

抗体-药物偶联物及其用途

相关申请的交叉引用

本申请要求 2023 年 06 月 29 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 2023107806802 以及 2024 年 01 月 30 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 2024101255800、发明名称皆为“一种抗体药物偶联物”的两件在先申请的优先权。两件在先申请的全文通过引用的方式结合于本发明中。

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种抗体药物偶联物、其制备方法及应用。

背景技术

抗体-药物偶联物(Antibody-drug Conjugate, ADC)由三个不同的组件抗体(antibody)、接头(linker)和生物活性分子(drug)组成。ADC 技术是通过接头将抗体和药物分子偶联在一起，利用抗体的特异性靶向运输药物分子到靶组织发挥作用，降低药物的系统性毒副作用，提高药物治疗窗和拓展抗体治疗潜能。

生物活性分子(drug)对 ADC 药物发挥作用是必不可少的，喜树碱类化合物由于其优异的抗肿瘤作用，引起了人们广泛的关注。其中上市 ADC 药物 Trodelvy 和 Enhertu 即分别采用喜树碱类化合物 SN38 和 Dxd 作为细胞毒物。其中 Dxd 与常见的化疗药物伊立替康(irinotecan)相比，活性提高 10 倍；具有很强的渗透细胞膜的能力，这使其在杀伤吞入 ADC 的癌细胞之后，能够杀死附近的癌细胞，产生“旁观者效应”(bystander effect)；其在血液中的半衰期显著缩短，有助于减少毒副作用的产生。

然而通过喜树碱类化合物最终制备得到的 ADC 都极大改变了单抗的属性，稳定性和半衰期都有较大程度衰减。虽然在 DESTINY-Breast 03 临床研究中，Enhertu 确认的客观缓解率(ORR)达到 79.7%，然而根据 DS8201-A-J101 临床研究显示对于 HER2 低表达乳腺癌，Enhertu 确认的客观缓解率(ORR)为 37.0%，治疗有效率明显低于高表达或中表达的乳腺癌。此外，ADC 药物在毒副作用上出现了新的症状，如 Enhertu 出现了肺炎和间质性肺病等副作用。

WO2020233174A1 公开了一类含有缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)-PAB 连接子的喜树碱类化合物，然而该分子无法与抗体偶联后获得质量合格的 ADC 分子(合格的 ADC 产品中聚体含量需要小

于 5%)。因此,本领域迫切需要提供更为合适的基于喜树碱类药物(如依沙替康、贝洛替康等)的抗体偶联药物,实现高效、简单、实用的化学制备与偶联,并且改善现有抗体偶联药物的药学性质、代谢性质、药效及安全性等、如提高 ADC 分子稳定性、提高治疗窗口等。

B7H3 全称 B7 homolog 3, 又称 CD276, 是一种新鉴定的 B7 家族配体, 属于 I 型跨膜糖蛋白。其细胞外结构域由两个免疫球蛋白恒定(IgC) 和可变(IgV) 结构域组成, 其主要存在两种剪切体: 胞外区由 IgV-IgC 组成的 2IgB7H3 和胞外区 IgV-IgC-IgV-IgC 组成的 4IgB7H3, 鼠和人的 B7H3 都包括 2IgB7H3, 但人和其他灵长类动物还具有 4IgB7H3 的 4 个免疫球蛋白样结构域结构。

B7H3 的受体尚未明确, 作用机制不完全清楚。目前研究 B7H3 具有免疫抑制与免疫激活的功能, 主流观点为 B7H3 主要发挥免疫抑制的作用, 有研究称 B7H3 是 T 细胞功能的负调节子, 主要影响 Th1。但有研究显示其主要抑制 CD8+T 和 NK 细胞, 直接抑制 NK 活化, 对 CD4+T 无明显作用。B7H3 通过抑制 IL-2 分泌发挥对 T 细胞的抑制作用, 外源添加 IL-2 可逆转此作用, 说明 B7H3 为 IL-2 的上游调控分子。DC 细胞与 Treg 共培养, DC 上调 B7H3 并减少 pMHC 表达, 其 T 细胞刺激功能受损。B7H3 表达与 NSCLC 中 PD-1 疗法响应呈负相关。B7H3 表达与 CD8+T 细胞浸润呈负相关。CD8+T 浸润高的患者对 IO 疗法响应更好。

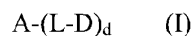
在肿瘤细胞中, B7H3 可能参与肿瘤生长和免疫逃逸机制; B7H3 可以通过 Jak2/Stat3/MMP-9 信号通路调节多种癌细胞对纤维连接蛋白的迁移、侵袭和粘附; 此外, B7H3 在结直肠癌和乳腺癌细胞中过表达可通过激活 Jak2/STAT3/ survivin 信号通路增强对凋亡的抵抗, 削弱了肿瘤细胞对化疗药物紫杉醇的敏感性; B7H3 的表达可以促进癌细胞糖酵解; 最后, B7H3 可以促进 VEGF 的表达进而促进肿瘤血管生成。多癌种患者的临床数据, 显示过表达 B7H3 与肿瘤进展、转移等不良预后相关。

B7H3 mRNA 广泛存在于人体许多组织中, 如心脏、前列腺、胰腺、肝脏、结肠、胸腺等, 而大量正常组织的免疫组化(IHC)分析显示, B7H3 仅在少数组织中低表达, 甚至检测不到。用 B7H3 特异性单克隆抗体对美国 Biomax 公司的组织芯片进行染色, 结果仅对唾液腺腺泡细胞、胃上皮细胞和肾上腺细胞有弱细胞质染色。在其它的研究中, 也只观察到胃、胆囊、前列腺、子宫颈和子宫内膜的基底侧膜的弱染色。B7H3 广泛表达于各种实体瘤, 如头颈癌、膀胱癌、肺癌、肾癌、胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌和卵巢癌等, 使其成为良好的 ADC 药物靶点。

发明内容

本发明提供一种具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消

旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物：



其中 A 选自抗体（如单克隆抗体）或其抗原结合片段；

L 为连接子部分，一端与 A 连接，一端与生物活性分子 D 连接；

D 为生物活性分子；

d 表示生物活性分子与 A 的摩尔比（又称 DAR，即药物抗体偶联比率），选自 1 到 12 的整数或小数（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）；

当 d 为小数时，其指每个 A 缀合的接头-生物活性分子（L-D）个数的平均数。

在一些实施方案中，A 选自单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，A 选自靶向 HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)、HER4(ErbB4)、EGFR、dll3、TROP2、B7H3、B7H4、TF(Tissue factor)、c-Met、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD47、CD56、CD70、CD73、CD79b、CD105、CEA、A33、Cripto、EphA2、G250、MUC1、Lewis Y、EDB-FN、VEGFR、VEDF、PD-1、PD-L1、MET、RET、GPNMB、Integrin、PSMA、Tenascin-C、SLC44A4、Claudin18.2 或 Mesothelin 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，A 选自靶向 B7H3、HER2、TROP2、B7H4、TF、EDB-FN、Claudin18.2 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，A 选自靶向 B7H3、HER2 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，A 为靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包括重链和/或轻链，所述重链包括 3 个互补决定区（CDR），其中重链互补决定区 1（HCDR1）氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，重链互补决定区 2（HCDR2）氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，重链互补决定区 3（HCDR3）氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示；所述轻链包括轻链 3 个互补决定区（CDR），其中轻链互补决定区 1（LCDR1）氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，轻链互补决定区 2（LCDR2）氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示，轻链互补决定区 3（LCDR3）氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，其中 CDR 按照 Kabat 编号规则确定。

在一些实施方案中，A 为靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包括重链和/或轻链，所述重链的可变区（HV）序列如 SEQ ID NO:7 所示，所述轻链的可变区（LV）序列如 SEQ ID NO:8 所示。

在一些实施方案中，A 为靶向 B7H3 的抗体，所述抗 B7H3 抗体还包括重链恒定区序列或其变体，和/或轻链恒定区序列或其变体。

在一些实施方案中，A 为靶向 B7H3 的抗原结合片段，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、

Fab'-SH、Fv、scFv 或 F(ab')₂。

在一些实施方案中，A 为靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段为人源化或全人源抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，A 为靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，所述抗 B7H3 抗体包括重链和/或轻链，所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所示，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示。

在一些实施方案中，A 选自靶向 B7H3 的 43A 或 43B、靶向 HER2 的 DP001、靶向 TROP2 的 sacituzumab、靶向 B7H4 的 Alsevalimab、靶向 TF 的 Tisotumab、靶向 EDB-FN 的 L19A、靶向 Claudin18.2 的 Zolbetuximab 或其生物类似物。

43A 包括 2 条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示。

>43A 重链 (SEQ ID NO:9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYFMNWVRQAPGQGLEWMG**DVNP**KTGSPSYNQKFKGRVTMTR
DTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARRYGFLYSMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>43A 轻链 (SEQ ID NO:11)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKVLIIYTSRLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISLQP
EDIATYYCQQGNTHPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

其中，粗体标示的氨基酸序列为重链/轻链 CDR 序列，HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别命名为 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6:

HCDR1: DYFMN

HCDR2: DVNPKTGSPSYNQKFKG

HCDR3: RYGLYSMDY

LCDR1: RASQDISNYLN

LCDR2: YTSRLHS

LCDR3: QQGNTHPFT

下划线标示的氨基酸序列为重链/轻链可变区序列，HV、LV 分别命名为 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8。

HV:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYFMNWVRQAPGQGLEWMGDVNPKTGSPSYNQKFKGRVTMTRD
TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARRYGFLYSMDYWGQGTSTVTVSS

LV:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKVLIIYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQP
EDIATYYCQQGNTHPFTFGGGTKVEIK

43B 包括 2 条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示。

>43B 重链 (SEQ ID No:10)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYFMNWVRQAPGQGLEWMGDVNPKTGSPSYNQKFKGRVTMTR
DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARRYGFLYSMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPPC
PAPEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>43B 轻链 (SEQ ID NO:11)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKVLIIYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQP
EDIATYYCQQGNTHPFTFGGGTKVEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

其中，粗体标示的氨基酸序列为重链/轻链 CDR 序列，HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别命名为 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6:

HCDR1: DYFMN

HCDR2: DVNPKTGS PSYNQKFKG

HCDR3: RYGFLYSMDY

LCDR1: RASQDISNYLN

LCDR2: YTSRLHS

LCDR3: QQGNTHPFT

下划线标示的氨基酸序列为重链/轻链可变区序列，HV、LV 分别命名为 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8。

HV:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYFMNWVRQAPGQGLEWMGDVNPKTGSPSYNQKFKGRVTMTRD
TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARRYGLYSMDYWGQGTSTVTVSS

LV:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKVLIIYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPE
EDIATYYCQQGNTHPFTFGGGTKVEIK

DP001 包括 2 条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示。

>DP001 重链 (SEQ ID NO:12)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS
KNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>DP001 轻链 (SEQ ID NO:13)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPE
DPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

sacituzumab 包括 2 条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示。

>sacituzumab 重链 (SEQ ID NO:14)

QVQLQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYDDFKGRFAFSLDTS
VSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFVDVWGQGS LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>sacituzumab 轻链 (SEQ ID NO:15)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSI AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRTGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFAVYYCQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Alsevalimab 包括 2 条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示。

>Alsevalimab 重链 (SEQ ID NO:16)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYSGSTYYNPSLRSVTISVDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Alsevalimab 轻链 (SEQ ID NO:17)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE
DFAVYYCQYHSFPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKSTSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Tisotumab 包括 2 条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示。

>Tisotumab 重链 (SEQ ID NO:18)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDYTYTDSVKGRFTISRDNKNT
LYLQMNSLR AEDTAVYYCARSPWGYLD SWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Tisotumab 轻链 (SEQ ID NO:19)

DIQMTQSPPSLSASAGDRVTITCRASQGISRLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKSTSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

L19A 包括 2 条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示。

>L19A 重链 (SEQ ID NO:20)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGTYYADSVKGRFTISRDNKNTL
YLQMNSLR AEDTAVYYCARFPFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN

GKEYCKKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

>L19A 轻链 (SEQ ID NO:21)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Zolbetuximab 包括 2 条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 所示。

>Zolbetuximab 重链 (SEQ ID NO:22)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRSWRGNSFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Zolbetuximab 轻链 (SEQ ID NO:23)

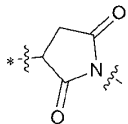
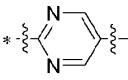
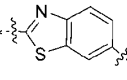
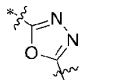
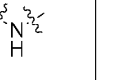
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

本发明的氨基酸可变区序列，均按照 Kabat 编号规则确定。

在一些实施方案中，-L-选自-L₁-L₂-L₃-L₄-L₅-，其中，L₁为共价连接单元，其与 A 共价连接，L₂为延伸单元，L₃选自键或任选极性亲水性基团取代的氨基酸残基，L₄选自由 2-8 个氨基酸组成的肽残基，L₅为键或自裂解片段或极性亲水性基团取代的自裂解片段。

在一些实施方案中，-L-选自-L₁-L₂-L₃-L₄-L₅-，其中，L₁为共价连接单元，其与 A 共价连接，L₂为延伸单元，L₃选自任选极性亲水性基团取代的氨基酸残基，L₄选自由 2-8 个氨基酸组成的肽残基，L₅为键或自裂解片段。

