

化合物以及含有该化合物的抗体偶联药物

相关申请的交叉引用

本申请是以 CN 申请号为 202311037231.5，申请日为 2023 年 8 月 16 日的申请为
5 基础，并主张其优先权，该 CN 申请的全部内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

本发明属于生物医药领域，涉及一种化合物以及含有该化合物的抗体偶联药物。
本发明还涉及包含所述抗体偶联药物的药物组合物及其用途。具体地，所述抗体偶联
10 药物为抗 HER3 的抗体偶联药物。

背景技术

癌症是危害人类生命健康的头号杀手。传统治疗包括手术、化疗和放疗等方式，
但 these 方法通常在杀死癌细胞的同时对正常细胞产生毒副作用，导致一个狭窄的治疗
15 窗口。免疫疗法是一种重要的癌症治疗手段，通常利用人体自身的免疫机制来对抗癌
细胞，由于其高靶向性和副作用小的独特优势，是早期病灶较小的癌症患者的优选治
疗方案。但针对晚期实体瘤来说，免疫疗法效果有限，需要联合其他方法共同抗击癌
细胞(李云峰,辛杰,李静,等.抗体偶联药物连接技术的研究进展[J].中国新药与临床杂志,
2022, 41(12):10.)。

20 抗体偶联药物(antibody drug conjugate, ADC)是一种新兴的大分子靶向药物，兼
具传统小分子化疗的强大杀伤效应及抗体药物的肿瘤靶向性。ADC 由三个主要部分组
成：负责选择性识别癌细胞表面抗原的抗体，负责杀死癌细胞的有效载荷 (payload)，
以及连接抗体和有效载荷的连接子 (linker)。ADC 药物进入血液循环后，其抗体部
分与肿瘤细胞表面的抗原特异性结合，结合形成的复合物通过受体介导的内吞作用
25 (可分为网格蛋白介导的内吞作用 clathrin-mediated endocytosis、细胞膜洞穴样内陷
cave-like invagination、巨胞饮作用 macropinocytosis 以及网格蛋白和小窝蛋白非依赖
性内吞作用 clathrin- and caveolin-independent endocytosis 四种类型) 进入细胞。可
切割型连接子对肿瘤细胞内的环境因素敏感，会被特定 pH 值环境、蛋白酶、或某些
化学物质裂解；携带不可切割型连接子的 ADC 药物被溶酶体消化，从而释放药物。
30 某些 ADC 药物的小分子可以穿透细胞膜进一步杀伤周围的癌细胞，即旁观者杀伤

效应 (Khongorzul, Puregmaa, et al. "Antibody-Drug Conjugates: A Comprehensive Review." *Mol Cancer Res* 1(2020).; Kostova Vesela, Désos Patrice, Starck Jérôme-Benoît et al. *The Chemistry Behind ADCs*. [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14: undefined.)。

- 5 有效载荷在肿瘤内的积累是有限的，因此需要在亚纳摩尔浓度下杀死肿瘤。另外还需要具备很好的稳定性，使之在循环系统和溶酶体中保持结构完整和活性。常见的有效载荷主要包括微管蛋白抑制剂和 DNA 损伤剂。微管蛋白抑制剂通过抑制微管蛋白的生成和聚集，以达到杀伤肿瘤细胞，并抑制肿瘤细胞的快速增殖的目的。常用于 ADC 构建的微管蛋白抑制剂包括美登素类 (Maytansines)、奥瑞他汀类 (Auristatins)
- 10 和微管溶素 (Tubulysins) 等。DNA 损伤剂因作用机制不同而分为 3 大类：DNA 双链破坏剂、DNA 插入剂和 DNA 烷基化剂。DNA 在细胞的生长和增殖过程中至为关键，对其进行破坏，能够高效杀伤肿瘤细胞并抑制其快速增殖。常用于 ADC 构建的 DNA 损伤剂包括吡咯苯并氮卓类和吲哚氯苯并氮卓类 (例如吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮杂卓, PBD)、杜卡霉素、喜树碱 (CPT) 及其衍生物 (例如拓扑异构酶 I 抑制剂 Dxd 和 SN-38)、
- 15 卡奇霉素等 (Dan Nirnøy, Setua Saini, Kashyap Vivek K et al. *Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy: Chemistry to Clinical Implications*. [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2018, 11: undefined.)。

- HER3 是人表皮生长因子受体 (human epidermal receptor, HER) 家族成员之一，由胞外的配体结合区、 α -螺旋的跨膜区以及胞内的酪氨酸激酶区 3 部分组成。HER3
- 20 在多种侵袭性肿瘤中异常过表达，包括乳腺肿瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、转移性结肠癌、头颈部癌、胰腺癌、卵巢癌、透明细胞肉瘤、胃癌和皮肤癌等。HER3 可与配体神经调节蛋白 (neuregulin, NRG) 结合，虽然其缺乏内在的酪氨酸激酶活性，但 HER3 可以通过与 HER2 形成异二聚体，诱导胞内高度保守的激酶残端发生交联磷酸化，即一个受体使另一受体上特定的酪氨酸残基磷酸化，进而招募并激活下游蛋白，
- 25 直接激活 PI3K/AKT 通路，引起信号级联反应，促进肿瘤细胞发生与发展。

综上所述，开发药效显著、毒副作用小的靶向 HER3 的 ADC 药物具有广阔前景。

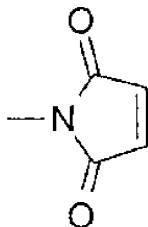
发明内容

- 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，制得了一种能够作为连接子和有效荷
- 30 载的化合物，并进一步制得了抗体偶联药物。制得的抗体偶联药物具有良好的稳定性

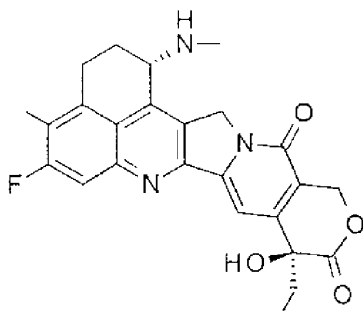
和/或生物学活性。由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及一种化合物或其可药用盐，其中，所述化合物包括依次连接的：式 III 化合物、 n 个丙氨酸、和式 IV 化合物，

5



式 III,



式 IV,

10

其中，

n 为 2、3、4、5 或 6；

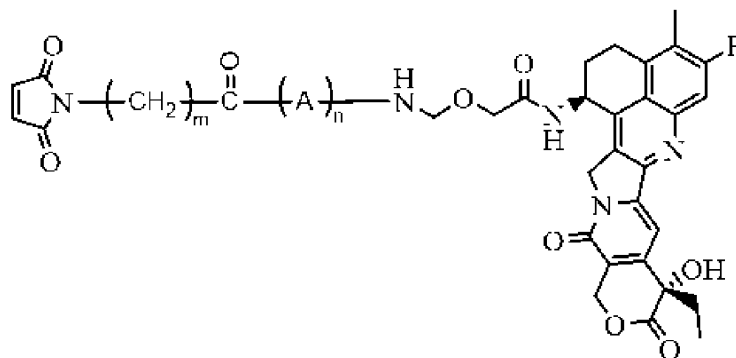
式 III 化合物、 n 个丙氨酸、和式 IV 化合物两两之间独立地为直接连接（例如通过化学键连接）或者通过化学基团连接。

15

本发明的化合物的可药用盐包括与药学上可接受的无机酸或有机酸、或者无机碱或有机碱形成的常规盐。合适的酸加成盐的例子包括与盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸、高氯酸、富马酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、羟基乙酸、甲酸、乳酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、扑酸、丙二酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、萘-2-磺酸、苯磺酸、羟基萘甲酸、氢碘酸、苹果酸、鞣酸等形成的盐。合适的碱加成盐的例子包括与钠、锂、钾、镁、铝、钙、锌、 N,N' -二苄基乙二胺、氯代普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、 N -甲基葡萄糖胺和普鲁卡因等形成的盐。

20

在本发明的一些实施方式中，所述的化合物或其可药用盐，其结构式如下面的式 I 所示，



5

式 I

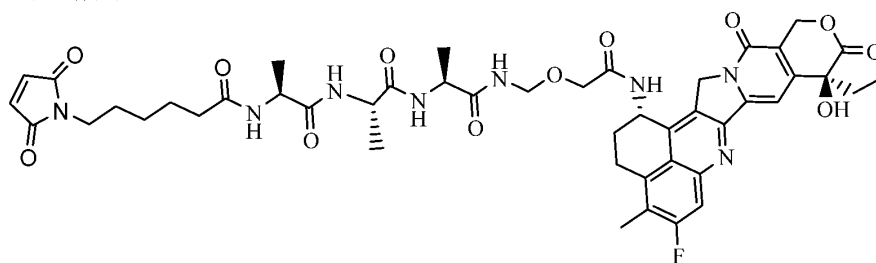
其中，

A 表示丙氨酸（丙氨酸残基）；

m 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12；

n 为 2、3、4、5 或 6。

10 在本发明的一些实施方式中，所述的化合物或可药用盐，其中，所述化合物如下面的式 II 所示，



式 II

15

本发明的另一方面涉及一种抗体偶联药物（ADC），其包含抗体或其抗原结合片段、连接子和有效荷载，

其中，连接子和有效荷载为本发明中任一项所述的化合物或其可药用盐；

优选地，连接子与抗体或其抗原结合片段通过一个或多个硫醚键连接；

20

优选地，连接子与抗体铰链部的二硫键位置的硫原子形成硫醚键。

不拘于理论的限制，马来酰亚胺-N-基与抗体中的巯基发生烷基化反应形成稳定的硫醚键。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体为 IgG 抗体，优选为 IgG1 抗体。

5 在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体为抗 HER3 抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体包含重链可变区和轻链可变区，

其中，

10 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 2 所示的 HCDR2、和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR3；

所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2、和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR3。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，和所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体的重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region 或 Ig gamma-4 chain C region；轻链恒定区为 Ig kappa chain C region。

20 在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体的重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；和轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，偶联于每个抗体分子上的连接子-有效载荷的平均数为 1-8、2-8、3-8、4-8、5-8、6-8 或 7-8。

25 在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体的重链恒定区为人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选人源 IgG1 重链恒定区；轻链恒定区为 Ig kappa chain C region。

30

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其具有 ADCC 活性。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体偶联药物，其中，

“所述抗体偶联药物与其靶向的抗原结合的 EC_{50} ”与“所述抗体偶联药物中包含的抗体或其抗原结合片段与同一抗原结合的 EC_{50} ”相同或基本相同。这里的“基本相同”

5 的含义可以是，例如：

所述抗体偶联药物与其靶向的抗原结合的 EC_{50} ”与“所述抗体偶联药物中包含的抗体或其抗原结合片段与同一抗原结合的 EC_{50} ” 的差异在 $\pm 10\%$ 以内、 $\pm 15\%$ 以内、 $\pm 20\%$ 以内、 $\pm 25\%$ 以内、 $\pm 30\%$ 以内、 $\pm 35\%$ 以内、 $\pm 40\%$ 以内或 $\pm 45\%$ 以内。

