

靶向 HER3 和 TROP2 的多特异性抗体及其偶联物

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体涉及靶向 HER3 和 TROP2 的多特异性抗体及其偶联物。

背景技术

癌症已经成为全球第二大健康威胁，基于细胞毒性药物的化疗一直是癌症治疗的主要手段。这些细胞毒性药物包括 DNA 碱基类似物（比如 5-氟尿嘧啶和 8-氮杂鸟嘌呤）、DNA 相互作用试剂（比如顺铂和放线菌素 D）、抗代谢药物（比如氨基蝶呤和甲氨蝶呤）和微管抑制剂（比如紫杉醇和长春新碱衍生物）等等。大多数化疗药物，治疗指数比较低，其中严重的副作用主要是脱靶带来的。为了解决这个问题，科学家一直在探索具有更高治疗窗口的癌症治疗方法。

早在 20 世纪初，保罗·埃利希（Paul Ehrlich）首先提出了“魔术子弹”的概念，并假设一些化合物可以直接进入到目标肿瘤细胞中。从理论上讲，这些化合物可以有效的杀灭癌细胞，同时对正常的细胞无害。一个可能的方法是去找一些可以区分肿瘤细胞和正常细胞的标志物，比如说乳腺癌细胞表面的 HER2 分子和 B 细胞淋巴瘤表面的 CD20 分子。自 1975 年杂交瘤技术问世以后，越来越多的针对这些肿瘤抗原的单克隆抗体问世。虽然单克隆抗体药物具有比较好的靶向性，但是对肿瘤细胞的杀伤效果远远低于化疗。因此，一种新的概念，抗体药物偶联物（antibody-drug conjugate, ADC）问世，旨在通过一个连接子桥接抗体和细胞毒性物质，提高肿瘤治疗窗口。

人滋养层细胞表面抗原 2（Trophoblast cell surface antigen 2, TROP2），是一种单次跨膜表面糖蛋白，属于 GA733 基因家族的一员，主要在上皮细胞中表达并调节细胞内钙水平。有证据表明，TROP2 可影响细胞内信号通路，负责细胞生长、增殖和转化。在胚胎发育时期，TROP2 蛋白在胎盘形成，胚胎植入，干细胞的增殖和器官的发育起着重要的作用。有证据表明，TROP2 在许多肿瘤细胞中的表达会上调，其上调可促进肿瘤生长、增殖与侵袭。TROP2 在实体瘤中广泛表达，一项研究表明，100% 的鳞状细胞癌（n=72）和 93.9% 的腺癌（n=181）会过表达 TROP2。由于其表达参与了肿瘤增殖、迁移、侵袭和转移的信号通路。因此，Trop-2 高表达是影响包括乳腺癌在内的多种实体瘤总生存的不良预后因素，同时，基于乳腺癌中 Trop-2 表达率可达 78%，而 HR+/HER2-乳腺癌中高达 78.5%，TNBC 甚至可高达 95%，TROP2 顺理成章地成为继 HER2 后的乳腺癌“最热靶点”。

人表皮生长因子受体 3（human epidermal growth factor receptor 3, HER3），也被称为 ErbB3，是一种细胞表面的受体酪氨酸激酶，它是 ErbB 家族的一员，该家族包括 EGFR（ErbB1）、HER2/neu（ErbB2）、HER3（ErbB3）和 HER4（ErbB4）。作为 ERBB 家族成员，于 1989 年被发现，至今三十余年尚无以 HER3 为靶点的药物获批。HER3 过表达常见于各种癌症。与 HER 家族其他的分子不同，HER3 缺乏胞内的激酶活性，但是它可以通过与其他受体，比如 HER2，形成异二聚体从而磷酸化酪氨酸激酶。配体诱导的二聚化的受体形成后可以通过 PI3K/AKT 信号和 MAPK/ERK 信号进行胞内信号传导，对细胞的存活和增殖起到关键的作用，最终导致肿瘤的进展。最近的研究表明，HER3 的过度表达可能跟很多实体瘤预后不良有关，包括乳腺癌、胃癌、卵巢癌和黑色素瘤。

目前，现有技术中尚未见同时靶向 HER3 和 TROP2 的多特异性抗体或抗原结合片段，也未见同时针对这两个靶标的 ADC 药物。

发明内容

在第一方面，本发明涉及人表皮生长因子受体 3 (HER3) 结合蛋白，其包含至少一个免疫球蛋白单可

变结构域，例如来源于骆驼科动物的 VHH。

在第二方面，本发明涉及多特异性抗原结合蛋白，其包含结合滋养层细胞表面抗原 2 (TROP2) 的抗体或抗原结合片段，以及结合人表皮生长因子受体 3 (HER3) 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域。

在第三方面，本发明还涉及结合 HER3 与 TROP2 的多特异性抗原结合蛋白与细胞毒素组成的抗体-药物偶联物，以及其在抗肿瘤方面的作用。

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。

附图说明

对附图简要说明如下：

图 1 显示的是 iBT11 与 HER3 的亲合力结果 (ELISA 法)；其中 □ 代表 iBT11-Chis，○ 代表 iBT1-Chis。

图 2 显示的是偶联产物抗体 A-ADC 与抗体 A 裸抗的 MS 对比结果。

图 3 显示的是由抗体 A 制备得到抗体 A-ADC 的整体反应式。

图 4 显示的是抗体 A-ADC 对 BxPC-3 细胞的杀伤作用。

图 5 显示的是抗体 A-ADC 对 A431 细胞的杀伤作用。

图 6 显示的是抗体 A-ADC 对 CAPAN-2 细胞的杀伤作用。

图 7 显示的是抗体 A-ADC 对 HCC827 细胞的杀伤作用。

图 8 显示的是抗体 A-ADC 对 BxPC-3、293T-GFP 细胞增殖抑制率。

图 9 显示的是在不同剂量的抗体 A-ADC 作用下，HCC827 CDX 模型中的肿瘤体积变化曲线。

图 10 显示的是在不同剂量的抗体 A-ADC 作用下，NCI-N87 CDX 模型中的肿瘤体积变化曲线。

图 11 显示的是在不同剂量的抗体 A-ADC 作用下，奥希替尼耐药的人肺癌 PDX 模型中的肿瘤体积变化曲线。

图 12 显示的是在抗体 A-ADC 及不同剂量的阳性对照药物作用下，HCC827 CDX 模型中的肿瘤体积变化曲线。横轴（时间轴）上标记的箭头指示了四次用药的具体时间点。

具体实施方式

术语定义

除非另有指示或定义，否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义，该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册，如 Sambrook 等人，“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (第 2 版)，第 1-3 卷，Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)；Lewin，“Genes IV”，Oxford University Press, New York, (1990)；及 Roitt 等人，“Immunology” (第 2 版)，Gower Medical Publishing, London, New York(1989)，以及本文中引用的一般现有技术；此外，除非另有说明，否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行，该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献。

术语“完全抗体”或“全长抗体”或“全抗体”在本文中可以互换使用，通常是指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。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区可以通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还可以包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。重链可以由重链可变区（VH）和重链恒定区（CH）组成。重链恒定区可以由 3 个结构域（CH1、CH2 和 CH3）组成。轻链可以由轻链可变区（VL）和轻链恒定区（CL）组成。轻链恒定区可以由一个结构域 CL 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）和经典补体系统的第一组分（C1q）的结合。VH 和 VL 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构架区（FR）的区域。例如，VH 和 VL 可以分别包含或由从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成，按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。各重链/轻链对的可变区（VH 和 VL）分别形成抗体结合部位。

术语“抗体片段”或“抗原结合片段”指与全长抗体不同的分子，其包含全长抗体的一部分且保留特异性地结合抗原（即，与衍生所述部分或片段的全长抗体结合相同的抗原）的能力。抗体片段的例子包括但不限于 Fv，Fab，Fab’，Fab’-SH，F(ab’)₂；双抗体；线性抗体；单链抗体（例如 scFv）；单结构域抗体；双价抗体或其片段；骆驼科抗体（重链抗体）。该术语还涵盖双特异性抗体或多特异性抗体的片段，和/或由抗体片段形成的双特异性抗体或多特异性抗体。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环（“超变环”）和/或含有抗原接触残基（“抗原接触点”）的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定，所述指派系统包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/ 上)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering) 的 North CDR 定义 (North 等, “A New Clustering of Antibody CDR Loop Con format ions”, Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011))。

在本发明中，采用 Kabat、AbM 或 IMGT 方案定义的 CDR 的区域范围如下：

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	IMGT 方案	Chothia 方案
LCDR1 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L24-L34	L24-L34	L27-L32	L26-L32
LCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L50-L52
LCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L89-L97	L89-L97	L89-L96	L91-L96
HCDR1 (Kabat 编号系统)	H31-H35B	H26-H35B	H26-H35B	H26-H32
HCDR1 (Chothia 编号系统)	H31-H35	H26-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H50-H65	H50-H58	H51-H57	H53-H55
HCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H95-H102	H95-H102	H93-H102	H96-H101

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

在本文中，当提及“Kabat CDR”时，是指基于 Kabat 方案确定的 CDR。类似的，“Chothia CDR”是指基于 Chothia 方案确定的 CDR，“Abm CDR”是指基于 Abm 方案确定的 CDR，“IMGT CDR”是指基于 IMGT 方案确定的 CDR。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG（例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型），IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

如本文所用，术语“抗原结合蛋白”、“结合蛋白”或“结合分子”包括含有至少一个抗原结合位点的分子，其中所述位点与靶分子特异性地结合。抗原结合蛋白可以是抗体，例如全长抗体，或抗体的抗原结合片段，或嵌合抗原受体(CAR)，或任何其他具有高于平常的亲力的多肽，例如支架蛋白、环肽、可溶性受体、受体-抗体(Rab)蛋白、或这些多肽的片段。所述靶分子可以是任何分子，在本文中尤其可以是HER3、TROP2，尤其是HER3、TROP2的构象表位。

如本文所用，术语“多特异性抗原结合蛋白”以最广泛的含义使用，指能够结合（优选特异性结合）两种或更多种抗原的结合蛋白。不受理论束缚地，一般而言，多特异性抗原结合蛋白包含相对独立的多个结构，分别提供针对所述多个抗原的结合特异性，例如，所述多个结构分别独立地包含针对各自靶抗原的一个或多个结合位点，例如，所述多个结构中的至少一个是抗体或抗体片段。在某些方面，至少一个结合特异性由抗体提供。在某些方面，至少一个结合特异性由全长抗体提供。在某些方面，至少一个结合特异性由VHH结构域提供。在某些方面，多特异性结合蛋白是双特异性抗体。

在本申请中，术语“双特异性抗体”通常是指能够分别和两种抗原或抗原表位结合的抗体。在本发明的一些实施方案中，所述双特异性抗体可以包括能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链，以及能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链。在本发明的一些实施方案中，所述双特异性抗体可以包括能够特异性结合第一抗原或抗原表位的VHH结构域，以及能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链。

术语“表位”或“抗原表位”通常是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14或15个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第66卷，G. E. Morris，Ed.（1996）。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子（例如抗体）之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

术语“特异性”是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白可结合的不同类型抗原或表位的数目。可基于抗原结合蛋白的亲力和/或亲合力确定其特异性。由抗原与抗原结合蛋白的解离平衡常数(KD)所表示的亲合力，是表位与抗原结合蛋白上抗原结合位点之间结合强度的量度：KD值越小，表位与抗原结合蛋白之间的结合强度越强(或者，亲合力也可表示为缔合常数(KA)，其为1/KD)。如本领域技术人员将了解，取决于具体感兴趣的抗原，可以以已知方式测定亲合力。亲合力为抗原结合蛋白(例如免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单一可变结构域或含有其的多肽)与相关抗原之间结合强度的量度。亲合力与以下两者有关：与其抗原结合蛋白上的抗原结合位点之间的亲合力，以及存在于抗原结合蛋白上的相关结合位点的数目。

如本申请所用，术语（多肽或蛋白的）“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个的功能性质，并在许多情况下可添加、移除或转移至其他蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

如本申请所用的术语“免疫球蛋白结构域”是指抗体链（例如常规4链抗体的链或重链抗体的链）的球形区域，或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特征。

如本申请所用的术语“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由下述组成的免疫球蛋白结构域：本领域及下文中分别称为“框架区1”或“FR1”、“框架区2”或“FR2”、“框架区3”或“FR3”、及“框架区4”或“FR4”的四个“框架区”，以及间隔开所述框架区的本领域及下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”、“互补决定

区 2”或“CDR2”、及“互补决定区 3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”。因此，免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予抗体对抗原的特异性。天然抗体的重链和轻链的可变结构域通常具有相似的结构。

如本申请所用的术语“免疫球蛋白单一可变结构域”是指能够在不与其他免疫球蛋白可变结构域配对的情况下特异性结合抗原表位的免疫球蛋白可变结构域。单个重链可变（VH）或轻链可变（VL）结构域可以足以提供抗原结合特异性。本申请含义中的免疫球蛋白单一可变结构域的一个实例为“结构域抗体”，例如免疫球蛋白单一可变结构域 VH 或 VL（VH 结构域或 VL 结构域）。免疫球蛋白单一可变结构域的另一实例为如下文定义的骆驼科的“VHH 结构域”（或简称为“VHH”），有时也称“单域抗体”，或“纳米抗体（nanobody）”。

“VHH 结构域”，亦称为单域抗体、VHH、VHH 结构域、VHH 抗体片段和 VHH 抗体，是称为“重链抗体”的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域（Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature 363,446-448 (1993)）。使用术语“VHH 结构域”以将所述可变结构域与存在于常规 4 链抗体中的重链可变结构域（其在本申请中称为“VH 结构域”）进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域（此与常规 4 链抗体中的 VH 或 VL 结构域相反，在该情况下表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识别）。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。VHH 例如来自骆驼科动物，例如羊驼，或是其人源化形式或序列优化形式（例如，以增加结合亲和力的亲和力成熟形式）。在一些实施方案中，VHH 为由或基本上由单个重链可变区（例如重链抗体的重链可变区）组成的单价单特异性多肽分子。优选地，在一个实施方案中，本发明提供包含人源化 VHH 的免疫球蛋白单一可变结构域。优选地，在一个实施方案中，本发明提供包含人源化 VHH 的抗体。优选地，在一个实施方案中，本发明提供包含人源化 VHH 的多特异性抗原结合蛋白（例如，多特异性抗体）。

在本申请的上下文中，术语“VHH 结构域”、“VHH”、“VHH 结构域”、“VHH 抗体片段”、以及“VHH 抗体”可互换使用。

例如 Riechmann 及 Muyldermans, J.Immunol.Methods 231,25-38 (1999) 所示（参见其图 2），对于骆驼科的 VHH 结构域所应用的氨基酸残基，可以根据 Kabat 等人给出的 VH 结构域的一般编号法来编号（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。

本领域中已知对 VH 结构域的氨基酸残基进行编号的替代方法，所述替代方法还可以类似地应用于 VHH 结构域。例如，Chothia CDR 指的是结构环的位置（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。AbM CDR 代表的是 Kabat 超变区和 Chothia 结构环的折中，并且在 Oxford Molecular's AbM 抗体建模软件中使用。“接触（Contact）”CDR 则基于对可获得的复合物晶体结构的分析。

单域抗体或 VHH 也可以包含在更大的多肽/蛋白中。包含本发明 VHH 的多肽/蛋白例子包括但不限于，重链抗体(HcAb)。

本发明所述的“重链抗体”是指不具有轻链的抗体，例如其从 N 段到 C 段可以包含 VH-Fc 或 VH-CH2-CH3 或 VH-铰链区-CH2-CH3，或可以包含 VH-CH1-CH2-CH3。本发明的重链抗体还可以涵盖同型二聚体，例如不具有轻链的重链二聚体抗体。重链抗体中可以包含来自标准抗体的 VH 或者来自单域抗体的 VH。例如，重链抗体中的 VH 可以就是 VHH。例如，重链抗体可以是具有源自骆驼科动物（美洲驼、骆驼，尤其是羊驼）的构架区和/或重链恒定区的重链抗体，其人源化形式或其序列优化形式（亲和力成熟形式）、或其片段（例如包含至少部分恒定区的片段）。重链抗体还可以涵盖将重链可变区或 VHH 与 Fc 区（例如人 IgG Fc 区，例如人 IgG1 或 IgG4Fc 区）融合后形成的抗体。

术语“Fc 区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然的免疫球蛋白“Fc 结构域”包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3

结构域和可选的 CH4 结构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白 Fc 结构域包含源自 IgG、IgA 和 IgD 类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2 结构域和 CH3 结构域)；或者包含源自 IgM 和 IgE 类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2 结构域、CH3 结构域和 CH4 结构域)。除非本文中另外说明，否则 Fc 区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系（也称作 EU 索引）进行编号。在本文中，术语“Fc 区”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL，但在一些情况下可以包括在重链恒定区 N 端的铰链区。在一些实施方案中，本发明的 Fc 区来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在一些实施方案中，本发明的 Fc 区包含 SEQ ID NO:2 或 3 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列。

术语“蛋白-药物偶联物”通常是指与一个或多个化学药物连接的结合蛋白（例如抗体或其抗原结合片段），例如抗体药物偶联物（ADC, Antibody-drug conjugates）。所述化学药物可以为任意的治疗剂和/或细胞毒性剂。所述抗体药物偶联物可以具有从 1-16 任何数目的与抗体偶联的药物，例如可以包括 2、4、6 或 8 的载药种类（drug loaded species）。在本发明中，所述药物可以包括有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、用于基因疗法的载体、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢物、含硼剂、化疗保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光敏治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和/或放射致敏剂等。

在本申请中，术语“药物/抗体比率”或“DAR”通常是指与 ADC 的抗体（或蛋白）连接的药物的数目。ADC 的 DAR 范围可以为 1-8，也可以为更高载量（例如 10），DAR 的范围可以取决于抗体上连接位点的数目。在本申请中，所述 DAR 可以为负载到单个抗体上的药物的数目。所述 DAR 也可以为一组 ADC 的平均或均值 DAR。

术语“连接子”是指将药物（例如小分子药物）与抗体部分连接起来的结构片段。应当理解，连接子在连接至抗体或其抗原结合片段之前具有可与抗体或其抗原结合片段的官能团形成键的官能团。

在本申请中，术语“HER3”通常是指人表皮生长因子受体 3（SwissProt P21860）。人 HER3 也称为 ErbB-3, ERBB3, c-erbB-3, c-erbB3, 受体酪氨酸蛋白激酶 erbB-3, 是受体酪氨酸激酶的表皮生长因子受体(EGFR)家族的一个成员，该家族还包括 HER1(也称作 EGFR)、HER2、和 HER4。HER3 是类似于 EGFR 的跨膜受体，由胞外配体结合域(ECD)、ECD 内的二聚化域、跨膜域、胞内蛋白质酪氨酸激酶域(TKD)和 C 端磷酸化域组成。HER3 能够与其配体结合，虽然不能直接经由蛋白质磷酸化将信号传递入细胞，但可以通过与具有激酶活性的其它 HER 家族成员形成异二聚体来间接实现信号传导途径激活。HER 家族成员之间的二聚体形成扩充 HER3 的信号传导潜力，而且不仅是信号多样化的手段而且是信号放大的手段。所述 HER3 可以包括 HER3 的任何变体、截短体、片段、同工型、和物种同源物，其由细胞-包括肿瘤细胞-天然地表达，或由以 HER3 基因或 cDNA 转染的细胞表达。

如本文所用，术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基。

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

术语“亚环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃基，从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。

术语“杂环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至 20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 S(O)_m (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子，但不包括 -O-O-、-O-S- 或 -S-S- 的环部

分, 其余环原子为碳。

术语“亚杂环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃基, 其包含 3 至 20 个环原子, 其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子, 但不包括 -O-O-、-O-S- 或 -S-S- 的环部分, 其余环原子为碳, 在此基础上从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。

术语“烷氧基”指 -O-(烷基) 和 -O-(非取代的环烷基), 其中烷基或环烷基的定义如上所述。

术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的 6 至 14 元全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团, 优选为 6 至 10 元, 例如苯基和萘基, 优选苯基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上, 其中与母体结构连接在一起的环为芳基环。芳基可以是取代的或非取代的, 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“亚芳基”指具有共轭的 π 电子体系的 6 至 14 元全碳单环或稠合多环, 并从母体芳环的两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。

术语“杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族体系, 其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为 5 至 10 元, 更优选为 5 元或 6 元, 例如咪唑基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上, 其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环。杂芳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“亚杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族多环, 并从母体芳环的两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。

术语“任选的”或“任选地”: 意为随后描述的事件或情况发生或不发生, 并且该描述包括所述事件或情况发生的实例以及所述事件或情况没有发生的实例。例如, 当基团或结构是“任选被取代的”, 所述基团或结构可以被取代, 也可以是不被取代的。

术语“药学上可接受的盐”表示指保持本发明偶联物的生物学效应和性能的盐, 并且该盐在生物学上或其它方面不是不被期望的。本发明偶联物可以以它们的药学上可接受的盐形式存在, 包括酸加成盐和碱加成盐。在本发明中, 药学上可接受的无毒的酸加成盐表示本发明中的偶联物与有机或无机酸形成的盐, 有机或无机酸包括但不限于盐酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、高氯酸、乙酸、草酸、马来酸、富马酸、酒石酸、苯磺酸、甲磺酸、水杨酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、丙酸、苯甲酸、对甲苯磺酸、苹果酸等。药学上可接受的无毒的碱加成盐表示本发明中的偶联物与有机或无机碱所形成的盐, 包括但不限于碱金属盐, 例如锂、钠或钾盐; 碱土金属盐, 例如钙或镁盐; 有机碱盐, 例如通过与含 N 基团的有机碱形成的铵盐。

在根据上下文无矛盾的情况下, 本文中“药学上可接受的”和“药用”可互换使用。

如本文所用, 术语“和/或”是指可选项中的任一项或可选项的两项或更多项。

如本文所用, 术语“包含”或“包括”是指包括所述的要素、整数或步骤, 但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中, 当使用术语“包含”或“包括”时, 除非另有指明, 否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组合的情形。

术语“施用”通常是指向受试者(例如, 患者)给予一定剂量的化合物或药物组合物的方法。施用可通过任何合适的方式进行, 包括肠胃外、肺内和鼻内, 以及(如果局部治疗需要)损伤内施用。胃肠外输注包括例如肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。如无特别说明，本申请所提及的数值均视作经过“约”的修饰。如果有疑问，或者对于特定值或参数的误差范围没有被该领域承认的通常理解，则“约”意味着该值或参数的 $\pm 5\%$ 。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。根据预期效果，可以包括“治疗有效量”和“预防有效量”。

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。

“个体”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，家养动物(例如，牛，羊，猫，狗和马)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物如猴)，兔，以及啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。在一些实施方案中，个体或受试者是人。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。

术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。“肿瘤”涵盖实体瘤和血液肿瘤以及转移性病灶术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提及时并不互相排斥。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

用于本文时，“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

发明详述

人表皮生长因子受体 3 (HER3) 结合蛋白

一方面，本申请提供了一种针对人表皮生长因子受体 3 (HER3) 的单域抗体，其包含 SEQ ID NO: 1 所示的 VHH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

在一些实施方案中，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 根据以下方案定义：Kabat、AbM、Chothia 或 IMGT。

在一些实施方案中，所述单域抗体是骆驼科的、人源化的、或嵌合的。

在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 1 所示的 VHH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 选自以下的任意一组：SEQ ID NO: 8-10 (Kabat 方案)、SEQ ID NO: 11-13 (AbM 方案)、SEQ ID NO: 14-16 (Chothia 方案) 和 SEQ ID NO: 17-19 (IMGT 方案)。

在一些实施方案中，所述单域抗体包含 (1) SEQ ID NO: 1 所示；(2) 与 SEQ ID NO: 1 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ ID NO: 1 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取

代的氨基酸序列，或者由其组成。

在一些实施方案中，所述单域抗体是人源化的。

在一些实施方案中，所述单域抗体包含 SEQ ID NO:2-7 任一项所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述单域抗体由 SEQ ID NO:2-7 任一项所示的氨基酸序列组成。

另一方面，本申请提供了一种人表皮生长因子受体 3 (HER3) 结合蛋白，其包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 1 所示的 VHH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

所述“至少一个免疫球蛋白单一可变结构域”可以为一个或多个，如无特别说明，则多个免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列可以相同，也可以不相同。在一些实施方案中，“多个”可以是 2、3、4 或 5 个，或更多个。

在一些实施方案中，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 根据以下方案定义：Kabat、AbM、Chothia 或 IMGT。

