

靶向 GPC3 的抗体药物偶联物及其应用

相关申请的交叉引用

本申请是以 CN 申请号为 202311141587.3、申请日为 2023 年 9 月 5 日的申请，以及 CN 申请号为 202411179009.3、申请日为 2024 年 8 月 26 日的申请为基础，并主张所有优先权，所有 CN 申请的内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

本发明涉及药物化学领域，具体地，涉及 GPC3 抗体药物偶联物及其应用。

背景技术

肝癌是世界上第五大流行的癌症，也是癌症相关死亡的第三大常见原因。肝细胞癌（HCC）是肝癌的主要形式，占有肝癌的 90%。目前公认的治疗方案是以手术切除为核心的多学科综合治疗，短期疗效虽有提高，但长期疗效仍不理想，因此探究治疗肝癌更加有效的新治疗策略是目前国内外研究热点，开发新的肝癌治疗药物仍然迫在眉睫。

GPC3 全称 Glypican-3，是硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族的成员，并通过细胞膜上的糖基磷脂酰肌醇锚定连接于细胞表面。GPC3 的蛋白质核心由两个亚基组成，其中 N 末端亚基的大小约为 40 kDa，C 末端亚基约为 30 kDa。在哺乳动物中已经鉴定出六个 Glypicans（GPC1-6）。GPC3 在调节细胞增殖、分化、粘附和迁移方面起着重要作用。有研究认为 GPC3 与 Wnt 蛋白和卷曲蛋白受体（Frizzled）相互作用，形成复合物，并触发下游信号。GPC3 的核心蛋白质可以用作 Wnt 的共受体或接收器。

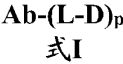
在人体中，GPC3 基因表达的 GPC3 蛋白在不同的发育时期和不同的组织中表达存在显著差异，如在成人正常组织中含量极少，在胃癌、乳腺癌、卵巢癌等癌症中低表达或不表达，而在肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）中常处于过度表达（阳性占比达 70% 以上）。研究表明，GPC3 是肝癌特异性相关抗原，可以在 HCC 早期协助确认病变的性质，可显著提高诊断的准确性。因此，GPC3 被认为在肝癌靶向治疗中潜力巨大。

GPC3 的靶向治疗近年来逐渐受到关注。目前，基于 GPC3 靶点的治疗策略主要集中在抗体药物、细胞治疗以及疫苗等方面。已经开发的治疗性抗 GPC3 抗体，包括 GC33（已完成 2 期临床试验）、YP7 和 HN3 等抗体以及双特异性抗体（如在进行临床试验的 ERY974 和 CM350）。这些抗体中有一些可以抑制肝癌细胞中的 Wnt 信号传导来发挥作用。此外，还有不同研究针对 GPC3 开发了嵌合抗原受体（CAR）T 细胞免疫疗法用于治疗肝癌。在具有异种移植或原位肝癌的小鼠模型研究中，CAR-T 细胞可以通过诱导穿孔蛋白和颗粒酶介导的细胞死亡并减少肿瘤细胞中的 WNT 信号传导从而消除 GPC3 阳性癌细胞。

发明内容

本申请的发明人通过大量实验和创造性劳动，制备得到了抗 GPC3 抗体药物偶联物（antibody drug conjugate, ADC），并证实其具有良好的生物学活性，由此完成了本发明。

为此，在本发明的第一方面，本发明提供了抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述抗体药物偶联物具有式 I 所示的结构，



其中：

Ab 为抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，所述抗 GPC3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、

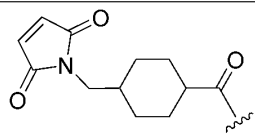
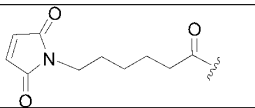
SEQ ID NO: 3 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 所示的序列或其突变体;

L 为接头, 其选自 mc-AAN、mc-AAQ、mcc-AAN、mcc-AAQ、mcc-Ala-Ala- (3-cyano-alanine)、mcc-Ala-Ala- (2-amino-4-cyanobutanoic acid)、mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln;

D 为细胞毒素, 其为依喜替康 (Exatecan, 简称为 Exa);

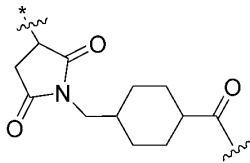
p 为 1-10 之间的任意数值 (如 1、1.5、2、2.5、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 或 10, 或者如 1-1.5、1.5-2、2-2.5、2.5-3、3-3.5、3.5-4、4-4.5、4.5-5、5-5.5、5.5-6、6-6.5、6.5-7、7-7.5、7.5-8、8-8.5、8.5-9、9-9.5 或 9.5-10)。

式 I 中, mc、mcc 的结构式如下所示:

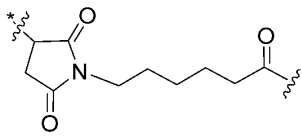
mcc	
mc	

式 I 中, L-D 表示接头与细胞毒素通过共价键相连, 形成 L-D 分子; Ab-(L-D)_p 表示 p 个 L-D 分子通过共价键偶联至 Ab。

本领域技术人员可以理解, mcc 与 Ab 通过共价键相连后形成如下结构片段:



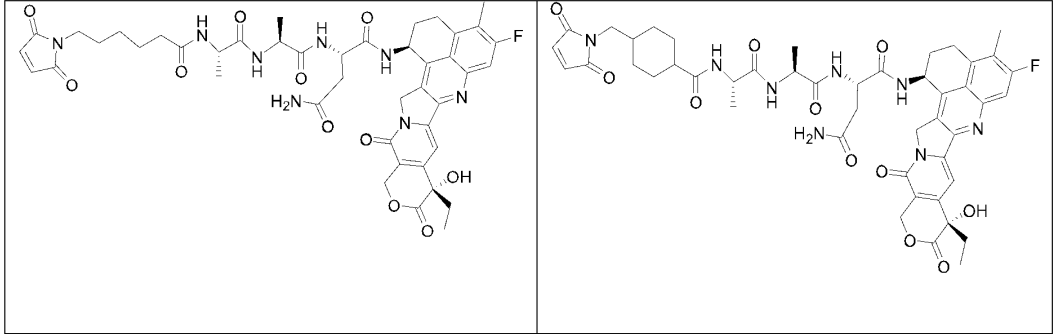
, mc 与 Ab 通过共价键相连后形成如下结构片段:

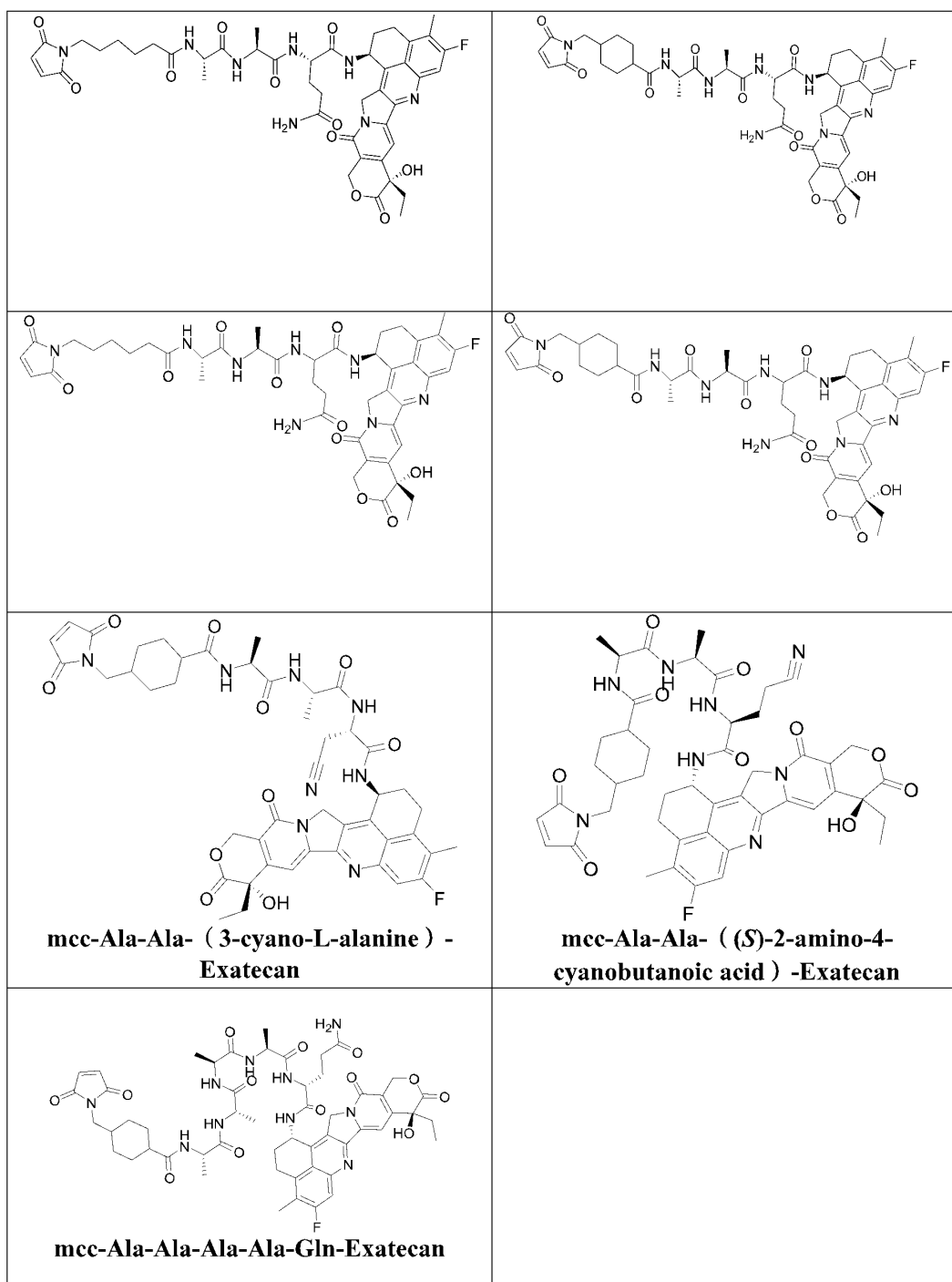


, 其中*端与 Ab 相连。

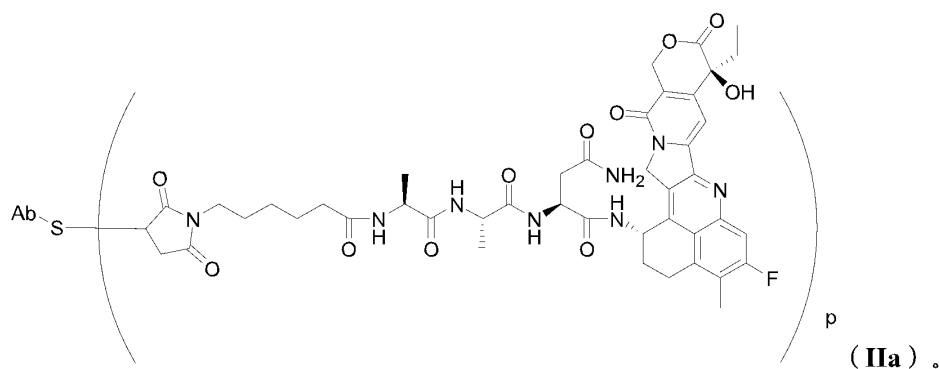
在一些实施方案中, L 选自 mc-AAN、mc-AAQ、mcc-AAN、mcc-AAQ、mcc-Ala-Ala- (3-cyano-L-alanine)、mcc-Ala-Ala- ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid)、mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln。

在一些实施方案中, 式 I 中, 未与 Ab 偶联前的 L-D 的结构式如下所示:

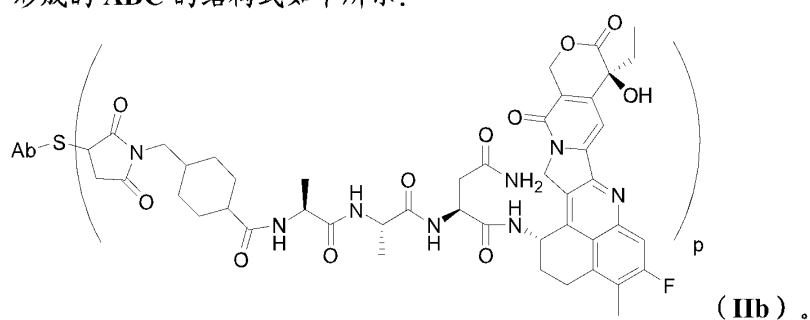




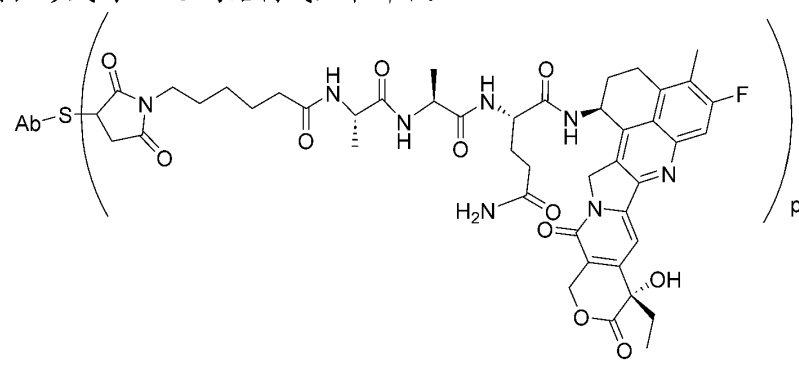
上述九个 L-D 通过共价键偶联至 Ab 上时，通过 L-D 末端的丁二酰亚胺与抗体中的巯基偶联形成。例如 mc-AAN-Exatecan 通过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



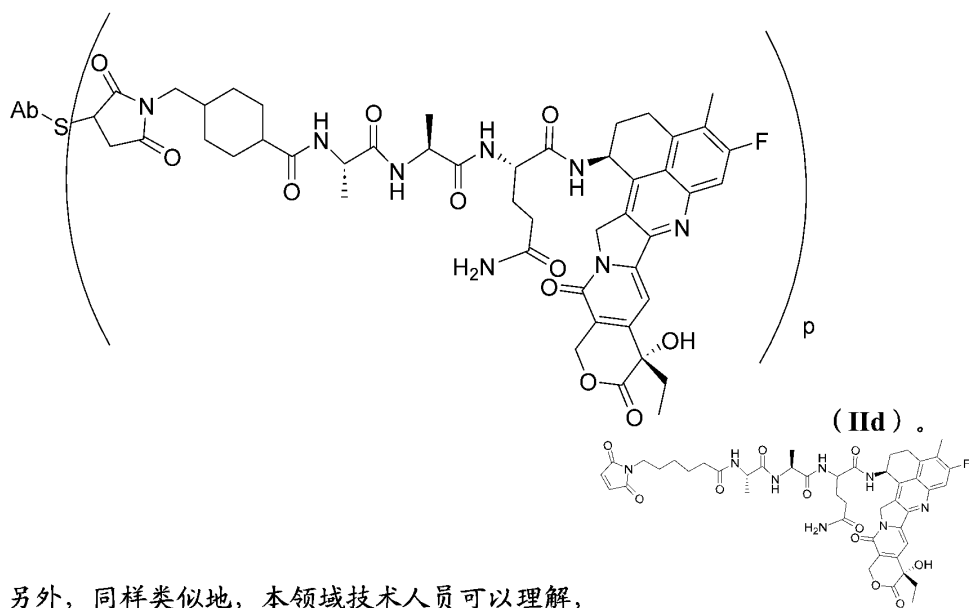
类似地，本领域技术人员可以理解，**mcc-AAN-Exatecan** 通过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



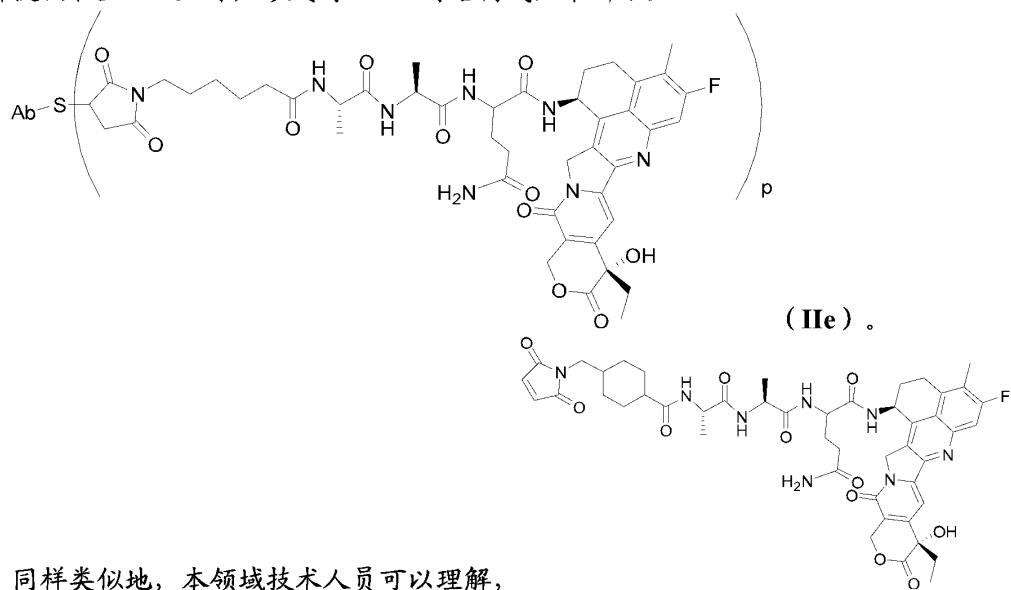
- 5 同样类似地，本领域技术人员可以理解，**mc-AAQ-Exatecan** 通过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