本发明的抗体偶联药物能够用于治疗或预防肿瘤；

10 优选地，所述肿瘤为 HER3 阳性的肿瘤；

优选地，所述肿瘤选自肺癌、透明细胞肉瘤、皮肤癌、肾癌、尿路上皮癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、头颈癌、食道癌、表皮样癌、腹膜癌、成体多形性成胶质细胞瘤、结肠癌、直肠癌、子宫癌、唾液腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肛门癌和阴茎癌中的一种或多种；

15

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌 (NSCLC)；

优选地，所述结肠癌为转移性结肠癌。

抗体偶联药物的制备，可以使化合物与抗体或其反应性衍生物反应，并通过在存在于该抗体的铰链部的二硫键部分中形成硫醚键的方法将本发明的化合物或其可药用盐偶联至该抗体。

20

本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的抗体偶联药物，以及一种或多种药学上可接受的辅料。

25 本发明的在再一方面涉及本发明中任一项所述的抗体偶联药物在制备治疗或预防肿瘤的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤为 HER3 阳性的肿瘤；

30 优选地，所述肿瘤选自肺癌、透明细胞肉瘤、皮肤癌、肾癌、尿路上皮癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、头颈癌、食道癌、表皮样癌、腹膜癌、成体多形性成胶

质细胞瘤、结肠癌、直肠癌、子宫癌、唾液腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肛门癌和阴茎癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌 (NSCLC)；

优选地，所述结肠癌为转移性结肠癌。

5

本发明的再一方面涉及一种治疗或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的抗体偶联药物的步骤；

优选地，所述肿瘤为HER3阳性的肿瘤；

10 优选地，所述肿瘤选自肺癌、透明细胞肉瘤、皮肤癌、肾癌、尿路上皮癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、头颈癌、食道癌、表皮样癌、腹膜癌、成体多形性成胶质细胞瘤、结肠癌、直肠癌、子宫癌、唾液腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肛门癌和阴茎癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌 (NSCLC)；

15 优选地，所述结肠癌为转移性结肠癌。

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，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本
20 发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语 EC_{50} 是指半最大效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect)，是指能引起 50% 最大效应的浓度。

如本文中所使用的，术语“无 ADCC 活性”是指通过现有的仪器设备或者检测方法（例如实施例 9 描述的方法）检测显示没有 ADCC 活性、检测不到 ADCC 活性或者
25 超出了仪器设备或者检测方法的检测限。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指通常由两对多肽链（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，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，
30 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(VH)和重链恒定

区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 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。各 VH 和 VL 由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 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(VH 和 VL)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 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987;196:901-917; Chothia 等人 Nature 1989;342:878-883,或者 IMGT 编号系统定义, 10 见 Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009;38(suppl_1):D301-D307 的定义。

轻链和重链的可变区决定抗原的结合;每条链的可变区均含有三个高变区,称互补决定区(CDR),其中重链(H)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3,轻链(L)的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3。本发明中,CDR 由 IMGT 编号系统定义, 15 请参见 Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J].Nucleic acids research,2009;38(suppl_1):D301-D307。

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,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。

如本文中所使用的,术语“单抗”和“单克隆抗体”是指,来自一群高度同源的抗体 25 分子中的一个抗体或抗体的一个片段,也即除可能自发出现的自然突变外,一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的,其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体,这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of 30 predefined specificity[J]. nature,1975;256(5517):495),但也可采用重组 DNA 技术获

得(如参见 U.S.Patent 4,816,567)。

如本文中所使用的, 术语“人源化抗体”是指, 人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体(供体抗体)的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段, 其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如, 小鼠、大鼠或兔)抗体。此外, 受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换, 或被其他抗体的氨基酸残基替换, 以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容, 可参见例如, Jones et al., Nature 1986; 321:522-525; Reichmann et al., Nature, 1988; 332:323-329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992; 2:593-596; 和 Clark, Immunol. Today 2000; 21: 397-402。在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是双抗体(Diabodies), 其中 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. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:6444-6448 和 Poljak R. J. et al., Structure 1994; 2:1121-1123)。

如本文中所使用的, 术语“单链抗体(single chain fragment variable, ScFv)”是指, 包含通过连接体连接的抗体重链可变区(VH)和抗体轻链可变区(VL)的分子。其中 VL 和 VH 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见, 例如, Bird et al, Science 1988; 242:423-426 和 Huston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:5879-5883)。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH₂-VL-连接片段-VH-COOH 或 NH₂-VH-连接片段-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS (SEQ ID NO: 15) 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 (SEQ ID NO: 16) 的接头, 但也可使用其变体(Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan et al, Protein Eng. 1995; 8:725-731, Choi et al, Eur. J. Immunol. 2001; 31: 94-106, Hu et al, Cancer Res. 1996; 56:3055-3061, Kipriyanov et al, J. Mol. Biol. 1999; 293:41-56 和 Roovers et al, Cancer Immunology, Immunotherapy, 2001, 50(1): 51-59. 描述。

如本文中所使用的, 术语“抗体部分”指的是, 抗体-药物偶联物中的抗体部分, 在某些特定的方案中, 其与中间接头部分通过特定官能团连接, 该抗体部分可以与抗原特异性结合。

如本文中所使用的, 术语“连接子”指的是, 连接抗体和细胞毒素的部分, 分为可

切割型与不可切割型。可裂解连接子主要为敏感性的化学键，可以根据身体内环境的特异性化学物种（如谷胱甘肽、酸碱性等）或酶浓度不同，促进连接子与药物裂解，主要通过胺键、二硫键、多肽的形式连接。不可裂解连接子没有可触发裂解的内置化学键，需要在癌细胞中将抗体通过蛋白质水解机制变成氨基酸，进而释放带有连接子

5 和氨基酸片段的细胞毒性药物，主要通过硫醚的形式连接。

如本文中所使用的，术语“有效载荷”指的是，是抗体-药物偶联物中主要负责执行细胞杀伤功能的细胞毒素分子，其与中间连接子部分通过化学合成连接，通过内化作用进入肿瘤细胞内，在溶酶体作用下释放出细胞毒素分子，从而发挥抗肿瘤效果，常见的靶向目标为细胞核中的 DNA 和细胞质中的微管蛋白。

10 如本文中所使用的，术语“**DAR (drug-to-antibody ratio)**”指的是，每个抗体分子上偶联的小分子药物的平均数量，是 **ADC** 重要的质量属性之一。根据连接子、小分子细胞毒素的化学性质以及偶联方式（赖氨酸偶联、半胱氨酸偶联、糖基偶联等），常用表征分析方法有：紫外-可见分光光度法、疏水色谱法、反相色谱法和质谱法(**MS**)。

如本文中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手

15 段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

20 如本文中所使用的，术语“载体 (**vector**)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体 (**YAC**)、细菌人工染色体 (**BAC**) 或

25 **P1** 来源的人工染色体 (**PAC**)；噬菌体如 λ 噬菌体或 **M13** 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 **SV40**）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复

30 制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，GS 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK293 细胞或人细胞等的动物细胞。

- 5 如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5}M ，例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的亲和力（KD）结合该抗原。

- 10 如本文中所使用的，术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5}M ，例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的解离平衡常数（KD）结合抗原。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 KD，例如使用 ForteBio 分子相互作用仪测定。

- 15 如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

- 20 如本文中所使用的，术语“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995），并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

- 25 如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途的有效量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。
- 30

发明的有益效果

本发明取得了如下技术效果中的一项或者多项：

5 (1) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 具有良好的生物学活性。

(2) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 能够有效地释放有效载荷部分。

(3) 本发明的抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 能有效与 **HER3** 结合。

10 (4) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 具有内化活性。

(5) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 在血浆中具有较好的稳定性。

(6) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 能够特异性杀伤肿瘤细胞。

15 (7) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 具有 ADCC 活性。

(8) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 能够有效地抑制体内肿瘤生长。

20 (9) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 具有良好的安全性。

(10) 采用本发明的化合物制得的抗体偶联药物例如 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 具有旁观者杀伤效应。

附图说明

25 图 1：抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 与细胞表面表达 **HER3** 的 **SK-BR-3** 细胞的表面 **HER3** 的结合活性检测结果。

图 2：抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 在细胞表面表达 **HER3** 的 **MDA-MB-453** 细胞中的内化活性检测结果。

30 图 3：抗 **HER3** 抗体-药物偶联物 **KA0013** 的连接子-有效载荷部分裂解所致的非特异性杀伤稳定性检测结果。

图 4: 抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 和 KA0011 的血浆稳定性检测结果。

图 5: 体外检测组织蛋白酶 B 切割 KA0013 和 KA0011 的连接子-有效载荷效率。

图 6: 间接 ELISA 方法测定抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 和 KA0011 与抗原人 HER3-his 结合活性检测结果。

5 图 7: 抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 的动力学特征参数检测结果。

图 8: 抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0011 的动力学特征参数检测结果。

图 9: 抗 HER3 抗体-药物偶联物的特异性细胞杀伤活性检测结果。

图 10: 抗 HER3 抗体-药物偶联物 ADCC 活性检测结果。

图 11: 抗 HER3 抗体-药物偶联物对 CB-17 SCID 小鼠 HCC827 人肺癌细胞移植
10 瘤模型体内药效结果。

图 12: 抗 HER3 抗体-药物偶联物对 CB-17 SCID 小鼠 HCC827 人肺癌细胞移植瘤模型体重影响。

具体实施方式

15 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。

20 在本发明的下述实验例中, 所用到阳性对照 ADC 药物 KA0011 为日本第一三共制药公司研发的 Her3 抗体偶联体药物 U3-1402, 其序列信息及制备方法参考中国专利文献 CN 106163559 B。

在本发明的下述实验例中, 所用到同型对照抗体, 即 IgG-Dxd、IgG-KA0012 和
25 IgG-KA0010 中的 IgG (即 anti-HEL) 组分, 以及 hIgG1 和 anti-HEL 均为靶向为人抗鸡蛋溶酶体 (HEL) 的抗体, 这些抗体的可变区序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies (Acierno 等人. J Mol Biol. 2007; 374(1): 130-46.), 其恒定区片段采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857 作为重链恒定区, Ig
30 kappa chain C region, ACCESSION: P01834 为轻链恒定区; IgG-DXd 或者 IgG-KA0012, hIgG1 和 anti-HEL 均为在中山康方生物医药有限公司的实验室制得。

制备例 1：抗 HER3 抗体 Patritumab 的制备

Patritumab 重链可变区的氨基酸序列：

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGE
5 INHSGSTNYPNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYF
DLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)

