

抗 HER3 抗体和抗 HER3 抗体药物偶联物及其医药用途

技术领域

本披露涉及抗 HER3 抗体、抗 HER3 抗体-依喜替康类似物偶联物，其制备方法，包含其的药物组合物，以及其用于制备治疗 HER3 介导的疾病或病症的药物中的用途；尤其在用于制备抗癌药物中的用途。

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

HER3 (epidermal growth factor receptor3, ErbB-3 或 HER3) 是表皮生长因子受体 (EGFR) 家族成员之一。该家族包括 HER1 (erbB1, EGFR)、HER2 (erbB2, NEU)、HER3 (erbB3) 及 HER4 (erbB4)。这些受体均包含细胞外区、跨膜区和胞内区 3 个部分，其中细胞外区包含 4 个结构域，胞内区包含 1 个用来信号传导的细胞内酪氨酸激酶结构域和 1 个位于胞浆内的带有酪氨酸磷酸化残基的尾部。当配体与细胞外结构域 I 和 III 结合时，细胞信号传导启动。在正常情况下，这些受体介导细胞分裂、迁移、存活和器官发育。EGFR 家族成员发生突变时，其产生的异常信号传导刺激细胞存活，与癌症进展相关。HER3 受体被激活并产生生理作用的基本原理与其他家族成员相似，区别在于其配体包括神经调节蛋白 1 (NRG-1) 和神经调节蛋白 2 (NRG-2)，并且活化后 HER3 不能形成同源聚体，只能与 EGFR 或 HER2 形成异源二聚体。HER3 在形成异源二聚体过程中，其胞内结构域部分表现较高的酪氨酸磷酸化酶活性，通过结构解析发现 HER3 胞内结构域有 6 个 P85 (PI-3K 亚基) 结合位点，该特定结构决定 HER3 与 P85 调节亚基相互作用时，能够募集多达 6 个 PI-3K 至调节亚基位点，从而强烈激活 PI-3K 信号通路。事实上，HER3 / HER2 二聚体是 HER 二聚体中活性最强的。EGFR 广泛分布于哺乳动物上皮细胞、成纤维细胞、胶质细胞、角质细胞等细胞表面。EGFR 信号通路对细胞的生长、增殖和分化等生理过程发挥重要的作用。

HER3 高表达于各种常见恶性肿瘤，例如乳腺癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈部鳞状细胞癌和黑色素瘤等。与 EGFR 基因突变导致其高水平表达或过度活化不同的是，HER3 基因突变率低，其高表达原因主要是 mRNA 转录增加，从而蛋白质翻译增多，并且常常与 HER2 共同高表达 HER3 的高表达与多种肿瘤的发生、进展及受试者的生存期都有密切联系，因此以 HER3 为靶点的抗肿瘤药物研究具有重要意义。

发明内容

本披露涉及抗 HER3 抗体, 抗 HER3 抗体-依喜替康类似物偶联物以及其用途。

本披露提供了一种分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体具有以下特征中的一种或多种:

5 a. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.5 nM 的表观亲和力 EC_{50} 与 HER3 蛋白结合, 所述的表观亲和力 EC_{50} 是通过 ELISA 方法测定的;

 b. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.2 nM 的表观亲和力 EC_{50} 与 MCF7 细胞表达的 HER3 蛋白结合, 所述的表观亲和力 EC_{50} 是通过 FACS 方法测定的;

 c. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞。

10 本披露提供了一种分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体具有以下特征中的一种或多种:

 a. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.5 nM 的表观亲和力 EC_{50} 与 HER3 蛋白结合, 所述的表观亲和力 EC_{50} 是通过 ELISA 方法测定的;

15 b. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.2 nM 的表观亲和力 EC_{50} 与 MCF7 细胞表达的 HER3 蛋白结合, 所述的表观亲和力 EC_{50} 是通过 FACS 方法测定的;

 c. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞, 当采用测试例 3 的方法测定所述的抗 HER3 抗体时, 其 IC_{50} 小于 2 nM;

 d. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞, 当采用测试例 4 的方法测定所述的抗 HER3 抗体时, 其 FITC 信号大于 300。

20 在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 HER3 抗体包含 (1) SEQ ID NO: 7 所示的重链可变区中所包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 和 (2) SEQ ID NO: 8 所示的轻链可变区中所包含的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3。

 在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

25 a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

 其中所述的 CDR 区按 Chothia 编号规则确定。

30 在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

 b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

 其中所述的 CDR 区按 IMGT 编号规则确定。

35 在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

其中所述的 CDR 区按 Kabat 编号规则确定。本披露提供了一种分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

其中所述的 CDR 区按 Chothia 编号规则确定。

本披露提供了一种分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

其中所述的 CDR 区按 IMGT 编号规则确定。

本披露提供了一种分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

其中所述的 CDR 区按 Kabat 编号规则确定。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 HER3 抗体是人抗体或抗原结合片段。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

所述重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的序列同一性, 和/或所述轻链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的序列同一性;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 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: 8 所示; 或

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 HER3 抗体进一步包含抗体重链恒定区和轻链恒定区; 优选地, 所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体, 所述轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区及其常

规变体；更优选地，所述抗体包含如 SEQ ID NO: 5 所示的重链恒定区和如 SEQ ID NO: 6 所示的轻链恒定区。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 HER3 抗体包含：

与 SEQ ID NO: 27 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、
5 97%、98%、99%或 100%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 28 具有至少
85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序
列同一性的轻链；

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 HER3 抗体包含：

如 SEQ ID NO: 27 所示的重链和如 SEQ ID NO: 28 所示的轻链。

10 在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 HER3 抗体具有以下特征中的一
种或多种：

a. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.5 nM 的表观亲和力 EC₅₀ 与 HER3 蛋白结
合，所述的表观亲和力 EC₅₀ 是通过 ELISA 方法测定的；

b. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.2 nM 的表观亲和力 EC₅₀ 与 MCF7 细胞表
15 达的 HER3 蛋白结合，所述的表观亲和力 EC₅₀ 是通过 FACS 方法测定的；

c. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 HER3 抗体具有以下特征中的一
种或多种：

a. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.5 nM 的表观亲和力 EC₅₀ 与 HER3 蛋白结
20 合，所述的表观亲和力 EC₅₀ 是通过 ELISA 方法测定的；

b. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.2 nM 的表观亲和力 EC₅₀ 与 MCF7 细胞表
达的 HER3 蛋白结合，所述的表观亲和力 EC₅₀ 是通过 FACS 方法测定的；

c. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞，当采用测试例 3 的
方法测定所述的抗 HER3 抗体时，其 IC₅₀ 小于 2 nM；

25 d. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞，当采用测试例 4 的
方法测定所述的抗 HER3 抗体时，其 FITC 信号大于 300。

在一些实施方案中，本披露还提供一种分离的抗 HER3 抗体，其中所述抗体
与如前一项所述的抗 HER3 抗体竞争性结合人 HER3。

30 在一些实施方案中，本披露还提供一种核酸分子，其编码如前一项所述的
抗 HER3 抗体。

在一些实施方案中，本披露还提供一种宿主细胞，其包含如前一项所述的
核酸分子。

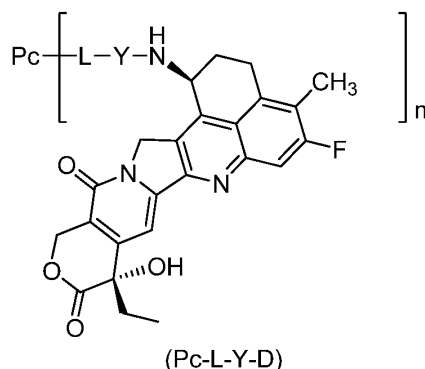
35 在一些实施方案中，本披露还提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的如
前一项所述的抗 HER3 抗体，或如前所述的核酸分子，以及一种或更多种药
学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在一些实施方案中，本披露还提供一种免疫偶联物，其包含如前一项所述

的抗 HER3 抗体和效应分子, 其中, 所述效应分子偶联至所述抗 HER3 抗体; 优选地, 所述效应分子选自放射性同位素、抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子, 以及其任何组合。

- 5 在一些实施方案中, 本披露还提供一种用于免疫检测或测定 HER3 的体内或体外方法, 所述方法包括如前一项所述的抗 HER3 抗体接触受试者或来自受试者的样品的步骤。

在一些实施方案中, 本披露还提供一种通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



10

其中:

Y 选自 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 、 $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ 、 $-O-CR^1R^2-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 和 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

- 15 R^a 和 R^b 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基和杂环基; 或者, R^a 和 R^b 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基;

- R^1 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基; R^2 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基; 或者, R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基;
- 20

或者, R^a 和 R^2 与其相连的碳原子一起形成环烷基或杂环基;

m 为 0 至 4 的整数;

n 为 1 至 10, n 是小数或整数;

L 为接头单元;

- 25 Pc 为如前一项所述的抗 HER3 抗体。

在一些实施方案中, 如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中 n 为 1 至 8, n 是小数或整数。在一些实施方案中, n 为 3 至 8, n 是小数或整数。

在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，

其中：

Y 为 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ；

5 R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素和 C_{1-6} 烷基；

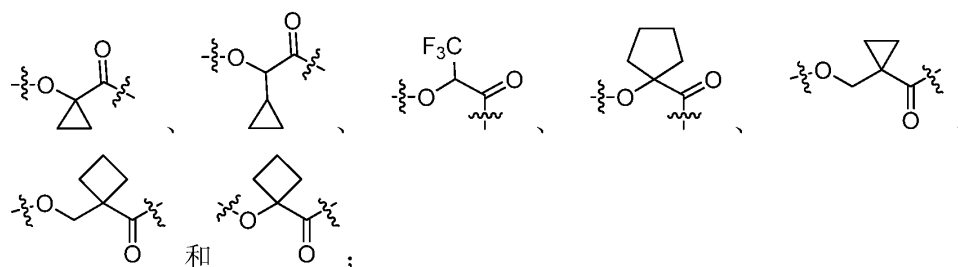
R^1 为卤代 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基；

R^2 选自氢原子、卤代 C_{1-6} 烷基和 C_{3-6} 环烷基；

或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基；

m 为 0 或 1。

10 在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 Y 选自：



其中 Y 的 O 端与接头单元 L 相连。

15 在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中接头单元-L-为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ，

L^1 选自 $-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-W-C(O)-$ 、 $-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$ 和 $-C(O)-W-C(O)-$ ，其中 W 选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷基- C_{3-6} 环烷基和 1 至 8 个链原子的直链杂烷基，所述 1 至 8 个链原子的直链杂烷基包含 1 至 3 个选自 N、O 和 S 的杂原子，其中所述的 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷基- C_{3-6} 环烷基和 1 至 8 个链原子的直链杂烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-6} 环烷基中的一个或多个取代基所取代；

25 L^2 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)p^1C(O)-$ 和化学键，其中 p^1 为 1 至 20 的整数；

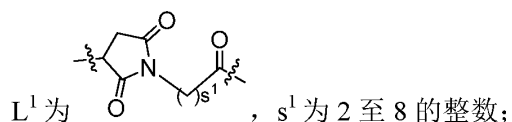
L^3 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸 (F)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、赖氨酸 (K)、瓜氨酸、丝氨酸 (S)、谷氨酸 (Q) 和天冬氨酸 (D) 中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

30 L^4 选自 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ 、 $-C(O)NR^5-$ 、 $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$ 和化学键，其中 t 为 1 至 6 的整数；

R^3 、 R^4 和 R^5 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基；

R^6 和 R^7 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基。

- 5 在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中接头单元-L-为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ，



L^2 为化学键；

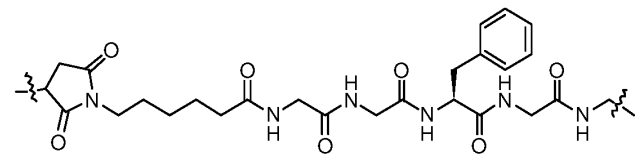
L^3 为四肽残基；

- 10 L^4 为 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ ， R^5 、 R^6 或 R^7 相同或不同，且各自独立地为氢原子或 C_{1-6} 烷基， t 为 1 或 2；