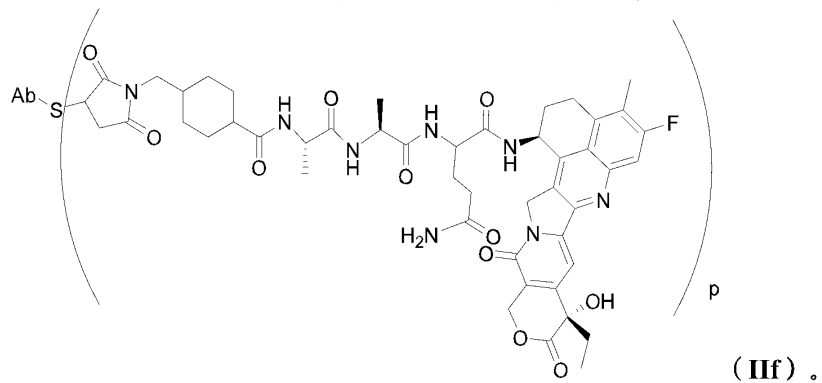
同样类似地，本领域技术人员可以理解，**mcc-AAQ-Exatecan** 通过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



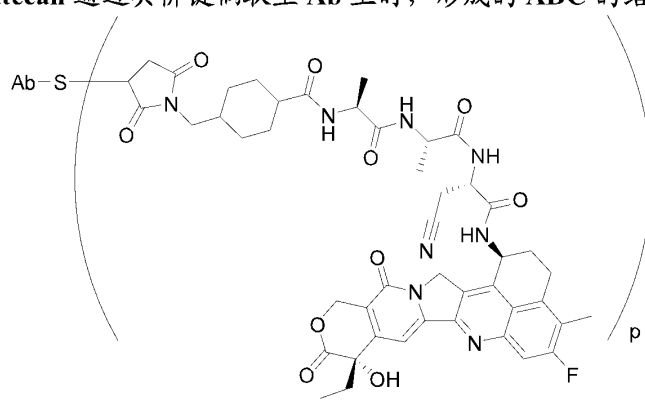
另外，同样类似地，本领域技术人员可以理解，共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



5 同样类似地，本领域技术人员可以理解，过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：

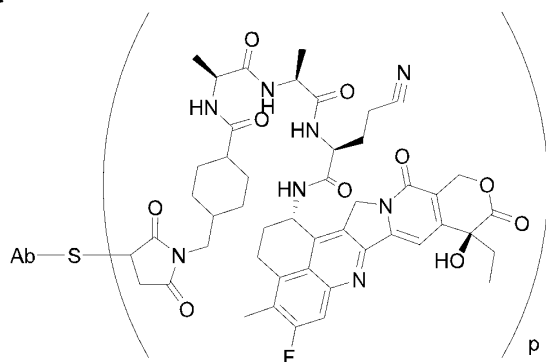


同样类似地，本领域技术人员可以理解，mcc-Ala-Ala-(3-cyano-L-alanine)-Exatecan 通过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



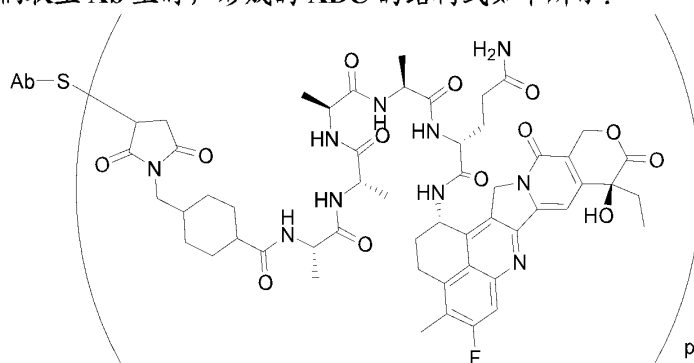
(IIg)。

同样类似地，本领域技术人员可以理解，mcc-Ala-Ala-(*S*)-2-amino-4-cyanobutanoic acid)-Exatecan 通过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



p (IIh)。

同样类似地，本领域技术人员可以理解，mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-Exatecan 通过共价键偶联至 Ab 上时，形成的 ADC 的结构式如下所示：



p (IIi)。

其中，上述形成的 ADC 中，抗体 Ab 通过-S-与 L-D 末端的丁二酰亚胺的碳原子相连接，该-S-并非另外引入 Ab 的巯基，而是抗体 Ab 被还原而打开二硫键后的抗体自身所含有的巯基。

本发明中，药物抗体比 (drug antibody ratio, DAR) 是指偶联到抗体的药物分子的个数 (例如，式 I 中的 p)。本文所述的抗体药物偶联物中包含的药物分子的个数可以是整数，也可以是小数。无论是整数还是小数，其指的均是每个抗体偶联的药物分子的平均数量。“p 为 1-10 之间的任意数值”，其表示，p 可以是选自 1-10 之间的任意整数 (包括端点 1 和 10)，也可以是选自 1-10 之间的任意小数。同时，本领域技术人员可以理解，即

使采用相同的制备方法，不同的批次制备得到的抗体药物偶联物的 DAR 值也不一定完全相同，例如，可以在上下不超过 0.5 的范围内浮动，例如，当 p 为 7.5 时，表示其 DAR 值可在 7.0 至 8.0 之间浮动。

5 药物抗体比 (DAR) 可以通过常规手段来测定，诸如质谱、ELISA 测定法、疏水相相互作用色谱 (HIC) 和 HPLC。还可以测定 ADC 在 p 方面的定量分布。在有些情况中，将 p 为某数值的同质 ADC 从具有其它药物载荷的 ADC 中分离、纯化和验证可以通过诸如 HIC、反相 HPLC 或电泳的手段来实现。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 所示，轻链可变区 CDR1、
10 CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 所示。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 所示的序列或其突变体。

15 在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区的序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 所示。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 所示的序列或其突变体，或者所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 15 所示的序列或其突变体。
20

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区的序列分别如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 所示，或者，所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区的序列分别如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 15 所示。
25

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的重链可变区包含如 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其突变体。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 8 所示。

30 在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其突变体。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 18 所示。

35 在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的重链恒定区选自人源性 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 恒定区或上述恒定区的突变体。在一些实施方案中，所述 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的轻链恒定区选自人源性 lambda 恒定区、kappa 恒定区或上述恒定区的突变体。

40 在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 19 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO: 19 所示序列的同源性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的重链恒定区的序列如 SEQ ID NO: 19 所示。

45 在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 20 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO: 20 所示序列的同源性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体的轻链恒定区的序列如 SEQ ID NO: 20 所

示。

在一些实施方案中，p 为 2-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中，p 为 4-8 之间的任意数值（例如 4.0、7.9 或 8.0）。

在本发明的第二方面，本发明提供了药物组合物，其包含前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

在一些实施方案中，所述药物组合物还包含至少一种药用辅料。

在一些实施方案中，所述药物组合物还包含用于治疗肿瘤的化疗药物、免疫治疗药物和免疫抑制剂中的至少一种。

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

在一些实施方案中，所述免疫治疗药物例如为 PD-1 单抗（例如帕博利珠单抗、纳武利尤单抗）、PD-L1 单抗（例如 Atezolizumab）、TIGIT 单抗、4-1BB 单抗、VEGFR2 单抗（例如 Ramucirumab、阿帕替尼）、HER2 单抗（例如曲妥珠单抗、Trastuzumab biosimilar、Trastuzumab-dkst）等，或它们的组合。

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

在本发明的第三方面，本发明提供了前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物或者前述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗与 GPC3 阳性相关的疾病。

在本发明的第四方面，本发明提供了前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物或者前述的药物组合物，其用于预防和/或治疗与 GPC3 阳性相关的疾病。

在本发明的第五方面，本发明提供了治疗和/或预防与 GPC3 阳性相关的疾病的方法，其包括：给予有需要的受试者治疗和/或预防有效量的前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物或者前述的药物组合物。

在一些实施方案中，上述与 GPC3 阳性相关的疾病选自肝癌、肺癌、胃癌、头颈癌、食管癌、默克尔细胞癌、脂肪肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、神经胶质瘤、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、胆囊癌、胶质母细胞瘤。

在一些实施方案中，上述与 GPC3 阳性相关的疾病为肝癌。

在本发明的第六方面，本发明提供了一种体外非治疗性抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长或抑制肿瘤细胞增殖的方法，其包括：将肿瘤细胞与前述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物或者前述的药物组合物进行接触，所述肿瘤为 GPC3 表达的肿瘤。

在一些实施方案中，所述 GPC3 表达的肿瘤选自肝癌、肺癌、胃癌、头颈癌、食管癌、默克尔细胞癌、脂肪肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、神经胶质瘤、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、胆囊癌、胶质母细胞瘤。

在一些实施方案中，所述 GPC3 表达的肿瘤为肝癌。

有益效果

- 1、本发明新开发的 GPC3-ADC 在多种肿瘤（如肝癌）细胞中表现出较强的细胞杀伤作用。
- 2、本发明新开发的 GPC3-ADC 在多种肿瘤模型（如人肝癌 PDX 肿瘤模型）中表现出了显著的抑制肿瘤细胞生长的药效作用。

附图说明

- 图 1 表示各 GPC3 抗体对 GPC3-CHO-K1 细胞的亲和力；
图 2 表示各 GPC3 抗体对 HepG2 细胞的亲和力；
图 3 表示各 GPC3 抗体对 Huh-7 细胞的亲和力；
图 4 表示各 GPC3 抗体在 HepG2 细胞上的内化；
图 5 表示 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAN-Exatecan（ADC-1）疏水作用色谱图；
图 6 表示 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAQ-Exatecan（ADC-2）疏水作用色谱图；
图 7 表示 Hu 52H5D3B8-8-mc-AAQ-Exatecan（ADC-3）疏水作用色谱图；
图 8 表示 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAQ-Exatecan（ADC-4）疏水作用色谱图；
图 9 表示 Hu 52H5D3B8-7-mcc-AAQ-Exatecan（ADC-5）疏水作用色谱图；
图 10 表示 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAQ-Exatecan（ADC-6）疏水作用色谱图；
图 11 表示 Hu 52H5D3B8-7-mcc-AAQ-Exatecan（ADC-7）疏水作用色谱图；
图 12 表示 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AA-(3-cyano-L-alanine)-Exatecan（ADC-8）疏水作用色谱图；
图 13 表示 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAAAQ-Exatecan（ADC-9）疏水作用色谱图；
图 14 表示 GPC3 抗体及 ADC 对 Huh7 细胞的亲和力；
图 15 表示 GPC3 抗体及 ADC 在 Huh7 细胞上的内吞结果；
图 16-图 18 表示不同 GPC3-ADC 对 Huh7 细胞杀伤的代表性图；
图 19 表示 GPC3-ADC 对人肝癌裸小鼠 PDX 模型 LIV#219 肿瘤生长抑制活性；
图 20 表示 GPC3-ADC 对人肝癌裸小鼠 PDX 模型 LIV#219 的动物体重的影响；
图 21 表示 GPC3-ADC 对人肝癌裸小鼠 PDX 模型 LI6653 肿瘤生长抑制活性；
图 22 表示 GPC3-ADC 对人肝癌裸小鼠 PDX 模型 LI6653 的动物体重的影响。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

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。

在本发明中，除非另有说明，否则任何数值范围应理解为包括范围内的任何值或任何子范围。

在本发明中，术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体的轻链可分为 κ 和 λ 两类。重链可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 五种，依据重链的不同可将抗体分为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE 五类。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还

包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区 (V_H) 和重链恒定区 (C_H) 组成。重链恒定区由 3 个结构域 (C_{H1}、C_{H2} 和 C_{H3}) 组成。各轻链由轻链可变区 (V_L) 和轻链恒定区 (C_L) 组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子, 包括免疫系统的各种细胞 (例如, 效应细胞) 和补体系统的组分 C1q 的结合。V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域 (称为互补决定区 (CDR)), 其间散布有较保守的称为骨架区 (FR) 的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区 (V_H 和 V_L) 分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

在本发明中, “人源化”抗体是指非人 (例如小鼠) 抗体形式, 其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段 (如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或者抗体的其它抗原结合亚序列), 含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地, 人源化抗体是人免疫球蛋白 (接受者抗体), 其中接受者抗体的互补决定区 (CDR) 的残基由来自具有期望的特异性、亲和性和能力的非人物种 (供体抗体) 如小鼠、大鼠或者兔的 CDR 残基置换。

此外, 在人源化中, 还可能对 V_H 和/或 V_L 的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基进行突变, 由此改善抗体的一或多种结合特性 (例如亲和性)。可进行例如 PCR 介导的突变引入突变, 其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常, 引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外, CDR 内的突变通常不超过一个或两个。

在本发明中, 术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽, 其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力, 和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合, 其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、互补决定区 (CDR) 片段、scFv、双抗体 (diabody)、单域抗体 (single domain antibody)、嵌合抗体、线性抗体 (linear antibody)、纳米抗体 (技术来自 Domantis)、probody 和这样的多肽, 其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。工程改造的抗体变体综述于 Holliger 等, 2005; Nat Biotechnol, 23: 1126-1136 中。

在本发明中, 术语“Fd”意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段; 术语“Fab 片段”意指由 V_L、V_H、C_L 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段; 术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段; 术语“Fab' 片段”意指还原连接 F(ab')₂ 片段中两个重链片段的二硫键后所获片段, 由一条完整的轻链和重链的 Fd 片段 (由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成) 组成。

在本发明中, 术语“Fv”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段。Fv 片段通常被认为是, 能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为, 六个 CDR 赋予抗体的抗原结合特异性。然而, 即便是一个可变区 (例如 Fd 片段, 其仅仅含有三个对抗原特异的 CDR) 也能够识别并结合抗原, 尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

在本发明中, 术语“scFv”是指, 包含 V_L 和 V_H 结构域的单个多肽链, 其中所述 V_L 和 V_H 通过接头 (linker) 相连 (参见, 例如, Bird 等人, Science 242:423-426 (1988); Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Roseburg 和 Moore 编, Springer-Verlag, 纽约, 第 269-315 页 (1994))。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH₂-V_L-接头-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-接头-V_L-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸

序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头,但也可使用其变体(Holliger 等人(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alftan 等人(1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi 等人(2001), *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu 等人(1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 和 Roovers 等人(2001), *Cancer Immunol.*描述。在一些情况下, scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键。在本发明的某些实施方案中, scFv 可形成 di-scFv, 其指的是两个或两个以上单个 scFv 串联而形成抗体。在本发明的某些实施方案中, scFv 可形成(scFv)₂, 其指的是两个或两个以上单个 scFv 并联而形成抗体。

在本发明中,术语“双抗体”意指,其 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见,例如, Holliger P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); Poljak R. J.等人, *Structure* 2:1121-1123 (1994))。

在本发明中,术语“单域抗体(single-domain antibody, sdAb)”具有本领域技术人员通常理解的含义,其是指由单个单体可变抗体结构域(例如单个重链可变区)所组成的抗体片段,其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力。单域抗体也称为纳米抗体(nanobody)。

在本发明中,术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其中可变区序列源自一个物种,恒定区序列源自另一物种,如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

上述各个抗体片段均保持了特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合。

可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如,重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的抗体)获得抗体的抗原结合片段(例如,上述抗体片段),并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

本发明的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得(参见 Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117 (1992); Brennan et al., *Science* 229:81 (1985))。另外,这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生(参见 Hudson, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 548-557 (1999); Little et al., *Immunol. Today*, 21: 364-370 (2000))。比如, Fab'片段可以直接从宿主细胞中获得;可以将 Fab'片段化学偶联形成 F(ab')₂ 片段(Carter et al., *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992))。另外, Fv、Fab 或 F(ab')₂ 片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

在本发明中,用于确定序列同源性和序列相似性百分数的算法是例如 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,它们分别描述在 Altschul 等(1977) *Nucl. Acid. Res.* 25: 3389-3402 和 Altschul 等(1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410。采用例如文献中所述或者默认参数, BLAST 和 BLAST 2.0 可以用于确定本发明的氨基酸序列同源性百分数。执行 BLAST 分析的软件可以通过美国国立生物技术信息中心(NCBI)为公众所获得。

在本发明中,所述与氨基酸序列具有至少 70% 的序列同源性的氨基酸序列包括与所述氨基酸序列基本同一的多肽序列,例如当采用本文所述方法(例如采用标准参数的 BLAST 分析)时,与本发明多肽序列相比含有至少 70% 序列同源性、优选至少 75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的序列同源性的那些序列。

在本发明中,所述氨基酸序列的突变体指的是与所述氨基酸序列的同源性大于 70%,例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列,例如具有 3 个、2 个或 1 个取代、缺失或添加氨基酸的序列。优选的是,取代、添加或缺失的氨基酸不超过 3 个氨基酸。更优选的是,取代、添加或缺失的氨基酸不超过 2 个氨基酸。最优选的是,取代、添加或缺失的氨基酸不超过 1 个氨基

酸。

“取代型”变体是天然序列中至少一个氨基酸残基被除去并被不同的氨基酸插入其相同位置的变体。所述取代可为单个的，其中该分子中仅有一个氨基酸被取代；或可为多个的，其中该相同分子有两个或更多的氨基酸被取代。多个取代可位于连续的位点。同样，一个氨基酸可被多个残基取代，其中这样的变体包括取代和插入二者。“插入型”（或“添加型”）变体是一个或多个氨基酸被插入到紧邻一段天然序列某个特定位置处的氨基酸的变体。紧邻氨基酸意指与该氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能团连接。“缺失型”变体是天然氨基酸序列中一个或多个氨基酸被除去的变体。通常情况下，缺失型变体在其分子的特定区域内有一个或两个氨基酸被缺失。