编码 Patritumab 重链可变区的核酸序列：

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCCGGACTGCTGAAGCCATCCGAG
ACCCTGTCTCTGACATGTGCCGTGTACGGCGGCTCCTTTTCTGGCTACTATT
10 GGAGCTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAG
ATCAACCACAGCGGCTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGGTGA
CCATCAGCGTGGAGACATCCAAGAATCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGT
GACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGGACAAGTGGACCTG
GTACTTTGATCTGTGGGGCAGAGGCACCCTGGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID
15 NO: 8)

Patritumab 轻链可变区的氨基酸序列：

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKL
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQG
TKVEIK (SEQ ID NO: 9)

20 编码 Patritumab 轻链可变区的核酸序列：

GACATCGAGATGACCCAGTCCCCTGATTCTCTGGCCGTGAGCCTGGGA
GAGAGGGCAACAATCAACTGTAGAAGCTCCCAGTCCGTGCTGTACTCTAGCT
CCAACCGGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAATCCAGGCCAGCCCCCTA
AGCTGCTGATCTATTGGGCCAGCACCAGGGAGTCCGGAGTGCCAGACCGCT
25 TCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTCACCCTGACAATCTCTAGCCTGCA
GGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACTATAGCACCCCCAG
GACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 10)

Patritumab 重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region；轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region。

30 Patritumab 重链恒定区的氨基酸序列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
5 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

Patritumab 重链恒定区的核酸序列:

GCCTCTACAAAGGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGT
10 CTACAAGCGGAGGAACAGCAGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC
CAGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACCTCAGGAGCCCTGACCAGCGGAGTGC
ACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGACTGTATAGCCTGAGCAGCG
TGGTGACCGTGCCTTCTTCTAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGCCCAAGTC
15 TTGCGACAAGACCCACACTTGTCTCCTTGTCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGA
GGACCAAGCGTGTTCCCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA
GCAGGACCCCAGAAGTGACTTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACC
CCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCTA
AGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCG
20 TGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTGTCCAATAAGGCCCTGCCAGCCCCTATCGAGAAGACCATCAGCAAGG
CCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCTCGGG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGAAGGGCTTCT
ACCCCAGCGATATTGCCGTCGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCCGAGAACA
25 ACTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGATAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTA
CAGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTT
TTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCT
GAGCCTGTCTCCAGGCAAG (SEQ ID NO: 12)

Patritumab 轻链恒定区的氨基酸序列:

30 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGN

SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C (SEQ ID NO: 13)

Patritumab 轻链恒定区的核酸序列:

CGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTTCATTTTCCCCCTAGTGACGAGC
5 AGCTGAAATCCGGAACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCC
TCGCGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGCAA
TTCACAGGAGAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTG
AGCTCCACTCTGACCCTGTCCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTGTATG
CCTGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGTTCTCCAGTCACCAAATCCTTCAA
10 CAGAGGCGAATGT (SEQ ID NO: 14)

将 Patritumab 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA 分别克隆到 pcDNA3.1 载体中, 获得抗体 Patritumab 的重组表达质粒。将重组质粒转染 293F 细胞。将 293F 细胞培养液纯化后进行检测。

制得了抗 HER3 单抗 Patritumab。

15 按照 IMGT 编号系统, 抗 HER3 单抗 Patritumab 的 6 个 CDR 如下:

HCDR1: GGSFSGYY (SEQ ID NO: 1)

HCDR2: INHSGST (SEQ ID NO: 2)

HCDR3: ARDKWTWYFDL (SEQ ID NO: 3)

LCDR1: QSVLYSSSNRNY (SEQ ID NO: 4)

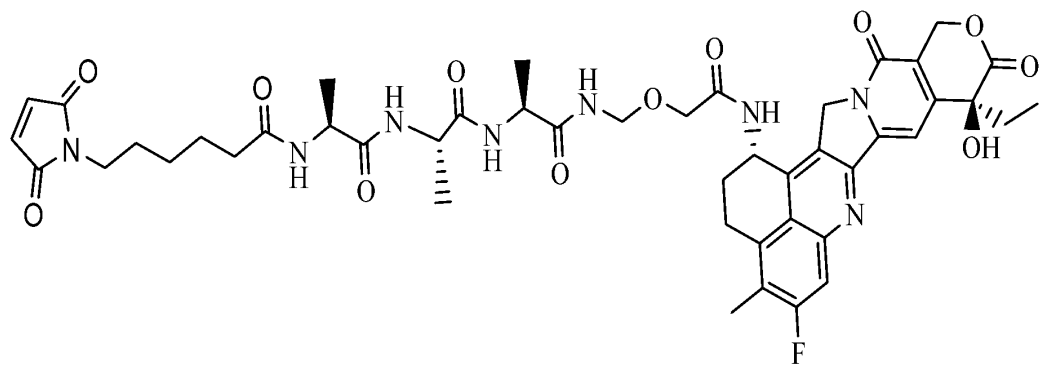
20 LCDR2: WAS (SEQ ID NO: 5)

LCDR3: QQYYSTPRT (SEQ ID NO: 6)。

制备例 2: Mc-AAA-Dxd (KA0012) 的制备

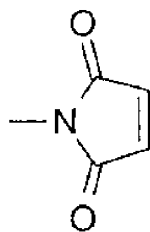
Mc-AAA-Dxd 是 (马来酰亚胺 -N- 基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)
25 -AAA-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。其中 Dxd 的 CAS 号为: 1599440-33-1。

Mc-AAA-Dxd 在本发明中命名为 KA0012, 其结构式如下面的式 II 所示:



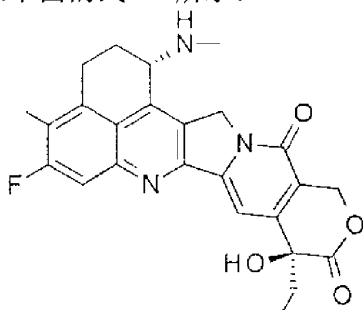
式 II

其中 **Mc** 为马来酰亚胺-N-基，其结构如下面的式 **III** 所示：



式 III

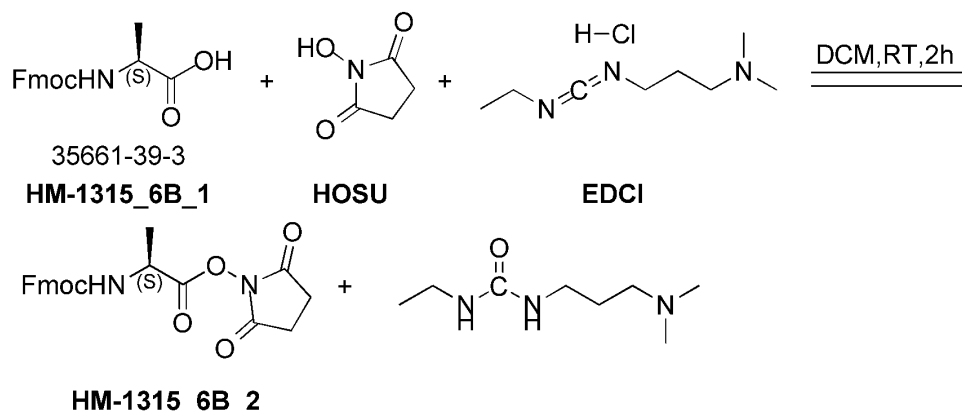
其中-(NH-DX)的结构式如下面的式 **IV** 所示：



式 IV

KA0012 合成步骤如下面的步骤 1 至步骤 10。

步骤 1：制备中间体 **HM-1315 6B 2**

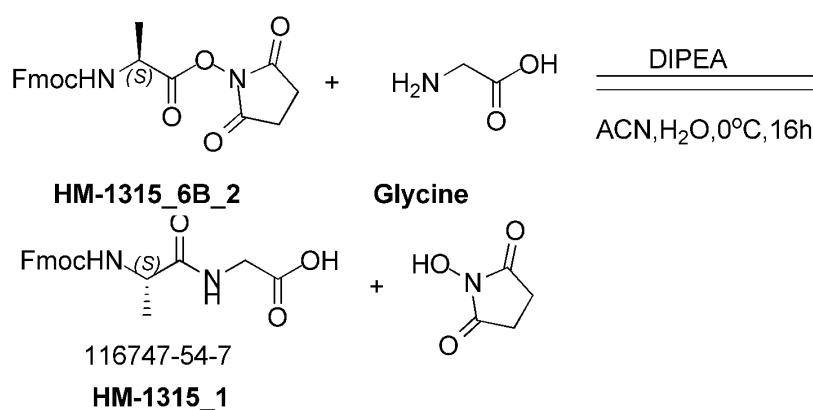


原料 HM-1315_6B_1 (450.0g, 1.44mol, 1eq) 悬浮与 DCM (二氯甲烷) (4.5L, 10V) 中, 控温 0~5°C, 依次加入 HOSU (182.9g, 1.59mol, 1.1eq), EDCI (304.8g, 1.59mol, 1.1eq), 加完后反应液溶解至澄清。反应在 (10~20°C) 反应 3 小时。向反应液中加入半饱和食盐水 (1.0L) 搅拌后静置分液, 然后有机相用半饱和食盐水 (1.0L) 洗涤一次, 再用饱和食盐水 (1.0L×2) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后得 579.0g 白色固体, 98% 产率。

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.13 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.71 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 7.42 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 4.52 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.41-4.17 (m, 3H), 2.79 (d, J = 15.5 Hz, 4H), 2.59 (s, 1H), 1.46 (d, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS [M+23]: 431.1。

步骤 2: 制备中间体 HM-1315_1

15



原料 HM-1315_6B_2 (579.0g, 1.42mol, 1.0eq) 溶解于乙腈 (2895mL, 5v) 中, 加入甘氨酸 (117.2g, 1.56mol, 1.1eq) 和水 (2895mL, 5v)。降温至 -5~0°C, 缓慢加入 DIPEA (N,N-

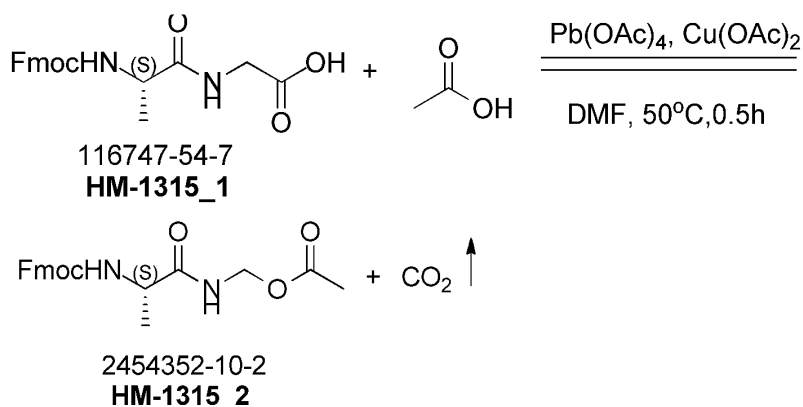
二异丙基乙胺)(275.3g, 2.13mol, 1.5eq), 加完后反应在 20~25°C反应 3 小时。向反应液中加入乙酸乙酯(1.0L)稀释, 稀盐酸(0.5N)调节 pH 至 3~4, 再加入乙酸乙酯(500mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(1.0L×2)萃取两次, 合并有机相, 用饱和食盐水(1.5L)洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩。粗品再用甲基叔丁基醚/乙酸乙酯

