结果（包括临床结果）的方法。出于本申请的目的，有益的或所希望的临床结果包括但不限于以下中的一种或多种：缓解由疾病引起的一种或多种症状、减少疾病的程度、稳定疾病（例如，预防或延迟疾病的恶化）、预防或延迟疾病的传播（例如，转移）、预防或延迟疾病的重现、延迟或减缓疾病的进展、改善疾病状态、提供疾病的缓解（部分或全部）、减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量、延迟疾病的进展、增加或改善生活质量、增加体重增长和/或延长存活。“治疗”还涵盖减少癌症的病理后果（像例如，肿瘤体积）。本申请的方法考虑了这些治疗方面中的任何一个或多个。

在癌症的语境中，术语“治疗”包括以下任何一项或全部：抑制癌细胞的生长、抑制癌细胞的复制、减轻全面肿瘤负担并改善与疾病相关的一种或多种症状。

术语“抑制（“inhibition”或“inhibit”）”是指任何表型特征的减少或停止，或指该特征的发生率、程度或可能性的减少或停止。与参照相比，“降低”或“抑制”是指减少、降低或阻止活性、功能和/或量。在某些实施方案中，“降低”或“抑制”是指引起全面减少 20%或更大的能力。在另一实施方案中，“降低”或“抑制”是指引起全面减少 50%或更大的能力。在又一实施方案中，“降低”或“抑制”是指引起全面减少 75%、85%、90%、95%或更大的能力。

如本文所用，“参照”是指用于比较目的的任何样品、标准或水平。参照可以从健康和/或未患病的样品中获得。在某些实施方案中，参照可以从未治疗的样品获得。在某些实施方案中，参照从个体的未患病或未治疗的样品获得。在一些实例中，参照是从不是所述个人或患

者的一个或多个健康个体获得的。

如本文所用，“延迟疾病的发展”是指推迟、阻碍、减缓、减慢、稳定、抑制和/或延迟缓疾病（例如癌症）的发展。该延迟可以具有不同的时间长度，其取决于疾病的历史和/或被治疗的个体。对本领域技术人员显而易见的是，足够的或显著的延迟实际上可以包括预防，因为所述个体没有患上所述疾病。例如，可能延迟晚期癌症（例如转移的发展）。

如本文所用，“预防”包括针对可能易患疾病但尚未被诊断出患有所述疾病的个体中所述疾病的发生或复发提供预防。

如本文所用，“抑制”功能或活性是与除感兴趣的条件或参数以外的其他相同条件相比，或者可替代地与另一条件相比，降低功能或活性。例如，与不存在抗体的情况下的肿瘤生长速度相比，抑制肿瘤生长的抗体降低了肿瘤的生长速度。

术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文可互换使用，是指哺乳动物，包括但不限于人、牛、马、猫、犬、啮齿动物或灵长类动物。在一些实施方案中，个体是人。

药剂的“有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效达到所需治疗或预防结果的量。具体的剂量可取决于以下中的一个或多个而变化：选择的特定药剂、要遵循的给药方案、是否与其他化合物组合施用、施用时间、要成像的组织以及携带其的物理传递系统。

本申请的物质/分子、激动剂或拮抗剂的“治疗有效量”可以根据例如疾病状态、年龄、性别和个体体重以及该物质/分子、激动剂或拮抗剂在个体中引发希望的应答的能力等因素而变化。治疗有效量也是该物质/分子、激动剂或拮抗剂的任何毒性或有害作用均被治疗有益作用所抵消的量。治疗有效量可以一次或多次施用来递送。

“预防有效量”是指以剂量计并且持续所需的时间段以实现所希望的预防结果的有效的量。典型地，但非必需地，因为预防的剂量是在疾病之前或早期在受试者体内使用的，所以这种预防有效量将小于治疗有效量。

术语“药物配制品”和“药物组合物”是指制剂，其处于的形式允许一种或多种活性成分的生物活性有效，并且其不包含对将被施用所述配制品的个体具有不可接受的毒性的其他组分。此类配制品可以是无菌的。

“药学上可接受的载体”是指与治疗剂一起使用的本领域常规的无毒固体、半固体、或液体填充剂、稀释剂、包封材料、配制品助剂或载体，二者共同组成用于向个体施用的“药物组合物”。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒，并且与配制品的其他成分兼容。药学上可接受的载体适用于所采用的配制品。

在本文中，KRAS 基因与 K-RAS 基因具有相同的含义，其为 RAS 基因家族成员之一，编码 K-ras 蛋白，与多种肿瘤的生成、增殖、迁移、扩散以及血管生成有关。其常见的突变位点为 K-RAS 基因 2 号外显子的 12 号密码子和 13 号密码子，3 号外显子的 61 号密码子，其中有 7 个突变热点：G12C、G12R、G12S、G12V、G12D、G12A、G13V/D。这 7 种突变占到了 90% 以上。在本发明的一个实施方案中，所述肿瘤为与 EGFR 表达相关的 KRAS 基因突变的肿瘤。

在本文中, BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homologB1)基因是一种原癌基因, 是 RAF 家族成员之一。大约 8% 的人类肿瘤发生 BRAF 突变, BRAF 基因突变的绝大部分突变形式为 BRAF V600E 突变, 该突变导致下游 MEK/ERK 信号通路持续激活, 对肿瘤的生长增殖和侵袭转移至关重要。在本发明的一个实施方案中, 所述肿瘤为与 EGFR 表达相关的

5 BRAF 基因突变的肿瘤。

应当理解, 在本申请中化学名与化学结构不一致的情况下(如果有的话), 以化学结构为准。

应当理解, 本文所述的申请的实施方案包括“由……组成”和/或“基本上由……组成”。

本文对“约”值或参数的引用包括(并描述)针对该值或参数本身的变化。例如, 涉及“约

10 X”的描述包括“X”的描述。

如本文所用, 对“不是”值或参数的提及通常意指并描述“不同于”值或参数。例如, 方法不是用于治疗 X 型癌症, 意味着所述方法用于治疗不同于 X 型的癌症。

如本文所用, 术语“约 X-Y”具有与“约 X 至约 Y”相同的含义。

如本文所用, 用术语“约”修饰本发明的成分或反应物的数量时是指数值量的变化, 它们可能发生在例如, 典型的测量和用于制备浓缩液或实际使用溶液的液体处理程序中; 这些

15 程序中的偶然误差中; 制造、来源、或用于制备组合物或实施方法的成分的纯度的差异中; 等。术语“约”还包括由于相对于由特定起始混合物所得组合物的不同平衡条件而不同的量。无论是否通过术语“约”来修饰, 权利要求包括量的等同量。在一个实施方案中, 术语“约”是指在报告数值 10% 范围内, 优选地在报告数值 5% 范围内。

20 本领域技术人员应理解, 当在权利要求中记载数值时, 无论其是否有前缀“约”, 该数值的实际值可以在记载值上下浮动 10% ($\pm 10\%$), 优选上下浮动 5% ($\pm 5\%$)。

当在本文和附带的权利要求中使用, 单数形式“一个/种 (a)”、“一个/种 (an)”、“或 (or)”和“这些/该 (the)”包括复数指代物, 除非上下文明确地指示其他的情况。

25 2. 抗体-药物偶联物

抗 EGFR 抗体可以与细胞毒性或细胞抑制部分(包括其药学上相容的盐)偶联以形成抗体-药物偶联物(ADC)。用于与抗体偶联的特别合适的部分是细胞毒性剂(例如, 化学治疗剂)、前

30 药转化酶、放射性同位素或化合物或毒素(这些部分统称为治疗剂)。例如, 抗 EGFR 抗体可以与细胞毒性剂如化学治疗剂或毒素(例如, 细胞抑制剂或细胞杀伤剂, 例如像相思豆毒素、蓖麻毒素 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素)偶联。

抗 EGFR 抗体可以与前体药物转化酶偶联。可以使用已知方法将前体药物转化酶与所述抗体重组融合或与其化学偶联。示例性的前体药物转化酶是羧肽酶 G2、 β -葡糖醛酸苷酶、青霉素-V-酰胺酶、青霉素-G-酰胺酶、 β -内酰胺酶、 β -葡糖苷酶、硝基还原酶和羧肽酶 A。

将治疗剂与蛋白质偶联、特别是与抗体偶联的技术是众所周知的。(参见例如, Arnon 等

35 人, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," 在 Monoclonal

Antibodies And Cancer Therapy(Reisfeld 等人编辑, Alan R. Liss, Inc., 1985)中; Hellstrom 等人, "Antibodies For Drug Delivery," 在 Controlled Drug Delivery(Robinson 等人编辑, Marcel Dekker, Inc., 第2版1987)中; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," 在 Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications(Pinchera 等人编辑, 1985)中; "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," 在 Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy(Baldwin 等人编辑, Academic Press, 1985)中; 以及 Thorpe 等人, 1982, Immunol. Rev. 62: 119-58。还参见例如, PCT 公开号 WO 89/12624。)

所述治疗剂可以以降低其活性的方式偶联, 除非将其从抗体切割(例如, 通过水解、通过抗体降解或通过切割剂)。用可切割的连接子将这种治疗剂附接至抗体, 所述可切割的连接子对表达 EGFR 的癌细胞的细胞内环境或肿瘤微环境中的切割敏感, 使得当偶联物处于该环境中时其从抗体切割(例如, 在核内体中或例如由于 pH 敏感性或蛋白酶敏感性而在溶酶体环境中、在小窝环境中或在肿瘤微环境中切割)。

典型地, ADC 包含治疗剂与抗 EGFR 抗体之间的连接子区。如上文所述, 典型地, 所述连接子在细胞内条件下或肿瘤微环境中是可切割的, 使得所述连接子的切割在细胞内环境(例如, 在溶酶体或核内体或小窝内)或肿瘤微环境中从抗体释放治疗剂。所述连接子可以是例如由细胞内肽酶或蛋白酶(包括溶酶体或核内体蛋白酶)切割的肽基连接子。典型地, 所述肽基连接子为至少两个氨基酸长或至少三个氨基酸长。切割剂可以包括组织蛋白酶 B 和 D 以及纤溶酶等等(参见例如, Dubowchik 和 Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123)。最典型的是可被表达 EGFR 的细胞中存在的酶或肿瘤微环境中可切割的肽基连接子。例如, 可以使用可以被在癌组织中高表达的硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B 可切割的肽基连接子(例如, 包含 Phe-Leu 或 Gly-Phe-Leu-Gly 肽的连接子)。其他此类连接子描述于例如美国专利号 6,214,345 中。在具体实施方案中, 可由细胞内蛋白酶可切割的肽基连接子包括 Val-Cit 连接子或 Phe-Lys 二肽(参见例如美国专利 6,214,345, 其描述了用 Val-Cit 连接子合成多柔比星)。使用细胞内蛋白水解释放治疗剂的一个优点是, 药剂典型地在偶联时衰减, 并且偶联物的血清稳定性通常很高。

所述可切割的连接子可以是 pH 敏感的, 即在某些 pH 值下对水解敏感。典型地, pH 敏感性连接子在酸性条件下可水解。例如, 可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定连接子(例如脘、半卡巴脘、胺苯硫脘、顺式-乌头酰胺、原酸酯、乙缩醛、缩酮等)。(参见例如, 美国专利号 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik 和 Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123; Neville 等人, 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661)。此类连接子在中性 pH 条件(如在血液中的那些)下相对稳定, 但是在低于 pH 5.5 或 5.0(溶酶体的近似 pH)时不稳定。在某些实施方案中, 可水解的连接子是硫醚连接子(如经由酰基脘键附接至治疗剂的硫醚)(参见例如, 美国专利号 5,622,929)。

其他连接子(例如二硫化物连接子)在还原条件下是可切割的。二硫化物连接子包括那些

可以使用 SATA (N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯)、SPDP (N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB (N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和 SMPT (N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB 和 SMPT 形成的那些。参见例如, Thorpe 等人, 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak 等人, Immunoconjugates: Antibody

5 Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C.W.Vogel 编辑, Oxford U. Press,1987。还参见美国专利号 4,880,935。)

所述连接子也可以是丙二酸酯连接子(Johnson 等人, 1995, Anticancer Res.15: 1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰基连接子(Lau 等人, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3 (10):1299-1304)或 3'-N-酰胺类似物(Lau 等人, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3 (10):1305-12)。所述连接子也可以是丙二酸酯连接子

10 (Johnson 等人,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰基连接子(Lau 等人, 1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304) 或 3'-N- 酰 胺 类 似 物 (Lau 等人,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。

所述连接子也可以是不可切割的连接子, 如直接附接至治疗剂(例如, 药物)的马来酰亚胺基-亚烷基-或马来酰亚胺-芳基连接子。通过抗体的降解释放活性药物-连接子。

15 典型地, 所述连接子对循环系统环境基本上不敏感, 这意味着当 ADC 存在于血浆中时, ADC 样品中不超过约 20%、典型地不超过约 15%、更典型地不超过约 10%、甚至更典型地不超过约 5%、不超过约 3%、或不超过约 1%的连接子被切割。

可以例如通过以下方式确定连接子是否对循环系统环境基本不敏感: 独立地用血浆培养 (a)ADC(“ADC 样品”)和(b)等摩尔量的未偶联的抗体或治疗剂(“对样品”)二者预定时间段(例如 2、4、8、16 或 24 小时), 然后对例如通过高效液相色谱法测得的 ADC 样品中存在的未偶联的抗体或治疗剂的量与对样品中存在的量进行比较。

20

所述抗 EGFR 抗体可以经由抗体的杂原子与连接子偶联。这些杂原子可以以其自然状态存在于抗体上, 或者可以被引入抗体中。在一些方面, 所述抗 EGFR 抗体将经由赖氨酸残基的氮原子与连接子偶联。在其他方面, 所述抗 EGFR 抗体将经由半胱氨酸残基的硫原子与连接子偶联。所述半胱氨酸残基可以是天然存在的或者是被工程化至抗体中的残基。经由赖氨酸和半胱氨酸残基将连接子和药物-连接子与抗体偶联的方法是本领域已知的。

25

示例性抗体-药物偶联物还包括基于喜树碱的抗体-药物偶联物(即, 药物组分是喜树碱药物)。喜树碱是已被证明具有抗癌活性的拓扑异构酶抑制剂。典型地, 基于喜树碱的抗体-药物偶联物包含在喜树碱药物与抗 EGFR 抗体之间的连接子。所述连接子可以是例如可切割的连接子(例如, 肽基连接子、碳水化合物连接子)或不可切割的连接子(例如, 通过抗体的降解而释放的连接子)。示例性喜树碱药物连接子的合成和结构描述于 PCT/US19/025968 中, 将其通过引用以其整体并入本文并用于所有目的。

30

其他示例性的抗体-药物偶联物包括美登木素生物碱抗体-药物偶联物(即, 药物组分是美登木素生物碱药物)和苯二氮卓类抗体-药物偶联物(即, 药物组分是苯二氮卓类(例如, 吡咯并 [1,4]苯二氮卓类二聚体(PBD 二聚体)、吲哚苯二氮卓类二聚体和噁唑烷苯二氮卓类二聚体))。

35

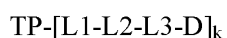
与抗EGFR抗体偶联的细胞毒性剂的有用类别包括例如抗微管蛋白剂、DNA小沟结合剂、DNA复制抑制剂、化疗增敏剂等。其他示例性的细胞毒性剂类别包括蒽环类、溴瑞他汀、喜树碱类、倍癌霉素、依托泊苷、美登木素生物碱和长春花生物碱。一些示例性的细胞毒性剂包括喜树碱类(例如,伊西替康、DXD等)、溴瑞他汀(例如,溴瑞他汀T、溴瑞他汀E、AFP、单甲基溴瑞他汀F(MMAF)、亲脂性单甲基溴瑞他汀F、单甲基溴瑞他汀E(MMAE))、DNA小沟结合剂(例如,烯二炔和莱克西菌素(lexitropsin))、倍癌霉素、紫杉醇(例如紫杉醇和多西紫杉醇)、长春花生物碱、烟酰胺磷酸核糖转移酶抑制剂(NAMPTi)、微管溶素M、多柔比星、吗啉代-多柔比星和环吗啉代-多柔比星。

所述细胞毒性剂可以是化学治疗剂,例如像多柔比星、紫杉醇、美法仑、长春花生物碱、甲氧蝶呤、丝裂霉素C或依托泊苷。所述药剂也可以是CC-1065类似物、卡奇霉素、美登素、尾海兔素10的类似物、根瘤菌素或岩沙海葵毒素。