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域是骆驼科的、人源化的、或嵌合的。

在一些实施方案中，SEQ ID NO: 1 所示的 VHH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 选自以下的任意一组：SEQ ID NO: 8-10 (Kabat 方案)、SEQ ID NO: 11-13 (AbM 方案)、SEQ ID NO: 14-16 (Chothia 方案) 和 SEQ ID NO: 17-19 (IMGT 方案)。

在一些实施方案中，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个 VHH，或由其组成，其中至少一个 VHH 是如 SEQ ID NO:1 所示的。

在一些实施方案中，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:1；(2) 与 SEQ ID NO:1 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ ID NO: 1 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的 VHH。

在一些实施方案中，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个(1) SEQ ID NO:1；(2) 与 SEQ ID NO:1 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ ID NO: 1 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的 VHH 组成。

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域为人源化的 VHH，所述人源化的 VHH 包含与 SEQ ID NO: 1 具有至少 80%、优选地至少 90%、更优选地至少 95%、甚至更优选地至少 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述人源化的 VHH 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代。例如，所述人源化的免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 相比包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代。

在一些实施方案中，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域可以包含一个或多个上述人源化的 VHH。

在一些实施方案中，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO:2-7 所示氨基酸序列中的一个或多个。

在一些实施方案中，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO:1-7 所示氨基酸序列中的一个或多个。

在一些实施方案中，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个 SEQ ID NO:1-7 所示氨基酸序列组成。

在另一些实施方案中,所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含选自 SEQ ID NO:1-7 所示的氨基酸序列。例如,所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:1; (2) 与 SEQ ID NO:1 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性;或(3) 与 SEQ ID NO:1 相比包含一个或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的 VHH;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:2; (2) 与 SEQ ID NO:2 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性;或(3) 与 SEQ ID NO:2 相比包含一个或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的 VHH;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:3; (2) 与 SEQ ID NO:3 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性;或(3) 与 SEQ ID NO:3 相比包含一个或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的 VHH;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:4; (2) 与 SEQ ID NO:4 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性;或(3) 与 SEQ ID NO:4 相比包含一个或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的 VHH;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:5; (2) 与 SEQ ID NO:5 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性;或(3) 与 SEQ ID NO:5 相比包含一个或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的 VHH;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:6; (2) 与 SEQ ID NO:6 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性;或(3) 与 SEQ ID NO:6 相比包含一个或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的 VHH;或者,所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:7 所示的 VHH; (2) 与 SEQ ID NO:7 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性;或(3) 与 SEQ ID NO:7 相比包含一个或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

又例如,在一些实施方案中,所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个 SEQ ID NO:1 所示的 VHH 组成;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个 SEQ ID NO:2 所示的 VHH 组成;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个 SEQ ID NO:3 所示的 VHH 组成;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个 SEQ ID NO:4 所示的 VHH 组成;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个 SEQ ID NO:5 所示的 VHH 组成;所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个 SEQ ID NO:6 所示的 VHH 组成;或者,所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域由一个或多个 SEQ ID NO:7 所示的 VHH 组成。

在一些实施方案中,所述 HER3 结合蛋白包含 1 个前述的免疫球蛋白单一可变结构域。

在一些实施方案中,所述 HER3 结合蛋白包含 2 个、3 个、4 个或 5 个或更多个前述的免疫球蛋白单一可变结构域。

在一些实施方案中,本申请的 HER3 结合蛋白,除了至少一个免疫球蛋白单一可变结构域外,还包含免疫球蛋白 Fc 区。在本公开的 HER3 结合蛋白中包含免疫球蛋白 Fc 区可以使所述结合分子形成二聚体。可用于本公开的 Fc 区可以来自不同亚型的免疫球蛋白,例如, IgG(例如, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM。

在一些实施方案中,可以在野生型的 Fc 序列上引入突变用于改变 Fc 介导的相关活性。所述突变包括但不限于: a). 改变 Fc 介导的 CDC 活性的突变; b). 改变 Fc 介导的 ADCC 活性的突变;或 c). 改变 FcRn 介导的体内半衰期的突变。此类突变描述于下列文献中: Leonard G Presta, *Current Opinion in Immunology* 2008,20:460-470; Esohe E. Idusogie et al., *J Immunol* 2000, 164: 4178-4184; RAPHAELA. CLYNES et al., *Nature*

Medicine, 2000, Volume 6, Number 4:443-446; Paul R. Hinton et al., J Immunol, 2006, 176:346-356。例如, 可以通过突变 CH2 区上的 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸用于增加或去除 Fc 介导的 ADCC 或 CDC 活性或是增强或减弱 FcRn 的亲合力。此外, 可以通过突变铰链区的 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸增加蛋白的稳定性。

所述免疫球蛋白 Fc 区优选是人免疫球蛋白 Fc 区, 例如是人 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的 Fc 区。在一些具体实施方案中, 所述免疫球蛋白 Fc 区的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 20。

在一些具体实施方案中, 本申请的 HER3 结合蛋白中, 所述免疫球蛋白 Fc 区(例如人 IgG1 的 Fc 区)直接或间接由接头间接连接至所述免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH)的 C 端。

在一些实施方案中, 本申请的 HER3 结合蛋白, 具有下述特征中的至少一项:

- (a) 与人 HER3 具有特异性的结合;
- (b) 与人 HER3 结合的 K_D 值小于 $1 \times 10^{-7} M$, 优选小于 $1 \times 10^{-8} M$;
- (c) 与人 HER3 特异性结合的 EC_{50} 值小于 200 ng/mL, 优选小于 100 ng/mL, 更优选小于 50 ng/mL;
- (d) 能够阻断 HER3 与 HER2 形成异二聚体;
- (e) 能够阻断 HER3 与其配体(例如 NRG1 或 NRG1b1)的结合, 例如以不大于 200 ng/mL, 优选不大于 150 ng/mL, 更优选不大于 120 ng/mL 的 IC_{50} 值阻断 HER3 与其配体的结合;
- (f) 能够抑制肿瘤细胞的增殖。

融合蛋白

另一方面, 本申请还涉及一种融合蛋白, 所述融合蛋白包含本公开所述的 HER3 结合蛋白或针对 HER3 的单域抗体。

在一些具体的实施方案中, 所述融合蛋白是多特异性抗原结合蛋白, 例如, 双特异性抗原结合蛋白, 例如双特异性抗体。在一些更具体的实施方案中, 所述多特异性抗原结合蛋白还包含第二结合特异性和任选地更多的结合特异性。

在一些实施方案中, 除所述 HER3 结合蛋白或针对 HER3 的单域抗体外, 所述融合蛋白还包含另一种或多种生物活性蛋白, 所述生物活性蛋白可以具有有生物学、治疗、预防或诊断意义或功能的任何蛋白质, 当其被施用于受试者时, 介导生物活性可预防或缓解疾病、障碍或病症。具体来说, 所述生物活性蛋白可以是激动剂、拮抗剂、调节剂、配体、细胞因子、酶或者激素, 特别是可用于预防和/或治疗肿瘤, 尤其是实体瘤和/或非实体瘤的生物活性蛋白。

多特异性抗原结合蛋白

另一方面, 本申请还涉及一种多特异性抗原结合蛋白, 所述多特异性抗原结合蛋白包含特异性结合 HER3 的结构部分(HER3 结合区), 例如, HER3 结合蛋白, 优选地, 本申请所述的 HER3 结合蛋白。

在一些实施方案中, 除所述 HER3 结合蛋白外, 所述多特异性抗原结合蛋白还包含另外的一个或多个抗原结合区, 所述另外的一个或多个抗原结合区提供不同的抗原结合特异性, 即, 与所述 HER3 结合蛋白结合不同的抗原或相同抗原的不同表位。

在一些实施方案中, 所述多特异性抗原结合蛋白包含滋养层细胞表面抗原 2 (TROP2) 结合区, 和人表皮生长因子受体 3 (HER3) 结合区。在一些更具体的实施方案中, 所述滋养层细胞表面抗原 2 (TROP2) 结合区, 和人表皮生长因子受体 3 (HER3) 结合区都是抗体或抗体片段(例如, 免疫球蛋白单一可变结构域), 即针对 TROP2 和 HER3 的结合特异性都由抗体或抗体片段提供, 即所述多特异性抗原结合蛋白是抗 TROP2×HER3

双特异性抗体。

在一些实施方案中，所述多特异性抗原结合蛋白包含滋养层细胞表面抗原 2 (TROP2) 结合蛋白，例如，结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段，以及前述结合人表皮生长因子受体 3 (HER3) 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域；

具体来说，所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 22-24 (Kabat 方案)、SEQ ID NO: 25-27 (AbM 方案)、SEQ ID NO: 28-30 (Chothia 方案) 和 SEQ ID NO: 31-33 (IMGT 方案) 中任意一组的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，

所述轻链可变区包含选自 SEQ ID NO: 35-37 (Kabat 方案)、SEQ ID NO: 38-40 (AbM 方案)、SEQ ID NO: 41-43 (Chothia 方案) 和 SEQ ID NO: 44-46 (IMGT 方案) 中任意一组的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述多特异性抗原结合蛋白中，所述结合 HER3 的免疫球蛋白单一可变结构域包含选自 SEQ ID NO: 8-10 (Kabat 方案)、SEQ ID NO: 11-13 (AbM 方案)、SEQ ID NO: 14-16 (Chothia 方案) 和 SEQ ID NO: 17-19 (IMGT 方案) 中任意一组的 VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3。

在一些实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含(1) SEQ ID NO: 21；(2) 与 SEQ ID NO: 21 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ ID NO: 21 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列，或由其组成。在一些实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列，或由其组成。

在一些实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区包含(1) SEQ ID NO: 34；(2) 与 SEQ ID NO: 34 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ ID NO: 34 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列，或由其组成。在一些实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，或由其组成。

在一些实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的重链还包含人 IgG1 的恒定区或其变体，例如包含(1) SEQ ID NO: 47；(2) 与 SEQ ID NO: 47 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ ID NO: 47 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的轻链还包含人 Igκ 的恒定区或其变体，例如包含(1) SEQ ID NO: 48；(2) 与 SEQ ID NO: 48 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ ID NO: 48 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体的重链包含(1) SEQ ID NO: 49；(2) 与 SEQ ID NO: 49 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ ID NO: 49 相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体的重链包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述结合 TROP2 的抗体的轻链包含(1) SEQ ID NO: 50；(2) 与 SEQ ID NO: 50 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性；或(3) 与 SEQ

ID NO: 50 相比包含一个或多个氨基酸取代, 优选保守氨基酸取代, 例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中, 所述结合 TROP2 的抗体的轻链包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

作为一个实例, 所述结合 TROP2 的抗体可以与 Sacituzumab (hRS7) 具有相同的结构, 公布于 WHO Drug Information Proposed INN List 115 (2016)。

在一些实施方案中, 所述多特异性抗原结合蛋白中, 所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含(1) SEQ ID NO:1-7 之一; (2) 与 SEQ ID NO: 1-7 之一具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性; 或(3) 与 SEQ ID NO: 1-7 之一相比包含一个或多个氨基酸取代, 优选保守氨基酸取代, 例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:1; (2) 与 SEQ ID NO: 1 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性; 或(3) 与 SEQ ID NO: 1 相比包含一个或多个氨基酸取代, 优选保守氨基酸取代, 例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含一个或多个(1) SEQ ID NO:7; (2) 与 SEQ ID NO: 7 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性; 或(3) 与 SEQ ID NO: 7 相比包含一个或多个氨基酸取代, 优选保守氨基酸取代, 例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代的氨基酸序列所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述多特异性抗原结合蛋白包含 1 个上述的免疫球蛋白单一可变结构域; 在另一些实施方案中, 所述多特异性抗原结合蛋白包含 2 个上述的免疫球蛋白单一可变结构域。

在一些实施方案中, 在所述多特异性抗原结合蛋白中, 所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域与结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段直接或通过接头间接连接。

在一些实施方案中, 所述接头为多肽, 例如可以是长 1-20 或更多个氨基酸、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。例如, 所述接头是柔性接头, 例如(GGG)_n、(GGGS)_n、(GGGA)_n、(GGGAA)_n、(GGGGS)_n 和(GGGGGS)_n 中的一个或多个, 其中 n 为选自 1 至 30 的整数, 选自 1 至 20 的整数, 选自 1 至 10 的整数, 选自 1 至 9 的整数, 选自 1 至 8 的整数, 选自 1 至 7 的整数, 选自 1 至 6 的整数, 选自 1 至 5 的整数, 选自 1 至 4 的整数, 或选自 1 至 3 的整数。在一些实施方案中, 所述接头是 GGGGGS、GGGGS、GS、GAP、(GGGGS)×3、GAPGGGGGS 等。

在一些实施方案中, 所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 C 末端与所述结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段的重链的 N 末端连接。

在一些实施方案中, 所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 N 末端与所述结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段的重链的 C 末端连接。

在一些实施方案中, 所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 C 末端与所述结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段的轻链的 N 末端连接。

在一些实施方案中, 所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 N 末端与所述结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段的轻链的 C 末端连接。

在一些具体的实施方案中, 所述多特异性抗原结合蛋白包含 SEQ ID NO: 51 所示的第一多肽, 以及 SEQ ID NO: 50 所示的第二多肽。

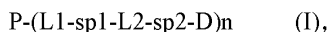
在一些具体的实施方案中, 所述多特异性抗原结合蛋白包含多于一条 SEQ ID NO: 51 所示的第一多肽, 以及多于一条 SEQ ID NO: 50 所示的第二多肽。在一些实施方案中, 所述多特异性抗原结合蛋白通过第一

多肽铰链区的二硫键形成同二聚体。

在一些实施方案中, 本申请所述多特异性抗原结合蛋白, 可以 (a) 同时结合 HER3 和 TROP2 (ELISA 法), 例如其 EC_{50} 值 $<100nM$, 优选 $<50nM$; (b) 结合表达 HER3 或 TROP2 的细胞; 和/或 (c) 桥接表达 TROP2 以及 HER3 的细胞。

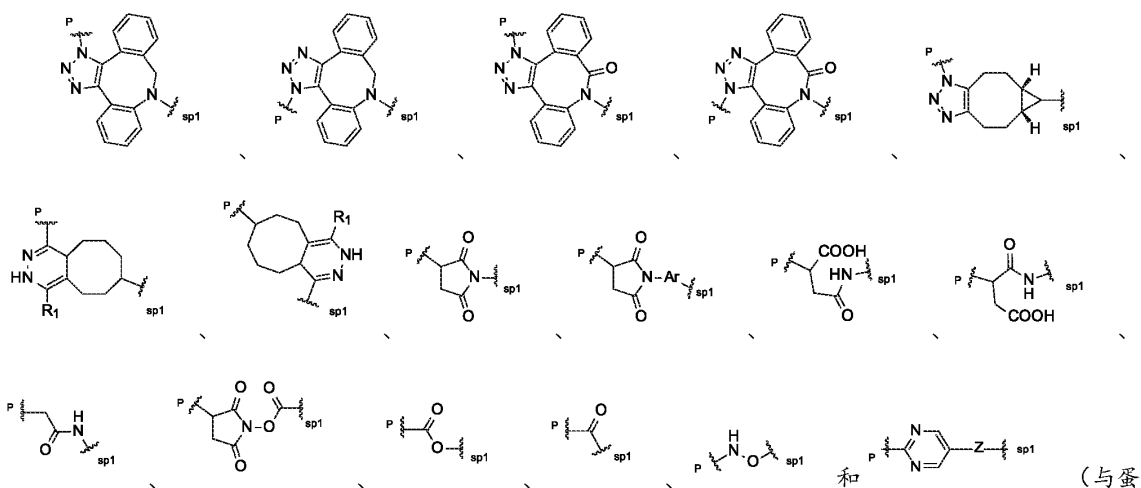
蛋白-药物偶联物

另一方面, 本申请还涉及蛋白-药物偶联物, 其具有式 I 的结构:

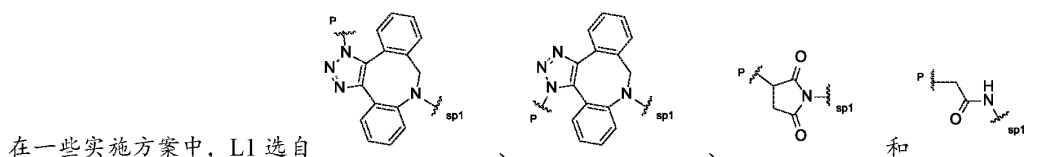


其中, 蛋白 P 包含本申请所述的多特异性抗原结合蛋白, D 为具有生物学活性的物质, L1 是用于与 P 连接的接头, sp1 为第一间隔单元, L2 为可切割的连接子, sp2 为第二间隔单元且与 D 相连, $n=1\sim20$ 。

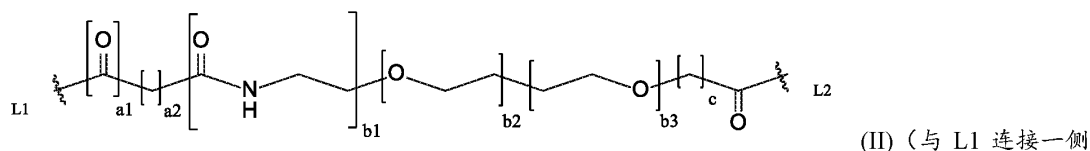
在一些实施方案中，L1 选自：



白质连接一侧标示为 P, 与第一间隔单元连接的一侧标示为 spl), 其中, Ar 代表 C₆₋₁₀ 的亚芳基, 其任选地被卤素、C₁₋₆ 烷基取代; R₁ 选自氢、卤素及 C₁₋₆ 烷基; Z 选自直键、C₂₋₆ 亚炔基、C₂₋₆ 亚烯基、C₆₋₁₀ 亚芳基、5-10 元亚杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、亚胺基和 CF₂。



在一些实施方案中，第一间隔单元 sp1 的结构如式 II 所示：



标示为 L1, 与 L2 连接一侧标示为 L2), 其中, $a_1=0$ 或 1, $a_2=0$ 至 6 的整数, $b_1=0$ 或 1, $b_2=0$ 至 16 的整数, $b_3=0$ 至 16 的整数, $c=0$ 至 6 的整数, 且 b_2 与 b_3 至少有一个为 0。

在一些实施方案中，spl 的结构中，a1=1；在另一些实施方案中，a1=0。

在一些实施方案中，a2=0、1、2、3、4、5 或者 6。

在一些实施方案中，b1=0 或 1。

在一些实施方案中，b2=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或者 16。

在一些实施方案中，b3=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或者 16。

在一些实施方案中，c=0、1、2、3、4、5 或者 6。

以上 a1、a2、b1、b2、b3 和 c 的可选方案之间能够进行任意的组合，前提是 b2 与 b3 至少有一个为 0。

在一些具体的实施方案中，spl 的结构选自以下的组：

- (1) a1=0, a2=2、3、4、5 或 6, b1=0, b2=0, b3=0, c=0;
- (2) a1=0, a2=0, b1=0, b2=0, b3=0, c=2、3、4、5 或 6;
- (3) a1=1, a2=2、3、4、5 或 6, b1=1, b2=2、3、4、5、6、7 或 8, b3=0, c=0;
- (4) a1=0, a2=2、3、4、5 或 6, b1=1, b2=2、3、4、5、6、7 或 8, b3=0, c=0; 和
- (5) a1=1, a2=0, b1=0, b2=0, b3=2、3、4、5、6、7 或 8, c=2、3、4、5 或 6;

在一些实施方案中，spl 的结构具体选自以下的组：

- (1.1) a1=0, a2=2, b1=0, b2=0, b3=0, c=0;
- (1.2) a1=0, a2=3, b1=0, b2=0, b3=0, c=0;
- (1.3) a1=0, a2=4, b1=0, b2=0, b3=0, c=0;
- (1.4) a1=0, a2=5, b1=0, b2=0, b3=0, c=0;
- (1.5) a1=0, a2=6, b1=0, b2=0, b3=0, c=0;
- (2.1) a1=0, a2=0, b1=0, b2=0, b3=0, c=2;
- (2.2) a1=0, a2=0, b1=0, b2=0, b3=0, c=3;
- (2.3) a1=0, a2=0, b1=0, b2=0, b3=0, c=4;
- (2.4) a1=0, a2=0, b1=0, b2=0, b3=0, c=5;
- (2.5) a1=0, a2=0, b1=0, b2=0, b3=0, c=6;
- (3.1) a1=1, a2=2, b1=1, b2=2, b3=0, c=0;
- (3.2) a1=1, a2=2, b1=1, b2=3, b3=0, c=0;
- (3.3) a1=1, a2=2, b1=1, b2=4, b3=0, c=0;
- (3.4) a1=1, a2=2, b1=1, b2=5, b3=0, c=0;
- (3.5) a1=1, a2=2, b1=1, b2=6, b3=0, c=0;
- (3.6) a1=1, a2=2, b1=1, b2=7, b3=0, c=0;
- (3.7) a1=1, a2=2, b1=1, b2=8, b3=0, c=0;

- (3.8) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- (3.9) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- (3.10) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- (3.11) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- (3.12) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- (3.13) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- (3.14) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- (3.15) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- (3.16) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- (3.17) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- (3.18) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- (3.19) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- (3.20) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- (3.21) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- (4.1) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- (4.2) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- (4.3) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- (4.4) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- (4.5) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- (4.6) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- (4.7) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- (4.8) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- (4.9) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- (4.10) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- (4.11) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- (4.12) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- (4.13) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- (4.14) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- (4.15) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- (4.16) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- (4.17) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;

- (4.18) $a_1=0$, $a_2=4$, $b_1=1$, $b_2=5$, $b_3=0$, $c=0$;
 (4.19) $a_1=0$, $a_2=4$, $b_1=1$, $b_2=6$, $b_3=0$, $c=0$;
 (4.20) $a_1=0$, $a_2=4$, $b_1=1$, $b_2=7$, $b_3=0$, $c=0$;
 (4.21) $a_1=0$, $a_2=4$, $b_1=1$, $b_2=8$, $b_3=0$, $c=0$;
 (5.1) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=2$, $c=2$;
 (5.2) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=3$, $c=2$;
 (5.3) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=4$, $c=2$;
 (5.4) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=5$, $c=2$;
 (5.5) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=6$, $c=2$;
 (5.6) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=7$, $c=2$; 和
 (5.7) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=8$, $c=2$ 。

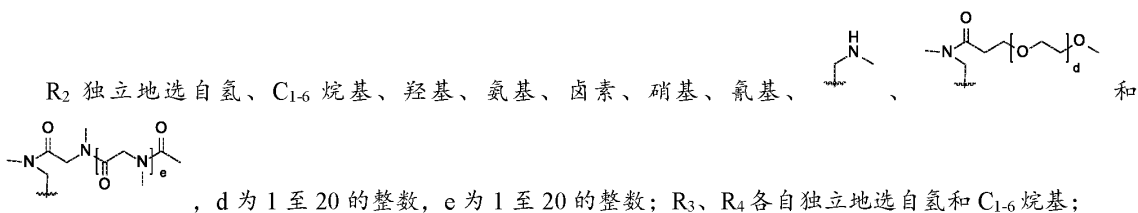
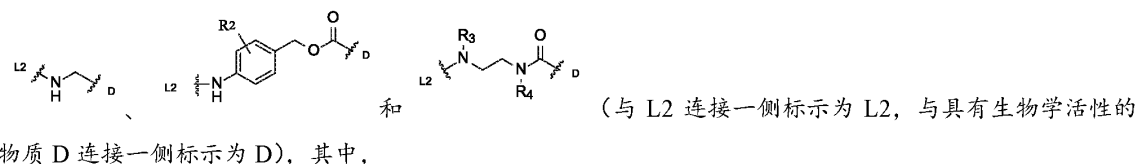
在一些实施方案中, 所述可切割的连接子 L2 为二肽、三肽或四肽残基。

在一些实施方案中, L2 选自以下的二肽残基: -Phe-Lys-, -Val-Ala-, -Val-Lys-, -Val-Cit-, -Ala-Lys-, -Phe-Cit-, -Leu-Cit-, -Ile-Cit-, -Phe-Arg-, -Trp-Cit-, -Gly-Gly-, -Ala-Ala-, -Gly-Val-和-Gly-Glu-; 所述二肽残基的左侧与 sp1 连接, 右侧与 sp2 连接。优选地, L2 选自 -Val-Ala-, -Val-Lys-和-Val-Cit-。