在某些实施方案中，在偶联反应中少于理论最大值的药物模块偶联至抗体。一般而言，抗体不包含许多游离的和反应性的半胱氨酸硫醇基，其可连接药物模块；事实上，抗体中的大多数半胱氨酸硫醇基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中，可以在部分或完全还原性条件下用还原剂诸如二硫苏糖醇（DTT）或三羧基乙基膦（TCEP）还原抗体以产生反应性半胱氨酸硫醇基。

本发明中，术语“药学上可接受的盐”是指，(i) 本发明所提供的偶联物中存在的酸性官能团与适当的无机或者有机阳离子（碱）形成的盐，并且包括但不限于，碱金属盐，如钠盐、钾盐、锂盐等；碱土金属盐，如钙盐、镁盐等；其他金属盐，如铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等；无机碱盐，如铵盐；有机碱盐，如叔辛基胺盐、二苄基胺盐、吗啉盐、葡糖胺盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己基胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基-苄乙基胺盐、哌嗪盐、四甲基胺盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐。以及，(ii) 本发明所提供的偶联物中存在的碱性官能团与适当的无机或者有机阴离子（酸）形成的盐，并且包括但不限于，氢卤酸盐，如氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐等；无机酸盐，如硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等；低级烷磺酸盐，如甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐等；芳基磺酸盐，如苯磺酸盐、对苯磺酸盐等；有机酸盐，如醋酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等；氨基酸盐，如甘氨酸盐、三甲基甘氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐等。

药学上可接受的盐可使用本领域熟知的标准程序获得，例如，通过将足量的碱性物质和提供药学上可以接受的阴离子的合适的酸反应，或者，通过将足量的酸性物质和提供药学上可以接受的阳离子的合适的碱反应。

在本发明中，溶剂合物表示这些形式的本发明的抗体药物偶联物：所述抗体药物偶联物通过与溶剂分子配位而形成的固态或液态形式的复合物。水合物是溶剂合物的一种具体形式，其具有配位的水分子。在本发明中，水合物是优选的溶剂合物。

制备各种含有一定量的活性成分的药物组合物的方法是已知的，或根据本发明的公开内容对于本领域技术人员是显而易见的。如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995) 所述，制备所述药物组合物的方法包括掺入适当的药学赋形剂、载体、稀释剂等，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。

本发明中，所述药用辅料是指生产药品和调配处方时，使用的赋形剂和附加剂，是指除活性成分外，在安全性方面已进行了合理的评估，并且包含在药物制剂中的物质。药用辅料除了赋型、充当载体、提高稳定性外，还具有增溶、助溶、缓控释等重要功能，是可能会影响到药品的质量、安全性和有效性的重要成分。根据其来源可分为天然物、半合成物和全合成物。根据其作用与用途可分为：溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、黏合剂、崩解剂、填充剂、润滑剂、湿润剂、渗透压调节剂、稳定剂、助流剂、矫味剂、防腐剂、助悬剂、包衣材料、芳香剂、抗黏着剂、抗氧剂、螯合剂、渗透促进剂、pH 调节剂、缓冲剂、增塑剂、表面活性剂、发泡剂、消泡剂、增稠剂、包合剂、保湿

剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂与反絮凝剂、助滤剂、释放阻滞剂等；根据其给药途径可分为口服、注射、黏膜、经皮或局部给药、经鼻或口腔吸入给药和眼部给药等。同一药用辅料可用于不同给药途径的药物制剂，且有不同的作用和用途。

本发明中，所述药物组合物可根据给药途径制成各种适宜的剂型。例如片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服溶液剂、口服混悬剂、口服乳剂、散剂、酏剂、糖浆剂、注射剂、栓剂、软膏剂、乳膏剂、糊剂、眼用制剂、丸剂、植入剂、气雾剂、粉雾剂、喷雾剂等。其中，所述的药物组合物或适宜的剂型可以含有 0.01 mg 至 1000 mg 的本发明的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

本文使用的术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：(a)预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状；(b)抑制疾病的症状，即阻止其发展；或(c)缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

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

在本发明中，“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。本发明的物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还涵盖该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量会低于治疗有效量。在癌症的情况中，药物的治疗有效量可减少癌细胞数；缩小肿瘤体积；抑制（即一定程度的减缓，优选停止）癌细胞浸润到周围器官中；抑制（即一定程度的减缓，优选停止）肿瘤转移；一定程度的抑制肿瘤生长；和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。

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

下面结合具体实施例对本发明进行进一步的解释说明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

实施例 1 人源化 GPC3 抗体的制备、序列及表征

一、人源化 GPC3 抗体的制备

为了获得靶向人 GPC3 的小鼠单克隆抗体，利用人 GPC3 蛋白免疫 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠并利用 ELISA 法（人 GPC3 蛋白）和 FACS 法（人 GPC3 过表达的 CHO-K1 细胞）进行血清中抗体效价的检测。经过多轮免疫后，选取效价较高的小鼠进行抗人 GPC3 杂交瘤细胞株建立，并通过 ELISA 法和 FACS 法进行阳性克隆的鉴定。随后进行亚克隆筛选鉴定，并获得单克隆 52H5D3B8。通过抗体人源化设计，最终获得了新人源化抗体 Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8。

二、人源化 GPC3 抗体的序列及表征

1、抗体序列

Hu 52H5D3B8-7:

VH:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAI
HPGSGGTAYNQKFGRVTMTADKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRFYSYAYWG
QGTLLTVSS (SEQ ID NO: 8)

其中下划线部分从左向右依次为 CDR1 (SEQ ID NO: 1)、CDR2 (SEQ ID NO: 2)、CDR3 (SEQ ID NO: 3)；

未下划线部分从左向右依次为 FR1 (SEQ ID NO: 4)、FR2 (SEQ ID NO: 5)、FR3 (SEQ ID NO: 6)、FR4 (SEQ ID NO: 7)。

5 VL:

DVVMQTPTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSIHVPYTFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO: 16)

10 其中下划线部分从左向右依次为 CDR1 (SEQ ID NO: 9)、CDR2 (SEQ ID NO: 10)、CDR3 (SEQ ID NO: 11)；

未下划线部分从左向右依次为 FR1 (SEQ ID NO: 12)、FR2 (SEQ ID NO: 13)、FR3 (SEQ ID NO: 14)、FR4 (SEQ ID NO: 15)。

Hu 52H5D3B8-8:

15 VH:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAI
HPGSGGTAYNQKFKGRVTMTADKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCTRFYSAAYWG
QGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 8)

20 其中下划线部分从左向右依次为 CDR1 (SEQ ID NO: 1)、CDR2 (SEQ ID NO: 2)、CDR3 (SEQ ID NO: 3)；

未下划线部分从左向右依次为 FR1 (SEQ ID NO: 4)、FR2 (SEQ ID NO: 5)、FR3 (SEQ ID NO: 6)、FR4 (SEQ ID NO: 7)。

VL:

25 DVVMQTPTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSIHVPYTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 18)

其中下划线部分从左向右依次为 CDR1 (SEQ ID NO: 9)、CDR2 (SEQ ID NO: 10)、CDR3 (SEQ ID NO: 11)；

30 未下划线部分从左向右依次为 FR1 (SEQ ID NO: 12)、FR2 (SEQ ID NO: 13)、FR3 (SEQ ID NO: 17)、FR4 (SEQ ID NO: 15)。

Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 的重链恒定区均为:

35 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 19)

40 Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 的轻链恒定区均为:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 20)

45 对照抗体:

(1) GC33 抗体 (Chugai Pharmaceutical)

GC33 抗体的制备在 US7919086B2 中有描述。

GC33 抗体的重链和轻链的 CDR 信息如下:

抗体	CDR	氨基酸序列	SEQ ID NO
GC33 (H)	CDR1	DYEMH	21
	CDR2	ALDPKTGDTAYSQKFKG	22
	CDR3	FYSYTY	23
GC33 (L)	CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	24
	CDR2	KVSNRFS	25
	CDR3	SQNTHPPT	26

GC33 抗体的重链和轻链的 FR 信息如下:

抗体	FR	氨基酸序列	SEQ ID NO
GC33 (H)	FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	27
	FR2	WVRQAPGQGLEWMG	28
	FR3	RVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTR	29
	FR4	WGQGTLLVTVSS	30
GC33 (L)	FR1	DVVMQTQSPVTPGEPASISC	31
	FR2	WYLQKPGQSPQLLIY	32
	FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	33
	FR4	FGQGTLKLEIK	34

(2) Y035 抗体 (CARSGEN Therapeutics)

Y035 抗体的制备在 CN106397593B 中有描述。人源化 Y035 抗体的重链和轻链的可变区氨基酸序列信息如下:

人源化 Y035 重链可变区 (SEQ ID NO: 42):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTHSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAI
HPGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARFYSYAYWGQ
GTLVTVSA

其中下划线部分从左向右依次为 CDR1 (SEQ ID NO: 35)、CDR2 (SEQ ID NO: 36)、CDR3 (SEQ ID NO: 37);

未下划线部分从左向右依次为 FR1 (SEQ ID NO: 38)、FR2 (SEQ ID NO: 39)、FR3 (SEQ ID NO: 40)、FR4 (SEQ ID NO: 41)。

人源化 Y035 轻链可变区 (SEQ ID NO: 50):

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNNRFSQVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSIYVPYTFGGQTK
LEIKR

其中下划线部分从左向右依次为 CDR1 (SEQ ID NO: 43)、CDR2 (SEQ ID NO: 44)、CDR3 (SEQ ID NO: 45);

未下划线部分从左向右依次为 FR1 (SEQ ID NO: 46)、FR2 (SEQ ID NO: 47)、FR3 (SEQ ID NO: 48)、FR4 (SEQ ID NO: 49)。

GC33 抗体和 Y035 抗体的重链恒定区均为:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 19)

GC33 抗体和 Y035 抗体的轻链恒定区均为：
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 20)

5

2、人源化 GPC3 抗体的细胞结合

发明人通过 FACS 评估了 Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 与人 GPC3 过表达的 CHO-K1 细胞、HepG2 细胞和 HuH-7 细胞的结合活性，并与已知抗 GPC3 抗体 GC33 和 Y035 进行比较。为了评估 Hu 52H5D3B8-7 与 Hu 52H5D3B8-8 这两个抗体的 CDR 区和 Hu 52H5D3B8-7 抗体的 FR 区，发明人制备了两个重组抗体。“Hu 52H5D3B8-7/8 CDRs with Y035 FRs”是指该抗体由 Hu 52H5D3B8-7 或 Hu 52H5D3B8-8 抗体的 CDR 区与 Y035 抗体的 FR 区重组。“Y035 CDRs with Hu 52H5D3B8-7 FRs”抗体是指该抗体由 Y035 抗体的 CDR 区与 Hu 52H5D3B8-7 抗体的 FR 区重组。

首先将 GPC3-CHO-K1 细胞、HepG2 细胞和 Huh-7 细胞与 Fc 阻断剂在 4℃ 孵育 15 分钟。用 FACS 缓冲液 (PBS+2% FBS) 洗涤细胞，将 5 倍连续稀释的 Hu 52H5D3B8-7、Hu 52H5D3B8-8、Hu 52H5D3B8-7/8 CDRs with Y035 FRs、Y035 CDRs with Hu 52H5D3B8-7 FRs 或 Y035 mAb (起始浓度 100 nM) 加入每个孔中，在 4℃ 孵育 60 分钟。用 FACS 缓冲液洗涤细胞并在室温下用 2% PFA 固定 15 分钟。用 FACS 缓冲液清洗后，将 Alexa Fluor® 647 AffiniPure 山羊抗人 IgG 添加到每个孔中，并在室温下孵育 30 分钟。样品用 FACS 缓冲液洗涤两次。用流式细胞仪 MACSQuant Analyzer 16 对细胞样品进行荧光信号分析，用 MFI (GeoMean fluorescence intensity) 表示。实验结果如图 1-图 3 所示，Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 与 GPC3-CHO-K1 细胞、HepG2 细胞和 Huh-7 细胞的结合亲和力相当，高于其他抗体。此外，无论是抗体“Hu 52H5D3B8-7/8 CDRs with Y035 FRs”还是抗体“Y035 CDRs with Hu 52H5D3B8-7 FR”都表现出比 Y035 更高的细胞亲和力，这意味着 Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 抗体的 CDR 区或 Hu 52H5D3B8-7 抗体的 FR 区都优于 Y035 抗体。各测试抗体在 GPC3-CHO-K1 细胞、HepG2 细胞和 Huh-7 细胞上的 EC₅₀ 值如下表 1 所示。

表 1: 各 GPC3 抗体对 GPC3-CHO-K1 细胞、HepG2 细胞和 Huh-7 细胞的亲和力 (EC₅₀)

抗体名称	EC ₅₀ (nM)		
	GPC3-CHO-K1	HepG2	Huh-7
Hu 52H5D3B8-7	0.4459	0.4051	0.4637
Hu 52H5D3B8-8	0.4106	0.3512	0.4177
GC33	0.9556	0.7449	0.9528
Y035	1.460	1.250	1.178
Hu 52H5D3B8-7/8 CDRs with Y035 FRs	0.7627	0.7687	0.7824
Y035 CDRs with Hu 52H5D3B8-7 FRs	0.9072	0.6107	0.6674

30

3、人源化 GPC3 抗体的细胞内化

评估 Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 在 HepG2 细胞上的内化，并与已知的 GPC3 抗体 Y035 (CARSGEN Therapeutics) 进行内化比较。除此以外，为了评估 Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 抗体的 CDR 和 FR，发明人在体外内化实验中还评估了抗体“Hu 52H5D3B8-7/8 CDRs with Y035 FRs”和抗体“Y035 CDRs with Hu 52H5D3B8-7

35

FRs”。

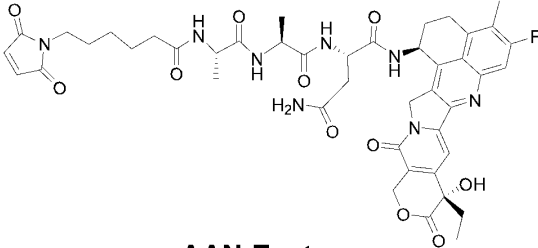
pHAb 硫醇染料是 pH 传感器染料，在 pH> 7 时具有非常低的荧光，当将其内化到内体或溶酶体时（pH 分别为 6.3 或 4.7），荧光会显著增加。简而言之，将 pHAb 硫醇染料标记的 α -hIgG 二抗（10 μ g/mL）与抗体（20 μ g/mL）孵育 30 分钟。孵育后，将混合抗体连续稀释 2 倍，并将稀释的混合物加入每个孔中用 2×10^4 HepG2 细胞预先种植的 96 孔测定板中。经 48 小时培养后，在多模式读取器上捕获荧光信号（Envision® 2105）。实验结果如图 4 所示，Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 均显示出比其他抗体更高的内化效果。此外，抗体“Hu 52H5D3B8-7/8 CDRs with Y035 FRs”显示出比 Y035 更高的内化效果（更高的 Top 值与相当的 EC₅₀），这意味着 Hu 52H5D3B8-7 和 Hu 52H5D3B8-8 的 CDRs 优于 Y035。各测试抗体的 EC₅₀ 和 Top 值如下表 2 所示。

表 2: 各 GPC3 抗体在 HepG2 细胞上的内吞（EC₅₀、Top）

抗体名称	EC ₅₀ （ μ g/mL）	Top
Hu 52H5D3B8-7	0.7195	58555
Hu 52H5D3B8-8	0.7805	62378
Y035	1.078	51973
Hu 52H5D3B8-7/8 CDRs with Y035 FRs	1.142	59223
Y035 CDRs with Hu 52H5D3B8-7 FRs	1.107	52157

实施例 2 连接子药物偶联物（linker-payload）的制备

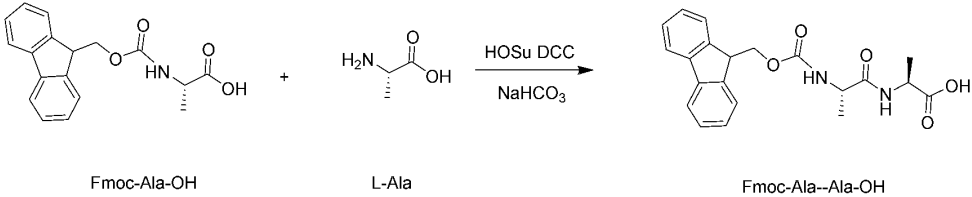
一、mc-AAN-Exatecan 的制备



mc-AAN-Exatecan

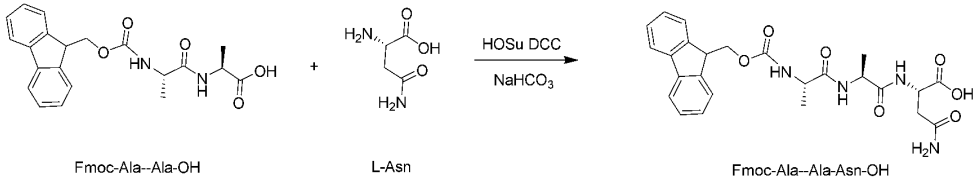
1. 中间体一的合成

将 Fmoc-Ala-OH（N-苄氧羰基-L-丙氨酸，CAS 号：35661-39-3）经 HOSu（N-羟基丁二酰亚胺，CAS 号：6066-82-6）活化后，与 L-Ala（L-丙氨酸，CAS 号：56-41-7）反应得到中间体一；具体的步骤是，反应瓶内加入 Fmoc-Ala-OH（3g，1.0eq）、HOSu（1.45g，1.3eq），加入 21mL 的 THF，控制温度在室温，搅拌条件下缓慢加入 DCC（2.59g，1.3eq），后室温进行反应，用 HPLC 监控，反应结束后，将反应液过滤，滤饼用 THF（6mL）淋洗。滤液中加入纯化水（15mL），后加入 L-Ala（1.12g，1.3eq），碳酸氢钠固体（0.81g，1.0eq），室温搅拌反应，HPLC 监控，反应结束后加入柠檬酸（2.02g，1.0eq）搅拌，然后反应液用乙酸乙酯萃取，浓缩有机相，加入 DMF（12mL）溶解产品，过滤后通过 prep-HPLC（制备高效液相色谱），浓缩制备液至无明显液滴流出后，用乙酸乙酯萃取，将乙酸乙酯相浓缩至干得到中间体一，反应式如下：