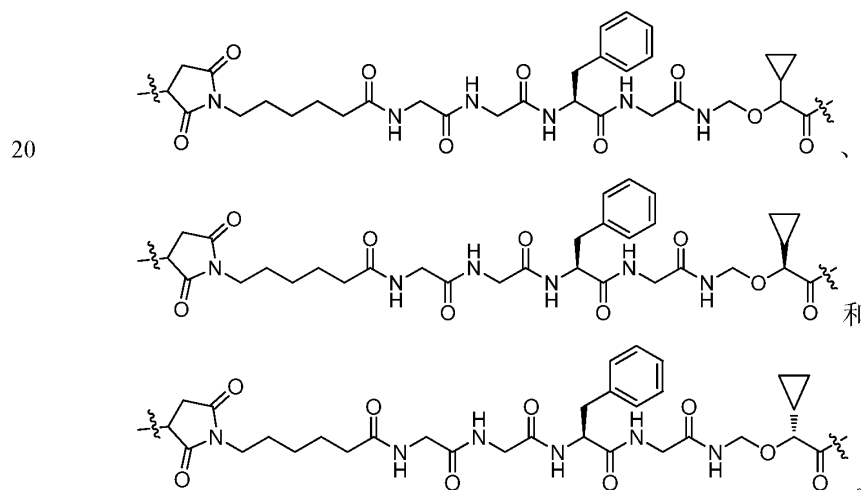
其中所述的 L^1 端与 Pc 相连， L^4 端与 Y 相连。

在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐， L^3 为 GGFG 的四肽残基。

- 15 在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中-L-为：

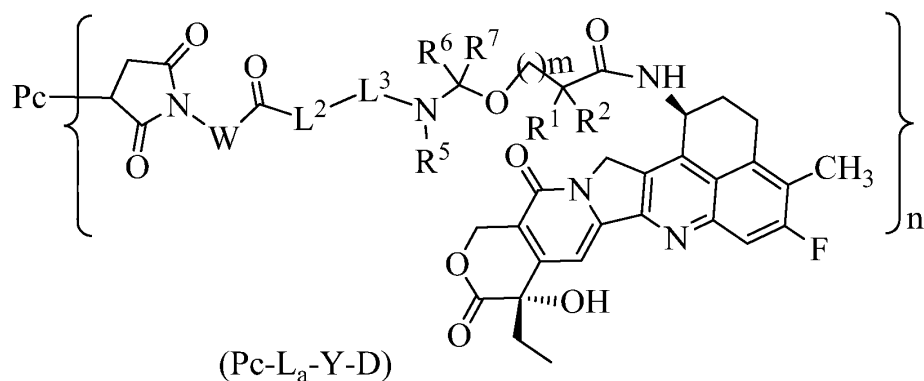


在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中-L-Y-任选自：



在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物

偶联物或其药学上可接受的盐，其为通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：



5 其中，

Pc 为如前所述的抗 HER3 抗体；

m 为 0 至 4 的整数；例如，m 选自 0、1、2、3 和 4；

n 为 1 至 10，n 是小数或整数；具体地，n 为 2-8 之间的小数或整数，包括两个端点值；更具体地 n 为 2-7 的小数或整数，包括端点值；可选地，n 为 2-3、
10 3-4、4-5、5-6、6-7 或 7-8 之间的小数或整数，包括端点值；

R¹ 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；R² 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；或者，R¹ 和 R² 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

15 W 选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-C₃₋₆ 环烷基和 1 至 8 个链原子的直链杂烷基，所述 1 至 8 个链原子的直链杂烷基包含 1 至 3 个选自 N、O 和 S 的杂原子，其中所述的 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-C₃₋₆ 环烷基和 1 至 8 个链原子的直链杂烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、C₁₋₈ 烷基、氯代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基和 C₃₋₆ 环烷基的一个或多个取代基所取代；

20 L² 选自 -NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂C(O)-、-S(CH₂)^{p¹}C(O)- 和化学键，其中 p¹ 为 1 至 20 的整数；

L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸 (F)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、赖氨酸 (K)、瓜氨酸、丝氨酸 (S)、谷氨酸 (Q) 和天冬氨酸 (D) 中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被
25 选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

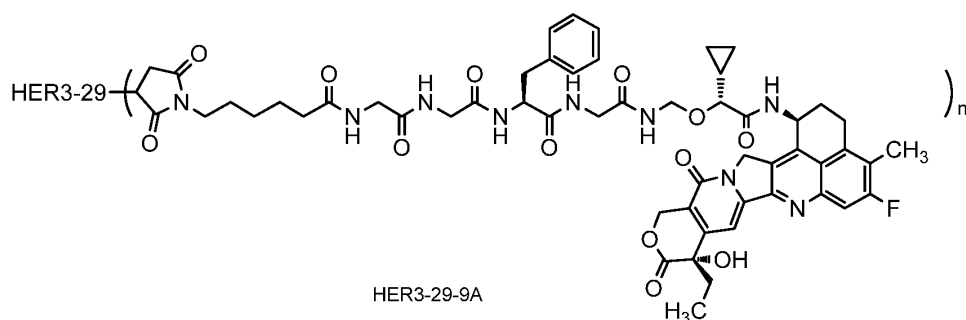
R⁵ 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基；

R⁶ 和 R⁷ 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、

氘代烷基和羟烷基。

在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其为通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：其中，

- 5 Pc 为如前一项所述的抗 HER3 抗体；
 m 为 0 至 4 的整数；例如，m 选自 0、1、2、3 和 4；
 n 为 1 至 10，n 是小数或整数；具体地，n 为 2-8 之间的小数或整数，包括两个端点值；更具体地 n 为 2-7 的小数或整数，包括端点值；可选地，n 为 2-3、3-4、4-5、5-6、6-7 或 7-8 之间的小数或整数，包括端点值；
- 10 R¹ 选自卤素、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、C₃₋₆ 环烷基 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 烷基、杂环基、芳基和杂芳基；R² 选自氢原子、卤素、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、C₃₋₆ 环烷基 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 烷基、杂环基、芳基和杂芳基；或者，R¹ 和 R² 与其相连接的碳原子一起形成 C₃₋₆ 环烷基或杂环基；
- 15 W 选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-C₃₋₆ 环烷基和 1 至 8 个链原子的直链杂烷基，所述 1 至 8 个链原子的直链杂烷基包含 1 至 3 个选自 N、O 和 S 的杂原子，其中所述的 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-C₃₋₆ 环烷基和 1 至 8 个链原子的直链杂烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、C₁₋₆ 烷基、氯代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基和 C₃₋₆ 环烷基的一个或多个取代基所取代；
- 20 L² 选自 -NR⁴(CH₂CH₂O)p¹CH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)p¹CH₂C(O)-、-S(CH₂)p¹C(O)- 和化学键，其中 p¹ 为 1 至 20 的整数；
 L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸 (F)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、赖氨酸 (K)、瓜氨酸、丝氨酸 (S)、谷氨酸 (Q) 和天冬氨酸 (D) 中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被
 25 选自卤素、羟基、氰基、氨基、C₁₋₆ 烷基、氯代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基和 C₃₋₆ 环烷基中的一个或多个取代基所取代；
 R⁵ 选自氢原子、C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基和 C₁₋₆ 羟烷基；
 R⁶ 和 R⁷ 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基和 C₁₋₆ 羟烷基；
- 30 所述的杂环基包含 3 至 6 个环原子，其中 1-3 个是选自氮、氧和硫的杂原子。
 在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，所述抗体-药物偶联物为：



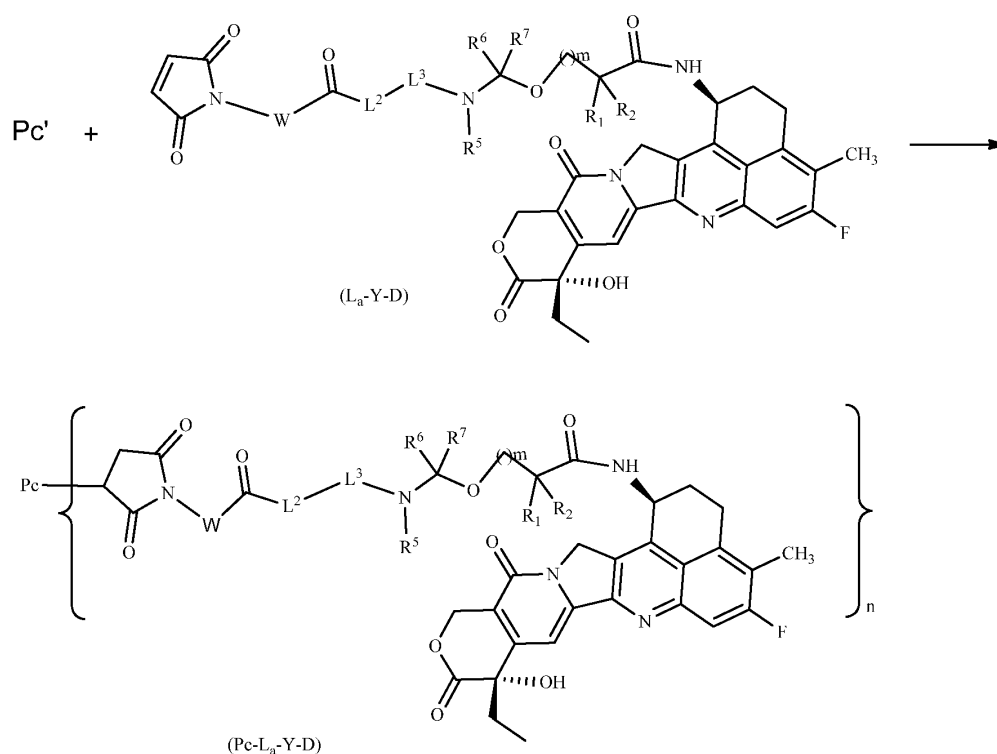
其中：

n 为 1 至 8， n 是小数或整数；具体地， n 为 2-8 之间的小数或整数，包括两个端点值；更具体地 n 为 2-7 的小数或整数，包括端点值；可选地， n 为 2-3、3-4、4-5、5-6、6-7 或 7-8 之间的小数或整数，包括端点值；

HER3-29 为抗 HER3 抗体，其包含如 SEQ ID NO: 27 所示的重链和如 SEQ ID NO: 28 所示的轻链。

在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，优选为 3 至 8， n 是小数或整数。

10 在一些实施方案中，本披露还提供一种制备如前一项所述通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法，其包括以下步骤：



Pc'与通式(L_a-Y-D)所示的化合物进行偶联反应,得到通式(Pc-L_a-Y-D)所示的化合物;

其中:

Pc'为Pc经还原后所得;

5 n、m、W、L²、L³、R¹、R²、R⁵、R⁶和R⁷如前一项中所定义。

在一些实施方案中,本披露还提供一种药物组合物,其包含如前一项所述的抗HER3抗体,或如前一项所述的核酸分子,或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

10 在一些实施方案中,本披露还提供如前一项所述的抗HER3抗体,或如前一项所述的核酸分子,或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,或如前一项所述的药物组合物在制备用于治疗HER3介导的疾病或病症的药物中的用途。

在一些实施方案中,本披露还提供如前一项所述的抗HER3抗体,或如前
15 任一项所述的核酸分子,或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,或如前一项所述的药物组合物在制备用于治疗/或预防肿瘤和癌症的药物中的用途,其中所述肿瘤和癌症选自乳腺癌、非小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈部鳞状细胞癌和黑色素瘤。

在一些实施方案中,本披露还提供一种试剂盒,其包含如前一项所述的抗
20 HER3抗体,或如前一项所述的核酸分子,或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,或如前一项所述的药物组合物。

在一些实施方案中,本披露还提供一种预防或治疗疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前一项所述的抗HER3抗体,或如前
25 任一项所述的核酸分子,或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,或如前一项所述的药物组合物。在一些实施方案中,所述疾病或病症优选为肿瘤、自身免疫性疾病或感染性疾病;在一些实施方案中,所述疾病或病症为与HER3有关的疾病或病症。

另一方面,本披露提供了一种药物组合物,其包含如前一项所述的抗
30 HER3抗体、抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。在一些实施方案中,所述单位剂量的药物组合物中含有0.1-3000mg或1-1000mg如前所述的抗HER3抗体或如前所述的抗体药物偶联物。

另一方面,本披露提供了如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物作为药物的用途。

35 另一方面,本披露提供了如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物在制备用于治疗HER3介导的疾病或病症的药

物中的用途, 在一些实施方案中, 所述 HER3 介导的疾病或病症为 HER3 高表达癌症, 中表达癌症或低表达癌症。

另一方面, 本披露提供了如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途, 在一些实施方案中, 所述肿瘤和癌症选自乳腺癌、非小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈部鳞状细胞癌和黑色素瘤。

另一方面, 本披露进一步涉及一种用于治疗 and/或预防肿瘤的方法, 该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物; 在一些实施方案中, 其中所述的肿瘤为与 HER3 高表达相关的癌症, 中表达癌症或低表达癌症。

另一方面, 本披露进一步涉及一种用于治疗或预防肿瘤或癌症的方法, 该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物; 其中所述肿瘤和癌症在一些实施方案中, 其中所述肿瘤和癌症选自乳腺癌、非小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈部鳞状细胞癌和黑色素瘤。

另一方面, 本披露进一步提供如前一项所述的抗 HER3 抗体或其抗体-药物偶联物作为药物, 在一些实施方案中, 作为治疗癌症或肿瘤的药物, 更优选作为治疗 HER3 介导的癌症的药物。

可将活性化合物(例如根据本公开所述的化合物或其药学上可接受的盐、本公开所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐)制成适合于通过任何适当途径给药的形式, 活性化合物可以以单位剂量的方式, 或者是以受试者能够以单剂进行自我给药的方式。本披露所述的活性化合物或组合物的单位剂量的表达方式可以是片剂、胶囊、扁囊剂、瓶装药水、药粉、颗粒剂、锭剂、栓剂、再生药粉或液体制剂。

本披露治疗方法中所用活性化合物或组合物的施用剂量通常将随疾病的严重性、受试者的体重和活性化合物的相对功效而改变。不过, 作为一般性指导, 合适的单位剂量可以是 0.1 mg ~1000mg。

本披露的药物组合物除活性化合物外, 可含有一种或多种辅料, 所述辅料选自以下成分: 填充剂、稀释剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂或赋形剂等。根据给药方法的不同, 组合物可含有 0.1 至 99 重量%的活性化合物。

本披露提供的 HER3 抗体及抗体药物偶联物具有与细胞表面抗原良好的亲和力, 良好的细胞内吞效率和很强的肿瘤抑制效率, 并且具有更宽的药物应用窗口, 适于临床的药物应用。