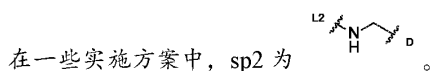
在一些实施方案中, L2 选自以下的三肽残基: -Glu-Val-Ala-, -Glu-Val-Cit-, - α Glu-Val-Ala-, - α Glu-Val-Cit-, -Val-Lys-Gly 和-Val-Cit-Gly-; 所述三肽残基的左侧与 sp1 连接, 右侧与 sp2 连接。

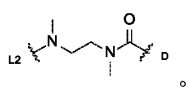
在一些实施方案中, L2 选自以下的四肽残基: -Gly-Gly-Phe-Gly-和-Gly-Phe-Gly-Gly-; 所述四肽残基的左侧与 sp1 连接, 右侧与 sp2 连接。

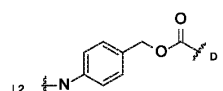
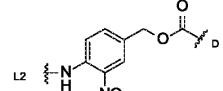
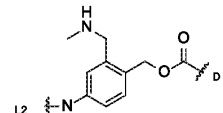
在一些实施方案中, 第二间隔单元 sp2 不存在, 或 sp2 选自:

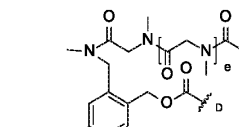


所述烷基可任选地被羟基、氨基、卤素、硝基和氰基取代。

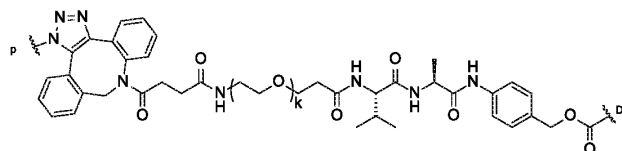
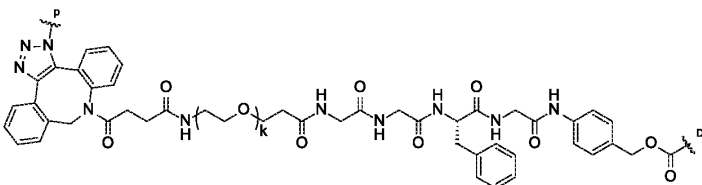
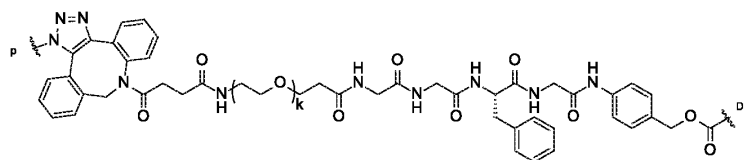
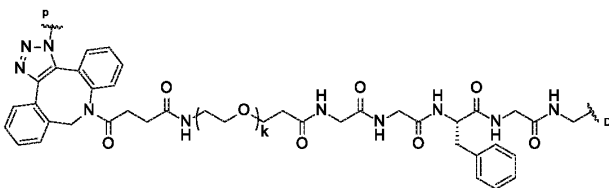
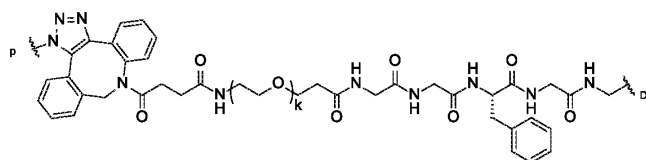


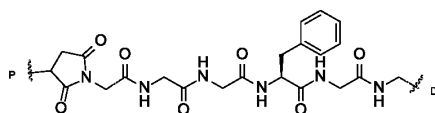
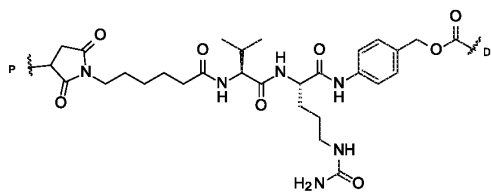
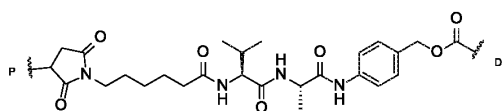
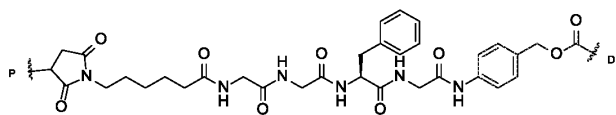
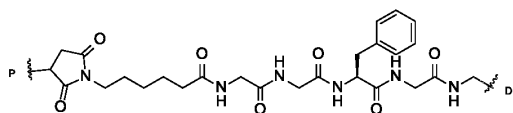
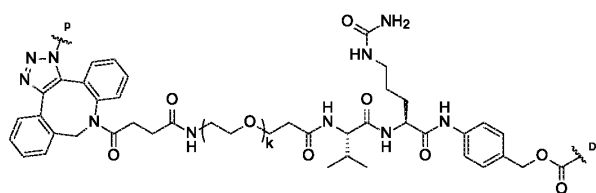
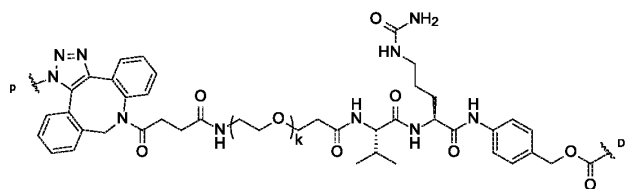
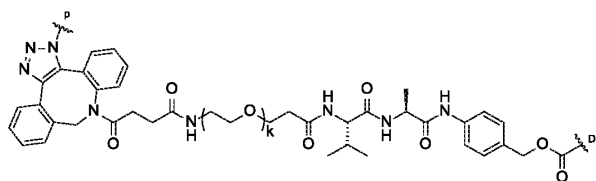
在一些实施方案中，sp2 为 。

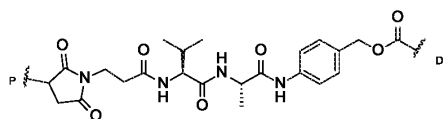
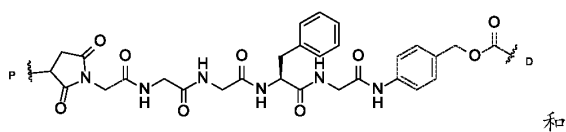
在一些实施方案中，sp2 选自：
、
、
、

和 ；其中，d 为 1 至 10 的整数，e 为 1 至 10 的整数。

在一些实施方案中，所述-L1-sp1-L2-sp2-选自以下的结构：



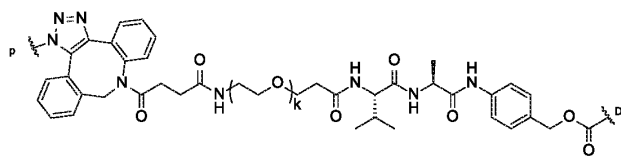
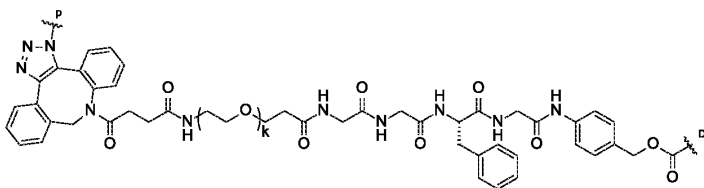
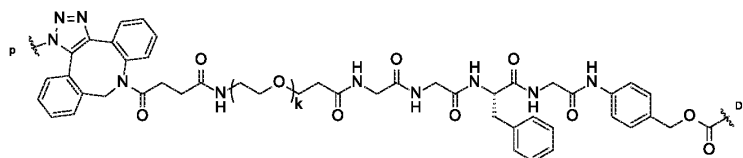
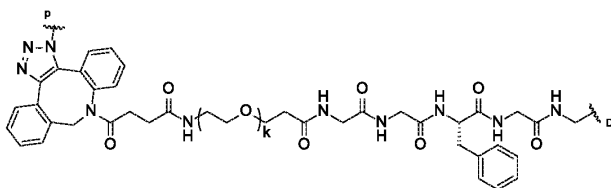
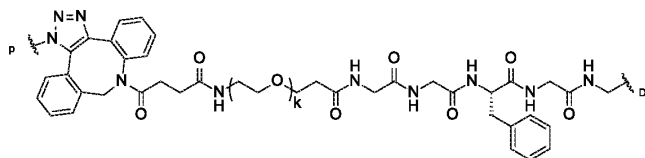


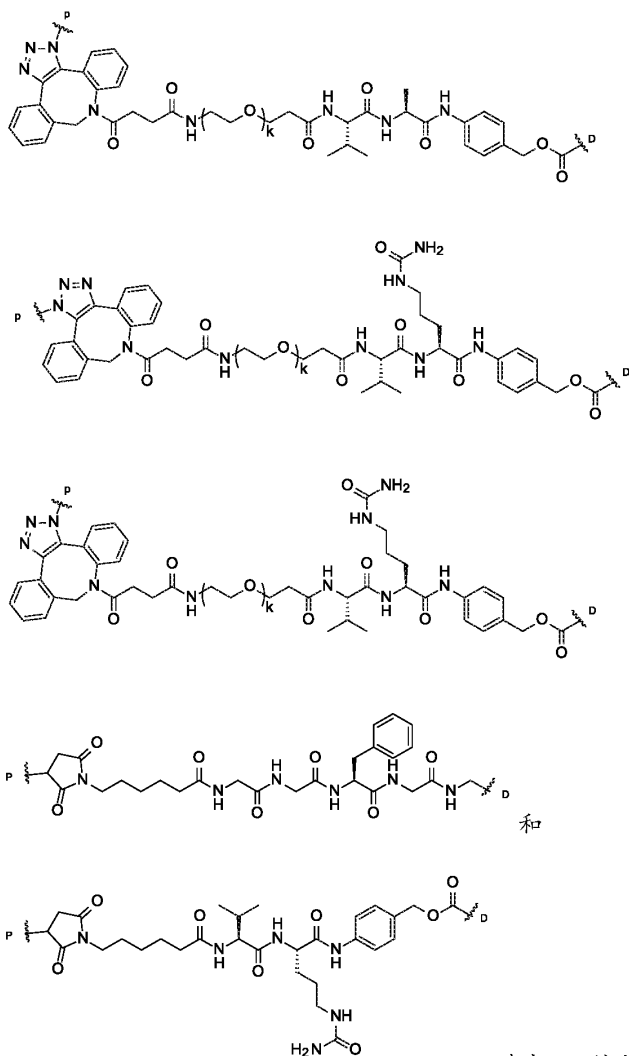


(与蛋白质 P 连接一侧标示为 P, 与具有生物学活性的物质 D 连接一侧标示为 D); 其中, k 为 1~20 的整数。

在一些实施方案中, 所述 k 为 2~16 的整数, 例如 k=2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16。

在一些实施方案中, 所述-L1-sp1-L2-sp2-进一步选自以下的结构:





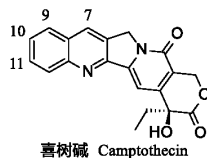
其中，k 的定义如前所述。

在一些实施方案中，生物学活性的物质 D，可以选自细胞毒素、蛋白激酶抑制剂、免疫激动剂、糖皮质激素、寡核苷酸、放射性同位素、多肽及其任意组合。

在一些实施方案中，D 为细胞毒素，其选自：DNA 烷化剂、DNA 解构剂、拓扑异构酶 I 抑制剂、拓扑异构酶 II 抑制剂、微管抑制剂、核糖体抑制剂及其任意组合。

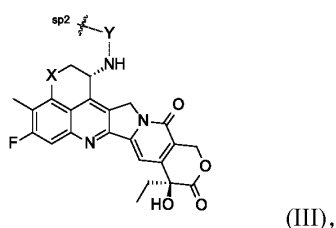
在一些具体的实施方案中，D 选自：奥瑞他汀(Auristatin)衍生物、美登素(Maitansine)衍生物、艾日布林(Eribulin)衍生物、微管菌素(tubulysin)衍生物、吡咯苯二氮卓二聚体(Pyrrolobenzodiazepine, PDB)衍生物、杜卡霉素(Duocarmycin)衍生物、卡奇霉素(Calicheamicin)衍生物、PNU-159682 及其衍生物、喜树碱(Camptothecin)衍生物、鹅膏毒素(Amatotoxin)衍生物及其任意组合。

在一些实施方案中，D 选自喜树碱衍生物，所述喜树碱衍生物指具有与天然来源喜树碱相同的 5 元杂合母核结构，并且在其 7 位、9 位、10 位和 11 位具有取代修饰的化合物，其具有与天然喜树碱同等或更强的拓扑异构酶 I 抑制活性。

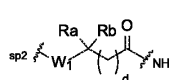


可选的喜树碱衍生物可来源于现有技术整体，例如专利申请文件 WO2014057687、WO2020063676、CN111689980A、WO2022068878、WO2022068878、WO2020259258、WO2020219287、WO2022121981、WO2021173773、WO2019195665、WO2021067861、WO2022170971、WO2020200880、WO2021148501、WO2023109965 和 WO2022015656，以上专利的公开内容作为整体加入到本申请中。

在一些实施方案中，D 具有式 III 所示的结构：

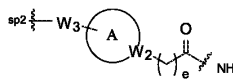


其中，X 选自 CH₂、NH、O、S 或 SO₂；



Y 不存在，或 Y 具有

(IV-a)或



(IV-b)所示的结构；

其中 W₁、W₃ 各自独立地选自 O、S 和 NH，W₂ 选自 C、CH 和 N，

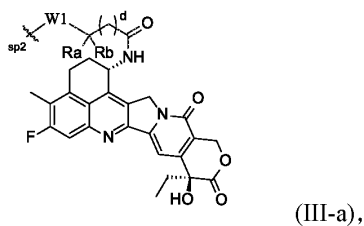
R_a、R_b 各自独立地选自氢、氘、卤素、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基、3-6 元杂环烷基、羟基、氨基、氰基和硝基；或者，R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成 3-6 元环烷基、3-6 元杂环烷基或羰基；或者，R_a 与酰胺部分的 N 原子相连形成 3-6 元杂环烷基并且 R_b 为氢；

环 A 选自以下的组：5-10 元亚环烷基、5-10 元亚杂环烷基、6-10 元亚芳基和 5-10 元亚杂芳基；

所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基和亚杂芳基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代；

d、e 各自独立地选自 0 至 5 的整数。

在一些实施方案中，D 具有式 III-a 所示的结构：



其中 W_1 为 O 或 NH;

R_a 、 R_b 各自独立地选自氢、氘、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷基、3-6 元杂环烷基、羟基、氨基、氰基和硝基; 或者, R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成 3-6 元环烷基、3-6 元杂环烷基或羰基; 或者, R_a 与酰胺部分的 N 原子相连形成 3-6 元杂环烷基并且 R_b 为氢;

所述烷基、烷氧基、环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代;

d 为 0 至 5 的整数。

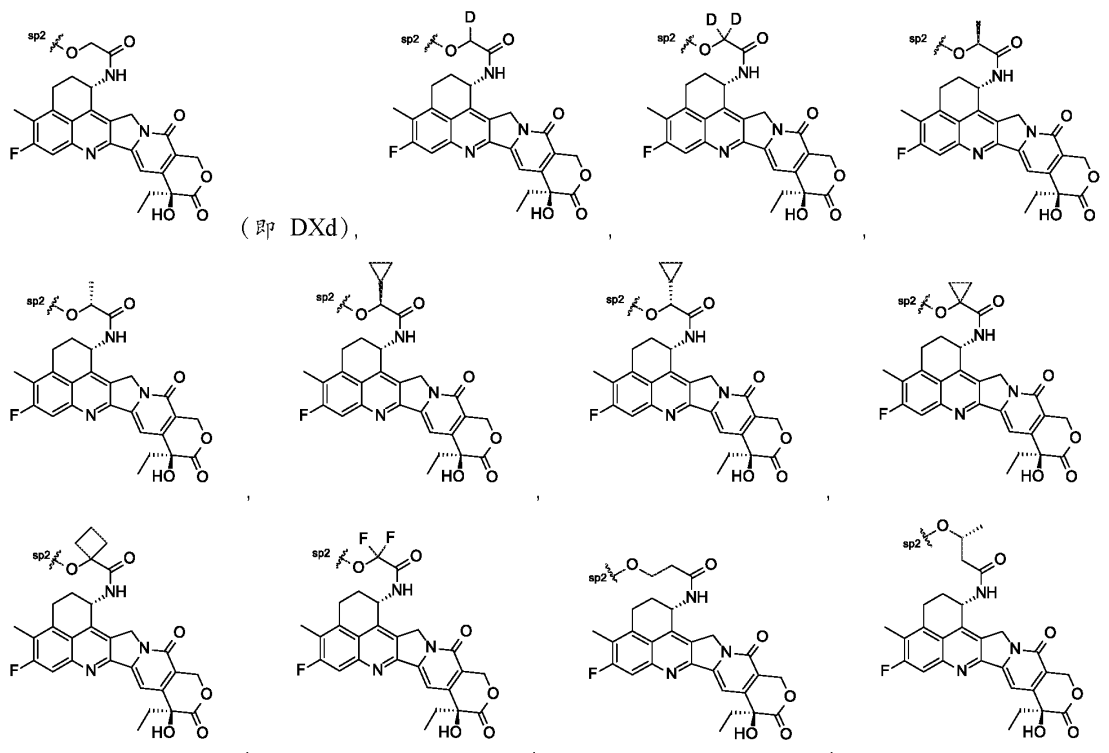
在一些实施方案中, W_1 为 O。

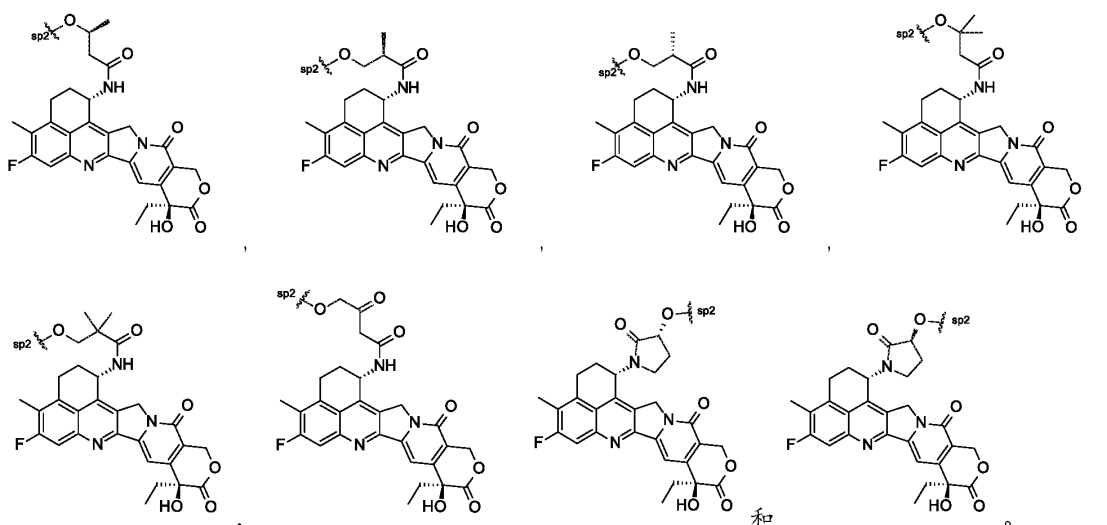
在一些实施方案中, d 为 0、1 或 2。

在一些实施方案中, 其中 R_a 选自氢、氘、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷基、3-6 元杂环烷基、羟基和氨基, R_b 为氢。所述烷基、烷氧基、环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代。

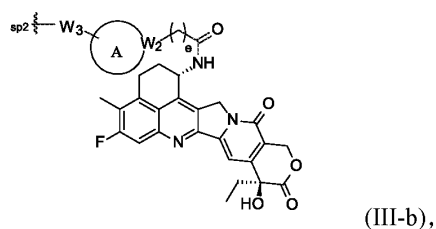
在一些实施方案中, 其中 R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成 3-6 元环烷基或 3-6 元杂环烷基。所述环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代。

在一些实施方案中, D 可以选自以下的组:





在另一些实施方案中，D 具有式 III-b 所示的结构：



其中 W_3 为 O 或 NH, W_2 为 C、CH 或 N,

环 A 选自以下的组：5-10 元亚环烷基、5-10 元亚杂环烷基、6-10 元亚芳基和 5-10 元亚杂芳基；

所述亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基和亚杂芳基各自独立任选地进一步被选自氟、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代；

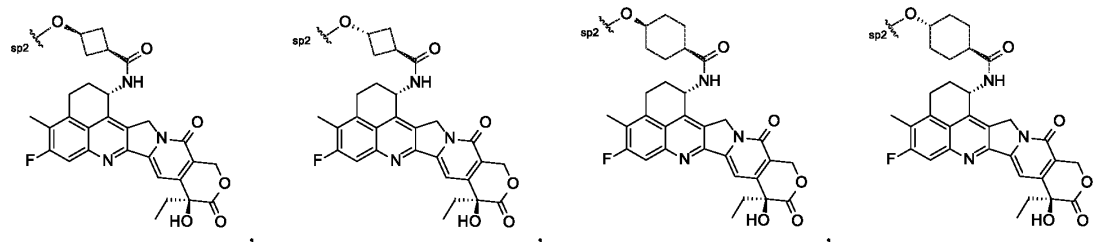
e 为 0 至 5 的整数。

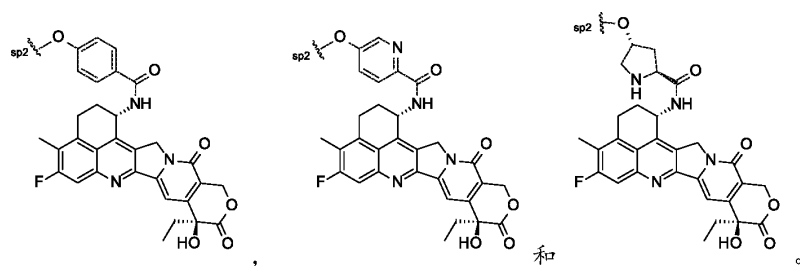
在一些实施方案中， W_3 为 O；在另一些实施方案中， W_2 为 CH。

在一些实施方案中， e 为 0、1 或 2。

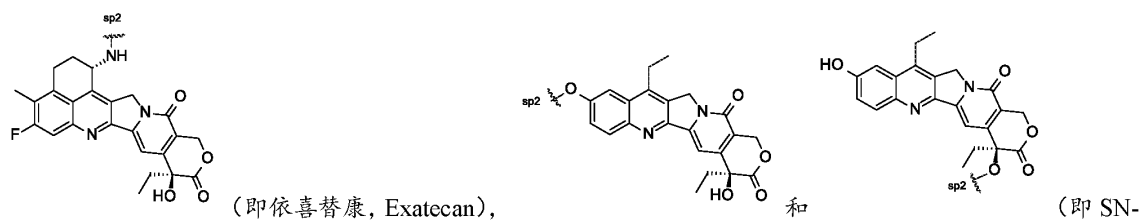
在一些实施方案中，环 A 为 5-10 元亚环烷基。所述亚环烷基可进一步被选自氟、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代。