在一些实施方案中，L₁选自如下基团：

编号	L ₁ -1	L ₁ -2	L ₁ -3	L ₁ -4	L ₁ -5
结构					

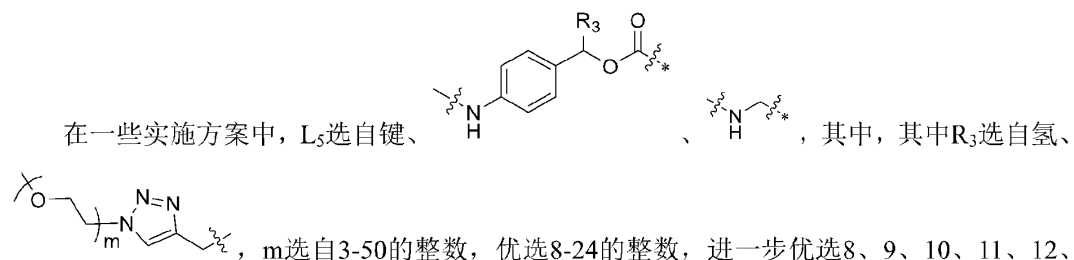
其中*表示与A连接。

在一些实施方案中， L_2 选自 $-L_{2a}-$ 、 $-L_{2a}-C(O)-$ 、 $-C(O)-L_{2a}-C(O)-NH-L_{2b}-C(O)-$ 、 $-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-$ ，其中 L_{2a} 和 L_{2b} 各自独立的选自 $-C_1-C_8$ 亚烷基-、 $-C_1-C_8$ 亚烷基- C_3-C_8 亚环烷基-、-亚炔基- C_1-C_6 亚烷基-、-亚苯基-、-亚苯基- C_1-C_3 亚烷基-、1-50（优选9-30，更优选9-26，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50）个原子的直链或支链亚杂烷基，所述亚烷基、亚环烷基、亚苯基、亚杂烷基各自任选地被独立地选自 C_1-C_6 烷基、1-6个原子的杂烷基、 C_1-C_6 烷氧基、羟基、氨基、羧基或 C_3-C_8 环烷基中的一个或者多个取代基所取代，所述亚杂烷基含有1-12（优选1-8，更优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）个杂原子，所述亚杂烷基的杂原子选自N、O或S（优选O）中的一个或多个（两个或三个）。

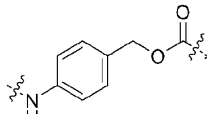
在一些实施方案中， L_2 选自 $-L_{2a}-$ 、 $-L_{2a}-C(O)-$ 、 $-C(O)-L_{2a}-C(O)-NH-L_{2b}-C(O)-$ 、 $-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-$ ，其中 L_{2a} 和 L_{2b} 各自独立的选自 $-C_1-C_8$ 亚烷基-、 $-C_1-C_8$ 亚烷基- C_3-C_8 亚环烷基-、-亚炔基- C_1-C_6 亚烷基-、1-50（优选9-30，更优选9-26，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50）个原子的直链或支链亚杂烷基，所述亚烷基、亚环烷基、亚杂烷基各自任选地被独立地选自 C_1-C_6 烷基、1-6个原子的杂烷基、 C_1-C_6 烷氧基、羟基、氨基、羧基或 C_3-C_8 环烷基中的一个或者多个取代基所取代，所述亚杂烷基含有1-12（优选1-8，更优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）个杂原子，所述亚杂烷基的杂原子选自N、O或S（优选O）中的一个或多个（两个或三个）。

在一些实施方案中， L_3 选自极性亲水性基团取代的氨基酸残基，所述极性亲水性基团包含糖残基及其衍生物或聚乙二醇残基及其衍生物或聚肌氨酸残基及其衍生物或其组合。

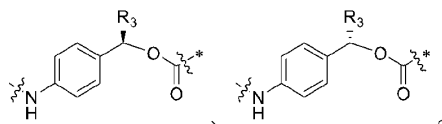
在一些实施方案中， L_4 选自由2-8个氨基酸组成的肽残基，所述氨基酸选自苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、丙氨酸、苏氨酸、组氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、脯氨酸、瓜氨酸、天冬氨酸和甘氨酸。



13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24，*表示与D连接。

在一些实施方案中， L_5 选自键、、，其中，*表示与D连接。

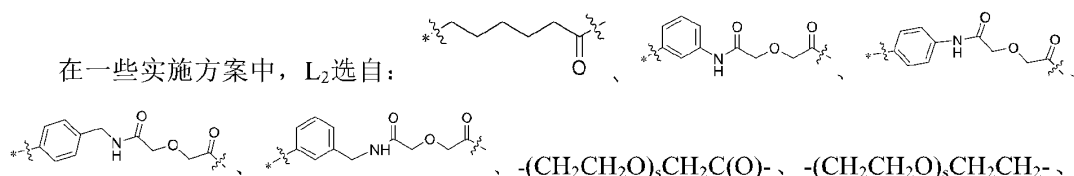
在一些实施方案中， L_5 选自：

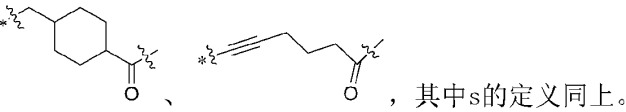


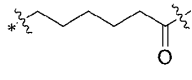
在一些实施方案中， L_2 选自 $-L_{2a}-$ 、 $-L_{2a}-C(O)-$ 、 $-C(O)-L_{2a}-C(O)-NH-L_{2b}-C(O)-$ 、 $-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-$ ，其中 L_{2a} 和 L_{2b} 各自独立的选自 $-C_1-C_6$ 亚烷基-、 $-C_1-C_3$ 亚烷基- C_3-C_6 亚环烷基-、-亚乙炔基- C_1-C_6 亚烷基-、 $-(CH_2CH_2O)_s-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_sC_{1-3}$ 亚烷基-、 $-C_{1-3}$ 亚烷基 $(CH_2CH_2O)_sC_{1-3}$ 亚烷基-，其中s选自1-12（优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）的整数。

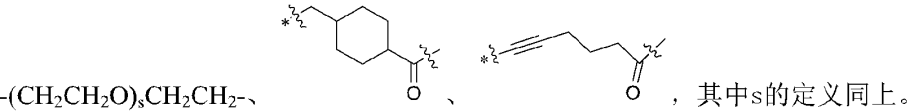
在一些实施方案中， L_2 选自 $-L_{2a}-$ 、 $-L_{2a}-C(O)-$ 、 $-C(O)-L_{2a}-C(O)-NH-L_{2b}-C(O)-$ 、 $-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-$ ，其中 L_{2a} 和 L_{2b} 各自独立的选自亚甲基、亚乙基、亚正丙基、亚异丙基、亚正戊基、亚甲基亚环己基、亚乙炔基亚甲基、亚乙炔基亚乙基、亚乙炔基亚正丙基、亚乙炔基亚正丁基、亚乙炔基亚正戊基、亚乙炔基亚正己基、亚苯基、亚苯基亚甲基、 $-(CH_2CH_2O)_sCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_sCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2(OCH_2CH_2)_s-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_s-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2-$ ，其中s选自1-12（优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）的整数。

在一些实施方案中， L_2 选自 $-L_{2a}-$ 、 $-L_{2a}-C(O)-$ 、 $-C(O)-L_{2a}-C(O)-NH-L_{2b}-C(O)-$ 、 $-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-$ ，其中 L_{2a} 和 L_{2b} 各自独立的选自亚甲基、亚乙基、亚正丙基、亚异丙基、亚正戊基、亚甲基亚环己基、亚乙炔基亚甲基、亚乙炔基亚乙基、亚乙炔基亚正丙基、亚乙炔基亚正丁基、亚乙炔基亚正戊基、亚乙炔基亚正己基、 $-(CH_2CH_2O)_sCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_sCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2(OCH_2CH_2)_s-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_s-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2-$ ，其中s选自1-12（优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）的整数。

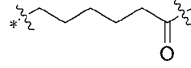
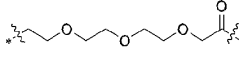
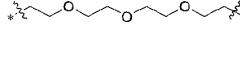
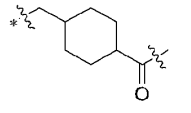
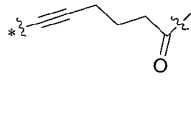
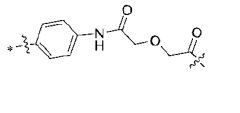
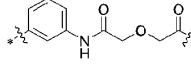
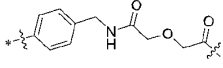
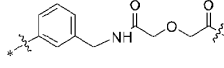




在一些实施方案中，L₂选自：、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、



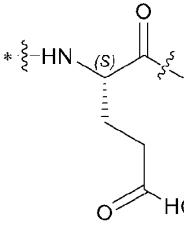
在一些实施方案中，L₂选自：

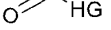
编号	L ₂ -1	L ₂ -2	L ₂ -3
结构			
编号	L ₂ -4	L ₂ -5	L ₂ -6
结构			
编号	L ₂ -7	L ₂ -8	L ₂ -9
结构			

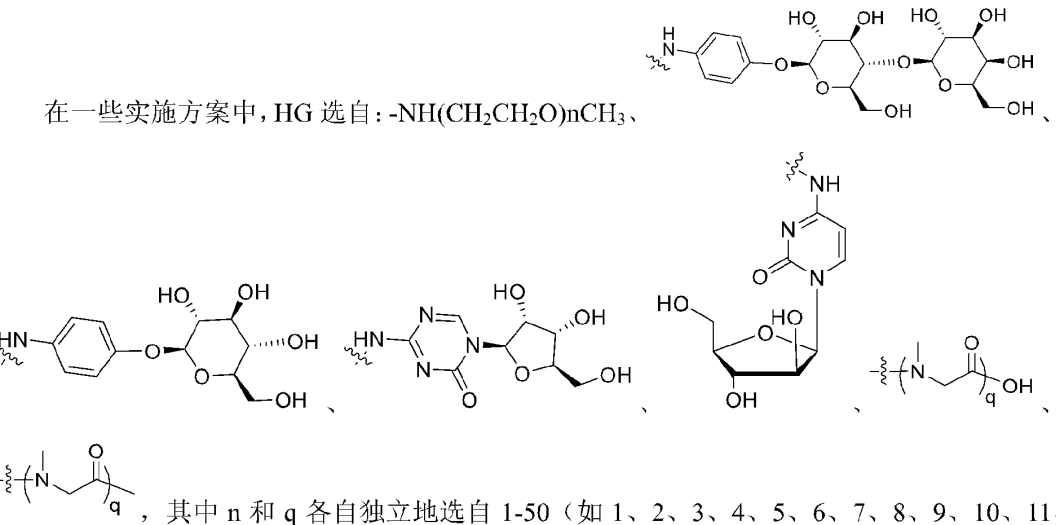
其中*表示与L₁连接。

在一些实施方案中，L₃选自键、谷氨酸、极性亲水性基团取代的谷氨酸，所述极性亲水性基团包含糖残基及其衍生物或聚乙二醇残基及其衍生物或聚肌氨酸残基及其衍生物或其组合。

在一些实施方案中，L₃选自极性亲水性基团取代的谷氨酸，所述极性亲水性基团包含糖残基及其衍生物或聚乙二醇残基及其衍生物或聚肌氨酸残基及其衍生物或其组合。

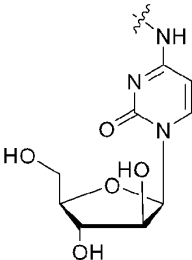
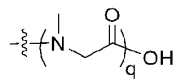
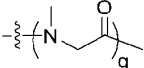


在一些实施方案中，L₃选自：，其中HG为极性亲水性基团；优选地，选自包含糖残基及其衍生物的基团、包含聚乙二醇残基及其衍生物的基团、包含聚肌氨酸残基及其衍生物或其组合，其中*表示与L₂连接。



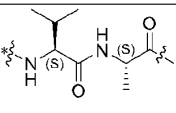
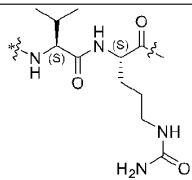
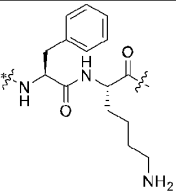
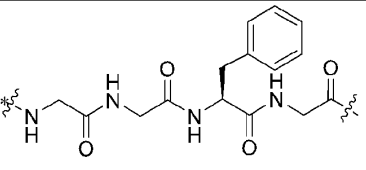
在一些实施方案中，L₃ 选自：

编号	L ₃ -1	L ₃ -2
HG 结构	HG-1: $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$	HG-2:
编号	L ₃ -3	L ₃ -4
HG 结构	HG-3: 	HG-4:
编号	L ₃ -5	L ₃ -6

HG 结构	HG-5: 	HG-6: 
编号	L ₃ -7	
HG 结构	HG-7: 	

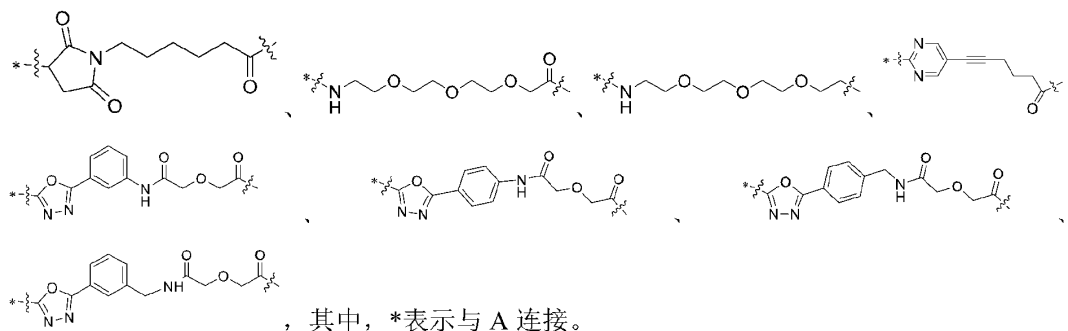
其中 n 和 q 各自独立地选自 1-50（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50）的整数，优选 1-24，进一步优选 3-12。

