抗 HER2 抗体药物偶联物在治疗尿路上皮癌中的用途

技术领域

[01] 本发明涉及一种抗 HER2（人类表皮生长因子受体 2，human epidermal growth factor receptor 2）抗体药物偶联物在治疗尿路上皮癌中的用途。

背景技术

[02] 尿路上皮细胞癌（Urothelial carcinoma，UC；或称移行细胞癌，Transitional cell carcinoma，TCC）是一种癌症类型，其通常存在于泌尿系统：肾、膀胱和附属器官中。其为膀胱癌和输尿管、尿道和脐尿管癌症的最常见类型。其为第二最常见的肾癌类型，占所有原发性肾脏恶性肿瘤的 5-10%。

[03]尿路上皮（也称为过渡性上皮）是膀胱，输尿管和尿道内侧以及肾盂（尿液收集的肾脏部分）内衬。它由尿路上皮细胞或过渡细胞组成。这些细胞可以变成癌细胞，即称为尿路上皮癌（或移行细胞癌）。

[04]根据癌变细胞的侵入性，尿路上皮癌可以是非侵入性的（仅在膀胱的衬里中）或侵入性的（生长到膀胱壁的其他层中）。其中，非侵入性尿路上皮癌仅在膀胱内膜中并且未在膀胱壁中更深地生长。在诊断时，50%-60%的尿路上皮癌患者的肿瘤为非侵入性的。非侵入性尿路上皮癌的类型包括：非侵袭性扁平尿路上皮癌（也称为原位癌）；非侵袭性乳头状尿路上皮癌，高级别；非侵袭性乳头状尿路上皮癌，低度恶性；具有低恶性潜能的非侵袭性乳头状尿路上皮肿瘤发展成侵袭性癌症的可能性很小。

[05] 相比之下，侵入性尿路上皮癌从膀胱内膜生长到膀胱壁的较深层，例如结缔组织（称为固有层）和肌肉层（称为肌层）。 在诊断时，40%-50%的尿路上皮癌患者的肿瘤为侵袭性的。

[06]理论上，尿路上皮癌可以从泌尿道的任何部位开始，包括但不限于肾盂、输尿管、膀胱或尿道。

[07]当相关肿瘤细胞未转移时，手术切除治疗为首选的治疗方案，对于肿瘤已经转移的患者，一般需要采取抗癌药物治疗，目前的一线疗法是：吉西他滨和顺铂的联合疗法；而放射疗法针对尿路上皮癌的效果并不理想，一般用作辅助治疗的手段；当治疗肾盂/输尿管上皮中的癌时，可以使用 BCG 注射疗法（导管注射牛结核杆菌）。

[08] 尿路上皮癌具有多中心，易复发的特点，对于肿瘤累及肌层的患者首选膀胱全切，且术后还需严格规律复查，因此，治疗难度大，复发率高。（李学松，王刚，张骞编. 泌尿外科病例精粹，北京大学医学出版社， 2017）。在术后早期(24 小时内)作为一次性剂量或在外科手术后几周作为六剂量方案将丝裂霉素(一种化疗药物)给予至膀胱中也是部分患者可选择的治疗方案。目前基于顺铂的化疗仍然是转移性 UC 患者的治疗金标准，基于顺铂的化疗的总体反应率（ORR）为 60-70%，总生存期（OS）为 14-15 个月，5 年生存率为 13-15%，复发后的患者基于铂的化疗，ORR 约为 15%，中位 OS 约为 7 个月。

[09] 在欧洲已批准长春氟宁用于治疗泌尿上皮晚期或转移性 TCC(Bellmunt,J.等人，J Clin Oncol.27(27)：4454-4461(2009))。经单一药剂疗法测试，若干药剂已显示适中活性，且中值存活期为 5 至 10 个月(Yafi,F.A. 等人，Current Oncol.18(1)：e25-e34(2011))。在转移性情况中，多西他赛（Docetaxel）作为缓解性选择向移行细胞癌患者投与(NCCN 2014)，且美国及加拿大(Canada)医学界基于来自 2 期研究的证据认可多西他赛治疗晚期疾病的方案（WO2016/064649A1）。

[10]近年来，治疗尿路上皮癌的新药主要有：1.罗氏的 Atezolizumab 是 2016 年批准上市的首个抗 PD-L1 癌症免疫治疗药物，根据最新的 Atezolizumab 治疗局部晚期或转移性尿道膀胱癌三期临床试验（IMvigor211）试验结果表明：Atezolizumab 未满足 III 期 IMvigor211 试验的主要临床终点，即改善局部晚期或转移性尿路上皮癌（mUC）患者二线治疗的总生存期（OS），在共 234 例患者（atezolizumab 组 116 例，化疗组 118 例）中，atezolizumab 组的中位总生存期为 11.1 个月，化疗组为 10.6 个月;该人群中可评估患者的确诊客观反应率分别为 23%和 22%，中位反应持续时间为 15.9 个月对 8.3 个月。

[11] 该人群的中位无进展生存期为 2.4 个月（对照为 4.2 个月），在意向治疗人群的探索性分析中，12 个月的总生存率数据：atezolizumab 为 39.2%，化疗为 32.4%; atezolizumab 的中位总生存期为 8.3 个月，紫杉烷为 7.5 个月，长春氟宁为 9.2 个月。（The ASCO Post, IMvigor211 Trial: Atezolizumab vs Chemotherapy in Platinum-Treated Advanced Urothelial Carcinoma, Matthew Stenger, 9/17/2018）

[12] 此外，由于美国数据监测委员会观测到使用 Atezolizumab 单一疗法与基于铂的化疗疗法相比，发现了 PD-L1 的低表达肿瘤患者的存活率下降的问

题，因此在 2018 年 6 月，美国 FDA 发出了限制 Atezolizumab（Tecentriq）在适合含顺铂化疗的局部晚期或转移性尿路上皮癌患者中使用的要求。要求在使用 Atezolizumab 前需先行检测 PD-L1 表达水平。这进一步表明了 Atezolizumab 应用于治疗尿路上皮癌的局限性。

[13]2.百时美施贵宝公司的 Nivolumab 于 2017 年被 FDA 批准用于局部晚期或转移性尿路上皮癌患者，Nivolumab 是一种抗 PD-1 单克隆抗体，临床数据显示，Nivolumab 的客观缓解率(ORR)为 19.6%，中位数总生存率为 8.7 个月，最常见严重不良事件包括：尿路感染，败血症，腹泻，小肠梗阻，以及总体健康状况退化。最常见的不良反应包括疲劳，肌与骨骼疼痛，恶心，以及食欲减退。17%患者因不良反应停止 Nivolumab 治疗，46%患者因不良反应延迟给药。在临床开展中，出现了 3 例患者由于肺炎或心血管衰竭导致与治疗相关的死亡。

[14] 综合以上内容来看，目前临床阶段的 PD-L1/PD-1 免疫治疗药物的主要问题是治疗效果不佳，主要体现在客观缓解率（ORR）和中位数总生存期等治疗数据方面不理想，另一个主要问题是严重不良反应占比相对较高，例如：Nivolumab 在相关临床试验中造成 3 例死亡病例。