在一些实施方案中，D 可以选自以下的组：



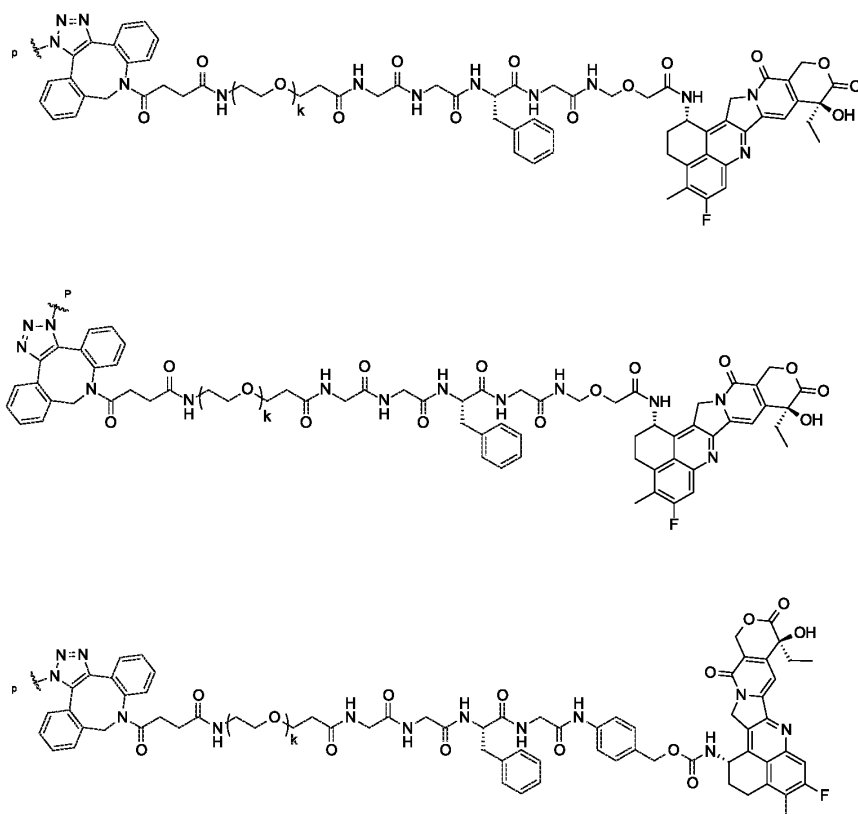


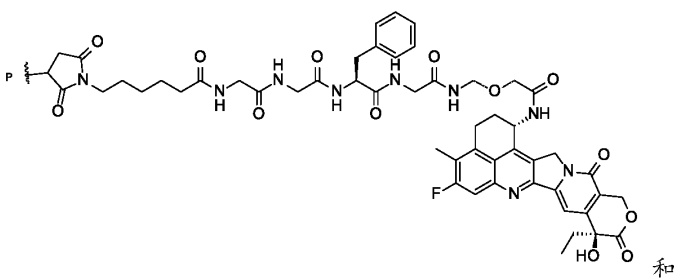
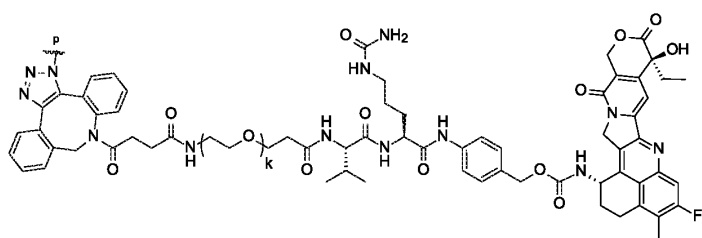
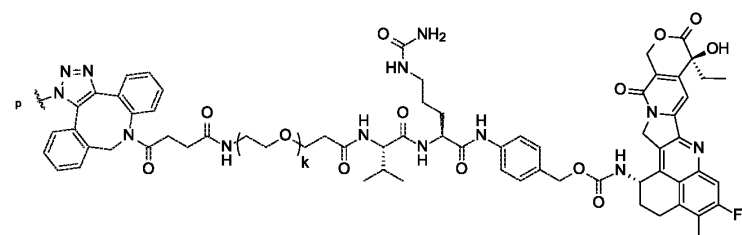
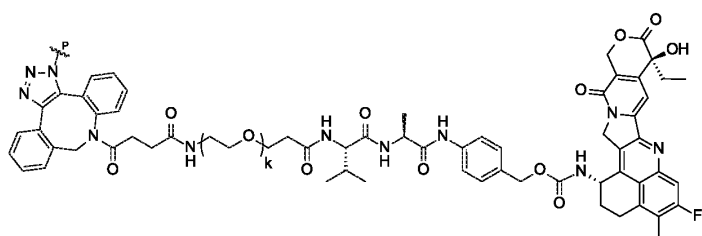
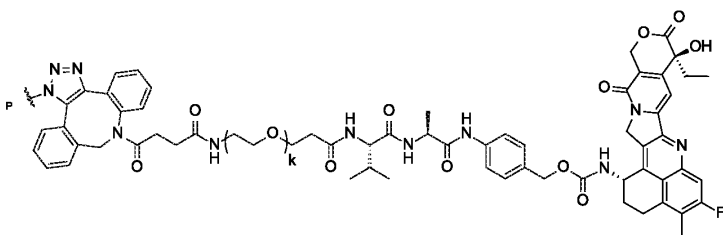
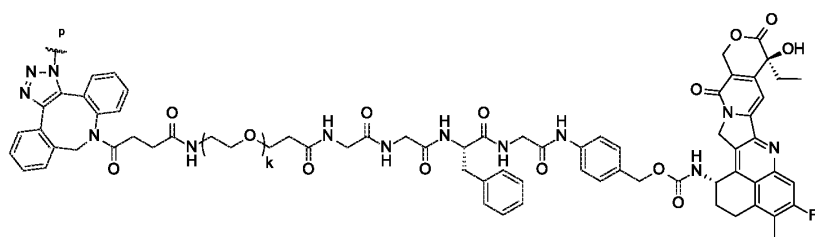
在一些实施方案中，D 作为喜树碱衍生物，还可以选自以下的结构：

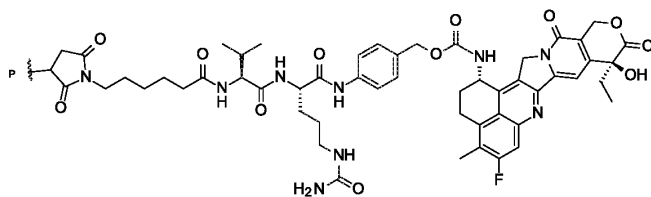


38)。

在一些具体的实施方案中，所述-L1-sp1-L2-sp2-D 选自以下的结构：







, 其中, k 为 1~20 的整数。

在一些实施方案中, 所述 k 为 2~16 的整数, 例如 k=2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16。

在一些实施方案中, n=1~15, 例如 n=1~10、n=1~8、n=2~6、n=2~5 或 n=2.5~3.5。

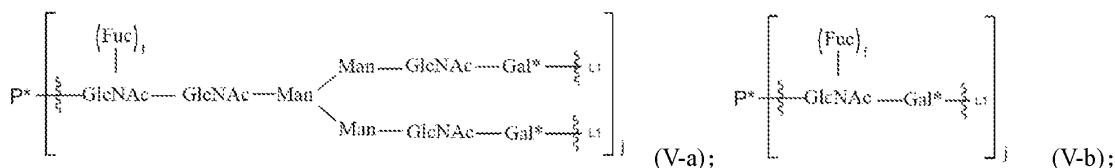
在一些实施方案中, 在式 I 中, 连接单元 L 与蛋白 P 之间通过巯基连接; 优选地, 所述巯基来源于抗体; 更优选地, 所述巯基通过还原重链与重链之间的二硫键, 和/或重链与轻链之间的二硫键得到。

在另一些实施方案中, 连接单元 L 与蛋白 P 之间通过寡糖连接; 优选地, 所述寡糖衍生自抗体的天然糖链。

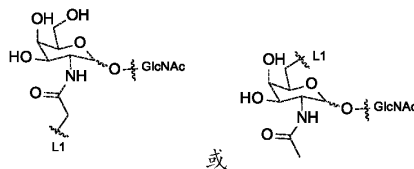
在一些实施方案中, 所述寡糖衍生自抗体的 N-糖链。

在一些实施方案中, 所述寡糖由 2~15 个单糖组成; 优选地, 所述寡糖由 2~10 个单糖组成。

在一些实施方案中, 所述寡糖具有式 V-a 或式 V-b 所示结构:



其中, P* 结合 HER3 和 TROP2, 例如, 其包含本申请所述的抗原结合蛋白, GlcNAc 为 N-乙酰葡萄糖胺, Fuc 为岩藻糖, Man 为甘露糖, f 为 0 或 1, j 为 1 至 20;



Gal* 为经修饰的半乳糖, 选自以下的结构:

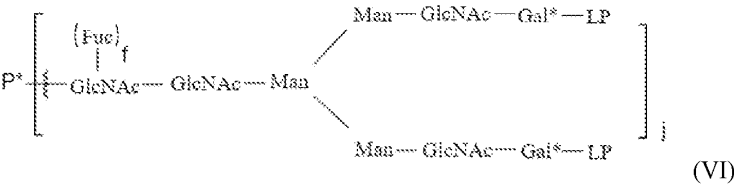
或

所述寡糖通过核心 GlcNAc 与 P* 连接。

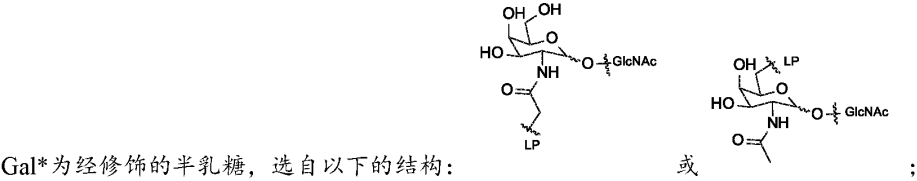
在一些实施方案中, 经修饰的半乳糖通过 β -1,4-糖苷键与 GlcNAc 连接。

在一些实施方案中, 所述寡糖与 P* 的 Fc 片段连接; 优选与 Fc 片段的 CH2 结构域连接; 更优选与 Fc 片段的 Asn297 (根据 Kabat 的 EU 索引编号) 连接。

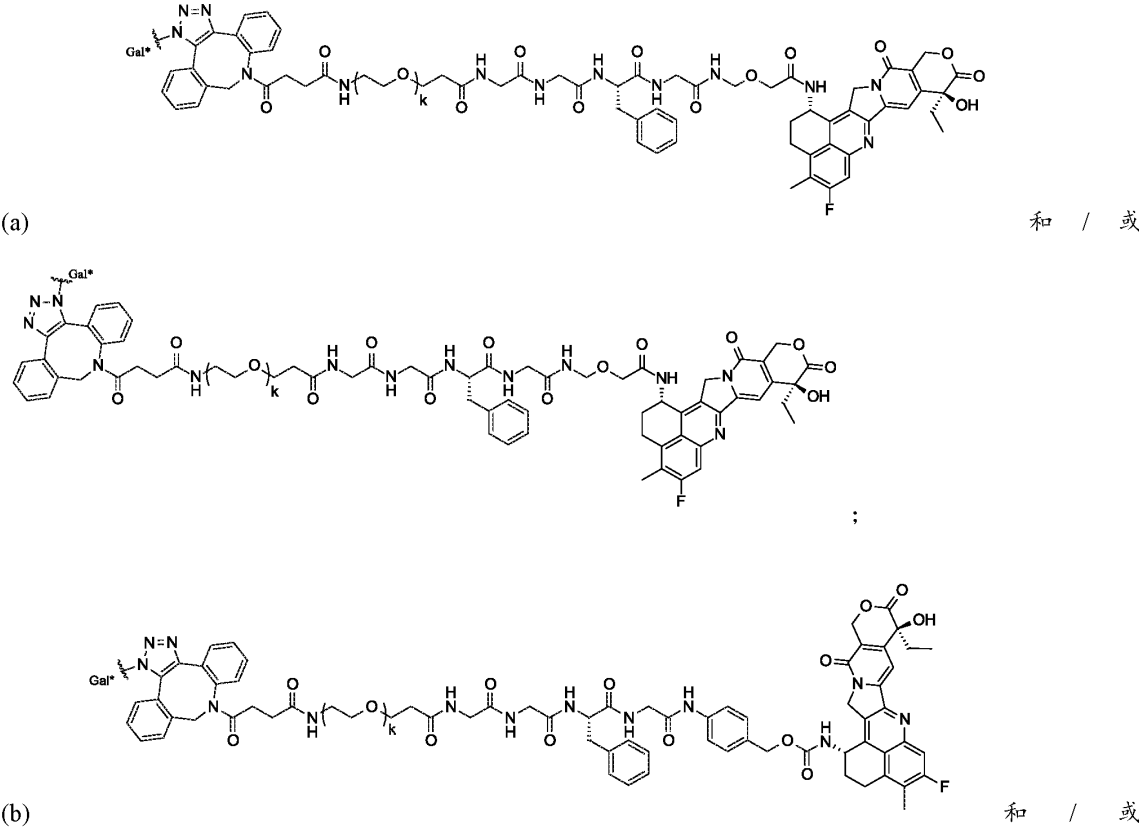
在一些具体的实施方案中, 本申请所述的蛋白-药物偶联物具有式 VI 所示的结构:

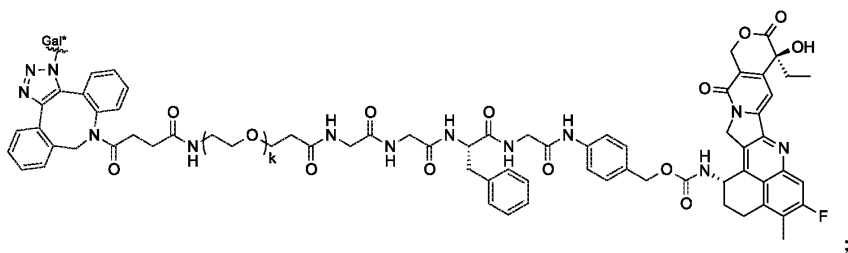


其中，P*结合 HER3 和 TROP2，例如，其包含本申请所述的抗原结合蛋白，GlcNAc 为 N-乙酰葡萄糖胺，Fuc 为岩藻糖，Man 为甘露糖，f 为 0 或 1，j 为 1 至 20；



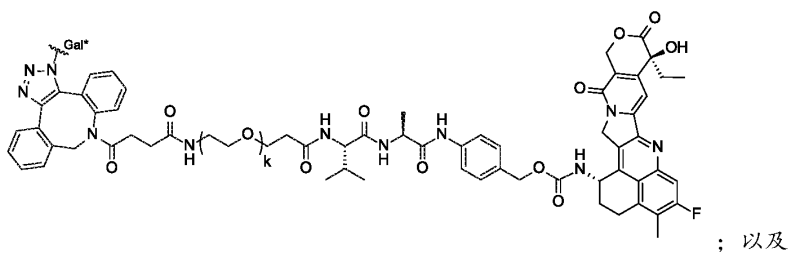
LP 选自以下结构(a)至(f)之一：





(c)

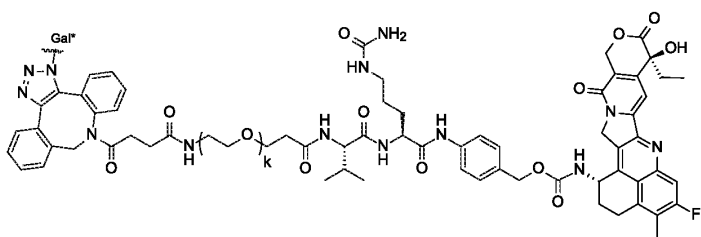
和 / 或



; 以及

(d)

和 / 或



; k 为 1~20 的整数, 例如 2、3、4、5、

6、7、8、9 或 10;

其中, 核心 GlcNAc 与 P* 直接连接。

在一些实施方案中, 偶联物整体的 DAR 值为 1 至 8。

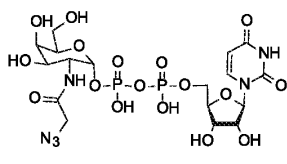
在一些实施方案中, $j=1\sim 10$, 例如 $j=1\sim 8$ 、 $j=1.2\sim 6$ 、 $j=1.5\sim 3$ 、 $j=1.5\sim 2.5$ 。

在一些实施方案中, 所述抗原结合蛋白包含 SEQ ID NO:51 所示的第一多肽, 以及 SEQ ID NO:50 所示的第二多肽。

在一些实施方案中, 所述蛋白-药物偶联物中, 所述寡糖与 P* 的 Fc 片段连接; 优选与 Fc 片段的 CH2 结构域连接; 更优选与 Fc 片段的 Asn297 (根据 Kabat 的 EU 索引编号) 连接。

如前所述, 所述寡糖可衍生自抗体的天然糖链, 具体地, 所述寡糖的前体 (或在本文中被称为蛋白衍生物) 的制备方法包括以下步骤: 将 N 糖糖型主要为 G0F/G0 的抗体与 UDP-GalNAz 或其盐, 或与其他 UDP-GalNAc 叠氮衍生物, 于存在催化剂的情况下进行反应, 从而得到前述寡糖的前体。

所述 UDP-GalNAz 具有以下的结构:



G0F/G0 糖型的抗体的获取方法是本领域所熟知的, 例如, 真核细胞表达的抗体经翻译后修饰, 可通过半乳糖苷酶处理将聚糖转化为 G0F/G0 的形式, 该酶处理去除任何末端的半乳糖残基并留下末端 N-乙酰葡萄糖胺残基。

在另一些实施方案中, 本公开所述 G0F/G0 糖型的起始糖链, 还可以通过使用 B4GALT1 基因敲除的细胞系表达、纯化得到。敲除表达细胞系 B4GALT1 基因的一个实例是通过同源重组技术, 其他敲除 B4GALT1 基因实例包括使用锌指核酸酶 (ZFN) 或转录激活物样效应核酸酶 (TALEN), 具体方法记载于 Nature Biotechnology, volume 33, pages 842-844 (2015). Int. J. Mol. Sci. 2015, 16(10), 23849-23866 等报道中。

在一些实施方案中, 前述催化剂为半乳糖基转移酶或其功能变体或片段。

在一些实施方案中, 所述催化剂是 β -1,4-半乳糖基转移酶或其功能变体或片段。

在一些实施方案中, 所述催化剂是牛 β -1,4-半乳糖基转移酶、人 β -1,4-半乳糖基转移酶或其功能变体或片段。

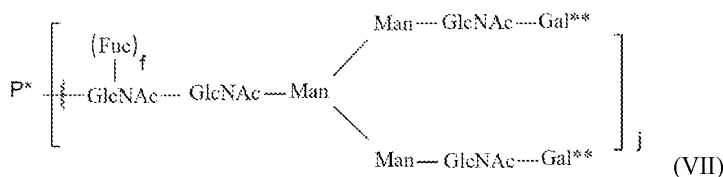
在一些实施方案中, 所述催化剂是具有 Y285L 突变的人 β -(1,4)-GalT1 或具有 Y289L 突变的牛 β -(1,4)-GalT1。

在一些实施方案中, 所述催化剂是专利申请 WO2016170186 中公开的 β -1,4-乙酰半乳糖转移酶。

在一些实施方案中, 所述催化剂包含 SEQ ID NO: 52-54 任一所示的序列。

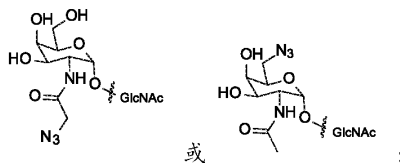
蛋白衍生物

另一方面, 本申请还涉及一种蛋白衍生物, 其具有式 VII 所示的结构:



其中, P* 结合 HER3 和 TROP2, 其包含本申请所述的抗原结合蛋白, GlcNAc 为 N-乙酰葡萄糖胺, Fuc 为

岩藻糖, Man 为甘露糖, f 为 0 或 1, j 为 1 至 20;



Gal**为经修饰的半乳糖, 选自以下的结构:

所述寡糖通过核心 GlcNAc 与 P*连接。

所述蛋白衍生物可通过将N糖糖型主要为G0F的抗原结合蛋白与UDP-GalNAz或其盐, 或其他UDP-GalNAc 叠氮衍生物, 于存在催化剂的情况下进行反应, 从而得到。

本发明的核酸以及包含其的载体和宿主细胞

在一方面, 本发明提供了编码以上任何结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白或其任何片段(例如, 抗原/靶标结合片段)的核酸。本发明还涵盖与上述核酸在严格性条件下杂交的核酸, 与上述核酸相比具有一个或多个置换(例如保守性置换)、缺失或插入的核酸, 或与上述核酸相比具有至少 80%, 至少 85%, 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的核酸序列。

例如, 本发明的核酸包含编码选自 SEQ ID NO:1-51 中任一项所示氨基酸序列的核酸, 或编码与选自 SEQ ID NO:1-51 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列的核酸。

如本领域技术人员明了的, 因为密码子简并性, 每一个结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白或其任何片段的氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。编码本发明分子的核酸序列可以采用本领域熟知的方法, 例如通过从头固相 DNA 合成, 或通过 PCR 扩增而产生。

在一方面, 本发明提供编码以上任何结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白或其任何肽链/片段的核酸。当从适宜的表达载体表达时, 由所述核酸编码的多肽能够显示人 HER3 和/或 TROP2 结合能力。

在一个实施方案中, 编码本发明结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白的各条链的核酸可以在相同的载体中或在不同的载体中。在另一实施方案中, 编码本发明结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白的各条链的核酸可以引入相同或不同的宿主细胞以表达。因此, 在一些实施方案中, 本发明的结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白的生产方法包括步骤: 在适于表达所述分子各条链的条件下, 培养包含编码所述各条链的核酸的宿主细胞, 产生本发明的抗体或双特异性结合分子或融合蛋白或其片段或多特异性结合分子。

在另一方面, 本发明提供了包含上述核酸的载体。在一个优选的实施方案中, 所述载体是表达载体。本领域技术人员完全可以理解, 在本发明所属的技术领域中通常采用的载体可以应用于本发明。

在一个实施方案中, 本发明提供了包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞, 包括这类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”, 这包括原代转化的细胞和从其衍生的后代, 而不考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同, 而是可以包含突变。本文中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞是可以用来产生本发明抗体分子的任何类型的细胞系统, 包括真核细胞, 例如, 哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 HEK293 细胞)、昆虫细胞、酵母细胞; 和原核细胞, 例如, 大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞, 也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织

内部的细胞。

组合物

另一方面，本公开提供一种组合物，例如，优选地，药物组合物，其含有与药学上可接受的载剂配制在一起的一种或组合的本公开的 HER3 结合蛋白、融合蛋白、多特异性抗原结合蛋白，或蛋白-药物偶联物。

本文使用的“药学上可接受的载剂”包括生理学相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、缓冲剂、稳定剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地，该载剂适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。根据施用途，可将活性化合物即抗体分子包裹于一种材料中，以保护该化合物免受可使该化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

可以与载剂材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量根据所治疗的对象和特定给药方式而不同。可以与载剂材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物的量。通常，以 100% 计，这个量的范围是大约 0.01% 至大约 99% 的活性成分，例如大约 0.1% 至大约 70%，或大约 1% 至大约 30% 的活性成分，与药学上可接受的载剂相组合。

本公开药物组合物中活性成分的实际剂量水平可能改变，以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应，而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括应用的本公开特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性，给药途径，给药时间，应用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料，接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史，以及医学领域中公知的类似因素。

在一些实施方案中，本公开蛋白-药物偶联物组合物的 DAR 值约为 1.0 至 16.0，优选约为 2.0 至 12.0，更优选约为 3.0 至 6.0，甚至更优选约为 3.5 至 4.5。例如，所述蛋白-药物偶联物组合物的 DAR 值约为 2.0、约为 2.1、约为 2.2、约为 2.3、约为 2.4、约为 2.5、约为 2.6、约为 2.7、约为 2.8、约为 2.9、约为 3.0、约为 3.1、约为 3.2、约为 3.3、约为 3.4、约为 3.5、约为 3.6、约为 3.7、约为 3.8、约为 3.9、约为 4.0、约为 4.1、约为 4.2、约为 4.3、约为 4.4、约为 4.5、约为 4.6、约为 4.7、约为 4.8、约为 4.9、约为 5.0、约为 5.1、约为 5.2、约为 5.3、约为 5.4、约为 5.5、约为 5.6、约为 5.7、约为 5.8、约为 5.9、约为 6.0。

本公开的组合物可以利用本领域公知的一种或多种方法通过一种或多种给药途径给药。本领域技术人员应当理解，给药途径和/或方式根据期望的结果而不同。本公开 HER3 结合蛋白、多特异性抗原结合蛋白或蛋白-药物偶联物的优选给药途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外给药途径，例如注射或输注。本文使用的短语“肠胃外给药”是指除肠和局部给药以外的给药模式，通常是注射，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

药物组合

术语“药物组合”或“组合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒。术语“非固定组合”意指活性成分(例如，(i) 本公开的 HER3 结合分子、(ii) 本发明的多特异性抗原结合蛋白以及(iii) 本公开的蛋白-药物偶联物)以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者，其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择，从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式，其制剂形式可以相同也可以不同。

因此，再一方面，本申请还提供了一种药物组合或组合产品，其包含本发明的结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白以及蛋白-药物偶联物，其中组合中有关结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白以及蛋白-药物偶联物的限定，可以参照第一方面所记载的技术特征。在一些实施方案中，所述药物组合或组合产品还可以包含一种或多种其他治疗

剂，例如化疗剂。

本申请还提供了包含所述药物组合的成套药盒，例如所述成套药盒在同一包装内包含：

-含有本发明的结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白、核酸、载体、宿主细胞或包含所述结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白、核酸、载体、宿主细胞的药物组合物的第一容器；