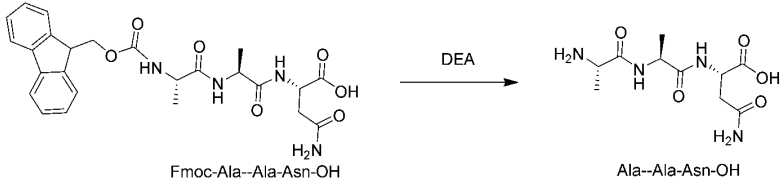
2. 中间体二的合成

将中间体一 (N-[芴甲氧羰基]-L-丙氨酰基-L-丙氨酸, CAS 号: 87512-31-0) 经 HOSu (N-羟基丁二酰亚胺, CAS 号: 6066-82-6) 活化后, 与 L-Asn (L-天冬酰胺, CAS 号: 70-47-3) 反应得到中间体二; 具体的步骤是, 反应瓶中加入中间体一 (0.87g, 1.0eq)、HOSu (0.34g, 1.3eq)、THF (9mL), 控制温度在室温, 搅拌条件下缓慢加入 DCC (0.61g, 1.3eq), 室温进行反应, 用 HPLC 监控, 反应结束后, 将反应液过滤, 滤饼用 THF (2mL) 淋洗。滤液中加入纯化水 (10mL), 加入 L-Asn (0.34g, 1.1eq), 碳酸氢钠固体 (0.19g, 1.0eq), 室温搅拌反应, HPLC 监控, 反应结束后, 加入一水合柠檬酸 (0.48g, 1.0eq) 搅拌, 浓缩反应液除去大部分溶剂, 制备纯化残余物, 浓缩制备液至无明显液滴流出后, 用乙酸乙酯萃取, 有机相浓缩至干得到中间体二, 反应式如下:



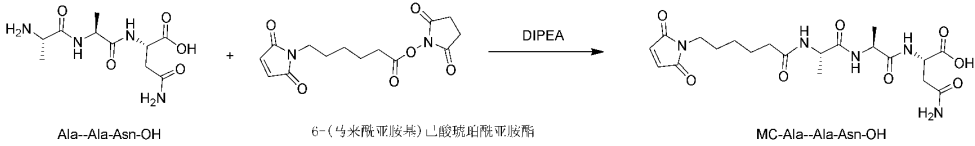
3. 中间体三的合成

中间体二加 DEA (二乙胺, CAS 号: 109-89-7) 脱 Fmoc 后, 得到中间体三; 具体的步骤是, 反应瓶中加入中间体二 (100mg)、DMF (1.5mL), 控制温度在室温, 滴加 DEA (300μL), 室温进行反应, HPLC 监控, 至中间体二无剩余, 浓缩除去 DMF, 加入 DCM (4mL), 纯化水 (4mL), 搅拌后分液, 将水相浓缩至干得到中间体三, 反应式如下:



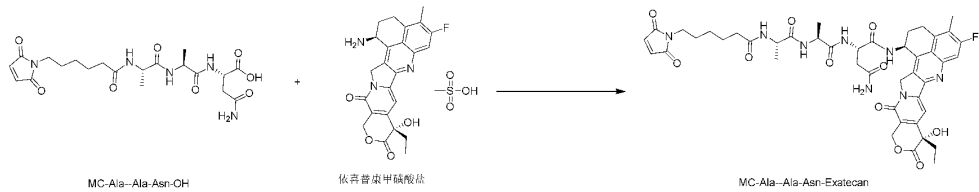
4. 中间体四的合成

中间体三与 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯 (CAS 号: 55750-63-5) 反应得到中间体四; 具体步骤是, 反应瓶中加入中间体三 (92mg, 1.0eq)、6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯 (135mg, 1.3eq)、DMF (1.5mL)、DIPEA (0.059mL, 1.0eq), HPLC 监控, 反应完成后, 制备纯化, 浓缩制备液, 得到中间体四, 反应式如下:



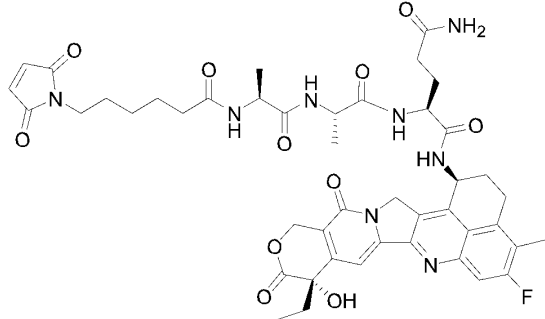
5. 产品的合成

中间体四与依喜替康甲磺酸盐 (CAS 号: 169869-90-3) 经缩合反应得到产品; 具体的步骤是, 室温条件下, 反应瓶中加入中间体四 (26mg, 1.0eq), 加入 DMF (1.5mL), 依次加入依喜替康甲磺酸盐 (29.6mg, 1.0eq)、EEDQ (20.7mg, 1.5eq), HATU (31.8mg, 1.5eq)、DMAP (0.7mg, 0.1eq)、DIPEA (29.2μL, 3.0eq), 室温进行反应。HPLC 监控, 反应完成后, 制备纯化, 浓缩制备液, 得到产品, 反应式如下:



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.22-8.29 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.94-8.05 (d, *J*=2.0 Hz, 3H), 7.83-7.88(d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.75-7.82(d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.34-7.40 (m, 1H), 7.28-7.33 (m, 1H), 6.96-7.02(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.87-6.94(m, 1H), 5.42-5.55(m, 1H), 5.41-5.46(m, 2H), 5.21-5.26(m, 1H), 4.41-4.49(m, 1H), 4.00-4.12(m, 2H), 3.32-3.40(m, 2H), 3.12-3.17(m, 2H), 2.86-2.96(m, 2H), 2.71-2.76(m, 2H), 2.36-2.43(m, 2H), 2.14-2.24(m, 1H), 1.97-2.07(m, 3H), 1.81-1.93(m, 2H), 1.36-1.52(m, 4H), 1.05-1.25(m, 8H), 0.83-0.93(m, 3H).

二、mc-AAQ-Exatecan 的制备

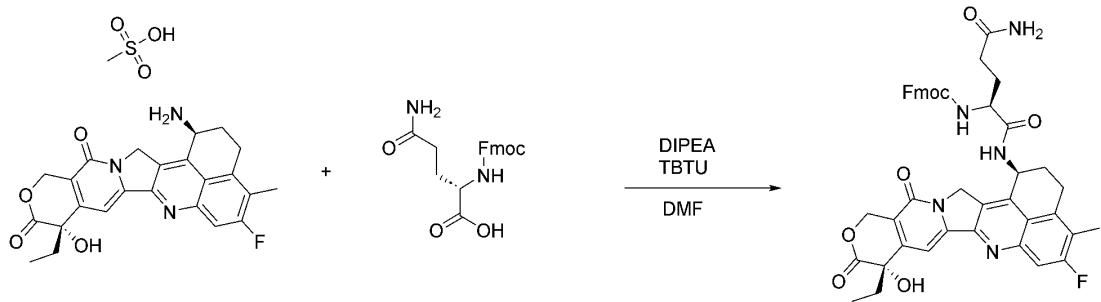


mc-AAQ-Exatecan

1. 中间体一的合成 Fmoc-Gln-Exatecan

将 Fmoc-Gln-OH (N-苄氧羰基-L-谷氨酰胺) (76.3mg 1.1eq.)、Exatecan(100mg 1.0eq.)加入反应瓶中, 加入 DMF (1ml), DIEA (29mg 1.5eq.), TBTU (72.5mg 1.1eq.), 室温反应。HPLC 监控, 无原料剩余。反应结束后, 加入硅胶浓缩拌样, 过柱纯化。收集产品, 浓缩干, 得到中间体一。

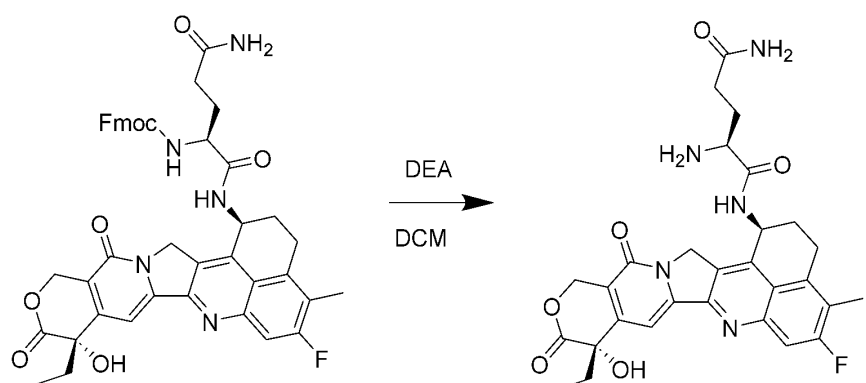
反应式如下:



2. 中间体二的合成 Gln-Exatecan

将中间体一 Fmoc-Gln-Exatecan (130mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, 加入 DCM (2ml), 室温搅拌, 不能溶清。加入 DEA (0.5ml), 室温反应。HPLC 监控, 无原料剩余。停止反应, 缓慢加入 MTBE (10ml), 析出大量固体, 搅拌 30min。过滤, 得到灰白色固体, 干燥, 得到中间体二。

反应式如下:

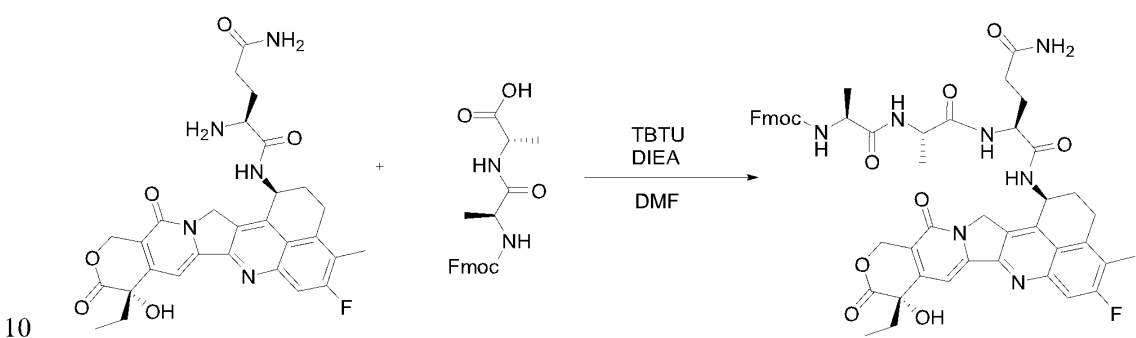


3. 中间体三的合成 Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体二 Gln-Exatecan (100mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, DMF (1mL), Fmoc-Ala-Ala-OH (67.8mg 1.0eq), TBTU (68.4mg 1.2eq.) DIEA (34.4mg 1.5eq.), 室温反

5 应。HPLC 监控, 无中间体二剩余, 停止反应。加入硅胶拌样, 过柱纯化, 收集产品得到中间体三。

反应式如下:

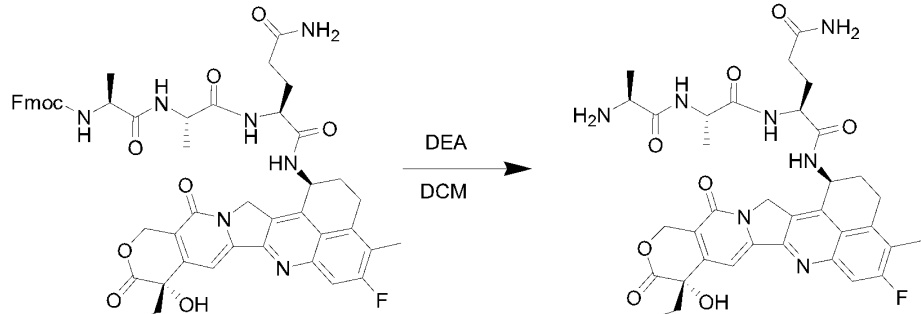


4. 中间体四的合成 Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体三 Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan (140mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, 加入 DCM (2ml), DEA (0.5ml), 室温反应。HPLC 监控, 无原料剩余。停止反应, 缓慢加入

15 MTBE (10ml), 析出大量固体, 搅拌 30min。过滤, 得到灰白色固体, 干燥, 得到中间体四。

反应式如下:



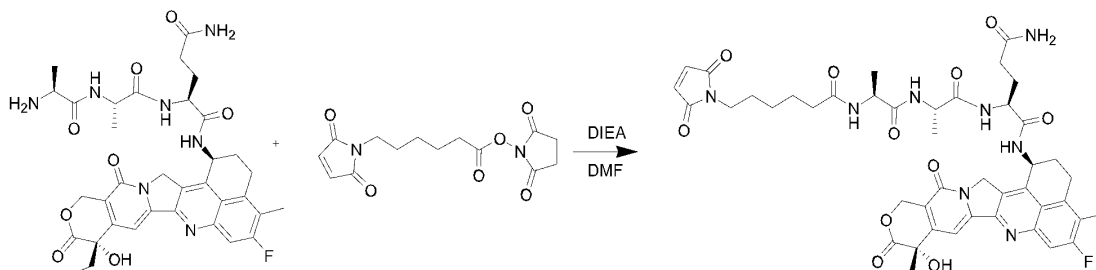
5. 产品合成 mc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体四 Ala-Ala-Gln-Exatecan (50mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, DMF (1mL), 再加入 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯 (21.8mg 1.1eq), DIEA (12.1mg 1.5eq.), 室

20

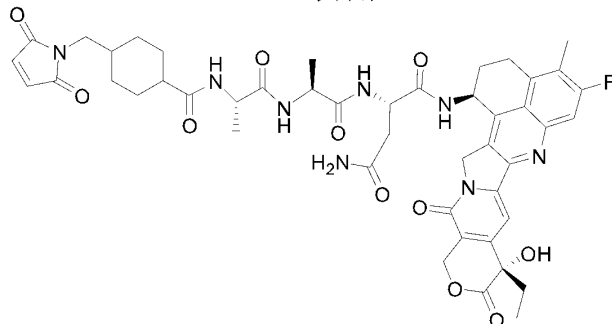
温反应。HPLC 监控，至中间体四无剩余，停止反应。制备纯化，收集产品，浓缩干，得到产品。

反应式如下:



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.28-8.36 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.90-7.96(d, *J*=2.0Hz, 2H), 7.75-7.87(d, *J*=2.0 Hz,2H), 7.27-7.33(d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.20-7.25 (m,1H), 6.97-7.03(d, *J*=8.0 Hz,2H), 6.69-6.75(m,1H), 6.49-6.53(m,1H), 5.46-5.55(m,1H), 5.40-5.45(m,2H), 5.24-5.34(m,1H), 5.04-5.14(m,1H), 4.31-4.38(m,1H), 4.02-4.23(m,2H), 3.86-3.96(m,1H), 3.40-3.49(m,1H), 3.33-3.40(m,2H), 3.12-3.20(m,1H), 2.36-2.42(m,2H), 2.15-2.25(m,1H), 2.00-2.12(m,4H), 1.71-1.93(m,3H), 1.36-1.52(m,4H), 1.01-1.20(m,10H), 0.83-0.92(m,3H).