所述细胞毒性剂也可以是溴瑞他汀。溴瑞他汀可以是溴瑞他汀E衍生物,例如在溴瑞他汀E与酮酸之间形成的酯。例如,溴瑞他汀E可以与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰基戊酸反应,从而分别产生AEB和AEVB。其他典型的溴瑞他汀包括溴瑞他汀T、AFP、MMAF和MMAE。多种溴瑞他汀的合成和结构描述在例如US 2005-0238649和US2006-0074008中。

本发明是一种新型的靶向EGFR抗体-药物偶联物(ADC),其主要由三个部分构成,即靶向EGFR的单克隆抗体、细胞毒性小分子药物(有效载荷)以及肿瘤微环境敏感的连接子(Linker),其中荷载药物为一种肿瘤更为敏感的拓扑异构酶(TOP)I新型抑制剂。本发明的抗EGFR抗体-药物偶联物进入体内后,可通过其抗体部分与肿瘤细胞上高表达的EGFR特异性结合,经抗原介导的药物内化后进入癌细胞。在肿瘤细胞内部,本发明的抗EGFR抗体-药物偶联物被溶酶体捕获转运过程中,在肿瘤内部特殊的环境下,抗EGFR抗体-药物偶联物的连接子裂解而高效释放有效载荷,荷载小分子药物发挥细胞毒作用进而可杀死癌细胞。部分有效载荷因具有较高亲脂性,可发挥“旁观者效应”,进入到癌细胞周围细胞中发挥作用。这种抗癌作用机制对抗原低表达或异质性肿瘤细胞也十分有效。

在一些方面,本公开提供了一种抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物,其中所述抗体-药物偶联物具有式(I)的结构:



(I)

其中:

TP为选择性结合或识别EGFR的靶向部分;

L1为延伸单元,其连接TP和L2,其中TP通过活性基团(例如巯基或氨基等)与L1连接,优选地其中L1偶联至TP中打开的链间半胱氨酸巯基-SH和/或定点突变的半胱氨酸巯基-SH;

L2为任选氨基酸残基或2-10个氨基酸残基组成的短肽;

L3为间隔元件;

D为生物活性分子;

k 代表 0.1 和 10.0 之间的任意数值。

提及抗体-药物偶联物，下标 k 表示药物载荷量，并且根据上下文，可以表示衔接至单独抗体分子的药物-连接子分子的分子数量，因此是整数值；或者可以表示平均药物载荷量，因此可以是整数或非整数值。平均药物载荷量表示群体中每个抗体的药物-连接子分子的平均数量。通常，但并非总是，当提及抗体，例如单克隆抗体时，我们是指抗体分子群体。在包含抗体-药物偶联物分子群体的组合物中，平均药物载荷量是重要的质量属性，因为其决定了可递送至靶细胞的药物量。组合物中未偶联的抗体分子的百分比包含在平均药物载荷值中。

在本发明的优选方面，当提及包含抗体-药物偶联物化合物群体的组合物时，平均药物载荷是从 1 至约 16、优选约 2 至约 14、更优选约 2 至约 10。

对于 MMAE 和喜树碱 ADC，如本文例示的那些，优选的平均药物载荷是约 2、4 或 8，并且特别优选的平均药物载荷是约 8。在一个实施方案中，MMAE ADC 的优选平均药物载荷是 2 或 4。在一个实施方案中，喜树碱 ADC 的优选平均药物载荷是 4 或 8。在示例性实施方案中，所述药物-连接子与还原的链间二硫化物的半胱氨酸残基偶联。在一些方面，抗体-药物偶联物化合物群体中单独抗体分子的实际药物载荷是从 1 至 10(或从 6 至 10 或从 6 至 8)，其中主要的药物载荷是 8。

在式(I)的一些实施方案中，所述 TP 为抗体或其抗原结合片段。

在式(I)的一些实施方案中，所述抗原结合片段选自全长免疫球蛋白、单链 Fv (scFv) 片段、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂、Fv 片段、二硫键稳定的 Fv 片段(dsFv)、(dsFv)₂、Fv-Fc 融合体、scFv-Fc 融合体、scFv-Fv 融合体、双抗体、三抗体、四抗体或它们的任何组合。

在式(I)的一些实施方案中，所述 TP 为人源化抗体或其抗原结合片段。

在式(I)的一些实施方案中，所述 TP 包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，所述重链可变区(VH)包含 SEQ ID NO:7 所包含的重链互补决定区 1(HCDR1)、HCDR2 和 HCDR3，且所述轻链可变区(VL)包含 SEQ ID NO:8 所包含的轻链互补决定区 1(LCDR1)、LCDR2 和 LCDR3。

在式(I)的一些实施方案中，所述 HCDR1 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1，所述 HCDR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2，所述 HCDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:3，且所述 LCDR1 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4，所述 LCDR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5 且所述 LCDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6。

在式(I)的一些实施方案中，所述 TP 包含人 IgG 的 Fc 序列。

在式(I)的一些实施方案中，所述 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

在式(I)的一些实施方案中，所述 TP 包含重链可变区(VH)，且所述重链可变区(VH)的氨基酸序列与 SEQ ID NO:7 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100% 的同一性。

在式(I)的一些实施方案中，所述 TP 包含轻链可变区(VL)，且所述轻链可变区(VL)的氨基酸序列与 SEQ ID NO:8 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100%

的同一性。

在式(I)的一些实施方案中,所述 TP 包含重链(HC),且所述重链(HC)的氨基酸序列与 SEQ ID NO:9 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99%或 100%的同一性。

在式(I)的一些实施方案中,所述 TP 包含轻链(LC),且所述轻链(LC)的氨基酸序列与 SEQ ID NO:10 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99%或 100%的同一性。

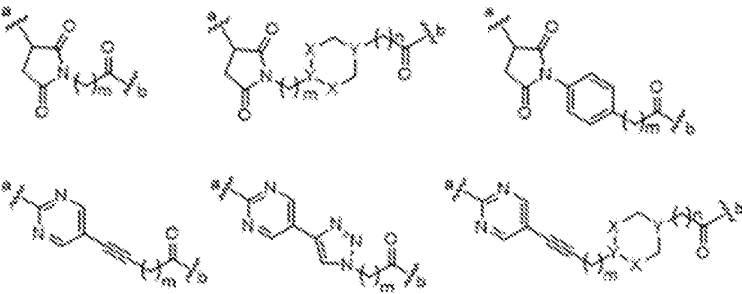
在式(I)的一些实施方案中,所述 TP 是多特异性抗体。

在式(I)的一些实施方案中,所述 TP 是无岩藻糖基化抗体。

在式(I)的一些实施方案中,所述 Fc 区包含 C-末端赖氨酸。

在式(I)的一些实施方案中,所述 Fc 区包含 C-末端赖氨酸的缺失。

在式(I)的一些实施方案中,所述 L1 选自



其中 L1 在 a 位通过 S 原子与 TP 连接且在 b 位与 L2 连接, m 为 1 和 10 之间的任意整数, n 为 1 和 10 之间的任意整数,且 X 和 Y 各自独立地为 C、O、S 或 N。

在式(I)的一些实施方案中,所述 L1 为



其中 L1 在 a 位通过 S 原子与 TP 连接且在 b 位与 L2 连接, m 选自 1、2、3、4、5。

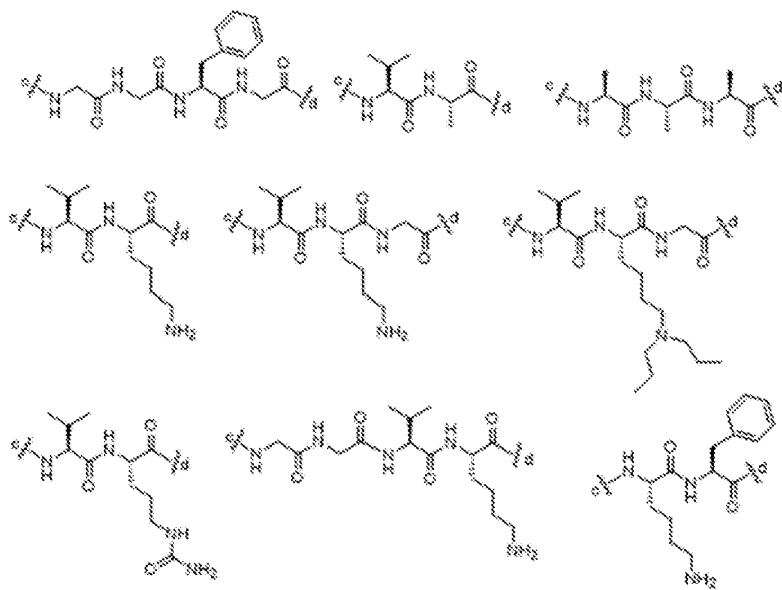
在式(I)的一些实施方案中,所述 L1 为



其中 L1 在 a 位通过 S 原子与 TP 连接且在 b 位与 L2 连接。

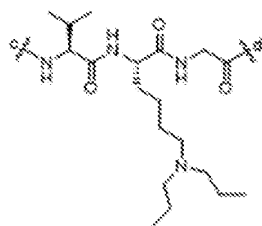
在一些实施方案中, L1 在 a 位与 TP 的半胱氨酸(更具体地,半胱氨酸的巯基)连接。

在式(I)的一些实施方案中,所述 L2 选自



其中 L2 在 c 位与 L1 连接且在 d 位与 L3 连接。

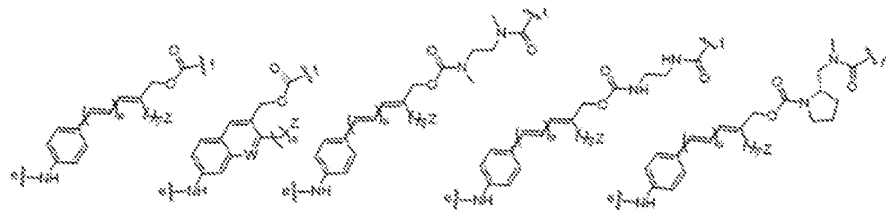
在式(I)的一些实施方案中，所述 L2 为



5

其中 L2 在 c 位与 L1 连接且在 d 位与 L3 连接。

在式(I)的一些实施方案中，所述 L3 为单键或选自以下的基团：



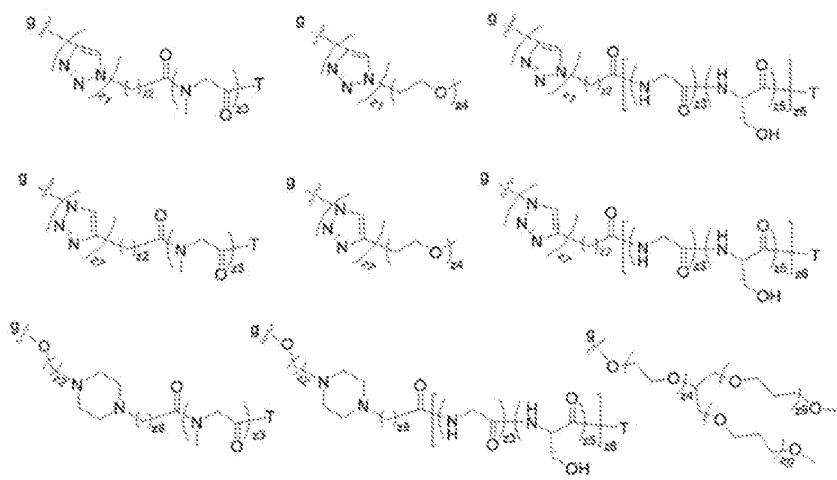
其中 L3 在 e 位与 L2 连接且在 f 位与 D 连接，

10 p 和 q 各自独立地为 0 和 10 之间的整数，

W 为 C、O、S 或 N，

Z 选自氢、卤素、C₁-C₂₀ 烷烃、C₁-C₂₀ 卤代烷烃、氰基、磺酸、羧酸、C₁-C₂₀ 烷氧基、C₂-C₁₀ 不饱和烷烃、天然氨基酸、非天然氨基酸以及上述氨基酸组成的短肽。

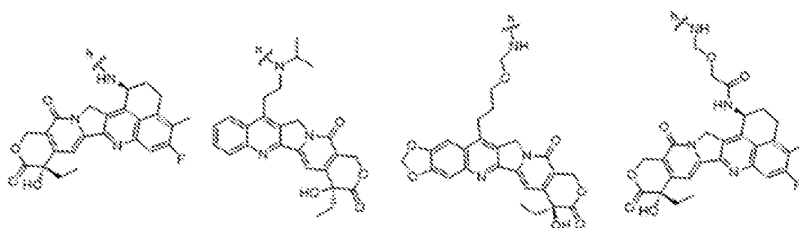
在式(I)的一些实施方案中，Z 选自：



其中 Z 在 g 位与 L3 的其余部分连接, z1-z9 各自独立地为 0 和 10 之间的整数, 且 T 为 NH₂ 或 OH。

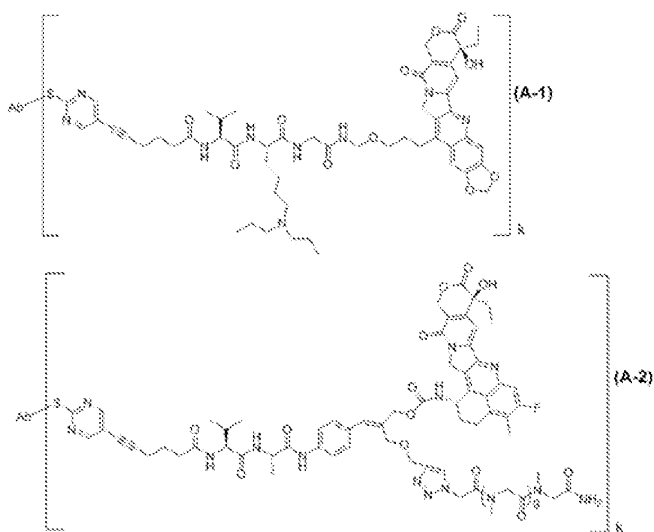
在式(I)的一些实施方案中, 所述 D 为细胞毒剂。

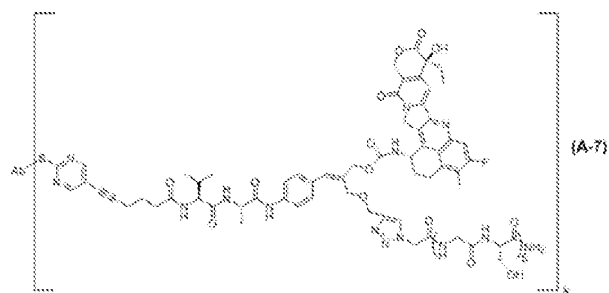
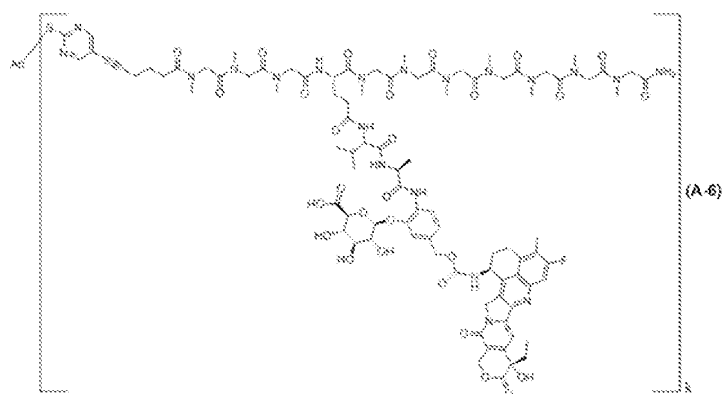
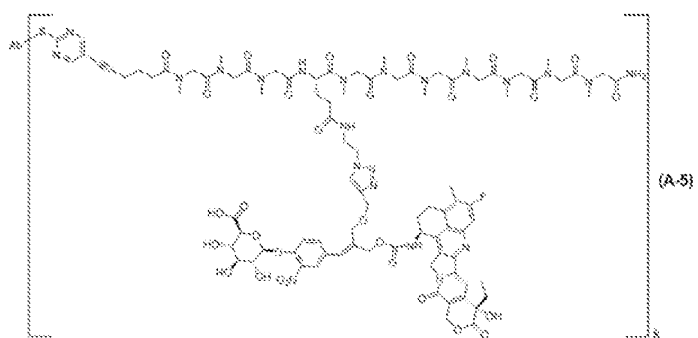
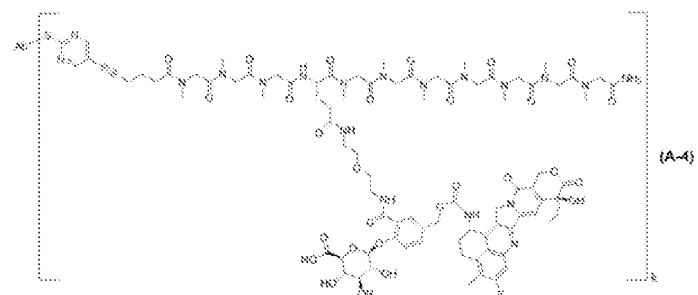
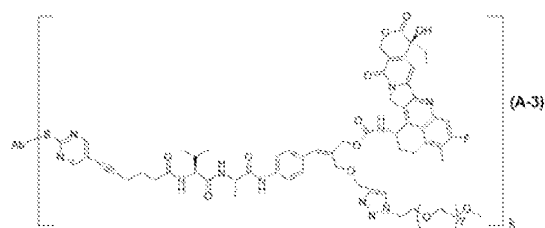
5 在式(I)的一些实施方案中, 所述 D 选自