在一些实施方案中，L₄选自：

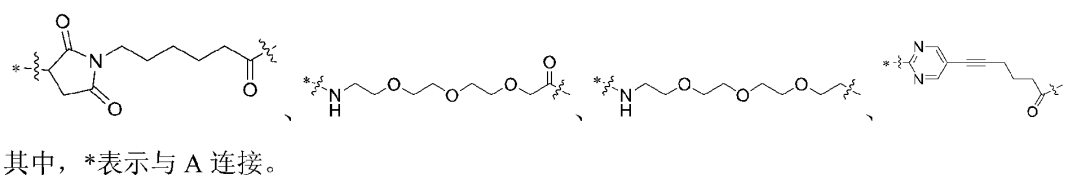
编号	L ₄ -1	L ₄ -2
结构	 (VA)	 (VC)
编号	L ₄ -3	L ₄ -4
结构	 (FK)	 (GGFG)

其中*表示与L₃连接。

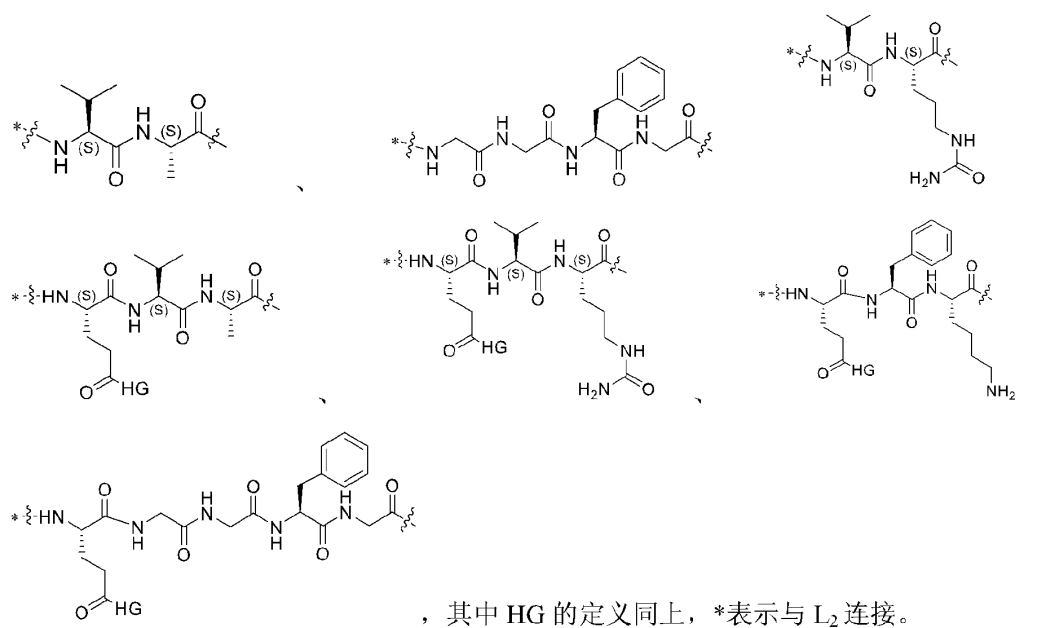
在一些实施方案中，-L₁-L₂-选自：



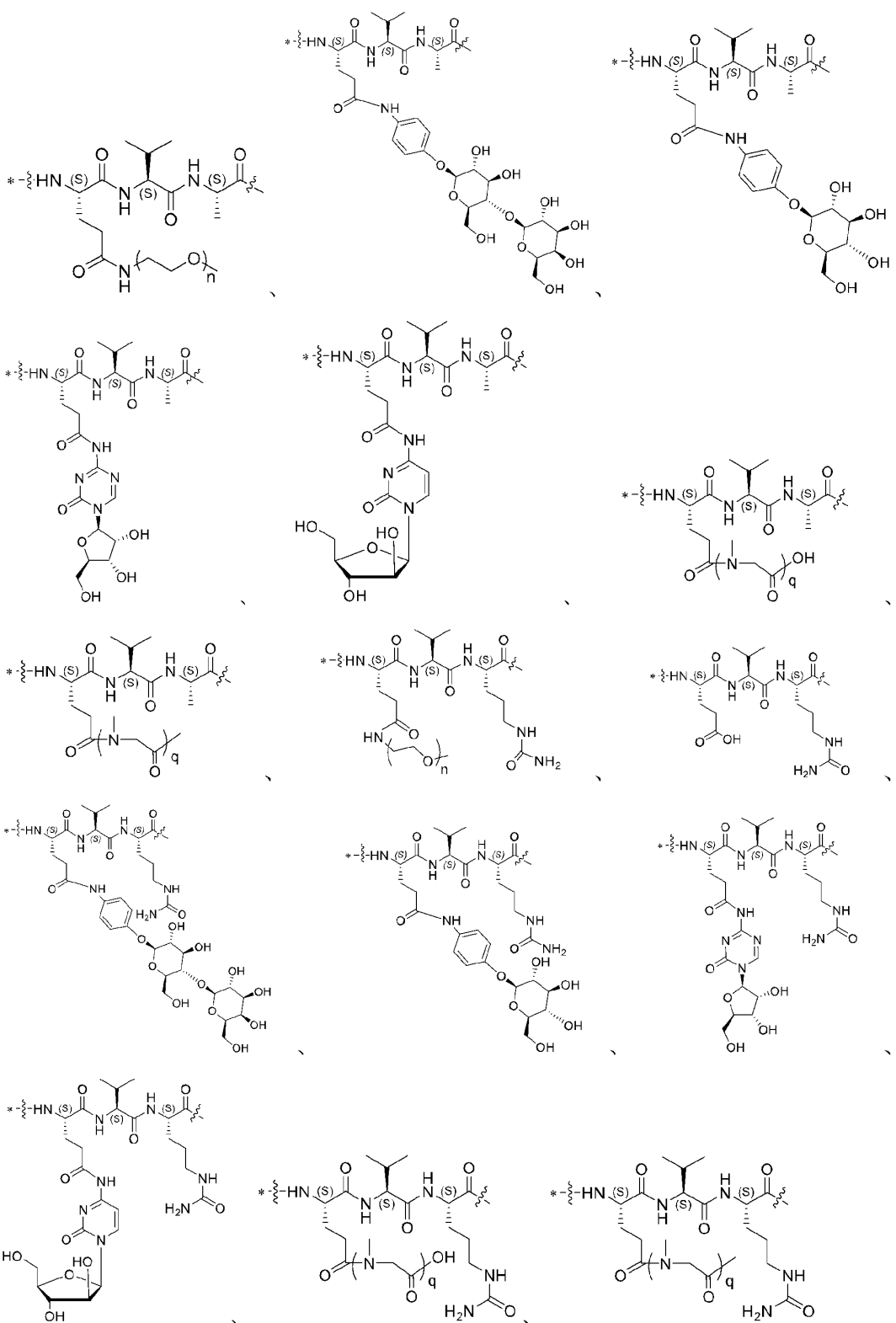
在一些实施方案中，-L₁-L₂-选自：



在一些实施方案中，-L₃-L₄-选自：

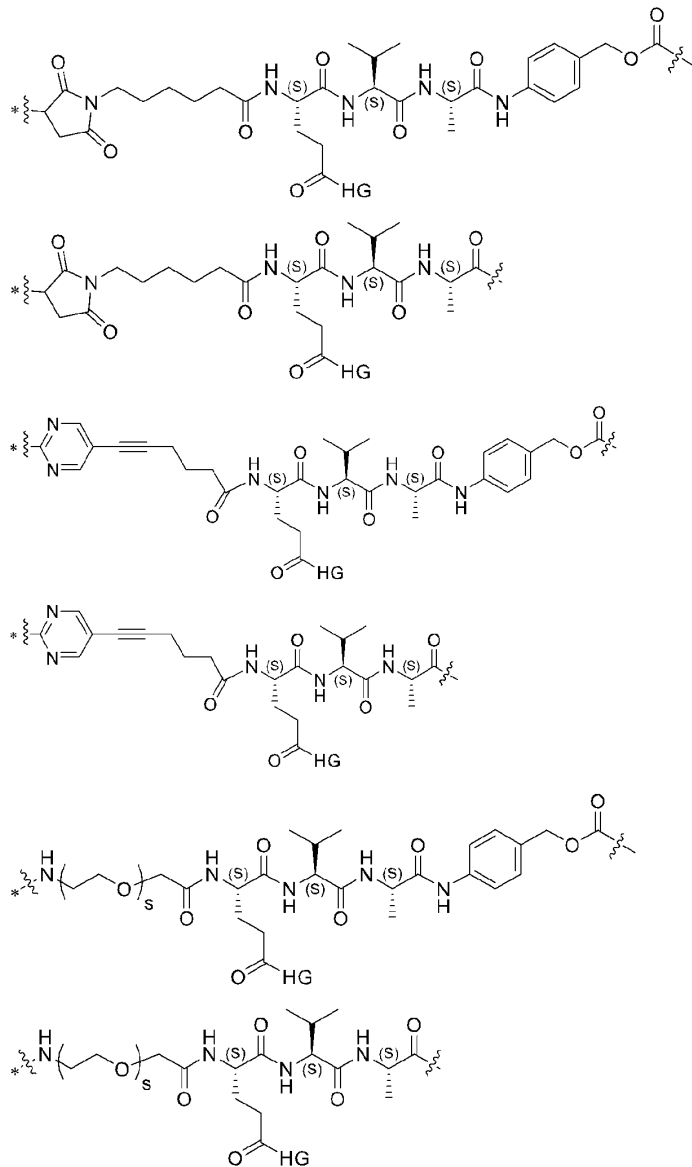


在一些实施方案中，-L₃-L₄-选自：



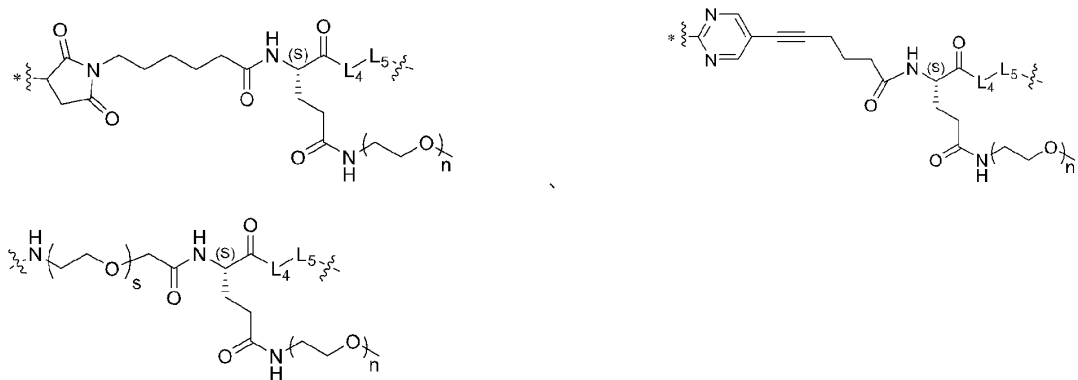
其中，*表示与 L₂ 连接，n、q 的定义同上。

在一些实施方式 中，-L-选自：



其中 HG、s 的定义同上，*表示与 A 连接。

在一些实施方式 中，-L-选自：



在一些实施方案中，-L-选自：

编号	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
L-1	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -1
L-2	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -2	L ₄ -1
L-3	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -3	L ₄ -1
L-4	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -4	L ₄ -1
L-5	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -5	L ₄ -1
L-6	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -6	L ₄ -1
L-7	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -7	L ₄ -1
L-8	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -2
L-9	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -2	L ₄ -2
L-10	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -3	L ₄ -2
L-11	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -4	L ₄ -2
L-12	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -5	L ₄ -2
L-13	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -6	L ₄ -2
L-14	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -7	L ₄ -2
L-15	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -1
L-16	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -2	L ₄ -1
L-17	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -3	L ₄ -1
L-18	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -4	L ₄ -1
L-19	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -5	L ₄ -1
L-20	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -6	L ₄ -1

L-21	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -7	L ₄ -1
L-22	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -2
L-23	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -2	L ₄ -2
L-24	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -3	L ₄ -2
L-25	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -4	L ₄ -2
L-26	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -5	L ₄ -2
L-27	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -6	L ₄ -2
L-28	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -7	L ₄ -2
L-29	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -1
L-30	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -2	L ₄ -1
L-31	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -3	L ₄ -1
L-32	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -4	L ₄ -1
L-33	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -5	L ₄ -1
L-34	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -6	L ₄ -1
L-35	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -7	L ₄ -1
L-36	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -2
L-37	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -2	L ₄ -2
L-38	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -3	L ₄ -2
L-39	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -4	L ₄ -2
L-40	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -5	L ₄ -2
L-41	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -6	L ₄ -2
L-42	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -7	L ₄ -2
L-43	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -3
L-44	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -4
L-45	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -3
L-46	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -4
L-47	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -3
L-48	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -4