三、mcc-AAN-Exatecan 的制备



mcc-AAN-Exatecan

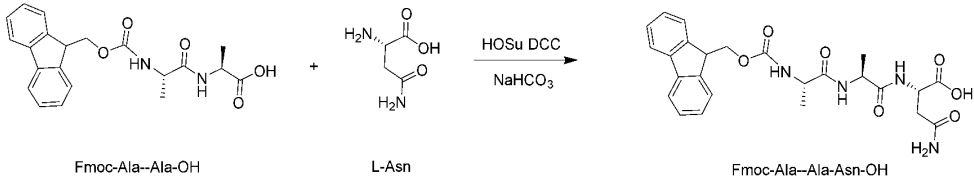
1. 中间体一的合成

将 Fmoc-Ala-Ala-OH (N-[芴甲氧羰基]-L-丙氨酰基-L-丙氨酸) 经 HOSu (N-羟基丁二酰亚胺) 活化后, 与 L-Asn (L-天冬酰胺) 反应得到中间体一。

具体的步骤是：室温下反应瓶中加入 Fmoc-Ala-Ala-OH (1.0eq)，HOSu

(1.3eq), THF (10v/w), 控制温度在室温, 搅拌条件下缓慢加入 DCC (1.3eq), 室温进行反应, 用 HPLC 检测, 至 Fmoc-Ala-Ala-OH 残留较少 (面积归一法), 将反应液过滤, 滤饼用 THF (2.5v/w) 淋洗。滤液中加入纯化水 (11.5v/w), 加入 L-Asn

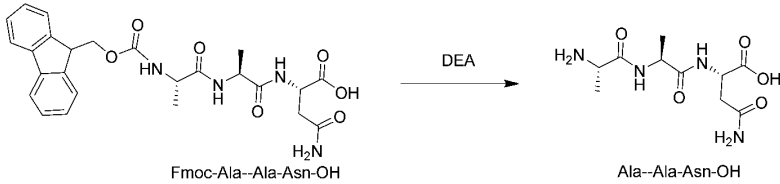
(1.1eq), 碳酸氢钠固体 (1.0eq), 室温搅拌反应, 用 HPLC 检测至 Fmoc-Ala-Ala-OSu 残留较少, 然后加入一水合柠檬酸 (1.0eq) 搅拌, 浓缩反应液除去大部分溶剂, 加入 DMF (4v/w) 溶解产品, 过滤后通过制备液相进行反相制备, 浓缩制备液至无明显液滴流出后, 用乙酸乙酯萃取, 将乙酸乙酯相浓缩至干得到中间体一, 反应式如下:



2. 中间体二的合成

将中间体一加 DEA（二乙胺）脱 Fmoc 后，得到中间体二。

5 具体的步骤是：室温下反应瓶中加入中间体一（1.0eq），加入 DMF（15v/w），控制温度在室温，滴加 DEA（3v/w），室温进行反应，用 HPLC 检测，至中间体一无残留，浓缩除去 DMF，加入 DCM（40v/w），纯化水（40v/w），搅拌后分液，将水相浓缩至干得到中间体二，反应式如下：

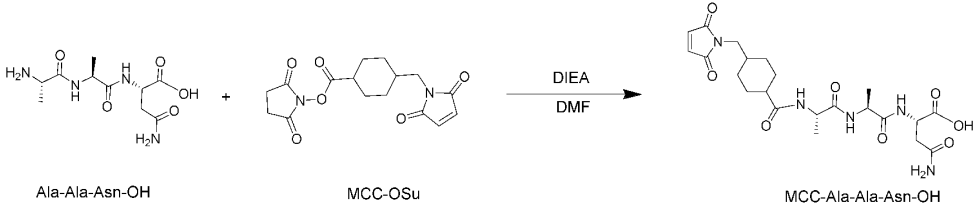


10

3. 中间体三的合成

将中间体二与 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸-N-琥珀酰亚胺酯反应得到中间体三。

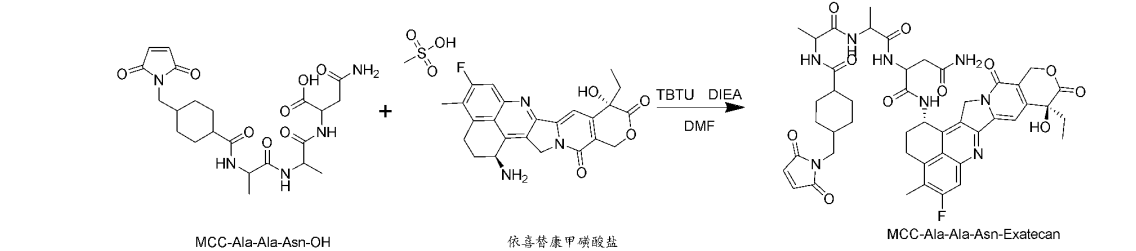
15 具体的步骤是：室温下反应瓶中加入中间体二（1.0eq），4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸-N-琥珀酰亚胺酯（1.1eq），加入 DMF（22v/w），水（9.5v/w），DIPEA（1.0eq），后室温进行反应，至中间体二残留较少（QDA 检测），待反应完成，浓缩除去大部分溶剂，加入水（50v/w），EA（50v/w），加入 1.0eq DIEA 搅拌溶清后静置分液，水相用 EA（50v/w*2）萃取，将水相浓缩至干，得到中间体三，反应式如下：



20

4. 产品的合成

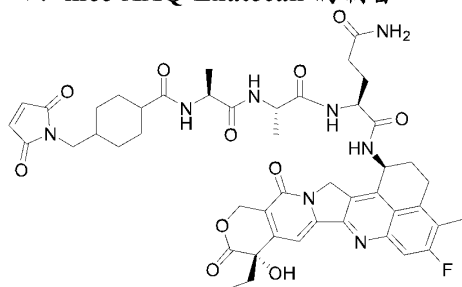
将中间体三与依喜替康甲磺酸盐（CAS 号：169869-90-3）经 HATU 经缩合反应得到产品。具体的步骤是：室温条件下，反应瓶中加入中间体三（1.2eq），加入 DMF（15v/w），依次加入依喜替康甲磺酸盐（1.0eq），TBTU（1.4eq），DIPEA（4.5eq），后室温进行反应，用 HPLC 中控检测，反应完成后，通过 prep-HPLC（制备高效液相色谱）纯化，浓缩制备液，DCM 萃取制备液，得到产品，反应式如下：



25

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.15-8.25 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.85-8.0 (d, *J*=7.5Hz, 2H), 7.7-7.85(d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.33-7.4 (d, *J*=8.0 Hz,1H), 7.28-7.32 (m,1H), 6.98-7.05(d, *J*=8.0 Hz,2H), 6.85-6.95(m,1H), 6.45-6.57(m,1H), 5.45-5.55(m,1H), 5.40-5.45(m,1H), 5.20-5.27(m,1H), 4.40-4.50(m,1H), 3.95-4.05(m,1H), 3.20-3.27(m,2H),
 5 3.10-3.18(m,2H), 2.86-2.97(m,2H), 2.36-2.43(m,3H), 2.15-2.25(m,1H), 1.95-2.10(m,3H), 1.80-1.93(m,3H), 1.73-1.78(m,1H), 1.55-1.70(m,3H), 1.45-1.55(m,3H), 1.0-1.3(m,10H), 0.80-0.95(m,5H).

四、mcc-AAQ-Exatecan 的制备

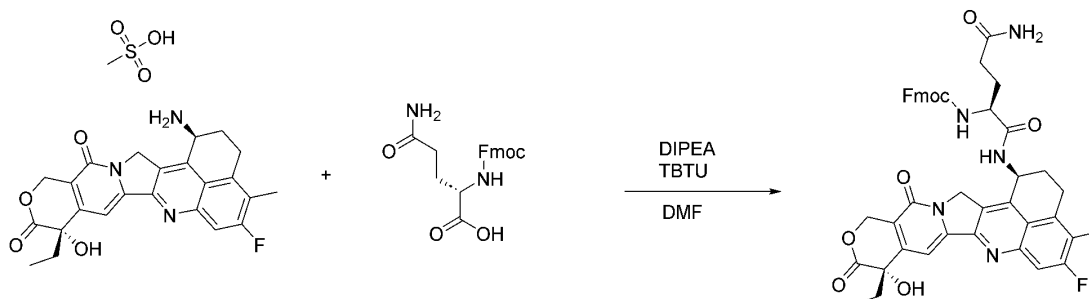


mcc-AAQ-Exatecan

1. 中间体一的合成 Fmoc-Gln-Exatecan

将 Fmoc-Gln-OH (N-苄氧羰基-L-谷氨酰胺) (76.3mg 1.1eq.)、Exatecan(100mg 1.0eq.)加入反应瓶中, 加入 DMF (1ml), DIEA (29mg 1.5eq.)。加入 TBTU (72.5mg 1.1eq.), 室温反应, HPLC 监控, 无原料剩余。反应结束后, 中压过柱纯化
 15 (DCM/MeOH)。收集产品, 浓缩干, 得到中间体一。

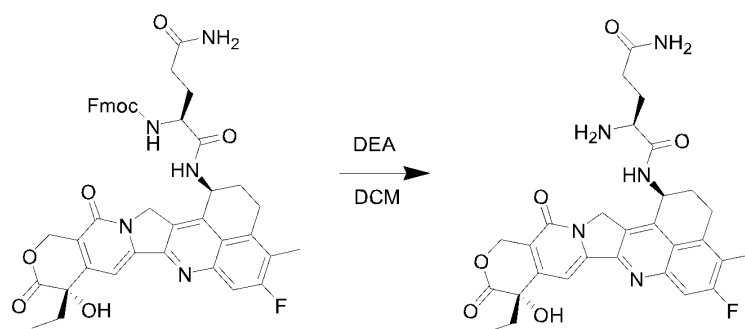
反应式如下:



2. 中间体二的合成 Gln-Exatecan

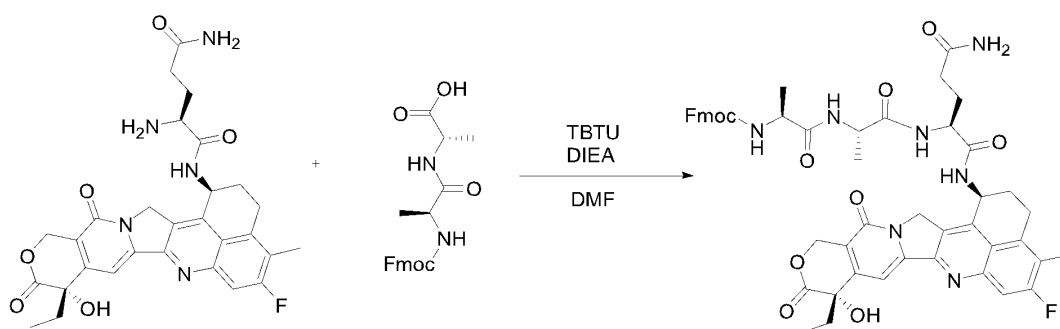
将中间体一 Fmoc-Gln-Exatecan (130mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, 加入 DCM
 20 (2ml), 室温搅拌。加入 DEA (0.5ml), 室温反应, HPLC 监控, 无原料剩余。停止反应, 缓慢加入 MTBE (10ml), 析出大量固体, 搅拌 30min。过滤, MTBE 洗涤, 得到灰白色固体, 干燥, 得到中间体二。

反应式如下:



3. 中间体三的合成 Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan

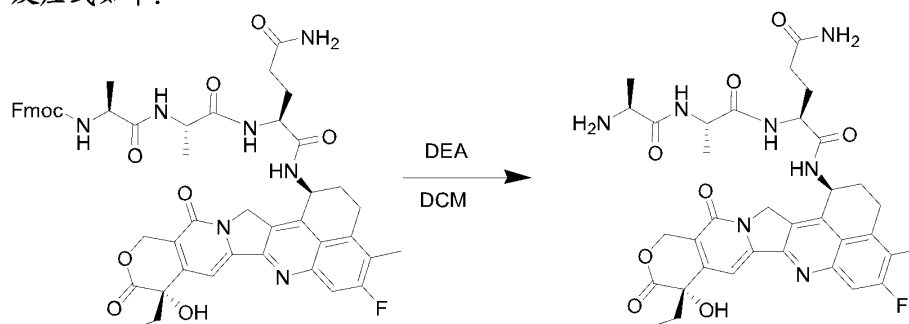
将中间体二 Gln-Exatecan (100mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, DMF (1mL), Fmoc-Ala-Ala-OH (67.8mg 1.0eq.), TBTU (68.4mg 1.2eq.) DIEA (34.4mg 1.5eq.), 室温反应, HPLC 监控至反应结束。中压过柱纯化 (DCM/MeOH), 收集产品得到中间体三。反应式如下:



4. 中间体四的合成 Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体三 Fmoc-Ala-Ala-Gln-Exatecan (140mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, 加入 DCM (2ml), 室温搅拌。加入 DEA (0.5ml), 室温反应, HPLC 监控至反应结束。缓慢加入 MTBE (10ml), 析出大量固体, 搅拌 30min。过滤, MTBE 洗涤, 得到灰白色固体, 干燥, 得到中间体四。

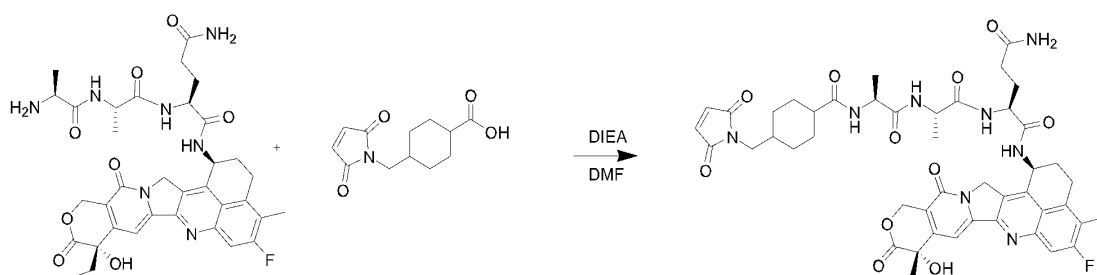
反应式如下:



5. 产品合成 MCC-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体四 Ala-Ala-Gln-Exatecan (50mg 1.0eq.) 加入反应瓶中, DMF (1mL), 再加入 MCC (18mg 1.1eq.), DIEA (12.1mg 1.5eq.), 室温反应, HPLC 监控至中间体四无剩余, 停止反应。Prep-HPLC 纯化, 收集产品, 浓缩干, 得到产品。

反应式如下:



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.17-8.26 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.83-7.91 (d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.65-7.74(d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.21-7.28(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.98-7.04(m, 2H), 5.43-5.50(m, 1H), 5.36-5.43(m, 2H), 5.15-5.24(m, 1H), 5.01-5.11(m, 1H), 4.14-4.24(m, 1H), 3.97-4.08(m, 1H), 3.47-3.57(m, 1H), 3.20-3.27(m, 1H), 3.05-3.16(m, 2H), 2.30-2.36(m, 2H), 2.00-2.15(m, 4H), 1.77-1.92(m, 3H), 1.65-2.00(m, 5H), 1.45-1.64(m, 4H), 1.09-1.24(m, 5H), 0.95-1.07(m, 4H), 0.79-0.94(m, 5H).

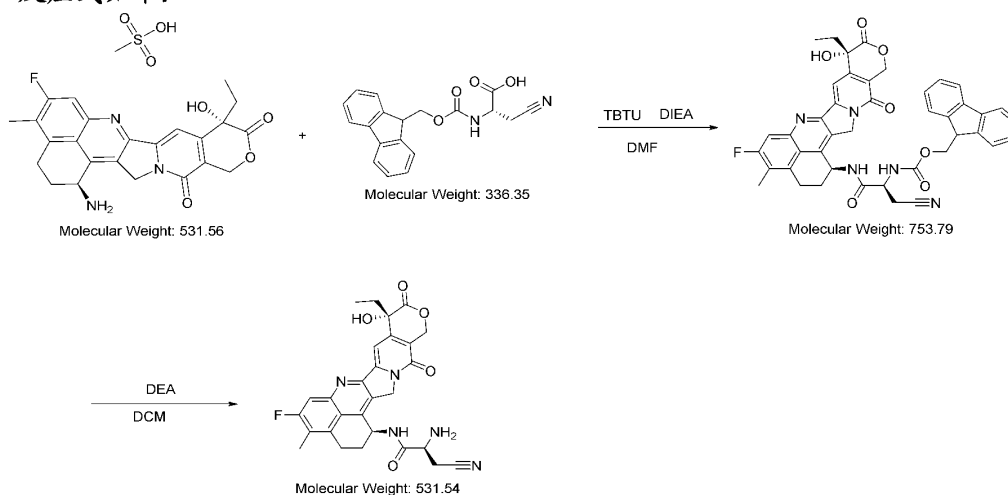
五、mcc-Ala-Ala- (3-cyano-L-alanine) -Exatecan 的制备

1. 中间体一的合成 (3-cyano-L-alanine) -Exatecan

将 Fmoc-Asn-OH (40mg 1.2eq) 加入反应瓶中, 加入 DMF (1.5ml), TBTU(45mg, 1.5eq), DIEA(60mg 2.5eq) 搅拌, 溶解完全。搅拌 30min 后, 再加入伊喜替康甲磺酸盐(50mg 1.0eq), 搅拌 4hrs, HPLC 检测不反应。补加 TBTU(45mg, 1.5eq), DIEA(60mg 2.5eq) 继续室温反应。HPLC 监控, 原料 Exatecan 无剩余, Fmoc-(3-cyano-L-alanine) -Exatecan 占比约 70%。停止反应, 中压制备纯化。收集产品。

将上述产品加入反应瓶中, 再加入 DCM (4ml) 搅拌。加入 DEA (1ml), 室温搅拌, 溶解完全。HPLC 监测, 无原料剩余。加入 MTBE 10ml, 室温搅拌, 有大量固体析出。过滤, 得到灰白色固体, 即中间体一。

反应式如下:

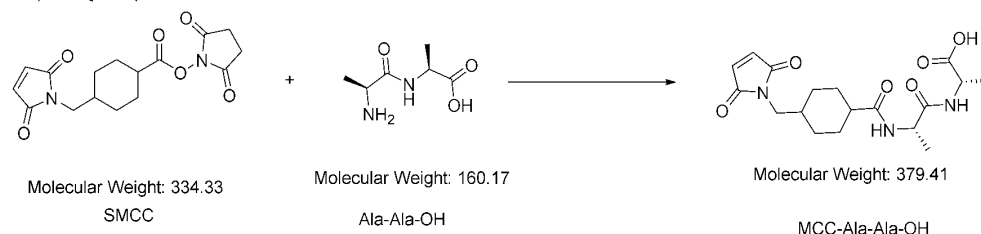


2. 中间体二的合成 mcc-Ala-Ala-OH

将 SMCC (460mg, 1.1eq) 加入反应瓶中, 再加入 NH₂-Ala-Ala-OH (200mg, 1.0eq), 加入 DMF (4ml, 20V), 搅拌, 再加入 DIPEA (161.4mg, 1.0eq)。加热至 60°C 反应。随反应进行反应液逐渐溶清。反应至少 8 小时。取样 LC-MS 检测, 反应结束, 降温至室温。35°C 减压浓缩除去 DMF, 再加入纯化水 (4ml, 20 V), DIPEA (161.4mg, 1.0eq)。加入 EA (4ml, 20V), 搅拌洗涤。有机相弃去。再加入 EA

(2ml, 10V) 萃取两次。有机相弃去。水相保留, 用 2M 盐酸调节酸性至 pH 为 1~2, 析出大量白色固体。搅拌一小时。过滤, 得到白色固体, 即中间体二。

反应式如下:



5

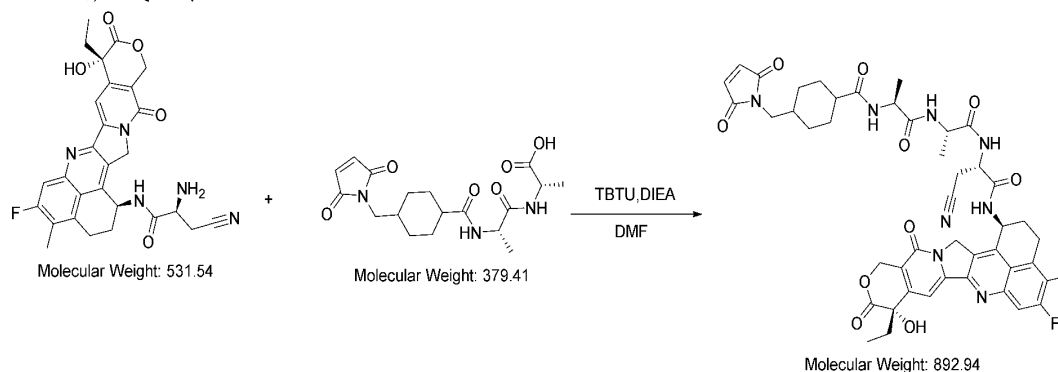
3. 产品合成 mcc-Ala-Ala- (3-cyano-L-alanine) -Exatecan

将中间体一 (3-cyano-L-alanine) -Exatecan (35mg 1.0eq) 加入反应瓶中, DMF (1mL), 再加入中间体二 mcc-Ala-Ala-OH (28mg, 1.1eq), TBTU (25.3mg, 1.2eq), DIPEA (12.8mg, 1.5eq) 室温反应 2 小时后, HPLC 监控, 中间体一无剩

10

余, 停止反应。Prep-HPLC 纯化, 收集产品。

反应式如下:



15

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.45-8.55 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 8.23-8.29 (d, *J*=2Hz, 2H), 7.95-8.03(d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.84-7.92 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.76-7.84 (m, 1H), 7.27-7.33(d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.98-7.02(m, 1H), 5.47-5.56(m, 1H), 5.40-5.45(m, 1H), 5.26-5.36(m, 1H), 5.1-5.2(m, 1H), 4.44-4.55(m, 1H), 4.07-4.19(m, 1H), 3.88-4.0(m, 2H), 3.19-3.26(m, 2H), 3.13-3.18(m, 1H), 2.90-3.0(m, 2H), 2.76-2.88(m, 2H), 2.36-2.43(m, 3H), 2.00-2.12(m, 2H), 1.80-1.93(m, 3H), 1.80-1.92(m, 2H), 1.55-1.70(m, 3H), 1.13-1.26(m, 5H), 1.05-1.12(m, 3H), 0.80-0.95(m, 5H).