[15] 3. 强生公司旗下的杨森公司的 erdafitinib 在 2018 年被 FDA 授予突破性药物资格，用于治疗接受化疗后病情进展且肿瘤中存在特定成纤维细胞生长因子（FGFR）基因改变的局部晚期或转移性尿路上皮癌患者的治疗，该药物属于一种成纤维细胞生长因子受体（FGFR）酪氨酸激酶抑制剂；其二期临床研究 （BLC2001，NCT02365597）的结果显示，erdafitinib 治疗的总缓解率为 40%（完全缓解率 3%，部分缓解率 37%），中位无进展生存期为 5.5 个月，中位总生存期 13.8 个月，在总计 99 例患者中，7 例患者因治疗相关不良事件停止治疗（https://www.jnj.com/media-center/press-releases/erdafitinib-phase-2-study-results-show-promise-in-the-treatment-of-metastatic-urothelial-cancer）。由于该药的治疗靶点是 FGFR，因此，其仅适用于具有某些 FGFR 基因突变的尿路上皮癌患者，而 FGFR 仅在 15%至 20%的转移性尿路上皮癌和 40%至 70%的非肌层浸润性膀胱癌过表达（2018 ASCO Annual Meeting，Responses Found in Advanced Urothelial Carcinoma With FGFR Inhibitor）。

[16]从目前的治疗来看，晚期尿路上皮癌恶性程度高，预后差，特别是常规化疗失败后，治疗手段有限，免疫治疗仅能使部分患者获益，而且可用的免疫治疗抑制剂数量也极为有限，客观缓解率不高，治疗副作用较大，或者使

用存在特定基因要求；目前患者能够选择的治疗药物并不多，因此，仍需要开发治疗效果更为显著、适用更广的药物，以满足临床的迫切需求。

发明内容

[17] 本发明公开了一种治疗尿路上皮癌的方法，所述方法包括向患者注射有效量的抗体药物偶联物（ADC），所述 ADC 为抗 HER2 抗体偶联细胞毒分子。所述细胞毒分子包括但不限于微管蛋白抑制剂或 DNA 损伤剂。所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素（dolastatin）及奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒分子，美登素（maytansine）类细胞毒分子；所述 DNA 损伤剂包括但不限于卡奇霉素（calicheamicin）类、倍癌霉素（duocarmycin）类、安曲霉素类衍生物 PBD（pyrrolobenzodiazepine，吡咯并苯并二氮杂䓬）、喜树碱类衍生物 SN-38。所述奥瑞他汀（auristatin）类细胞素分子包括但不限于单甲基澳瑞他汀 E(monomethyl auristatin E；MMAE)、单甲基澳瑞他汀 F(monomethyl auristatin F；MMAF)、和澳瑞他汀 F(auristatin F；AF)或它们的衍生物，所述美登素类细胞毒分子包括但不限于 DM1、DM3、DM4 或它们的衍生物（抗体药物偶联物的弹头分子研究进展，胡馨月等，中国医药生物技术，2017 年 12 月，第 12 卷第 6 期）（美登素类抗体药物偶联物研究进展，周磊等，中国新药杂志 2016 年第 25 卷第 22 期，第 2521-2530 页）。所述细胞毒分子还可以是瓢菌素(amanitins)、蒽环类物(anthracyclines)、浆果赤霉素(baccatins)、喜树碱(camptothecins)、西马多丁(cemadotins)、秋水仙碱(colchicines)、秋水仙胺(colcimids)、考布他汀(combretastatins)、隐菲辛(cryptophycins)、圆皮海绵内酯(discodermolides)、多烯紫杉醇(docetaxel)、阿霉素(doxorubicin)、棘霉素(echinomycins)、艾榴塞洛素(eleutherobins)、埃博霉素(epothilones)、雌莫司汀(estramustines)、偏端霉素(lexitropsins)、美登素(maytansines)、氨甲蝶呤(methotrexate)、纺锤菌素(netropsins)、嘌呤霉素(puromycins)、根瘤菌素(rhizoxins)、紫杉烷(taxanes)、微管蛋白裂解素(tubulysins)、或长春花生物碱(vinca alkaloids)。所述细胞毒分子不限于上述类别，包括所有可用于 ADC 的药物。

[18] 本发明的另一个方面是提供了一种抗体药物偶联物（ADC）在制备用于治疗膀胱癌的药物中的用途； 所述抗体药物偶联物包含结合 HER2 的抗体或其功能性片段，其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中(i)所述重链可变区包含三个 CDR 区，其中所述 CDR 区的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO：1、2 和 3 所示的氨基酸序列；和(ii)所述轻链可变区包含三个 CDR 区，其中所述 CDR 区的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO：4、5 和 6

所示的氨基酸序列。所述抗体还可以是与上述 CDR 限定的抗体竞争性结合相同或相近表位的抗体。

[19] 本发明中，术语“抗体”可以包括全长抗体或与 HER2 结合、反应性相关、或复合的抗体片段。抗体可以是任何蛋白质、类蛋白质分子、或多肽，其与寻求治疗性修饰的细胞群的一部分结合、复合、或反应。所述抗体可为嵌合抗体或其功能活性片段、人源化抗体或其功能活性片段、人类抗体或其功能活性片段。亦可为上述物种以外的其他物种的抗体或其其功能活性片段，例如：小鼠抗体或其功能活性片段、大鼠抗体或其功能活性片段、羊抗体或其功能活性片段、兔子抗体或其功能活性片段。抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体。于一些实施例中，抗体可为双特异性抗体。此外，抗体也可为功能性活性片段、抗体的衍生物或类似物。 “功能性”代表所述片段、衍生物或类似物可辨认相同的抗原，辨认衍生自抗原的片段、衍生物或类似物的抗体，例如但不限于：$F(ab')_2$、Fab、Fab’、Fv 片段及抗体的重链及轻链二聚体、或其任何最小片段像是 Fvs 或单链抗体(SCAs)。此外，抗体可为抗体的融合蛋白。抗体也可包括经修饰或未经修饰(亦即，通过任何分子的共价连接)的类似物和衍生物，只要这样的共价连接允许抗体保留其抗原结合免疫特异性。例如但不限于：抗体的类似物和衍生物，包括经过进一步修饰，例如：糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻隔基衍生化、蛋白酶切割、连接至细胞抗体单元或其他蛋白质等。可利用已知技术实现任何大量的化学修饰，包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素存在下的代谢合成等。此外，类似物或衍生物可包括一种或多种非天然氨基酸。在一些实施例中，抗体可在与 Fc 受体作用的氨基酸残基中具有修饰(例如：取代、删除、或增加)。另一方面，所述抗体药物偶联物具有通式 Ab-(L-U)n 的结构，其中 Ab 表示所述的抗体或其功能性片段，L 表示接头； U 表示偶联的细胞毒分子， n 为 1 至 8 的整数，代表每一抗体上结合的治疗剂的分子数量。