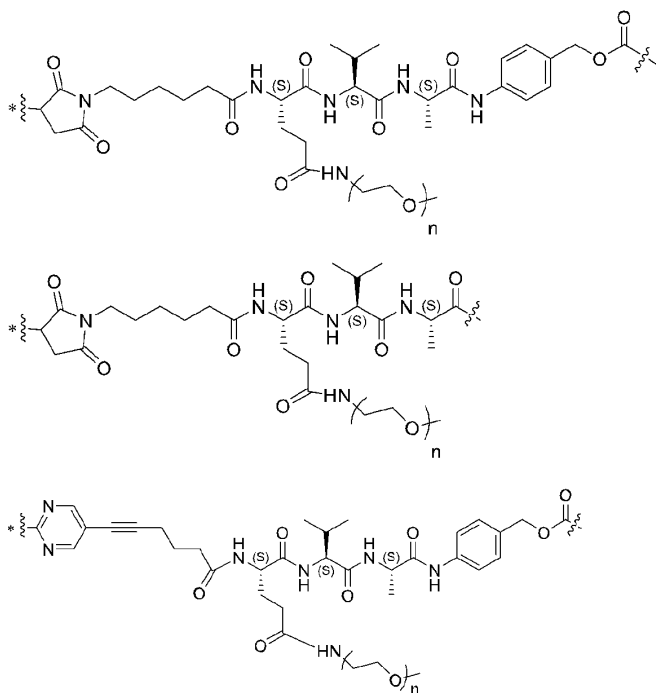
在本发明的一些实施方案中，-L-选自：

-L ₁ -L ₂ -L ₃ -L ₄ -				
编号	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
L-49	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -1

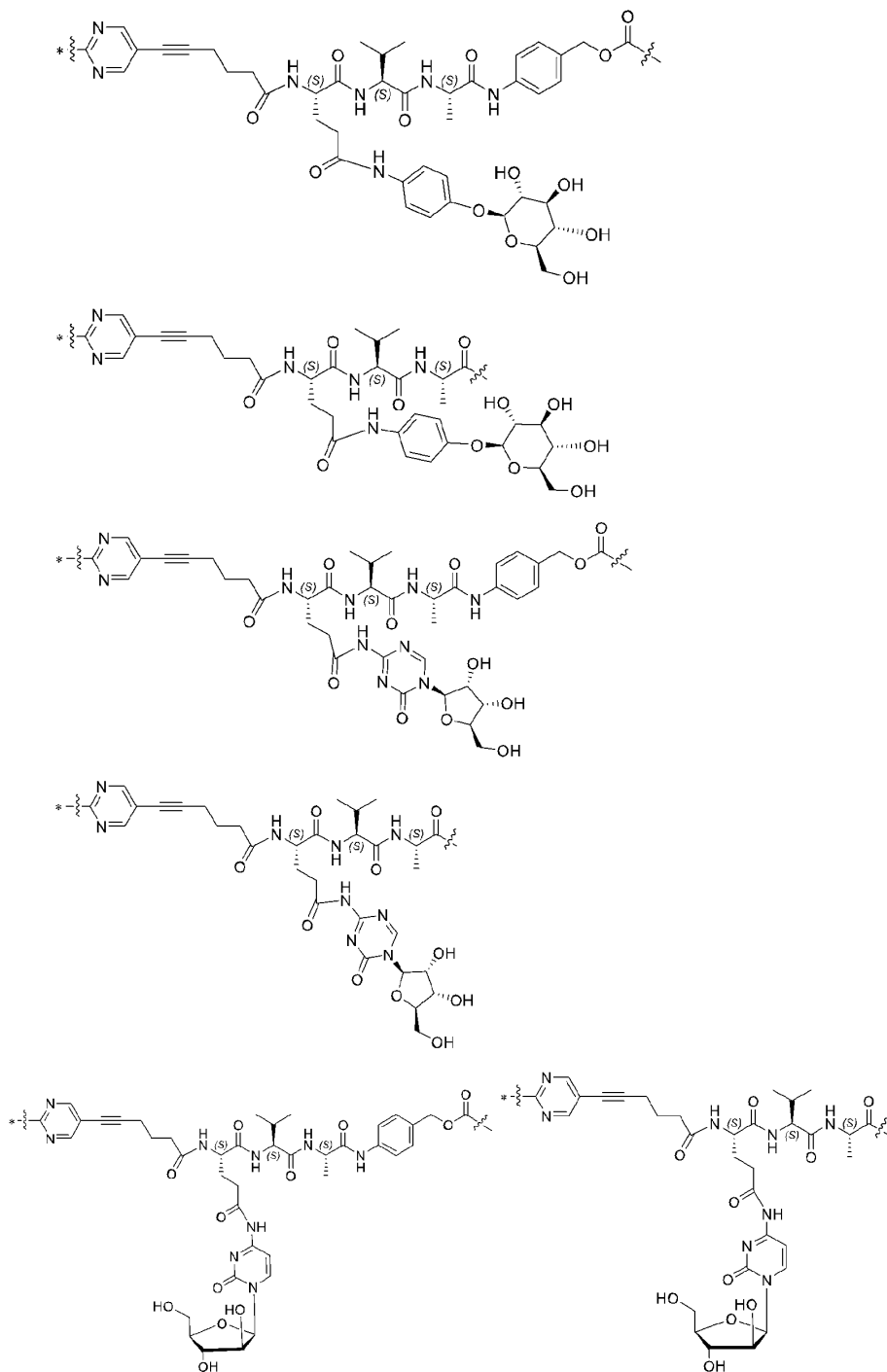
L-50	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -2	L ₄ -1
L-51	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -3	L ₄ -1
L-52	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -4	L ₄ -1
L-53	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -5	L ₄ -1
L-54	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -6	L ₄ -1
L-55	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -7	L ₄ -1
L-56	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -2
L-57	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -2	L ₄ -2
L-58	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -3	L ₄ -2
L-59	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -4	L ₄ -2
L-60	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -5	L ₄ -2
L-61	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -6	L ₄ -2
L-62	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -7	L ₄ -2
L-63	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -1
L-64	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -2	L ₄ -1
L-65	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -3	L ₄ -1
L-66	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -4	L ₄ -1
L-67	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -5	L ₄ -1
L-68	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -6	L ₄ -1
L-69	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -7	L ₄ -1
L-70	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -2
L-71	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -2	L ₄ -2
L-72	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -3	L ₄ -2
L-73	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -4	L ₄ -2
L-74	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -5	L ₄ -2
L-75	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -6	L ₄ -2
L-76	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -7	L ₄ -2
L-77	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -1
L-78	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -2	L ₄ -1
L-79	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -3	L ₄ -1
L-80	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -4	L ₄ -1
L-81	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -5	L ₄ -1
L-82	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -6	L ₄ -1

L-83	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -7	L ₄ -1
L-84	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -2
L-85	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -2	L ₄ -2
L-86	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -3	L ₄ -2
L-87	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -4	L ₄ -2
L-88	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -5	L ₄ -2
L-89	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -6	L ₄ -2
L-90	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -7	L ₄ -2
L-91	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -3
L-92	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -4
L-93	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -3
L-94	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -4
L-95	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -3
L-96	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -4

在本发明的一些实施方式中，-L-选自：



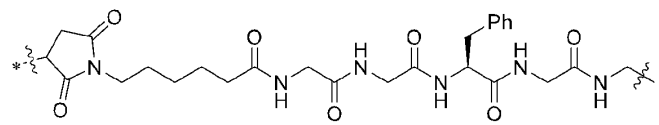




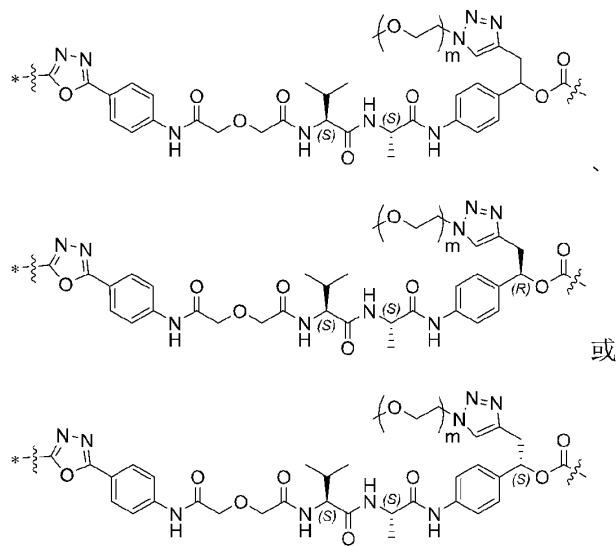
其中，n、s 的定义同上。

在一些实施方案中，-L-选自-L₁-L₂-L₄-L₅-，其中 L₁、L₂、L₄、L₅ 的定义同上。

在一些实施方案中，-L-选自：



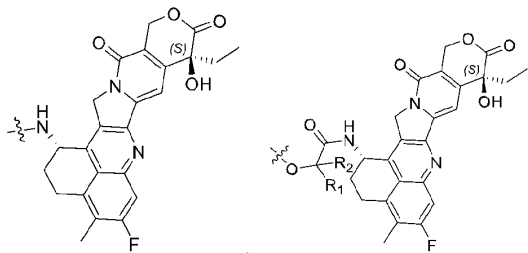
在一些实施方案中，-L-选自：

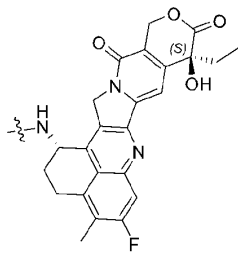


其中，m 选自 3-50 的整数，优选 8-24 的整数，进一步优选 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24。

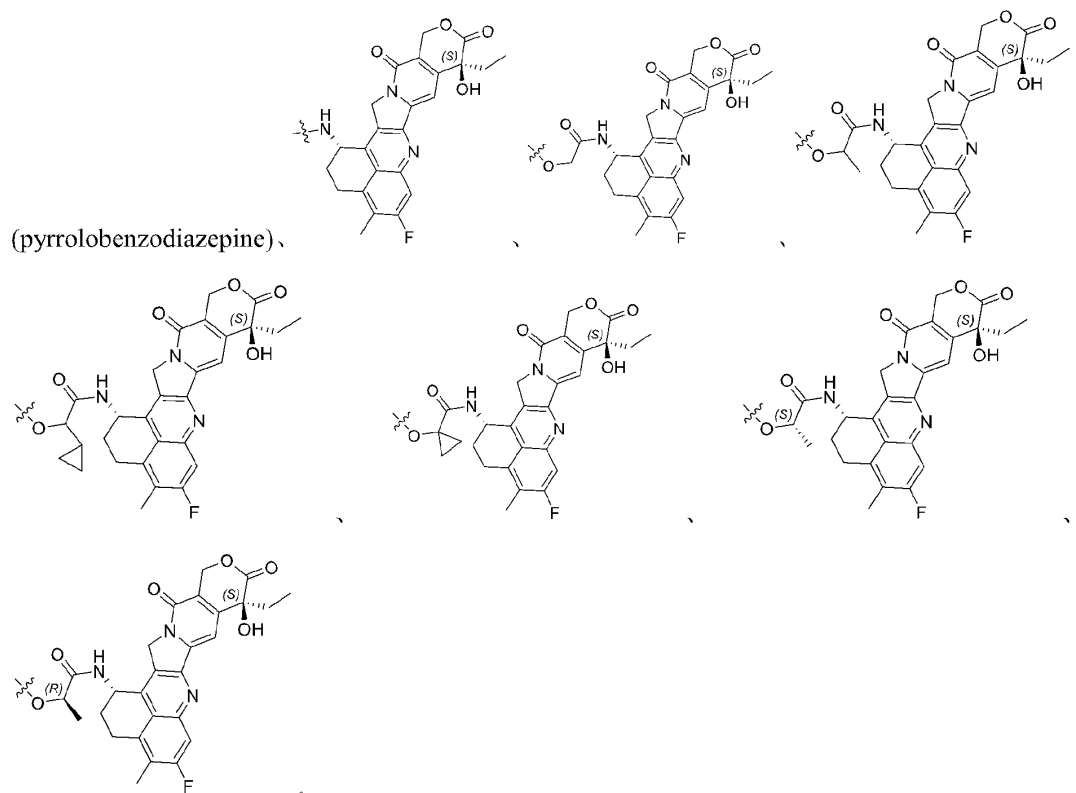
在一些实施方案中，D 选自拓扑异构酶 I 抑制剂、微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂。

在一些实施方案中，D 选自喜树碱衍生物。

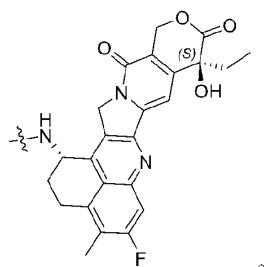


在一些实施方案中，D 选自 ，其中 R₁、R₂ 各自独立的选自 H、C₁₋₃ 烷基（优选甲基、乙基、正丙基、异丙基）、3-6 元环烷基（优选环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己烷基），或者 R₁ 和 R₂ 与连接其的碳原子一起形成 3-6 元环烷基（优选环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己烷基）。