5 (2895mL/289.5mL, 5v/0.5v) 打浆 2h, 过滤, 滤饼用油泵抽干得到 447.2g 白色粉末状固体, 85%产率。

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.12 (t, J=5.5 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.73 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.54 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.37 (dt, J = 34.6, 7.1 Hz, 4H), 4.24 (dd, J=15.6, 5.9 Hz, 3H), 4.13- 4.05 (m, 1H), 3.75 (dd, J=14.9, 5.7 Hz, 3H), 1.23 (d, J=7.2 Hz,

10 3H). LCMS [M+1]:369.1, [M+23]:392.1。

步骤 3: 制备中间体 HM-1315 2



15

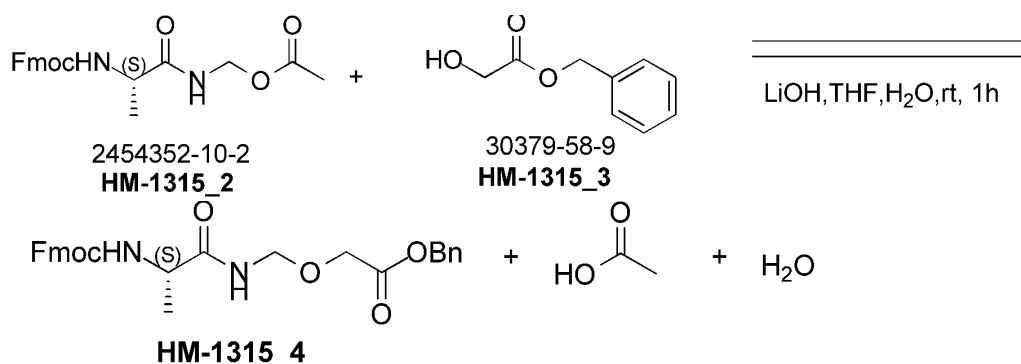
原料 HM-1315_1(474.0g, 1.29mol, 1.0eq) 溶解于超干 DMF(2370 mL, 5v)中, 氮气保护, 加入四乙酸铅(1143.9g, 2.58mol, 2.0eq)、无水乙酸铜(234.3g, 1.29mol, 1.0eq)和乙酸(170.5g, 2.84mol, 2.2eq), 加完反应温度上升至约 50°C。将反应液至于油浴中 50~55°C反应 0.5 小时。将反应液冷却, 向其中加入乙酸乙酯(2370 mL, 5v), 再加入冰

20 水(2370 mL, 5v), 有黑色粘稠固体析出。布氏漏斗过滤滤去黑色不溶物, 滤液用分液漏斗分液, 水层再用乙酸乙酯(2.0L×2)萃取两次, 合并有机相, 用水(1.0L×2)洗两遍, 再用饱和食盐水(1.0L×3)洗涤三次, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩后所得粗品用甲基叔丁基醚(2370mL)室温打浆 2h, 过滤, 滤饼用油泵抽干得到 367.7g 白色固体产物, 74%产率。

25 ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.90 (s, 1H), 7.89 (d, J =7.5 Hz, 2H), 7.73 (t, J=6.6

Hz, 2H), 7.59 (d, J=7.6 Hz, 1H), 7.42 (t, J =7.4 Hz, 2H), 7.33 (t, J=7.4 Hz, 2H), 5.10 (d, J=6.7 Hz, 2H), 4.25 (dd, J=20.3, 6.5 Hz, 3H), 4.12-4.01 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.22 (d, J=7.2 Hz, 3H).LCMS [M+23]:405.0。

5 步骤 4: 制备中间体 HM-1315 4

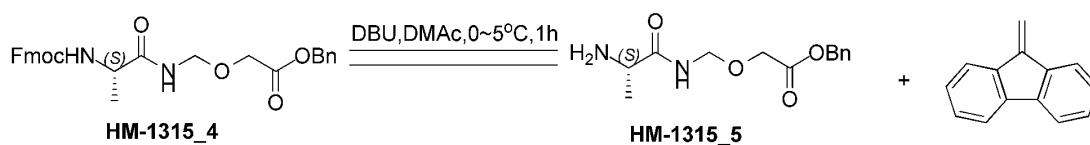


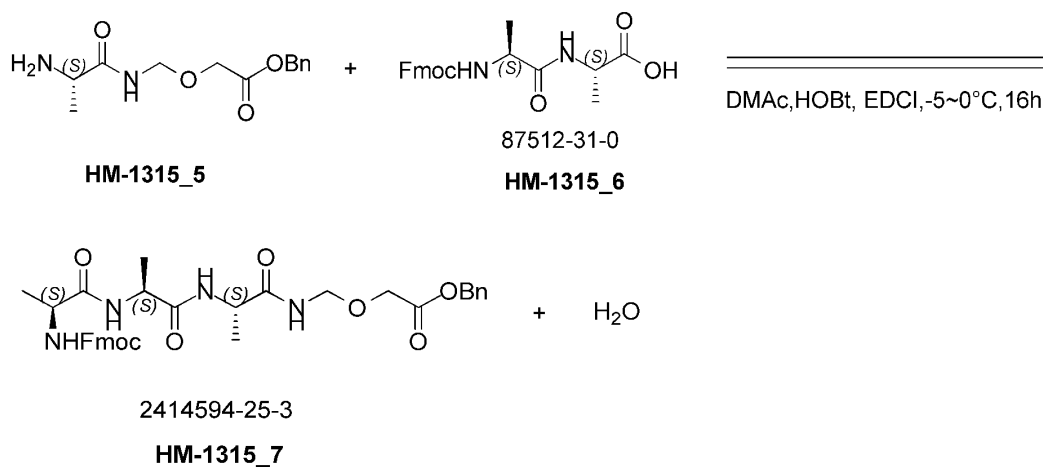
原料 HM-1315_2(326.0g, 0.85mol, 1.0eq) 溶解于 THF(3260.0 mL, 10v)中, 加入
 10 HM-1315_3(211.9g, 1.27mol, 1.5eq)。加完将反应降温至 0~10℃, 缓慢加入氢氧化锂
 (24.4g, 1.02mol, 1.2eq)的水溶液(163.0mL, 0.5v)。加完后自然升至室温(15~25℃)反应 1
 小时。向反应液中加入乙酸乙酯(1.5L)和水(1.5L), 分液, 水层再用乙酸乙酯(1.0L)萃
 取一次, 合并有机相, 用饱和食盐水(1.0L×2)洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩
 15 后所得粗品进行柱层析纯化, 石油醚/乙酸乙酯=1/1 洗脱出产品, 收集浓缩并用油泵抽
 干得到 311.8 g 白色固体产物, 74%产率。

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.74 (s, 1H), 7.89 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.72 (t, J=7.9 Hz, 2H), 7.59 (d, J=7.3 Hz, 1H), 7.47-7.25 (m, 9H), 5.13 (s, 2H), 4.64 (d, J=6.7 Hz, 2H), 4.31-4.18 (m, 3H), 4.15 (s, 2H), 4.07-3.95 (m, 1H), 1.23 (d, J=7.2 Hz, 3H). LCMS [M+23]:511.1。

20

步骤 5: 制备中间体 HM-1315 7

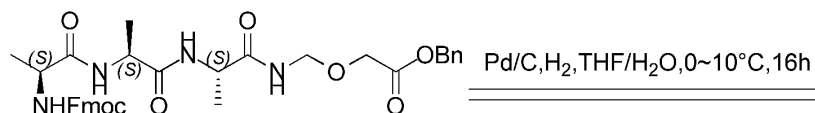




原料 HM-1315_4(60.00g, 122.82mmol, 1.0eq)溶解于 DMAc (N,N-二甲基乙酰胺) (600.0 mL, 10v)中, 降温至 0~5°C, 缓慢加入 DBU (1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯) (18.70g, 122.82mmol, 1.0eq), 加完后 0~5°C反应 1 小时。将反应液降温至-5~0°C, 依次向反应液中加入 PPTS (4-甲基苯磺酸吡啶) (30.86g, 122.82mmol, 1.0eq)、EDCI(23.54g, 122.82mmol, 1.0eq)、HOBT (1-羟基苯并三唑) (16.59g, 122.82mmol, 1.0eq)和 HM-1315_6 (42.27g, 110.54mmol, 0.9eq), 加完后-5~0°C反应 16 小时。向反应液中加入正己烷(1200mL, 20v)后静置分液, DMAc 层再用正己烷(1.2L×4)洗涤四次, 然后将其倒入水(1800mL, 30v)中, 有大量白色固体析出。用布氏漏斗过滤, 滤饼烘干后得白色固体粗品。向反应瓶中加入乙腈(300.0mL, 5v), 将上步所得白色粗品加入, 打浆 1 小时, 过滤, 滤饼油泵抽干得到 56.2g 白色固体产物, 80%产率。

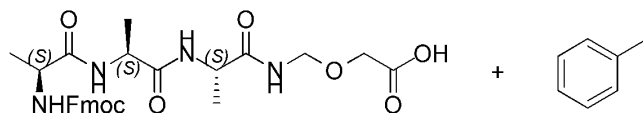
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.68 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 15.4, 7.2 Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.72 (t, J=7.0 Hz, 2H), 7.54 (d, J=7.4 Hz, 1H), 7.46-7.28 (m, 9H), 5.14 (s, 2H), 4.63 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 4.32-4.16 (m, 5H), 4.13 (s, 2H), 4.09-4.01 (m, 1H), 1.21 (dd, J = 7.0, 2.6 Hz, 9H). LCMS [M+23]:654.3.