另一方面，所述接头与所述抗体或其功能性片段通过巯基和/或氨基连接，所述细胞毒分子定点或非定点偶联所述抗体。本发明的接头可以选自以下列表中的接头：

缩写	全称	类别与作用机制
mc	Maleimidocaproyl	不可切割[12]
mc-vc-pAB	Maleimidocaproyl valine citrulline p-amino-benzyl	可切割[12]
3-MPA	3-maleimido-propionic acid	不可切割[12]
Mal-di-EG-OPFP	perfluorophenyl 3-(2-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)ethoxy)ethoxy)propanoate	不可切割[24]
Mal-di-EG-OSu	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)propanoate	不可切割[24]
Mal-Tri-EG-OSu	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoate	不可切割[24]
Mal-Tetra-EG-OSu	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oate	不可切割[24]
Br-di-EG-OSu	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(2-bromoacetamido)ethoxy)ethoxy)propanoate	不可切割[24]
Py-ds-prp-OSu	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(pyridin-2-yldisulfanyl)propanoate	可还原的[24]
Py-ds-Prp-OPFP	perfluorophenyl 3-(pyridin-2-yldisulfanyl)propanoate	可还原的[24]
Py-ds-dmBut-OSu	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-methyl-4-(pyridin-2-yldisulfanyl) pentanoate	可还原的[24]
Py-ds-dmBut-OPF	perfluorophenyl 4-methyl-4-(pyridin-2-yldisulfanyl)pentanoate	可还原的[24]
SMCC	N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylate	不可切割[23]
MBS	3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester	不可切割[23]
SATA	S-(N-succinimidyl) thioacetate	不可切割[23]
SPDP	N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate	可还原的[23]
SMPT	[(N-succinimidyloxy carbonyl)-1-methyl-1-(2-pyridyldithio) toluene	可还原的[23]

本发明的接头优选马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苄氧基（Maleimido-Caproyl-Valine-Citrulline-p-Aminobenzyloxy, mc-vc-pAB）和马来酰亚胺基己酰基（Maleimidocaproyl，mc）。

本发明的接头也可选择三甘氨酸肽接头（triglycyl peptide linker），该接头是近年来开发的用于 ADC 药物偶联物的新接头。（Rajeeva Singh et al, A New Triglycyl Peptide Linker for Antibody–Drug Conjugates (ADCs) with Improved Targeted Killing of Cancer Cells, MCT-16-002, Published June 2016.），此外，也可以选择葡萄糖醛酸接头（glucuronide-tubulysin）（Patrick J. Burke et al, Glucuronide-linked antibody-tubulysin conjugates display activity in MDR+ and heterogeneous tumor models, Molecular Cancer Therapeutics,2018）。

另一方面，其中所述抗体或其功能性片段衍生自在 2013 年 08 月 22 日以保藏编号 CGMCC No.8102 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的杂交瘤所分泌的抗体；地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号；另一方面，其中所述抗体是人源化抗体，优选地所述抗体是在 2013 年 11 月 06 日以保藏编号 CCTCC C2013170 保藏于中国典型培养物保藏中心的 CHO 细胞所分泌的抗体。地址：湖北 武汉 武汉大学

[20] 在一个实施例中，所使用的抗体药物偶联物名称为 RC48-mc-vc-pAB

–MMAE，符合通式 Ab-(L-U)n 的结构，RC48（一种人源化的抗 HER2 单克隆抗体）通过连接子 mc-vc-pAB 偶联 MMAE，偶联数量为 1-8 个不等，包括偶联 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个或为偶联 1-8 个 MMAE 数量不等的抗体药物偶联物的组合。

[23] 本发明中，所述尿路上皮癌为无法接受手术切除的局部进展尿路上皮癌、局部晚期或转移性尿路上皮癌、HER2（人类表皮生长因子受体 2，也称之为 ErbB-2、c-erbB2 或 HER2/neu）阳性尿路上皮癌、HER2 阳性局部晚期或转移性尿路上皮癌。

[24] 本发明中所述药物可通过鼻内、皮下、皮内、肌内或静脉内施用。

所述药物还包括药学上可接受的载体；所述药物优选为冻干剂或液体制剂；所述载体包括稳定剂、保护剂、缓冲液、冻干保护剂、活性保护剂、表面活性剂、吸附载体、吸收促进剂中的一种或多种。

附图说明

[25] 图 1：纯化人重组蛋白 HER2-ECD 的 SDS-PAGE 图，经考马斯亮蓝染色。每孔上样量为 10μg。

[26] 图 2：表示 cRC48（嵌合抗体），RC48（人源化抗体）的 SDS-PAGE 分析图，抗体每孔上样量为 2μg。

[27] 图 3：显示了通过 ELISA 实验测定的人源化抗体 RC48 的 HER2-ECD 的结合亲和力，并计算出结合亲和力常数 Kd。本实验中 Herceptin 和 cRC48 作为对照。

[28] 图 4A:表示用流式细胞术分析抗 HER2 人源化抗体 RC48 结合 HER2+细胞 SK-BR3，BT474，HER2-细胞 MDA-MB468 的能力。

[29] 图 4B:显示流式细胞术分析不同抗体浓度下抗 HER2 抗体结合 BT474 细胞表面抗原的能力。抗 HER2 抗体包括 Herceptin，cRC48，RC48。共分析了 5×10^4 个细胞。

[30] 图 5：表示 RC48 只对 HER2 表现出特异性结合亲和力，而对 EGFR，HER3，HER4 没有结合。

[31] 图 6. 受试者编号 01001 疗效示意图

患者基本情况：女，57 岁，右肾盂癌术后，多发肺转移。病理诊断尿路上皮癌，HER2 IHC 3+；

[32] 图 7. 受试者编号 01003 疗效示意图

患者基本情况：女，45 岁，右肾盂癌术后，腹腔淋巴结转移。病理诊断尿路上皮癌，HER2 IHC 3+ 。

[33] 图 8. 受试者编号 01007 疗效示意图

患者基本情况：男，63 岁，膀胱癌术后，右肾盂癌术后，肺转移，肝转移，颈部淋巴结转移，纵隔转移，多发骨转移。病理诊断尿路上皮癌，，HER2 IHC 3+；

具体实施方式

[34]实施例 1.鼠源单克隆抗体 mRC48 的制备与序列分析

[35]1、HER2 抗原的表达和纯化

[36]编码 HER2-ECD(氨基酸 Thr23 至 Thr652，GenBank 登录号为 M11730)的 cDNA 片段通过 PCR 克隆到 pcDNA3(Invitrogen 公司)表达载体上。

[37]具体方法为：通过 RT-PCR 方法从 HER2+SKBR3 细胞株(ATCC 号：HTB-30)中获得 HER2-ECD 编码区的 cDNA(试剂盒采用 Promega 公司的 ImProm-IITM Reverse Transcription System 逆转录系统)。