-含有本发明的蛋白-药物偶联物或包含所述蛋白-药物偶联物的药物组合物的第二容器；

其中有关结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白、核酸、载体、宿主细胞以及蛋白-药物偶联物的限定，可以参照本发明前述方面所记载的技术特征。

在一些实施方案中，所述成套药盒在同一包装内还包含含有其他治疗剂或包含所述其他治疗剂的其他容器。在一些实施方案中，所述其他治疗剂是化疗剂。

治疗方法与用途

再一方面，本申请还提供了一种治疗肿瘤或癌症，例如实体瘤或非实体瘤，例如血液系统肿瘤的方法，包括向有需要的患者施用本发明的结合蛋白、单一可变结构域、VHH、融合蛋白、抗体、多特异性抗原结合蛋白、核酸、载体、宿主细胞与蛋白-药物偶联物中的一种，或多于一种的组合/联合。本申请还提供了一种治疗肿瘤或癌症，例如晚期或转移性实体恶性肿瘤的方法，包括向有需要的患者施用本申请的药物组合物。

本申请“施用……药物组合”、“……联合……”的描述既包括复数种药物同时施用的情形，也包括复数种药物先后施用的情形。当先后施用时，复数种药物之间施用的间隔不超过 24h，例如不超过 18h，不超过 15h，不超过 12h，不超过 10h，不超过 8h，不超过 5h，不超过 3h，不超过 2h，不超过 1h 或不超过 0.5h。

另一方面，本申请还涉及所述 HER3 结合蛋白、多特异性抗原结合蛋白、核酸、载体、宿主细胞和/或蛋白-药物偶联物在制备药物中的用途，所述药物可用于治疗和/或预防肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤，例如血液系统肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤是 HER3 阳性和/或 TROP2 阳性。在一些实施方案中，所述肿瘤是其治疗将受益于抑制 HER3 和/或 TROP2 的肿瘤。

实施例

仪器设备

名称	厂商	型号	编号
流式细胞仪	贝克曼	CytoFlex	10000396
细胞计数仪	Count-star	ICI1000	10000395
生物安全柜	苏净安泰	BSC-1804IIA2	10000388
细胞培养箱	Thermo	Model311	10000385
多功能酶标仪	Molecular Devices	SpectraMax I3x	10000397

试剂与耗材

名称	厂商	货号
RPMI1640	Gibco	11875-093
FBS	Hyclone	10091-148

Trypsin-EDTA	Hyclone	25200056
Penicillin-Streptomycin (PS)	Gibco	15140-122
PBS	Hyclone	SH30028.02
Matrigel	Corning	356230
proA biosensors	Sartorius	18-5012
Human HER3 Protein, His Tag	ACRO	ER3-H5223
SA-HRP	Abcam	ab7403
APC anti-human IgG Fc Antibody	Biolegend	366906/B343083
CellTrace™ Violet cell proliferation Kit, for flow cytometry	Thermo Fisher	C34557/2535896
CCK8	Dojindo	CK04/SW602
Nunc 酶标板	Nunc	442404
96 孔聚丙烯微孔板, F 型底, 黑	Sartorius	655209

实施例一 HER3 单域抗体的筛选、制备与表征

1.1 HER3 单域抗体免疫文库的构建

选取健康骆驼, 将人 HER3-Fc 融合蛋白作为抗原对骆驼采用颈部肌肉多点注射, 每两周免疫一次, 共计免疫六次。最后一次免疫结束时, 收集 50mL 骆驼外周血于真空采血管内, 收集上清作为免疫后血清。利用密度梯度离心法分离出淋巴细胞, 使用 QIAGEN 公司提供的 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。使用 Super-Script III FIRST STRANDS SUPERMIX 试剂盒(ThermoFisher)按照说明书将提取的 RNA 全部反转录为 cDNA, 用巢式 PCR 扩增编码重链抗体的可变区的核酸片段。

回收目标重链单域抗体的核酸片段, 并使用限制性内切酶 SfiI 将其克隆进入噬菌体展示用载体 pComb3XSS 中。产物随后电转化至大肠杆菌电感受态细胞 TG1 中, 构建抗 HER3 的免疫单域抗体噬菌体展示文库并对文库进行鉴定。通过梯度稀释铺板, 计算库容的大小约为 1.0×10^8 。

1.2 HER3 单域抗体的淘选

将前述获得的噬菌体文库进行淘选, 第一轮淘选, 采用 HER3-muFc (人 HER3-小鼠 Fc 融合蛋白) 作为筛选原, 使用 PD-L1-Fc 作为负筛选; 第二轮和第三轮淘选, 采用 HER3-muFc 作为筛选原, 使用 SP-Fc (信号肽-Fc 融合蛋白) 作为负筛选。淘选得到与 HER3-muFc 结合同时不结合 Fc 的克隆。

将以上淘选后获得的结合阳性的噬菌体感染空白大肠杆菌并铺板。随后挑选菌落分别接种至 2TY-AG(含 10%甘油), 室温静置过夜。次日, 按 1%接种量分别转接至 200μL 2TY-AG 中, 于 37°C 下, 以 250rpm 摇动培养, 至 OD600 为 0.5 左右, 加入辅助噬菌体 M13KO7 进行感染(感染指数为 1:20), 37°C 静置 15min, 之后 220rpm, 45min。每孔加入 800μL 2TY-AG, 30°C, 220rpm, 过夜, 次日离心, 收集上清用于 ELISA 检测。分别用 HER3-Fc、SP-Fc 包被平板 4°C 过夜, 将获得的上清液加入, 室温下反应 2 小时。洗涤之后加入二抗 Goat anti-HA tag HRP(购自 Abcam)或 Goat anti-mouse IgG-HRP(购自 Thermo), 室温反应 2 小时。洗涤之后加入 TMB 显色液, 读取 450nm 和 650nm 波长吸收值, 450nm 波长的吸光度值减去 650nm 波长的吸光度值为最终的吸光度值, 结果如表 1 所示。

表 1 阳性克隆的 OD 值

Sample	OD (HER3-Fc)	OD (SP-Fc)	Sample	OD (HER3-Fc)	OD (SP-Fc)
iBT42	2.992	0.062	iBT19	2.423	0.06
iBT47	2.928	0.079	iBT27	2.414	0.046
iBT44	2.843	0.055	iBT17	2.382	0.055
iBT16	2.764	0.051	iBT34	2.318	0.044
iBT6	2.754	0.059	iBT28	1.925	0.052

iBT11	2.741	0.052	iBT40	1.915	0.057
iBT21	2.739	0.059	iBT14	1.799	0.056
iBT4	2.677	0.081	iBT7	1.717	0.195
iBT9	2.64	0.061	iBT22	1.695	0.053
iBT24	2.56	0.051	iBT3	1.683	0.042
iBT10	2.522	0.062	iBT33	1.593	0.047
iBT13	2.515	0.051	iBT46	1.502	0.053
iBT41	2.505	0.064	iBT25	1.448	0.068
iBT23	2.501	0.05	iBT20	1.359	0.049
iBT12	2.486	0.048	iBT26	1.337	0.051
iBT39	2.474	0.049	iBT45	0.859	0.046
iBT32	2.472	0.099	iBT35	0.512	0.052
iBT1	2.47	0.051	iBT15	0.484	0.047
iBT38	2.468	0.047	iBT43	0.324	0.053
iBT18	2.462	0.052	iBT31	0.3	0.115
iBT5	2.459	0.05	iBT8	0.108	0.054
iBT2	2.439	0.046	iBT36	0.101	0.045
iBT29	2.432	0.048	iBT30	0.096	0.04
iBT37	2.431	0.055			

将筛选所得特异性结合 HER3 的阳性克隆进行测序，其中，iBT11 的氨基酸序列如下所示：
QVQLQESGGGVSQSGSLRLSCAASGYTTSSVCMAWFRQAPGNREGVAHITRDGRTMYADSVRGR
FTISQDNAKNTLFLQMNSLKPEDTGMYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGRGTQVTVSS (SEQ ID NO:
1)

1.3 制备 HER3 单域抗体及其 Fc 融合蛋白

PCR 扩增 HER3 单域抗体 VHH 编码序列片段，与编码人 IgG1-Fc 的 DNA 片段融合，或在其 C 端与 His tag 融合 (Chis)，并克隆至常规哺乳动物表达载体，获得用于在哺乳动物中表达 HER3 单域抗体-Fc/Chis 融合蛋白的重组质粒。PCR 扩增所使用的通用引物如下：

上游引物 cccACCGGTCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO: 57)

下游引物 cccGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTGG (SEQ ID NO: 58)

将构建获得的质粒载体转染至 HEK293 细胞进行抗体的瞬时表达。将重组表达质粒用 Freestyle293 培养基稀释并加入转化所需 PEI (Polyethylenimine)溶液，将每组质粒/PEI 混合物分别加入 HEK293 细胞悬液中，放置在 37℃，5%CO₂，悬浮培养。培养 5~6 天后，收集瞬时表达培养物的上清液，通过 Protein A 亲和层析法或 Ni 柱，纯化得到目标 HER3 单域抗体-Fc/Chis 融合蛋白。

1.4 检测与 HER3 的亲合力

通过 ELISA 检测技术，对 HER3 单域抗体的亲和力进行检测，5ug/mL 的 Her3-muFc 进行包被，4℃过夜；待测的 HER3 单域抗体-Chis 用 1%BSA+0.05%PBST20 进行梯度稀释，起始浓度为 5 μg/mL，3 倍稀释，共稀释 10 个梯度，室温反应 2h。1%BSA+0.05%PBST20 洗板之后，加入二抗 anti-6*his tag HRP(购自 abcam，1:10000 稀释)。1%BSA+0.05%PBST20 洗板之后，加入 TMB 显色液，室温显色 5min，读取 450nm 和 650nm 波长吸光度值，450nm 波长的吸光度值减去 650nm 波长的吸光度值为最终的吸光度值。结果如图 1 所示，

iBT11-Chis 的 EC50 值为 5.39 ng/mL。

通过生物膜干涉(Biolayerinterferometry, BLI)技术, 检测 HER3 单域抗体-Fc 融合蛋白对 HER3-chis 的结合动力学。iBT11-Fc 融合蛋白稀释至 10ug/mL 后固化到 AHC biosensor 上, 然后将 HER3-chis 稀释至 100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM 等 5 个梯度, 和固化的 iBT11-Fc 融合蛋白进行结合。使用 Octet K2 数据分析软件 9.0 计算平衡解离常数(KD), 结果如表 2 所示。

表 2 iBT11-Fc 的亲合力结果 (BLI)

Sample	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
iBT11-Fc	2.27E-09	1.88E+05	4.26E-04

1.5 HER3 单域抗体的人源化

人源化方法采用蛋白表面氨基酸人源化(resurfacing)的方法及 VHH 人源化通用框架移植法(CDR grafting to a universal framework)完成。

首先获取 Cécile Vincke 等人根据序列同源性设计完成的通用性人源化 VHH 框架 hNbBcII10FGLA(PDB 编号为: 3EAK), 该框架设计基于纳米抗体 NbBcII10 抗体 (PDB 编号为: 3DWT)。使用 Modeller9 进行建模, 根据蛋白三维结构计算框架上氨基酸的相对溶剂可及性 (relative solvent accessibility)。

VHH 人源化通用框架移植法具体步骤如下: 通过 IMGT 获取高度同源的人源抗体序列, 并参考通用性人源化 VHH 框架 hNbBcII10FGLA (PDB 编号为: 3EAK), 对目标序列进行人源化。使用高度同源序列框架作为框架模板, 将 CDR 替换为目标抗体株的 CDR 区。然后根据建模, 将框架上的非表面氨基酸进行回复突变, 完成目标抗体人源化。

对抗体株 iBT11 进行人源化, 得到人源化变体 huiBT11v1 (SEQ ID NO: 2)、huiBT11v3 (SEQ ID NO: 3)、huiBT11v4 (SEQ ID NO: 4)、huiBT11v5 (SEQ ID NO: 5)、huiBT11v6 (SEQ ID NO: 6)、huiBT11v7 (SEQ ID NO: 7)。

将上述人源化序列进行基因合成, 与编码人 IgG1-Fc 的 DNA 片段融合, 并克隆至常规哺乳动物表达载体, 获得用于在哺乳动物中表达 HER3 单域抗体-Fc 融合蛋白的重组质粒。将构建获得载体转染至 HEK293 细胞进行抗体的瞬时表达。将重组表达质粒用 Freestyle293 培养基稀释并加入转化所需 PEI(Polyethylenimine) 溶液, 将每组质粒/PEI 混合物分别加入 HEK293 细胞悬液中, 放置在 37°C, 5%CO₂, 130rpm 中培养。四小时后补加 EXCELL293 培养基, 2mM 谷氨酰胺, 130rpm 培养。24 小时后加 3.8mM VPA, 72 小时后加入 4g/L 葡萄糖。培养 5~6 天后, 收集瞬时表达培养上清液, 通过 Protein A 亲和层析法, 纯化得到目标 huiBT11 单域抗体 Fc 融合蛋白。

1.6 检测人源化抗体的亲和力

通过 ELISA 检测技术, 对人源化抗体对 HER3 的亲和力进行检测: 5ug/mL 的 Her3-muFc 5ug/mL 进行包被, 4°C 过夜; 抗体用 1%BSA+0.05%PBST20 进行梯度稀释, 起始浓度为 100 μg/mL, 4 倍稀释, 共稀释 10 个梯度, 室温反应 2h。1%BSA+0.05%PBST20 洗板之后, 加入检测二抗 Goat anti-human IgG(Fc specific)-HRP(购自 Sigma, 1:8000 稀释), 室温反应 2h。1%BSA+0.05%PBST20 洗板之后, 加入 TMB 显色液, 室温显色 5min, 读取 450nm 和 650nm 波长吸收值, 450nm 波长的吸光度值减去 650nm 波长的吸光度值为最终的吸光度值。结果如表 3 所示。

阳性对照抗体 AV203 的序列参考专利文件 WO2011136911: 分别将 AV203HC (SEQ ID NO: 55) 和 AV203LC(SEQ ID NO:56)进行基因合成, 并克隆至常规哺乳动物表达载体, 将构建获得载体转染至 HEK293 细胞进行抗体瞬时表达得到。

表 3 人源化抗体的亲和力结果 (ELISA 法)

Conc(ng/mL)	huiBT11v1-Ld-Fc	huiBT11v4-Ld-Fc	huiBT11v3-Ld-Fc	huiBT11v5-Ld-Fc	huiBT11v6-Ld-Fc	huiBT11v7-Ld-Fc	Av203
100000	2.311	2.3	2.346	2.313	2.322	2.381	2.345
25000	2.243	2.259	2.28	2.267	2.28	2.283	2.263

6250	2.347	2.257	2.262	2.315	2.272	2.29	2.24
1562.5	2.251	2.254	2.292	2.264	2.279	2.275	2.231
390.625	2.232	2.291	2.257	2.261	2.301	2.274	2.226
97.656	1.777	1.763	1.759	1.758	1.79	1.782	1.481
24.414	0.763	0.741	0.765	0.738	0.772	0.794	0.332
6.104	0.243	0.244	0.245	0.239	0.253	0.268	0.096
1.526	0.089	0.089	0.092	0.086	0.092	0.092	0.052
0.381	0.051	0.05	0.053	0.051	0.053	0.051	0.044
0.095	0.042	0.04	0.042	0.042	0.042	0.043	0.041
EC50(ng/mL)	41.7	42.4	42.4	43.3	41.2	41	70.7

1.7 检测人源化抗体的阻断活性

采用 ELISA 检测技术，检测人源化抗体对 HER3-muFc 和 NRG1b1 结合的阻断活性检测。1ug/mL 的 NRG1 beta1(购自 Sino) 和 SP-NRG1b-Chis 进行包被，4℃过夜；待测抗体用 1%BSA+0.05%PBST20+200ng/mL Her3-muFc 进行梯度稀释，起始浓度为 20 μg/mL，4 倍稀释，共稀释 6 个梯度，室温反应 2h。1%BSA+0.05%PBST20 洗板之后，加入检测二抗 Goat anti-mouse IgG1-HRP(购自 Thermo，1:3000 稀释)，室温反应 2h。1%BSA+0.05%PBST20 洗板之后，加入 TMB 显色液，室温显色 7.5min,读取 450nm 和 650nm 波长吸收值，450nm 波长的吸光度值减去 650nm 波长的吸光度值为最终的吸光度值。结果如表 4 所示。

表 4 人源化抗体的阻断活性结果（ELISA 法）

Conc(ng/mL)	huiBT11 v1-Ld- Fc(Her3- muFc)- NRG1b1	huiBT11 v4-Ld- Fc(Her3- muFc)- NRG1b1	huiBT11 v3-Ld- Fc(Her3- muFc)- NRG1b1	huiBT11 v5-Ld- Fc(Her3- muFc)- NRG1b1	huiBT11 v6-Ld- Fc(Her3- muFc)- NRG1b1	huiBT11 v7-Ld- Fc(Her3- muFc)- NRG1b1	Av203(He r3-muFc)- NRG1b1	Av203(He r3-muFc)- SP- NRG1b- Chis
20000	0.251	0.232	0.249	0.255	0.245	0.254	0.354	0.083
5000	0.234	0.214	0.218	0.229	0.23	0.23	0.388	0.076
1250	0.24	0.224	0.233	0.235	0.228	0.241	0.419	0.076
312.5	0.269	0.256	0.27	0.269	0.265	0.274	0.538	0.102
78.125	1.791	1.817	1.837	1.864	1.823	1.8	2.14	1.981
19.531	2.254	2.23	2.256	2.265	2.246	2.23	2.252	2.205
4.883	2.333	2.289	2.281	2.305	2.303	2.26	2.292	2.208
IC50(ng/mL)	105	109	110	110	108	108	160	122

实施例二 抗体偶联药物的制备

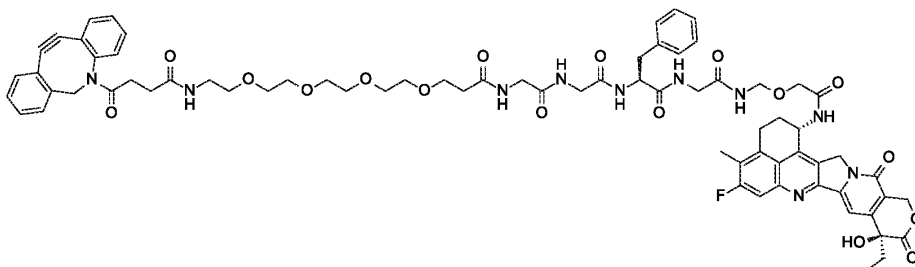
2.1 抗体 A 的制备

分别依据目的双特异性抗体（抗体 A）的第一多肽（SEQ ID NO: 51）和第二多肽（SEQ ID NO: 50）的序列进行基因合成，利用引物进行 PCR 扩增，并克隆至常规哺乳动物表达载体 pcDNA3.4 得到 pcDNA3.4-A 重组质粒。

HEK293 细胞在 293M 培养基中培养，培养条件为 37℃，130±10 rpm，5%CO₂。瞬转前将 HEK293 细胞密度调整到 6×10⁶ 细胞/mL。取 pcDNA3.4-A 质粒和转染试剂 PEI 按照 1:6 比例混匀，将混匀后的转染试剂和质粒复合物加入到 2 mL 左右的表达培养基 OPM-293-CD05 中，静置 5 min。将上述溶液加入至 100 mL 的表达培养基中，37℃，130±10 rpm，5%CO₂，培养。至第 7 天，1500 rpm 离心 10 min，收获上清。将收获后的上清进行 Protein A 亲和纯化得到目标蛋白，SDS PAGE 鉴定目标蛋白大小的正确性。

2.2 连接子-毒素的制备

根据专利申请 CN113264983A (其内容通过引用并入本文) 中记载的工艺制备下述连接子-毒素(LP1):



经检测, LP1 MS m/z (ESI): 1375.77。

2.3 抗体 A-ADC 的制备

步骤一：将抗体 A（主要为 G0F）原液脱盐至 HEPES 缓冲液中待用。向 1.5mL 离心管中依次加入：超纯水(210 μ L), MnCl₂(1 M, 5 μ L), UDP-GalNAz(100 mM, 25 μ L), Tris-HCl (1 M, 5 μ L), 抗体 A(25.5 mg/mL, 196 μ L), GalT1 (5.2 mg/mL, 12 μ L, SEQ ID NO: 52)。30 $^{\circ}$ C, 400 rpm 反应 12 h。反应结束后, Protein A 纯化, 超滤浓缩至 DPBS 中, 得到抗体 A-(N₃)₄ 备用。

步骤二：向 1.5mL 离心管中依次加入 LP1 (16 μ L, 50 mM), DMSO (25 μ L) 以及步骤一得到的抗体 A-(N₃)₄ (10mg/ml, 800 μ L)。30 $^{\circ}$ C, 400rpm 反应 12h。反应完全后, 脱盐至 DPBS 中, 得到抗体 A-ADC, 质谱检测分子量, 结果如图 2 所示, 与偶联前的抗体 A 相比, 确认获得目标产物。产物经 RP-HPLC 检测, 确认 DAR 值约为 3.8。整体反应式如图 3 所示。

实施例三 抗体 A-ADC 生物学活性的表征

3.1 检测抗体 A-ADC 结合 TROP2 的活性 (BLI 法)

基于生物膜干涉 (Bio-Layer Interferometry, BLI) 技术检测抗体 A-ADC 与人、猴 TROP2 的亲合力。首先将抗体 A-ADC 稀释至 10 $\mu\text{g/mL}$ 固化 proA biosensor 上, 然后将 TROP2 蛋白稀释得到 7 个浓度分别与抗体 A-ADC 结合, 可检测到不同强度的结合信号。使用 Data Analysis HT 12.0 软件对数据进行分析, 采用 1:1 模型拟合, 计算得到样品的平衡解离常数 (KD) 值。结果如表 5 所示, 抗体 A-ADC 与人 TROP2 蛋白、猴 TROP2 蛋白的结合能力与裸抗相当。

表 5 样品与人、猴 TROP2 蛋白的亲和力结果

Sample ID	Loading Sample ID	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
hTROP2-His	抗体 A-ADC	2.854E-09	7.19E+04	2.052E-04
	hRS7-IgG1	3.008E-09	1.446E+05	4.351E-04
	抗体 A	3.376E-09	7.479E+04	2.525E-04
cynoTROP2-His	抗体 A-ADC	4.443E-09	9.969E+04	4.429E-04
	hRS7-IgG1	3.801E-09	1.795E+05	6.9824E-04
	抗体 A	5.099E-09	9.059E+04	4.619E-04

3.2 检测抗体 A-ADC 结合 HER3 的活性 (BLI 法)

采用与上述类似的方法,检测抗体 A-ADC 与人、猴 HER3 蛋白的亲合力。结果如表 6 所示,抗体 A-ADC 与人 HER3 蛋白、猴 HER3 蛋白的结合能力与裸抗相当。

表 6 样品与人、猴 HER3 蛋白的亲合力结果

Sample ID	Loading Sample ID	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
hHER3-His	抗体 A-ADC	1.233E-09	5.944E+04	7.331E-05

cynoHER3-His	iBT11V7-Fc	1.442E-09	1.052E+05	1.516E-04
	抗体 A	3.438E-09	5.933E+04	2.04E-04
	抗体 A-ADC	5.035E-09	6.058E+04	3.05E-04
	iBT11V7-Fc	3.292E-09	1.078E+05	3.547E-04
	抗体 A	4.46E-09	6.183E+04	2.758E-04

3.3 检测抗体 A-ADC 同时结合 HER3 和 TROP2 的活性

采用 ELISA 法检测抗体 A-ADC 与 HER3、TROP2 蛋白同时结合的能力。将多个浓度梯度的待测样品加入预包被抗原 1（HER3-His）的酶标板中孵育，再加入生物素化的抗原 2（TROP2-Biotin，自制）进行孵育，最后加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体（SA-HRP），形成一个固相的抗原 1-抗体 A-ADC 样品-抗原 2-酶标检测抗体复合物。使用酶标仪于 450nm 处读取吸光值，四参数拟合曲线分析法进行数据分析。结果如表 7 所示，抗体 A-ADC 和抗体 A 均可以同时结合人 HER3 和 TROP2 蛋白，结合 EC₅₀ 分别为 31.42 nM 和 29.95 nM，两者结合能力相当；iBT11V7-Fc 和 hRS7-IgG1 无法同时结合两个蛋白。