步骤 6: 制备中间体 HM-1315 8

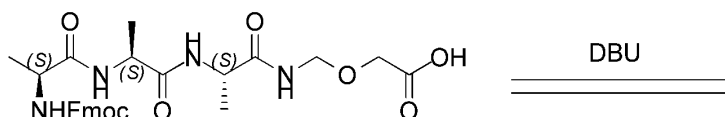


2414594-25-3

HM-1315_7

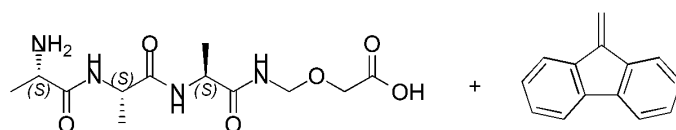


HM-1315_7_2



HM-1315_7_2

5



2414594-27-5

HM-1315_8

原料 HM-1315_7(2.59g, 4.10mmol, 1.0eq)悬浮于 THF (四氢呋喃) (51.8 mL, 20v) 和水(5.2 mL, 2v)中, 降温至 0~10°C, 加入 10%钯碳(0.39g, 0.15w/w), 氢气置换三次, 0~10°C反应 16 小时。过滤除去钯碳, 滤饼再用乙腈/水(10mL/10mL)淋洗, 向滤液中

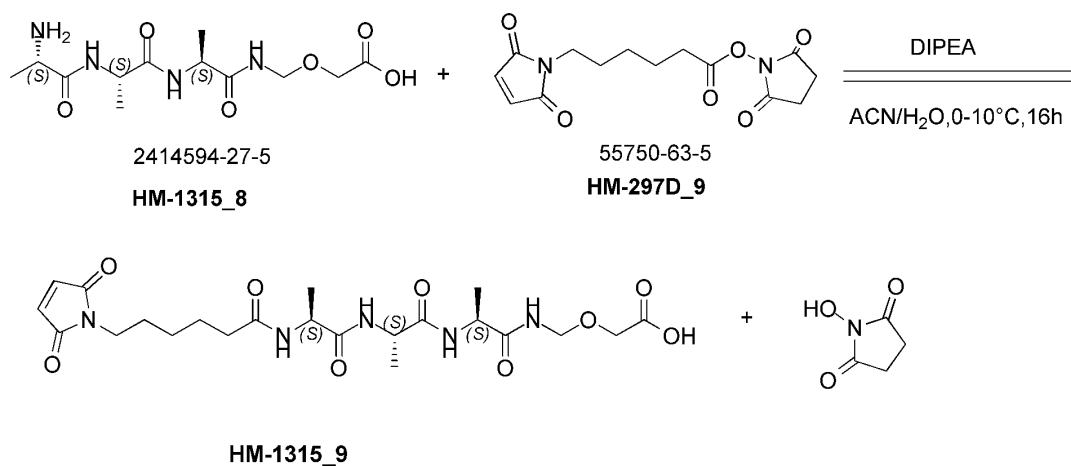
10 加入 2-甲基四氢呋喃(50mL)萃取, 有机相用水(50mL)和饱和食盐水(50mL)各洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得 2.0g 白色固体粗品。将该粗品(2.0g, 3.70mmol, 1.0eq)悬浮于二氯甲烷(20.0mL, 10v)中, 控温 20~25°C下缓慢滴加 DBU(0.56g, 3.70mmol, 1.0eq), 加完后反应液部分溶清, 20-25°C下反应 16 小时, 有白色固体析出。向反应液

15 中加入甲基叔丁基醚(40.0mL, 20v), 有更多的白色固体析出。过滤, 再将滤饼转移至单口瓶中加入乙腈(20.0mL), 打浆 2h, 过滤, 滤饼用油泵抽干得 0.5g 白色固体产品, 38%产率。

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.73 (q, $J=10.8$ Hz, 1H), 4.43- 4.21 (m, 1H), 4.04-3.82 (m, 1H), 1.47 (d, $J=7.0$ Hz, 2H), 1.42 (d, $J=7.2$ Hz, 3H). LCMS $[\text{M}+1]:319.1$ 。

步骤 7: 制备中间体 HM-1315 9

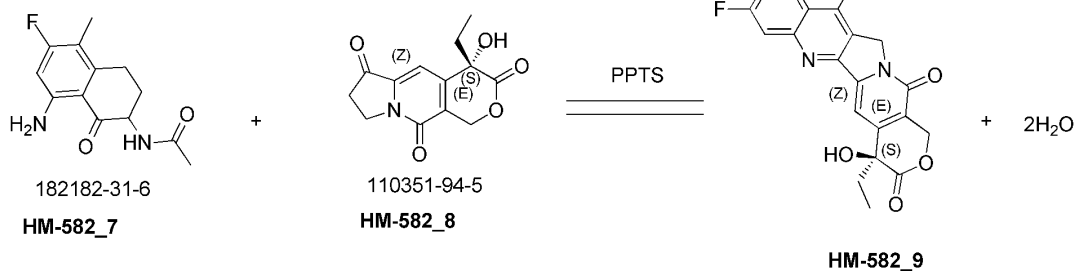
5



原料 HM-1315_8(300mg, 0.94mmol, 1.0eq) 溶解于乙腈(3.0mL, 10v)和水(4.5mL, 10 15v)中, 加入 HM-297D_9(290mg, 0.94mmol, 1.0eq), 冷却到 0~10°C, 加入 DIPEA(121mg, 0.94mmol, 1.0eq), 0~10°C反应 16 小时后制备分离得到产品 (290mg, 60% yield) 白色固体。

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.61 (t, $J=6.7$ Hz, 1H), 7.97 (dd, $J = 7.1, 3.4$ Hz, 2H), 7.91 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 4.66-4.52 (m, 2H), 4.29-4.12 (m, 3H), 3.95 (s, 2H), 15 3.44-3.35 (m, 5H), 2.08 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 1.54-1.40 (m, 4H), 1.28-1.10 (m, 11H). LCMS $[\text{M}+23]:534.3$ 。

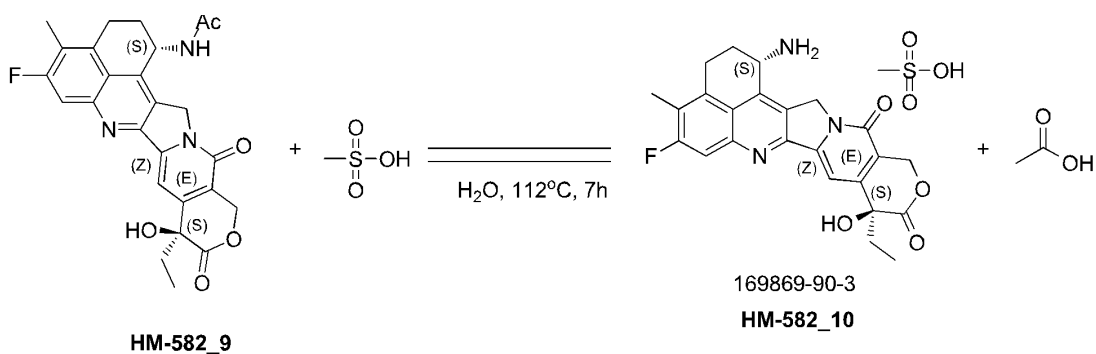
步骤 8: 制备中间体 HM-582 9



将化合物 HM-582_7(10 g, 39.98mmol, 1.0eq)、化合物 HM-582_8(10 g, 38.01mmol, 0.95eq)、对甲苯磺酸吡啶盐(6 g, 23.88mmol, 0.60eq)加入到三口瓶中,加入甲苯(500 mL), 130~140°C分水反应 48 小时,反应液冷却,过滤,甲基叔丁基醚(100mL)洗涤,收集固体,烘干得产物(18.4 g, 96.5%)。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO) δ :8.43-8.55 (m, 1H), 7.80 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 6.55 (brs, 1H), 5.52-5.57 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.16-5.20 (m, 2H), 3.14-3.18 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.11- 2.16 (m, 2H), 1.80- 1.92 (m, 5H), 0.86-0.89 (m, 3H).
LCMS $[M+1]$ 478.2.

步骤 9: 制备中间体 HM-582 10

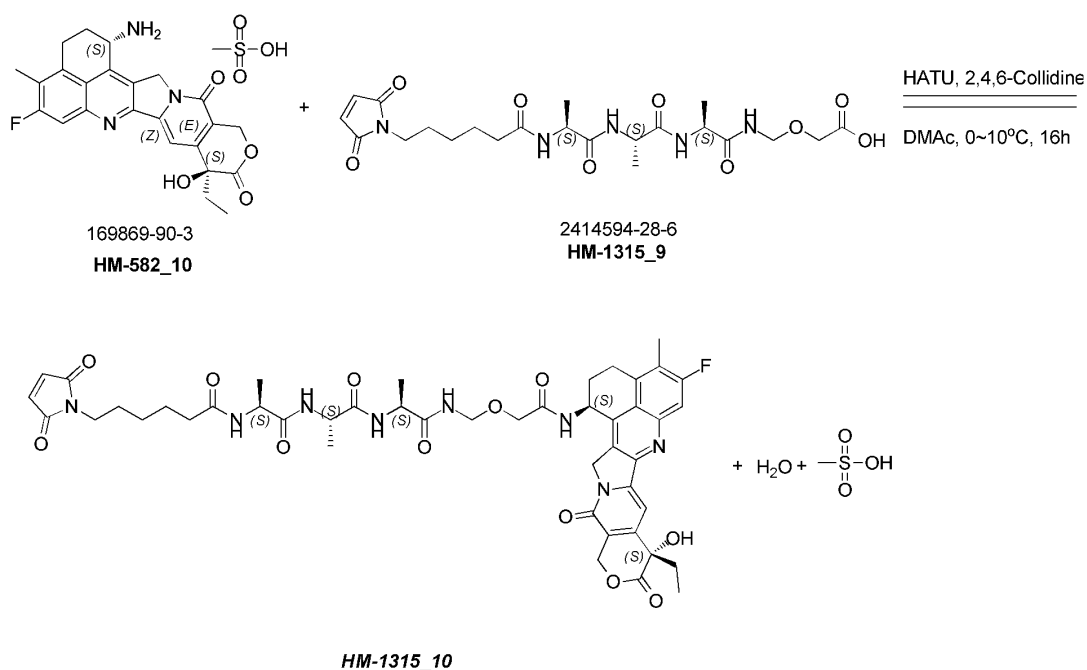


将化合物 HM-582_9(30 g)悬浮于水(600 mL)中,缓慢加入甲磺酸(300 mL),固体溶解并有放热现象,氮气置换后,加热到 112°C反应 7h,冷却到室温,过滤,滤饼用水(100 mL)洗涤。滤液用乙醇(4 L)稀释,固体析出,室温下搅拌 20min,过滤,抽干,将粗品悬浮于乙醇/水=4: 1(1 L)中,加热回流 2h,冷却到室温,过滤,固体用少量乙醇洗涤后抽干,冻干后得到伊喜替康甲磺酸盐(16.7 g, 50%)。

^1H NMR (DMSO) δ 8.41-8.50 (m, 3H), 7.86 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 5.66-5.74 (m, 1H), 5.37-5.44 (m, 2H), 5.10 (s, 1H), 3.27-3.32 (m, 1H), 3.08-3.17 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.17-2.24 (m, 1H), 1.80-1.95 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). LCMS $[\text{M}+1]$ 436.1.