20

六、mcc-Ala-Ala- ((*S*)-2-amino-4-cyanobutanoic acid) -Exatecan 的合成路线

1. 中间体一的合成 ((*S*)-2-amino-4-cyanobutanoic acid) -Exatecan

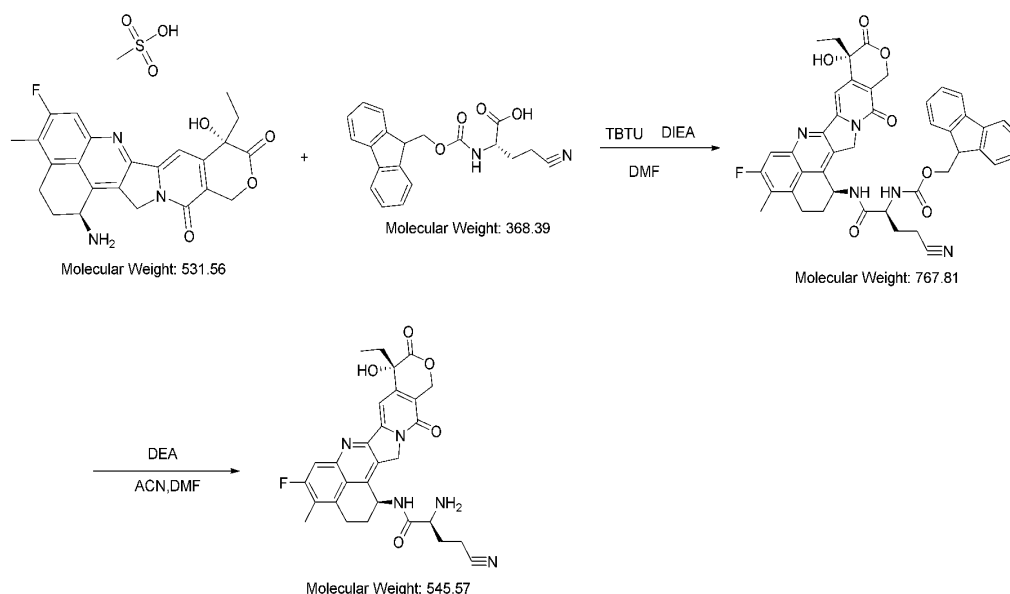
将(*S*)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氰基丁酸 (79.8 mg 1.1eq)、伊喜替康甲磺酸盐(110mg 1.0eq)加入反应瓶中, 加入 DMF (1.5ml), TBTU(79.73 mg, 1.5eq), DIEA(80mg 2.5eq), 室温反应 3 小时, HPLC 监控。反应结束后, 加入 ACN 9 ml, 室温搅拌。再加入 DEA 1.0 ml, 继续室温反应 1 小时。取样监测, 无原料剩

25

余。加入 MTBE 10 ml。搅拌, 无明显固体析出。搅拌 1 小时, 无明显变化。30°C 减压浓缩除去溶剂。浓缩过程中析出大量固体, 此时溶剂仅除去少量, 约 3ml。停止浓缩, 继续室温搅拌 1 小时。过滤, 再用 MTBE 洗涤固体。干燥, 得到灰白色固体即中间体一。

30

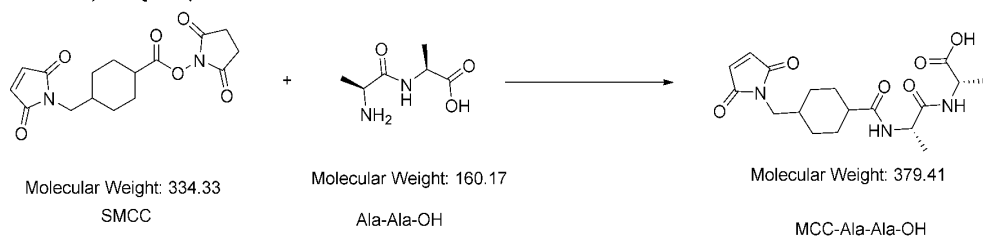
反应式如下:



2. 中间体二的合成 mcc-Ala-Ala-OH

- 将 SMCC (460mg, 1.1eq) 加入反应瓶中, 再加入 NH₂-Ala-Ala-OH (200mg, 1.0eq), DMF (4ml, 20V), 搅拌, 再加入 DIPEA (161.4mg, 1.0eq)。加热至 60°C 反应 8 小时。取样 LC-MS 检测, 反应结束, 降温至室温。35°C 减压浓缩除去 DMF, 再加入纯化水 (4ml, 20 V), DIPEA (161.4mg, 1.0eq)。加入 EA (4ml, 20V), 搅拌洗涤。有机相弃去。再加入 EA (2ml, 10V) 萃取两次。有机相弃去。水相保留, 用 2M 盐酸调节酸性至 pH 为 1~2, 析出大量白色固体。搅拌一小时。过滤, 得到白色固体即中
- 10 中间体二。

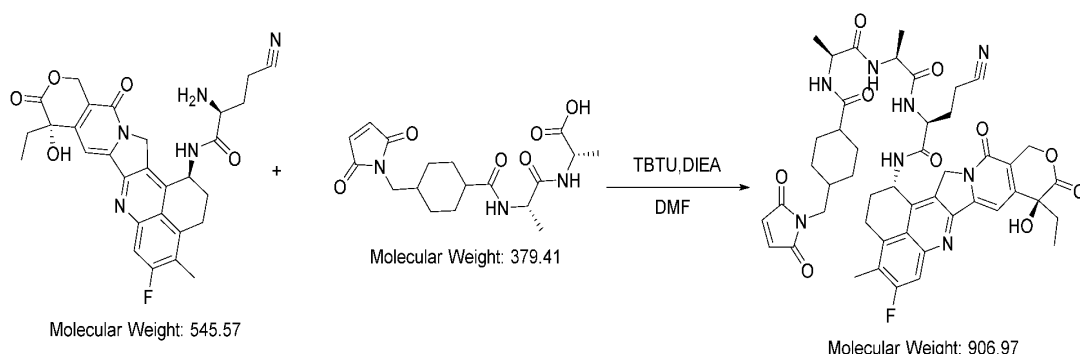
反应式如下:



3. 产品合成 mcc-Ala-Ala-((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid)-Exatecan

- 15 将中间体一 ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid)-Exatecan (25mg 1.0eq) 加入反应瓶中, DMF (1mL), 再加入中间体二 mcc-Ala-Ala-OH (19mg, 1.1eq), TBTU (17.7 mg, 1.2eq), DIPEA (8.88 mg, 1.5eq) 室温反应 2 小时后, HPLC 监控反应结束。Prep-HPLC 制备纯化, 收集产品。

反应式如下:



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30-8.37 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.87-7.96 (d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.75-7.86(d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.27-7.33(d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.98-7.02(m, 2H), 5.45-5.54(m, 1H), 5.40-5.45(m, 2H), 5.23-5.32(m, 1H), 5.04-5.13(m, 1H), 4.25-4.37(m, 1H), 3.97-4.09(m, 1H), 3.56-3.66(m, 4H), 3.10-3.26(m, 4H), 2.35-2.46(m, 4H), 2.00-2.13(m, 3H), 1.77-1.92(m, 3H), 1.66-1.75(m, 2H), 1.56-1.64(m, 3H), 1.45-1.53(m, 1H), 1.12-1.26(m, 4H), 1.01-1.13(m, 4H), 0.80-0.94(m, 4H).

七、mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-Exatecan 的合成路线

1. 中间体一的合成 mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-OH

将 H-Gln(Trt)-OH 2-CTC resin (1.0 g, 0.5 mmol, 0.5 mmol/g) 加入固相反应器中, 加入 DCM (20 mL), 在振荡器中振荡 20 min 充分溶胀树脂。过滤, 用 DMF 洗涤树脂。加入含 Fmoc-Ala-OH (3.0 eq, 467 mg, 1.5 mmol), HBTU (3.0 eq, 569 mg, 1.5 mmol) 及 HOBT (3.0 eq, 202 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 用 DMF 洗涤树脂。加入 20% 哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, 过滤, 并再次加入 20% 哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, Kaiser 检测树脂颜色为阳性, 用 DMF 洗涤树脂, 得到 H-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin。

向含 H-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin 的反应管内, 加入含 Fmoc-Ala-OH (3.0 eq, 467 mg, 1.5 mmol), HBTU (3.0 eq, 569 mg, 1.5 mmol) 及 HOBT (3.0 eq, 202 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 用 DMF 洗涤树脂。加入 20% 哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, 过滤, 并再次加入 20% 哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, Kaiser 检测树脂颜色为阳性, 用 DMF 洗涤树脂, 得到 H-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin。

向含 H-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin 的反应管内, 加入含 Fmoc-Ala-OH (3.0 eq, 467 mg, 1.5 mmol), HBTU (3.0 eq, 569 mg, 1.5 mmol) 及 HOBT (3.0 eq, 202 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 用 DMF 洗涤树脂。加入 20% 哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, 过滤, 并再次加入 20% 哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, Kaiser 检测树脂颜色为阳性, 用 DMF 洗涤树脂, 得到 H-Ala-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin。

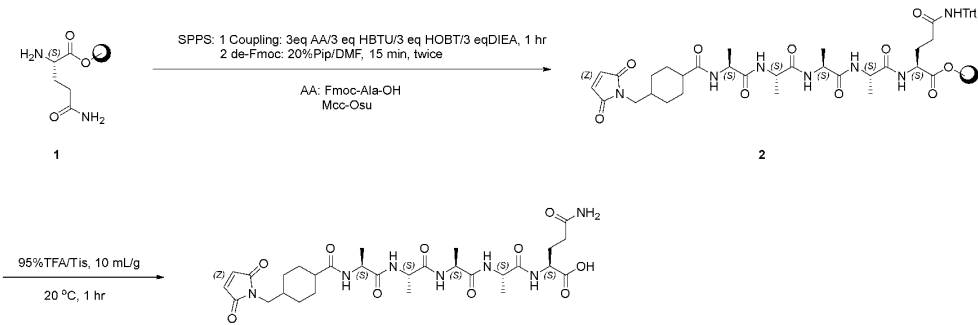
向含 H-Ala-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin 的反应管内, 加入含 Fmoc-Ala-OH (3.0 eq, 467 mg, 1.5 mmol), HBTU (3.0 eq, 569 mg, 1.5 mmol) 及 HOBT (3.0 eq, 202 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL, 摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol), 在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤, 用 DMF 洗涤树脂。加入 20% 哌啶/DMF 溶液 20 mL, 在振荡器中反应 15 min, 过滤, 并再次加入 20%

哌啶/DMF 溶液 20 mL，在振荡器中反应 15 min，Kaiser 检测树脂颜色为阳性，用 DMF 洗涤树脂，得到 H-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin。

向含 H-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln (Trt)-2-CTC-resin 的反应管内，加入含 SMCC (3.0 eq, 501 mg, 1.5 mmol) 的 DMF 溶液 20 mL，摇匀后加入 DIPEA (3.0 eq, 0.26 mL, 1.5 mmol)，在振荡器中反应 1 hr。Kaiser 检测树脂颜色为阴性。过滤，依次用 DMF 洗涤树脂，MeOH 洗涤树脂，MTBE 洗涤。真空干燥箱 30°C 干燥 1 hr，得到 mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln(Trt)-2-CTC-树脂 (1.42 g, 0.5 mmol)。

向上述得到的树脂转移至 50 mL 离心管中，加入冷的 95%TFA/Tis 溶液 (15 mL)，在振荡器中反应 1 hr。过滤，并将滤液缓慢加入到冷的 MTBE 溶液中 (150 mL)，静置 1 hr，析出白色沉淀物，离心并用冷的 MTBE 溶液洗涤沉淀。收集洗涤后的沉淀，真空干燥箱 30°C 干燥 4 hr，得到白色固体即中间体一 mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-OH。

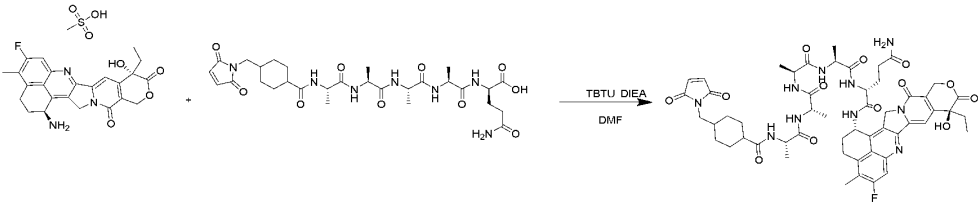
反应式如下：



2. 产品合成 mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-Exatecan

将中间体一 mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln-OH (244mg, 2.0eq) 加入反应瓶中，再加入 DMF (2mL)，伊喜替康加磺酸盐 (100mg, 1.0eq)，TBTU (132mg, 2.2eq)，DIPEA (73mg, 3.0eq)。室温搅拌反应 1 小时。Prep-HPLC 制备纯化，收集产品。

反应式如下：



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.25-8.33(d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.87-7.95 (d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.76-7.86(d, *J*=2.0 Hz, 2H), 7.28-7.34(d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.20-7.26(m, 1H), 6.98-7.02(m, 1H), 6.73-6.76(m, 1H), 5.47-5.55(m, 1H), 5.40-5.41(m, 1H), 5.26-5.36(m, 2H), 5.05-5.15 (m, 2H), 4.12-4.20(m, 2H), 4.03-4.09(m, 1H), 3.87-3.94(m, 1H), 3.20-3.27(m, 2H), 3.12-3.18(m, 1H), 2.65-2.68(m, 1H), 2.36-2.43(m, 2H), 2.31-2.35(m, 1H), 2.02-2.13(m, 2H), 1.78-1.93(m, 3H), 1.6-1.76(m, 2H), 1.56-1.64(m, 2H), 1.21-1.27(m, 1H), 1.06-1.20(m, 6H), 0.85-0.94(m, 3H).