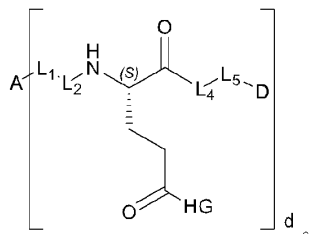
在一些实施方案中，D 选自 MMAE、MMAF、艾日布林、吡咯并苯并二氮卓



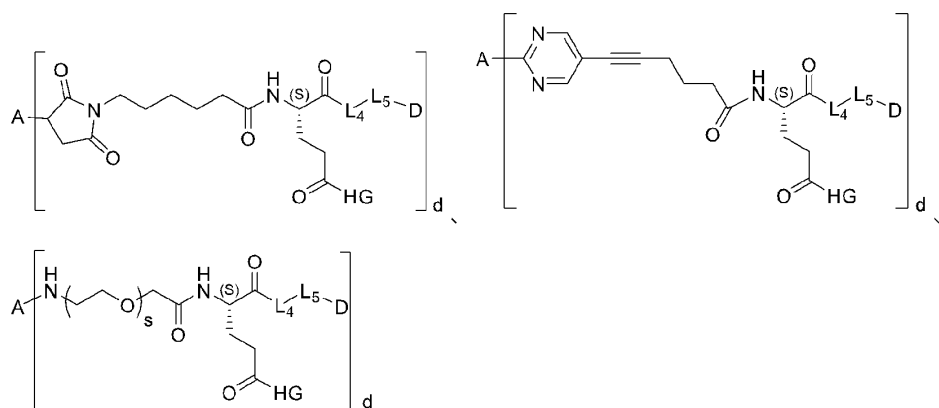
在一些实施方案中，D 选自：



在一些实施方案中，式(I)的抗体药物偶联物具有如下结构：

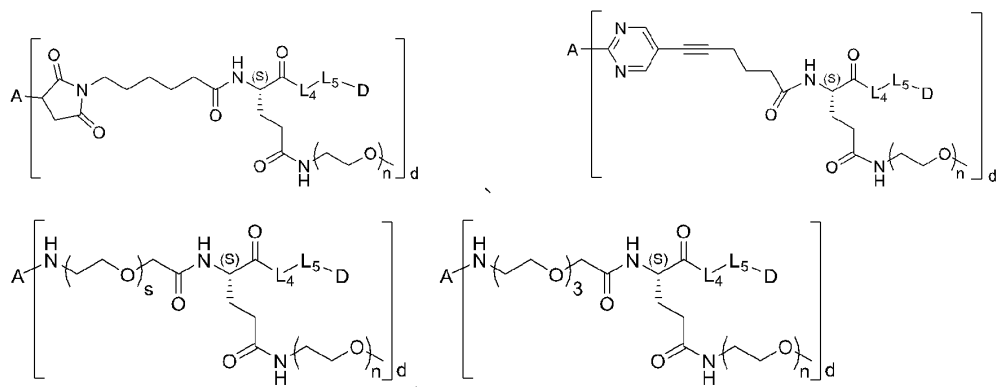


在一些实施方案中，式(I)的抗体药物偶联物具有如下结构：



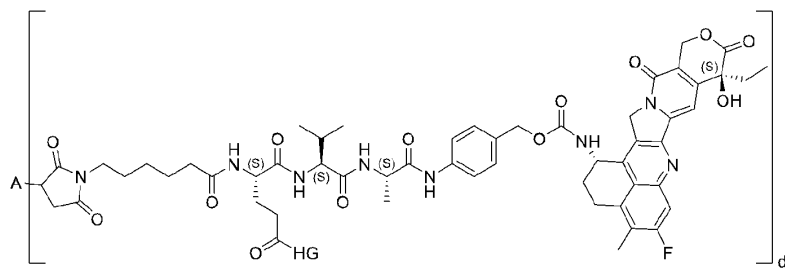
其中，d、s 的定义同上。

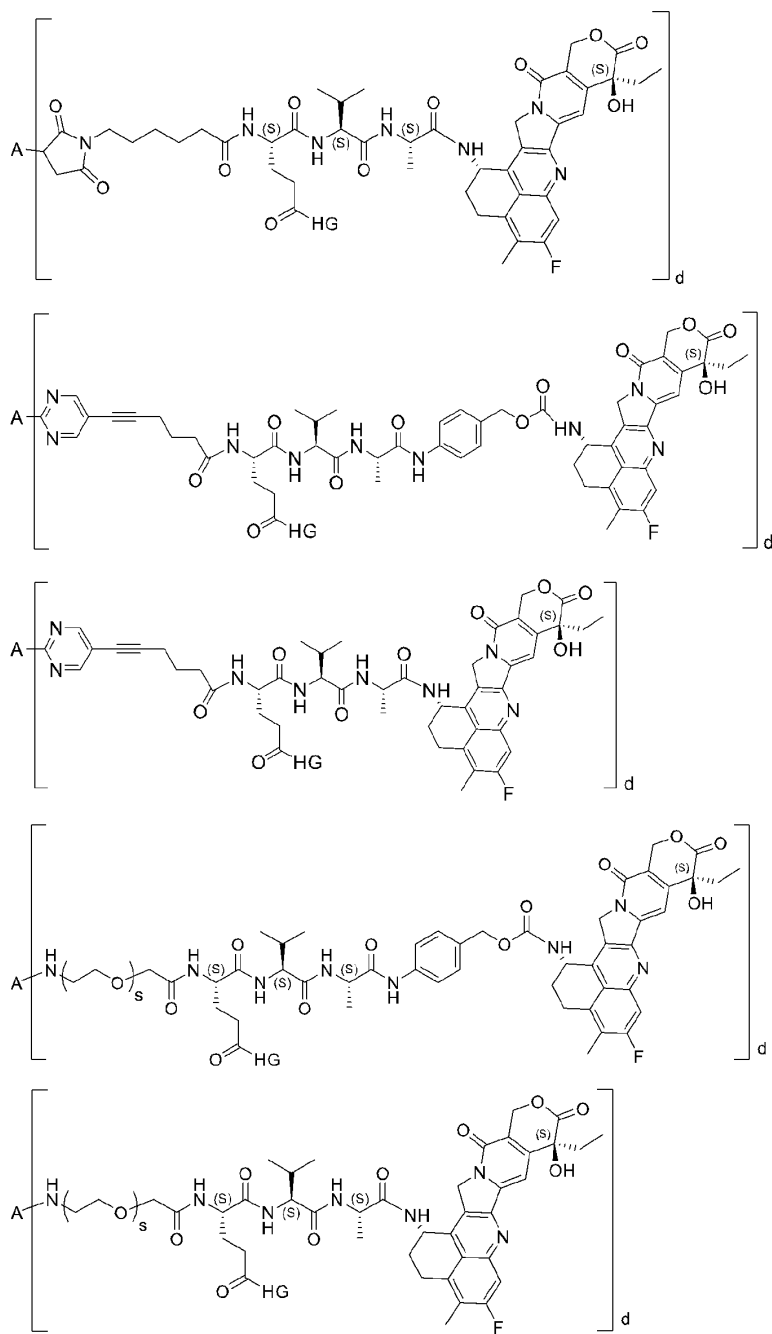
在一些实施方案中，式(I)的抗体药物偶联物具有如下结构：

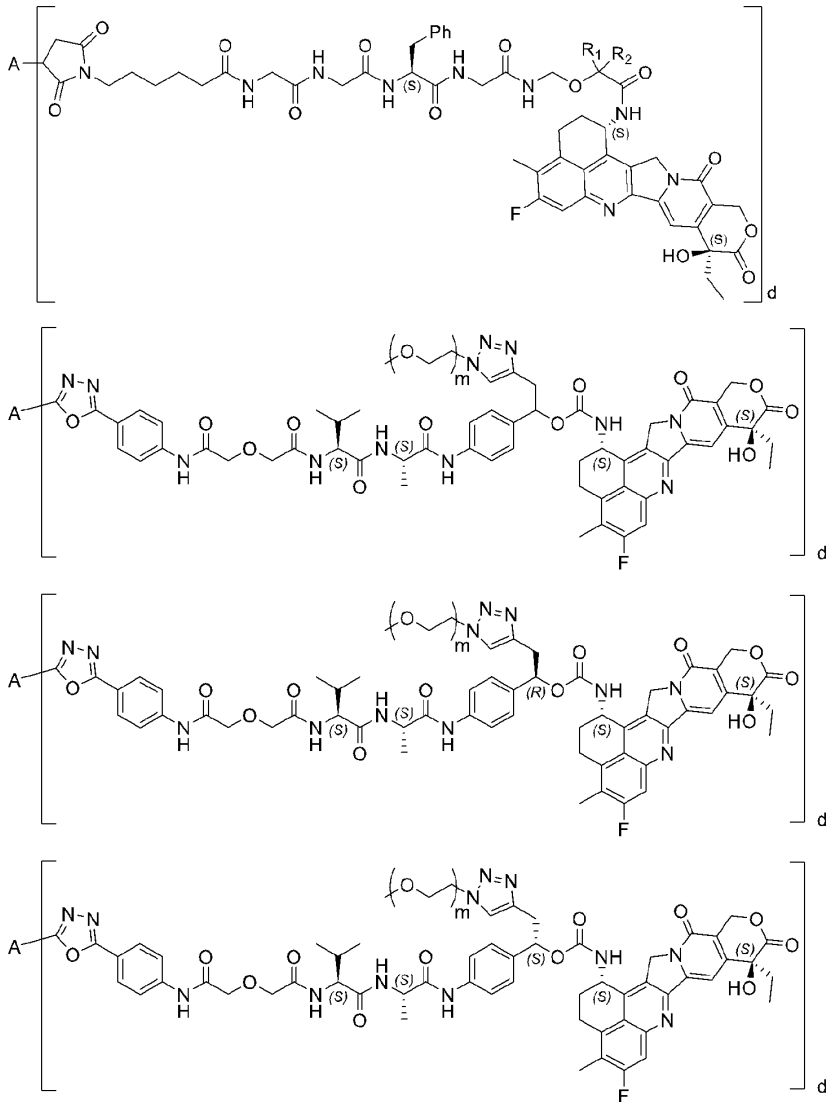


其中，n、d、s 的定义同上。

在一些实施方案中，式(I)的抗体药物偶联物具有如下结构：

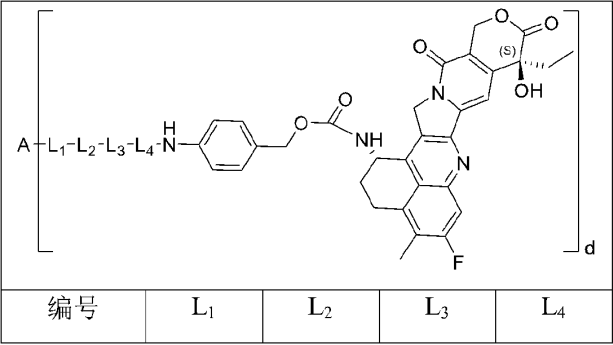






其中，HG、R₁、R₂、d、s、m 的定义同上。

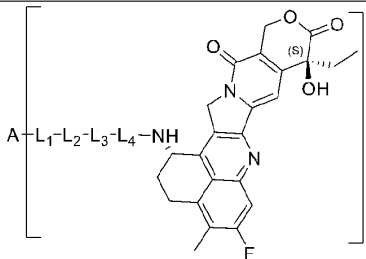
在一些实施方案中，式(I)的抗体药物偶联物具有如下结构：



ADC-1	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -1
ADC-2	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -2	L ₄ -1
ADC-3	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -3	L ₄ -1
ADC-4	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -4	L ₄ -1
ADC-5	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -5	L ₄ -1
ADC-6	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -6	L ₄ -1
ADC-7	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -7	L ₄ -1
ADC-8	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -2
ADC-9	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -2	L ₄ -2
ADC-10	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -3	L ₄ -2
ADC-11	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -4	L ₄ -2
ADC-12	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -5	L ₄ -2
ADC-13	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -6	L ₄ -2
ADC-14	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -7	L ₄ -2
ADC-15	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -1
ADC-16	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -2	L ₄ -1
ADC-17	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -3	L ₄ -1
ADC-18	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -4	L ₄ -1
ADC-19	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -5	L ₄ -1
ADC-20	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -6	L ₄ -1
ADC-21	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -7	L ₄ -1
ADC-22	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -2
ADC-23	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -2	L ₄ -2
ADC-24	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -3	L ₄ -2
ADC-25	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -4	L ₄ -2
ADC-26	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -5	L ₄ -2
ADC-27	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -6	L ₄ -2
ADC-28	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -7	L ₄ -2
ADC-29	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -1
ADC-30	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -2	L ₄ -1
ADC-31	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -3	L ₄ -1
ADC-32	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -4	L ₄ -1
ADC-33	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -5	L ₄ -1

ADC-34	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -6	L ₄ -1
ADC-35	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -7	L ₄ -1
ADC-36	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -2
ADC-37	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -2	L ₄ -2
ADC-38	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -3	L ₄ -2
ADC-39	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -4	L ₄ -2
ADC-40	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -5	L ₄ -2
ADC-41	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -6	L ₄ -2
ADC-42	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -7	L ₄ -2
ADC-43	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -3
ADC-44	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -4
ADC-45	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -3
ADC-46	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -4
ADC-47	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -3
ADC-48	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -4