5

步骤 10: 制备 HM-1315 10 (KA0012)



10

原料 HM-1315_9(150mg, 0.29mmol, 1.0eq) 溶解于 DMAc(3.0mL, 20v)中, 加入 HM-582_10(156mg, 0.29mmol, 1.0eq), 冷却到 0~10°C, 加入 HATU (2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯) (121mg, 0.32mmol, 1.0eq), 滴加 2,4,6-三甲基吡啶(70mg, 0.58mmol, 2.0eq), 0~10°C 反应 16 小时。LCMS 显示原料转化完全, 15 制备分离得到产品(135mg, 50%产率)浅黄色固体。

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J = 9.3, 7.3$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.61 (dt, $J = 10.1, 3.3$ Hz, 2H), 4.17 (dt, $J = 14.1, 7.1$ Hz, 3H), 3.98 (s, 2H), 3.38 (s, 1H), 3.16

(dd, J = 14.1, 6.4 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.18 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 2.07 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.85 (dd, J = 15.0, 7.4 Hz, 2H), 1.51 – 1.39 (m, 4H), 1.17 (dt, J = 14.5, 7.4 Hz, 11H), 0.86 (t, J = 7.3 Hz, 3H). LCMS [M+I]:929.3, [M+23]:952.3。

5 制备例 3：抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 制备
KA0013 和 KA0011 的结构如下面的表 1。

表 1

命名	结构
KA0013	Patritumab -Mc-AAA-Dxd
KA0011	Patritumab -Mc-GGFG-Dxd

10 抗体-药物偶联物,其是通过在存在于抗 HER3 抗体的铰链部的二硫键位点中形成硫醚键获得的,其中在还原条件下处理抗 HER3 抗体,然后与化合物(如式 II)反应生成抗体-药物偶联物。具体而言,化合物与具有巯基的抗体反应可制造抗体-药物偶联物。

具有巯基的抗体可利用本领域中公知的方法获得 (Hermanson ,G .T ,Bioconjugate Techniques ,第 56-136 页,第 456-493 页,Academic Press(1996))。实例包括:使 Traut’s 试剂与抗体的氨基反应;使 N-琥珀酰亚胺基 S-乙酰硫代链烷酸酯(N-succinimidyl S-acetylthioalkanoate)与抗体的氨基反应后,与羟基胺反应;在与 N-琥珀酰亚胺基 3-(吡啶基二硫代)丙酸酯反应后,使其与还原剂反应;使抗体与诸如二硫苏糖醇、2-巯基乙醇和三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)的还原剂反应以将抗体内铰链部的二硫键还原从而形成巯基,但其不限于此。

20 具体而言,相对于每 1 个抗体内铰链部二硫键,使用 0.3 至 10 摩尔当量 TCEP 作为还原剂,使其在含有螯合剂的缓冲液中与抗体反应,可得到部分或完全地将抗体内铰链部二硫键还原的抗体。螯合剂的实例包括乙二胺四乙酸(EDTA)和二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)。

25 其可以以 1mM 至 20mM 的浓度。可使用的缓冲液的实例包括磷酸钠、硼酸钠或乙酸钠溶液。具体而言,通过使抗体与 TCEP 在 4°C-37°C 反应 1 至 4 小时,可得到具有部分或完全还原的巯基的抗体。

同时,通过进行在药物-接头部分添加巯基的反应,可通过硫醚键偶联药物-接头部分。

相对于每 1 个具有巯基的抗体，使用 2 至 20 摩尔当量的化合物，可制造其中每 1 个抗体偶联 2 个至 8 个药物分子的抗体-药物偶联物。具体而言，足以在含有具有巯基的抗体的缓冲液中添加其中溶解有化合物的溶液以进行反应。此处，可使用的缓冲液的实例包括乙酸钠溶液、磷酸钠和硼酸钠。反应的 pH 为 5 至 9，更优选反应在 pH7
5 左右进行。用于溶解化合物(1)的溶剂的实例包括诸如二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)和 N-甲基-2-吡啶酮(NMP)的有机溶剂。

可以以 1 至 20% v/v 将溶解有化合物的有机溶剂溶液添加到含有具有巯基的抗体的缓冲液中进行反应。反应温度为 0 至 37°C、更优选为 10 至 25°C，反应时间为 0.5 至 2 小时。

10 偶联之后，可以对制造的抗体-药物偶联物进行缓冲液交换、抗体浓度及每一抗体分子的药物平均偶联数的测量，以鉴定抗体-药物偶联物。

共通操作 A：抗体浓度的测量

使用 UV 检测器(Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), 按照制造商规定的方法，进行抗体浓度的测量。此时，可以使用已知的计算方法(Protein Science,
15 1995, 第 4 卷, 2411-2423)由抗体的氨基酸序列推定 280nm 的吸光系数，而且使用了对于每个抗体而言不同的 280nm 的吸光系数(1.3mL mg-1cm-1 至 1.8mL mg-1cm-1)。在 KA0013 的情况下，根据其氨基酸序列使用 1.768mL mg-1cm-1 的 280nm 的吸光系数作为推定值。

共通操作 B：抗体-药物偶联物的缓冲液交换

20 使用超滤膜包 (Millipore P3C030C00, 30 kDa)，按照制造商规定的方法，对抗体-药物偶联物进行超滤浓缩换液，换液倍数为 10 倍。

共通操作 C：抗体-药物偶联物中的每一抗体分子的药物平均偶联数的测量

采用液质连用，对抗体-药物偶联物中的每一抗体分子的药物平均偶联数的测量：

样品用水稀释至 2mg/mL，取 50μL 稀释后的样品，加入 1μL 的 0.5 M TCEP，室
25 温反应 30 min，准备进样。其中色谱柱：MabPac RP (2.1×50 mm)； 流动相：流动相 A-0.1%甲酸水溶液；流动相 B-0.1%甲酸乙腈溶液；进样量：2μg；柱温：80°C；检测波长：280 nm。

液相梯度如下面的表 2。

表 2

Time (min)	Flow rate	%A	%B
------------	-----------	----	----

	(ml/min)		
0.00	0.30	90.0	10.0
3.00	0.30	90.0	10.0
7.00	0.30	10.0	90.0
8.00	0.30	10.0	90.0
8.10	0.30	90.0	10.0
10.00	0.30	90.0	10.0

依据各组分信号值计算 DAR 值。

$$DAR = 2 \times \left(\frac{1 \times LC_1}{LC_0 + LC_1} + \frac{1 \times HC_1 + 2 \times HC_2 + 3 \times HC_3}{HC_1 + HC_2 + HC_3} \right)$$

上式中，LCn 代表偶联 n 个连接子-有效载荷的轻链的信号值，HCn 代表偶联 n
5 个连接子-有效载荷的重链的信号值。

具体偶联示例如下。

抗体的还原：使用磷酸盐缓冲液 PB/EDTA（15mM Na₂HPO₄，5mM NaH₂PO₄，
5mM EDTA-2Na，pH7.0）将 Partritumab 稀释至约 10mg/mL。在室温下，将该抗体
10 溶液(100 mL)加入烧杯中，然后添加 10mM TCEP 水溶液(0.68 mL；相对于一抗体分
子为 10.0 当量)，并使用磁力搅拌器搅拌，于室温孵育 3 小时以还原抗体铰链部的二
硫键。

抗体与药物接头的偶联：向其中缓缓添加含 10mM KA0012 的 DMSO 溶液(0.748
mL；相对于一抗体分子为 11.0 当量)。室温搅拌 1 小时以偶联药物接头与抗体。

15 纯化：使用超滤膜包进行超滤浓缩换液，在将未偶联的药物接头及其他低分子
量试剂除去的同时，将缓冲液置换成制剂缓冲液，进而浓缩该溶液。对得到的纯化溶
液进行除菌过滤得到含有抗体-药物偶联物 KA0013 的溶液。

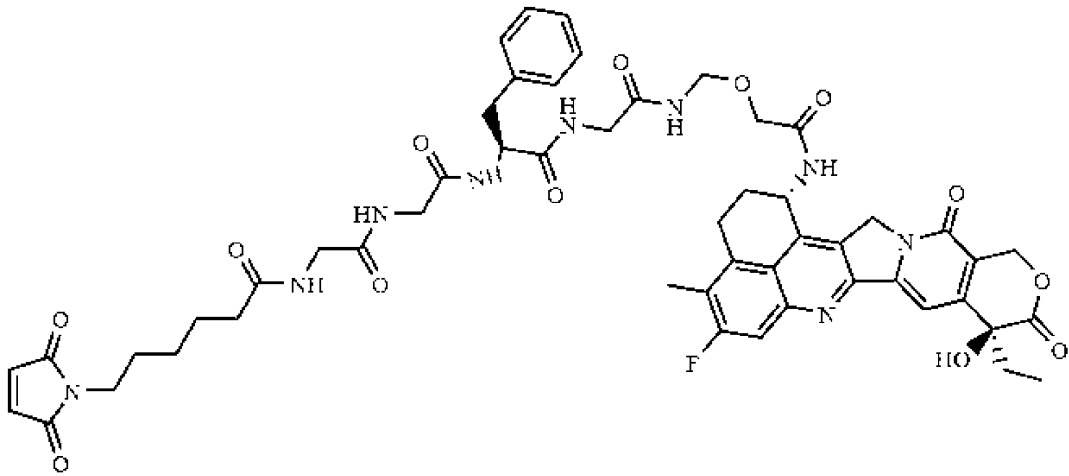
使用共通操作 A 测量抗体浓度：23.64 mg/mL，使用共通操作 C 测量 KA0013 中
每一抗体分子的药物平均偶联数(n)：7.87。

20

制备例 4：对照药物的制备

KA0010：Mc-GGFG-Dxd，作为对照的 linker-payload。

对照 KA0010 的结构式如下面的式 V 所示：



式 V

5 KA0011: Patritumab-Mc-GGFG-Dxd。

IgG-KA0010: IgG-Mc-GGFG-Dxd，简称为 IgG-Dxd。

IgG-KA0012: IgG-Mc-AAA-Dxd。

KA0010 和 KA0011 的制备方法参照中国专利文献 CN 106163559 B 中的相关描述。

10 IgG-KA0010 和 IgG-KA0012 均采用巯基偶联中通用的偶联方法制得，具体制备方法参照前面 KA0013 的制备方法，也可参照中国专利文献 CN 106163559 B 中的相关描述。

实施例 1: FACS 检测抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 与 SK-BR-3 细胞表面

15 HER3 的结合活性

1. 实验药物

KA0013,

HER3 靶点单克隆抗体 Patritumab（参照制备例 1 制得）。

KA0011。

20 2. 实验方法

常规收集 SK-BR-3 细胞（购自中国科学院上海生命科学研究院），用适量 PBS 洗涤一次，计数并测定细胞活率；按 3×10^5 个细胞/样本将细胞悬液加至 96 孔板， $1000 \times g$