附图说明

图 1: 本披露的抗体和阳性抗体与 HER3 蛋白的结合活性。

图 2: 本披露的抗体和阳性抗体与 MCF7 细胞的结合活性。

图 3: 用 DT3C 测试本披露的抗体和阳性抗体的细胞内吞活性。

图 4: 用 pHrodo 测试本披露的抗体和阳性抗体的细胞内吞活性。

5 图 5: 本披露 ADC 样品对荷瘤裸鼠 SW620 移植瘤的疗效。

具体实施方式

术语

除非另有限定, 本文所用的所有技术和科学术语均与本披露所属领域普通技术人员
10 的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本披露, 但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本披露时, 依据以下定义, 使用下列术语。

当本披露中使用商品名时, 旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的药物和活性药物部分。

15 术语“抗体-药物偶联物”(antibody drug conjugate, ADC) 指将抗体与具有生物活性的药物相连。其中, 抗体可以直接地或经连接单元地与药物偶联。

术语“载药量”是指抗体-药物偶联物群体中, 每个抗体-药物偶联物分子载有的药物平均数量, 也可以表示为药物量和抗体量的比值。载药量的范围可以是每个抗体连接 0-12 个药物, 示例性的为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个药物, 该数值可以是小数, 也可以是整数。在某些实施方案中, 每个抗载体有 1
20 个到约 10 个药物; 在某些实施方案中, 每个抗载体有约 1 个至约 9 个, 1 个到约 8 个, 约 3 个至约 7 个, 约 3 个至约 6 个, 约 3 个至约 5 个, 约 2 个、约 3 个、约 4 个、约 5 个、约 6 个、约 7 个、约 8 个药物, 该数值可以是小数, 也可以是整数。载药量可用常规方法鉴定, 例如 UV/可见光光谱法、质谱、ELISA 试验和 HPLC 特征。

本披露的一个实施方式中, 细胞毒性药物通过连接单元偶联在抗体的巯基上。

可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量, 包括:

- 30 (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比,
(2) 控制反应时间和温度,
(3) 选择不同的反应试剂。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

本披露的术语“抗体”以最广义使用, 其涵盖各种抗体结构, 包括但不限于单克隆抗体, 多克隆抗体, 多特异性抗体 (例如双特异性抗体), 全长抗体或其
35 抗原结合片段 (也称“抗原结合部分”), 只要它们展现出期望的抗原结合活性。

全长抗体是包含由二硫键互相连接的至少两条重链和两条轻链的免疫球蛋白 (Ig)。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同, 故其抗原性也不同。据此, 可将免疫球蛋白分为五类, 或称为免疫球蛋白的同种型, 即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE, 其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别, 又可分为不同的亚类, 如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

全长抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大, 为可变区 (缩写为 Fv 区); 靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定, 为恒定区。每条重链由重链可变区 (缩写为 VH) 和重链恒定区 (缩写为 CH) 组成。重链恒定区包含 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域。每条轻链由轻链可变区 (缩写为 VL) 和轻链恒定区 (缩写为 CL) 组成。重链可变区和轻链可变区包括高变区 (也称为互补性决定区, 缩写为 CDR 或 HVR) 和序列相对保守的骨架区 (也称框架区, 缩写为 FR)。每个 VL 和 VH 由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的 3 个 CDR 4 个 FR 组成: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3; 重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

本披露中所述人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体, 示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区变体, 具体替换如现有技术已知的 YTE 突变, L234A 和/或 L235A 突变, S228P 突变, 265A(例如 D265A)和/或 297A(例如 N297A), 和/或获得 knob-into-hole 结构的突变 (使得抗体重链具有 knob-Fc 和 hole-Fc 组合), 这些突变已被证实使得抗体具有新的性能, 但不改变抗体可变区的功能。

本披露中“人抗体” (HuMAb)、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用, 其氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列、或衍生自利用人抗体组库或其它人抗体编码序列的非人来源的氨基酸序列。该人抗体的定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

术语“抗原结合片段”或“功能片段”或“抗原结合部分”是指保持特异性结合抗原的能力的完整抗体的一个或更多个片段。可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。示例性的, 涵盖在术语“抗原结合片段”的结合片段的示例包括: (i) Fab 片段, 一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 一种包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体的单臂的 VH 和

VL 结构域组成的 Fv 片段；(v) dsFv，由 VH 和 VL 经链间二硫键形成的稳定的抗原结合片段；(vi)包含 scFv、dsFv、Fab 等片段的双抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码，但可使用重组方法将这两个结构域通过能够使它们形成为单条蛋白质链的人工肽接头来接合，其中 VL 和 VH 配对形成单价分子，称为单链 Fv(scFv)（参见，例如，Bird 等人 (1988)Science242 :423-426；和 Huston 等人 (1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883）。此类单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。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。

术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指相较于原蛋白质或多肽，变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变，包括在原蛋白质或多肽的基础上发生 1 个、2 个、3 个或更多个氨基酸的插入、缺失或替换。

术语“抗体框架区”或“FR 区”，是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环（CDR）的支架。从本质上讲，其是不具有 CDR 的可变结构域。

术语“互补决定区”、“CDR”或“高变区”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。通常，每个重链可变区中存在三个 CDR（HCDR1、HCDR2、HCDR3），每个轻链可变区中存在三个 CDR（LCDR1、LCDR2、LCDR3）。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界，包括“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则、“ABM”编号规则、“contact”编号规则（参见 Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001）和 ImMunoGenTics(IMG T)编号规则（参见 Lefranc M.P., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003)）等。例如，对于经典格式，遵循 Kabat 规则，所述重链可变域(VH)中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；轻链可变域(VL)中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)。遵循 Chothia 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)。遵循 IMG T 规则，VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-38(HCDR1)、56-65(HCDR2)和 105-117(HCDR3)，VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-38(LCDR1)、

56-65(LCDR2)和 105-117(LCDR3)。遵循 AbM 规则, VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-35 (HCDR1)、50-58 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3); 并且 VL 中的氨基酸残基编号为 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3)。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上被抗体结合的部位(例如, HER3 分子上的特定部位)。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。参见, 例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed.(1996)。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体或抗原结合片段对预先确定的抗原上的表位的结合。通常, 抗体或抗原结合片段以大约小于 10^{-8}M , 例如大约小于 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或更小的亲和力(KD)结合。

当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时, 意指在抗原结合蛋白之间竞争, 其通过以下测定法来测定: 在所述测定法中, 待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如 HER3 抗原或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争, 这些测定例如: 固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahl 等, 1983, Methods in Enzymology 9: 242-253); 固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Kirkland 等, 1986, J.Immunol.137: 3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual(抗体, 实验室手册), Cold Spring Harbor Press); 用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA(参见例如 Morel 等, 1988, Molec.Immunol.25: 7-15); 固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Cheung, 等, 1990, Virology 176: 546-552); 和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等, 1990, Scand.J.Immunol.32: 77-82)。通常所述测定法涉及使用结合荷有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白任一种的固态表面或细胞的纯化的抗原。通过测量在所测抗原结合蛋白存在下结合固态表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常所测抗原结合蛋白过量存在。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括: 结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白; 和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白, 所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本文实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时, 其将抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或 75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下, 结合被抑制至少 80-85%、85-90%、

90-95%、95-97%或97%或更多。

本文中使用的术语“核酸分子”是指DNA分子或RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的，优选是双链DNA或单链mRNA或修饰的mRNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

氨基酸序列“同一性”指在比对氨基酸序列及必要时引入间隙，以达成最大序列同一性百分比，且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分，第一序列中与第二序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。为测定氨基酸序列同一性百分比的目的，比对可以通过属于本领域技术的范围内的多种方式来实现，例如使用公开可得到的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数，包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

“抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指的是细胞介导的反应，其中表达FcR的非特异性细胞毒性细胞（例如天然杀伤（NK）细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞）识别靶细胞上结合的抗体，并且随后引起靶细胞的裂解。调节ADCC的原代细胞、NK细胞仅表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FCγRIII。为了评估目的分子的ADCC活性，可进行体内外ADCC测定，诸如Clynes等人（PNASUSA 95:652-656(1998)）、美国专利号US5500362、US5821337等所述。

“抗体依赖性细胞吞噬作用”或“ADCP”指通过吞噬细胞（例如，巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突细胞）内化来消除经抗体包被的靶细胞或病毒体的机制。内化的抗体包被的靶细胞或病毒体被包含在称为吞噬体的囊泡中，所述囊泡随后与一个或多个溶酶体融合，以形成吞噬溶酶体。ADCP可以通过使用巨噬细胞作为效应细胞的体外细胞毒性测定和电视显微术(videomicroscopy)来评价（如van Bij等于Journal of Hepatology第53卷，第4期，2010年10月，第677-685）。“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指补体参与的细胞毒作用，即通过抗体与细胞或病毒体上的相应抗原结合，形成复合物而激活补体经典途径，所形成的攻膜复合物对靶细胞发挥裂解效应。CDC可以通过体外测定（如CDC测定，其中使用正常人血清作为补体源）或在C1q浓度系列中评价。CDC活性的降低（例如由于在多肽或抗体中引入第二突变而导致的CDC活性的降低）可以通过在相同的测定法内比较多肽或抗体的CDC活性与其不具有第二突变的亲本多肽或抗体的CDC活性来测量。为了评估抗体诱导CDC的能力，可如Romeuf等人所述的测定方法（Romeuf等人，Br J Haematol.2008Mar；140(6):635-43）进行测定。

本披露所描述的抗体或抗体片段可以通过任何方式偶联至效应分子。举例来说，抗体或抗体片段可以通过化学或重组方式附接至细胞毒性药物。制备融合物或偶联物的化学方式在本领域中是已知的并且可以用于制备免疫偶联物。用于偶联抗体或抗体片段和药物的方法必须能够连接抗体与细胞毒性药物而不会干扰抗体或抗体片段结合至靶分子的能力。

在一个实施方案中，抗体和细胞毒性药物都是蛋白质并且可以使用本领域中熟知的技术偶联。存在本领域中所公开的数百种交联剂，其可以偶联两种蛋白质。交联剂一般基于在抗体或细胞毒性药物上可用或插入的反应官能团来选择。另外，如果不存在反应基团，那么可以使用光可活化交联剂。在某些情况下，可能需要在抗体与细胞毒性药物之间包括间隔子。本领域中已知的交联剂包括同型双功能剂：戊二醛、二甲基己二亚酰胺化物和双(重氮基联苯胺)，以及异型双功能剂：间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺和磺基-间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺。

可以用于使效应分子偶合至抗体片段的交联剂包括例如 TPCH(S-(2-硫代吡啶基)-L-半胱氨酸酰肼)和 TPMPH(S-(2-硫代吡啶基)巯基-丙酰肼)。TPCH 和 TPMPH 在先前已经通过温和高碘酸盐处理而氧化的糖蛋白的碳水化合物部分反应，由此在交联剂的酰肼部分与高碘酸盐产生的醛之间形成腙键。异型双功能交联剂 GMBS(N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)-琥珀酰亚胺)和 SMCC(琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷)与伯胺反应，由此将马来酰亚胺基引入组分上。这个马来酰亚胺基随后可以与另一种组分上的可以由交联剂引入的巯基反应，由此在组分之间形成稳定的硫醚键。如果组分之间的位阻干扰任一种组分的活性，那么可以使用交联剂，将长的间隔臂引入组分之间，诸如 3-(2-吡啶基二巯基)丙酸 n-琥珀酰亚胺酯(SPDP)。因此，存在许多适合的交联剂，其可以被使用并且各自取决于其对最佳免疫偶联物产量的影响来选择。

术语“表达载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中，载体是“质粒”，其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中，载体是病毒载体，其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组，从而随宿主基因组一起复制（例如，非附加型哺乳动物载体）。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。公开所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或更多个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics

(IMGT) 的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到, 或者从免疫球蛋白杂志, 2001ISBN012441351 上获得。

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科 (enterobacteriaceae) 的成员, 例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或沙门氏菌 (*Salmonella*) 的菌株; 芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*); 肺炎球菌 (*Pneumococcus*); 链球菌 (*Streptococcus*) 和流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO (中国仓鼠卵巢细胞系)、293 细胞和 NS0 细胞。在一些实施方案中, 本披露中的宿主细胞不包含来自人胚胎的细胞。

本披露工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如, 编码重链和轻链的 cDNA 序列, 可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术, 哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化, 特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与人 HER3 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如, 用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 pH 梯度法洗脱结合的抗体, 用 SDS-PAGE 检测抗体片段, 收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体, 也可以用常规方法去除, 比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻, 如 -70°C, 或者冻干。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征 (例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等) 的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸, 使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓, 一般而言, 多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性 (参见例如 Watson 等 (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页, (第 4 版))。另外, 结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。示例性保守取代如下:

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val
Gln (Q)	Asn; Glu

Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

“外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源；如果两个序列中的 100 个位置有 95 个匹配或同源，那么两个序列为 95%同源。通常，当比对两个序列时进行比较以给出最大百分比同源性。例如，可以通过 BLAST 算法执行比较，其中选择算法的参数以在各个参考序列的整个长度上给出各个序列之间的最大匹配。以下参考文献涉及经常用于序列分析的 BLAST 算法：BLAST 算法（BLAST ALGORITHMS）：Altschul, S.F.等人，（1990） J. Mol. Biol. 215:403-410； Gish, W.等人，（1993） Nature Genet. 3:266-272； Madden, T.L.等人，（1996） Meth. Enzymol. 266:131-141； Altschul, S.F. 等人，（1997） Nucleic Acids Res. 25:3389-3402； Zhang, J.等人，（1997） Genome Res. 7:649-656。其他如 NCBI BLAST 提供的常规 BLAST 算法也为本领域技术人员所熟知。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初