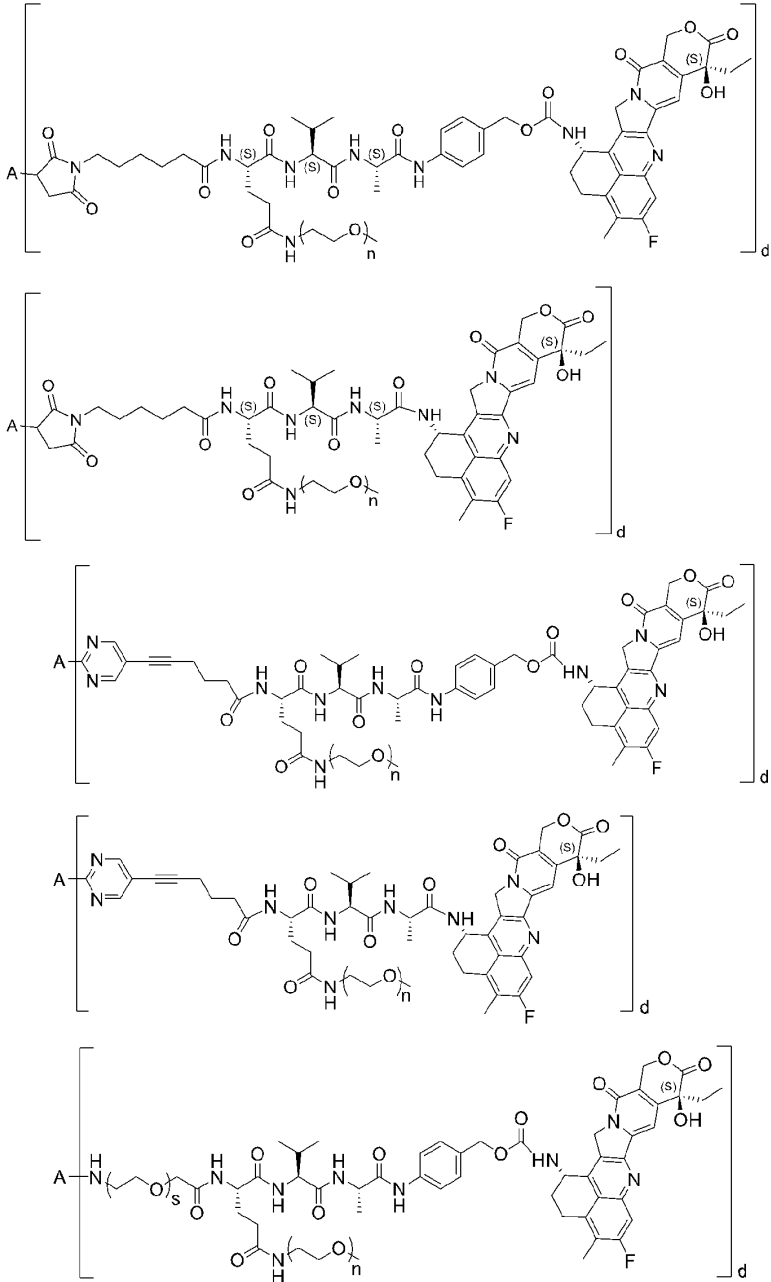
在一些实施方案中，式(I)的抗体药物偶联物具有如下结构：

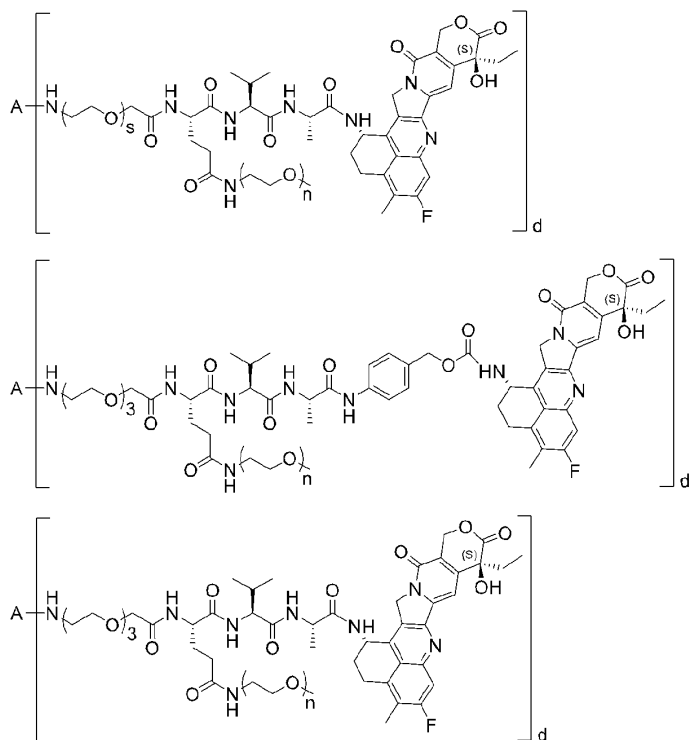
				
编号	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
ADC-49	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -1
ADC-50	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -2	L ₄ -1
ADC-51	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -3	L ₄ -1
ADC-52	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -4	L ₄ -1
ADC-53	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -5	L ₄ -1
ADC-54	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -6	L ₄ -1
ADC-55	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -7	L ₄ -1
ADC-56	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -2
ADC-57	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -2	L ₄ -2
ADC-58	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -3	L ₄ -2

ADC-59	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -4	L ₄ -2
ADC-60	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -5	L ₄ -2
ADC-61	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -6	L ₄ -2
ADC-62	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -7	L ₄ -2
ADC-63	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -1
ADC-64	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -2	L ₄ -1
ADC-65	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -3	L ₄ -1
ADC-66	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -4	L ₄ -1
ADC-67	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -5	L ₄ -1
ADC-68	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -6	L ₄ -1
ADC-69	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -7	L ₄ -1
ADC-70	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -2
ADC-71	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -2	L ₄ -2
ADC-72	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -3	L ₄ -2
ADC-73	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -4	L ₄ -2
ADC-74	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -5	L ₄ -2
ADC-75	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -6	L ₄ -2
ADC-76	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -7	L ₄ -2
ADC-77	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -1
ADC-78	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -2	L ₄ -1
ADC-79	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -3	L ₄ -1
ADC-80	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -4	L ₄ -1
ADC-81	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -5	L ₄ -1
ADC-82	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -6	L ₄ -1
ADC-83	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -7	L ₄ -1
ADC-84	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -2
ADC-85	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -2	L ₄ -2
ADC-86	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -3	L ₄ -2
ADC-87	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -4	L ₄ -2
ADC-88	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -5	L ₄ -2
ADC-89	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -6	L ₄ -2
ADC-90	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -7	L ₄ -2
ADC-91	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -3

ADC-92	L ₁ -1	L ₂ -1	L ₃ -1	L ₄ -4
ADC-93	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -3
ADC-94	L ₁ -2	L ₂ -5	L ₃ -1	L ₄ -4
ADC-95	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -3
ADC-96	L ₁ -5	L ₂ -2	L ₃ -1	L ₄ -4

在一些实施方案中，式(I)的抗体药物偶联物具有如下结构：

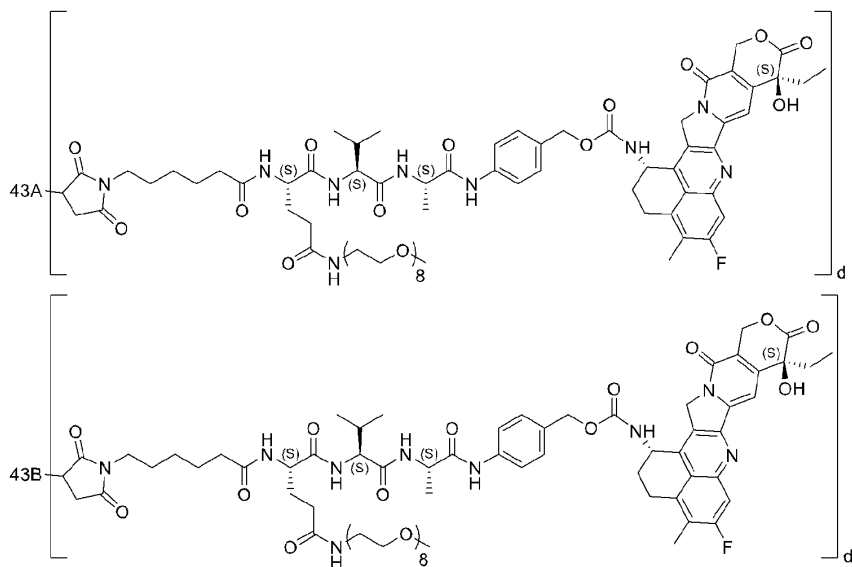


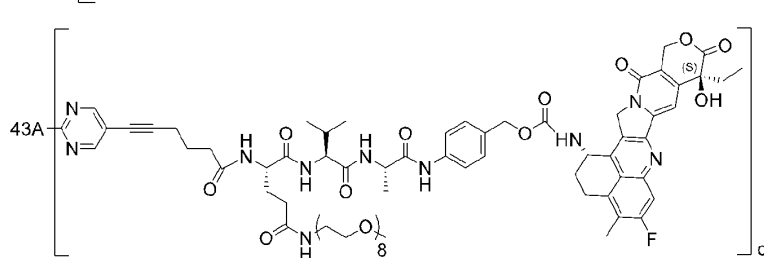
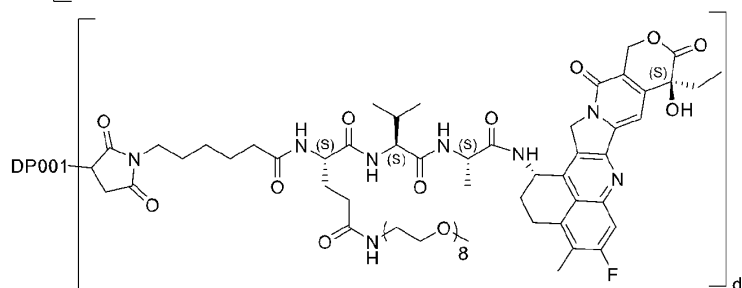
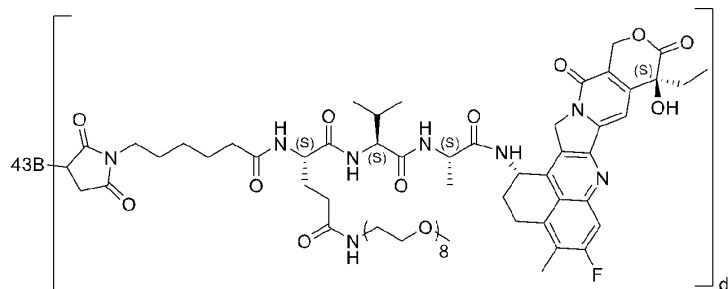
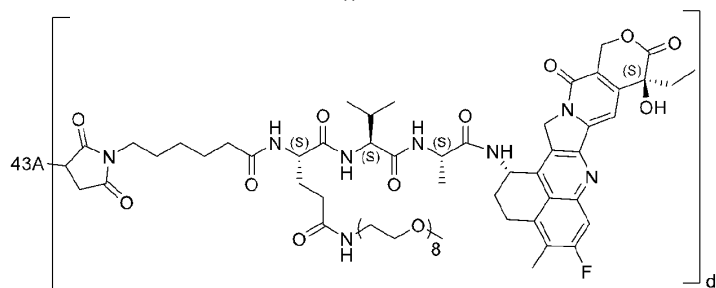
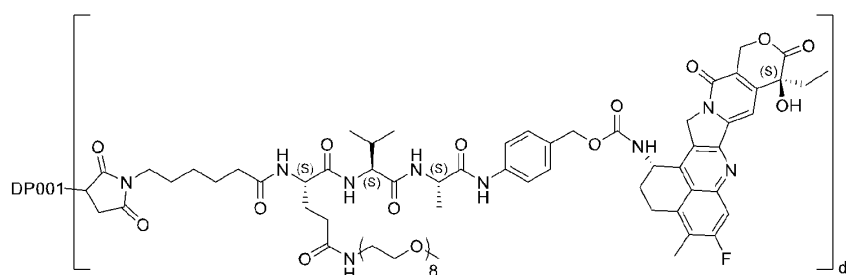