离心 5 分钟，弃上清；分别加入 100 μ L 梯度稀释的实验药物（按抗体工作浓度计分别为 900 nM、300 nM、100 nM、33.3 nM、11.1 nM、3.7 nM、1.23 nM、0.41 nM、0.041 nM、0.0041 nM），重悬细胞团，放置冰上孵育 40 分钟；加入 1% PBSA（PBS+ 1%BSA），1000 $\times$ g 离心 5 分钟，弃上清，再重复洗涤两次；加入 100 μ L 经 300 倍稀释的荧光抗体 Mouse Anti-Human IgG Fc-Alexa Fluor 647（Southern Biotech，Cat. 9040-31），重悬细胞团，放置冰上避光孵育 30 分钟；加入 1% PBSA，1000 $\times$ g 离心 5 分钟，弃上清，再重复洗涤两次；加入 200 μ L 1% PBSA，重悬细胞团后上机检测。

3. 实验结果

结果如图 1 所示。

结果显示，在相同实验条件下，KA0013、KA0011、HER3 靶点单克隆抗体 Patritumab 与 SK-BR-3 细胞结合 EC₅₀ 分别为 15.36nM、12.89 nM 和 8.481 nM。

结果表明，在相同实验条件下，KA0013、KA0011 和 Patritumab 均具有有效结合表达 HER3 的 SK-BR-3 细胞的活性。

15 实施例 2：FACS 检测抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 对 MDA-MB-453 细胞内化活性

1. 实验药物

KA0013，

IgG-Dxd，

KA0012，

KA0011。

2. 实验方法

收集 MDA-MB-453 细胞（购自南京科佰生物科技有限公司，货号：CBP60386），计数并测定细胞活率；按 1 $\times$ 10⁵ 个细胞/样本将细胞悬液加至 96 孔低吸附板，750 $\times$ g 离心 5 分钟，弃上清；分别加入 100 μ L 实验药物（工作浓度为 100nM），其中同时设计同型对照（IgG-Dxd，工作浓度为 100nM），混匀，在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 1h、3h、5h。孵育结束后，加入 1% PBSA（PBS+ 1%BSA），750 $\times$ g 离心 5 分钟，弃上清，再用 1% PBSA 洗涤 2 次；加入 100 μ L patritumab（工作浓度为 100 nM），冰上孵育 30 分钟；加入 1% PBSA（PBS+ 1%BSA），750 $\times$ g 离心 5 分钟，弃上清，再用 1% PBSA 洗涤 2 次；加入 100 μ L 经 300 倍稀释的荧光抗体 Mouse Anti-Human IgG Fc-Alexa

Fluor 647 (Southern Biotech, Cat. 9040-31), 重悬细胞团, 放置冰上避光孵育 30 分钟; 加入 1% PBSA (PBS+ 1%BSA), 1000×g 离心 5 分钟, 弃上清, 再重复洗涤 2 次; 加入 200 μL 1% PBSA, 重悬细胞团后上机检测。

3. 实验结果

5 结果如图 2 所示。

结果显示, 在相同实验条件下, 与同型对照 IgG-Dxd (即 IgG-Mc-GGFG-Dxd, 中山康方生物有限公司生产) 相比, KA0013 和 KA0011 在 MDA-MB-453 可被内吞, 两者的内吞活性与 IgG-Dxd 相比具有显著性差异。

10 实施例 3: 抗 HER3 抗体-药物偶联物的连接子-有效载荷部分非特异性杀伤活性测定

1. 实验药物

IgG-KA0010,
IgG-KA0012。

15 2. 实验方法

分别对抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 的连接子-有效载荷部分 Mc-AAA-Dxd (命名为 KA0012) 以及对照 KA0011 的连接子-有效载荷部分 Mc-GGFG-Dxd (命名为 KA0010) 进行非特异性杀伤活性检测。

20 采集人静脉血后将肝素钠抗凝管上下轻柔混匀颠倒, 室温下 3500 rpm 离心 10 分钟, 取血浆层用于实验。常规收集 MDA-MB-453 细胞, 计数及测定细胞活率, 调整细胞密度至 2.5×10^4 个/ mL, 按 100 μL/孔将细胞悬液加至 96 孔黑底板, 置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱中孵育过夜; 用 DMEM 培养基 (5% human plasma) 稀释抗体, 加入 100 μL 梯度稀释的实验药物 (按抗体工作浓度计为 100 nM、50 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM、0.05 nM、0.01 nM), 并设计空白对照组, 每组设计 3 个复
25 孔; 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 6 天。孵育结束后取出 96 孔板, 350×g 离心 5 分钟后, 吸弃 135 μL 上清, 加入 65 μL CellTiter-Glo (promega, Cat.: G8461), 室温孵育 20 分钟后于多标记微孔板检测仪检测荧光值。

3. 实验结果

结果如图 3 所示。

30 结果显示, 在相同实验条件下, 与同型对照 (IgG-KA0010, 中山康方生物有限公

司生产)比较, IgG-KA0012 非特异性杀伤更弱, 表明 Mc-AAA-Dxd 比 Mc-GGFG-Dxd 更稳定。

实施例 4: 抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 血浆稳定性检测

- 5
1. 实验药物
- KA0013,
- KA0011。

2. 实验方法

10

采集人静脉血后将肝素钠抗凝管上下轻柔混匀颠倒, 室温下 3500 rpm 离心 10 分钟, 上清即为血浆。用人血浆稀释 实验药物 (工作浓度为 100 µg/mL), 放置 37°C, 5%CO₂ 培养箱中孵育 0h、24h、48h、72h、96h、139h, 孵育结束后, 取出 150 µL 样品液氮速冻, 待收集全部样品后通过质谱检测血浆中游离 Dxd 变化。

质谱样品准备: 取上述样品适量, 与乙腈 1:1 混合沉淀蛋白, 12000rpm 离心 3min, 取上清液 10µL 进行质谱检测。其中色谱柱: MabPac RP 2.1×50mm 4µm; 流动相 A: 0.1%甲酸水; 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈; 柱温: 30°C;

15

梯度如下面的表 3。

表 3

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	95	5
1	0.4	95	5
5	0.4	10	90
6	0.4	10	90
6.5	0.4	95	5
7	0.4	10	90
8	0.4	10	90
8.1	0.4	95	5
10	0.4	95	5

3. 实验结果

结果如图 4 所示。

结果显示,在相同实验条件下,KA0013 组血浆中游离的 Dxd 量低于 KA0011 组,表明 KA0013 在血浆中的稳定性要优于 KA0011。

5 实施例 5：体外检测组织蛋白酶 B 切割不同连接子-有效载荷效率

1. 实验样品:

KA0010,

KA0012.

2. 实验方法

10 将 PBS(20 倍溶液) (生工, Cat.: B548117) 20 倍稀释, 获得 PBS 工作溶液, 用
PBS 工作溶液稀释组织蛋白酶 B (CTSB) (Sinobio, Cat.: 10483-H08H) 和连接子-
有效载荷; 取 150 μ L CTSB (工作浓度为 3 nM) 与等体积连接子-有效载荷 (工作浓
度为 10 μ M) 混匀, 置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱中孵育 0 小时、0.5 小时、1 小时、2
小时、4 小时; 孵育结束后加入 Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (30X)
15 (Thermofisher, Cat.: 87785) 终止反应。

将酶解后的样品直接上样进行质谱检测。其中色谱柱：**MabPac RP 2.1×50mm 4μm**；流动相 **A：0.1%甲酸水**；流动相 **B：0.1%甲酸乙腈**；上样量：**10 μM** 样品进样 **1μL**；柱温：**30℃**；

梯度如下面的表 4。

表 4

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	95	5
1	0.4	95	5
5	0.4	10	90
6	0.4	10	90
6.5	0.4	95	5
7	0.4	10	90
8	0.4	10	90
8.1	0.4	95	5

10	0.4	95	5
----	-----	----	---

3. 实验结果

结果如图 5 所示。

结果显示，在相同实验条件下，KA0012（Mc-AAA-Dxd）与 KA0010（Mc-GGFG-Dxd）均可有效被 CSTB 切割，均能有效地释放有效载荷，两者效率相同。

实施例 6: ELISA 方法检测抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 与抗原的结合活性

酶标板中包被人 HER3-his 并进行孵育，封闭后分别加入待测抗体，经孵育洗板后，加入山羊抗人 IgG Fc，HRP（购自 Jackson ImmunoResearch Inc.，货号：109-035-098），孵育洗板后用 TMB（Neogen，308177）进行显色反应，显色终止后在酶标仪中检测 450nm 波长吸光度。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。结果如图 6 和表 5 所示。

表 5: KA0013 和 KA0011 与抗原人 HER3-his 的结合活性

Coating: huHER3-his (0.5µg/ml, 50µl/well)						
抗体稀释 (nM)	KA0013		KA0011		Patritumab	
1.000	2.848	2.861	2.804	2.819	2.869	2.844
0.333	2.883	2.900	2.814	2.829	2.891	2.856
0.111	2.820	2.841	2.756	2.748	2.831	2.795
0.037	2.538	2.587	2.390	2.438	2.569	2.570
0.012	1.702	1.755	1.508	1.531	1.780	1.775
0.004	0.819	0.847	0.718	0.700	0.870	0.872
0.001	0.362	0.370	0.306	0.315	0.382	0.394
0	0.082	0.092	0.075	0.078	0.091	0.087
Secondary antibody: Goat Anti Human IgG Fc, HRP(1: 5000)						
EC ₅₀ (nM)	0.009		0.011		0.009	

结果显示，抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013、KA0011 以及 Patritumab 均能有

效地结合抗原人 HER3-his，其结合效率呈剂量依赖关系。

实施例 7：抗 HER3 抗体-药物偶联物动力学参数测定

1. 实验样品

5 KA0013
KA0011

2. 实验方法

实验样品的稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。1 μg/ml 的 huHER3-his-Biotin 固定在 SA 传感器上，固定高度为 1nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，
10 固定在传感器上的 huHER3-his-Biotin 与各抗体结合，抗体浓度为 0.2469-20 nM (三倍稀释)，时间 120s，抗体在缓冲液中解离，时间 300s。样品板震动速率为 1000rpm，检测温度为 30℃，频率为 5.0Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。数据采集软件为 Fortebio Data Acquisition 12.0，数据分析软件为 Fortebio Data Analysis 12.0。

3. 实验结果

15 结果如表 6 以及图 7 至图 8 所示。

表 6：抗 HER3 抗体-药物偶联物与人 HER3-his-biotin 结合的动力学参数

样品	KD (M)	kon(1/Ms)	S E (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax(nm)
KA0013	8.08E-11	1.49E+06	4.63E+03	1.21E-04	2.77E-06	0.116-0.243
KA0011	5.52E-11	1.40E+06	6.33E+03	7.70E-05	3.99E-06	0.128-0.197

KD 为亲和力常数；kon 为抗原抗体结合速率；kdis 为抗原抗体解离速率；
KD=kdis/kon。

结果显示，抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 和 KA0011 与抗原 人
20 HER3-his-biotin 均具有较好的亲和力。