其中 D 在 h 位与 L3 连接。

在式(I)的一些实施方案中, 所述抗体-药物偶联物选自:





其中 Ab 代表如前述实施方案中所定义的抗体或其抗原结合片段。

在式(I)的一些实施方案中, k 为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0 或其任意两者之间的范围。在进一步实施方案中, k 为 4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0 或其任意两者之间的范围。在进一步实施方案中, k 为 4.0、6.0 或 8.0。

3. 使用方法

本发明的抗 EGFR 抗体-药物偶联物可以用于治疗癌症。一些此类癌症显示出在蛋白质(例如, 通过使用所例示的抗体之一的免疫测定)或 mRNA 水平上测量的可检测的 EGFR 水平。一些此类癌症显示出相对于相同类型的非癌性组织(优选来自同一患者)的升高的 EGFR 水平。任选地, 在进行治疗之前测量癌症中 EGFR 的水平。

与 EGFR 表达相关并且适于治疗的癌症的实例包括表皮癌、结肠癌、直肠癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗表皮癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗结肠癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗直肠癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗头颈癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗肺癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗奥希替尼耐药的肺癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗非小细胞肺癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗小细胞肺癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗卵巢癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗宫颈癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗膀胱癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗食管癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗乳腺癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗肾癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗前列腺癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗胃癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗 Enhertu 耐药的胃癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗胰腺癌。在一些实施方案中, 本发明的抗体或抗体-药物偶联物用于治疗脑胶质

瘤。所述治疗可以应用于患有这些种类的原发性或转移性肿瘤的患者。所述治疗也可以应用于常规治疗难治的患者或在对此类治疗有反应后已经复发的患者。

本发明的抗体-药物偶联物(ADC)还可以与其它 TKI 抑制剂或 PD1/PDL1 抑制剂联合用药可以用于治疗各种疾病或病症,例如其特征在于 EGFR 过表达的疾病或病症。典型的疾病或
5 过度增殖性病症包括良性或恶性肿瘤,包括表皮癌、结肠癌、直肠癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。在一个实施方案中,所述肿瘤或癌症为 KRAS 基因突变和/或 BRAF 基因突变的肿瘤或癌症。在进一步实施方案中,所述 KRAS 基因突变和/或 BRAF 基因突变的肿瘤或癌症为 KRAS 基因突变和/或 BRAF 基因突变的结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌。在一个实施方案中,所述 PD1
10 抑制剂为抗 PD1 抗体。在进一步实施方案中,所述抗 PD1 抗体为斯鲁利单抗(serplulimab)。

将本发明的抗体-药物偶联物以有效方案施用,所述有效方案意味着可延迟发作、降低严重性、抑制进一步恶化和/或改善癌症的至少一种体征或症状的剂量、施用途径和施用频率。如果患者已经患有癌症,则所述方案可以称为治疗有效方案。如果相对于一般群体,患者患上癌症的风险升高,但尚未经历症状,则所述方案可以称为预防有效方案。在一些情况下,
15 相对于同一患者中的历史对照或过去的经验,可以在单独患者中观察到治疗或预防功效。在其他情况下,相对于未治疗的患者的对照群体,可以证明在临床前或临床试验中的治疗或预防功效。

所述抗体-药物偶联物的示例性剂量可以是 1 μ g/kg—15 mg/kg(例如 0.1 mg/kg -20mg/kg),例如 1mg/kg 至 7.5mg/kg、或 2mg/kg 至 7.5mg/kg 或 3mg/kg 至 7.5mg/kg 受试者体重、或
20 0.1-20mg/kg 体重或 0.5-5mg/kg 体重(例如, 0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg 或 10mg/kg)或者作为固定剂量的 10-1500mg 或 200-1500mg。在一些方法中,向所述患者施用至少 1mg/kg、至少 1.5mg/kg、至少 2mg/kg、至少 3mg/kg、至少 8 mg/kg、至少 10mg/kg 的剂量,每周、每三周或更长时间施用一次。所述剂量取决于施用的频率、患者的状况和对先前治疗的反应(如果有的话)、治疗是预防性的
25 还是治疗性的以及所述病症是急性的还是慢性的等因素。

施用可以是肠胃外、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、局部、鼻内或肌内。施用也可以直接定位至肿瘤中。优选通过静脉内或皮下施用而施用至体循环中。静脉内施用可以例如通过输注一段时间(如 30-90min)或通过单次推注注射进行。

施用频率取决于所述偶联物在循环中的半衰期、患者的状况以及施用途径等因素。所述
30 频率可以是每天一次、每周一次、每月一次、每季度一次或响应于患者的状况变化或正在治疗的癌症的进展而以不规律的间隔。在连续的治疗过程中,静脉内施用的示例性频率是在每周两次与每季度一次之间,但也可以以较高或较低频率给药。在连续的治疗过程中,静脉内施用的其他示例性频率是每周一次或每四周三次之间,但也可以以较高或较低频率给药。对于皮下施用,示例性的给药频率是每天一次至每月一次,但也可以以较高或较低频率给药。

35 施用剂量的数量取决于癌症的性质(例如,呈现急性症状还是慢性症状)以及病症对治疗

的反应。对于急性病症或慢性病症的急性加重，在 1 与 10 个剂量之间通常是足够的。有时，单次推注剂量(任选地以分开形式)对于急性病症或慢性病症的急性加重是足够的。对于急性病症的复发或急性加重，可以反复治疗。对于慢性病症，抗体可以以规律的间隔施用，例如，每周一次、每两周一次、每月一次、每季度一次、每六个月一次，持续至少 1、5 或 10 年或者患者的寿命。

用于肠胃外施用的药物组合物优选地是无菌的且基本上等渗的，并且是在 GMP 条件下制造的。药物组合物可以以单位剂型(即用于单次施用的剂量)提供。可以使用一种或多种生理上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂来配制药物组合物。所述配制取决于选择的施途径。对于注射，可以将抗体配制在水溶液中，优选地在生理上相容的缓冲液如汉克氏溶液、林格氏溶液或生理盐水或乙酸盐缓冲液中(以减少注射部位的不适)。所述溶液可以含有配制药剂，如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地，在使用之前，抗体可以是冻干形式以供使用合适的媒介物(例如，无菌无热原水)构造。液体配制品中抗体的浓度可以是例如 1-100mg/ml，如 10mg/ml。

用本发明的抗体-药物偶联物的治疗可以与免疫疗法、化学疗法、放射、干细胞治疗、外科手术、其他对正在治疗的病症有效的治疗组合。可与如本文所述的针对 EGFR 的抗体-药物偶联物一起施用的其他药剂的有用类别包括例如针对癌细胞上表达的其他受体的抗体(例如抗 PDL1 抗体)、免疫治疗剂(例如，抗 PD1 抗体)、抗微管蛋白剂(例如，奥瑞他汀)、DNA 小沟结合剂、DNA 复制抑制剂、烷基化剂(例如，铂络合物，如顺铂、单(铂)、双(铂)和三核铂络合物和卡铂)、蒽环类、抗生素、抗叶酸、抗代谢物、化学疗法增敏剂、倍癌霉素、依托泊苷、氟化嘧啶、离子载体、莱克西菌素、亚硝基脲、顺氯氨铂、预形成化合物、嘌呤抗代谢物、嘌呤霉素、放射增敏剂、类固醇、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。

与相同的治疗(例如，化学疗法)但没有所述抗体-药物偶联物相比，用抗体-药物偶联物的治疗任选地与上述任何其他药剂或方案的组合可以使患有肿瘤(例如，表皮癌、结肠癌、直肠癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤)的患者(尤其是在复发性或难治性肿瘤的情况下)的中值无进展存活期或总存活期时间增加至少 30%或 40%，但优选 50%、60%至 70%或甚至 100%或更长时间。另外地或可替代地，与相同的治疗(例如，化学疗法)但没有所述抗体-药物偶联物相比，包括所述抗体-药物偶联物的治疗(例如，标准化学疗法)可以使患有肿瘤的患者完全反应率、部分反应率或客观反应率(完全+部分)增加至少 30%或 40%，但优选 50%、60%至 70%或甚至 100%。

4. 药物配制品

尽管可以单独使用(例如施用)本文所述的抗体-药物偶联物，但是通常优选将其以组合物或配制品形式存在。

在一个方面，所述组合物是药物组合物(例如，配制品、制剂、药剂)，其包含本文所述

的抗体-药物偶联物和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在一个方面，所述组合物是药物组合物，其包含至少一种本文所述的抗体-药物偶联物以及本领域技术人员众所周知的一种或多种其他药学上可接受的成分，所述成分包括但不限于药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂、佐剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂(例如湿润剂)、掩蔽剂、着色剂、调味剂和甜味剂。

在一个方面，所述组合物进一步包含其他活性剂，例如其他治疗剂或预防剂。

合适的载体、稀释剂、赋形剂等可以在标准药物文献中找到。参见，例如，Handbook of Pharmaceutical Additives, 第2版(M.Ash和I.Ash编辑), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, 纽约, 美国, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第20版, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; 和 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第2版, 1994。

本发明的另一个方面涉及制备药物组合物的方法,其包括将至少一种如本文定义的[11C]-放射性标记的抗体-药物偶联物或抗体-药物偶联物样的化合物与本领域技术人员众所周知的一种或多种其他药学上可接受的成分(例如载体、稀释剂、赋形剂等)混合。如果配制为离散的单位(例如,片剂等),则每个单位含有预定量(剂量)的活性化合物。

如本文所用,术语“药学上可接受的”涉及化合物、成分、材料、组合物、剂型等,其在合理的医学判断范围内适于与讨论的受试者(例如人)的组织接触,没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的获益/风险比相当。在与配制品的其他成分相容的意义上,每种载体、稀释剂、赋形剂等也必须是“可接受的”。

可以通过药学领域中众所周知的任何方法来制备配制品。这样的方法包括使活性化合物与构成一种或多种辅助成分的载体缔合的步骤。通常,通过将活性化合物与载体(例如液体载体、细分的固体载体等)均匀且紧密地缔合在一起,然后根据需要使产品成型来制备配制品。

所述配制品可以被制备为提供快速或缓慢释放;立即、延迟、定时或持续释放;或其组合。

适用于肠胃外施用(例如通过注射)的配制品包括水性或非水性、等渗、无热原的无菌液体(例如溶液、悬浮液),其中活性成分被溶解、悬浮或以其他方式提供(例如,在脂质体或其他微粒物中)。此类液体可另外含有其他药学上可接受的成分,例如抗氧化剂、缓冲液、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、助悬剂、增稠剂和溶质,这些可使配制品与预期接受者的血液(或其他相关体液)等渗。赋形剂的实例包括例如水、醇、多元醇、甘油、植物油等。用于此类配制品的合适的等渗载体的实例包括氯化钠注射液、林格氏溶液或乳酸林格氏注射液。通常,液体中活性成分的浓度为从约1ng/ml至约10μg/ml,例如从约10ng/ml至约1μg/ml。所述配制品可以存在于单位剂量或多剂量密封的容器(例如安瓿和小瓶)中,并且可以在冷冻干燥(冻干)条件下储存,仅需要在使用前(即刻)添加无菌液体载体(例如水)用于注射。临时注射溶液和悬浮液可以由无菌粉末、颗粒和片剂制备。

5. 制品和试剂盒

在另一个方面，提供了一种制品或试剂盒，所述制品或试剂盒包含本文所述的抗 EGFR 抗体-药物缀合物。所述制品或试剂盒还可以包含本文所述的抗 EGFR 抗体-药物缀合物在本发明的方法中的使用说明书。因此，在某些实施方案中，所述制品或试剂盒包含本文所述的抗 EGFR 抗体-药物缀合物在治疗受试者的癌症(例如，表皮癌、结肠癌、直肠癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤)的方法中的使用说明书，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的抗 EGFR 抗体-药物缀合物。在一些实施方案中，所述受试者是人。

所述制品或试剂盒可以进一步包含容器。合适的容器包括例如瓶、小瓶(例如双室小瓶)、注射器(如单室或双室注射器)和试管。在一些实施方案中，所述容器是小瓶。所述容器可以用各种材料(如玻璃或塑料)制成。所述容器容纳配制品。

所述制品或试剂盒还可以包含在容器上的或与所述容器相关联的标签或包装插页，其可指示关于重建和/或使用配制品的指导说明。所述标签或包装插页可以进一步指示所述配制品可用于或旨在用于皮下、静脉内(例如，静脉内输注)或其他施用方式以治疗受试者中的癌症(例如，表皮癌、结肠癌、直肠癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤)。容纳配制品的容器可以是一次性小瓶或多次使用的小瓶，其允许重复施用重构的配制品。所述制品或试剂盒还可以包含含有合适的稀释剂的第二容器。所述制品或试剂盒还可以包含从商业、治疗 and 用户角度来看希望的其他材料，包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射筒和印有使用说明书的包装插页。

本文的制品或试剂盒还任选地包含含有第二药剂的容器，其中所述抗 EGFR 抗体-药物缀合物是第一药剂，并且所述制品或试剂盒还包含用于以有效量的所述第二药剂治疗受试者的在标签或包装插页上的说明书。在一些实施方案中，所述第二药剂用于消除或降低一种或多种不良事件的严重性。

在一些实施方案中，所述抗 EGFR 抗体-药物缀合物作为冻干粉末存在于所述容器中。在一些实施方案中，所述冻干粉末在气封的容器(如小瓶、安瓿或小袋)中，所述容器指示活性剂的量。在通过注射施用所述药物的情况下，注射用无菌水或生理盐水的安瓿可以例如任选地作为所述试剂盒的一部分而提供，使得成分可以在施用之前混合。如果需要的话，此类试剂盒还可以包括一种或多种各种常规药物组分，例如像具有一种或多种药学上可接受的载体的容器、另外的容器等，这对于本领域技术人员来说是清楚的。所述试剂盒中还可以包含作为插页或作为标签的印刷说明书，其指示待施用的组分的量、施用指南和/或混合组分的指导。

30 序列表

SEQ ID NO	基因名称	氨基酸序列
1.	MAB07 重链 CDR1	NYGVH
2.	MAB07 重链 CDR2	VIWSGGNTDYGNEFTS
3.	MAB07 重	ALDYDYEFAY

	链 CDR3	
4.	MAB07 轻 链 CDR1	RASQSIGTNIH
5.	MAB07 轻 链 CDR2	YASESIS
6.	MAB07 轻 链 CDR3	QQNNNWPTS
7.	MAB07 重 链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWLGVI WSGGNTDYGNEFTSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALDYYD YEFAYWGQGTMTVSS
8.	MAB07 轻 链可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLIKYASESIS GIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQNNNWPTSFGGGTKVEIKRTV
9.	MAB07 重 链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWLGVI WSGGNTDYGNEFTSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALDYYD YEFAYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10.	MAB07 轻 链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLIKYASESIS GIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQNNNWPTSFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11.	Cetuximab 重链	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIW SGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGLTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12.	Cetuximab 轻链	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLIKYASESIS GIPSRFSGSGGTDFLTLSINSEVEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13.	人 EGFR ECD	LEEKKVCQGTSNKLTLQGTGFEDHFLSLQRMFNNECVVLGNLEITYVQRNYDL SFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKT GLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQN HLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQCSGRCRGKSPSDCCHN QCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKY SFGATCVKKCPRNYVVDHGSVCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKV CNGIGIGEFKDSLSINATNIHKFNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPLDPQEL

		DILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITS LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKA TGQVCHALCSPEGWCWGEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENS ECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTL VWKYADAGHVCHLCHPNCTYTGCTGPGLEGCPNTPKIPS
14.	食蟹猴 EGFR ECD	LEEKKVCQGTSNKLTLQGTGFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDL SFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNQLIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKT GLKELPMRNLQEILHGA VRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSEFLSNMSMDFQNH LGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRGRGKSPSDCCHNQ CAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSF GATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVC NGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELD ILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITS LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQKTKIISNRGENSCKAT GQVCHALCSPEGWCWGEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCNVLEGEPRFVENSE CIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTL VWKYADAGHVCHLCHPNCTYTGCTGPGLEGCARNGPKIPS
15.	大鼠 EGFR ECD	LEEKKVCQGTSNRLTLQGTGFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDL SFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNQLIIRGNALYENTYALAVLSNYGTNKT GLRELPMRNLQEILIGAVRFSNNPILCNMETIQWRDIVQDVFLSNMSMDVQRH LTGCPKCDPSCPNGSCWGRGEENCQKLTKIICAQQCSRRRCRGRSPSDCCHNQC AAGCTGPRESCLVCHRFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFG ATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGPDYVEVEDGVSKCKKCDGPCRKVCN GIGIGEFKDTLSINATNIKHFKYCTAISGDLHILPVAFKGDSFTRTPPLDPRELEI LKTVKEITGFLLIQAWPENWTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVGLNITS LGLRSLKEISDGDVIISGNRNL CYANTINWKKLFGTPNQKTKIMNNRAEKDCKA TNHVCNPLCSSEGCWGPEPTDCVSCQNVSRGRECVDKCNILEGEPRFVENSE CIQCHPECLPQTMNITCTGRGPDNCIKCAHYVDGPHCVKTCPSGIMGENNTLV WKFADANNVCHLCHANCTYGCAGPGLKGCQQPEGPKIPS
16.	小鼠 EGFR ECD	LEEKKVCQGTSNRLTLQGTGFEDHFLSLQRMYNCEVVLGNLEITYVQRNYDL SFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNQLIIRGNALYENTYALAILSNYGTNRTG LRELPMRNLQEILIGAVRFSNNPILCNMDTIQWRDIVQNVFMSNMSMDLQSH SSCPKCDPSCPNGSCWGGGEENCQKLTKIICAQQCSHRCRGRSPSDCCHNQCA AGCTGPRESCLVCQKFQDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFG ATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGPDYVEVEDGIRKCKKCDGPCRKVCNG IGIGEFKDTLSINATNIKHFKYCTAISGDLHILPVAFKGDSFTRTPPLDPRELEI KTVKEITGFLLIQAWPDNWDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVGLNITS LGLRSLKEISDGDVIISGNRNL CYANTINWKKLFGTPNQKTKIMNNRAEKDCKAV NHVCNPLCSSEGCWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVKCNILEGEPRFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGIMGENNTLV KYADANNVCHLCHANCTYGCAGPGLQGCEVWPSGPKIPS
17.	斯鲁利单抗 (serplulima b)重链	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS AASGFTFSNYGMSWIRQAPGKGLEWVSTIS GGGSNIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSYYYGID FWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV

		DKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
18.	斯鲁利单抗 (serplulima b)轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWAS TRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTIPWTFGGGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

实施例

以下实施例仅是对当前公开的主题的说明，不应以任何方式视为限制。

试剂与材料：

二甲基亚砷等有机溶剂购自 Spectrum Chemical Mfg Corp，TCEP-HCl 试剂购自 Thermo

5 Fisher 等。

IgG1 为人 IgG1，κ 同种型对照，其购自北京义翘神州科技有限公司。

pH 值敏感性 Zenon™ pHrodo™ iFL IgG 标记试剂购自 Thermo Fisher。

CellTiter-Glo 溶液购自 Promega 公司。

细胞系 A549、NCI-H1993 购自 ATCC，细胞系 SW480 购自中国科学院细胞库，EBC-1

10 细胞系购自 JCRB 细胞库，各种 PDX 移植瘤由上海立迪生物技术股份有限公司建立和维持。

制备方案：

以下实施例中记载的化合物的结构通过核磁共振氢谱 (¹HNMR) 或液质联用质谱 (LC-MS) 来确定。

15 核磁共振氢谱 (¹HNMR) 的测定仪器使用 Bruker 400MHz 核磁共振仪；测定溶剂为氘代甲醇 (CD₃OD)、氘代氯仿 (CDCl₃) 或六氘代二甲亚砷 (DMSO-d₆)；内标物质为四甲基硅烷 (TMS)。

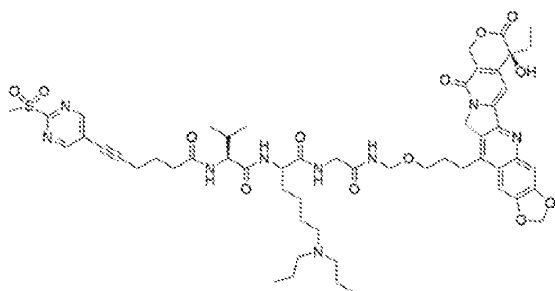
实施例中使用的核磁共振 (NMR) 图谱中的缩写示于以下。

s:单峰 (singlet); d: 二重峰 (doublet); t: 三重峰 (triplet); q: 四重峰 (quartet); dd:
20 双二重峰 (double doublet); qd: 四二重峰 (quarter doublet); ddd: 双双二重峰 (double doubledoublet); ddt: 双双三重峰 (double doubletriplet); dddd: 双双双峰 (double doubledouble doublet); m: 多重峰 (multiplet); br: 宽峰 (broad); J: 偶合常数; Hz: 赫兹; DMSO-d₆: 氘代二甲亚砷。Δ 值用 ppm 值表示。

液质联用质谱 (LC-MS) 的检测使用 Agilent (ESI) 质谱仪，型号为 Agilent 6120B。

25

实施例 1. 连接子-毒素 (LP62) 的制备

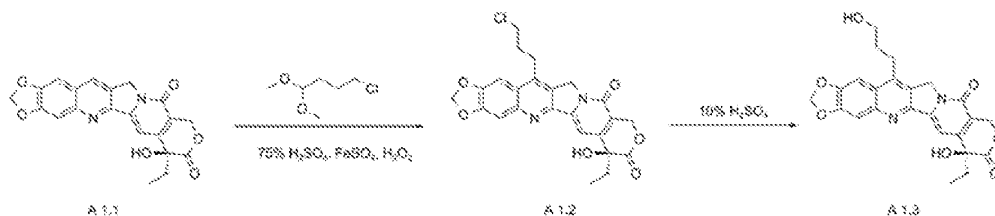


LP62

实施例 1.1: (S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4',6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.3)的合成

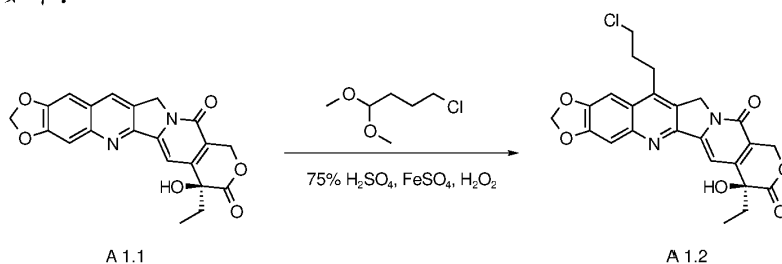
5

化合物 A1.3 的合成路线如下方案 1 所示:



方案 1: 活性化合物 A1.3 的制备

具体步骤如下:



10

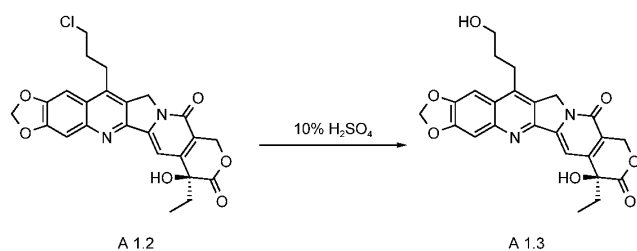
步骤 1: 在冰浴条件下, 向(S)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4',6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮(A1.1, 500mg)的 75%硫酸溶液(5 mL)中加入七水合硫酸亚铁(570 mg 七水合硫酸亚铁溶于 1mL 水中)和 4,4-二甲氧基氯丁烷(3.89 g)。反应液搅拌三分钟后继续在冰浴条件下滴加双氧水(29%, 2.5 mL)。滴加完毕后反应液在 0℃下搅拌反应 5 分钟后升至室温, 并搅拌反应 3 小时。反应液加入水(50 mL)稀释, 并使用乙酸乙酯(80 mL×2)萃取反应液。有机相用饱和食盐水洗涤后, 使用无水硫酸钠干燥有机相。减压蒸发有机相后浓缩得到粗产品, 粗产品使用装备有 C18 柱的制备型液相色谱纯化粗产品(乙腈/0.05% 甲酸的水溶液; 5%-60%), 最终得到目标化合物(A1.2, 黄色固体, 400mg, 收率: 67%)

15

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 468.9:

20

^1H NMR (400 Hz, DMSO- d_6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, $J=6.7$ Hz, 4H), 0.88 (t, $J=7.2$ Hz, 3H)。



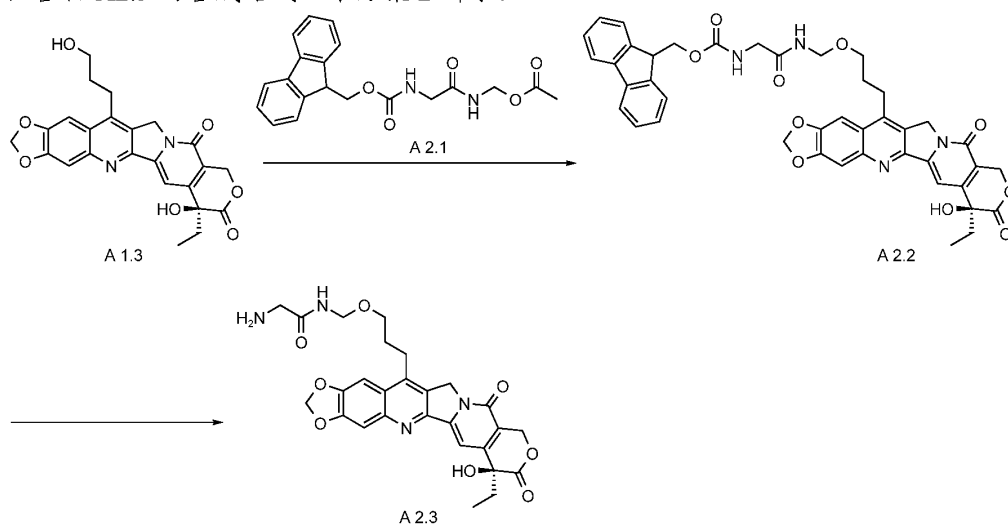
步骤 2: 将(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-氯丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4',6,7]吡啶啉并[1,2-b]喹啉-8, 11(7H)-二酮(A1.2, 100 mg, 0.213 mmol)溶于 10%硫酸(5 mL)溶液中,反应液在 110℃下反应 48 小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠(30 mL)溶液, 5 用二氯甲烷(10 mL×5)萃取, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩得到粗产品。粗产品经高效液相制备纯化(乙腈/水, 含 0.05%甲酸)得到(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10, 13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4',6,7]吡啶啉并[1,2-b]喹啉-8, 11(7H)-二酮(A1.3, 1.78 mg)。

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 451.0:

10 ¹HNMR (400 Hz, DMSO-*d*₆) δ7.63 (s,1H), 7.50 (s,1H),7.24 (s, 1H), 6.48 (s,1H), 6.28 (s, 2H), 5.47-5.37 (m, 2H), 5.32-5.19 (m, 2H), 3.51-3.46 (m, 2H), 3.17-3.13 (m, 2H), 1.92-1.76 (m, 4H), 0.90-0.84 (m, 3H)。

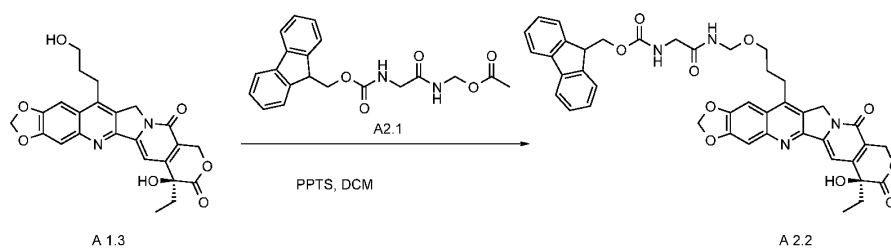
实施例 1.2: 化合物 A2.3 的合成

15 化合物 A2.3 的合成路线如下方案 2 所示:



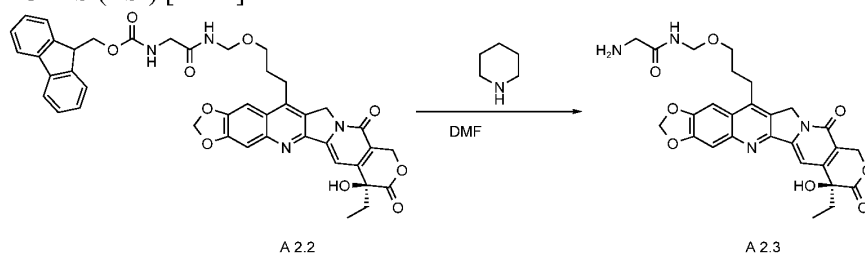
方案 2: 化合物 A2.3 的合成路线

合成化合物 A2.3 的具体步骤如下:



步骤 1: 使化合物 A 2.1 (368 mg)、化合物 A 1.3 (440 mg) 和对甲苯磺酸吡啶盐(PPTS, 25mg) 在二氯甲烷(20 mL)中 40℃回流 20 小时, 然后用碳酸氢钠水溶液和盐酸水溶液分别洗涤, 减压去除有机溶剂, 得到粗产品。粗产品经过柱层析(二氯甲烷: 甲醇=10: 1)分离纯化得到目标化合物 A 2.2(240 mg)

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 747:



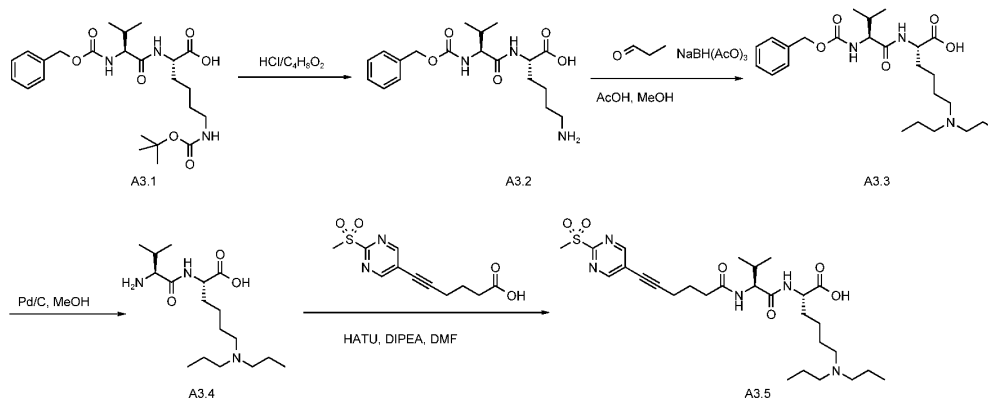
步骤 2: 将 A 2.2 (240 mg) 溶于 DMF (5 mL) 中, 加入哌啶(1 mL), 在室温搅拌 20 分钟, 加压去除低沸点组分, 残留物直接用于下一步合成。少量粗产物经过反向色谱(乙腈/0.05% FA 的水溶液: 5%-50%)纯化, 得到目标化合物 A 2.3。

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 525:

^1H NMR (400 Hz, DMSO- d_6) δ 9.13 (t, 1H), 8.04 (br, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.65 (d, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.87 (m, 4H), 0.88 (t, 3H)。