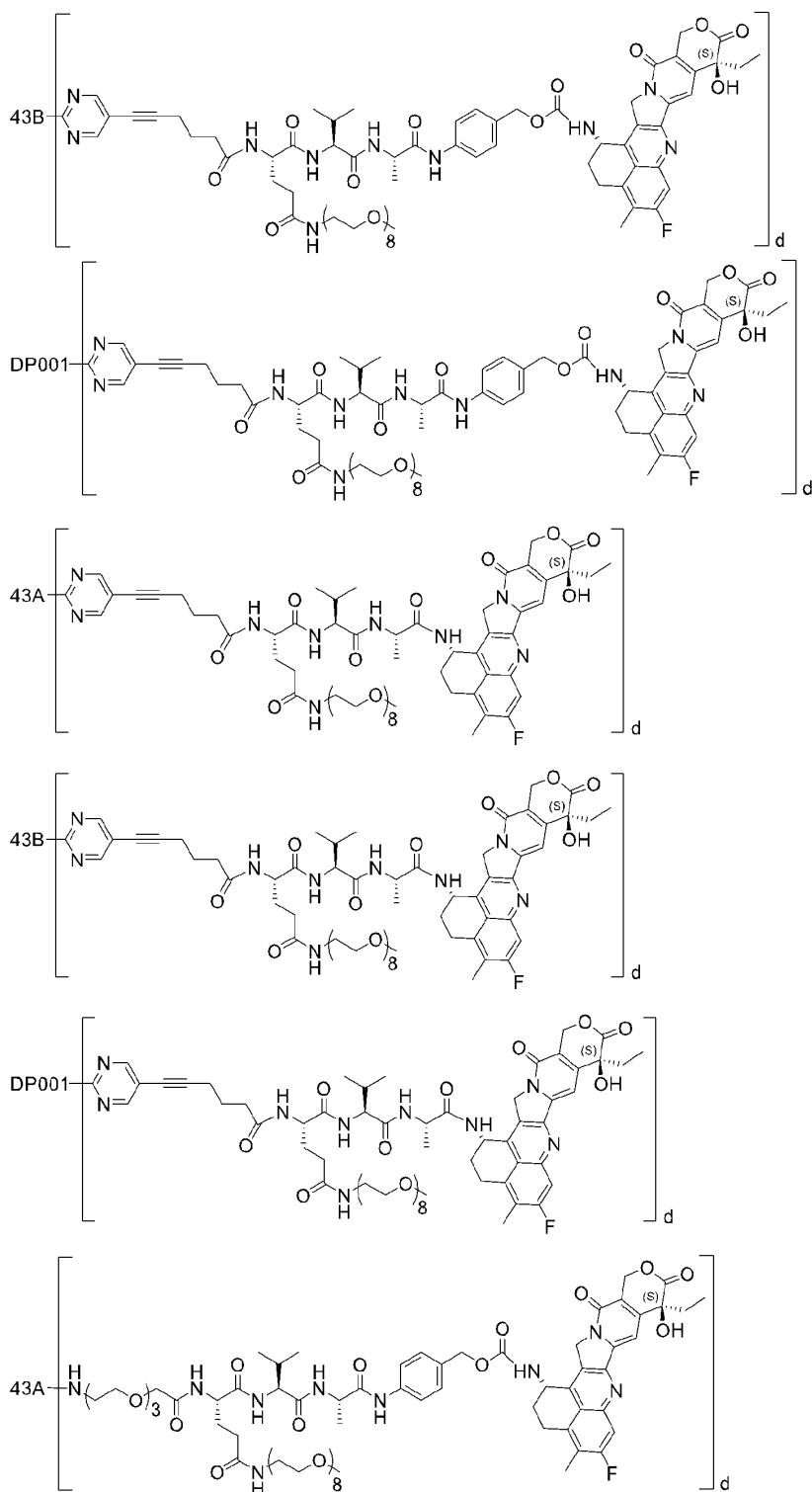
其中，n、d、s的定义同上。

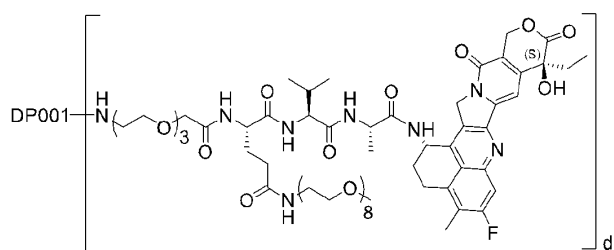
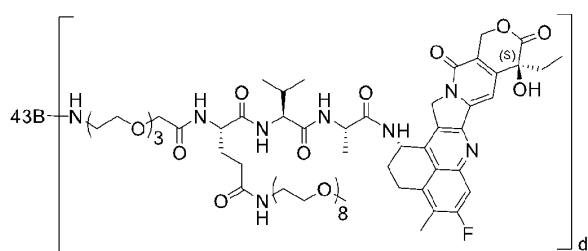
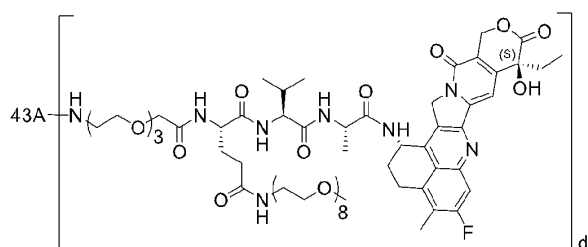
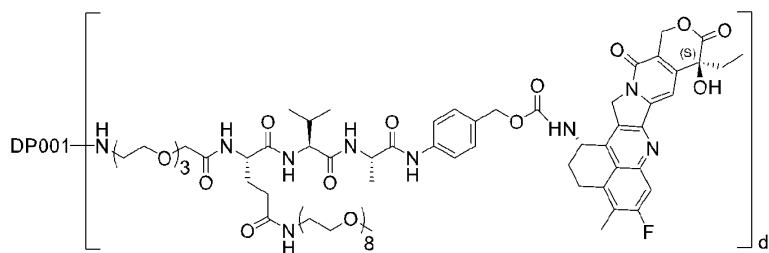
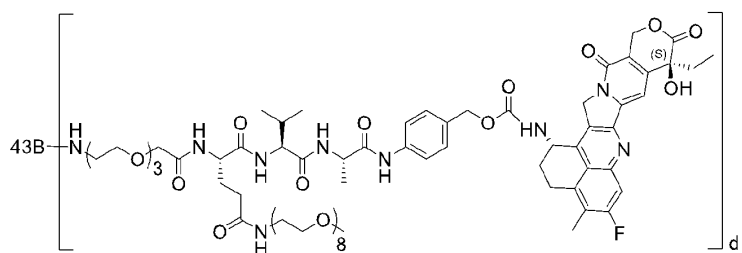
在一些实施方案中，所述式(I)的抗体药物偶联物中，A为43A、43B或DP001。

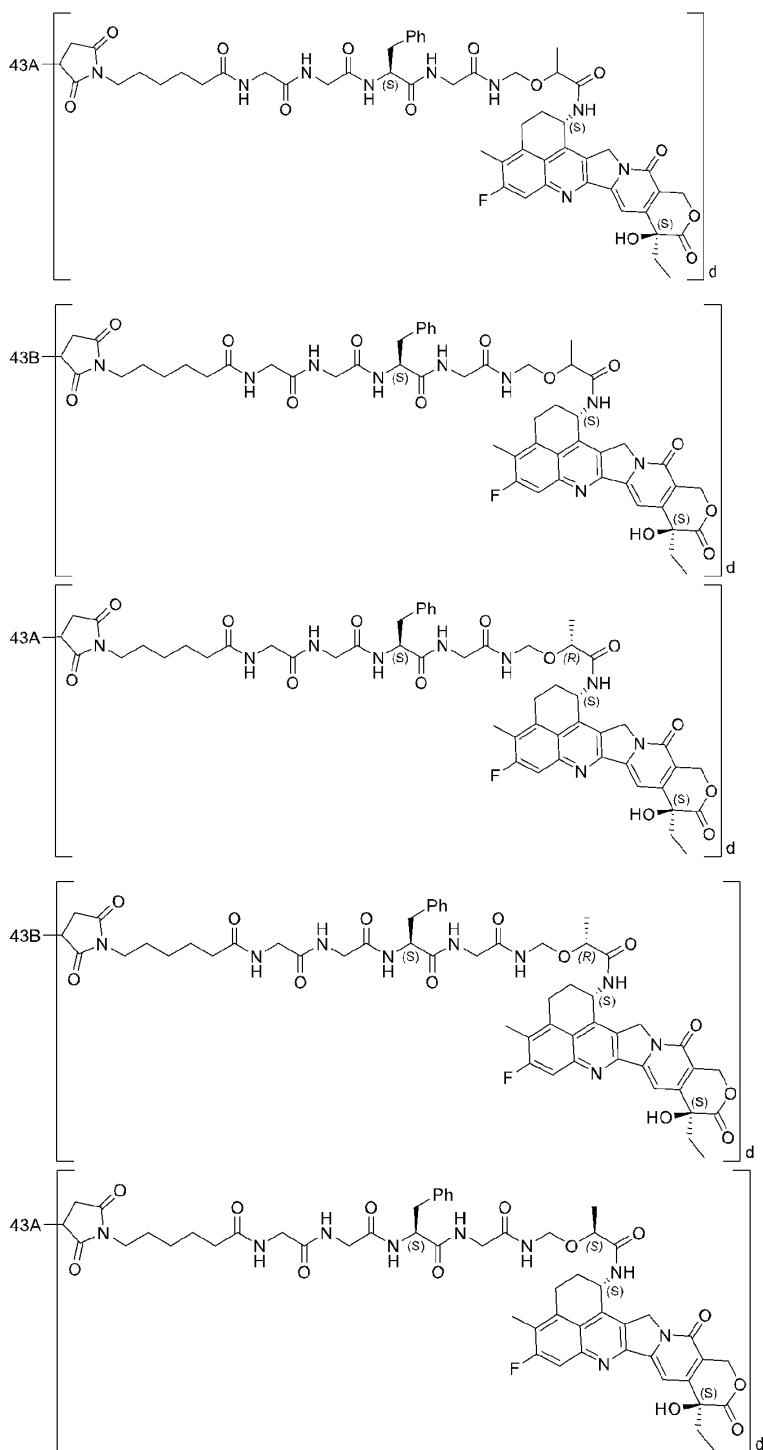
在一些实施方案中，式(I)的抗体药物偶联物选自：

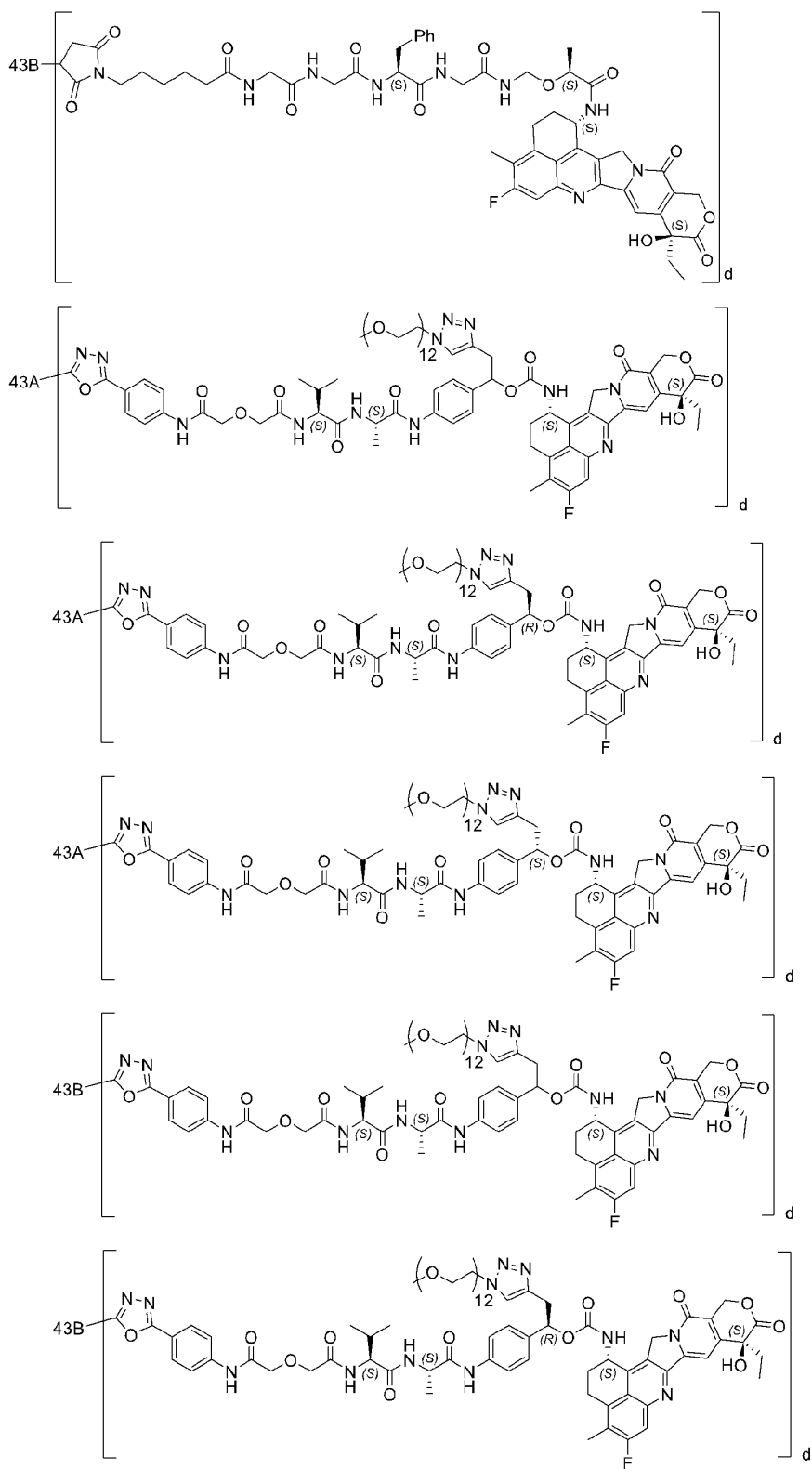


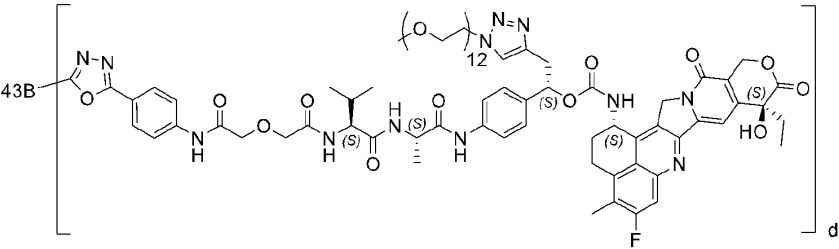






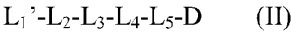


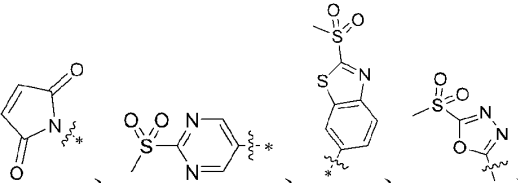




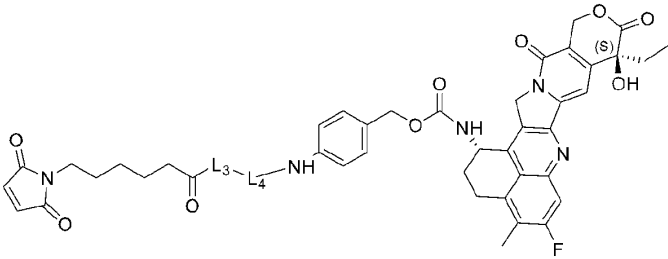
其中 d 选自 1-8 的整数或小数，优选 2-8 的整数或小数，更优选 4-8 的整数或小数，最优选 2、4、6 或 8。