转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下，其由上下文清楚可见。

本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美国专利号 4,683,195 中所述扩增的程序或技术。一般来说，需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5' 末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组 DNA 的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 编辑，(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个示例，但不是唯一的示例，所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶，以扩增或产生核酸的特定部分。

“分离的”指纯化状态，并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子，例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物或其他材料，例如细胞碎片和生长培养基。通常，术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐，除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

术语“药物”是指可以改变或查明机体的生理功能及病理状态，可用以预防，诊断和治疗疾病的化学物质。药物包括细胞毒性药物。药物和毒物之间并无严格界限，毒物是指在较小剂量即对机体产生毒害作用，损害人体健康的化学物质，任何药物剂量过大都可产生毒性反应。

细胞毒性药物，即抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。细胞毒性药物包括毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，放射性同位素（例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 和 Lu 的放射性同位素），化疗药物，抗生素和核溶酶。

在一些实施方式中，毒素可以是来自细菌、真菌、植物或动物的小分子毒素及其衍生物，包括喜树碱类衍生物如伊沙替康，美登木素生物碱及其衍生物（CN101573384）如 DM1、DM3、DM4，auristatin F (AF)及其衍生物，如 MMAF、MMAE、3024 (WO 2016/127790 A1，化合物 7)，白喉毒素、外毒素、蓖麻毒蛋白(ricin)A 链、相思豆毒蛋白(abrin)A 链、modeccin、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐 (Aleutites fordii) 毒蛋白、香石竹 (dianthin) 毒蛋白、美洲商陆 (Phytolaca americana) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (Momordica charantia) 抑制

物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(croton)、肥皂草(saponaire officinalis)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)局限曲霉素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。

术语“化疗药物”是可用于治疗肿瘤的化学化合物。该定义还包括起调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素效果作用的抗激素剂，且常常是系统或全身治疗的形式。它们自身可以是激素。化疗药物示例包括烷化剂，如噻替哌(thiotepa)，环磷酰胺(cyclophosphamide)(CYTOXAN™)，烷基磺酸脂如白消安(busulfan)，英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)，氮丙啶(aziridine)如苯并多巴(benaodopa)，卡波醌(carboquone)，美妥替哌(meturedopa)和尿烷亚胺(uredopa)，氮丙啶和 methylamelamine 包括六甲蜜胺(altretamine)，三亚胺嗪(triethylenemelamine)，三亚乙基磷酰胺，三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine)，氮芥(nitrogen mustards)如苯丁酸氮芥，氮芥，胆磷酰胺(cholophosphamide)，雌氮芥(estramustine)，异环磷酰胺(ifosfamide)，氮芥(mechlorethamine)，盐酸氧氮芥；左旋苯丙氨酸氮芥(melphalan)，新氮芥(novembichin)，胆甾醇苯乙酸氮芥，松龙苯芥(prednimustine)，曲磷胺(trofosfamide)，尿嘧啶氮芥；亚硝基脲(nitrosoureas)如亚硝基脲氮芥(carmustine)，氯脲菌素(chlorozotocin)，福莫司汀(fotemustine)，洛莫司汀(lomustine)，尼莫司汀(nimustine)，雷莫司汀(ranimustine)，抗生素如阿克拉霉素，放线菌素，authramycin，重氮丝氨酸，博来霉素，放线菌素 C(cactinomycin)，加利车霉素(calicheamicin)，carabycin，洋红霉素(chromomycin)，嗜癌素(carzinophilin)，色霉素，放线菌素 D，柔红菌素(daunorubicin)，地托比星(detorubicin)，6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸，阿霉素(doxorubicin)，表阿霉素(epirubicin)，依索比星(esorubicin)，伊达比星(idarubicin)，发波霉素(marcellomycin)，丝裂霉素，霉酚酸，诺加霉素(nogalamycin)，橄榄霉素(olivomycin)，培洛霉素(peplomycin)，potfiromycin，嘌呤霉素，三铁阿霉素(quelamycin)，罗多比星(rodorubicin)，链黑菌素，链脲霉素(streptozocin)，杀结核菌素，乌苯美司(ubenimex)，净司他丁(zinostatin)，佐柔比星(zorubicin)，抗代谢药如氨甲蝶呤，5-氟尿嘧啶(5-FU)，叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin)，氨甲蝶呤，蝶罗呤，三甲曲沙(trimetrexate)，嘌呤类似物氟达拉滨(fludarabine)，6-巯基蝶呤，硫咪蝶呤，硫鸟蝶呤，嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine)，阿扎胞苷(azacitidine)，6-氮尿苷，卡莫氟(carmofur)，阿糖胞苷，双脱氧尿苷，去氟氧尿苷(doxitluridine)，依诺他滨(enocitabine)，氟尿苷，5-FU，雄激素类如二甲睾酮(calusterone)，丙酸甲雄烷酮(dromostanol long propionate)，环硫雄醇(epitioanol)，美雄氨(mepitioane)，睾内酯(testolactone)，抗肾上腺类如氨鲁米特(aminoglutethimide)，米托坦(mitotane)，曲洛司坦(trilostane)，叶酸补充剂如 frolinic acid，醋葡内脂，醛磷酰胺糖苷(aldophosphamidedeglycoside)，氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid)，安吡啶(amsacrine)，bestabucil，比生群(biasntrene)，

- 依达曲沙(edatraxate), defofamine, 秋水仙胺, 地吡醌(diaziquone), elfomithine, 依利醋铵(elliptiniumacetate), 依托格鲁(etoglucid), 硝酸镓, 羟基脲, 香菇多糖(lentinan), 氯尼达明(lonidamine), 米托胍脘(mitoguazone), 米托蒽醌(mitoxantrone), 莫哌达醇(mopidamol), 硝呋旦(nitracrine), 喷司他丁(pintostatin),
- 5 phenamet, 吡柔比星(pirarubicin), 鬼臼树酸(podophyllinic acid), 2-乙基酰肼, 丙卡巴肼(procarbazine), PSK®, 雷佐生(razoxane), 西索菲兰(sizofiran), 锗螺胺(spirogermanium), 细交链孢菌酮酸, 三亚胺醌; 2, 2', 2''-三氯二乙胺(trichlorotriethylamine), 乌拉坦(urethan), 长春碱酰胺, 达卡巴嗪(dacarbazine), 甘露醇氮芥, 二溴甘露醇(mitobronitol), 二溴卫矛醇, 哌溴烷坑(pipobroman),
- 10 gacytosine, 阿拉伯糖苷("Ara-C"), 环磷酰胺, 三胺硫磷(thiotepa), 紫杉烷, 如紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)和docetaxel(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France), 苯丁酸氮芥, 吉西他滨(gemcitabine), 6-硫代鸟嘌呤, 巯基嘌呤, 氨甲蝶呤, 铂类似物如顺铂和卡铂, 长春花碱, 铂, 依托泊甙(etoposide)(VP-16), 异环磷酰胺, 丝裂霉素 C,
- 15 米托蒽醌, 长春新碱, 长春瑞宾(vinorelbine), 新霉酰胺(navelbine), novantrone, 替尼泊甙(teniposide), 柔红霉素, 氨基蝶呤; xeloda, 伊拜磷酸盐(ibandronate), CPT-11, 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000, 二氟甲基鸟氨酸(DMFO), 维甲酸esperamicins, capecitabine, 以及上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。此定义还包括能调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素制剂, 如抗雌激素制剂包括他
- 20 莫昔芬(tamoxifen), 雷洛昔芬(raloxifene), 芳香酶抑制剂 4(5)-咪唑, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬(trioxifene), keoxifene, LY117018, onapristone, 和托瑞米芬(Fareston), 和抗雄激素制剂如氟他氨(flutamide), 尼鲁米特(nilutamide), bicalutamide, 亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin), 和上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。
- 25 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(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个)碳原子的烷基, 更优选为含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性示例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲
- 30 基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己
- 35 基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正

壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基,及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基,非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基和 2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基优选独立地任选自 H 原子、D 原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“杂烷基”指含有一个或多个选自 N、O 或 S 的杂原子的烷基,其中烷基如上所定义。

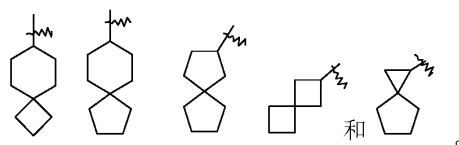
术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基,其具有 2 个从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基,其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团,优选含有 1 至 12 个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个)碳原子,更优选含有 1 至 8 个碳原子的亚烷基,最优选含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性示例包括但不限于亚甲基($-\text{CH}_2-$)、1,1-亚乙基($-\text{CH}(\text{CH}_3)-$)、1,2-亚乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1,1-亚丙基($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$)、1,2-亚丙基($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$)、1,3-亚丙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1,4-亚丁基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)等。亚烷基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基优选独立地任选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基。

术语“烯基”指分子中含有碳碳双键的烷基化合物,其中烷基的定义如上所述。烯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,其独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

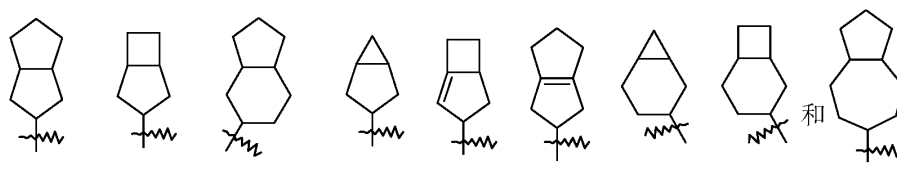
术语“炔基”指分子中含有碳碳三键的烷基化合物,其中烷基的定义如上所述。炔基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

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，优选包含 3 至 8 个碳原子（例如 3、4、5、6、7 和 8 个）碳原子，更优选包含 3 至 6 个碳原子。单环环烷基的非限制性示例包括环丙基、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、环庚三烯基和环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

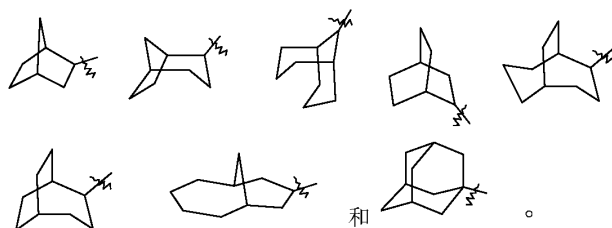
术语“螺环烷基”指 5 至 20 元，单环之间共用一个碳原子(称螺原子)的多环基团，其可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元(例如 7、8、9 或 10 元)。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺环烷基分为单螺环烷基、双螺环烷基或多螺环烷基，优选为单螺环烷基和双螺环烷基。更优选为 4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/5 元或 5 元/6 元单螺环烷基。螺环烷基的非限制性示例包括：



术语“稠环烷基”指 5 至 20 元，系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对碳原子的全碳多环基团，其中一个或多个环可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠环烷基，优选为双环或三环，更优选为 5 元/5 元或 5 元/6 元双环烷基。稠环烷基的非限制性示例包括：



术语“桥环烷基”指 5 至 20 元，任意两个环共用两个不直接连接的碳原子的全碳多环基团，其可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥环烷基，优选为双环、三环或四环，更优选为双环或三环。桥环烷基的非限制性示例包括：



所述环烷基环包括如上所述的环烷基(包括单环、螺环、稠环和桥环)稠合于芳基、杂芳基或杂环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为环烷基,非限制性示例包括茚满基、四氢萘基和苯并环庚烷基等;优选苯基并环戊基或四氢萘基。

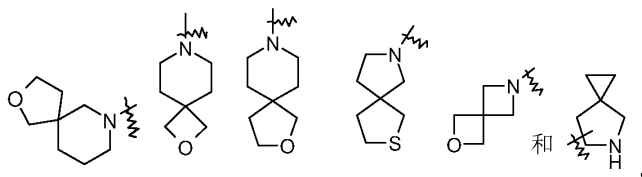
环烷基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基优选独立地任选自氢原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基),其中烷基、环烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性示例包括:甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基和环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自H原子、D原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基。

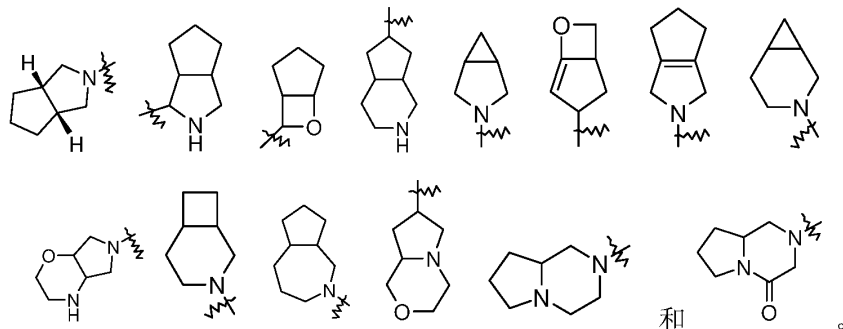
术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,其包含3至20个环原子,其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或S(O)₂的杂原子,但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分,其余环原子为碳。优选包含3至12个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个)环原子,其中1~4个(例如1、2、3和4个)是杂原子;更优选包含3至8个环原子(例如3、4、5、6、7和8个),其中1-3是杂原子(例如1、2和3个);更优选包含3至6个环原子,其中1-3个是杂原子;最优选包含5或6个环原子,其中1-3个是杂原子。单环杂环基的非限制性示例包括吡咯烷基、四氢吡喃基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基和高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