实施例 3 GPC3-ADC 的制备

1、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mc-AAN-Exatecan (ADC-1) 的制备

a. 取 10 mg 的 Hu 52H5D3B8-8 抗体，用 PBS 缓冲液稀释至浓度 5 mg/mL，用 Tris-

EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 8 倍摩尔数的 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120 min, 连续混匀。

- 5 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 mc-AAN-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。
- 10 c. 使用 15 mL 的 30 KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10 mM Histidine, pH5.5 左右) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mc-AAN-Exatecan, 于 4°C 进行保存。
- 10 d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检测 (如图 5 所示), DAR 为 8.0, SEC 进行纯度检测。

2、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAN-Exatecan (ADC-2) 的制备

- 15 a. 取 10 mg 的 Hu 52H5D3B8-8 抗体, 用 PBS 缓冲液稀释至浓度 5 mg/mL, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 8 倍摩尔数的 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120 min, 连续混匀。
- 20 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 mcc-AAN-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。
- 25 c. 使用 15 mL 的 30 KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10 mM Histidine, pH5.5 左右) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAN-Exatecan, 于 4°C 进行保存。
- 25 d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检测 (如图 6 所示), DAR 为 8.0, SEC 进行纯度检测。

3、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mc-AAQ-Exatecan (ADC-3) 的制备

- 30 a. 取 10 mg 的 Hu 52H5D3B8-8 抗体, 用 PBS 缓冲液稀释至浓度约 5 mg/mL, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5 左右; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 8 倍摩尔数的 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120 min 以上, 连续混匀。
- 35 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 mc-AAQ-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min 以上, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min 以上, 连续混匀。
- 40 c. 使用 15 mL 的 30 KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10 mM Histidine, pH5.5 左右) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mc-AAQ-Exatecan 于 4°C 进行保存。
- 45 d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检测 (如图 7 所示), DAR 为 8.0, SEC 进行纯度检测。

4、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAQ-Exatecan (ADC-4) 的制备

- a. 取 10 mg 的 Hu 52H5D3B8-8 抗体, 用 PBS 缓冲液稀释至浓度 5 mg/mL, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 8 倍摩尔数的 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120 min, 连续混匀。
- 5 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 mcc-AAQ-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。
- 10 c. 使用 15 mL 的 30 KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10 mM Histidine, pH5.5) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAQ-Exatecan, 于 4°C 进行保存。
- d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检测 (如图 8 所示), DAR 为 8.0, SEC 进行纯度检测。
- 15 5、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-7-mcc-AAQ-Exatecan (ADC-5) 的制备
- a. 取 10 mg 的 Hu 52H5D3B8-7 抗体, 用 PBS 缓冲液稀释至浓度 5 mg/mL, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 10 倍摩尔数的 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120 min, 连续混匀。
- 20 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 mcc-AAQ-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。
- 25 c. 使用 15 mL 的 30 KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10 mM Histidine, pH5.5 左右) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-7-mcc-AAQ-Exatecan, 于 4°C 进行保存。
- d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检测 (如图 9 所示), DAR 为 7.9, SEC 进行纯度检测。
- 30 6、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAQ-Exatecan (ADC-6) 的制备
- a. 取 10 mg 的 Hu 52H5D3B8-8 抗体, 用 PBS 缓冲液稀释至浓度 5 mg/mL, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 2.1 倍摩尔数的 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120 min, 连续混匀。
- 35 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 mcc-AAQ-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。
- 40 c. 使用 15 mL 的 30 KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10 mM Histidine, pH5.5 左右) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-8-mcc-AAQ-Exatecan, 于 4°C 进行保存。
- 45 d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检测如图 10 所示), DAR 为 4.0, SEC 进行纯度检测。

- 7、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-7-mcc-AAQ-Exatecan (ADC-7) 的制备
- 5 a. 取 10 mg 的 Hu 52H5D3B8-7 抗体, 用 PBS 缓冲液稀释至浓度 5 mg/mL, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至 7.5; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 2.5 倍摩尔数的 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120 min, 连续混匀。
- 10 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 mcc-AAQ-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30 min, 连续混匀。
- 15 c. 使用 15 mL 的 30 KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10 mM Histidine, pH5.5) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-7-mcc-AAQ-Exatecan, 于 4°C 进行保存。
- 20 d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检测 (如图 11 所示), DAR 为 4.0, SEC 进行纯度检测。
- 8、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AA-(3-cyano-L-alanine)-Exatecan (ADC-8) 的制备
- 25 a. 取 GPC3 抗体 Hu 52H5D3B8-8, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至约 7.5 左右; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120min 以上, 连续混匀将抗体链间二硫键完全还原。
- 30 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 MCC-AA-(3-cyano-L-alanine)-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30min 以上, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30min 以上, 连续混匀。
- 35 c. 使用 30KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10mM Histidine, pH5.5 左右) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AA-(3-cyano-L-alanine)-Exatecan 于 4°C 进行保存。
- 40 d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度, 用 HIC 进行 DAR 检 (图 12), DAR 为 8.0, SEC 进行纯度检测。
- 9、抗体偶联物 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAAAQ-Exatecan (ADC-9) 的制备
- 45 a. 取 GPC3 抗体 Hu 52H5D3B8-8, 用 Tris-EDTA 溶液调节抗体 pH 至约 7.5 左右; 用 Nanodrop 检测蛋白浓度, 并称量抗体溶液净重, 计算蛋白总量。向抗体中加入 TCEP 溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 120min 以上, 连续混匀将抗体链间二硫键完全还原。
- 40 b. 向还原后的抗体溶液加入过量的 MCC-AANI-Exatecan 溶液 (溶于 DMSO), 混匀后置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30min 以上, 连续混匀。反应结束后向反应液中加入过量的 N-乙酰半胱氨酸溶液, 置于 3D 摇床上, 室温下, 反应 30min 以上, 连续混匀。
- 45 c. 使用 30KD 超滤离心管将偶联产物进行纯化, 并置换到储存液 (10mM Histidine, pH5.5 左右) 中, 置换倍数大于 1000 倍。然后用 0.22 μ m 的除菌过滤器进行过滤, 即得到抗体药物偶联物 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAAAQ-Exatecan 于

4℃进行保存。

d. 用 UV/BCA 的方法检测抗体药物偶联物的蛋白浓度，用 HIC 进行 DAR 检（图 13），DAR 为 8.0，SEC 进行纯度检测。

5 另外，本领域技术人员还可以参照上述方法制备本发明的其他 ADC，例如 GPC3（如 Hu 52H5D3B8-8）-mcc-Ala-Ala-（(S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid）-Exatecan。

实施例 4 GPC3-ADC 药理药效学研究

10 1、GPC3-ADC 的细胞结合

通过 FACS 实验确认 ADC 的细胞结合基本不受抗体链间 Cys 偶联的影响。

收集对数期生长的 Huh7 肝癌细胞。离心后，将细胞重悬于 FACS 缓冲液（PBS+3% FBS），调整细胞密度，并将细胞分至 96 孔 U 底细胞培养板中，使每孔内含 200,000~500,000 个细胞。加入用 FACS 缓冲液 4 倍梯度稀释的抗体或 ADC 并混匀，使各样品最终起始浓度为 10 μg/mL。将 96 孔板置于 4℃孵育 60 min。用 FACS 缓冲液对孔内细胞进行充分清洗，除去未结合的抗体或 ADC。加入用 FACS 缓冲液 1:1,000 稀释的 Goat anti-Human IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647（Invitrogen, #A-21445），于 4℃避光孵育 30~60 min。用 FACS 缓冲液对孔内细胞进行充分清洗，除去未结合的二抗。用 CytoFLEX 流式细胞仪（Beckman Coulter）对细胞样品进行荧光信号分析。实验结果如图 14 所示，GPC3 抗体在偶联细胞毒素前后对 Huh7 细胞的亲和力未表现出显著变化。各测试物对 Huh7 细胞的亲和力如表 3 和图 14 所示。

表 3: GPC3 抗体及 ADC 对 Huh7 细胞的结合（EC₅₀）

抗体/ADC 名称	EC ₅₀ （ng/mL）
Hu 52H5D3B8-8	56.91
Hu 52H5D3B8-8-MC-AAN-Exa（ADC-1）	67.32
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa（ADC-2）	60.97
Hu 52H5D3B8-8-MC-AAQ-Exa（ADC-3）	63.31
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa（ADC-4）	67.52

25 2、GPC3-ADC 中抗体的内化

确认 ADC 的内化并同时对各 ADC 分子的内化进行比较。

收集对数期生长的 Huh7 肝癌细胞。离心后，对细胞清洗一次，将细胞重悬于预冷的含 3% FBS 的 DMEM 培养基中，调整细胞密度，并将细胞分至 96 孔 U 底细胞培养板中，使每孔内含 500,000~800,000 个细胞。加入用含 3%FBS 的 DMEM 培养基稀释的抗体或 ADC 并混匀，使样品终浓度为 10 μg/mL。将 96 孔板置于冰上孵育 60 min。用预冷的 FACS 缓冲液（PBS+3% FBS）对孔内细胞进行充分清洗，除去未结合的抗体或 ADC。将孔内细胞均分至 4 块 96 孔 U 底板中，离心后，用 DMEM 培养基重悬细胞。1 块 96 孔板置于冰上，另外 3 块则置于 37℃的细胞培养箱中孵育。0.5 h、1 h 和 2 h 后，分别将 37℃的 1 块培养板转移至冰上。待第 3 块培养板转移至冰上 5~10 min 后，加入稀释的 Goat anti-Human IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647（Invitrogen, #A-21445），于冰上避光孵育 30 min。用预冷的 FACS 缓冲液对孔内细胞进行清洗，除去未结合的二抗。用 CytoFLEX 流式细胞仪（Beckman Coulter）对细胞样品进行荧光信号分析，用 MFI（GeoMean fluorescence intensity）表示。除 37℃孵育外，整个实验过程均保持在冰上或 4℃。

细胞表面分子减少百分比的计算方法如下:

细胞表面分子减少% = (MFI_{冰上}-MFI_{37℃})/MFI_{冰上}*100%。

实验结果如表 4 所示, 抗体 Hu 52H5D3B8-8 在偶联细胞毒素前后对于 Huh7 细胞的内化能力没有改变, 并且各 ADC 分子的内化能力表现相似。各测试物在 Huh7 细胞上的内吞 (以细胞表面分子减少百分比表示) 结果如表 4 和图 15 所示。

表 4: GPC3 抗体及 ADC 在 Huh7 细胞上的内吞

抗体/ADC 名称	细胞表面 GPC3 减少百分比 (%)		
	0.5 h	1 h	2 h
Hu 52H5D3B8-8	18.6	37.1	52.8
Hu 52H5D3B8-8-MC-AAN-Exa (ADC-1)	17.9	32.9	52.2
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2)	20.5	38.2	52.2
Hu 52H5D3B8-8-MC-AAQ-Exa (ADC-3)	20.0	32.8	50.1
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4)	18.9	36.2	50.2

实施例 5 体外药效学研究

对偶联多种 linker-payload 及不同 DAR 值的靶向 GPC3 的 ADC 分子的细胞杀伤活性进行比较。其中, Non-binding 表示抗体是非结合的人 IgG1 同型对照, 与实验所用肿瘤细胞表面的靶点无结合, 用于作为阴性对照抗体。

收集对数期生长的肝癌细胞。离心后, 将细胞重悬于新的培养基中, 并对细胞进行计数。将细胞接种于 96 孔底透黑色细胞培养板 (Costar) 中, 并于细胞培养箱内培养过夜。第二天, 用培养基对 ADC 分子进行 4 倍梯度稀释, 小心转移稀释液至黑色培养板中, 使各样品最终起始浓度为 600 或 500 ng/mL。置于细胞培养箱内培养 6 天, 然后加入 1/10 孔内体积的 PrestoBlue 试剂 (Invitrogen), 细胞培养箱内孵育 1 h。用 SpectraMax M5 读板仪对荧光信号进行读取, 将仪器的激发和发射波长分别设为 560 nm 和 590 nm。所得荧光信号数据用 SoftMax Pro 6.5 软件进行分析。

1、实验试剂及来源:

受试药物

名称	保存条件
Hu 52H5D3B8-8-MC-AAN-Exa (ADC-1)	2-8℃
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2)	2-8℃
Hu 52H5D3B8-8-MC-AAQ-Exa (ADC-3)	2-8℃
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4)	2-8℃
Hu 52H5D3B8-7-MCC-AAQ-Exa (ADC-5)	2-8℃
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-6)	2-8℃
Hu 52H5D3B8-7-MCC-AAQ-Exa (ADC-7)	2-8℃
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AA-(3-cyano-L-alanine)-Exa (ADC-8)	2-8℃
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAAAQ-Exa (ADC-9)	2-8℃
Non-binding-MCC-AAQ-Exa (DAR8)	2-8℃

Non-binding-MCC-AAQ-Exa (DAR4)				2-8℃
细胞株				
细胞株	细胞类型	GPC3 表达水平	来源	培养液
Huh7	人肝癌细胞	过表达 ($9\times 10^3\sim 1.25\times 10^5$)	中科院	DMEM+10%FBS

2、实验结果:
各 GPC3-ADC 细胞杀伤活性的 EC₅₀ 的平均值见表 5。图 16-18 为不同 GPC3-ADC 对
5 Huh7 细胞杀伤的代表性图。

表 5: 不同 GPC3-ADC 在 Huh7 细胞中细胞杀伤活性的 EC₅₀ 值

受试物	EC ₅₀ 值 (ng/mL)
Hu 52H5D3B8-8-MC-AAN-Exa (ADC-1)	3.59
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2)	9.39
Hu 52H5D3B8-8-MC-AAQ-Exa (ADC-3)	11.90
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4)	14.92
Hu 52H5D3B8-7-MCC-AAQ-Exa (ADC-5)	16.38
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-6)	30.65
Hu 52H5D3B8-7-MCC-AAQ-Exa (ADC-7)	27.92
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AA- (3-cyano-L-alanine) -Exa (ADC-8)	7.34
Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAAAQ-Exa (ADC-9)	4.78

另外, 本发明的其他 ADC, 例如 GPC3 (如 Hu 52H5D3B8-8) -mcc-Ala-Ala- ((S)-2-amino-4-cyanobutanoic acid) -Exatecan, 在 Huh7 细胞中同样表现出显著的特异性细胞
杀伤活性。

10 从上述结果, 如表 5 和图 16-18 的结果可以看出, 本发明的不同 GPC3-ADC 在 Huh7 细胞中均表现出显著的特异性细胞杀伤活性。并且, 与 DAR 约为 4 的 GPC3-ADC 相比, DAR 约为 8 的相应 GPC3-ADC 分子具有更强的细胞杀伤作用。

实施例 6 体内药效学研究

15 在人肝癌 LIV#219 PDX 小鼠模型中对 GPC3-ADC 的体内抗肿瘤活性进行了测试。
LIV219 PDX 模型有较高的 GPC3 RNA 表达水平, 并经 FACS 分析证实为 GPC3 阳性表达。人肝癌裸小鼠 LIV#219 PDX 模型 (精迪生物医药技术(上海)有限公司) 的建立过程为: 将体积大小约为 15-30 mm³ 的肿瘤组织移植于 BALB/c 裸小鼠右后背部皮下。当肿瘤
20 体积达到 150-250 mm³ 时, 用随机区组法分组, 分组当日记为 Day 0。每组 6 只小鼠, 保证各组间肿瘤体积均一并兼顾体重, 共 15 组, 包括溶媒组、Non-binding-MC-AAN-Exa(DAR8) (10 mg/kg) 对照给药组、Non-binding-MC-AAQ-Exa(DAR8) (10 mg/kg) 对照给药组、Non-binding-MCC-AAN-Exa(DAR8) (10 mg/kg) 对照给药组、Non-binding-MCC-AAQ-Exa(DAR8) (10 mg/kg) 对照给药组、Hu 52H5D3B8-8-MC-AAN-Exa (ADC-1, 10 mg/kg) 给药组、Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2, 10 和 3 mg/kg) 给药组、
25 Hu 52H5D3B8-8-MC-AAQ-Exa (ADC-3, 10 和 3 mg/kg) 给药组和 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4, 10 和 3 mg/kg) 给药组。在 Day 0 与 Day 7 时, 各进行一次尾静脉给药。

数据分析: 实验期间, 每周测定两次小鼠体重与肿瘤体积。肿瘤体积 (Tumor Volume, TV) 的计算公式为: $TV = l \times w^2 / 2$ 。其中 l、w 分别代表肿瘤测量长和宽。根据测量结果计

算出相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV), $RTV = V_t/V_0$ 。其中, V_0 为分组给药时 (即 Day 0) 测量所得肿瘤体积, V_t 为最后一天测量的肿瘤体积。相对肿瘤增殖率 $T/C(\%) = (\text{给药组 RTV}/\text{Vehicle 组 RTV}) \times 100\%$ 。当 $T/C(\%) \leq 40\%$, 且 $P < 0.05$ 时认为供试品对肿瘤生长有显著抑制作用。

- 5 实验结果如图 19-20 所示。Day 29 时, Hu 52H5D3B8-8-MC-AAN-Exa (ADC-1, 10 mg/kg) 给药组的相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)$ 为 7.88% ($P < 0.05$); Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2, 10 和 3 mg/kg) 给药组的相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)$ 分别为 12.44% ($P < 0.05$) 和 77.71% ($P > 0.05$); Hu 52H5D3B8-8-MC-AAQ-Exa (ADC-3, 10 和 3 mg/kg) 给药组的相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)$ 分别为 6.75% ($P < 0.05$) 和 47.29% ($P > 0.05$); Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4, 10 和 3 mg/kg) 给药组的相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)$ 分别为 7.37% ($P < 0.05$) 和 53.71% ($P > 0.05$)。与 Day 0 相比, Day 29 时各组小鼠的平均体重变化在 0.87%~4.88% 内。

- 10 实验结果表明, 给药剂量为 10 mg/kg 时, 所有 ADC 都对肿瘤生长有显著的抑制作用; 给药剂量为 3 mg/kg 时, Hu 52H5D3B8-8-MC-AAQ-Exa (ADC-3) 和 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4) 表现出更小的相对肿瘤生长增殖率。荷瘤小鼠对全部供试品均有很好的耐受性。

实施例 7 体内药效学研究

- 20 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2) 与 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4) 的体内抗肿瘤活性比较也在人肝癌 LI6653 PDX 小鼠模型中进行了测试。

- 25 LI6653 PDX 模型 (中美冠科生物技术 (太仓) 有限公司) 经 IHC 检测确认其阳性表达 GPC3 (++)。人肝癌裸小鼠 PDX 模型的建立过程为: 从人源肝癌异种移植模型的荷瘤小鼠收取肿瘤组织, 切成直径为 2-3 mm 的瘤块接种 BALB/c Nude 小鼠右前肩胛处皮下。当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约 170~200 mm³ 时, 将荷瘤鼠根据肿瘤大小随机分组给药, 分组当日记为 Day 0。每组 6 只小鼠, 保证各组间肿瘤体积均一并兼顾体重, 共 6 组, 包括溶媒组、Non-binding-MCC-AAN-Exa (DAR8) (10 mg/kg) 对照给药组、Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2, 10 和 3 mg/kg) 给药组和 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4, 10 和 3 mg/kg) 给药组。在 Day 0 与 Day 7 时, 各进行一次尾静脉给药。