[38]引物为：P1：5’CGGGATCCTGCCACCAGCTGTGCGCC(SEQ ID NO：7)，P2：5’ GCTCTAGA TCAGTTGATGGGGCAAGGCT(SEQ ID NO：8)，下划线序列分别为引入的 BamHI、XbaI 酶切位点，以反转录的 HER2-ECD 的 cDNA 为模板用上述引物进行 PCR 扩增，扩增条件是：94℃变性 30s，60℃退火 30s，72℃延伸 1 分钟，循环 30 次，最后 72℃ 延伸 10 分钟。然后将 PCR 片段回收，用 BamHI 和 XbaI 酶(NEB)进行酶切，与 pcDNA3 载体连接。HER2-ECD 的 C 末端加入了一个多聚组氨酸标签以方便纯化。用构建的 DNA 表达载体转染 HEK293 细胞(美国 ATCC)，利用 Ni-NTA 亲和层析(Qiagen)从细胞培养液中纯化 His-标记的可溶性蛋白 HER2-ECD。SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色表明纯化的 HER2-ECD 蛋白具有 95%以上的同质性，结果见图 1。可溶性的 HER2-ECD 以单体形式出现，相对分子量约为 75kDa，比计算的分子量(71kDa)稍大，表明蛋白在 HEK293 细胞中进行了糖基化。将纯化得到的 HER2-ECD 蛋白进一步浓缩，并转移到无菌 pH7.4 的 PBS 缓冲液中，用于随后的体内和体外分析。

[39]2、杂交瘤细胞的生产与筛选

[40]使用上述制备的 HER2-ECD 作为抗原免疫小鼠，制备单克隆抗体。免

疫反应、杂交瘤细胞融合和初筛都按照标准步骤(参考文献：WHO Technical Report Series，No.822，1992 Annex 3)进行。0.25ml HER2-ECD 蛋白(50-100μg)和 0.25ml 弗氏完全佐剂(Difco Lab)等体积混合均匀后免疫 4 只 Balb/c 小鼠(购自上海斯莱克实验动物有限责任公司)，间隔 2 周后进行第 2 次注射，用弗氏不完全佐剂(Difco Lab)，抗原量为 25-50μg/0.5ml/只小鼠，间隔 3 周后进行第 3 次注射，注射剂量同第 2 次，第 3 次注射后 10 天取血。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠的血清，将血清中抗 HER2 抗体滴度最大的 2 只小鼠的脾脏取出，然后与骨髓瘤细胞 P3X63Ag8(ATCC CRL-1580)融合。将融合细胞稀释到 10 块 96 孔板上,根据与 HER2-ECD 的结合能力用 ELISA 方法进行初筛。在典型的 ELISA 实验中，用 HER2-ECD(0.2-1μg/ml)包被 Nunc Maxisorb 96 孔板，然后用梯度稀释的小鼠血清或杂交瘤上清液(100μL)孵育。鼠源的抗 HER2 抗体用辣根过氧化物酶偶联的山羊 F(ab′)2 抗鼠 IgG Fc 特异的二抗(Invitrogen 公司)进行检测。

[41]用 ELISA 法对 400 个杂交瘤细胞株的上清液进行筛选，其中 36 个表现出强的 HER2-ECD 结合力。选择 HER2 结合能力最强的十株杂交瘤细胞，通过有限稀释方法筛选亚克隆杂交瘤细胞株。通过悬浮亚克隆杂交瘤细胞株培养，蛋白纯化，用 ELISA 确定 HER2 的结合亲和力，用流式细胞仪(BD FACS Calibur)来进一步测试上述抗体对自然表达在人乳腺癌细胞株表面的 HER2 的结合能力(更详细的描述见实施例 4)。最终通过序列分析确定了一株杂交瘤细胞系 mRC48(鼠源 IgG1k)，它具有强的 HER2 结合能力。所述杂交瘤细胞 mRC48 在 2013 年 08 月 22 日以保藏编号 No.8102 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(转为按照布达佩斯条约之保藏的日期为 2013 年 10 月 29 日)。

[42]3、抗 HER2 杂交瘤细胞克隆 mRC48 的序列分析

[43]上述杂交瘤细胞克隆 mRC48 重链和轻链的可变区根据说明书利用商业试剂盒 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit(Clontech 公司)快速扩增 5’末端进行测序。

[44]用 RNApure Tissue Kit(北京康威世纪生物科技有限公司)从杂交瘤细胞中提取总 RNA，使用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 进行总 RNA 的反转录，以总 RNA 为模板，利用试剂盒中的引物，加入反转录酶 SMARTScribeTM Reverse Transcriptase，按照试剂盒提供的步骤进行反转录获得 RACE-Ready 第一链 cDNA，然后进行两轮 PCR，第一轮 PCR 以获得的 cDNA 为模板，试剂盒中提供的 UPM 为 5’端引物，3’端引物为

mRC48-VL-1/mRC48-VH-1。PCR 反应条件为：94℃预变性 5min；25 个扩增循环(94℃变性 30s，68℃退火 30s，72℃延伸 2min)；最后 72℃延伸 10min。

[45]第二轮 PCR，以第一轮 PCR 的产物为模板，以试剂盒中提供的 NUP 为 5’端引物，3’端引物为 mRC48-VL-2/mRC48-VH-2，PCR 反应条件为：94℃预变性 5min；25 个扩增循环(94℃变性 30s，68℃退火 30s，72℃延伸 2min)；72℃延伸 10min。这样既获得上述杂交瘤细胞克隆 mRC48 重链和轻链的可变区。

[46]具体引物序列如下：

mRC48-VL-1:5’-GTTGGTGCAGCATCAGCCCGTT - 3’（SEQ ID NO.9）

mRC48-VL-2: 5’-GTTCACTGCCATCAATCTTCCAC-3’（SEQ ID NO.10）

mRC48-VH-1:5’-GCCAGTGGATAGACAGATGG- 3’（SEQ ID NO.11）

mRC48-VH-2:5’-AGGTCACTGTCACTGGCTCAG - 3’（SEQ ID NO.12）

[47]PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行纯化，并亚克隆到 pCR2.1TOPO 克隆载体上(Invitrogen 公司)。通过 PCR，获得 10 个独立克隆的质粒 DNA，进而用 M13 正向和反向引物测序。DNA 序列分析表明，这 10 个克隆都具有编码相同 VH 或 VL 多肽的 cDNA。互补决定区(CDR)的氨基酸序列通过 Kabat 编码表定义，并在表 1 中列出。序列比较分析表明，抗 HER2 mRC48 的 CDR 与已知的 HER2 抗体包括 Herceptin(曲妥珠单抗)有显著区别。

[48]表 1.抗 HER2 单克隆抗体 mRC48 CDR 的氨基酸序列

	重链 (VH)	轻链(VL)
CDR1	DYYIH (SEQ ID NO. 1)	KASQDVGTAVA (SEQ ID NO. 4)
CDR2	RVNPDHGDSYYNQKFKD (SEQ ID NO. 2)	WASIRHT (SEQ ID NO. 5)
CDR3	ARNYLFDHW (SEQ ID NO. 3)	HQFATYT (SEQ ID NO. 6)

实施例 2.抗 HER2 单克隆抗体 mRC48 的人源化(源引自 CN105008398A 中相应方法)

[49]通过移植轻链或重链 CDR 到人的 IgG1 κ 框架区来人源化鼠抗 HER2 单克隆抗体 mRC48。

[50]设计了人源化 RC48 抗体的轻链可变区(RC48-VL)，以及人源化 RC48 抗体的重链可变区(RC48-VH)，从而组合成为人源化抗 HER2 抗体：RC48。RC48-VH 的整体序列与人 IgG1VH 基因的相似性分别 84%。RC48 抗体包含轻链可变区 RC48-VL 和重链可变区 RC48-VH。