术语“螺杂环基”指5至20元的,单环之间共用一个原子(称螺原子)的多环杂环基团,其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或S(O)₂的杂原子,其余环原子为碳。其可以含有一个或多个双键,但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为6至14元,更优选为7至10元(例如7、8、9或10元)。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺杂环基分为单螺杂环基、双螺杂环基或多

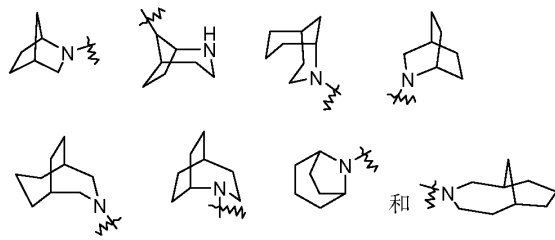
螺杂环基, 优选为单螺杂环基和双螺杂环基。更优选为 4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/5 元或 5 元/6 元单螺杂环基。螺杂环基的非限制性示例包括:



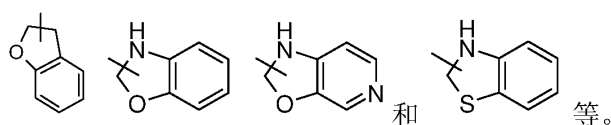
- 术语“稠杂环基”指 5 至 20 元, 系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对原子的多环杂环基团, 一个或多个环可以含有一个或多个双键, 但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统, 其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子, 其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元, 更优选为 7 至 10 元 (例如 7、8、9 或 10 元)。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠杂环基, 优选为双环或三环, 更优选为 5 元/5 元或 5 元/6 元双环稠杂环基。
- 稠杂环基的非限制性示例包括:



- 术语“桥杂环基”指 5 至 14 元, 任意两个环共用两个不直接连接的原子的多环杂环基团, 其可以含有一个或多个双键, 但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统, 其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子, 其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元, 更优选为 7 至 10 元 (例如 7、8、9 或 10 元)。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥杂环基, 优选为双环、三环或四环, 更优选为双环或三环。桥杂环基的非限制性示例包括:

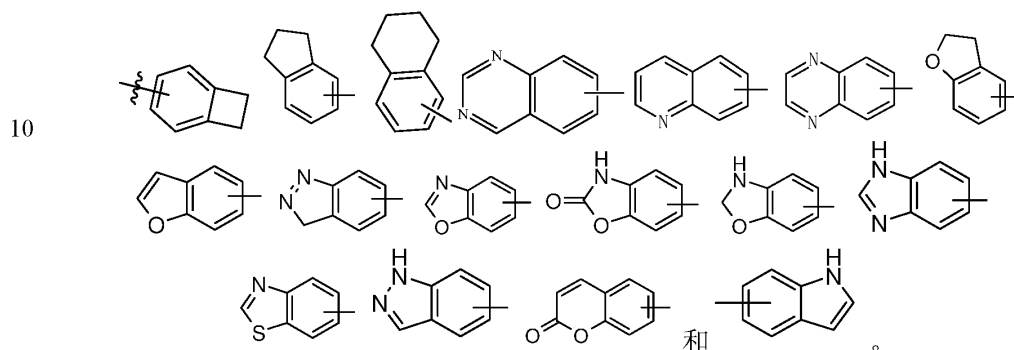


- 所述杂环基环包括如上所述的杂环基(包括单环、螺杂环、稠杂环和桥杂环)稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上, 其中与母体结构连接在一起的环为杂环基, 其非限制性示例包括:



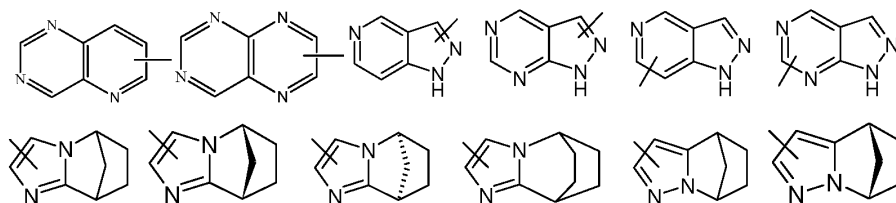
杂环基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自氢原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

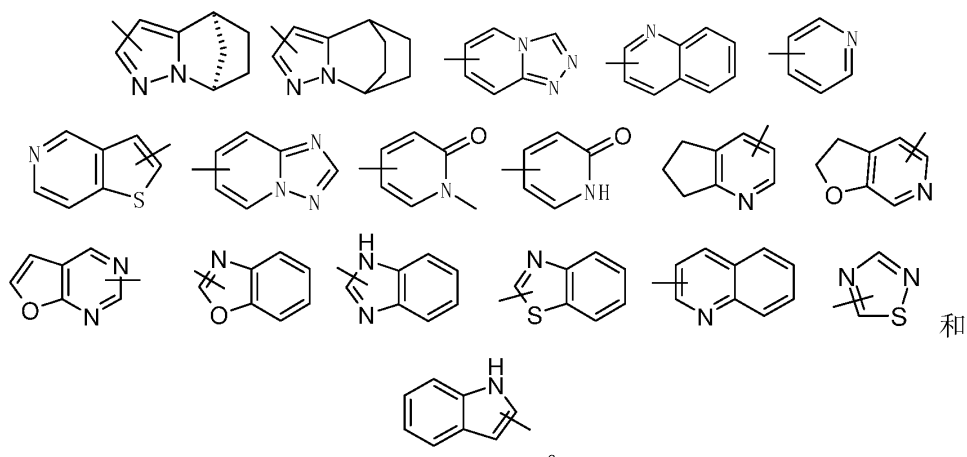
术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环(稠合多环是共享毗邻碳原子对的环)基团，优选为6至10元，例如苯基和萘基。所述芳基环包括如上所述的芳基环稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性示例包括：



芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自氢原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

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(例如5、6、7、8、9或10元)，更优选为5元或6元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、咪唑基、吡嗪基、哒嗪基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基等。所述杂芳基环包括如上述的杂芳基稠合于芳基、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，其非限制性示例包括：





5 杂芳基可以是取代的或非取代的, 当被取代时, 取代基可以在任何可使用的连接点上被取代, 所述取代基优选独立地任选自氢原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“氨基保护基”是为了使分子其它部位进行反应时氨基保持不变, 用易于脱去的基团对氨基进行保护。非限制性实施例包含(三甲基硅)乙氧基甲基、四氢吡喃基、叔丁氧羰基、乙酰基、苄基、烯丙基和对甲氧苄基等。这些基团可任
10 选地被选自卤素、烷氧基或硝基中的 1-3 个取代基所取代。

术语“羟基保护基”是本领域已知的适当的用于羟基保护的基团, 参见文献 (“Protective Groups in Organic Synthesis” , 5th Ed. T.W. Greene & P.G.M. Wuts) 中的
15 羟基保护基团。作为示例, 优选地, 所述的羟基保护基可以是(C₁₋₁₀ 烷基或芳基)₃ 硅烷基, 例如: 三乙基硅基, 三异丙基硅基, 叔丁基二甲基硅基, 叔丁基二苯基硅基等; 可以是 C₁₋₁₀ 烷基或取代烷基, 优选烷氧基或芳基取代的烷基, 更优选 C₁₋₆ 烷氧基取代的 C₁₋₆ 烷基或苯基取代的 C₁₋₆ 烷基, 最优选 C₁₋₄ 烷氧基取代的 C₁₋₄ 烷基, 例如: 甲基, 叔丁基, 烯丙基, 苄基, 甲氧基甲基(MOM), 乙氧基乙基,
20 2-四氢吡喃基(THP)等; 可以是(C₁₋₁₀ 烷基或芳香基)酰基, 例如: 甲酰基, 乙酰基, 苯甲酰基、对硝基苯甲酰基等; 可以是(C₁₋₆ 烷基或 C₆₋₁₀ 芳基)磺酰基; 也可以是(C₁₋₆ 烷氧基或 C₆₋₁₀ 芳基氧基)羰基。

术语“环烷基氧基”指环烷基-O-, 其中环烷基如上所定义。

术语“杂环基氧基”指杂环基-O-, 其中杂环基如上所定义。

25 术语“烷硫基”指烷基-S-, 其中烷基如上所定义。

术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代, 其中烷基如上所定义。

术语“卤代烷氧基”指烷氧基被一个或多个卤素取代, 其中烷氧基如上所定义。

术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代, 其中烷基如上所定义。

术语“羟烷基”指被羟基取代的烷基，其中烷基如上所定义。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“羟基”指-OH。

术语“巯基”指-SH。

5 术语“氨基”指-NH₂。

术语“氰基”指-CN。

术语“硝基”指-NO₂。

术语“氧代基”指“=O”。

术语“羰基”指 C=O。

10 术语“羧基”指-C(O)OH。

术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)、-C(O)O(环烷基)、(烷基)C(O)O-或(环烷基)C(O)O-，其中烷基、环烷基如上所定义。

本披露的化合物包含其同位素衍生物。术语“同位素衍生物”指结构不同仅在于存在一种或多种同位素富集原子的化合物。例如，具有本披露的结构，用
15 “氘”或“氚”代替氢，或者用¹⁸F-氟标记（¹⁸F 同位素）代替氟，或者用¹¹C-，¹³C-，或者¹⁴C-富集的碳（¹¹C-，¹³C-，或者¹⁴C-碳标记；¹¹C-，¹³C-，或者¹⁴C-同位素）代替碳原子的化合物处于本披露的范围内。这样的化合物可用作例如生物学测定中的分析工具或探针，或者可以用作疾病的体内诊断成像示踪剂，或者作为药效学、药动学或受体研究的示踪剂。本披露的各种氘化形式的化合物是指
20 与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的化合物。在制备氘代形式的化合物时可使用市售的氘代起始物质，或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成，氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。氘代物通常可以保留与未氘代的化合物相当的活性，并且当氘代在某些特定
25 定位点时可以取得更好的代谢稳定性，从而获得某些治疗优势。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

30 “取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为 1~5 个，更优选为 1~3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下(通过实验或理论)确定可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和(如烯属)键的碳原子结合时可能是不稳定的。

35 “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的

载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

本文所用的术语“药学上可接受的”是指这些化合物、材料、组合物和/或剂型，在合理的医学判断范围内，适用于与受试者组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，具有合理的获益/风险比，并且对预期的用途是有效。

本文所使用的，单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括复数引用，反之亦然，除非上下文另外明确指出。

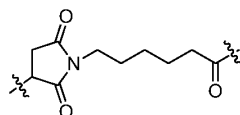
当将术语“约”应用于诸如 pH、浓度、温度等的参数时，表明该参数可以变化 $\pm 10\%$ ，并且有时更优选地在 $\pm 5\%$ 之内。如本领域技术人员将理解的，当参数不是关键的时，通常仅出于说明目的给出数字，而不是限制。

术语“接头单元”、“连接单元”或“连接片段”是指一端与配体（本披露中为抗体）连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键，也可以连接其他接头后再与药物相连。

接头可以包含一种或多种接头构件。例示性的接头构件包括 6-马来酰亚氨基己酰基(“MC”)、马来酰亚氨基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、及那样源自与接头试剂的偶联的：N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”)、N-琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1 羧酸酯(“SMCC”，在本文中也称作“MCC”)和 N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。接头可以包括延伸物、间隔物和氨基酸单元，可以通过本领域已知方法合成，诸如 US2005-0238649A1 中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头（例如脲）、蛋白酶敏感（例如肽酶敏感）接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari 等, Cancer Research 52: 127-131(1992); 美国专利 No.5, 208, 020)。

接头组件包括但不限于：

MC=6-马来酰亚氨基己酰基，结构如下：



Val-Cit 或 “vc” =缬氨酸-瓜氨酸(蛋白酶可切割接头中的例示二肽)

瓜氨酸=2-氨基-5-脲基戊酸

PAB=对氨基苄氧羰基(“自我牺牲”接头组件的例示)

Me-Val-Cit=N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(其中接头肽键已经修饰以防止其受到组织蛋白酶 B 的切割)

MC(PEG)6-OH=马来酰亚氨基己酰基-聚乙二醇(可附着于抗体半胱氨酸)

SPP=N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯

SPDP=N-琥珀酰亚氨基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯

SMCC=琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯

5 IT=亚氨基硫烷

常规的药物组合物的制备见中国药典。

术语“载体”用于本披露的药物，是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的示例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂和润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧化剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂和着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐和微晶纤维素等。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入受试者的血流中。或者，最好按可保持本披露化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的示例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液，例如 1, 3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶

剂或悬浮介质。为此目的,可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外,脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

“施用”、“给予”和“处理”,当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当其应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本披露抗体-药物偶联物的盐,或本披露中所述的化合物的盐,这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性,且具有应有的生物活性,本披露抗体药物偶联物至少含有一个氨基,因此可以与酸形成盐,可药用盐的非限制性示例包括:盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂,例如包含本披露的任一种结合化合物的组合物,所述受试者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床右测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如受试者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定,其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方案的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露,但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书,本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中,除非上下文中有清楚的另外指明,单数形

式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方案。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围，本披露的范围由权利要求书限定。