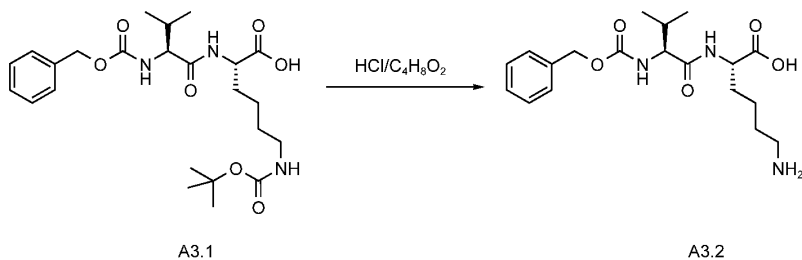
实施例 1.3: 化合物 A 3.5 的合成

化合物 A 3.5 的合成路线如下方案 3 所示:



方案 3: 化合物 A 3.5 的合成路线

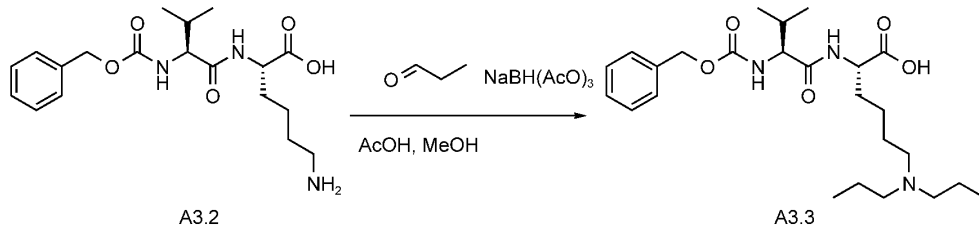
化合物 A3.5 的具体合成步骤如下：



步骤 1：向化合物 A3.1(10.0g)加入氯化氢-二氧六环(dioxane, C₄H₈O₂)(100mL)溶液，在室温下反应 2 小时。反应液减压浓缩，得到白色固体目标化合物 A3.2 (8.0 g)。

5 LC-MS (ESI) [M+H]⁺: 380.1

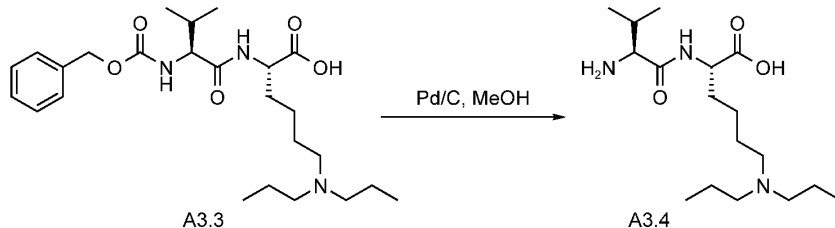
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.40-7.30 (m, 5H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.08-4.99 (m, 2H), 4.23-4.11 (m, 1H), 3.94-3.88 (m, 1H), 2.78-2.73 (m, 2H), 2.03-1.94 (m, 1H), 1.77-1.51 (m, 4H), 1.44-1.31 (m, 2H), 0.87 (dd, *J* = 17.3, 6.6 Hz, 6H)。



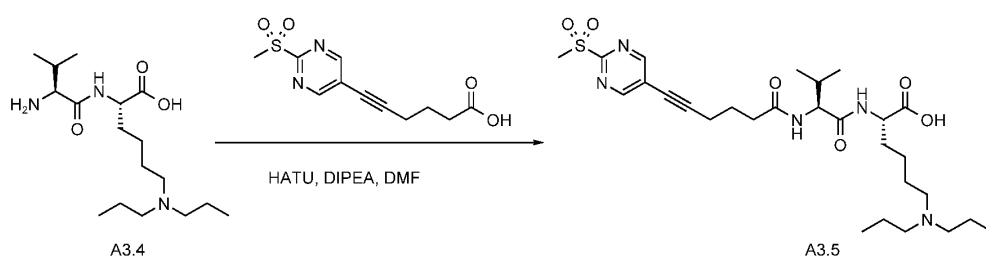
10 步骤 2：将化合物 A3.2 (5.0 g, 12 mmol)溶于二氯甲烷(100 mL)中，向反应液中加入正丙醛(4.2 g, 72.3 mmol)，室温下搅拌反应 10 分钟，再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠(12.8 g, 60.25 mmol)，反应在室温下搅拌反应 1 小时。LC-MS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌 1 小时，通过旋转干燥，过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化，得到目标化合物 A3.3 (4.57 g, 收率 82.0%)，化合物 A3.3 为白色固体。

15 LC-MS (ESI) [M+H]⁺: 464.0:

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.81 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.38-7.28 (m, 5H), 5.04 (d, *J* = 1.7Hz, 2H), 4.12- 4.02 (m, 1H), 3.94-3.82 (m, 1H), 2.65-2.52 (m, 6H), 2.06-1.94 (m, 1H), 1.76-1.64 (m, 1H), 1.64-1.53 (m, 1H), 1.52-1.40 (m, 6H), 1.34-1.18 (m, 2H), 0.92-0.80 (m, 12H)。



20 步骤 3：室温下，将化合物 3.3 (2.0g, 4.32 mmol)溶于甲醇(80 mL)中，然后向反应液中加入 Pd/C(0.16 g)，在氢气下室温搅拌反应 12 小时，LC-MS 显示反应完全，将反应液过滤，减压浓缩得到目标化合物 A3.4 (1.2 g, 收率 85.5%)，为白色固体。



步骤4: 将6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸(100 mg, 0.373 mmol)溶于DMF(1 mL)中, 然后加入HATU(142 mg, 0.373 mmol), *N,N*-二异丙基乙胺(120 mg, 0.93 mmol), 该体系搅拌30分钟, 然后加入化合物A3.4 (122mg, 0.371 mmol), 将反应液在室温搅拌1小时。通过LC-MS检测反应完成后, 反应液直接经过C18柱反相(乙腈和0.05%的甲酸水溶液体系)纯化, 得到目标化合物

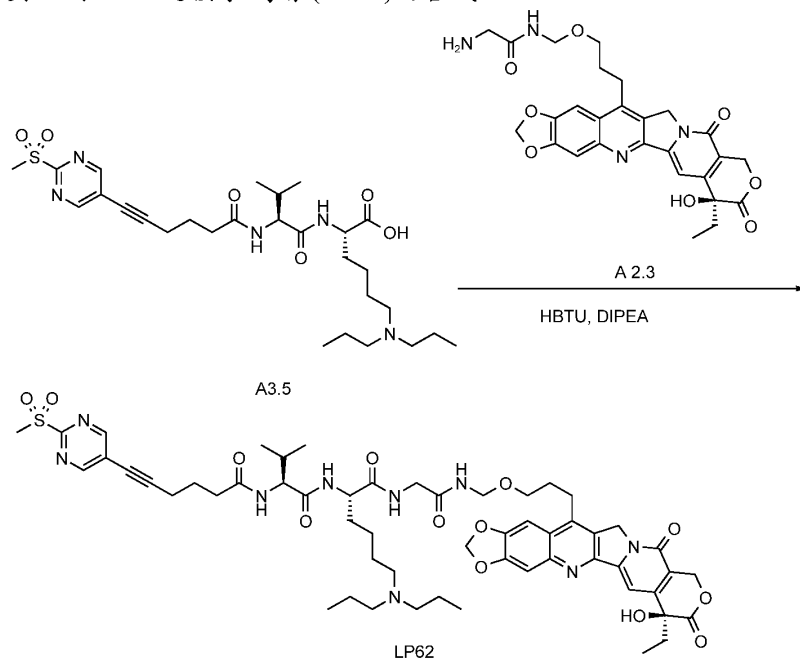
5 N^6, N^6 -二丙基- N^2 -((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸(化合物 A3.5, 50 mg, 收率28%)为淡黄色固体。

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 580.0:

1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.24 (s, 2H), 7.98-7.93 (m, 2H), 4.24-4.16 (m, 1H), 4.10 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79-2.64 (m, 6H), 2.55 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.45-2.26 (m, 2H), 2.06-1.91 (m, 1H), 1.89-1.78 (m, 2H), 1.76-1.66 (m, 1H), 1.64-1.57 (m, 1H), 1.57-1.42 (m, 6H), 1.37-1.24 (m, 2H), 0.93-0.78 (m, 12H)。

10

实施例 1.4: 连接子-毒素(LP62)的合成



15

步骤 1: 将化合物 A3.5(43 mg, 0.074 mmol)、化合物 A2.3(40 mg, 0.074 mmol)溶于 1 mL DMF 中, 然后依次加入 HBTU(28 mg, 0.075 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(24 mg, 0.187 mmol), 将反应液在室温搅拌 1 小时。LC-MS 检测反应完成后, 反应液直接经过制备色谱(0.01% 三氟乙

酸水溶液, 乙腈)纯化, 得到目标化合物 LP62 的三氟乙酸盐(8.5 mg, 收率 10%), 为黄色固体。

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 1098.6:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.19 (m, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66-4.52 (m, 2H), 4.31-4.21 (m, 1H), 4.19-4.10 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.49-3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.15-3.06 (m, 2H), 3.02-2.95 (m, 6H), 2.59-2.52 (m, 3H), 2.41-2.29 (m, 2H), 2.50-1.90 (m, 2H), 1.91-1.77 (m, 6H), 1.63-1.57 (m, 6H), 1.31-1.29 (m, 2H), 0.92-0.80 (m, 15H).

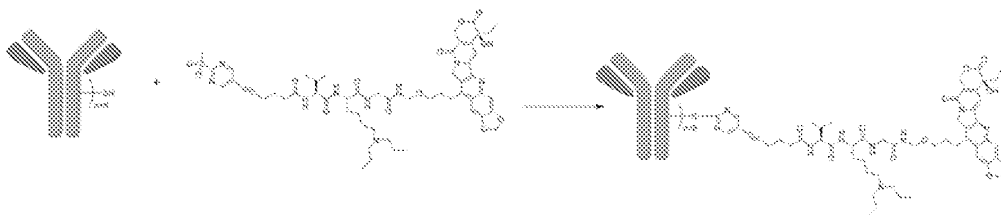
10 实施例 2. 抗体的制备

除非另有说明, 否则本发明采用的抗 EGFR 抗体为 MAB07, 其重链和轻链氨基酸序列描述于序列表中。

一般而言, 所述抗体如下制备: 构建分泌表达 MAB07 的稳定 CHO 细胞系。在合适的培养基中培养所述稳定 CHO 细胞系。收获培养上清液, 并依次进行深层过滤、蛋白 A 柱亲和层析、病毒灭活、过滤、阴离子层析、阳离子层析和纳滤/超滤等过程。最终获得目标抗体。

实施例 3. 抗体-药物偶联物的制备和检测

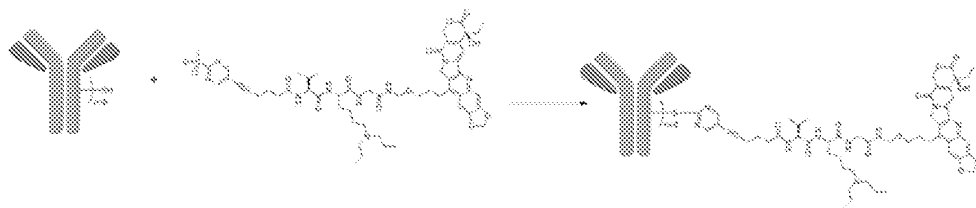
实施例 3.1: MAB07-LP62 的制备



20 其中 $n=8$ 代表连接子-载荷药物与抗体的摩尔比。

取 2-5 mL 抗 EGFR 抗体 MAB07 (Anti-EGFR_mAb, 15-25 mg/mL) 置于反应管中。加入终浓度为 10-20 mM 的 EDTA, 随后用 0.5-1 M 磷酸氢二钠溶液调节 pH 至 6.0-7.5。缓慢加入 10-20 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦, 4-10 当量, 0.1-0.4 mL), 混匀并在室温下反应 50-80 分钟。待 MAB07 还原反应结束后, 向上述溶液体系中加入提前溶于二甲基亚砜 DMSO 或 DMAC 溶剂中的连接子-毒素 LP62 溶液(4-12 倍当量, 1-8 μmol), 搅拌混匀并置于室温反应 100-150 分钟。采用阳离子层析纯化后用 Amicon Ultra-15 将体系缓冲液置换成 10-50 mM PB 或组氨酸-盐酸组氨酸, pH 5.5-7.5, 得到 MAB07 与连接子-毒素 LP62 的偶联产物 MAB07-LP62。其 DAR 值和单体含量经 LC-MS、HIC 和 HPLC-SEC 分析验证符合标准。

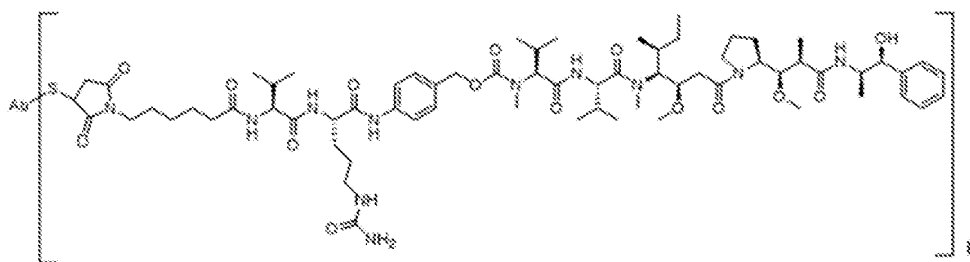
30 实施例 3.2: 参照 ADC Cetuximab-LP62 的制备。



其中 $n=8$ 代表连接子-载荷药物与抗体的摩尔比。

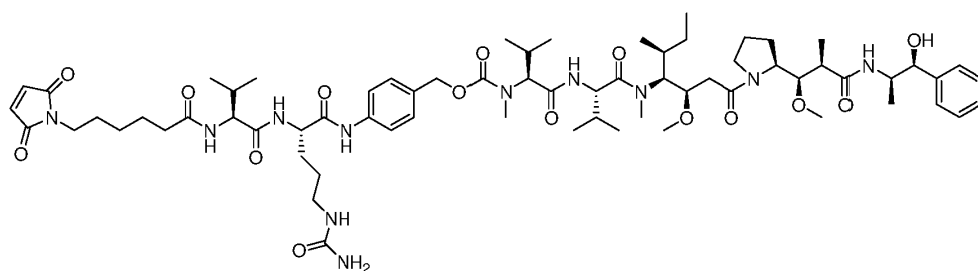
取 2-5 mL 西安普单抗(Cetuximab, 15-25 mg/mL)置于反应管中。加入终浓度为 10 -20mM 的 EDTA, 随后用 0.5-1 M 磷酸氢二钠溶液调 pH 至 6.0-7.5。缓慢加入 10-20 mM TCEP(三(2-羧乙基)膦, 4-10 当量, 0.1-0.4 mL), 混匀并在室温下 50-80 分钟。待 Cetuximab 还原反应结束后, 向上述溶液体系中加入提前溶于二甲基亚砷 DMSO 或 DMAC 溶剂中的连接子-毒素 LP62 溶液(4-12 倍当量, 1-8 μ mol), 搅拌混匀并置于室温反应 100-150 分钟。采用阳离子层析后用 Amicon Ultra-15 将体系缓冲液置换成 10-50 mM PB 或组氨酸-盐酸组氨酸, pH 5.5-7.5, 得到 Cetuximab 与连接子-毒素 LP62 的偶联产物 Cetuximab-LP62。其 DAR 值和单体含量经 LC-MS、HIC 和 HPLC-SEC 分析验证符合标准。

实施例 3.3: 参照 ADC MAB07-VC-MMAE 的制备



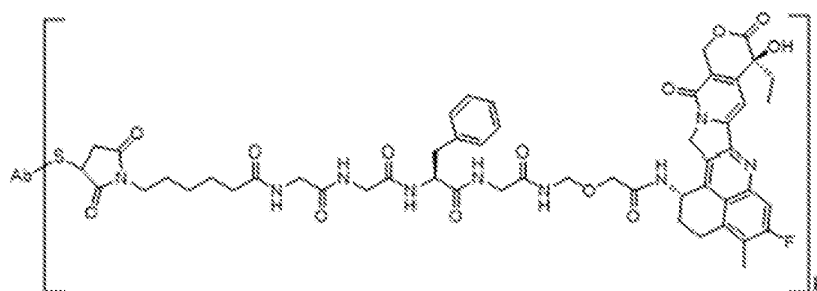
MAB07-VC-MMAE 的结构(此处 Ab 为 MAB07, 且 k 为 DAR 值)