[51]人源化抗 HER2 单克隆抗体 RC48 通过 CDR 移植的方法获得，重链或轻链可变区是由南京金斯瑞生物科技有限公司直接合成，合成的可变区包括 Kozak 共有序列、起始密码子，重链或轻链信号肽，人源框架区和鼠源 CDR，可变区与人 IgG1k 恒定区是通过重叠延伸 PCR 的方法连接成完整片段。

[52]重叠延伸 PCR 的引物是：

[53]重链 VH1：5 CGCGGATCC GCCGCCACCATGGGATGGAGCT3′ (SEQ ID NO：13)

[54]VH2:5GATGGGCCCTTGGTGCTAGCGGAGCTCACTGTCACCAG TGTT3 (SEQ ID NO：14)

[55]CH1：5 GCTAGCACCAAGGGCCCATC 3 (SEQ ID NO：15)

[56]CH2：5 CCGGAATTCTTTACCGGGAGACAGGGAGA 3 (SEQ ID NO：16)

[57]轻链：VL1：5 CGCGGATCC GCCGCCACCATGGACATGAGGGT 3 (SEQ ID NO：17)

[58]VL2：5 GATGGTGCAGCCACAGTACGCTTTATCTCAACTTTTG T 3

[59]AC3 (SEQ ID NO：18)

[60]CL1：5 CGTACTGTGGCTGCACCAT 3 (SEQ ID NO：19)

[61]CL2：5 CCGGAATTCACACTCTCCCCTGTTGAAGC 3 (SEQ ID NO：20)

[62]对于重链的扩增，首先以合成的可变区为模板，以 VH1 和 VH2 为引物，人 IgG1κ 重链恒定区为模板，以 CH1 和 CH2 为引物，分别扩增重链的可变区、恒定区，扩增条件均是：94℃变性 30s，60℃退火 30s，72℃延伸 1 分钟，循环 30 次，最后 72℃延伸 10 分钟。再以两次的 PCR 产物为模板，VH1 和 CH2 为引物，扩增 RC48 的重链序列。扩增条件均是：94℃变性 30s，60℃退火 30s，72℃延伸 2 分钟，循环 30 次，最后 72℃延伸 10 分钟。

[63]对于轻链的扩增，首先以合成的可变区为模板，以 VL1 和 VL2 为引物，以人 IgG1κ 轻链恒定区为模板，以 CL1 和 CL2 为引物，分 别扩增轻链的可变区、恒定区，扩增条件均是：94℃变性 30s，60℃退火 30s，72℃延伸 1 分钟，循环 30 次，最后 72℃延伸 10 分钟。再以两次的 PCR 产物为模板，VL1 和 CL2 为引物，扩增轻链序列。扩增条件均是：94℃变性 30s，60℃退火 30s，72℃延伸 2 分钟，循环 30 次，最后 72℃延伸 10 分钟。

[64]因此，得到了人源化抗 HER2 单克隆抗体 RC48，其中 RC48 包含人 IgG1κ 重链恒定区和重链可变区 RC48-VH，以及人 IgG1κ 轻链恒定区和轻链可变区 RC48-VL。

[65]人-鼠嵌合抗体 cRC48 也是通过相同的方法获得，将鼠的可变区和人 IgG1k 恒定区通过重叠延伸 PCR 的方法连接成完整片段。

[66]将上述扩增得到的各片段分别亚克隆到表达载体 pcDNA3.0 上。将构建的不同质粒转染到悬浮 CHO 细胞(Invitrogen)中，以产生不同的重组抗体，并利用 Protein A 进行纯化和后续的特征分析。嵌合的抗-HER2 RC48(被称为 cRC48)是由鼠-人嵌合 cRC48 重链和轻链组成。RC48 包括人源化重链 RC48-VH 和人源化轻链 RC48-VL。cRC48 和 RC48 都能够表达，从 CHO 细胞上清液中收集所述抗体，经 Protein A 进行纯化，在还原与非还原条件下用 SDS-PAGE 分析(见图 2)。如上所述分泌 RC48 抗体的 CHO 细胞(即转染了人 IgG1κ 重链恒定区和重链可变区 RC48-VH，以及人 IgG1κ 轻链恒定区和轻链可变区 RC48-VL 的 CHO 细胞)在 2013 年 11 月 06 日以保藏编号 C2013170 保藏于中国典型培养物保藏中心。

[67]实施例 3.抗 HER2 RC48 抗体的表征分析

[68]用 ELISA 法测定 cRC48(嵌合抗体)和 RC48 抗体(人源化抗体)的 HER2-结合亲和力常数(Kd)，具体方法可见实施例 1，即以可溶性 HER2-ECD 蛋白包被 96 孔板，之后与稀释的抗体(Herceptin 和嵌合 cRC48 作为对照)一起孵育，对于与 HER2-ECD 相关的抗体(所有形式的人 IgG1κ)用 HRP-偶联的羊 F(ab')2 抗-人 IgG Fc-特异性二抗进行检测(invitrogen)。绘制结合曲线并进一步用单一位点特异性结合非线性方程(Journal of Immunological Methods，270：155-162，2002)，为每一个抗 HER2 抗体计算表面结合亲和力常数(Kd)值(图 3 中展示的是由 3 次独立的 ELISA 实验得出的一条典型 HER2-结合 曲线)。ELISA 试验结果见图 3。

[69]从 3 次独立的测定试验可知，与 cRC48(平均亲和常数 77pM)和 Herceptin(平均亲和常数 97pM)相比， RC48（人源化抗体）有显著提高的 HER2-ECD 结合亲和力，平均亲和常数为 44pM，结果见表 2。

[70]表 2.本发明的抗体与 Herceptin 的平均亲和常数比较

样品	平均亲和常数
Herceptin	97pM
cRC48	77pM
RC48	44pM

[71]实施例 4.RC48（人源化抗体）与 HER2 的结合力

[72]1)RC48 抗体与 HER2 的结合亲和力试验

[73]利用流式细胞仪来检测人乳腺癌细胞内源表达的 HER2 与人源化抗 HER2 抗体 RC48 的结合力，结果见图 3。用 6μg 对照组人 IgG、Herceptin、cRC48、RC48 分别与两种 HER2+细胞系人乳腺癌细胞 SK-BR-3、BT474 以及 HER2-细胞 MDA-MB468(2×10^7 个细胞)共同孵育，冰上孵育 30-45 分钟。用 4ml 冷的 PBS 充分洗涤 2 次之后，细胞表面结合的抗体通过偶联 R-PE 的山羊抗人 IgG Fc(15μl，25μg/mL)特异性二抗检测，然后利用流式细胞仪(BDFACSCalibur)进行分析。对照组人 IgG1 没有检测出与上述三种癌症细胞的结合。相比而言，Herceptin、cRC48、RC48 与两种 HER2 阳性细胞强