表 7 抗体 A-ADC、抗体 A 与人 HER3 和 TROP2 蛋白结合活性结果

Sample	EC ₅₀ (nM)
抗体 A-ADC	31.42
抗体 A	29.95

3.4 检测抗体 A-ADC 与肿瘤细胞的结合活性

将 1.0×10⁵/孔的人三阴乳腺癌细胞系 MDA-MB-468、人胃癌细胞系 NCI-N87 和人胰腺癌细胞系 BxPC-3（均购自北钠创联生物技术有限公司），分别与抗体 A-ADC、抗体 A（终浓度最高浓度为 200nM，3 倍梯度稀释，共 10 个浓度）冰上共孵育 30min，洗涤 2 次后加入 APC anti-human IgG Fc 荧光抗体，避光冰上孵育 30min，洗涤 2 次后，流式细胞仪检测细胞表面荧光强度，使用 CytExpert 软件对流式结果进行分析，计算各检测样品的平均荧光强度（MFI），并用 GraphPad Prism7.0 对实验结果进行四参数拟合。

结果如表 8 所示，抗体 A-ADC、裸抗体 A 对肿瘤细胞的结合活性相近。

表 8 抗体 A-ADC 与肿瘤细胞的结合活性

Sample	EC ₅₀ (nM)		
	MDA-MB-468	NCI-N87	BxPC-3
抗体 A-ADC	4.959	2.93	4.18
抗体 A	4.732	2.927	3.538

3.5 检测抗体 A-ADC 对 293T-TROP2 和 293T-HER3 细胞的桥接作用

293T-TROP2-GFP 细胞（1.0×10⁵/孔，细胞表面表达 TROP2、胞内表达绿色荧光蛋白的 HEK293T 细胞，自制）与 293T-HER3-CellTrace Violet（1.0×10⁵/孔，细胞表面表达 HER3，并经过 CellTrace™ Violet 荧光染料标记，购自康源博创生物科技有限公司）按照 1: 1 比例混合，分别与 0.016~50nM 浓度范围的抗体 A-ADC、抗体 A、iBT11V7-FC 和 hRS7-IgG1 混合物混匀后，避光冰上孵育 30min，洗涤 2 次后，CytoFelix 流式细胞仪的 PB450/FITC 通道分别收集 293T-HER3-CellTrace Violet 细胞的荧光信号和 293T-TROP2-GFP 荧光信号。PB450 通道和 FITC 通道的二维散点图中双荧光信号事件体现了抗体 A-ADC 桥接两种靶细胞的作用。

结果如表 9 显示，随着抗体 A-ADC 浓度的增加，检测样品中双荧光信号事件占总事件的百分比从 1.82% 逐渐增加至 22.46%，具有明显的浓度依赖性；但随着药物浓度的继续增加，双荧光信号事件占总事件的百分比逐渐降低，抗体 A-ADC 桥接两种细胞的作用降低，出现“Hook-effect”。与抗体 A-ADC 相比，抗体 A

桥接两种细胞的能力相当。结果表明，抗体 A 作为抗 HER3 和 TROP2 双特异性抗体药物偶联物，可以同时结合 TROP2 和 HER3 阳性细胞，具备桥接两种细胞的能力。而抗 TROP2 单抗和抗 HER3 单域抗体 Fc 融合蛋白的混合物无明显桥接作用。

表 9 抗体 A-ADC 对 TROP2 和 HER3 阳性细胞的桥接作用

Double positive events %	Conc. nM					
	50	10	2	0.4	0.08	0.016
抗体 A-ADC	1.34%	14.65%	22.46%	17.47%	10.41%	1.82%
抗体 A	1.93%	18.85%	21.99%	17.65%	7.00%	1.39%
iBT11V7-FC+hRS7-IgG1	0.75%	0.49%	0.77%	0.81%	0.72%	0.69%

3.6 检测抗体 A-ADC 对肿瘤细胞的杀伤作用

人胰腺癌 BxPC-3 细胞按 5×10^3 /孔铺板 96 孔板，培养过夜后分别加入终浓度为 0.006~25nM 的抗体 A-ADC、抗体 A 及 iso-ADC（同型对照 ADC 药物，其抗体为人 IgG1 同型对照，毒素连接子与抗体 A-ADC 相同，通过与抗体 A-ADC 同样的制备工艺得到），于 37℃ 培养 120h，使用 CCK-8 法检测酶标仪 450/650nm 处 OD 值，计算各实验细胞活力，从而计算各实验组抑制率。再将标准曲线样品浓度的对数值 (x) 与计算所得的抑制率 (%) (y) 利用 GraphPad Prism7.0 软件的 4 parameter logistic fit 进行拟合，计算待测样品的 IC₅₀。实验结果如图 4 所示，抗体 A-ADC 对 BxPC-3 细胞有明显的杀伤作用，IC₅₀ 为 0.141nM；而抗体 A 及 iso-ADC 对 BxPC-3 细胞增值无明显杀伤作用。

采用类似方法测试了抗体 A-ADC 对人表皮癌细胞系 A431（购自北钠创联生物技术有限公司，样品终浓度 0.003~50nM）、人胰腺癌细胞系 CAPAN-2（购自北钠创联生物技术有限公司，样品终浓度 0.006~100nM）、人肺腺癌细胞系 HCC827（购自南京科佰生物科技有限公司，样品终浓度 0.012~50nM）的杀伤作用，结果如图 5-图 7 所示，抗体 A-ADC 对各种瘤细胞均有明显的杀伤作用，而抗体 A 及 iso-ADC 则没有明显的杀伤作用。

3.7 检测抗体 A-ADC 对 TROP2、HER3 阴性细胞的旁观者杀伤效应

为了考察抗体 A-ADC 的旁观者效应，分别采用抗体 A-ADC、iso-ADC 处理 BxPC-3（TROP2、HER3 阳性）单细胞体系、293T-GFP（TROP2、HER3 阴性）单细胞体系、BxPC-3 与 293T-GFP（1：1）混合细胞体系，96h 后，对所有样本孔细胞进行计数和流式细胞仪检测：

单个细胞铺板（mono-culture）：用培养基（RPMI1640+10%FBS）将两种细胞密度都调整为 3×10^4 /mL，各自按 100μL/孔铺板 96 孔板，每孔细胞个数为 3×10^3 ，37℃，5%CO₂ 培养箱培养过夜；

混合细胞铺板（co-culture）：用培养基（RPMI-1640+10%FBS）将两种细胞混合，其中 BxPC-3 细胞密度为 3.0×10^4 /mL，293T-GFP 细胞密度为 3.0×10^4 /mL；按 100μL/孔铺板 96 孔板，37℃，5%CO₂ 培养过夜；

每孔加入 100μL 工作浓度为 10nM 的抗体 A-ADC 和 iso-ADC，同时设置不加药对照组（Negative Control），每个样本三个重复，之后 37℃、5%CO₂ 培养 96h。随后，对于单细胞样本孔，加入 20μL CCK-8，37℃ 放置 3h 后酶标仪 450/650nm 检测 OD 值。对于混合细胞样本孔，胰酶消化细胞，细胞计数后，剩余细胞 DPBS 洗涤一遍后流式上机。使用细胞计数仪检测细胞个数 N，流式细胞仪器检测混合细胞组中各浓度组 TROP2、HER3 阳性细胞比例（V1L%父群），以及 TROP2、HER3 阴性细胞比例（V1R%父群）。

对于单细胞体系：各浓度检测样品抑制率 (%) = $1 - \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$

对于混合细胞体系：BxPC-3 各浓度检测样品抑制率 (%) =

$1 - \frac{\text{实验组细胞数 N} \times \text{实验组细胞数 V1L \%父群}}{\text{对照组细胞数 N} \times \text{对照组细胞数 V1L \%父群}} \times 100\%$

293T-GFP 各浓度检测样品抑制率 (%) =

$$1 - \frac{\text{实验组细胞数 } N * \text{实验组细胞数 } V1R \% \text{父群}}{\text{对照组细胞数 } N * \text{对照细胞组 } V1R \% \text{父群}} * 100\%$$

结果如图 8 所示,在单细胞体系中,10 nM 抗体 A-ADC 对 BxPC-3 细胞平均抑制率为 65.31%,对 293T-GFP 细胞杀伤效果不明显;在混合体系中,10 nM 抗体 A-ADC 对 BxPC-3 细胞平均抑制率为 43.86%,对 293T-GFP 细胞平均抑制率为 78.8%。可见,与 iso-ADC 相比,抗体 A-ADC 对于 TROP2、HER3 阴性细胞有明显的旁观者杀伤效应。

3.8 评价抗体 A-ADC 在人肺癌 CDX 模型 HCC827 皮下异种移植小鼠动物模型中的抗肿瘤作用

在 BALB/c Nude 小鼠(购自维通利华(北京)实验动物技术有限公司)皮下注射人 HCC827 细胞建立动物模型:将 0.2 mL (10×10^6 个) HCC827 细胞(加 Matrigel, 体积比为 1:1)皮下接种于每只小鼠的右后背,肿瘤平均体积达到约 123 mm³ 时,将动物按照体重和肿瘤体积随机分为 5 组,分别为溶媒对照组(PBS)、iso-ADC 组(10mg/kg)、抗体 A-ADC 低剂量组(1mg/kg)、抗体 A-ADC 中剂量组(3mg/kg)和抗体 A-ADC 高剂量组(10mg/kg),每组 6 只动物,分组当天为第 0 天,于第 1, 5, 8 和 12 天腹腔注射给与受试物,共给药 4 次。实验过程中,每周两次测量肿瘤体积及称量小鼠体重。

结果显示,试验期间,与 PBS 组相比,抗体 A-ADC 治疗组动物体重无显著性差异,小鼠状态未见明显异常。如图 9 所示,分组给药后 32 天,溶媒对照组平均瘤体积为 1552 mm³,抗体 A-ADC (1 mg/kg, 3 mg/kg 和 10 mg/kg)治疗组瘤体积分别为 1073mm³, 743 mm³ 和 120 mm³, TGI%(相对肿瘤抑制率,百分比数值)分别为 33.4%, 56.5%和 100.2%(p 值分别为 0.0103, 0.0001 和 0.0001)。

可见,在人肺癌 HCC827 的 CDX 模型中,抗体 A-ADC 在 1-10mg/kg 剂量范围内,给药 4 次,具有明显抑制肿瘤作用,且呈现剂量依赖性。同时,体重变化结果显示抗体 A-ADC 在各给药剂量下耐受性良好。

3.9 评价抗体 A-ADC 在人胃癌 CDX 模型 NCI-N87 皮下异种移植小鼠动物模型中的抗肿瘤作用

将 0.2 mL (10×10^6 个) NCI-N87 细胞(加 Matrigel, 体积比为 1:1)皮下接种于每只 BALB/c Nude 小鼠的右后背,肿瘤平均体积达到约 169 mm³ 时,将动物按照体重和肿瘤体积随机分为 3 组,分别为溶媒对照组(PBS)、抗体 A-ADC 低剂量组(3mg/kg)和抗体 A-ADC 高剂量组(10mg/kg),每组 6 只动物,每周给药 1 次,共给药 2 周。

结果显示,各受试物单药测试组对小鼠体重均无显著影响,小鼠状态未见明显异常。如图 10 所示,开始给药后 20 天,溶剂对照组荷瘤鼠的平均瘤体积达到 826 mm³。在受试物抗体 A-ADC (10 mg/kg, 3 mg/kg)治疗组中,瘤体积分别为, 209mm³ 和 591mm³ (T/C%= 27.22%和 72.64%; TGI%=94.07%和 35.65%; $p < 0.0001$ 和 $p = 0.0807$),其中受试物抗体 A-ADC (10 mg/kg)治疗组与对照组相比具有显著的抑瘤效果。

3.10 评价抗体 A-ADC 在奥希替尼耐药的人肺癌 PDX 模型 LU-01-1377 皮下异种移植 NOD/SCID 小鼠动物模型中的抗肿瘤作用和耐受性

人源肿瘤 PDX 模型的建立最初来源于外科手术切除的临床样本,在植入实验鼠体内后被定义为 P0 代。将 P0 代的肿瘤组织植入下一代被称为 P1 代。以此类推持续在实验鼠体内植入。其中 FP3 的肿瘤是通过 P2 代重新复苏得到。由 FP3 代产生的下一代被定义为 FP4,以此类推,FP8 代的肿瘤组织将分别会被用于此次 LU-01-1377 模型药效试验。

将 20~30 mm³ LU-01-1377 肿瘤组织块分别接种于每只 NOD/SCID 小鼠(购自维通利华(北京)实验动物技术有限公司)的右后背部待肿瘤生长,体内药效实验在 LU-01-1377 瘤块接种后第 33 天,肿瘤平均体积分别达到 141 mm³ 时开始进行随机分组给药,分组当天定义为第 1 天,分组后立即开始给药。试验分为抗体 A-ADC 治疗组 (1 mg/kg, 3 mg/kg 和 10 mg/kg)和溶媒 PBS 阴性对照组,每组 6 只动物,分组后每周给药两次,尾静脉注射给药,根据相对肿瘤抑制率(TGI)和体重变化情况进行疗效和耐受性的评价。

体重变化结果显示,对照组和测试药组在首次给药第 27 天时,各组内动物全部存活,没有明显的体重下降。抗肿瘤药效结果如图 11 所示, PBS 对照组小鼠在分组首次给药后第 27 天时平均肿瘤体积为 1244 ± 216 mm³; 抗体 A-ADC 高剂量治疗组(10 mg/kg)在分组首次给药后第 27 天时平均肿瘤体积为 0 ± 0 mm³

(10 mg/kg), 相对肿瘤抑制率 TGI (%) 为 112.78%, 相对于 PBS 对照组, 该治疗组在统计学上有显著性差异 ($p < 0.0001$); 抗体 A-ADC 中剂量治疗组 (3 mg/kg) 在分组首次给药后第 27 天时平均肿瘤体积为 $81 \pm 43 \text{ mm}^3$, 相对肿瘤抑制率 TGI (%) 为 105.43%, 相对于 PBS 对照组, 该治疗组在统计学上有显著性差异 ($p < 0.0001$); 抗体 A-ADC 低剂量治疗组 (1 mg/kg) 在分组首次给药后第 27 天时平均肿瘤体积为 $1085 \pm 171 \text{ mm}^3$, 相对肿瘤抑制率 TGI (%) 为 14.35%, 相对于 PBS 对照组, 该治疗组在统计学上没有显著性差异 ($p = 0.7601$)。

3.11 评价抗体 A-ADC 在 HCC827 细胞株皮下移植 BALB/c nude 雌性小鼠模型中的抗肿瘤作用

于 BALB/c nude 小鼠 (购自浙江维通利华实验动物技术有限公司) 右侧背部皮下接种 $100 \mu\text{L}$, 1×10^6 HCC827 细胞, 接种时细胞重悬在 PBS 与基质胶混合物 (1: 1) 中。接种后定期观察肿瘤生长情况, 待肿瘤生长至平均体积约 93 mm^3 时根据肿瘤大小随机分组给药, 分组当天定义为第 0 天。试验分为抗体 A-ADC 治疗组 (11.5 mg/kg)、Sacituzumab Govitecan 阳性对照组 (10 mg/kg 和 20 mg/kg, 购自吉利德科学, 以下简称 SG) 和 PBS 空白对照组, 每组 6 只小鼠, 给药方式均为尾静脉注射给药, 共进行四次给药, 每周给药一次, 第一次给药后第 49 天结束实验。根据肿瘤生长抑制率进行疗效评价, 根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

实验结束时, 除 SG 10 mg/kg 组出现一只小鼠死亡外, 其余各组中均无发现动物死亡, 小鼠体重均无异常降低。抗肿瘤药效结果如图 12 所示, PBS 组小鼠在实验结束时的平均肿瘤体积为 580 mm^3 , 抗体 A-ADC 治疗组 (11.5 mg/kg) 的瘤体积为 43 mm^3 , 与 PBS 组相比 TGI (%) 为 92.6% ($p < 0.001$); 阳性对照 SG 10 mg/kg 组和 20 mg/kg 组的瘤体积分别为 244 mm^3 和 121 mm^3 , 与 PBS 组相比 TGI (%) 为 58.0% ($p < 0.05$) 和 79.2% ($P < 0.001$)。

3.12 抗体 A-ADC 在不同种属血清中稳定性的研究

抗体 A-ADC 分别用人、食蟹猴、大鼠和小鼠血清进行稀释, 配制成 $10 \mu\text{g/mL}$ 和 $100 \mu\text{g/mL}$; 配制后进行分装, 每管 $100 \mu\text{L}$, 每个时间点准备一份, 于 37°C 分别孵育 0, 3, 7, 14, 21 天, 之后取出进行冻存。采用 LC-MS/MS 方法检测血清中 DXd 含量: 通过蛋白沉淀的方法提取试验样品中的 DXd, 处理后的样品使用液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 进行检测。

结果显示, 至第 21 天, 抗体 A-ADC $100 \mu\text{g/mL}$ 在人、食蟹猴、大鼠和小鼠血清中 DXd 的释放率分别为 0.637%、0.698%、0.355% 和 0.439%。抗体 A-ADC $10 \mu\text{g/mL}$ 在人、食蟹猴、大鼠和小鼠血清中 DXd 的释放率分别为 0.696%、0.702%、0.368% 和 0.492%。这说明抗体 A-ADC 能够在各种属血清中稳定存在, 荷载毒素 DXd 脱落率较低。

序列列表

SEQ ID NO: 1 (iBT11)

QVQLQESGGGSVQSGGSLRLSCAASGYTTSSVCMAWFRQAPGNEREGVAHITRDGRTMYADSVRGRFTIS
QDNAKNTLFLQMNSLKPEDTGMYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGRGTQVTVSS

SEQ ID NO: 2 (huiBT11v1)

QVQLVESGGGSVQSGGSLRLSCAASGYTTSSVCMAWFRQAPGNEREGVAHITRDGRTMYADSVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 3 (huiBT11v3)

QVQLVESGGGSVQSGGSLRLSCAASGYTTSSVCMAWFRQAPGNLEGVAHITRDGRTMYADSVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 4 (huiBT11v4)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTTSSVCMAWFRQAPKGLEGVAHITRDGRTMYADSVRGRFTIS

RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 5 (huiBT11v5)

QVQLVESGGGSVQSGGSLRLSCAASGYTTSSVCMWFRQAPGKLEGVAHITRDGRTMYADSVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 6 (huiBT11v6)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTTSSVCMWFRQAPGNGLEGVAHITRDGRTMYADSVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 7 (huiBT11v7)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTTSSVCMWFRQAPGNREGVAHITRDGRTMYADSVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 8 (CDR1 Kabat)

SVCMA

SEQ ID NO: 9 (CDR2 Kabat)

HITRDGRTMYADSVRG

SEQ ID NO: 10 (CDR3 Kabat)

RVCEWRSTVQAPRSEAYQL

SEQ ID NO: 11 (CDR1 AbM)

GYTTSSVCMA

SEQ ID NO: 12 (CDR2 AbM)

HITRDGRTM

SEQ ID NO: 13 (CDR3 AbM)

RVCEWRSTVQAPRSEAYQL

SEQ ID NO: 14 (CDR1 Chothia)

GYTTSSV

SEQ ID NO: 15 (CDR2 Chothia)

TRDGR

SEQ ID NO: 16 (CDR3 Chothia)

RVCEWRSTVQAPRSEAYQL

SEQ ID NO: 17 (CDR1 IMGT)

GYTTSSVC

SEQ ID NO: 18 (CDR2 IMGT)

ITRDGRT

SEQ ID NO: 19 (CDR3 IMGT)
AARVCEWRSTVQAPRSEAYQL

SEQ ID NO: 20 (IgG1 Fc C220S)
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21 (hRS7 VH)
QVQLQQSGSELKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGR
FAFSLDTSVSTAYLQISLKAADDNAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 22 (hRS7 VH CDR1 Kabat)
NYGMN

SEQ ID NO: 23 (hRS7 VH CDR2 Kabat)
WINTYTGEPTYTDDFKG

SEQ ID NO: 24 (hRS7 VH CDR3 Kabat)
GGFGSSYWFYFDV

SEQ ID NO: 25 (hRS7 VH CDR1 AbM)
GYTFTNYGMN

SEQ ID NO: 26 (hRS7 VH CDR2 AbM)
WINTYTGEPT

SEQ ID NO: 27 (hRS7 VH CDR3 AbM)
GGFGSSYWFYFDV

SEQ ID NO: 28 (hRS7 VH CDR1 Chothia)
GYTFTNY

SEQ ID NO: 29 (hRS7 VH CDR2 Chothia)
NTYTGE

SEQ ID NO: 30 (hRS7 VH CDR3 Chothia)
GGFGSSYWFYFDV

SEQ ID NO: 31 (hRS7 VH CDR1 IMGT)
GYTFTNYG

SEQ ID NO: 32 (hRS7 VH CDR2 IMGT)
INTYTGEP

SEQ ID NO: 33 (hRS7 VH CDR3 IMGT)
ARGGFGSSYWYFDV

SEQ ID NO: 34 (hRS7 VL)
DIQLTQSPSSLASVGDVRSITCKASQDVSIABAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFT
LTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIK

SEQ ID NO: 35 (hRS7 VL CDR1 Kabat)
KASQDVSIABA

SEQ ID NO: 36 (hRS7 VL CDR2 Kabat)
SASYRYT

SEQ ID NO: 37 (hRS7 VL CDR3 Kabat)
QQHYITPLT

SEQ ID NO: 38 (hRS7 VL CDR1 AbM)
KASQDVSIABA

SEQ ID NO: 39 (hRS7 VL CDR2 AbM)
SASYRYT

SEQ ID NO: 40 (hRS7 VL CDR3 AbM)
QQHYITPLT

SEQ ID NO: 41 (hRS7 VL CDR1 Chothia)
KASQDVSIABA

SEQ ID NO: 42 (hRS7 VL CDR2 Chothia)
SASYRYT

SEQ ID NO: 43 (hRS7 VL CDR3 Chothia)
QQHYITPLT

SEQ ID NO: 44 (hRS7 VL CDR1 IMGT)
SAS

SEQ ID NO: 45 (hRS7 VL CDR2 IMGT)
QDVSA

SEQ ID NO: 46 (hRS7 VL CDR3 IMGT)
QQHYITPLT

SEQ ID NO: 47 (IgG1 constant region)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

SSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 48 (Ig κ constant region)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 49 (hRS7 HC)

QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGR
FAFSLDTSVSTAYLQISLKAADTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGLSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50 (hRS7 LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDVRSITCKASQDVSIABAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFT
LTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 51 (抗体 A HC)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTTSSVCMWFRQAPGNREGVAHITRDGRTMYADSVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARVCEWRSTVQAPRSEAYQLWGQGLTVTVSSGAPGGGGGSQV
QLQQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFA
FSLDTSVSTAYLQISLKAADTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGLSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52 (Mutant GalT1)

GSNSAAAIQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESP
LLVGPMLEFNPMPVDLELVAKQNPVNKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQ
QLDYGIIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSVDVLDIPMNDHNAYRCFSQPRHISVAMDK
FGFSLPYVQLFGGVSALSQKQFLTINGFPNNYWGWWGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMIRHSR
DKKNEPN PQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS

SEQ ID NO: 53 (human GalT1 Y285L)

MRLREPLLSGSAAMPASLQACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLSRLPQLVGVSTPLQGGSNSAAAI
QSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLLVGPMLE
EFNPMPVDLELVAKQNPVNKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDYGIIY
VINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSVDVLDIPMNDHNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYV

QLFGGVSALSQQFLTINGFPNNYWGWWGEGDDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMIRHSRDKKNEPNP
QRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS

SEQ ID NO: 54 (bovine GalT1 Y289L)

MKFREPLLGGSAAMPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLRRLPQLVGVHPPLQGSSHGAAAI
GQPSGELRLRGVAPPPPLQNSSKPRSAPSNLDAYSHPGPGPGPGSNLTSAPVPSTTTTSLTACPEESPLLVG
MLIEFNIPVDLKLVEQQNPVKVLGGRYTPMDCISPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYYLHPILQRQQLDYGIY
VINQAGESMFNRAKLLNVGFKEALKDYDYNCFVFSVDLIPMNDHNTYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPY
VQLFGGVSALSQQFLSINGFPNNYWGWWGEGDDDDIYNRLAFRGMSVSRPNAVIGKCRMIRHSRDKKNEP
NPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTVMVLEVQRYPLYTKITVDIGTPS

SEQ ID NO: 55 (AV203HC)

MGWSLILLFLVAVATRVLSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSTIS
DGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWGDYDGFYDWGQGLTVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 56 (AV203LC)

MDFVQIISFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLSWYQQKPGKAPKRLIYAA
STLD SGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 57 (单域抗体 VHH 编码序列通用上游引物)

cccACCGGTCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC

SEQ ID NO: 58 (单域抗体 VHH 编码序列通用下游引物)

cccGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTGG

权利要求

1、人表皮生长因子受体 3 (HER3) 结合蛋白，其包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 1 所示的 VHH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

2、根据权利要求 1 所述的 HER3 结合蛋白，其中所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 根据以下定义系统定义：Kabat、AbM、Chothia 或 IMGT。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的 HER3 结合蛋白，其中所述免疫球蛋白单一可变结构域是骆驼科的、人源化的、或嵌合的。

4、根据权利要求 1-3 中任一项所述的 HER3 结合蛋白，其中 SEQ ID NO: 1 所示的 VHH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 选自以下的任意一组：SEQ ID NO: 8-10、SEQ ID NO: 11-13、SEQ ID NO: 14-16 和 SEQ ID NO: 17-19。

5、根据权利要求 1-4 中任一项所述的 HER3 结合蛋白，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 1-7 所示氨基酸序列中的一个或多个。

6、根据权利要求 5 所述的 HER3 结合蛋白，所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 1-7 之一所示的氨基酸序列。

7、根据权利要求 1-6 中任一项所述的 HER3 结合蛋白，其中所述 HER3 结合蛋白包含 1 个所述免疫球蛋白单一可变结构域。

8、根据权利要求 1-6 中任一项所述的 HER3 结合蛋白，其中所述 HER3 结合蛋白包含 2 个、3 个、4 个、5 个或更多个所述免疫球蛋白单一可变结构域，任选地，所述 2 个、3 个、4 个、5 个或更多个所述免疫球蛋白单一可变结构域具有相同的序列或不具有相同的序列。

9、根据权利要求 1-8 中任一项所述的 HER3 结合蛋白，其还包含免疫球蛋白 Fc 区，优选人免疫球蛋白的 Fc 区，更优选人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。

10、根据权利要求 9 所述的 HER3 结合蛋白，所述免疫球蛋白的 Fc 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示。

11、根据权利要求 9 或 10 所述的 HER3 结合蛋白，所述免疫球蛋白 Fc 区与所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域直接连接或通过接头间接连接。

12、多特异性抗原结合蛋白，其包含提供第一结合特异性的如权利要求 1-11 所述的 HER3 结合蛋白或其抗原结合片段。

13、如权利要求 12 所述的多特异性抗原结合蛋白，其还包含由结合滋养层细胞表面抗原 2 (TROP2) 的抗体或其抗原结合片段提供的第二结合特异性，以及任选地更多的结合特异性。

14、多特异性抗原结合蛋白，其包含结合滋养层细胞表面抗原 2 (TROP2) 的抗体或其抗原结合片段，以及结合人表皮生长因子受体 3 (HER3) 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域；

优选地，

所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 22-24、SEQ ID NO: 25-27、SEQ ID NO: 28-30 和 SEQ ID NO: 31-33 中任意一组的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，

所述轻链可变区包含选自 SEQ ID NO: 35-37、SEQ ID NO: 38-40、SEQ ID NO: 41-43 和 SEQ ID NO: 44-46 中任意一组的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3；

和/或

优选地,所述结合 HER3 的免疫球蛋白单一可变结构域包含选自 SEQ ID NO: 8-10、SEQ ID NO: 11-13、SEQ ID NO: 14-16 和 SEQ ID NO: 17-19 中任意一组的 VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3。

15、根据权利要求 14 所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

16、根据权利要求 14 所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

17、根据权利要求 14-16 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的重链还包含人 IgG1 的恒定区或其变体,例如包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。

18、根据权利要求 14-17 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 TROP2 的抗体或其抗原结合片段的轻链还包含人 Ig κ 的恒定区或其变体,例如包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。

19、根据权利要求 14-18 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 TROP2 的抗体的重链包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

20、根据权利要求 14-19 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 TROP2 的抗体的轻链包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

21、根据权利要求 14-20 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO:1-7 之一所示的氨基酸序列。

22、根据权利要求 21 所述的多特异性抗原结合蛋白,其包含 1 个免疫球蛋白单一可变结构域。

23、根据权利要求 14-22 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域与结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段直接或通过接头间接连接。

24、根据权利要求 14-23 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 C 末端与所述结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段的重链的 N 末端连接。

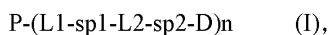
25、根据权利要求 14-23 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 N 末端与所述结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段的重链的 C 末端连接。

26、根据权利要求 14-23 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 C 末端与所述结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段的轻链的 N 末端连接。

27、根据权利要求 14-23 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,所述结合 HER3 的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 N 末端与所述结合 TROP2 的抗体或抗原结合片段的轻链的 C 末端连接。

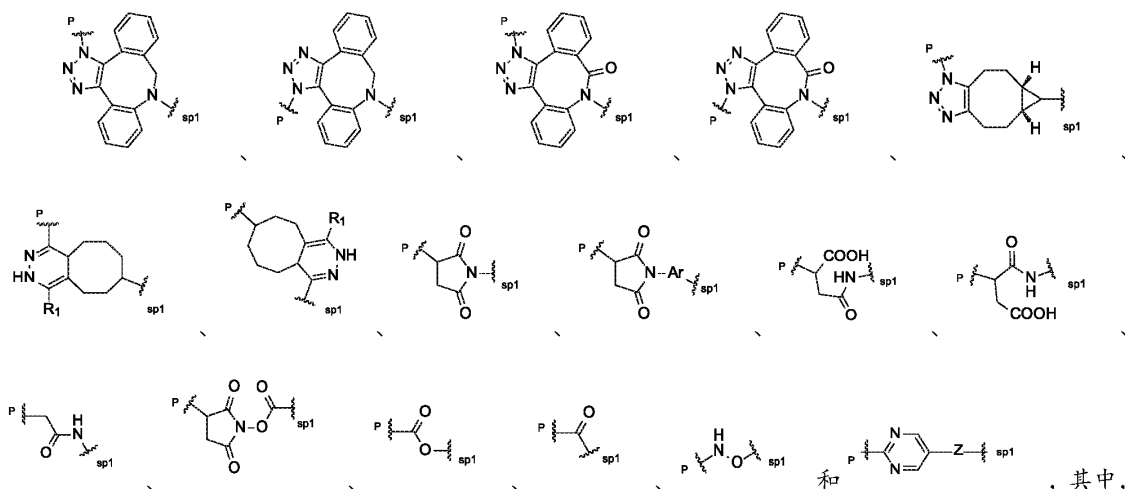
28、根据权利要求 14-27 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,其包含 SEQ ID NO: 51 所示的第一多肽,以及 SEQ ID NO: 50 所示的第二多肽。

29、蛋白-药物偶联物,其具有式 I 的结构:



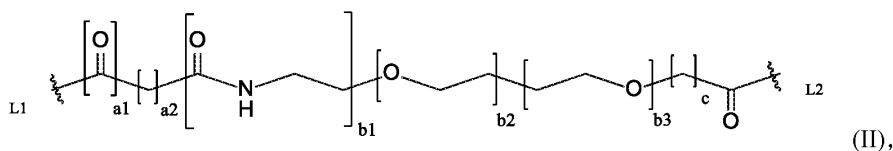
其中,蛋白 P 包含权利要求 12-28 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白,D 为具有生物学活性的物质,L1 是用于与 P 连接的接头,sp1 为第一间隔单元,L2 为可切割的连接子,sp2 为第二间隔单元且与 D 相连,n=1~20。

30、根据权利要求 29 所述的蛋白-药物偶联物,其中 L1 选自:



Ar 代表 C₆₋₁₀ 的亚芳基, 其任选地被卤素、C₁₋₆ 烷基取代; R₁ 选自氢、卤素及 C₁₋₆ 烷基; Z 选自直键、C₂₋₆ 亚烷基、C₂₋₆ 亚烯基、C₆₋₁₀ 亚芳基、5-10 元亚杂芳基、酰胺基、磷酰胺基、亚胺基和 CF₂。

31、根据权利要求 29 或 30 所述的蛋白-药物偶联物，其中 sp1 的结构如式 II 所示：



其中, $a_1=0$ 或 1, $a_2=0$ 至 6 的整数, $b_1=0$ 或 1, $b_2=0$ 至 16 的整数, $b_3=0$ 至 16 的整数, $c=0$ 至 6 的整数, 且 b_2 与 b_3 至少有一个为 0。

32、根据权利要求 31 所述的蛋白-药物偶联物，其中：

- (1) $a_1=0$, $a_2=2, 3, 4, 5$ 或 6 , $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=0$;
- (2) $a_1=0$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=2, 3, 4, 5$ 或 6 ;
- (3) $a_1=1$, $a_2=2, 3, 4, 5$ 或 6 , $b_1=1$, $b_2=2, 3, 4, 5, 6, 7$ 或 8 , $b_3=0$, $c=0$;
- (4) $a_1=0$, $a_2=2, 3, 4, 5$ 或 6 , $b_1=1$, $b_2=2, 3, 4, 5, 6, 7$ 或 8 , $b_3=0$, $c=0$; 或
- (5) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=2, 3, 4, 5, 6, 7$ 或 8 , $c=2, 3, 4, 5$ 或 6 。

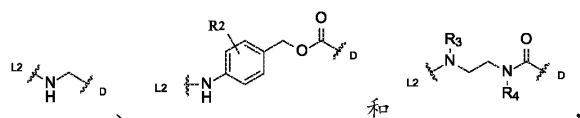
33、根据权利要求 29-32 中任一项所述的蛋白-药物偶联物, 其中, L2 为二肽、三肽或四肽氨基酸残基。

34、根据权利要求 33 所述的蛋白-药物偶联物，L2 选自以下的二肽氨基酸残基：-Phe-Lys-、-Val-Ala-、-Val-Lys-、-Val-Cit-、-Ala-Lys-、-Phe-Cit-、-Leu-Cit-、-Ile-Cit-、-Phe-Arg-、-Trp-Cit-、-Gly-Gly-、-Ala-Ala-、-Gly-Val-和-Gly-Glu-；所述二肽氨基酸残基的左侧与 sp1 连接，右侧与 sp2 连接。

35、根据权利要求 33 所述的蛋白-药物偶联物，L2 选自以下的三肽氨基酸残基：-Glu-Val-Ala-、-Glu-Val-Cit-、-α Glu-Val-Ala-、-α Glu-Val-Cit-、-Val-Lys-Gly 和 -Val-Cit-Gly-；所述三肽氨基酸残基的左侧与 sp1 连接，右侧与 sp2 连接。

36、根据权利要求 33 所述的蛋白-药物偶联物，L2 选自以下的四肽氨基酸残基：-Gly-Gly-Phe-Gly-和-Gly-Phe-Gly-Gly-；所述四肽氨基酸残基的左侧与 sp1 连接，右侧与 sp2 连接。

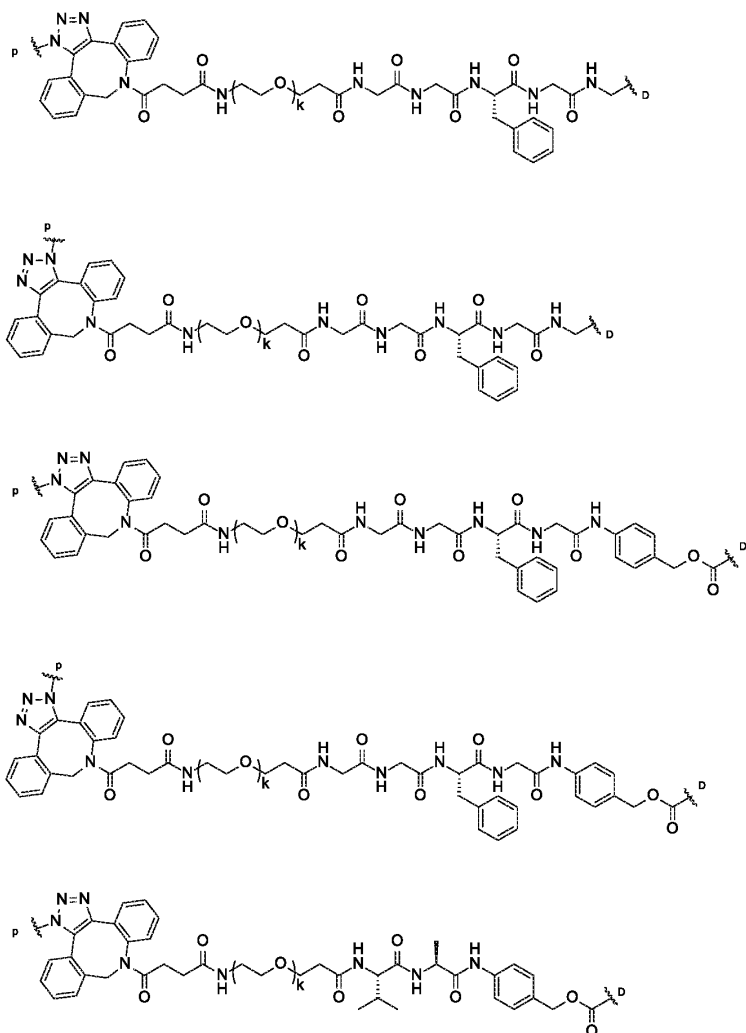
37、根据权利要求 29-36 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，其中 sp2 不存在，或 sp2 选自：

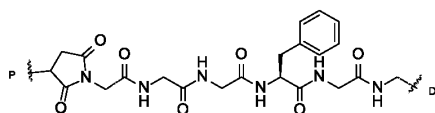
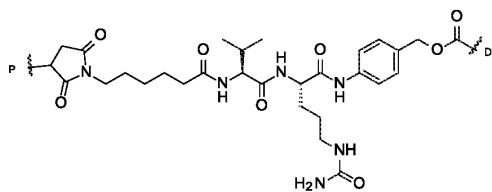
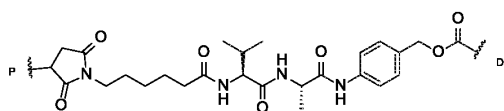
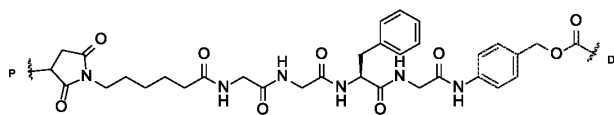
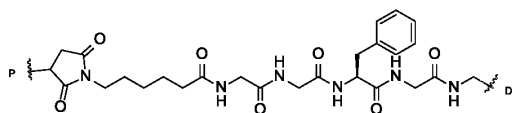
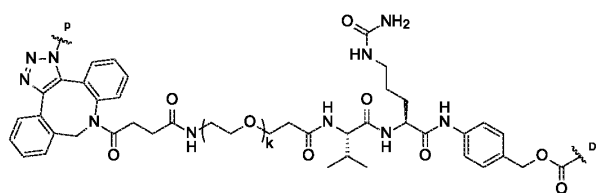
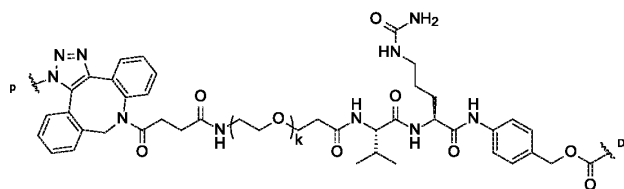
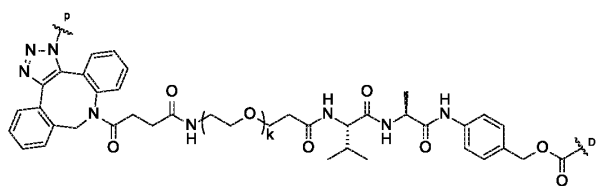


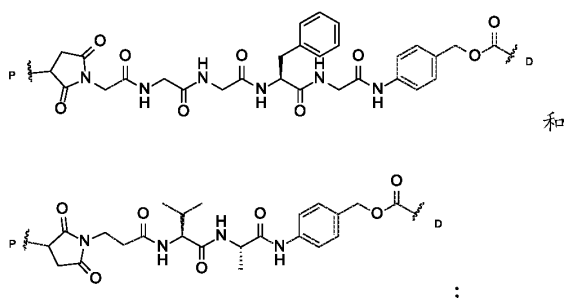
R_2 独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、羟基、氨基、卤素、硝基、氰基、、 和 ， d 为 1 至 20 的整数， e 为 1 至 20 的整数； R_3 、 R_4 各自独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基；

所述烷基可任选地被羟基、氨基、卤素、硝基和氰基取代。

38、根据权利要求 29-37 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，所述-L1-sp1-L2-sp2-选自以下的结构：







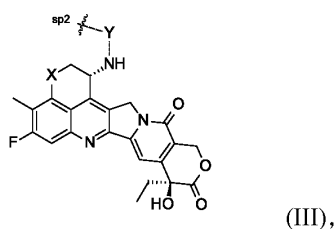
k 为 1~20 的整数, 例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

39、根据权利要求 29-38 中任一项所述的蛋白-药物偶联物, 其中 D 选自细胞毒素、蛋白激酶抑制剂、免疫激动剂、糖皮质激素、寡核苷酸、放射性同位素、多肽及其任意组合。

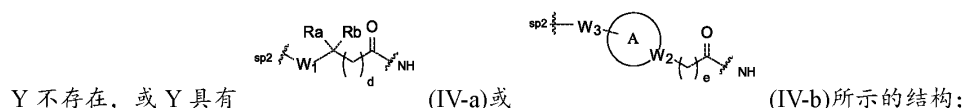
40、根据权利要求 39 所述的蛋白-药物偶联物, 其中 D 为细胞毒素, 其选自: DNA 烷化剂、DNA 解构剂、拓扑异构酶 I 抑制剂、拓扑异构酶 II 抑制剂、微管抑制剂、核糖体抑制剂及其任意组合。

41、根据权利要求 40 所述的蛋白-药物偶联物, 其中 D 选自: 奥瑞他汀(Auristatin)衍生物、美登素(Maitansine)衍生物、艾日布林(Eribulin)衍生物、微管菌素(tubulysin)衍生物、吡咯苯二氮卓二聚体(Pyrrolobenzodiazepine, PDB)衍生物、杜卡霉素(Duocarmycin)衍生物、卡奇霉素(Calicheamicin)衍生物、PNU-159682 及其衍生物、喜树碱(Camptothecin)衍生物、鹅膏毒素(Amatoxin)衍生物及其任意组合。

42、根据权利要求 40 所述的蛋白-药物偶联物, 其中 D 具有式 III 所示的结构:



其中, X 选自 CH₂、NH、O、S 或 SO₂;



其中 W₁、W₃ 各自独立地选自 O、S 和 NH, W₂ 选自 CH 和 N,

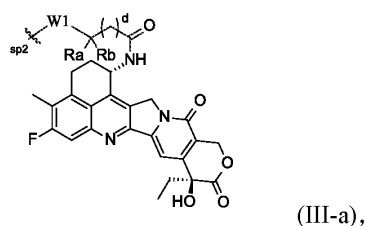
R_a、R_b 各自独立地选自氢、氘、卤素、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基、3-6 元杂环烷基、羟基、氨基、氰基和硝基; 或者, R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成 3-6 元环烷基、3-6 元杂环烷基或羰基; 或者, R_a 与酰胺部分的 N 原子相连形成 3-6 元杂环烷基并且 R_b 为氢;

环 A 选自以下的组: 5-10 元亚环烷基、5-10 元亚杂环烷基、6-10 元亚芳基和 5-10 元亚杂芳基;

所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基和亚杂芳基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代;

d、e 各自独立地选自 0 至 5 的整数。

43、根据权利要求 42 所述的蛋白-药物偶联物，其中 D 具有式 III-a 所示的结构：



其中 W_1 为 O 或 NH；

R_a 、 R_b 各自独立地选自氢、氘、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷基、3-6 元杂环烷基、羟基、氨基、氰基和硝基；或者， R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成 3-6 元环烷基、3-6 元杂环烷基或羰基；或者， R_a 与酰胺部分的 N 原子相连形成 3-6 元杂环烷基并且 R_b 为氢；

所述烷基、烷氧基、环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氢、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代；

d 为 0 至 5 的整数。

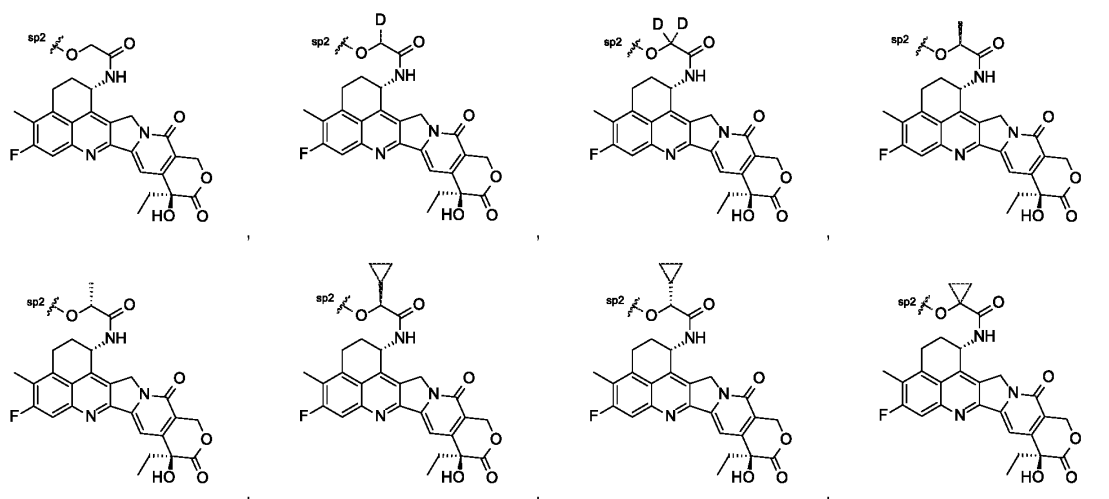
44、根据权利要求 43 所述的蛋白-药物偶联物，其中， W_1 为 O。

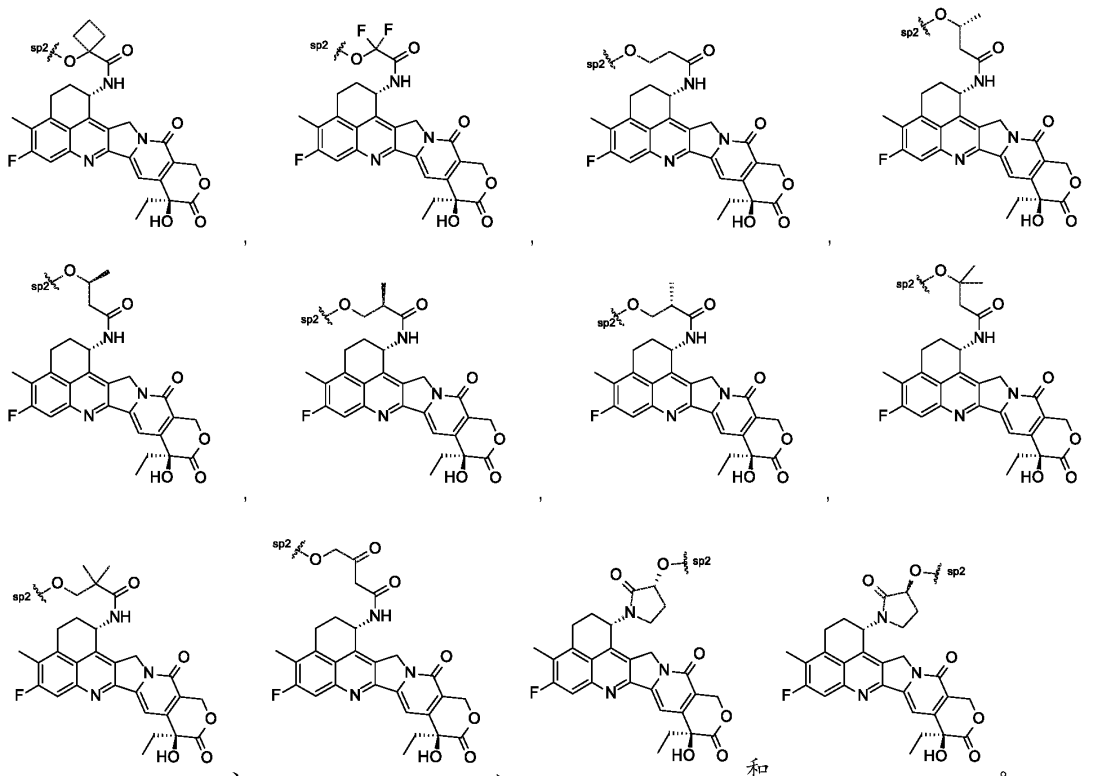
45、根据权利要求 43 或 44 所述的蛋白-药物偶联物，其中 d 为 0、1 或 2。