根据现有技术的通用方法制备 MAB07-VC-MMAE。具体而言, 取 2-5 mL 抗 EGFR 抗体 MAB07 (Anti-EGFR_mAb, 15-25 mg/mL) 置于反应管中。加入 10-20mM 的 EDTA, 随后用 0.5-1 M 磷酸氢二钠溶液调节 pH 至 6.0-7.5。缓慢加入 10-20 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦, 4-10 当量, 0.1-0.4 mL), 混匀并在室温下反应 50-80 分钟。待 MAB07 还原反应结束后, 向上述溶液体系中加入提前溶于二甲基亚砷 DMSO 或 DMAC 溶剂中的连接子-毒素 MC-VC-PABC-MMAE (其结构如下所示) 溶液 (4-12 倍当量, 1-8 μ mol), 搅拌混匀并在室温反应 100-150 分钟。采用 Amicon Ultra-15 将体系缓冲液置换成 10-50 mM PB 或组氨酸-盐酸组氨酸, pH 5.5-7.5, 得到 MAB07 与连接子-毒素 MC-VC-PABC-MMAE 的偶联产物 MAB07-VC-MMAE。其 DAR 值和单体含量经 LC-MS、HIC 和 HPLC-SEC 分析验证符合标准。



MC-VC-PABC-MMAE

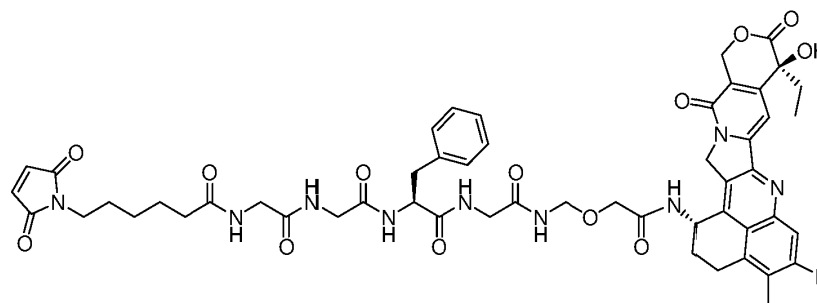
实施例 3.4: 参照 ADC MAB07-GGFG-DXD 的制备



5

MAB07-GGFG-DXD 的结构(此处 Ab 为 MAB07, 且 k 为 DAR 值)

根据现有技术的通用方法制备 MAB07-GGFG-DXD。具体而言, 取 2-5 mL 抗 EGFR 抗体 MAB07 (Anti-EGFR_mAb, 15-25 mg/mL) 置于反应管中。加入终浓度为 10 -20mM 的 EDTA, 随后用 0.5-1 M 磷酸氢二钠溶液调节 pH 至 6.0-7.5。缓慢加入 10-20 mM TCEP (三(2-羧乙基) 10 膦, 4-10 当量, 0.1-0.4 mL), 混匀并在室温下反应 50-80 分钟。待 MAB07 还原反应结束后, 向上述溶液体系中加入提前溶于二甲基亚砷 DMSO 或 DMAC 溶剂中的连接子-毒素 MC-GGFG-DXD (其结构如下所示) 溶液(8-12 倍当量, 2-10 μmol), 搅拌混匀并在室温反应 100-150 分钟。采用 Amicon Ultra-15 将体系缓冲液置换成 10-50 mM PB 或组氨酸-盐酸组氨酸, pH 5.5-7.5, 得到 MAB07 与连接子-毒素 MC-GGFG-DXD 的偶联产物 MAB07-GGFG-DXD。 15 其 DAR 值和单体含量经 LC-MS、HIC 和 HPLC-SEC 分析验证符合标准。



MC-GGFG-DXD

实施例 3.5: 用于单体和偶联物聚集分析的尺寸排阻色谱(HPLC-SEC)

在配备有 TSKgel® G3000SWxL 柱(Tosoh Bioscience LLC, 7.8 mm ×30 cm, 5μm 孔径)的 Agilent 1260 液相色谱系统上进行尺寸排阻色谱分析。用含有 0.15 M 氯化钠和 10-20%异丙醇 (pH 7.4)的 0.1 M 磷酸钠以 0.5-1.0 mL/min 的流速从柱洗脱裸抗体或偶联物样品约 30-60 分钟。

5 所有数据均使用 Agilent ChemStation 软件进行分析。裸抗体或偶联物的聚集百分比如下计算:

$$\text{聚集百分比} = \frac{PA_{\text{聚集体}}}{PA_{\text{总计}}} \times 100\%$$

其中: PA = 积分的峰面积

计算的所得偶联物的单体纯度列于下面:

表 2: 抗 EGFR 抗体-药物偶联物的尺寸排阻色谱分析			
样品名称	聚体(%)	主峰(%)	片段(%)
MAB07-LP62	0.4	98.9	0.6
Cetuximab-LP62	0.3	99.2	0.5

结果表明,所得的抗 EGFR 抗体-药物偶联物主要以单体状态存在,呈现优异的抗聚集性。

10

实施例 3.6: 以 LC-MS 分析抗体-药物偶联物的荷载药物:抗体比(DAR)

在 37℃ 用 DTT 还原抗体-药物偶联物样品 10 分钟,然后使用 LC-MS 分析该偶联物的 DAR 值。具体而言, 将还原样品注入配备有 Acquity UPLC BEH C4 反相柱(Waters Corporation, 2.1mm ×50 mm, 1.7μm, 300Å)的 LC-MS 系统(Agilent 1290 Infinity II LC 系统和 Agilent 6545XT

15 AdvanceBio Q-TOF)。利用提供的解卷积的 LC-MS 结果计算药物:抗体比(DAR)。

表 3:通过 LC-MS 分析抗 EGFR 抗体-药物偶联物的药物: 抗体比值(DAR)			
样品名称	链	LC/HC 的 DAR	IgG 的 DAR
MAB07-LP62	LC (轻链)	1.00	8.00
	HC (重链)	3.00	
Cetuximab-LP62	LC (轻链)	1.00	8.00
	HC (重链)	3.00	

实施例 4.抗 EGFR 抗体-药物偶联物对 EGFR 阳性细胞的亲和力的测定

分别收集正常生长传代的 A549 和 SW480 肿瘤细胞, 用 PBS 洗涤, 重悬, 以 5×10⁵ 个细胞/孔/50 μl 接种至 96-孔板。随后用 FACS 缓冲液(PBS+2% FBS)等梯度稀释测试样品, 将

20 稀释后待测样品和对照样品依次加入接种细胞的 96-孔板中, 其中对照样品 IgG1 为同型对照 (购自北京义翘神州科技有限公司)。将样品板放置 4℃ 孵育 0.5 h, 离心, 除去上清液, 然后用 300 μl/孔的 FACS 缓冲液洗涤。随后将带有荧光标记的羊抗人 IgG 抗体检测液依次加入

样品板中(100 μ l/孔)与细胞进行孵育。将样品板放置 4℃ 孵育 0.5 h, 用 300 μ l/孔的 FACS 缓冲液洗涤, 最后重悬细胞。通过流式细胞仪检测各样品荧光数值。以 Graphpad prism 8.1 分析数据, 用四参数方程拟合。

- 如图 1A 中所示, 无论 DAR 高(DAR8)还是低(DAR4), 抗 EGFR 抗体-药物偶联物 MAB07-LP62 对 EGFR 阳性细胞 A549 均表现出较好的亲和力, 其亲和力与未偶联的抗体的亲和力相当。类似地, 如图 1B 中所示, MAB07-LP62 (DAR8)对 EGFR 阳性细胞 SW480 也表现出与未偶联的抗体相当的亲和力。

实施例 5. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物内化入 EGFR 阳性细胞的测定

- 取一定体积正常生长传代的 A549 细胞, 离心, 除去上清液, 用细胞培养基(RPMI-1640 培养基+10% FBS)重悬。接种 50 μ l 细胞悬液到 96 孔板中待用(1×10^5 个细胞/孔)。用细胞培养基将 pH 值敏感性 Zenon™ pHrodo™ iFL IgG 标记试剂 (购自 ThermoFisher) 配制成 4x 工作液 1(480nM)。该 pH 值敏感性染料与 IgG 的偶联物在细胞外不发出荧光, 但在酸性环境(包括溶酶体)中会发出明亮荧光。用细胞培养基将测试物配制成 4x 工作液 2(160nM)。分别取工作液 1 和工作液 2 各 25 μ l 到 96 孔板中, 混合并孵育。将混合的液体吸取到 50 μ l 的细胞悬液中, 混匀, 并放置于培养箱中进行培养。分别在 0、2、16、24h 时间点取样品, 离心, 并除去上清液。然后用 300 μ l/孔的 FACS 缓冲液洗涤, 重悬, 用流式细胞仪测定各样品荧光值。

- 如图 2 中所示, 与 IgG1 同种型对照数据相比, 随着孵育时间的增加, MAB07-LP62 和 MAB07 内化的比例增加, 在 16h 时达到峰值, 说明抗 EGFR 抗体-药物偶联物 MAB07-LP62 能够有效地结合细胞表面上的 EGFR 抗原并内化进入细胞内的溶酶体途径。

实施例 6. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物的细胞杀伤活性的测定

- 收集处于指数生长期的细胞并用 Vi-Cell XR 细胞计数仪进行活细胞计数。用培养基将细胞悬液调整到适当浓度。向细胞培养板中每孔添加 80 μ l 细胞悬液。梯度稀释测试样品(5 倍稀释液), 将稀释后的测试品分别取 20 μ l 加入至细胞培养板中的细胞悬液中, 将细胞培养板置于培养箱中, 培养 72 小时。72 小时后, 按照 CellTiter-Glo 的操作说明, 每孔加入 50 μ l 预先融化并平衡到室温的 CellTiter-Glo 溶液 (购自 Promega), 用微孔板震荡器混匀 2 分钟, 于室温放置 10 分钟, 用 Envision2104 读板仪测定荧光信号。

- 如图 3 中所示, 针对 MAB07 不敏感的 EGFR 阳性肿瘤细胞 NCI-H1993 和 EBC-1, MAB07-LP62 显示了较强的细胞杀伤作用。

实施例 7. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物的细胞杀伤活性的比较

- 收集处于指数生长期的结肠腺癌细胞系 SW480 并用 Vi-Cell XR 细胞计数仪进行活细胞计数。用培养基将细胞悬液调整到适当浓度。向细胞培养板中每孔添加 80 μ l 细胞悬液。梯

度稀释测试样品(5 倍稀释液), 将稀释后的测试品分别取 20 μl 加入至细胞培养板中的细胞悬液中, 将细胞培养板置于培养箱中, 培养 72 小时。72 小时后, 按照 CellTiter-Glo 的操作说明, 每孔加入 50 μl 预先融化并平衡到室温的 CellTiter-Glo 溶液 (购自 Promega), 用微孔板震荡器混匀 2 分钟, 于室温放置 10 分钟, 用 Envision2104 读板仪测定荧光信号。

5 如表 4 中所示, MAB07-LP62 的体外细胞杀伤作用优于 Cetuximab-LP62。

表 4. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物针对人结肠腺癌细胞系 SW480 的细胞杀伤活性

ADC 样品	DAR 值	IC50 (nM)
MAB07-LP62	8	1161
Cetuximab-LP62	8	2702

实施例 8. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物对源自不同物种的 EGFR 的交叉结合活性

10 用 1×PBS 分别稀释源自人、食蟹猴、大鼠和小鼠的 EGFR 的细胞外结构域(ECD), 工作浓度为 2 μg/mL, 作为 ELISA 包被液。测试板用 PBST(含 0.05% Tween20 的 PBS)洗 3 次。该板用封闭液 SuperBlock T20 (PBS) Blocking Buffer(60 μL/孔)在室温孵育, 然后将测试样品等梯度稀释后分别加样到测试板中, 在室温孵育。洗涤测试板, 添加作为二抗的 HRP 酶标记的山羊抗人 IgG, 孵育。洗涤测试板, 加入终止液(30 μL/孔), 离心, 然后读取 450 nm 波长处的光吸收。原始数据使用 Graphpad prism 8.1 分析, 并用四参数方程拟合。

15 如图 4 中所示, MAB07-LP62 对食蟹猴 EGFR ECD 的结合亲和力与人 EGFR ECD 一致, 其 EC50 分别为 0.074 nM 和 0.033 nM。MAB07-LP62 (DAR8)对大鼠和小鼠 EGFR ECD 均呈现出微弱的特异性结合。

实施例 9. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人表皮癌细胞系 A431 皮下异种移植的 BALB/c 裸小鼠模型中的抗肿瘤活性的评价

20 在生长培养基中(DMEM 1640+10% FBS)培养 A431 细胞。收集对数生长期的细胞, 将细胞重悬至 PBS 与 Matrigel 基质中用于皮下接种小鼠。待接种小鼠周龄为 7-8 周, 于右侧背部皮下接种 A431 细胞(5×10⁶/只)。待肿瘤生长至平均体积为 152.78 mm³ 时, 根据肿瘤大小随机分组给药, 以保证不同组别间的肿瘤体积相似。分组当天定义为第 0 天。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小, 每周给药一次, 给药三次。记录实验过程中观察到的临床症状。肿瘤体积根据以下公式计算: 肿瘤体积(mm³)= 1/2 ×(a × b²)(其中 a 表示长径, b 表示短径)。

25 如图 5 中所示, 在给药后第 21 天, 与对照组(PBS)相比, Cetuximab-LP62 没有显示肿瘤抑制作用(TGI -15.47%)。MAB07-LP62 则展现出肿瘤抑制作用(TGI 42.66%)。表明
30 MAB07-LP62 的体内抗肿瘤活性优于 Cetuximab-LP62。

实施例 10. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人非小细胞肺癌细胞系 NCI-H1993 皮下异种移植的 BALB/c 裸小鼠模型中的抗肿瘤活性的评价

在生长培养基中(RPMI 1640+10% FBS)培养 NCI-H1993 细胞。收集对数生长期的细胞, 将细胞重悬至 PBS 与 Matrigel 基质中用于皮下接种小鼠。待接种小鼠周龄为 6-7 周, 于右侧背部皮下接种 NCI-H1993 细胞(1×10^7 /只)。待肿瘤生长至平均体积为 199.56 mm^3 时, 根据肿瘤大小随机分组给药, 以保证不同组别间的肿瘤体积相似。分组当天定义为第 0 天。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小, 每周给药一次, 给药三次。记录实验过程中观察到的临床症状。肿瘤体积根据以下公式计算: 肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

如图 6 中所示, 在给药后第 24 天, 与对照组(MAB07)相比, MAB07-LP62 (DAR4) (3 mg/kg 和 8 mg/kg)以及 MAB07-LP62 (DAR8) (3 mg/kg 和 8 mg/kg)都显示显著的肿瘤生长抑制, 其 TGI%分别为 47.0% ($p=0.18$), 81.5% ($p<0.001$), 53.4% ($p=0.0106$)和 84.7% ($p<0.001$)。其中 MAB07-LP62 (DAR8)或 MAB07-LP62 (DAR4)均表现出显著的剂量依赖的抗肿瘤效应。与基于现有技术偶联技术构建的抗体-药物偶联物 MAB07-VC-MMAE (DAR4) (第 24 天, 3 mg/kg TGI% 38.6%)和 MAB07-GGFG-DXD (DAR8) (第 24 天, 3 mg/kg, TGI% 28.4%; 8 mg/kg 73.3%)比较, MAB07-LP62 (DAR8)显示显著优异的抗肿瘤活性。在整个治疗期间, 所有动物均未出现严重的体重下降。

实施例 11. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人非小细胞肺癌细胞系 EBC-1 皮下异种移植的 BALB/c 裸小鼠模型中的抗肿瘤活性的评价

在生长培养基中(MEM+10% FBS+1%NEAA)中培养 EBC-1 细胞。收集对数生长期的细胞, 将细胞重悬至 PBS 与 Matrigel 基质中用于皮下接种小鼠。待接种小鼠周龄为 7-8 周, 于右侧背部皮下接种 EBC-1 细胞(3×10^6 /只)。待肿瘤生长至平均体积为 200.41 mm^3 时, 根据肿瘤大小随机分组给药, 以保证不同组别间的肿瘤体积相似。分组当天定义为第 0 天。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小, 每周给药一次, 给药三次。记录实验过程中观察到的临床症状。肿瘤体积根据以下公式计算: 肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