烈结合，但与 HER2 阴性细胞不结合，这说明这种结合是 HER2 特异性的(如图 4a 所示)。通过比较同种对照组的平均荧光强度发现，与 Herceptin 和 cRC48 相比，RC48 表现出更高的结合亲和力。通过滴定抗 HER2 抗体的浓度，以及流式细胞术中分析的细胞数目，得出基于细胞的抗 HER2 的抗体与细胞表面 HER2 的结合曲线，结果见图 4b。人源化的抗 HER2 抗体 RC48 表现出明显的结合亲和力，与 BT474 细胞表面 HER2 结合亲和力 Kd 为 4nM，Herceptin、cRC48 分别为 10nM 和 5nM，结果见表 3:

样品	结合亲和力 Kd
Herceptin	10nM
cRC48	5nM
RC48	4nM

[74]2)抗原结合特异性试验

[75]用 ELISA 方法测定 Herceptin、cRC48、RC48 结合不同的表面抗原 EGFR、HER2、HER3、HER4 的能力。ELISA 方法见实施例 1。分别用抗原 EGFR、HER2、HER3、HER4 包被 96 孔板，每孔上样量为 20ng，用不同的抗 HER2 抗体进行孵育，即 Herceptin、cRC48、RC48 抗体，然后用辣根过氧化物酶偶联的羊 F(ab′)2 抗鼠 IgG Fc 特异的二抗(Invitrogen 公司)进行检测。结果见图 5，结果表明 Herceptin、cRC48、RC48 抗体与 EGFR、HER3、HER4 几乎无结合力，而与 HER2 有强的结合力，说明 Herceptin、RC48 对 HER2 的结合有高度的特异性。

[76]实施例 5.抗体偶联物的制备

[77]1)单克隆抗体 RC48 的纯化

[78]经 Protein A 从 CHO 细胞培养液中捕获得到 RC48 的单克隆抗体，SDS-PAGE 电泳及 SEC 分析纯度达到 95%以上。用 30KD 膜包将所获抗体蛋白超滤透析到 PBS 缓冲液中，浓缩，用紫外吸光光度计标定浓度，用于后续的偶联反应。

[79]2)单克隆抗体 RC48 与药物分子的偶联

[80]用 PBS 缓冲液分别配制还原剂和保护剂如下：1～20mmol/L

TCEP(Tris-2-carboxyethyl-phosphine)、1～20mmol/L DTPA(Diethylene triamine pentacetate acid)母液，还原剂用量根据所需偶联率不同可在一定浓度范围内添加，与一定浓度单克隆抗体(如：5～30mg/ml)按照一定体积比(如1：1)混合，TCEP与抗体的终浓度摩尔比0.5～6.0：1，于25℃搅拌反应2h。用DTNB法于412nm检测自由巯基浓度，与抗体的摩尔比计算自由巯基个数。TCEP还原可重复性好，还原后自由巯基数可以达到1.0-8.0。

[81]TCEP还原后抗体可直接进行后续偶联。配制一定浓度(10mM)药物(vc-MMAE、vc-MMAF、mc-MMAF)(购自上海皓元化学科技有限公司)溶于25%的DMSO(dimethyl sulfoxide，二甲亚砜)，按照药物与巯基的摩尔比0.3～2.8：1缓慢加药，于25℃搅拌反应2h。用DTNB法于412nm检测自由巯基浓度(接近0)，Sephadex G-25纯化除去残余未反应药物以及DMSO等游离小分子，SDS-PAGE电泳、反相高效液相(R-HPLC)疏水高效液相(HIC-HPLC)法检测偶联情况。

[82]实施例6.抗体药物偶联物亲和力的测定

[83]ELISA法测亲和力

[84]用重组蛋白HER2-ECD(浓度为0.5mg/ml)包被ELISA板，2℃-8℃过夜。洗板机洗板3次。3%BSA-PBST溶液封闭，37度2h。洗板机洗板3次。加样：用PBST溶液稀释标线从1000ng/ml起梯度稀释11个点，100μl/孔，37度2h。洗板机洗板3次。用PBST溶液稀释二抗(山羊抗人IgG-Fc-HRP)5000倍。加入TMB显色液显色，室温避光显色8-10分钟。用2M H2SO4终止试验，酶标仪450/655nm处读数。结果见表4。

[85]表4.抗体药物偶联物与T-DM1亲和力比较（VC为mc-vc-pAB缩写）

样品	亲和力 ng/ml	摩尔当量 pmol/L
RC48-VC-MMAE	2.237	15.22
RC48-VC-MMAF	3.349	13.51
RC48-MC-MMAF	2.902	16.42
T-DM1	2.376	15.16

[86]由结果可知，RC48-VC-MMAE（即RC48-mc-vc-pAB–MMAE）、RC48-VC-MMAF、RC48-MC-MMAF的HER2-ECD亲和力与T-DM1相当。

[87] 实施例7. 单药治疗HER2阳性局部晚期或转移性尿路上皮癌的有效性和安全性实验

[88] 本实验的目的是评价单药治疗 HER2 阳性局部晚期或转移性尿路上皮癌的有效性和安全性。所使用的抗体药物偶联物为 RC48-mc-vc-pAB–MMAE，RC48 通过连接子 mc-vc-pAB 偶联 MMAE，偶联数量为 1-8 个不等。

[89] 其中对于受试者的选择标准为：

年龄：18 岁(最小年龄)至 80 岁(最大年龄)

其中入选标准为：

1.自愿同意参与研究并签署知情同意书；

2.男性或女性，年龄大于等于 18 岁且小于 60 岁；

3.预期生存期大于等于 12 周；

4.具有病理学确诊的无法接受手术完全切除的局部进展或转移性膀胱尿路上皮癌；

5.受试者确诊为无法手术切除的局部进展或转移性疾病后接受过至少一线全身化疗后出现疾病进展或不能耐受；

6.至少具有 RECIST 1.1 标准规定的可测量病灶；

7.中心实验室确认的 HER2 表达阳性；

8. ECOG 体力状况 0 或 1 分；

9.足够的心、骨髓、肝、肾功能；

10.对于女性受试者：应为手术绝育、绝经后的患者，或同意在研究治疗期间和研究治疗期结束后 6 个月内至少采用一种经医学认可的避孕措施（如宫内节育器，避孕药或避孕套）；男性受试者应同意在研究治疗期间和研究治疗期结束后 6 个月内至少采用一种经医学认可的避孕措施（如避孕套、禁欲等）；

11.愿意且能够遵从试验和随访程序安排。

[90] 同时，排除标准为：

1. 已知对重组人源化抗 HER2 单抗-MMAE 偶联剂药物及其组分过敏者；

2. 研究治疗开始前 4 周内接受过其他抗肿瘤治疗；

3. 既往接受过重组人源化抗 HER2 单抗-MMAE 偶联剂药物；

4. 研究给药开始前 4 周内进行过大型手术且未完全恢复；

5. 研究给药开始前 4 周内接种过活疫苗或计划在研究期间接受任何疫苗；

6. 其他可能影响方案依从性或干扰结果解释的严重的、无法控制的伴随疾病；

7. 研究给药开始前 5 年内患有其他恶性肿瘤；

8. 患有中枢神经系统转移和/或癌性脑膜炎；

9. 有在过去 2 年内需要系统治疗的活动性自身免疫性疾病；

10. 既往接受过异体造血干细胞移植或实体器官移植；

11. 伴有临床症状或需要对症处理的大量胸水或腹水；

12. 妊娠或哺乳期妇女；

13. HIV 检测结果阳性；

14. 活动性乙型肝炎或丙型肝炎患者；

15. 活动性结核病史；

16.患有任何其它疾病，代谢异常，体格检查异常或实验室检查异常，根据研究者判断，有理由怀疑患者具有不适合使用研究药物的某种疾病或状态，或者将会影响研究结果的解读，或者使患者处于高风险的情况；