实施例 8：抗 HER3 抗体-药物偶联物的特异性细胞杀伤活性测定

1. 实验药物

KA0013
25 KA0011
IgG-KA0012

2. 实验方法

收集 NCI-H1781 细胞（南京科佰生物科技有限公司，货号：CBP60116），1000 x g 离心 5min 后去上清，重悬，计数及活率，稀释细胞，于黑底 96 孔板每个孔中加入 NCI-H1781(2500 个/100μL)。置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中过夜；用培养基(10%人 ab 血清)稀释实验药物，按实验设计每孔对应加入 100μL 实验药物，并设计空白对照，每组 3 个复孔。置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中孵育 6 天；孵育后将 96 孔板 350x g 离心 5min 后，弃去 135μL 上清；每孔加入 60μL CellTiter-Glo（promega，Cat.: G8461），室温孵育 15 分钟后多标记微孔板检测仪检测荧光值。

3.实验结果

结果如图 9 所示。结果显示，抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 以及 KA0011 均能特异性杀伤 NCI-H1781 细胞。

实施例 9：抗 HER3 抗体-药物偶联物 ADCC 活性研究

收集处于生长对数期的 MDA-MB-453 细胞（购自南京科佰生物科技有限公司，货号：CBP60386）和 PBMC（由中山血站提供），170×g 离心 5 min，弃上清。用分析培养基（含 1% FBS 的 RPMI-1640）重悬细胞沉淀，离心洗涤两次，计细胞数。用分析培养基调整细胞密度，按 50μL/孔将靶细胞悬液接种至 96 孔板中（每孔约含 3×10⁴ 个靶细胞）。再加入梯度稀释的药物（按抗体工作浓度计分别为 5μg/mL、15μg/mL、45μg/mL），室温下预孵育 1 小时。预孵育完毕后，按 100μL/孔将 PBMC 悬液加至样本孔中（每孔约含 9×10⁵ 个 PBMC，效靶比为 30：1），充分混匀，于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 4 小时。孵育结束后，取出 96 孔板，250×g 离心 5 min，小心吸取 100μL 细胞上清并转移至新的 96 孔板中。根据 Cytotoxicity Detection Kit（Roche，货号：11644793001）说明书每孔加入 100 μL 现配的反应液，室温避光孵育 30 min。分别于 490 nm 和 650 nm 处测量 OD 值，各组 OD 值=OD_{490 nm}—OD_{650 nm}。根据测得的各组 OD 值计算 ADCC 活性（以 ADCC%表示）。

$$ADCC\% = (\text{实验组 OD} - \text{靶细胞自发组 OD 均值}) / (\text{阳性对照 OD 均值} - \text{靶细胞自发组 OD 均值}) \times 100\%$$

结果如图 10 所示。结果显示，在 MDA-MB-453 靶细胞体系中，KA0011 对 MDA-MB-453 细胞无 ADCC 活性，而 KA0013 对 MDA-MB-453 细胞有 ADCC 活性。

实施例 10：抗 HER3 抗体-药物偶联物体内药效检测

为检测抗 HER3 抗体-药物偶联物体内抑瘤活性，首先用 HCC827 人肺癌细胞（购自广州吉尼欧生物科技有限公司），接种于 5-8 周龄的雌性 CB-17 SCID 小鼠（购自广东南模生物科技有限公司）小鼠右侧背部大腿上方皮下。分组当天定义为 D0 天。

5 给药方式为静脉注射（iv），每周给药 1 次，共给药 3 次。造模与具体给药方式见表 7。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

表 7：抗 HER3 抗体-药物偶联物治疗 CB-17 SCID 小鼠 HCC827 人肺癌细胞移植瘤模型的给药方案

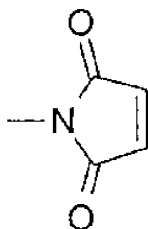
组别	动物数量	模型建立	给药方式
hIgG1 (1.5mg/kg)组	6	HCC827 细胞 600 万 /200μL/ 只 ， 在 CB-17 SCID 小鼠右侧背部大腿上方皮下接种	hIgG1 (1.5mg/kg)， IV， weekly×3
IgG-KA0012(1.5mg/kg)组	6		IgG-KA0012， 1.5mg/kg， IV， weekly×3
Patritumab(3mg/kg)组	6		Patritumab， 3mg/kg， IV， weekly×3
KA0013(3mg/kg)组	6		KA0013， 3mg/kg， IV， weekly×3
KA0013(1.5mg/kg)组	6		KA0013， 1.5mg/kg， IV， weekly×3

10 结果如图 11 所示。结果显示，相比同型对照抗体，抗 HER3 抗体-药物偶联物 KA0013 能够有效地抑制小鼠肿瘤的生长。此外，如图 12 所示，荷瘤鼠对受试药 KA0013 的耐受性均良好，各组对荷瘤小鼠体重无影响。

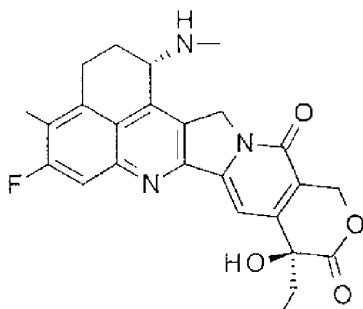
15 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 化合物或其可药用盐，其中，所述化合物包括依次连接的：式 III 化合物、 n 个丙氨酸、和式 IV 化合物，



式 III,



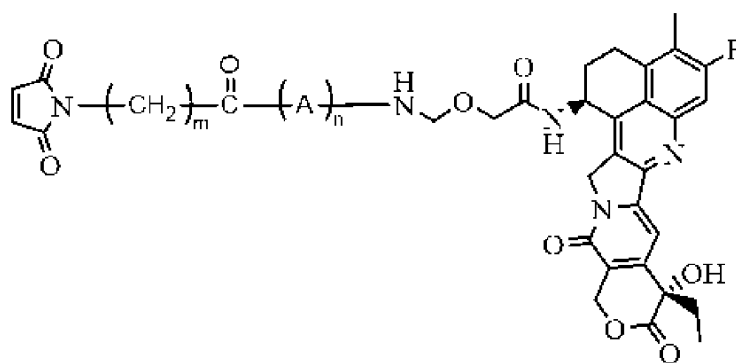
式 IV,

其中，

n 为 2、3、4、5 或 6；

式 III 化合物、 n 个丙氨酸和式 IV 化合物两两之间独立地为直接连接或者通过化学基团连接。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物或其可药用盐，其结构式如下面的式 I 所示，



式 I

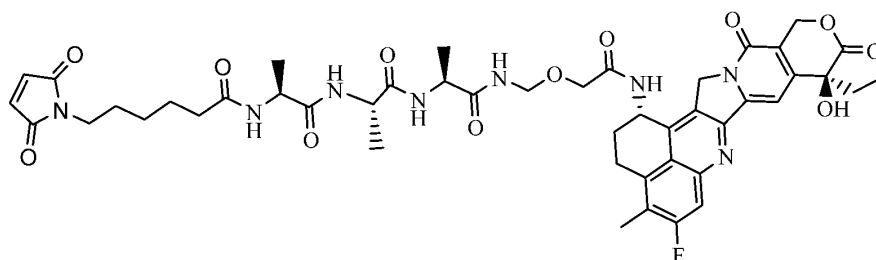
其中，

A 表示丙氨酸；

m 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12；

n 为 2、3、4、5 或 6。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任一权利要求所述的化合物或可药用盐，其中，所述化合物如下面的式 II 所示，



式 II

4. 一种抗体偶联药物，其包含抗体或其抗原结合片段、连接子和有效荷载，其中，连接子和有效荷载为权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的化合物或其可药用盐；

优选地，连接子与抗体或其抗原结合片段通过一个或多个硫醚键连接；

优选地，连接子与抗体铰链部的二硫键位置的硫原子形成硫醚键。

5. 根据权利要求 4 所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体为 IgG 抗体，优选为

IgG1 抗体。

6. 根据权利要求 4 至 5 中任一权利要求所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体为抗 HER3 抗体。

7. 根据权利要求 4 至 6 中任一权利要求所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体包含重链可变区和轻链可变区，

其中，

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 2 所示的 HCDR2、和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR3；

所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2、和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR3。

8. 根据权利要求 7 所述的抗体偶联药物，其中，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，和所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

9. 根据权利要求 4 至 8 中任一权利要求所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体的重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region 或 Ig gamma-4 chain C region；轻链恒定区为 Ig kappa chain C region。

10. 根据权利要求 4 至 9 中任一权利要求所述的抗体偶联药物，其中，所述抗体的重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；和轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

11. 根据权利要求 4 至 10 中任一权利要求所述的抗体偶联药物，其中，偶联于每个抗体分子上的连接子-有效载荷的平均数为 1-8。

12. 根据权利要求 4 至 11 中任一权利要求所述的抗体偶联药物，其具有 ADCC 活性。

13. 根据权利要求4至12中任一权利要求所述的抗体偶联药物，其中，

所述抗体偶联药物与其靶向的抗原结合的 EC_{50} ，与所述抗体偶联药物中包含的抗体或其抗原结合片段与同一抗原结合的 EC_{50} 相同或基本相同。

14. 一种药物组合物，其包含权利要求4至13中任一权利要求所述的抗体偶联药物，以及一种或多种药学上可接受的辅料。

15. 权利要求4至13中任一权利要求所述的抗体偶联药物在制备治疗或预防肿瘤的的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤为HER3阳性的肿瘤；

优选地，所述肿瘤选自肺癌、透明细胞肉瘤、皮肤癌、肾癌、尿路上皮癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、头颈癌、食道癌、表皮样癌、腹膜癌、成体多形性成胶质细胞瘤、结肠癌、直肠癌、子宫癌、唾液腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肛门癌和阴茎癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述结肠癌为转移性结肠癌。

16. 根据权利要求4至13中任一权利要求所述的抗体偶联药物，其用于治疗或预防肿瘤；

优选地，所述肿瘤为HER3阳性的肿瘤；

优选地，所述肿瘤选自肺癌、透明细胞肉瘤、皮肤癌、肾癌、尿路上皮癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、头颈癌、食道癌、表皮样癌、腹膜癌、成体多形性成胶质细胞瘤、结肠癌、直肠癌、子宫癌、唾液腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肛门癌和阴茎癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述结肠癌为转移性结肠癌。

17. 一种治疗或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求4

至13中任一权利要求所述的抗体偶联药物的步骤；

优选地，所述肿瘤为HER3阳性的肿瘤；

优选地，所述肿瘤选自肺癌、透明细胞肉瘤、皮肤癌、肾癌、尿路上皮癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、头颈癌、食道癌、表皮样癌、腹膜癌、成体多形性成胶质细胞瘤、结肠癌、直肠癌、子宫癌、唾液腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肛门癌和阴茎癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述结肠癌为转移性结肠癌。