如图 7 中所示, 在给药后第 17 天, 与对照组(MAB07)相比, MAB07-LP62 (DAR4)(3 mg/kg 和 8 mg/kg)、MAB07-LP62 (DAR8)(3 mg/kg 和 8 mg/kg)、MAB07-GGFG-DXd (DAR8)(8 mg/kg)以及 MAB07-VC-MMAE (DAR4)(3 mg/kg)均表现出显著的肿瘤抑制作用, 其 TGI%分别为 67.06% ($p=0.00126$), 96.58% ($p<0.001$), 97.83% ($p<0.001$), 100.00% ($p<0.001$), 82.12% ($p<0.001$)和 99.21% ($p<0.001$)。本次实验的测试药物均表现出剂量依赖的抗肿瘤效应。相较于其他受试药, MAB07-LP62 (DAR8)实现了该肿瘤模型的完全响应(CR)。相比之下, 其他测试药物在结束给药后 4 周观察期中, 均出现了不同程度的肿瘤的增长。表明 MAB07-LP62 (DAR8)具有极强的肿瘤抑制效应。在整个治疗期间, 所有动物均未出现严重的体重下降。

实施例 12. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在 HuPrime®肺癌 LU3075 皮下异种移植的雌性

BALB/c 裸小鼠模型中的抗肿瘤作用的评价

从 HuPrime® 肺癌异种移植模型 LU3075 荷瘤小鼠收取肿瘤组织, 切成直径为 2-3mm 的瘤块。将所得瘤块皮下接种于周龄为 8-9 周的 BALB/c 裸小鼠的右前肩胛处。待肿瘤生长至平均体积为 181.60mm^3 时, 根据肿瘤大小随机分组给药, 以保证不同组别间的肿瘤体积相似。

- 5 分组当天定义为第 0 天。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小, 每周给药一次, 给药三次。记录实验过程中观察到的临床症状。肿瘤体积根据以下公式计算: 肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

- 如图 8 中所示, 在给药后第 28 天, MAB07-LP62 (DAR8) 在 1 mg/kg (TGI 79.88%)、3 mg/kg (TGI 76.55%) 和 8 mg/kg (TGI 91.47%) 的剂量均展现了较强的肿瘤抑制效果。同时, 3 mg/kg MAB07-LP62 (DAR8) 与 20 mg/kg 奥希替尼的联用组(第 28 天, TGI 93.80%)与单独的 MAB07-LP62 (DAR8) (第 28 天, TGI 76.55%) 或单独的奥希替尼(第 28 天, TGI 61.00%) 相比显示了优效性。8 mg/kg MAB07 在给药后第 28 天的 TGI 为 35.20%。本实施例说明 MAB07-LP62 具有与小分子抑制剂(如奥希替尼)联用的优势。在整个治疗期间, 所有动物均未出现严重的体重下降。

15

实施例 13. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人肺癌 PDX(患者来源的异种移植瘤)移植瘤 NCG 小鼠模型中的抗肿瘤作用的评价

- 在 NCG 小鼠上进行奥希替尼耐药的 EGFR exon19del/T790M/C797S 突变的人肺癌 LD1-0025-200717 PDX 模型复苏, 待肿瘤长至 $500-800\text{mm}^3$ 时, 手术无菌摘取肿瘤组织, 去除非肿瘤组织和坏死组织。剥离肿瘤组织并将其均匀切成约 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的组织块, 随后将肿瘤组织小块接种到 NCG 小鼠的背部右侧皮下。待接种后 6 天, 每只小鼠腹腔注射 PBMC 5×10^6 个。待肿瘤生长至平均体积为 110mm^3 左右时, 根据肿瘤大小随机分组给药, 以保证不同组别间的肿瘤体积相似。分组当天定义为第 0 天。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小, 单次给药或给药三周。记录实验过程中观察到的临床症状。肿瘤体积根据以下公式计算: 肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

- 如图 9 中所示, 在奥希替尼耐药的肺癌 PDX 模型 LD1-0025-200717 中, 与 PBS 组相比, IgG1-LP62 TGI% 为 58.1% ($p < 0.0001$), 奥希替尼和斯鲁利单抗(serplulimab)没有明显的肿瘤抑制效果, MAB07-LP62 (DAR8) 在 1mg/kg、3mg/kg 和 8mg/kg 剂量单次给药以及联合给药(与奥希替尼或斯鲁利单抗(serplulimab)联用) 都导致了肿瘤的持续缓解。在整个治疗期间, 所有动物均未出现严重的体重下降。

30

实施例 14. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在 PBMC 免疫系统人源化小鼠人结肠癌 HT-29 细胞异体移植的 NCG 小鼠模型中的抗肿瘤活性的评价

- 在生长培养基(McCoy's 5A + 10% FBS)中培养 HT-29 细胞。将人 PBMC 接种到 NCG 小鼠完成小鼠免疫系统重建, 3 周后收集对数生长期的 HT-29 细胞, 将细胞重悬至 PBS 与 Matrixgel

35

基质中用于皮下接种小鼠。待接种小鼠周龄为 6-8 周,于右侧背部皮下接种 HT-29 细胞(3×10^6 /只)。待肿瘤生长至平均体积为 140.5 mm^3 时,根据肿瘤大小随机分组给药,以保证不同组别间的肿瘤体积相似。分组当天定义为第 0 天。开始给药后,每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小,每周给药一次,给药三次。记录实验过程中观察到的临床症状。肿瘤体积根据以下公式计算:肿瘤体积(mm^3)= $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

如图 10 中所示,在给药后第 17 天,与对照组(PBS)相比, MAB07-LP62 (DAR8)(1 mg/kg 和 3 mg/kg)都显示显著的肿瘤生长抑制和剂量依赖的抗肿瘤效应,其 TGI%分别为 49.3% ($p=0.0017$)和 94.6%($p<0.001$)。此外 10mg/kg 斯鲁利单抗(serplulimab)+1mg/kg MAB07-LP62 (DAR8) 联合用药组较 10mg/kg 斯鲁利单抗(serplulimab)或 1mg/kg MAB07-LP62 (DAR8)均显示更优的肿瘤生长抑制,其 TGI%分别为 82.1%、18.5%和 49.3%。表明斯鲁利单抗(serplulimab)和 MAB07-LP62 (DAR8)组合具有明显的协同作用。在整个治疗期间,所有动物均未出现严重的体重下降。

实施例 15. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人头颈鳞癌 LD1-2023-411020 PDX 移植瘤 NCG 小鼠模型中的抗肿瘤作用的评价

在 NCG 小鼠上进行人头颈鳞癌 PDX 模型复苏,待肿瘤长至 $500-800 \text{ mm}^3$ 时,剥离肿瘤组织并将其均匀切成约 $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 的组织块,随后将肿瘤组织小块接种到 NCG 小鼠的背部右侧皮下。待肿瘤生长至平均体积为 138.88 mm^3 左右时,根据肿瘤大小随机分组给药,以保证不同组别间的肿瘤体积相似。分组当天定义为第 0 天。开始给药后,每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小,每周给药一次,给药三次。肿瘤体积根据以下公式计算:肿瘤体积(mm^3)= $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

如图 11 中所示,在第 21 天, MAB07-LP62 (DAR8)在 8mg/kg 剂量展现了较强的肿瘤抑制效果, TGI 为 121.62% ($p<0.001$)。表明 MAB07-LP62 (DAR8)具有极强的肿瘤抑制效应。在整个治疗期间,所有动物均未出现严重的体重下降。

25

实施例 16. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人胃癌 LD1-0017-411335 PDX 移植瘤 NU/NU 小鼠模型中的抗肿瘤作用的评价

在 NU/NU 小鼠上进行 DS-8201 (fam-trastuzumab deruxtecan-nxki, 商品名 ENHERTU®) 耐药的人胃癌 PDX 模型复苏,待肿瘤长至 $500-800 \text{ mm}^3$ 时,剥离肿瘤组织并将其均匀切成约 $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 的组织块,随后将肿瘤组织小块接种到 NU/NU 小鼠的背部右侧皮下。待肿瘤生长至平均体积为 176.58 mm^3 左右时,根据肿瘤大小随机分组给药,以保证不同组别间的肿瘤体积相似。分组当天定义为第 0 天。开始给药后,每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小,每周给药一次,给药四次。记录实验过程中观察到的临床症状。肿瘤体积根据以下公式计算:肿瘤体积(mm^3)= $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径, b 表示短径)。

如图 12 中所示,在第 28 天, MAB07-LP62 (DAR8)在 3mg/kg 和 8mg/kg 剂量均展现了较

强的肿瘤抑制效果，TGI 分别为 87.04% ($p=0.0003$) 和 98.01% ($p<0.0001$)。相比之下，裸抗 MAB07 在 8mg/kg 未展现出显著的抗肿瘤活性，TGI 为 27.59% ($p=0.1976$)，而游离载荷药物 A1.3 的 TGI 为 30.68%。表明 MAB07-LP62 (DAR8) 具有极强的肿瘤抑制效应。在整个治疗期间，所有动物均未出现严重的体重下降。

5

实施例 17. 抗 EGFR 抗体-药物偶联物在人源食管癌 KYSE-150 细胞系皮下异种移植 NOD/SCID 小鼠模型中的抗肿瘤作用的评价

在生长培养基中(RPMI 1640/F12+2% FBS)培养 KYSE-150 细胞。收集指数生长期的细胞，将细胞重悬至 PBS 与 Matrigel 基质中用于皮下接种小鼠。待接种小鼠周龄为 7-8 周，于右侧背部皮下接种 KYSE-150 细胞(1×10^7 /只)。待肿瘤生长至平均体积为 199.66 mm^3 时，根据肿瘤大小随机分组给药，以保证不同组别间的肿瘤体积相似。分组当天定义为第 0 天。开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小，每周给药一次，给药三次。肿瘤体积根据以下公式计算：肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径，b 表示短径)。

如图 13 中所示，在第 21 天，MAB07-LP62 (DAR8) 在 1mg/kg、3mg/kg 和 8mg/kg 剂量组展现了剂量依赖的肿瘤抑制效果，TGI 分别为 28.6% ($p=0.482$)、94.5% ($p<0.001$) 和 97.9% ($p<0.001$)。而裸抗 MAB07 在 8mg/kg 仅表现出部分抗肿瘤活性，TGI 为 66.4% ($p<0.001$)。表明 MAB07-LP62 (DAR8) 具有极强的肿瘤抑制效应。在整个治疗期间，所有动物均未出现严重的体重下降。

除了所描绘和要求保护的各个实施方案之外，所公开的主题还针对具有本文所公开和要求保护的特征的其他组合的其他实施方案。这样，本文所呈现的特定特征可以在所公开的主题的范围内以其他方式彼此组合，使得所公开的主题包括本文所公开的特征的任何合适的组合。出于展示和说明的目的已经提出了所公开主题的具体实施方案的以上说明。以上说明并不旨在是穷尽的或将所公开主题限制于所公开的那些实施方案。

对于本领域技术人员将显而易见的是，在不脱离所公开主题的精神或范围的情况下，可以对所公开主题的组成和方法进行多种修改和变化。因此，预期的是所公开主题包括在所附权利要求书及其等同物范围之内的修改和变化。

本文引用了多种出版物、专利和专利申请，其内容通过引用以其整体并入本文。

权利要求书

1. 一种抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述抗体-药物偶联物具有式(I)所示的结构：

TP-[L1-L2-L3-D]_k

5 (I)

其中：

TP 为选择性结合或识别 EGFR 的靶向部分；

L1 为延伸单元，其连接 TP 和 L2；

L2 为任选氨基酸残基或 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；

10 L3 为间隔元件；

D 为生物活性分子；

k 代表 0.1 和 10.0 之间的任意数值。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 TP 为抗体或其抗原结合片段。

15 3. 根据权利要求 2 所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述抗原结合片段选自全长免疫球蛋白、单链 Fv (scFv) 片段、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂、Fv 片段、二硫键稳定的 Fv 片段(dsFv)、(dsFv)₂、Fv-Fc 融合体、scFv-Fc 融合体、scFv-Fv 融合体、双抗体、三抗体、四抗体或它们的任何组合。

20 4. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 TP 为人源化抗体或其抗原结合片段。

25 5. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 TP 包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，所述重链可变区(VH)包含 SEQ ID NO:7 所包含的重链互补决定区 1 (HCDR1)、HCDR2 和 HCDR3，且所述轻链可变区(VL)包含 SEQ ID NO:8 所包含的轻链互补决定区 1 (LCDR1)、LCDR2 和 LCDR3。

30 6. 根据权利要求 5 所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 HCDR1 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1，所述 HCDR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2，所述 HCDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:3，且所述 LCDR1 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4，所述 LCDR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5 且所述 LCDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 TP 包含人 IgG 的 Fc 序列。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

35 9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶

剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 TP 包含重链可变区(VH), 且所述重链可变区(VH)的氨基酸序列与 SEQ ID NO:7 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99%或 100%的同一性。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 TP 包含轻链可变区(VL), 且所述轻链可变区(VL)的氨基酸序列与 SEQ ID NO:8 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99%或 100%的同一性。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 TP 包含重链(HC), 且所述重链(HC)的氨基酸序列与 SEQ ID NO:9 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99%或 100%的同一性。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 TP 包含轻链(LC), 且所述轻链(LC)的氨基酸序列与 SEQ ID NO:10 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99%或 100%的同一性。

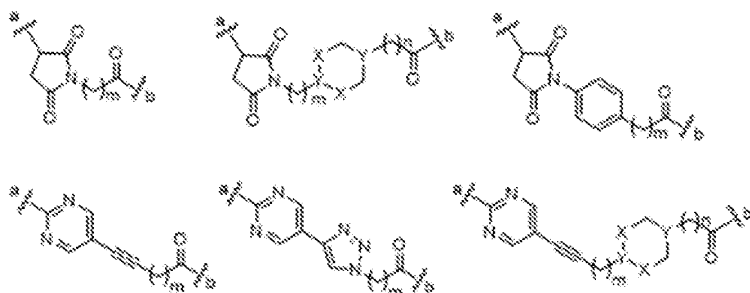
13. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 TP 是多特异性抗体。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 TP 是无岩藻糖基化抗体。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 Fc 区包含 C-末端赖氨酸。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 Fc 区包含 C-末端赖氨酸的缺失。

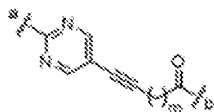
17. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 L1 选自



其中 L1 在 a 位通过 S 原子与 TP 连接, 且在 b 位与 L2 连接, m 为 1 和 10 之间的任意整数, n 为 1 和 10 之间的任意整数, 且 X 和 Y 各自独立地为 C、O、S 或 N。

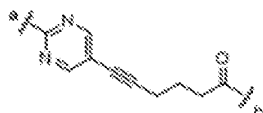
18. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、

溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 L1 为



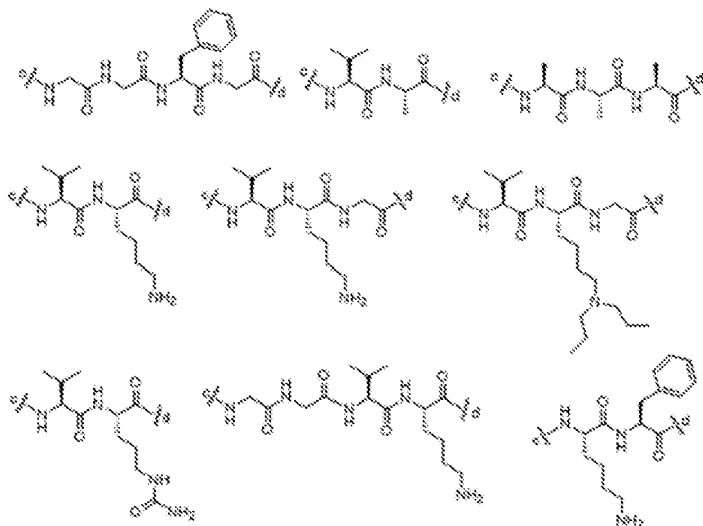
其中 L1 在 a 位通过 S 原子与 TP 连接, 且在 b 位与 L2 连接, m 选自 1、2、3、4、5。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、
5 溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 L1 为



其中 L1 在 a 位通过 S 原子与 TP 连接, 且在 b 位与 L2 连接。

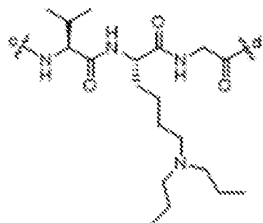
20. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 L2 选自