17. 估计患者参加本临床研究的依从性不足。

[91]具体实验方法：

[92]本研究将纳入既往接受过至少一线全身化疗失败或不能耐受的局部晚期或转移性尿路上皮癌受试者，且具有可测量病灶，一般情况及器官功能良好。所有受试者送检肿瘤组织病理切片至中心实验室检测确认 HER2 表达阳性，其阳性定义为免疫组化（IHC）为 2+或 3+（无论荧光原位杂交[FISH]检测结果）。

[93]本研究中 HER2 免疫组化（IHC）的结果判定依据中国《乳腺癌 HER2 检测指南（2014 版）》中的 HER2 判读标准。具体如表 5 所示。

[94] 表 5 中国《乳腺癌 HER2 检测指南（2014 版）》中的 HER2 判读标准。

评分标准	IHC 结果	HER2 过表达评估
无胞膜着色或≤10%的浸润癌细胞呈现不完整的、微弱的细胞膜染色。	0	阴性
＞10%的浸润性癌细胞呈现微弱的不完整的细胞膜染色。	1+	阴性
＞10%的浸润性癌细胞呈现不完整和/或弱至中等强度的细胞膜染色或≤10%的浸润性癌细胞呈现强而完整的细胞膜染色。	2+	阳性
＞10%的浸润性癌细胞呈现强、完整、均匀的细胞膜染色。	3+	阳性

[95]符合所有研究人群标准的受试者接受 RC48-ADC 治疗（2.0mg/kg，静脉滴注，每 2 周一次），每 6 周进行疗效评价，直至发生疾病进展、不可耐受毒性或主动退出。研究的主要终点指标为独立评估的客观缓解率（ORR），次要研究终点为无进展生存期、总生存期以及治疗的安全性。

[96]研究结果：

[97]该研究于 2017 年 12 月启动，截至 2018 年 7 月 31 日，共入组 18 例受试者接受治疗，其中男性 15 例，女性 3 例，中位年龄 63 岁。原发病灶包括膀胱（50.0%）、肾盂（27.8%）和输尿管（22.2%），主要的转移部位为肺、肝以及淋巴结转移。16 例（88.9%）既往接受过一线铂类治疗。受试者肿瘤 HER2 表达经中心实验室确认的免疫组化（IHC）结果为 11 例（61.1%）IHC2+，7 例（38.9%）IHC3+。

[98] 18 例受试者中有 13 例受试者进行了疗效评估，部分缓解（PR）10 例（4 例已确认 PR(连续两次评效为 PR 称为确认 PR)。根据 RECIST 标准“当每一个受试者符合部分或者完全缓解标准而且在随后的时间点（一般是四周后）再次做疗效确认后才能认为是完全或者部分缓解”，即受试者连续两次评效为 PR，称为确认 PR。其他 6 例还未到再次疗效确认时间点，目前仅完

成一次确认），客观缓解率（ORR）为 76.9%（10/13），疾病控制率（DCR）（13 例疗效评估者中 10 例 PR，2 例疾病稳定（SD））为 92.3%(12/13)。目前受试者最长治疗时间超过 7 个月。获得疾病缓解的受试者中，7 例（53.8%）接受过紫杉类药物治疗，4 例（30.8%）接受过 PD-1/PD-L1 治疗。

[99] 18 例受试者中，有 16 例接受了安全性评估，安全性评估中最常见的治疗相关不良反应（TRAEs）为 ALT 升高（50.0%, 1-2 级）、感觉减退（50.0%, 1-2 级）和白细胞计数降低（50.0%, 1-2 级）；≥3 级的 TRAE 为中性粒细胞计数下降（12.5%，3 级）。无药物相关严重不良事件（SAE）发生。

[100]下方为部分病例直观治疗效果描述：

[101]1.患者 01001：女，57 岁，右肾盂癌术后，多发肺转移。病理诊断尿路上皮癌，HER2 IHC 3+；

[102]根据图 6 可以看出：经过长达 12 周的治疗，其位于右肺下叶的肿瘤病灶经过 6 周、12 周的治疗后，肿瘤病灶从 54×31mm 缩小到 37×23mm，缩小了 49%。

[103]2.患者 01003，女，45 岁，右肾盂癌术后，腹腔淋巴结转移。病理诊断尿路上皮癌，HER2 IHC 3+；

[104] 根据图 7 可以看出：通过 6 周的治疗，其位于右腰大肌旁的肿瘤病灶从 56×48mm 缩小到 33×22mm，缩小了 72.9%。

[105] 3.患者 01007，男，63 岁，膀胱癌术后，右肾盂癌术后，肺转移，肝转移，颈部淋巴结转移，纵隔转移，多发骨转移。病理诊断尿路上皮癌，，HER2 IHC 3+ ；

[106] 根据图 8 可以看出：位于左上肺叶、肝转移、纵隔淋巴结的肿瘤病灶经过为期 6 周的治疗，病灶处的肿瘤面积均有明显的缩小。左上肺叶从 45×36mm 缩小到 28×22mm，减少 61.9%，肝转移处从 38×32mm 缩小到 25×21mm，减少 56.8%，纵隔淋巴结从 29×15mm 缩小到 18×7mm，减少 71.03%。

[107] 以上临床数据及直观病理检测均表明本发明的抗 HER2 单抗-MMAE 偶联剂药物具有非常显著的治疗效果；通过与目前的上市药物对比，也可以看出：其明显优于目前已经被欧盟和美国批准的同类药物，例如：罗氏的 Atezolizumab 三期临床数据显示 ORR 仅为 23%，百时美施贵宝公司的 Nivolumab 的 ORR 仅为 19.6%，而杨森公司的 erdafitinib 仅针对具有某些 FGFR 基因突变的尿路上皮癌患者，反观本发明的重组人源化抗 HER2 单抗

-MMAE 偶联剂药物的 ORR 为 76.9%，疾病控制率（DCR）为 92.3%，明显优于目前上市的同类药物，并且副作用也明显小于同类药物，未发生任何严重不良反应（SAE），针对的患者更为广泛，为急需治疗的尿路上皮癌患者提供了另一种选择；由此可见，本发明的抗 HER2 抗体偶联物在治疗尿路上皮癌中有着极佳的应用前景，能够有效改善，甚至逆转患者的疾病发展进程，取得了预料不到的技术效果。

PCT

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 10.20.32/10.21.34 MT/FOP 20140331/0.20.5.21
0-2	国际申请号	PCT/CN2019/101283
0-3	申请人或代理人的档案号	1