以下结合实施例用于进一步描述本发明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

本披露实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例

实施例 1: HER3 高表达细胞株构建

将 pCDH-Her3 慢病毒表达载体质粒与 pVSV-G, pCMV-dR8.91 慢病毒系统包装载体用 Lipofectamine 3000 转染试剂转染至病毒包装细胞 293T 中，收集含有病毒的培养基上清，过滤并进行超高速离心，使用浓缩后的病毒感染中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1，经嘌呤霉素筛选两至三周，再进行 FACS 单细胞分选。

通过 FACS 检测慢病毒感染的 CHO-K1 细胞表面的 HER3 表达，挑选出 HER3 表达量高的单克隆细胞株。

将挑选出的单克隆细胞株扩大培养，储存以便后续实验。

HuMan ErbB3 氨基酸序列 (UniProtKB - P21860-1, AA Ser 20 - Thr 643)

SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHN
ADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDYGKFAIFVMLNY
NTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCMDTIDWRDIVRDRDAEIVV
KDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGEEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNNQCCH
DECAGGCSGPQDTCFACRHFNDGACVPRCPQPLVYNKLTFLQLEPNPHTKY
QYGGVCVASCPHNFVVDQTSVVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKA
CEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKL
NVFRTVREITGYLNIQSWPPMHNFVSFNLTTIGGRSLYNRGFSLIMKNLNV
TSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRD
CVAEGKVCDDPLCSSGGCWGPQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFA
HEAECFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVGLGA
KGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPPELQDCLGQTLVLIGKTHLT

SEQ ID NO: 1

HuMan ErbB3 核苷酸序列

AGCGAAGTCGGCAACAGCCAAGCCGTCTGTCCCGGCACACTCAATGGACT
GTCCGTGACTGGCGACGCCGAGAACCAATACCAGACACTCTACAAGCTCT
ACGAGAGGTGCGAGGTGGTCATGGGAAATCTGGAGATCGTGCTGACTGGC
CATAACGCCGATCTGTCCTTTCTGCAGTGGATTAGGGAAGTGACTGGCTAC
5 GTGCTGGTCGCCATGAATGAGTTTTCCACTCTGCCACTGCCAAATCTGAGA
GTGGTGAGGGGCACTCAAGTGTACGACGGCAAGTTCGCCATTTTCGTCATG
CTCAACTACAACACAAACTCCAGCCACGCCCTCAGACAGCTGAGGCTCAC
TCAGCTGACAGAAATTCTGTCCGGCGGCGTCTATATCGAGAAAAACGATAA
ACTGTGCCACATGGACACAATCGATTGGAGGGACATCGTGAGGGATAGGGA
10 TGCCGAGATCGTGGTCAAGGATAACGGAAGGAGCTGTCTCCTTGTCATGA
GGTCTGCAAGGGAAGGTGTTGGGGACCCGGCTCCGAAGACTGCCAGACA
CTGACTAAGACTATCTGCGCCCCCTCAGTGCAATGGACACTGCTTCGGCCCA
AATCCAAACCAGTGCTGCCACGACGAATGTGCCGGCGGATGCAGCGGACC
ACAAGATACAGACTGCTTCGCTTGTAGACACTTCAATGACTCCGGCGCTTG
15 TGTGCCTAGGTGTCCACAGCCACTCGTGTACAACAAGCTCACTTTTCAGCT
CGAGCCTAACCCCTCACACTAAGTACCAATACGGCGGAGTCTGCGTCGCCAG
CTGTCTCACAACCTTCGTGGTGGATCAGACAAGCTGCGTGAGAGCTTGCCC
TCCAGATAAAATGGAGGTGGACAAGAACGGACTGAAGATGTGTGAGCCTT
GCGGCGGACTGTGTCCTAAAGCTTGCGAGGGCACTGGCTCCGGATCTAGG
20 TTCCAGACTGTCGACTCCAGCAACATCGACGGCTTTGTGAACTGCACTAAG
ATTCTGGGCAATCTGGACTTTCTGATCACTGGCCTCAACGGCGATCCTTGG
CACAAGATCCCAGCTCTGGACCCAGAAAAGCTGAATGTGTTTAGGACAGT
GAGGGAGATTACTGGCTACCTCAACATCCAGAGCTGGCCTCCACACATGCA
CAACTTCAGCGTGTTCTCCAATCTGACTACAATCGGCGGCAGATCCCTCTAT
25 AATAGGGGCTTCTCTCTGCTCATCATGAAGAATCTGAACGTCACTTCTCTGG
GCTTCAGATCTCTGAAGGAGATCTCCGCCGGAAGGATTTACATCTCCGCCA
ATAGGCAGCTCTGTTACCACCACAGCCTCAACTGGACTAAGGTGCTGAGGG
GACCTACTGAGGAAAGGCTGGACATTAAACACAATAGGCCAAGAAGGGAT
TGCCTGCTGAGGGCAAAGTGTGTGATCCTCTGTGTAGCTCCGGAGGATGT
30 TGGGGACCCGGCCCCGGCCAGTGTCTGAGCTGTAGGAATTATTCTAGGGGC
GGCGTGTGTGTGACACACTGCAACTTTCTGAACGGCGAACCTAGGGAATT
CGCCCATGAAGCCGAGTGCTTCAGCTGCCACCCAGAGTGTCAGCCTATGGA
GGGCACAGCTACATGCAATGGCAGCGGATCCGACACATGTGCTCAGTGTGC
CCACTTTAGGGATGGACCTCATTGCGTCAGCAGCTGTCCACACGGCGTGCT
35 GGGAGCCAAGGGCCCTATCTACAAGTACCCAGATGTGCAGAACGAGTGTA
GGCCTTGCCACGAGAATTGCACACAAGGCTGCAAGGGCCCAGAGCTGCAA
GATTGCCTCGGCCAGACTCTGGTGCTCATCGGCAAGACTCATCTCACT

SEQ ID NO: 2

40

实施例 2: 抗人 HER3 单克隆抗体产生

2.1 阳性对照抗体制备

阳性对照抗体 U3 参照 WO2007077028A2 (第 118 页, U1-59) 制备。其中 U3 的重链和轻链氨基酸序列如下:

U3 重链:

5 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIN
HSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYF
DLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
10 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 3

15 U3 轻链:

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNLYAWYQQNPGQPPLL
YWASTRESGVDPDRFSGSGGTDFLTITSLQAEDVAVYYCQYYSTPRTFGGG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
20 SFNRGEC

SEQ ID NO: 4

2.2 本披露的抗体制备

利用全人源天然噬菌体抗体库和抗原 Biotinylated HuMan ErbB3 (购买于北京百普赛斯生物科技股份有限公司, 货号: ER3-H82E6), 经过淘选后, 采用 ELISA 方法进行噬菌体检测, 获得阳性克隆。将阳性克隆测序, 获得序列后, 将阳性克隆序列插入蛋白表达载体 Phr-IgG 中, 并通过 HEK293 和 Expi-CHO-S 细胞进行表达。纯化后进行 FACS 和吞噬活性验证实验, 得到全人源抗体分子 HER3-29。全人源抗体分子 HER3-29 的抗体的恒定区:

30 人 IgG1 的重链恒定区:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
35 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 5

人源 κ 轻链恒定区：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

5

SEQ ID NO: 6

全人源抗体分子 HER3-29 的重链可变区和轻链可变区序列如下：

HER3-29 重链可变区：

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGI
SWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKEGLPG
LDYWGQGTLLTVSS

10

SEQ ID NO: 7

HER3-29 轻链可变区：

DIQMTQSPSSLSASIGDRATITCRASQHVGTLYLNWYQQKPGKTPKLLISGAAN
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYNTPPFSGGQGTKVEIK

15

SEQ ID NO: 8

不同编号规则获得的 CDR 序列如下：

表 1、Chothia 编号规则获得的 CDR 序列

抗体	HER3-29	序列号
重链 CDR1	GFTFDDY	SEQ ID NO: 9
重链 CDR2	SWNSGS	SEQ ID NO: 10
重链 CDR3	EGLPGLDY	SEQ ID NO: 11
轻链 CDR1	RASQHVGTLYN	SEQ ID NO: 12
轻链 CDR2	GAANLQS	SEQ ID NO: 13
轻链 CDR3	QQSYNTPPFS	SEQ ID NO: 14

表 2、IMGT 编号规则获得的 CDR 序列

抗体	HER3-29	序列号
重链 CDR1	GFTFDDYA	SEQ ID NO: 15
重链 CDR2	ISWNSGSI	SEQ ID NO: 16
重链 CDR3	AKEGLPGLDY	SEQ ID NO: 17
轻链 CDR1	QHVGTY	SEQ ID NO: 18
轻链 CDR2	GAA	SEQ ID NO: 19
轻链 CDR3	QQSYNTPPFS	SEQ ID NO: 20

20

表 3、Kabat 编号规则获得的 CDR 序列

抗体	HER3-29	序列号
----	---------	-----

重链 CDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 21
重链 CDR2	GISWNSGSIGYADSVKG	SEQ ID NO: 22
重链 CDR3	EGLPGLDY	SEQ ID NO: 23
轻链 CDR1	RASQHVGTLYN	SEQ ID NO: 24
轻链 CDR2	GAANLQS	SEQ ID NO: 25
轻链 CDR3	QQSYNTPPFS	SEQ ID NO: 26

全人源抗体分子 HER3-29 的重链序列和轻链序列如下：

HER3-29 重链：

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGI
5 SWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKEGLPG
LDYWGGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
10 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 27

HER3-29 轻链：

DIQMTQSPSSLSASIGDRATITCRASQHVGTLYNHWYQQKPGKTPKLLISGAAN
15 LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYNTPPFSFGGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

20

SEQ ID NO: 28

实施例 3：ADC 的制备

ADC 的 DAR 值测定

本披露的 ADC 的 DAR 值计算方法采用了 RP-HPLC（反相高效液相色谱），
25 具体如下：

1、测定方法：

裸抗和供测试 ADC 样品（浓度为 1 mg/mL），加入 4μL DDT（sigma）还原，
37℃水浴 1 小时，结束后取出到内插管中。使用高效液相色谱仪 Agilent 1200 进
行检测，色谱柱选用 Agilent PLRP-S 1000A 8μm 4.6*250 mm，柱温： 80℃；DAD
30 检测器波长 280 nm；流速： 1 mL/min；进样量为： 40 μL；之后通过样品与裸抗
的谱图比对，区分出轻重链的位置，然后对检测样品的谱图进行积分，计算出

DAR 值。

2、溶液配制

1) 0.25M DTT 溶液:

配制示例: 取 DTT 5.78 mg, 加入 150μL 纯化水充分溶解后, 配得 0.25M DTT 溶液, -20℃保存。

2) 流动相 A (0.1% TFA 水溶液):

配制示例: 量筒量取 1000 mL 纯化水, 加入 1 mL TFA (sigma), 充分混匀后使用, 2-8℃保存 14 天。

3) 流动相 B (0.1% TFA 乙腈溶液):

配制示例: 量筒量取 1000 mL 乙腈, 加入 1 mL TFA, 充分混匀后使用, 2-8℃保存 14 天。

3、数据分析

通过样品与裸抗的谱图比对, 区分出轻重链的位置, 然后对检测样品的谱图进行积分, 计算出 DAR 值。

计算公式如下:

名称	连接药物数
LC	0
LC+1	2
HC	0
HC+1	2
HC+2	4
HC+3	6

LC 峰面积总和=LC 峰面积+LC+1 峰面积

HC 峰面积总和=HC 峰面积+HC+1 峰面积+ HC+2 峰面积+ HC+3 峰面积

LC DAR=Σ(连接药物数*峰面积百分比)/ LC 峰面积总和

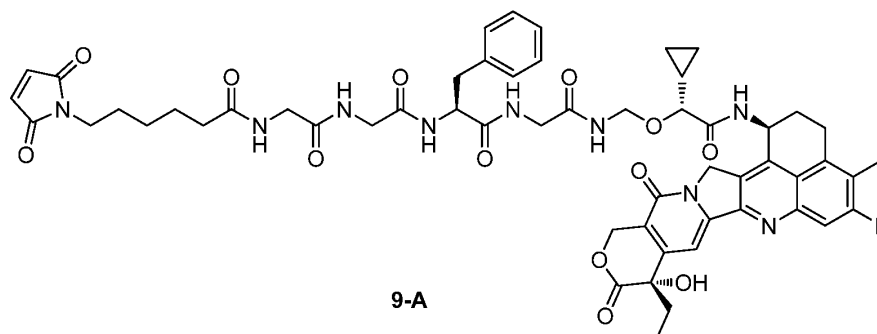
HC DAR=Σ(连接药物数*峰面积百分比)/ HC 峰面积总和

DAR= LC DAR+ HC DAR

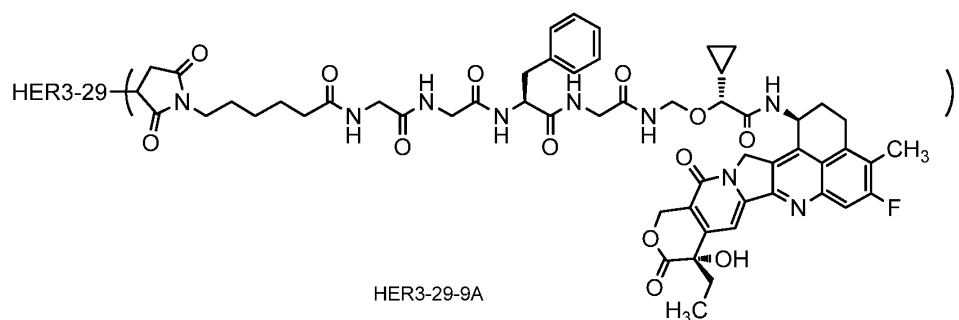
药物

本披露偶联物的药物部分可以是任意适宜的药物。特别适宜的药物描述于例如 PCT 公开号 WO2020063676A1 (通过援引完整收入本文)。本披露的化合物 9A (即 WO2020063676 A1 实施例 9 的化合物 9-A) 是 N-((2R,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)