10

其中 L2 在 c 位与 L1 连接, 且在 d 位与 L3 连接。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物, 其中所述 L2 为

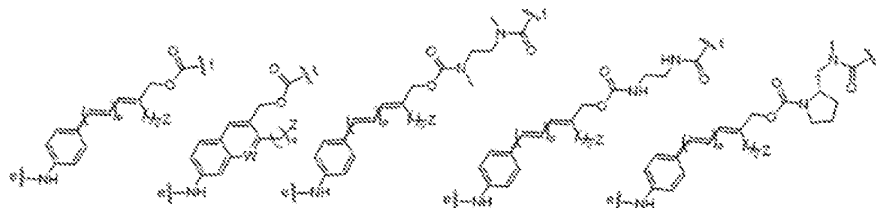


15

其中 L2 在 c 位与 L1 连接, 且在 d 位与 L3 连接。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、

溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 L3 为单键或选自以下的基团：



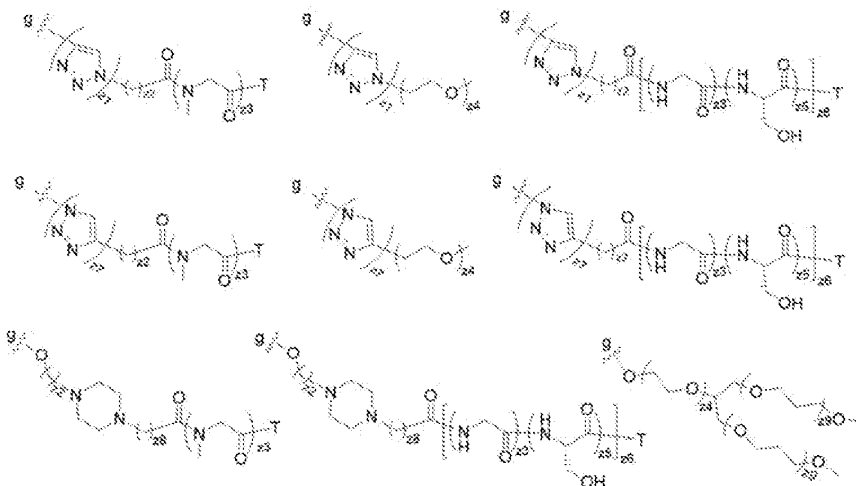
其中 L3 在 e 位与 L2 连接，且在 f 位与 D 连接，

p 和 q 各自独立地为 0 和 10 之间的整数，

5 W 为 C、O、S 或 N，

Z 选自氢、卤素、C₁-C₂₀ 烷烃、C₁-C₂₀ 卤代烷烃、氰基、磺酸、羧酸、C₁-C₂₀ 烷氧基、C₂-C₁₀ 不饱和烷烃、天然氨基酸、非天然氨基酸以及上述氨基酸组成的短肽。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中 Z 选自：

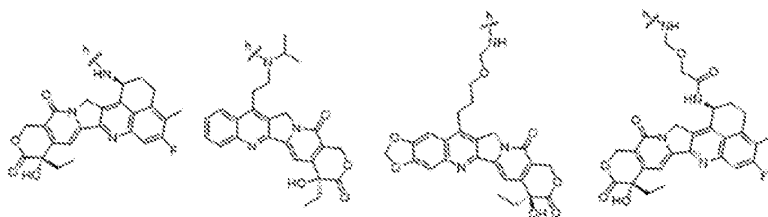


10

其中 Z 在 g 位与 L3 的其余部分连接，z1-z9 各自独立地为 0 和 10 之间的整数，且 T 为 NH₂ 或 OH。

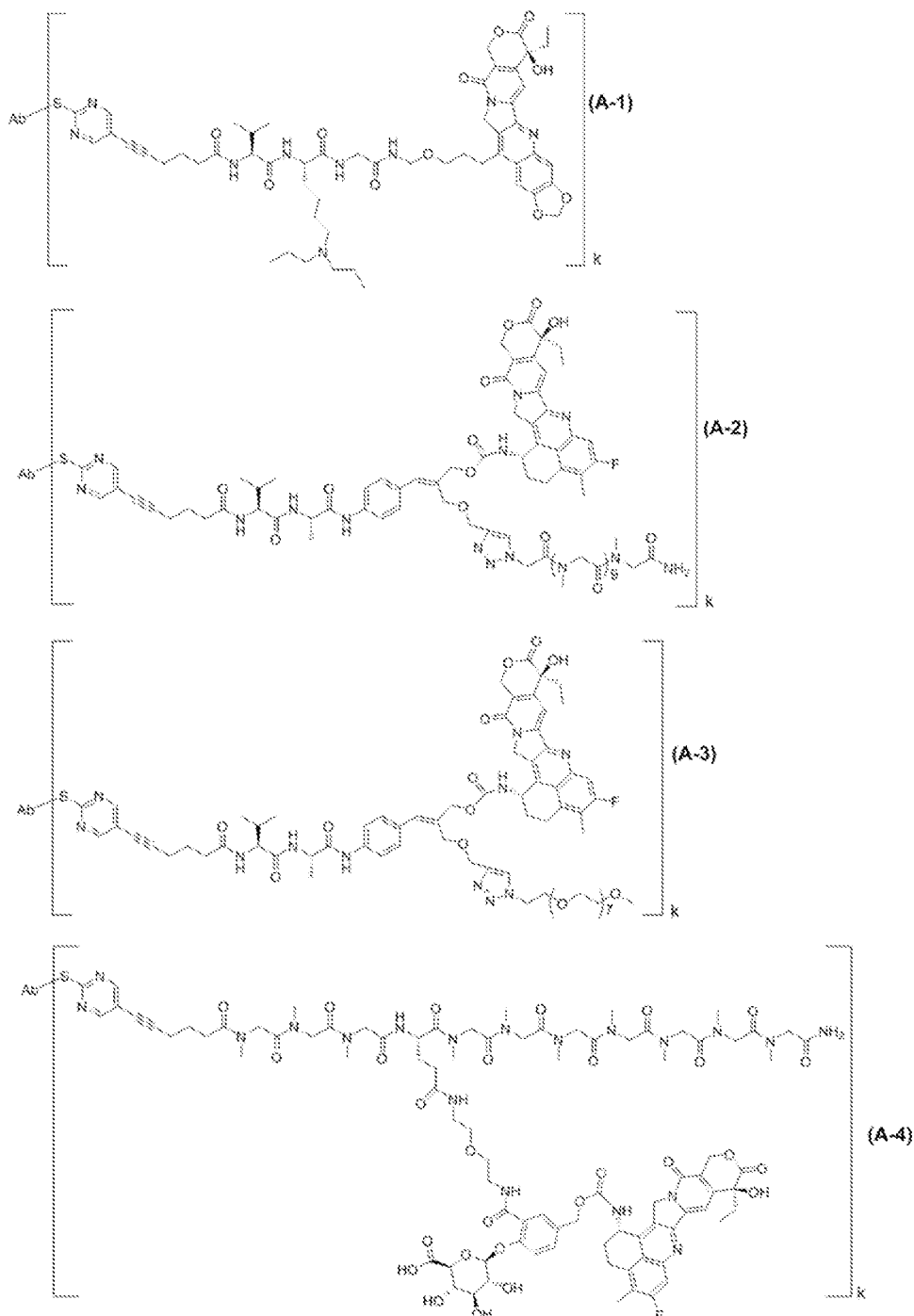
24. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 D 为细胞毒剂。

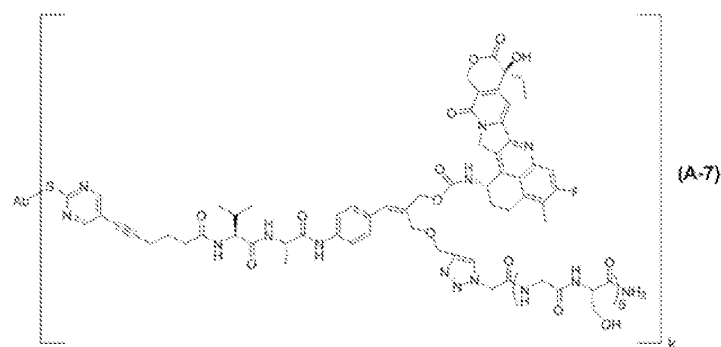
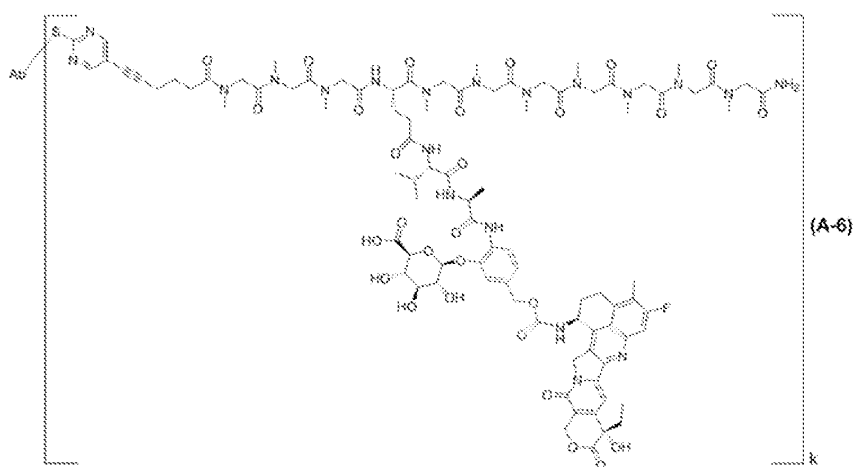
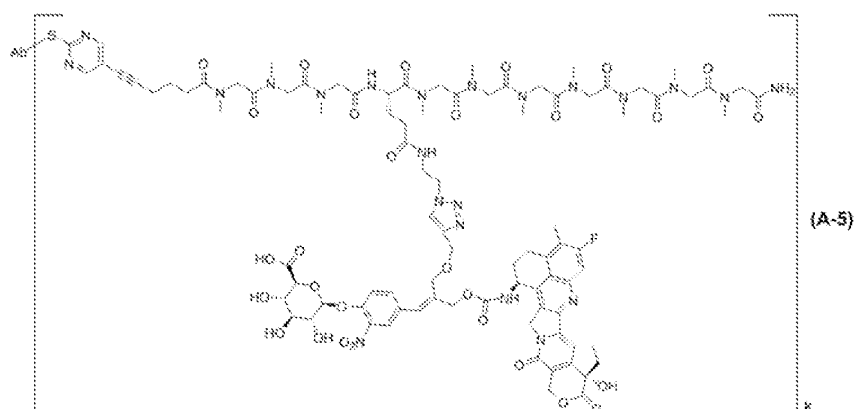
15 25. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述 D 选自



其中 D 在 h 位与 L3 连接。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中所述抗体-药物偶联物选自：





其中 Ab 代表所述抗体或其抗原结合片段。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，其中 k 为约 4.0-约 8.0，优选地 k 为约 4.0、约 6.0 或约 8.0。

28. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物，以及任选地，药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

29. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、

溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或根据权利要求 28 所述的药物组合物,其用作药物。

30. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或根据权利要求 28 所述的药物组合物,其用于治疗或预防肿瘤或癌症。

5 31. 根据权利要求 30 所述的用于治疗或预防肿瘤或癌症的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或药物组合物,其中所述肿瘤或癌症为与 EGFR 相关的肿瘤或癌症。

32. 根据权利要求 30 所述的用于治疗或预防肿瘤或癌症的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或药物组合物,其中所述肿瘤或
10 癌症选自表皮癌、结肠癌、直肠癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

33. 根据权利要求 32 所述的用于治疗或预防肿瘤或癌症的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或药物组合物,其中所述肺癌为小细胞肺癌或非小细胞肺癌。

15 34. 根据权利要求 32 所述的用于治疗或预防肿瘤或癌症的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或药物组合物,其中所述肺癌为奥希替尼耐药的肺癌。

35. 根据权利要求 32 所述的用于治疗或预防肿瘤或癌症的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或药物组合物,其中所述胃癌为
20 ENHERTU 耐药的胃癌。

36. 根据权利要求 30-35 中任一项所述的用于治疗或预防肿瘤或癌症的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或药物组合物,其中所述肿瘤或癌症为 KRAS 基因突变和/或 BRAF 基因突变的肿瘤或癌症。

37. 根据权利要求 36 所述的用于治疗或预防肿瘤或癌症的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或药物组合物,其中所述 KRAS
25 基因突变和/或 BRAF 基因突变的肿瘤或癌症为 KRAS 基因突变和/或 BRAF 基因突变的结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌。

38. 一种制品或试剂盒,其包含根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或根据权利要求 28 所述
30 的药物组合物以及使用说明书。

39. 一种预防或治疗肿瘤或癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用预防或治疗有效量的根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或根据权利要求 28 所述的药物组合物。

40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述肿瘤或癌症为与 EGFR 相关的肿瘤或癌症。

35 41. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述肿瘤或癌症选自表皮癌、结肠癌、直肠癌、

头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

42. 根据权利要求 41 所述的方法，其中所述肺癌为小细胞肺癌或非小细胞肺癌。

43. 根据权利要求 41 所述的方法，其中所述肺癌为奥希替尼耐药的肺癌。

5 44. 根据权利要求 41 所述的方法，其中所述胃癌为 ENHERTU 耐药的胃癌。

45. 根据权利要求 39-44 中任一项所述的方法，其中所述肿瘤或癌症为 KRAS 基因突变和/或 BRAF 基因突变的肿瘤或癌症。

46. 根据权利要求 45 所述的方法，其中所述 KRAS 基因突变和/或 BRAF 基因突变的肿瘤或癌症为 KRAS 基因突变和/或 BRAF 基因突变的结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌。

10 47. 根据权利要求 39-46 中任一项所述的方法，其中所述方法包括向所述受试者施用额外的治疗剂，所述治疗剂选自抗肿瘤剂、化疗剂、生长抑制剂和细胞毒性剂。

48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述额外的治疗剂为奥希替尼。

49. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述额外的治疗剂为 TKI 抑制剂或 PD1/PDL1 抑制剂。

15 50. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述额外的治疗剂为抗 PD1 抗体。

51. 根据权利要求 50 所述的方法，其中所述抗 PD1 抗体为斯鲁利单抗。

52. 根据权利要求 39-51 中任一项所述的方法，其中所述方法包括向所述受试者进一步施用放射疗法。

20 53. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或根据权利要求 28 所述的药物组合物在制备治疗或预防肿瘤或癌症的药物中的用途。

25 54. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或根据权利要求 28 所述的药物组合物与额外的治疗剂联用在制备治疗或预防与 EGFR 相关的疾病或病症或奥希替尼耐药的肿瘤或癌症的药物中的用途。

55. 根据权利要求 53 或 54 所述的用途，其中所述额外的治疗剂为奥希替尼或抗 PD1 抗体。

56. 根据权利要求 55 所述的用途，其中所述抗 PD1 抗体为斯鲁利单抗。

30 57. 一种预防或治疗奥希替尼耐药的肿瘤或癌症的方法，其包括向有此需要的受试者施用预防或治疗有效量的根据权利要求 1-27 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其前药、药学上可接受的盐、溶剂合物或药学上可接受的盐的溶剂合物或根据权利要求 28 所述的药物组合物。

35 58. 根据权利要求 57 所述的方法，其中所述肿瘤或癌症选自表皮癌、结肠癌、直肠癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

59. 根据权利要求 58 所述的方法，其中所述肺癌为小细胞肺癌或非小细胞肺癌。
60. 根据权利要求 57-59 中任一项所述的方法，其中所述方法包括向所述受试者施用额外的治疗剂，所述额外的治疗剂选自抗肿瘤剂、化疗剂、生长抑制剂和细胞毒性剂。
61. 根据权利要求 60 所述的方法，其中所述额外的治疗剂为奥希替尼。
- 5 62. 根据权利要求 60 所述的方法，其中所述额外的治疗剂为 TKI 抑制剂或 PD1/PDL1 抑制剂。
63. 根据权利要求 60 所述的方法，其中所述额外的治疗剂为抗 PD1 抗体。
64. 根据权利要求 63 所述的方法，其中所述抗 PD1 抗体为斯鲁利单抗。
65. 根据权利要求 57-64 中任一项所述的方法，其中所述方法包括向所述受试者进一步施
- 10 用放射疗法。