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	18
1-2	行号:	
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
1-3-2	保藏单位地址	中国微生物菌种保藏委员会，中国北京市2714信箱，邮政编码:100080，Beijing (CN)。
1-3-3	保藏日期	2013年 8月 22日 (22.08.2013)
1-3-4	保藏号	CGMCC
1-4	补充说明	
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	
2	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
2-1	页码	19
2-2	行号:	
2-3	保藏事项	
2-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
2-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学，邮政编码:430072，Hubei (CN)。
2-3-3	保藏日期	2013年 11月 06日 (06.11.2013)
2-3-4	保藏号	CCTCC
2-4	补充说明	
2-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
2-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	受权官员	

PCT

打印件(原件为电子形式)

由国际局填写

0-5	**国际局收到本表格日期:**	
0-5-1	受权官员	

权利要求书

1. 一种抗体药物偶联物（ADC）在制备用于治疗尿路上皮癌的药物中的用途，所述抗体药物偶联物为抗 HER2 抗体或其功能性片段偶联细胞毒分子。

2. 权利要求 1 所述的用途，所述细胞毒分子包括但不限于微管蛋白抑制剂或 DNA 损伤剂。

3. 权利要求 2 所述的用途，所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素（dolastatin）及奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒分子，美登素（maytansine）类细胞毒分子；所述 DNA 损伤剂包括但不限于卡奇霉素类（calicheamicin）、倍癌霉素（duocarmycin）类、安曲霉素类衍生物 PBD、喜树碱类衍生物 SN-38。

4.权利要求 1 所述的用途，所述细胞毒分子包括但不限于瓢菌素(amanitins)、蒽环类物(anthracyclines)、浆果赤霉素(baccatins)、喜树碱(camptothecins)、西马多丁(cemadotins)、秋水仙碱(colchicines)、秋水仙胺(colcimids)、考布他汀(combretastatins)、隐菲辛(cryptophycins)、圆皮海绵内酯(discodermolides)、多烯紫杉醇(docetaxel)、阿霉素(doxorubicin)、棘霉素(echinomycins)、艾榴塞洛素(eleutherobins)、埃博霉素(epothilones)、雌莫司汀(estramustines)、偏端霉素(lexitropsins)、美登素(maytansines)、氨甲蝶呤(methotrexate)、纺锤菌素(netropsins)、嘌呤霉素(puromycins)、根瘤菌素(rhizoxins)、紫杉烷(taxanes)、微管蛋白裂解素(tubulysins)、或长春花生物碱(vinca alkaloids)。

5. 权利要求 3 所述的用途，所述奥瑞他汀（auristatin）类细胞素分子包括但不限于 MMAE 或 MMAF 或它们的衍生物，所述美登素类细胞毒分子包括但不限于 DM1、DM4 或它们的衍生物。

6. 根据前述任一权利要求所述的用途，所述抗体或其功能性片段与以下 CDR 序列限定的抗体竞争性结合相同表位；所述 CDR 序列限定的抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中

(i)所述重链可变区包含三个 CDR 区，其中所述 CDR 区的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO：1、2 和 3 所示的氨基酸序列；和

(ii)所述轻链可变区包含三个 CDR 区，其中所述 CDR 区的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO：4、5 和 6 所示的氨基酸序列。

7.根据权利要求 1-5 中任一项的用途，所述抗体或其功能性片段包含重链可变区和轻链可变区，其中

(i)所述重链可变区包含三个 CDR 区，其中所述 CDR 区的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO：1、2 和 3 所示的氨基酸序列；和

(ii)所述轻链可变区包含三个 CDR 区，其中所述 CDR 区的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO：4、5 和 6 所示的氨基酸序列。

8. 根据前述任一权利要求所述的用途，所述抗体药物偶联物具有通式 Ab-(L-U)n 的结构，其中 Ab 表示所述的抗体或其功能性片段，L 表示接头； U 表示偶联的细胞毒分子， n 为 1 至 8 的整数，代表每一抗体上结合的治疗剂的分子数量。

9.权利要求 8 所述的用途，所述偶联的细胞毒分子包括但不限于 DM1、DM3、DM4、MMAE、MMAF、AF（auristatin F）或它们的衍生物。

10. 根据前述任一权利要求所述的用途，所述接头与所述抗体或其功能性片段通过巯基和/或氨基连接。

11.权利要求 10 所述的用途，所述接头选自马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苄氧基（Maleimido-Caproyl-Valine-Citrulline-p-Aminobenzyloxy, mc-vc-pAB）、马来酰亚胺基己酰基（Maleimidocaproyl, mc）、三甘氨酸肽接头（triglycyl peptide linker）、3-马来酰亚胺 - 丙酸（3-maleimido-propionic acid）、Mal-di-EG-OPFP(perfluorophenyl 3-(2-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)ethoxy)ethoxy)propanoate) 、 Mal-di-EG-Osu(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)propanoate)、Mal-Tri-EG-OSu(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxypropanoate) 、 Mal-Tetra-EG-OSu(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oate) 、 Br-di-EG-OSu(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3(2-(2-(2-bromoacetamido)ethoxy)ethoxy)propanoate) 、 Py-ds-prp-OSu(2-5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(pyridine-2-yldisulfanyl)propanoate)、Py-ds-Prp-OPEP(perfluorophenyl 3-(pyridine-2-yldisulfanyl)propanoate) 、 Py-ds-dmBut-OSu(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-methyl-4-(pyridine-2-yldisulfanyl)、Py-ds-dmBut-OPF(perfluorophenyl

4-methyl-4-(pyridine-2-yldisulfanyl)pentanoate)、SMCC(N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate)、MBS(3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester)、SATA(S-(N-succinimidyl)thioacetate)、SPDP((N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate)、SMPT((N-succinimidyloxy carbonyl)-1-methyl-1-(2-pyridyldithio)toluene)。

12. 根据前述任一权利要求所述的用途，所述细胞毒分子定点或非定点偶联所述抗体。

13. 根据前述任一权利要求所述的用途，其中所述抗体或其功能性片段为鼠源、嵌合或人源化的。

14. 根据前述任一权利要求所述的用途，其中所述抗体或其功能性片段衍生自在2013年08月22日以保藏编号CGMCC No.8102保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的杂交瘤所分泌的抗体。

15. 根据前述任一权利要求所述的用途，其中所述抗体是人源化抗体，优选地所述抗体是在2013年11月06日以保藏编号CCTCC C2013170保藏于中国典型培养物保藏中心的CHO细胞所分泌的抗体。

16. 根据前述任一项权利要求所述的用途，所述尿路上皮癌为无法接受手术切除的局部进展尿路上皮癌、局部晚期或转移性尿路上皮癌、HER2阳性尿路上皮癌、HER2阳性局部晚期或转移性尿路上皮癌。

17. 根据前述任一项权利要求所述的用途，所述药物还包括药学上可接受的载体；所述药物优选为冻干剂或液体制剂；所述载体包括稳定剂、保护剂、缓冲液、冻干保护剂、活性保护剂、表面活性剂、吸附载体、吸收促进剂中的一种或多种。

18. 根据前述任一项权利要求所述的用途，所述药物可通过鼻内、皮下、皮内、肌内或静脉内施用。