己酰胺，其具有如下的结构：



本披露用以下方法，通过调节反应参数，制备如 ADC 通式 (HER3-29-9A) 所示的抗体-药物偶联物。



实施例 3-1 ADC-1

在 37 °C 条件下，向抗体 HER3-29 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液；10.0 mg/mL，11.8 mL，797 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基) 磷(TCEP)的水溶液 (10 mM，208.2 μ L，2.082 μ Mol)，置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 **9A** (参考 WO2020063676，实施例 9 的化合物 9-A 制备所得，该申请的全部内容引入本披露) (8.6mg，8.006 μ mol) 溶解于 500 μ L DMSO 中，加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化 (洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到偶联物 HER3-29-9A 的示例性产物 **ADC-1** 的 PBS 缓冲液 (4.02 mg/mL，27.9 mL)，于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值：DAR=4.19。

实施例 3-2 ADC-2

在 37 °C 条件下，向抗体 HER3-29 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液；10.0 mg/mL，11.8 mL，797 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙

基)膦(TCEP)的水溶液(10 mM, 128 μ L, 1.281 μ mol), 置于水浴振荡器, 于 37 $^{\circ}$ C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 $^{\circ}$ C。

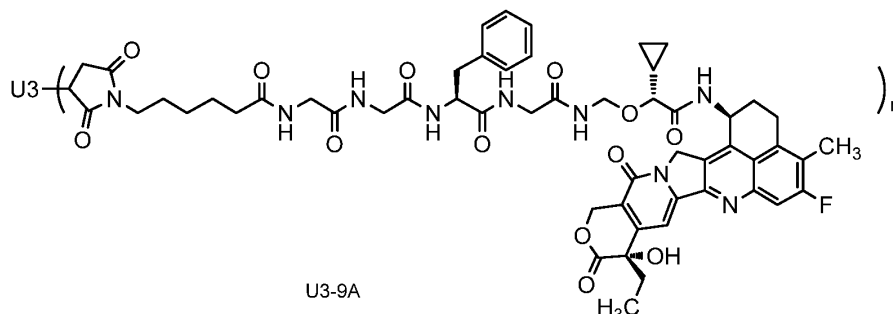
将化合物 **9A** (6.88mg, 6.405 μ mol) 溶解于 400 μ L DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 $^{\circ}$ C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到偶联物 HER3-29-9A 的示例性产物 **ADC-2** 的 PBS 缓冲液(4.24 mg/mL, 27.2 mL), 于 4 $^{\circ}$ C 储存。RP-HPLC 计算平均值: DAR=2.91。

实施例 3-3 ADC-3

在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 向抗体 HER3-29 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 3.1 mL, 209 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10 mM, 111 μ L, 1.111 μ Mol), 置于水浴振荡器, 于 37 $^{\circ}$ C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 $^{\circ}$ C。

将化合物 **9A** (3.37mg, 3.137 μ mol) 溶解于 120 μ L DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 $^{\circ}$ C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到偶联物 HER3-29-9A 的示例性产物 **ADC-3** 的 PBS 缓冲液(1.48 mg/mL, 12.8 mL), 于 4 $^{\circ}$ C 储存。RP-HPLC 计算平均值: DAR=7.27。

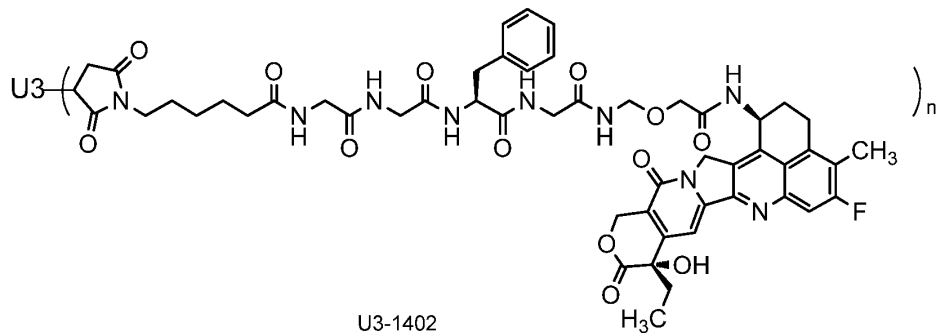
实施例 3-4 ADC-4



在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 向抗体 U3 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 3.1 mL, 209 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10 mM, 111 μ L, 1.111 μ mol), 置于水浴振荡器, 于 37 $^{\circ}$ C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 $^{\circ}$ C。

将化合物 **9A** (3.37mg, 3.137 μ mol) 溶解于 120 μ L DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 $^{\circ}$ C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到偶联物 U3-9A 的示例性产物 **ADC-4** 的 PBS 缓冲液(1.48 mg/mL, 12.8 mL), 于 4 $^{\circ}$ C 储存。RP-HPLC 计算平均值: DAR=6.76。

实施例 3-5 ADC-5



参考 WO2015155998A1 说明书第 156 页的实施例 12，制备 U3-1402，做为
5 阳性对照。在 37 °C 条件下，向抗体 U3 的 PBS 缓冲水溶液（pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液；10.0 mg/mL，3.1 mL，236 nmol）加入配置好的三(2-羧乙基) 磷(TCEP)的水溶液（10 mM，130 μL），置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 **1402**（3.67mg，3.54μmol）溶解于 180 μL DMSO 中，加入到上述
10 反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化（洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA），得到偶联物 U3-1402 的示例性产物 **ADC-5** 的 PBS 缓冲液（1.53 mg/mL，15.4mL），于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值：DAR=6.97。

15 测试例

测试例 1：抗体与游离 **HER3** 蛋白的结合实验

用 pH 7.4 的 PBS（源培生物，B320）缓冲液将 **HER3** 蛋白稀释至 1 μg/mL，
以 100 μL/孔的体积加入 96 孔酶标板中，4°C 过夜孵育。弃去液体后，每孔加入
300 μL 用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶（BD，232100）进行封闭，37°C 孵育 2 小时。
20 封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液（pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20）洗
板 3 次后，每孔加入 100 μL 梯度稀释的抗体溶液，于 37°C 孵育 1 小时。孵育结
束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μL 小鼠抗人(Mouse Anti-HuMan)IgG (H+L)
（Jackson ImmunoResearch，209-035-088，1:8000 稀释），37°C 孵育 1 小时。用
PBST 洗板 3 次后，每孔加入 100 μL TMB 显色底物（KPL，5120-0077），室温孵
25 育 10-15 分钟，每孔加入 50 μL 1 M H₂SO₄ 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm
处的吸收值，用软件拟合出抗体与抗原的结合曲线，见图 1。计算出 EC₅₀ 值，
结果见表 4。

表 4、抗体与 **HER3** 蛋白的结合活性

抗体	HER3-29	U3
----	---------	----

EC ₅₀ (nM)	0.14	0.56
-----------------------	------	------

结论：本披露抗体 HER3-29 与 HER3 蛋白的结合活性优于对照抗体 U3。

测试例 2：抗体与表达 HER3 的细胞的结合实验

将 MCF7 细胞（ATCC，HTB-22）用 FACS 缓冲液（2%胎牛血清（Gibco，10099141）pH7.4 PBS（Sigma，P4417-100TAB））制备成 1×10⁶ 细胞/mL 的细胞悬液，100μL/孔加入 96 孔圆底板中。离心去除上清后加入 50μL/孔用 FACS 缓冲液稀释的不同浓度待测抗体，放于 4℃冰箱中避光孵育 1 小时。以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 3 次后，加入工作浓度的 Alexa Fluor 488 山羊抗人（Goat anti-HuMan）IgG（H+L）(invitrogen，A-11013)，放于 4℃冰箱中避光孵育 40 分钟。以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 3 次后，在 BD FACSCantoII 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度，见图 2。EC₅₀ 值见表 5。

表 5、抗体细胞水平结合活性

抗体	HER3-29	U3
EC ₅₀ (nM)	0.057	0.249

结论：本披露抗体 HER3-29 与表达 HER3 蛋白的细胞的结合活性优于对照抗体 U3。

测试例 3：DT3C 抗体内吞实验

本实验的目的是根据 DT3C 蛋白进入细胞后，活化的白喉毒素（DT）对细胞进行杀伤，间接反映了 HER3 抗体的内吞情况。根据 IC₅₀ 和 I_{max} 来评价抗体的体外内吞活性。

DT3C 是重组表达的融合蛋白，由白喉毒素的 Fragment A（仅毒素部分）和 G 群链球菌的 3C 片段（IgG 结合部分）融合而成。该蛋白能够与抗体的 Fc 结构高度亲和，在抗体发生内吞时一同进入细胞。在胞内弗林蛋白酶的作用下，释放出具有毒性的 DT。DT 能够抑制 EF2-ADP 核糖基化的活性，阻断蛋白翻译过程，最终导致细胞死亡。而未进入细胞的 DT3C 则不具有杀伤细胞的活性。根据细胞杀伤情况来评价抗体的内吞活性。

用含 20% low IgG FBS 的新鲜细胞培养基，制取重组表达 HER3 的 CHOK1 细胞悬液，细胞密度为 2×10⁴ 细胞/mL，以 50μL/孔加入细胞培养板中，5%二氧化碳 37℃ 16 小时培养。

用无血清培养基配制成 4×浓度的 DT3C，0.22μm 小滤器过滤成无菌溶液。用无血清培养基配制 4×浓度的抗体，将 80μL DT3C(400nM)和 80μL 抗体(66nM)按照 1:1 的体积混匀，室温下静置孵育 30 分钟。取 50μL 稀释好的抗体加入 50μL 的细胞中，培养箱中孵育三天。每孔加入 50μL CTG(CellTiter-Glo™试剂，G7573)，室温下避光孵育 10 分钟，Victor3 上读取化学发光，结果见图 3 和表 6。

表 6、抗体的内吞活性

抗体	HER3-29	U3
Imax	48%	19%
IC ₅₀ (nM)	0.51	2.81

结论：本披露抗体 HER3-29 的细胞内吞活性优于对照抗体 U3。

测试例 4: pHrodo 抗体内吞实验

5 本实验的目的是根据染料被内化后荧光信号变化来反映 HER3 抗体的内吞情况。根据荧光信号的强弱来评价抗体的体外内吞活性。

pH 敏感的 pHrodo iFL 染料偶联结合的 Fab 片段，可直接结合至 HER3 抗体的 Fc 区，且不影响抗体的抗原识别。pHrodo iFL 染料在中性 pH 值时几乎不发光，在 HER3 抗体发生内吞时，染料同时被内化，随着 pH 降低，荧光信号会逐渐增强。根据荧光信号的增强情况来评价抗体的内吞活性。

10 HER3/CHOK1 细胞用 DMEM/F12+10%FBS+10μg/mL 嘌呤霉素培养，实验第一天用含新鲜细胞培养基制取细胞悬液，密度为 2×10⁵ 细胞/mL，以 100μL/孔加入 96 孔细胞培养板中，5%二氧化碳 37℃ 培养 24 小时。

15 将板中的细胞液吸出 50μL，每孔加入 50μL 的抗体和 pHrodo 染料混合液，每个抗体样品都设置两个复孔。并设置单加染料组和同型 IgG1 对照组。

培养箱培养 24 小时后，吸出培养基，每孔加入 50μL 胰酶，消化 2 分钟，50μL 新鲜培养基终止消化。用排枪将同一样品复孔的细胞转到圆底板同一个孔中。1500rpm，离心 2 分钟，弃去培养液，用 FACS Buffer (PBS+2.5%FBS) 洗一次细胞，1500rpm，离心 2 分钟。加入 200μL 的 FACS Buffer (PBS+2.5%FBS)，重悬细胞，用流式细胞仪检测 FITC 信号。用 Flowjo 7.6 分析数据，结果见图 4 和表 7。

表 7、抗体内吞活性

抗体	HER3-29	U3
FITC 信号	373	267

结论：本披露抗体 HER3-29 的细胞内吞活性优于对照抗体 U3。

25 测试例 5: ADC 分子细胞活性实验

本实验的目的是检测 ADC 样品对细胞杀伤作用，根据 IC₅₀ 和 Imax 来评价 Her3-ADC 的体外活性。

30 MCF7 细胞（人乳腺癌细胞），SW620 细胞（人结肠癌细胞，南京科佰，CBP60036），WiDr 细胞（人大肠癌细胞）用胰酶消化，新鲜培养基中和，1000rpm 离心后用培养液重悬，计数后将细胞悬液密度调整为 500 细胞/孔，加入到 96 孔细胞培养板中，第 11 列不铺细胞只加入 135μL 的培养基，5%二氧化碳 37℃ 16

小时培养。

ADC 样品用 PBS 稀释成 15μM（10×浓度）。以此为首浓度，用 PBS 五倍稀释，共 8 个浓度。每孔加入 15μL 的 10×浓度溶液。5%二氧化碳 37℃培养 6 天。