46、根据权利要求 43-45 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，其中 R_a 选自氢、氘、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷基、3-6 元杂环烷基、羟基和氨基， R_b 为氢。

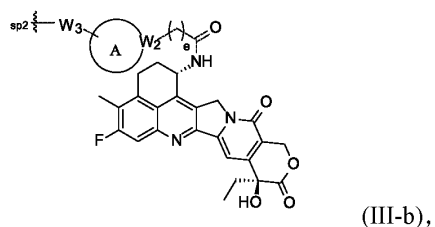
47、根据权利要求 43-45 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，其中 R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成 3-6 元环烷基或 3-6 元杂环烷基。

48、根据权利要求 43 所述的蛋白-药物偶联物，其中 D 选自以下的组：





49、根据权利要求 42 所述的蛋白-药物偶联物，其中 D 具有式 III-b 所示的结构：



其中 W_3 为 O 或 NH, W_2 为 CH 和 N,

环 A 选自以下的组：5-10 元亚环烷基、5-10 元亚杂环烷基、6-10 元亚芳基和 5-10 元亚杂芳基；

所述亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基和亚杂芳基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代；

e 为 0 至 5 的整数。

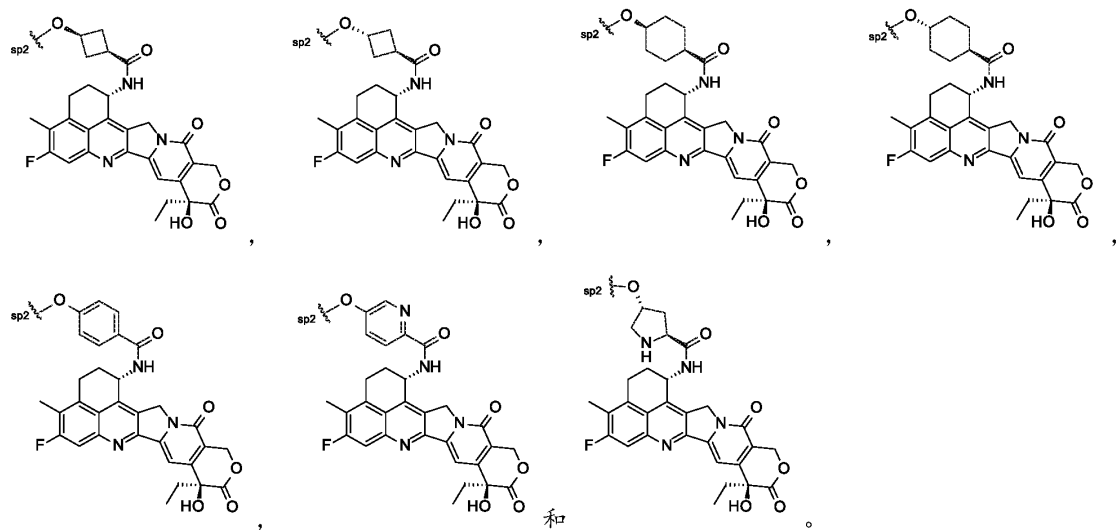
50、根据权利要求 49 所述的蛋白-药物偶联物，其中， W_3 为 O。

51、根据权利要求 49 或 50 所述的蛋白-药物偶联物，其中， W_2 为 CH。

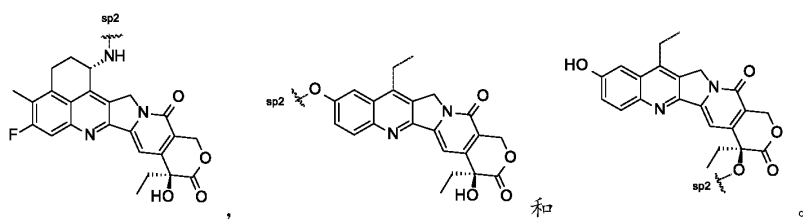
52、根据权利要求 49-51 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，其中， e 为 0、1 或 2。

53、根据权利要求 49-52 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，其中，环 A 为 5-10 元亚环烷基。

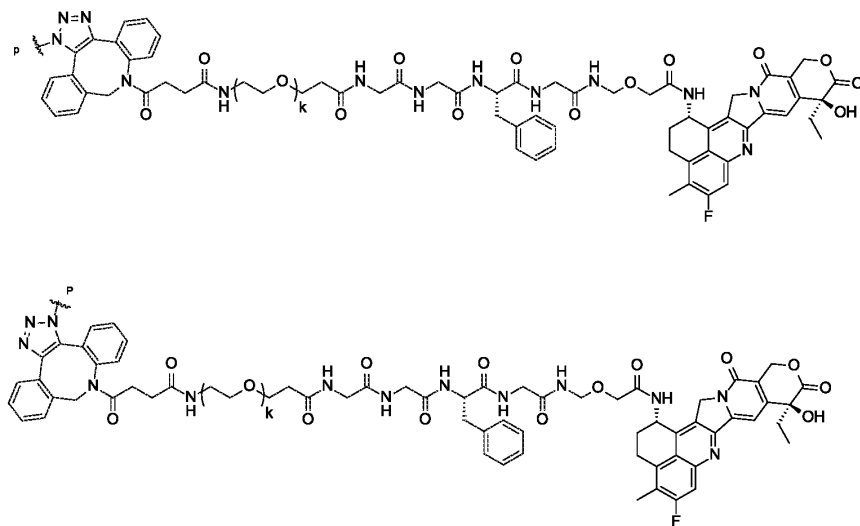
54、根据权利要求 49 所述的蛋白-药物偶联物，其中 D 选自以下的组：

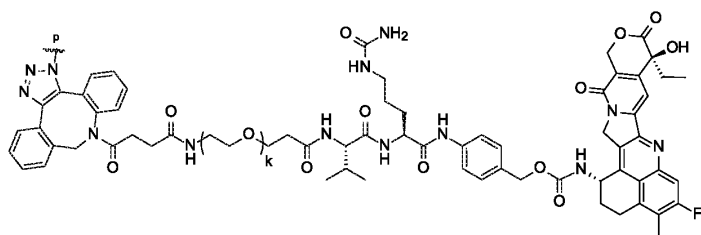
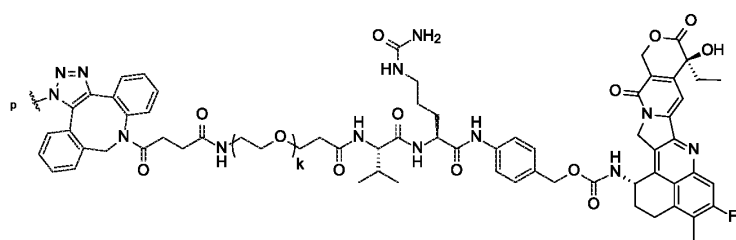
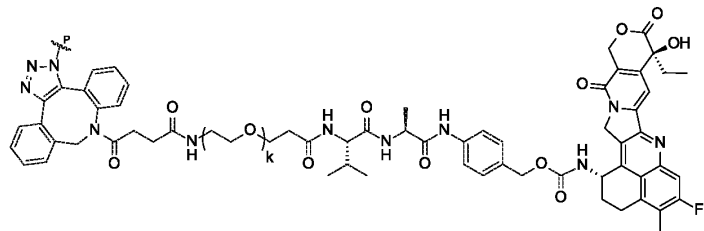
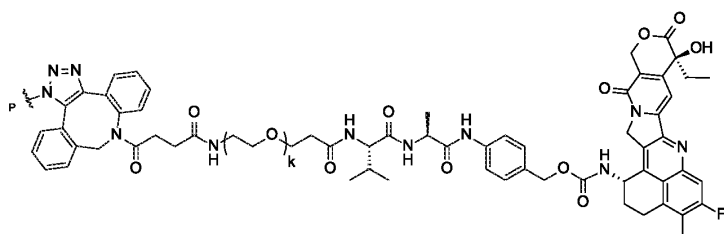
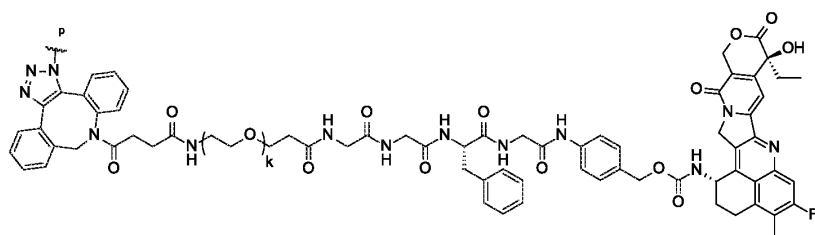
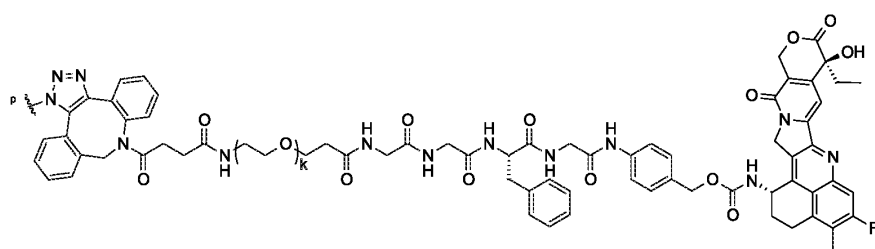


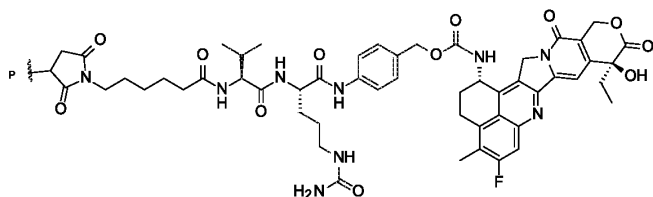
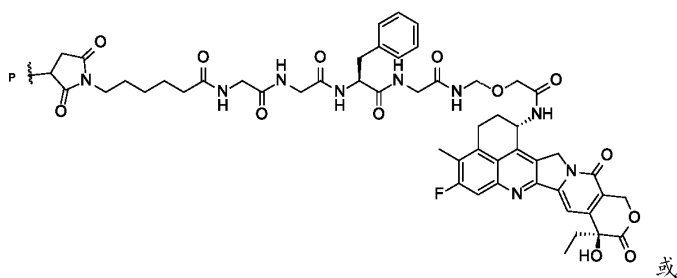
55、根据权利要求 41 所述的蛋白-药物偶联物，其中 D 为喜树碱类衍生物；优选自以下的结构：



56、根据权利要求 29 所述的蛋白-药物偶联物，所述-L1-sp1-L2-sp2-D 选自以下的结构：





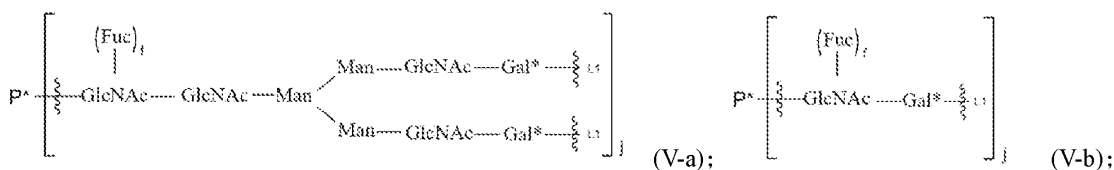


, k 为 1~20 的整数。

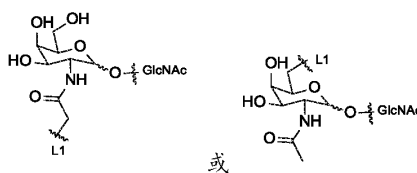
57、根据权利要求 29-56 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，所述 L1 与多特异性抗原结合蛋白 P 之间通过巯基连接，所述巯基通过还原重链与重链之间的二硫键，和/或重链与轻链之间的二硫键得到。

58、根据权利要求 29-56 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，所述 L1 与多特异性抗原结合蛋白 P 之间通过寡糖连接。

59、根据权利要求 58 所述的蛋白-药物偶联物，所述寡糖具有式 V-a 或式 V-b 所示结构：



其中，P*结合 HER3 和 TROP2，其包含权利要求 12-28 中任一项所述的抗原结合蛋白，GlcNAc 为 N-乙酰葡萄糖胺，Fuc 为岩藻糖，Man 为甘露糖，f 为 0 或 1，j 为 1 至 20；



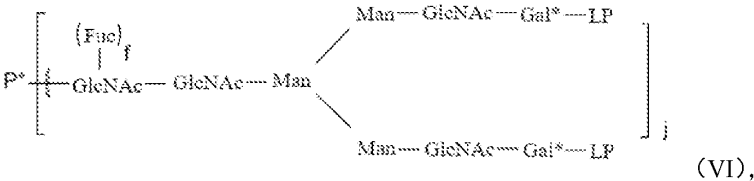
Gal*为经修饰的半乳糖，选自以下的结构：

所述寡糖通过核心 GlcNAc 与 P*连接。

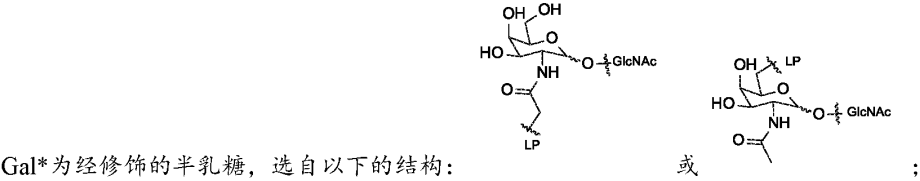
60、根据权利要求 59 所述的蛋白-药物偶联物，所述经修饰的半乳糖通过 β -1,4-糖苷键与 GlcNAc 连接。

61、根据权利要求 58-60 任一所述的蛋白-药物偶联物，所述寡糖与 P*的 Fc 片段连接；优选与 Fc 片段的 CH2 结构域连接；更优选与 Fc 片段的 Asn297（根据 Kabat 的 EU 索引编号）连接。

62、根据权利要求 29-61 中任一项所述的蛋白-药物偶联物，所述蛋白-药物偶联物具有式 VI 所示的结构：

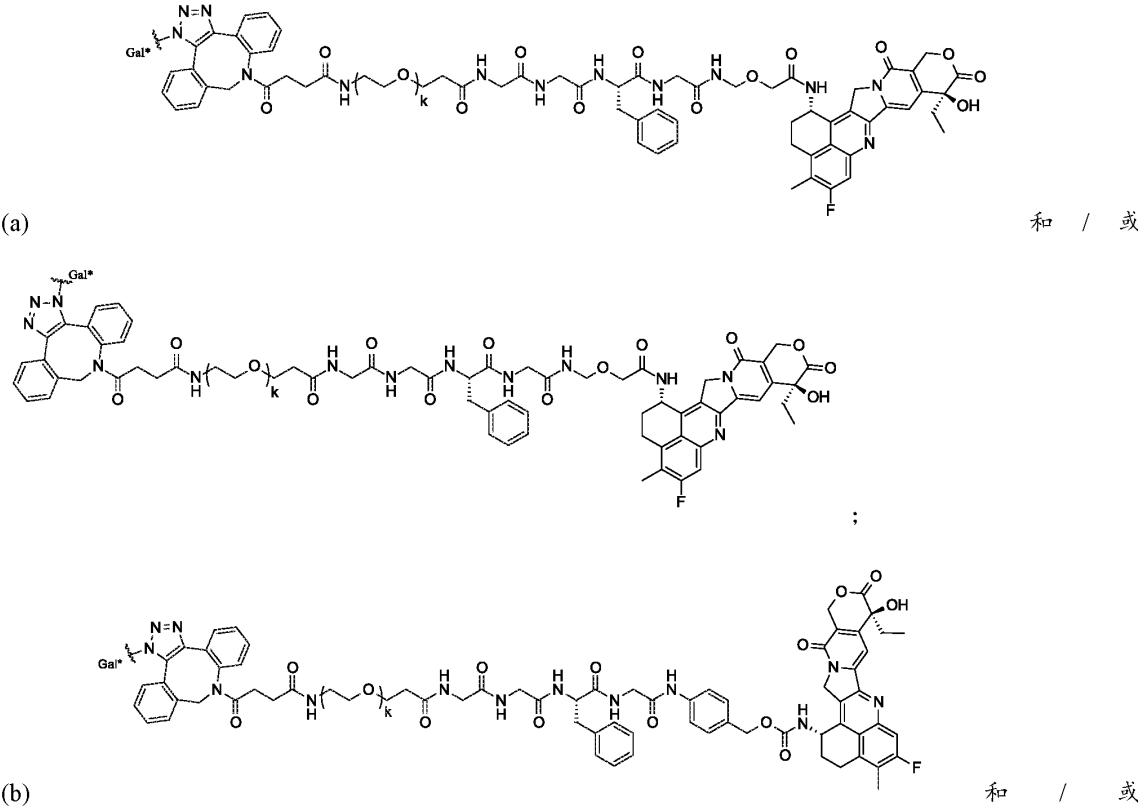


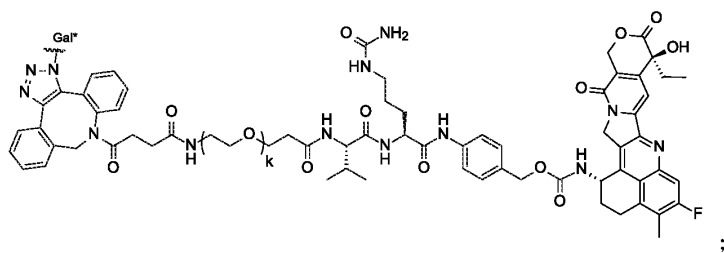
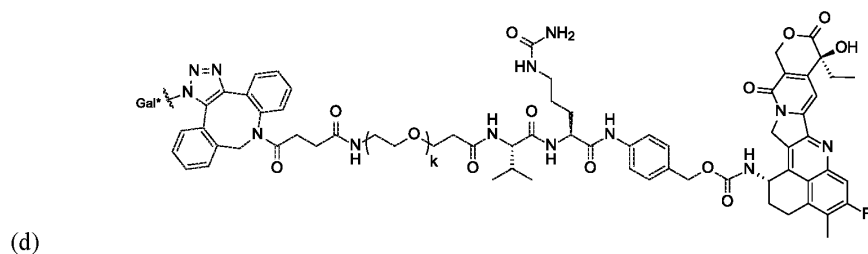
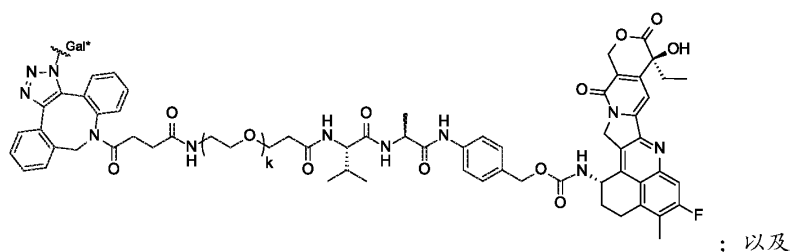
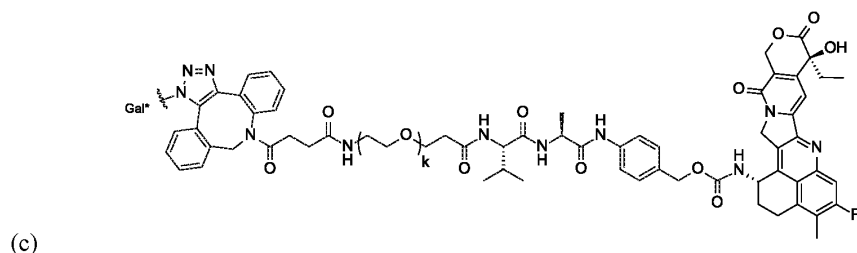
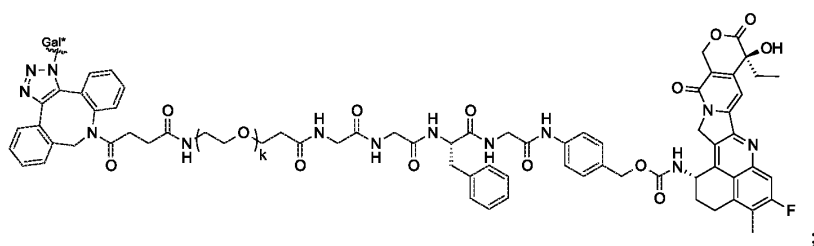
其中，P*结合 HER3 和 TROP2，例如，包含权利要求 12-28 中任一项所述的抗原结合蛋白，GlcNAc 为 N-乙酰葡萄糖胺，Fuc 为岩藻糖，Man 为甘露糖，f 为 0 或 1，j 为 1 至 20；



所述寡糖通过核心 GlcNAc 与 P*连接；

LP 选自以下的结构：





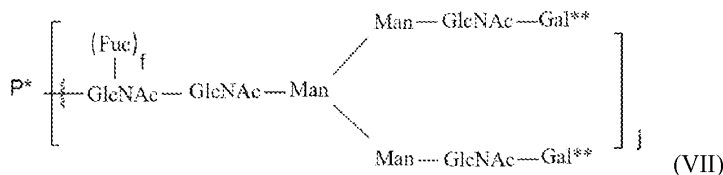
k 为 1~20 的整数, 例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

其中, 核心 GlcNAc 与 P* 直接连接。

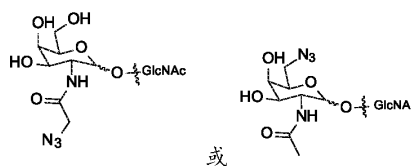
63、根据权利要求 59-62 中任一项所述的蛋白-药物偶联物, 所述抗原结合蛋白包含 SEQ ID NO:51 所示的第一多肽, 以及 SEQ ID NO:50 所示的第二多肽。

64、根据权利要求 62 或 63 所述的蛋白-药物偶联物，所述寡糖与 P* 的 Fc 片段连接；优选与 Fc 片段的 CH2 结构域连接；更优选与 Fc 片段的 Asn297（根据 Kabat 的 EU 索引编号）连接。

65、蛋白衍生物，其具有式 VII 所示的结构：



其中，P* 结合 HER3 和 TROP2，其包含权利要求 12-28 中任一项所述的抗原结合蛋白，GlcNAc 为 N-乙酰葡萄糖胺，Fuc 为岩藻糖，Man 为甘露糖，f 为 0 或 1，j 为 1 至 20；



Gal** 为经修饰的半乳糖，选自以下的结构：

或

所述寡糖通过核心 GlcNAc 与 P* 连接。

66、根据权利要求 65 所述的蛋白衍生物，所述核心 GlcNAc 与 P* 的 Fc 片段连接；优选与 Fc 片段的 CH2 结构域连接；更优选与 Fc 片段的 Asn297（根据 Kabat 的 EU 索引编号）连接。

67、分离的多核苷酸，其编码权利要求 1-11 中任一项的 HER3 结合蛋白或其抗原结合片段或权利要求 12-28 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白。

68、载体，其包含权利要求 67 的多核苷酸，优选地所述载体是表达载体。

69、宿主细胞，其包含权利要求 67 的多核苷酸或权利要求 68 的载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选的选自酵母细胞、哺乳动物细胞（例如所述宿主细胞是 CHO 细胞，例如 CHO-K1 细胞或 expiCHO 细胞，或所述宿主细胞是 293 细胞，例如 HEK293 细胞）或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

70、制备结合 HER3 结合蛋白或其抗原结合片段或包含 HER3 结合蛋白或其抗原结合片段的多特异性抗原结合蛋白的方法，所述方法包括在适于表达所述蛋白的条件下，培养包含编码权利要求 1-11 中任一项的 HER3 结合蛋白或其抗原结合片段或权利要求 12-28 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白的核酸的宿主细胞，任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述结合蛋白或多特异性抗原结合蛋白或其抗原结合片段或融合蛋白。

71、权利要求 1-11 中任一项所述的 HER3 结合蛋白、权利要求 12-28 中任一项所述的多特异性抗原结合蛋白或者权利要求 29-64 中任一项所述的蛋白-药物偶联物在制备药物中的用途，所述药物可用于治疗和/或预防肿瘤。

72、根据权利要求 71 所述的用途，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。