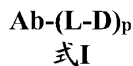
- 30 数据分析: 实验期间, 每周测定两次小鼠体重与肿瘤体积。肿瘤体积 (Tumor Volume, TV) 的计算公式为: $TV = l \times w^2/2$ 。其中 l 、 w 分别代表肿瘤测量长和宽。根据测量结果计算出相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV), $RTV = V_t/V_0$ 。其中, V_0 为分组给药时 (即 Day 0) 测量所得肿瘤体积, V_t 为最后一天测量的肿瘤体积。相对肿瘤增殖率 $T/C(\%) = (\text{给药组 RTV}/\text{Vehicle 组 RTV}) \times 100\%$ 。当 $T/C(\%) \leq 40\%$, 且 $P < 0.05$ 时认为供试品对肿瘤生长有显著抑制作用。

- 35 实验结果如图 21-22 所示。Day 16 时, Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2, 10 和 3 mg/kg) 给药组的相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)$ 分别为 17.46% ($P < 0.05$) 和 31.81% ($P < 0.05$); Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4, 10 和 3 mg/kg) 给药组的相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)$ 分别为 13.05% ($P < 0.05$) 和 21.10% ($P < 0.05$)。与 Day 0 相比, Day 16 时各组小鼠的平均体重变化在 4.38%~11.97% 内。

- 40 实验结果表明, 给药剂量为 10 mg/kg 时, 两个 ADC 都对肿瘤生长有显著的抑制作用; 给药剂量为 3 mg/kg 时, Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAQ-Exa (ADC-4) 表现出较 Hu 52H5D3B8-8-MCC-AAN-Exa (ADC-2) 更小的相对肿瘤生长增殖率。荷瘤小鼠对全部供试品均有很好的耐受性。

权 利 要 求

1、抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述抗体药物偶联物具有式I所示的结构，



其中：

Ab 为抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段, 所述抗 GPC3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 所示的序列或其突变体;

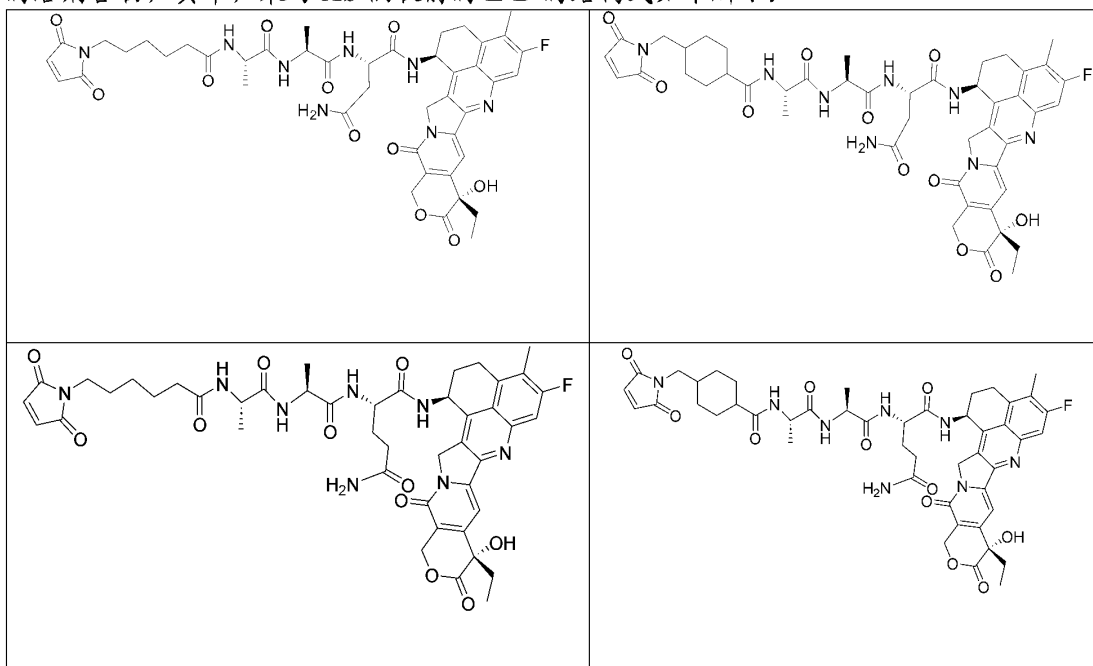
L为接头，其选自mc-AAN、mc-AAQ、mcc-AAN、mcc-AAQ、mcc-Ala-Ala-(3-cyano-alanine)、mcc-Ala-Ala-(2-amino-4-cyanobutanoic acid)、mcc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gln；

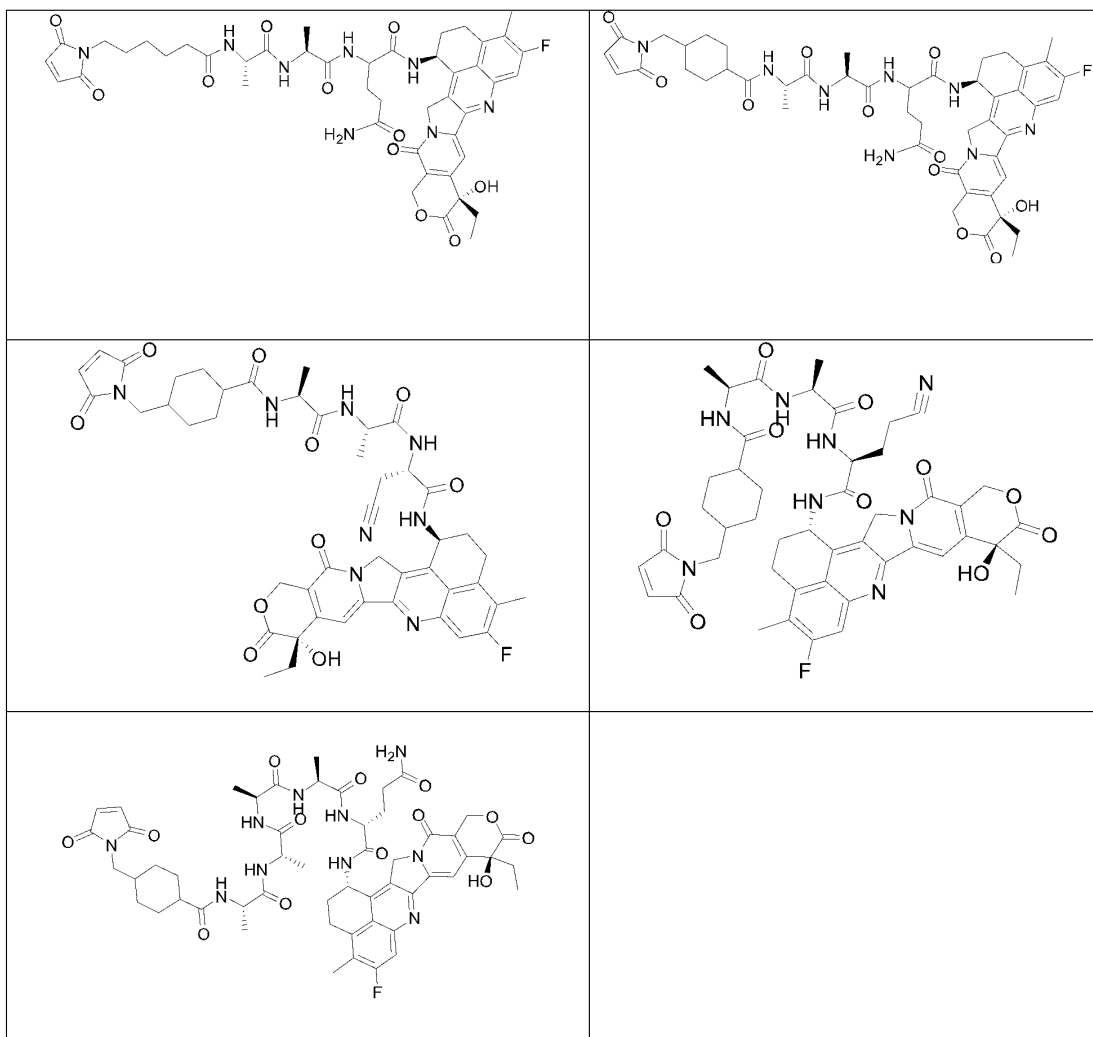
D 为细胞毒素，其为依喜替康（Exatecan）；

p 为 1-10 之间的任意数值;

其中，L接头的mcc或mc端与Ab共价相连，L接头的另一端与D共价相连。

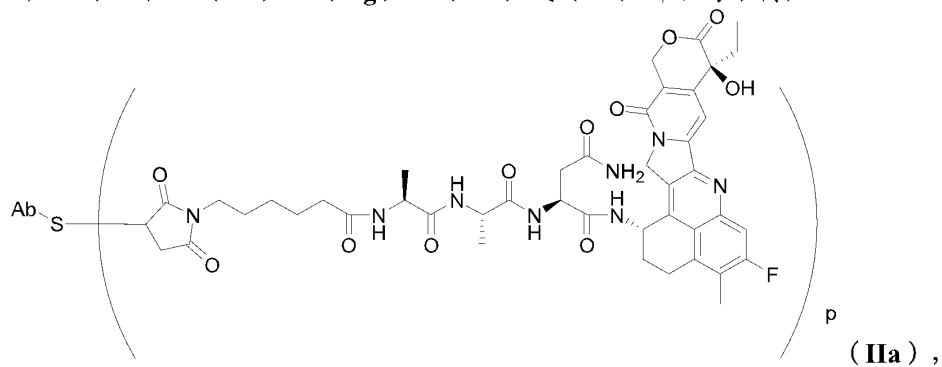
2、权利要求1所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物,其中,未与Ab偶联前的L-D的结构式如下所示:

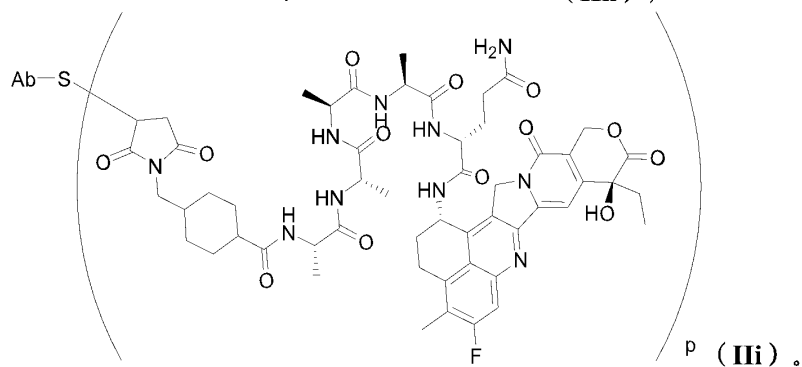
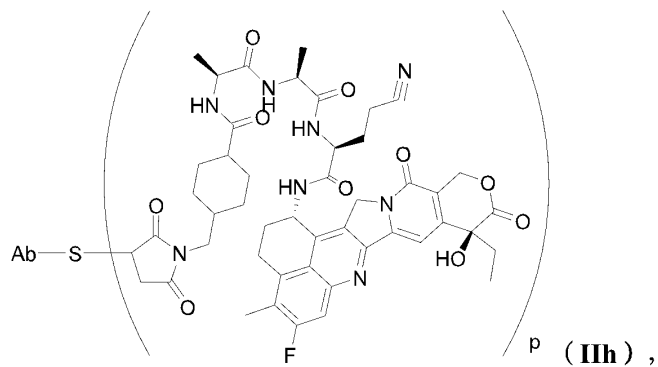
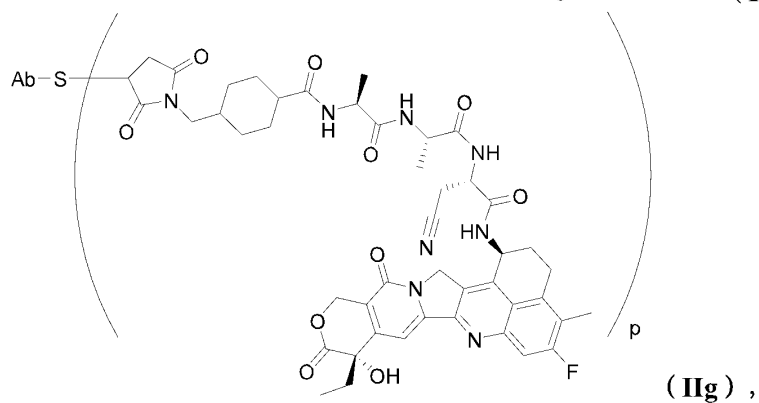
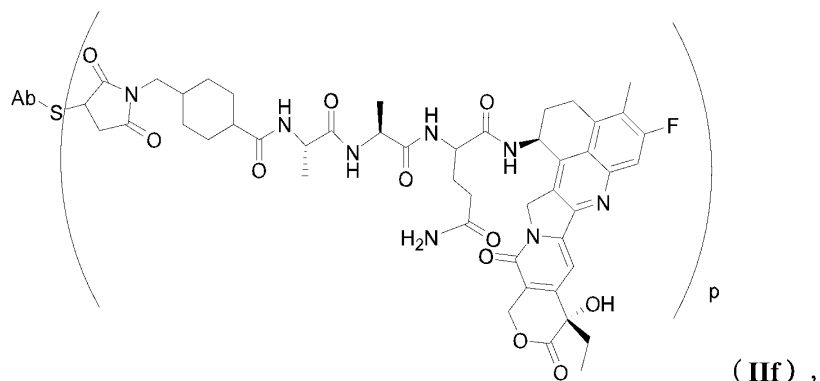




各 L-D 通过末端的丁二酰亚胺与 Ab 中的巯基进行偶联。

3、权利要求 1-2 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，所述抗体药物偶联物具有式 (IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IId)、(IIe)、(IIIf)、(IIg)、(IIh) 或 (IIi) 所示的结构，





4、权利要求 1-3 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，所述抗 GPC3 抗体具有选自以下 (1) - (2) 中的一项或多项技术特征：

(1) 所述抗 GPC3 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID

NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 所示的序列或其突变体;

(2) 所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 所示的序列或其突变体, 或者所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 15 所示的序列或其突变体。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物, 其中, 所述抗 GPC3 抗体具有选自以下 (1) - (2) 中的一项或多项技术特征:

(1) 所述抗 GPC3 抗体的重链可变区包含如 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其突变体;

(2) 所述抗 GPC3 抗体的轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其突变体。

6、权利要求 1-5 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物, 其中, 所述抗 GPC3 抗体具有选自以下 (1) - (2) 中的一项或多项技术特征:

(1) 所述抗 GPC3 抗体的重链恒定区选自人源性 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 恒定区或上述恒定区的突变体;

优选地, 所述 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4;

(2) 所述抗 GPC3 抗体的轻链恒定区选自人源性 lambda 恒定区、kappa 恒定区或上述恒定区的突变体。

7、权利要求 1-6 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物, 其中, 所述抗 GPC3 抗体具有选自以下 (1) - (2) 中的一项或多项技术特征:

(1) 所述抗 GPC3 抗体的重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 19 所示的序列, 或者包含与 SEQ ID NO: 19 所示序列的同源性大于 70%, 优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列;

优选地, 所述抗 GPC3 抗体的重链恒定区的序列如 SEQ ID NO: 19 所示;

(2) 所述抗 GPC3 抗体的轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 20 所示的序列, 或者包含与 SEQ ID NO: 20 所示序列的同源性大于 70%, 优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列;

优选地, 所述抗 GPC3 抗体的轻链恒定区的序列如 SEQ ID NO: 20 所示。

8、权利要求 1-7 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物, 其中, p 为 2-8 之间的任意数值;

优选地, p 为 4-8 之间的任意数值 (例如 4.0、7.9 或 8.0)。

9、药物组合物, 其包含权利要求 1-8 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物;

任选地, 所述药物组合物还包含至少一种药用辅料;

或者任选地, 所述药物组合物还包含用于治疗肿瘤的化疗药物、免疫治疗药物和免疫抑制剂中的至少一种。

10、权利要求 1-8 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物

或所述盐的溶剂合物或者权利要求 9 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗与 GPC3 阳性相关的疾病；

优选地，所述与 GPC3 阳性相关的疾病选自肝癌、肺癌、胃癌、头颈癌、食管癌、默克尔细胞癌、脂肪肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、神经胶质瘤、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、胆囊癌、胶质母细胞瘤；

更优选地，所述与 GPC3 阳性相关的疾病为肝癌。

11、一种体外非治疗性抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长或抑制肿瘤细胞增殖的方法，其包括：将肿瘤细胞与权利要求 1-8 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物或者权利要求 9 所述的药物组合物进行接触，所述肿瘤为 GPC3 表达的肿瘤；

优选地，所述 GPC3 表达的肿瘤选自肝癌、肺癌、胃癌、头颈癌、食管癌、默克尔细胞癌、脂肪肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、神经胶质瘤、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、胆囊癌、胶质母细胞瘤；

更优选地，所述 GPC3 表达的肿瘤为肝癌。

12、一种治疗和/或预防与 GPC3 阳性相关的疾病的方法，其包括：给予有需要的受试者治疗和/或预防有效量的权利要求 1-8 任一项所述的抗体药物偶联物、或其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物或者权利要求 9 所述的药物组合物；

优选地，所述与 GPC3 阳性相关的疾病选自肝癌、肺癌、胃癌、头颈癌、食管癌、默克尔细胞癌、脂肪肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、神经胶质瘤、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、胆囊癌、胶质母细胞瘤；

更优选地，所述与 GPC3 阳性相关的疾病为肝癌。