每孔加入 70μL CTG，室温下避光孵育 10 分钟，将白色底膜贴在细胞培养板底部，置于 Victor3 上读取化学发。本实验的数据使用了数据处理软件 GraphPad prism5.0，见表 8。

表 8、HER3-29-9A 不同 DAR 值体外杀伤实验

ADC 样品	DAR 值	测试细胞					
		MCF7		SW620		WiDr	
		IC ₅₀ (nM)	I _{max} %	IC ₅₀ (nM)	I _{max} %	IC ₅₀ (nM)	I _{max} %
ADC-5	6.97	95.52	85.53	110.5	99.04	420.6	97.98
ADC-4	6.76	68.2	83.66	90.2	100.06	327.5	100.89
ADC-3	7.27	22.35	86.72	47.27	100.06	143.5	100.54
ADC-1	4.19	71.51	91.41	90.47	100.35	673.4	94.1
ADC-2	2.91	119.6	88.91	130.4	99.85	2278	87.9

结论：本披露 ADC 样品 ADC-1，ADC-2，ADC-3 对细胞的杀伤活性优于阳性对照 ADC-4 和 ADC-5。

10

体内活性生物学评价

测试例 6：HER3 高表达 CDX 模型体内药效评价

将 SW620 细胞（5×10⁶ 个/只）接种于 Balb/c 裸鼠右肋部皮下，7 天后分 9 组，8 只/组，共 9 组。平均分组体积 134.75mm³。ADC 腹腔注射，共给药 3 次，每隔 5 天给药一次。每只按体重注射 0.1mL/10g。每周测量 2 次瘤体积和体重，记录数据。使用 Excel 统计软件记录数据：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；SEM 值以 STDEV/SQRT（每组动物数）计算；采用 GraphPad Prism 软件作图，采用 Two-way ANOVA 或 One-way ANOVA 对数据进行统计学分析。

肿瘤体积（V）计算公式为：V=1/2×L_长×L_短²

相对肿瘤增殖率 T/C(%)=(T-T₀)/(C-C₀)×100%，其中 T、C 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积；T₀、C₀为实验开始时的肿瘤体积。

抑瘤率 TGI(%)=1- T/C(%)。结果见图 5 及表 9。

表 9、ADC 对荷瘤裸鼠 SW620 移植瘤的疗效

ADC 样品	DAR 值	抑瘤率 TGI(%)		
		6mpk	3mpk	1.5mpk
ADC-5	6.97	98.8	56.6	24.1
ADC-1	4.19	-	72.5	22.4

ADC-2	2.91	86.3	65.6	6.3
-------	------	------	------	-----

结论：本披露 ADC-1，ADC-2 对荷瘤裸鼠 SW620 移植瘤的疗效优于阳性对照 ADC-5。

权利要求书:

1. 一种分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体具有以下特征中的一种或多种:
 - a. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.5 nM 的表观亲和力 EC_{50} 与 HER3 蛋白结合,
 - 5 所述的表观亲和力 EC_{50} 是通过 ELISA 方法测定的;
 - b. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.2 nM 的表观亲和力 EC_{50} 与 MCF7 细胞表达的 HER3 蛋白结合, 所述的表观亲和力 EC_{50} 是通过 FACS 方法测定的;
 - c. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞; 优选的, 当采用 DT3C 抗体内吞实验测定所述的抗 HER3 抗体时, 其 IC_{50} 小于 2 nM;
 - 10 d. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞; 优选的, 当采用 pHrodo 抗体内吞实验测定所述的抗 HER3 抗体时, 其 FITC 信号大于 300。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体包含
 - 1) SEQ ID NO: 7 所示的重链可变区中所包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 和
 - 15 2) SEQ ID NO: 8 所示的轻链可变区中所包含的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;优选的, 其中所述抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:
 - a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;
 - 20 其中所述的 CDR 区按 Chothia 编号规则确定; 或
 - b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;
 - 其中所述的 CDR 区按 IMGT 编号规则确定; 或
 - 25 c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;
 - 其中所述的 CDR 区按 Kabat 编号规则确定。
- 30 3. 一种分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:
 - a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;
 - 35 如上所述的 CDR 区按 Chothia 编号规则确定; 或
 - b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO:

17 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 CDR 区按 IMGT 编号规则确定; 或

5 c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 CDR 区按 Kabat 编号规则确定。

10 4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体是人抗体或抗原结合片段。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的分离的抗 HER3 抗体, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

15 所述重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90% 的序列同一性, 和/或所述轻链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8 具有至少 90% 的序列同一性;

优选地, 所述的抗 HER3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 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: 8 所示。

20 6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体, 其包含:

与 SEQ ID NO: 27 具有至少 85% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 28 具有至少 85% 序列同一性的轻链;

优选地, 所述的抗 HER3 抗体包含:

如 SEQ ID NO: 27 所示的重链和如 SEQ ID NO: 28 所示的轻链。

25

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗 HER3 抗体具有以下特征中的一种或多种:

a. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.5 nM 的表观亲和力 EC_{50} 与 HER3 蛋白结合, 所述的表观亲和力 EC_{50} 是通过 ELISA 方法测定的;

30 b. 所述的抗 HER3 抗体以小于 0.2 nM 的表观亲和力 EC_{50} 与 MCF7 细胞表达的 HER3 蛋白结合, 所述的表观亲和力 EC_{50} 是通过 FACS 方法测定的;

c. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞; 优选的, 当采用 DT3C 抗体内吞实验测定所述的抗 HER3 抗体时, 其 IC_{50} 小于 2 nM;

35 d. 所述的抗 HER3 抗体能被表达人 HER3 的细胞内吞; 优选的, 当采用 pHrodo 抗体内吞实验测定所述的抗 HER3 抗体时, 其 FITC 信号大于 300。

8. 一种分离的抗 HER3 抗体, 其中所述抗体与权利要求 1 至 7 中任一项所述

的抗 HER3 抗体竞争性结合人 HER3。

9. 一种核酸分子，其编码权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体。

5

10. 一种宿主细胞，其包含如权利要求 9 所述的核酸分子。

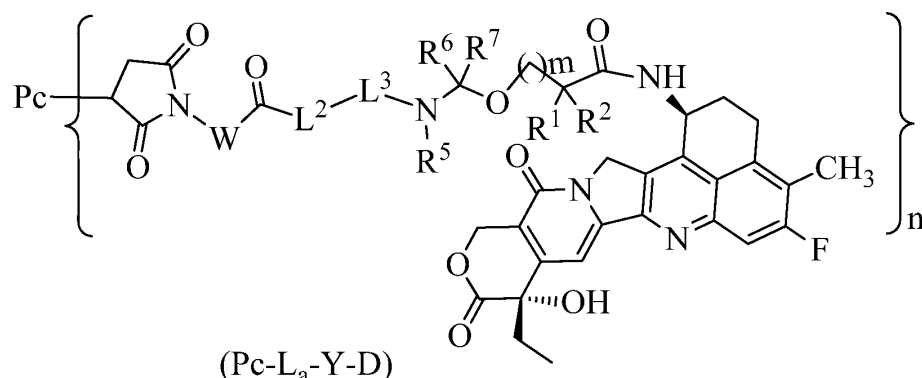
11. 一种免疫偶联物，其包含：权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体和效应分子，其中，所述效应分子偶联至所述抗 HER3 抗体；

10 优选地，所述效应分子选自抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子，以及其任何组合。

12. 一种用于免疫检测或测定 HER3 的方法，所述方法包括使权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体接触受试者或来自受试者的样品的步骤。

15

13. 一种通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：



其中，

20 Pc 为如权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体；

m 为 0 至 4 的整数；

n 为 1 至 10，n 是小数或整数；

25 R¹ 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；R² 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；或者，R¹ 和 R² 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

W 选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-C₃₋₆ 环烷基和 1 至 8 个链原子的直链杂烷基，所述 1 至 8 个链原子的直链杂烷基包含 1 至 3 个选自 N、O 和 S 的杂原子，其中所述的 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-C₃₋₆ 环烷基和 1 至 8 个链原子的直链杂烷基各自独立地任

选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代；

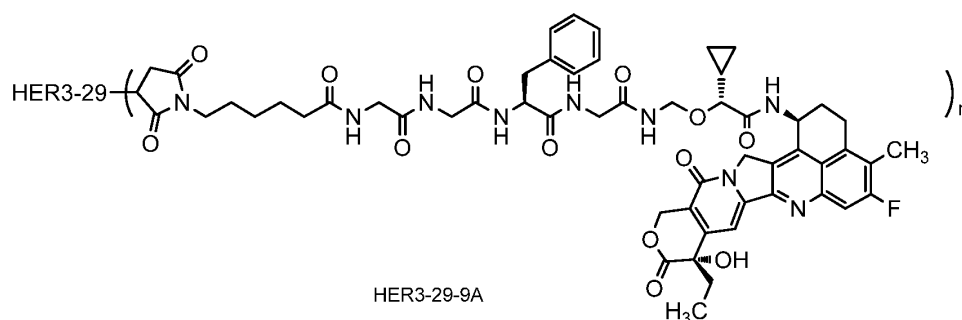
L^2 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)p^1C(O)-$ 和化学键，其中 p^1 为 1 至 20 的整数；

5 L^3 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

R^5 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基；

10 R^6 和 R^7 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

14. 根据权利要求 13 所述的通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，所述抗体-药物偶联物为：



15

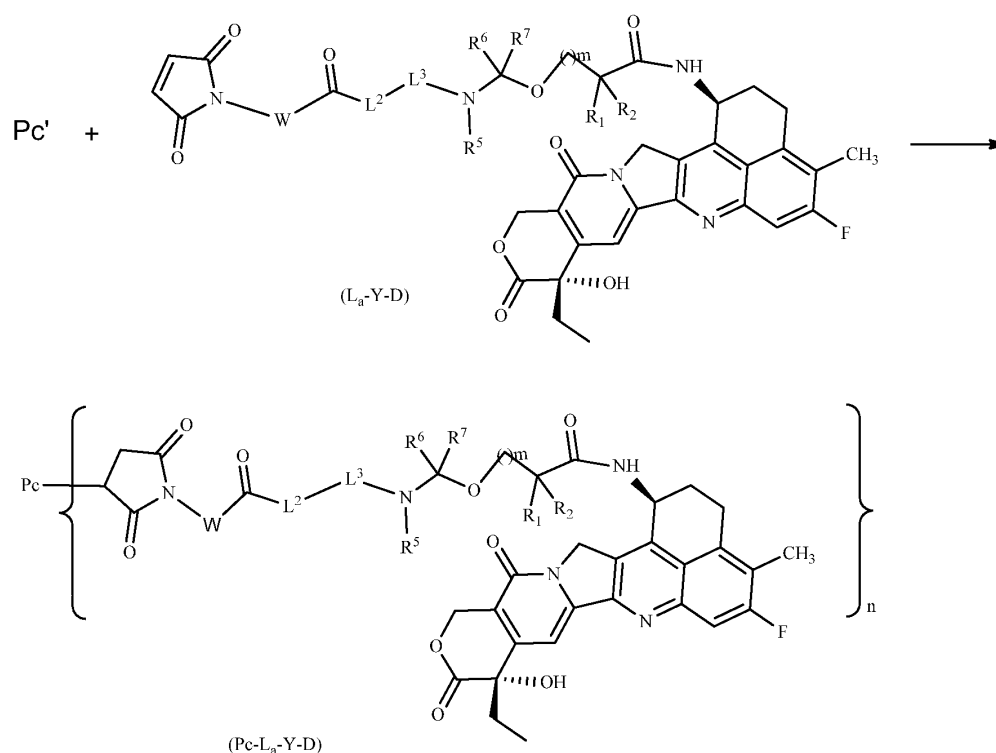
其中：

n 为 1 至 8， n 是小数或整数；优选的 n 为 3 至 8， n 是小数或整数；

HER3-29 为抗 HER3 抗体，其包含如 SEQ ID NO: 27 所示的重链和如 SEQ ID NO: 28 所示的轻链。

20

15. 一种制备如权利要求 13 所述的通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法，其包括以下步骤：



Pc' 与通式 (L_a-Y-D) 所示的化合物进行偶联反应，得到通式 $(Pc-L_a-Y-D)$ 所示的化合物；

5 其中：

Pc' 为 Pc 经还原后所得， Pc 、 n 、 m 、 W 、 L^2 、 L^3 、 R^1 、 R^2 、 R^5 、 R^6 和 R^7 如权利要求 13 中所定义。

16. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗
10 HER3 抗体，或权利要求 9 所述的核酸分子，或权利要求 13 或 14 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐；以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

17. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体，或权利要求 9
15 所述的核酸分子，或权利要求 13 或 14 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或根据权利要求 16 所述的药物组合物在制备用于治疗 HER3 介导的疾病或病症的药物中的用途。

18. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体，或权利要求 9
20 所述的核酸分子，或权利要求 13 或 14 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或根据权利要求 16 所述的药物组合物在制备用于治疗/或预防肿瘤的药物

中的用途；

优选的，所述肿瘤选自乳腺癌、非小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈部鳞状细胞癌和黑色素瘤。

- 5 19. 一种试剂盒，其包含根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗 HER3 抗体，或权利要求 9 所述的核酸分子，或权利要求 13 或 14 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或根据权利要求 16 所述的药物组合物。