本发明还提供式(II)所示结构的接头-药物化合物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物：



其中 L_1' 选自 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 D 的定义同式(I)。

在一些实施方案中，式(II)所示结构的接头-药物化合物选自：

		
编号	L_3	L_4
LD-1	L_3-1	L_4-1
LD-2	L_3-2	L_4-1
LD-3	L_3-3	L_4-1
LD-4	L_3-4	L_4-1
LD-5	L_3-5	L_4-1
LD-6	L_3-6	L_4-1
LD-7	L_3-7	L_4-1
LD-8	L_3-1	L_4-2

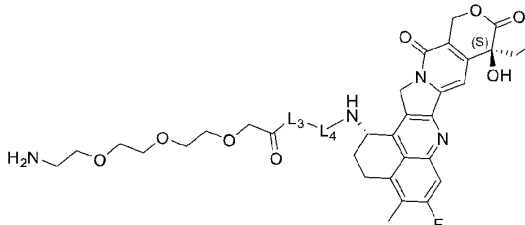
LD-9	L ₃ -2	L ₄ -2
LD-10	L ₃ -3	L ₄ -2
LD-11	L ₃ -4	L ₄ -2
LD-12	L ₃ -5	L ₄ -2
LD-13	L ₃ -6	L ₄ -2
LD-14	L ₃ -7	L ₄ -2
LD-43	L ₃ -1	L ₄ -3
LD-44	L ₃ -1	L ₄ -4
编号	L ₃	L ₄
LD-15	L ₃ -1	L ₄ -1
LD-16	L ₃ -2	L ₄ -1
LD-17	L ₃ -3	L ₄ -1
LD-18	L ₃ -4	L ₄ -1
LD-19	L ₃ -5	L ₄ -1
LD-20	L ₃ -6	L ₄ -1
LD-21	L ₃ -7	L ₄ -1
LD-22	L ₃ -1	L ₄ -2
LD-23	L ₃ -2	L ₄ -2
LD-24	L ₃ -3	L ₄ -2
LD-25	L ₃ -4	L ₄ -2
LD-26	L ₃ -5	L ₄ -2
LD-27	L ₃ -6	L ₄ -2
LD-28	L ₃ -7	L ₄ -2
LD-45	L ₃ -1	L ₄ -3
LD-46	L ₃ -1	L ₄ -4

编号	L ₃	L ₄
LD-29	L ₃ -1	L ₄ -1
LD-30	L ₃ -2	L ₄ -1
LD-31	L ₃ -3	L ₄ -1
LD-32	L ₃ -4	L ₄ -1
LD-33	L ₃ -5	L ₄ -1
LD-34	L ₃ -6	L ₄ -1
LD-35	L ₃ -7	L ₄ -1
LD-36	L ₃ -1	L ₄ -2
LD-37	L ₃ -2	L ₄ -2
LD-38	L ₃ -3	L ₄ -2
LD-39	L ₃ -4	L ₄ -2
LD-40	L ₃ -5	L ₄ -2
LD-41	L ₃ -6	L ₄ -2
LD-42	L ₃ -7	L ₄ -2
LD-47	L ₃ -1	L ₄ -3
LD-48	L ₃ -1	L ₄ -4

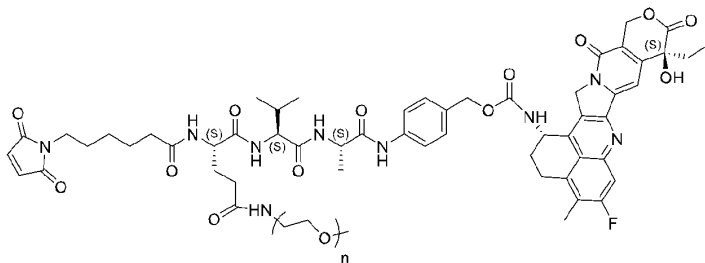
在一些实施方案中，式(II)所示结构的接头-药物化合物选自：

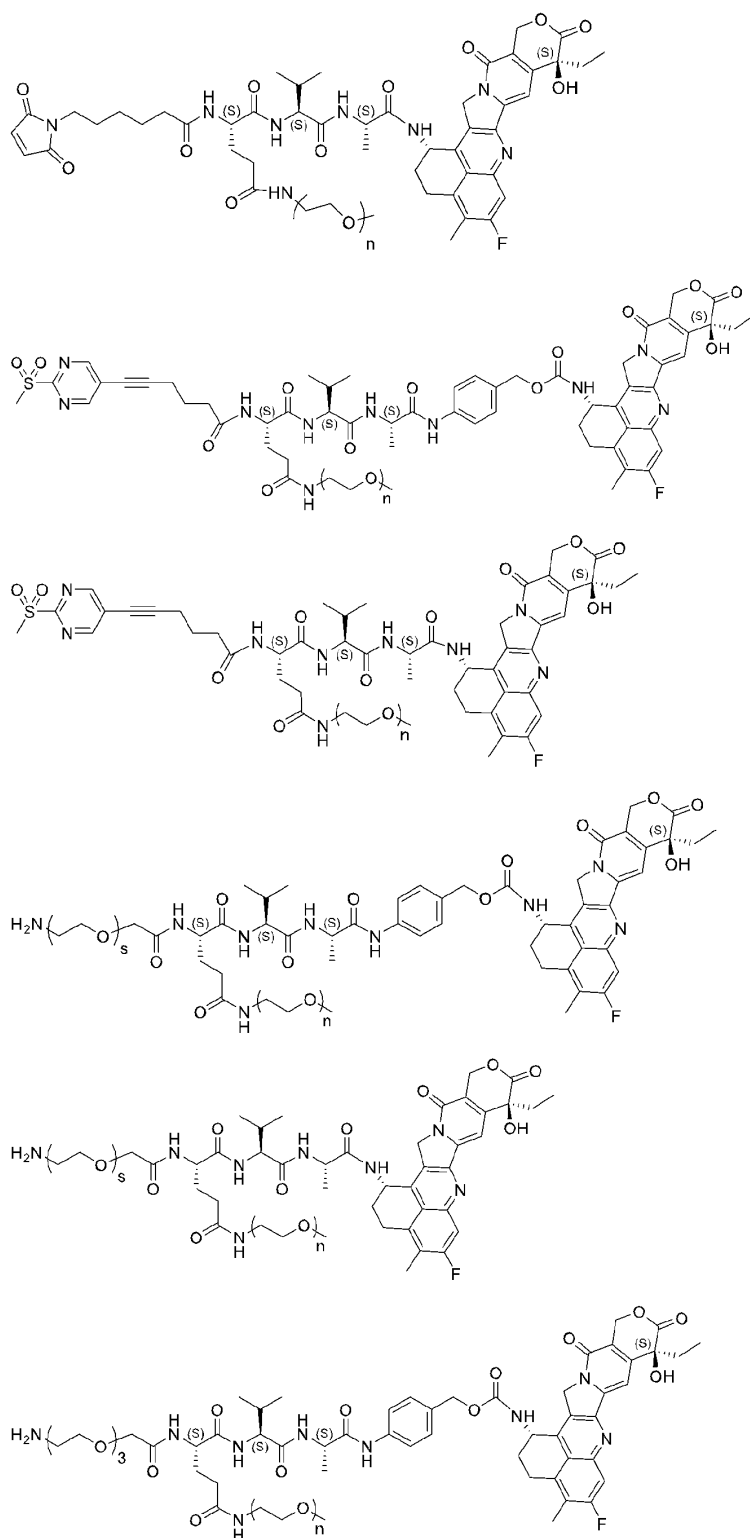
编号	L ₃	L ₄
LD-49	L ₃ -1	L ₄ -1
LD-50	L ₃ -2	L ₄ -1
LD-51	L ₃ -3	L ₄ -1

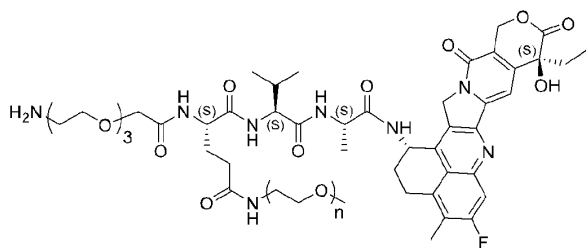
LD-52	L ₃ -4	L ₄ -1
LD-53	L ₃ -5	L ₄ -1
LD-54	L ₃ -6	L ₄ -1
LD-55	L ₃ -7	L ₄ -1
LD-56	L ₃ -1	L ₄ -2
LD-57	L ₃ -2	L ₄ -2
LD-58	L ₃ -3	L ₄ -2
LD-59	L ₃ -4	L ₄ -2
LD-60	L ₃ -5	L ₄ -2
LD-61	L ₃ -6	L ₄ -2
LD-62	L ₃ -7	L ₄ -2
LD-91	L ₃ -1	L ₄ -3
LD-92	L ₃ -1	L ₄ -4
编号	L ₃	L ₄
LD-63	L ₃ -1	L ₄ -1
LD-64	L ₃ -2	L ₄ -1
LD-65	L ₃ -3	L ₄ -1
LD-66	L ₃ -4	L ₄ -1
LD-67	L ₃ -5	L ₄ -1
LD-68	L ₃ -6	L ₄ -1
LD-69	L ₃ -7	L ₄ -1
LD-70	L ₃ -1	L ₄ -2
LD-71	L ₃ -2	L ₄ -2
LD-72	L ₃ -3	L ₄ -2
LD-73	L ₃ -4	L ₄ -2
LD-74	L ₃ -5	L ₄ -2
LD-75	L ₃ -6	L ₄ -2

LD-76	L ₃ -7	L ₄ -2
LD-93	L ₃ -1	L ₄ -3
LD-94	L ₃ -1	L ₄ -4
		
编号	L ₃	L ₄
LD-77	L ₃ -1	L ₄ -1
LD-78	L ₃ -2	L ₄ -1
LD-79	L ₃ -3	L ₄ -1
LD-80	L ₃ -4	L ₄ -1
LD-81	L ₃ -5	L ₄ -1
LD-82	L ₃ -6	L ₄ -1
LD-83	L ₃ -7	L ₄ -1
LD-84	L ₃ -1	L ₄ -2
LD-85	L ₃ -2	L ₄ -2
LD-86	L ₃ -3	L ₄ -2
LD-87	L ₃ -4	L ₄ -2
LD-88	L ₃ -5	L ₄ -2
LD-89	L ₃ -6	L ₄ -2
LD-90	L ₃ -7	L ₄ -2
LD-95	L ₃ -1	L ₄ -3
LD-96	L ₃ -1	L ₄ -4

在一些实施方案中，式(II)所示结构的接头-药物化合物选自：

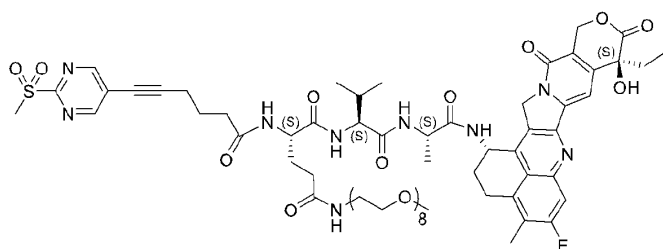
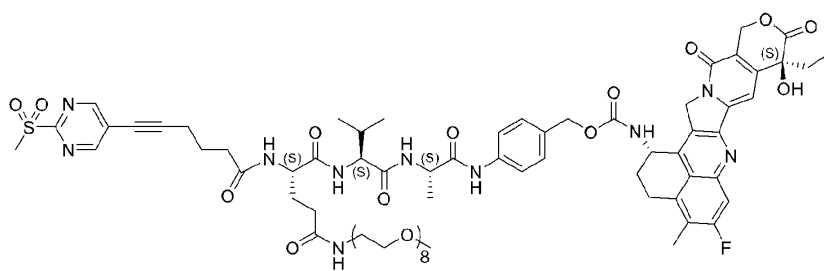
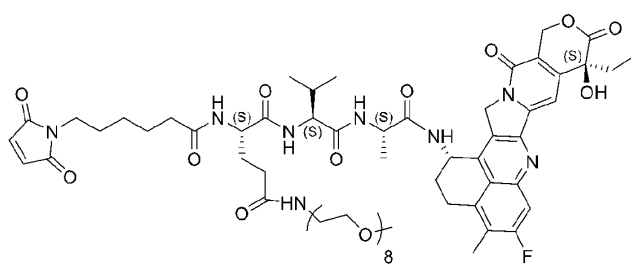
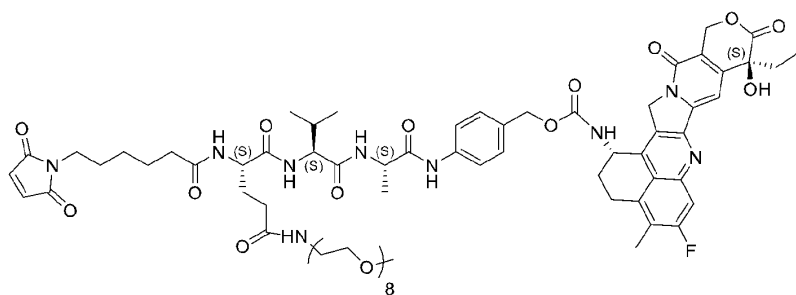


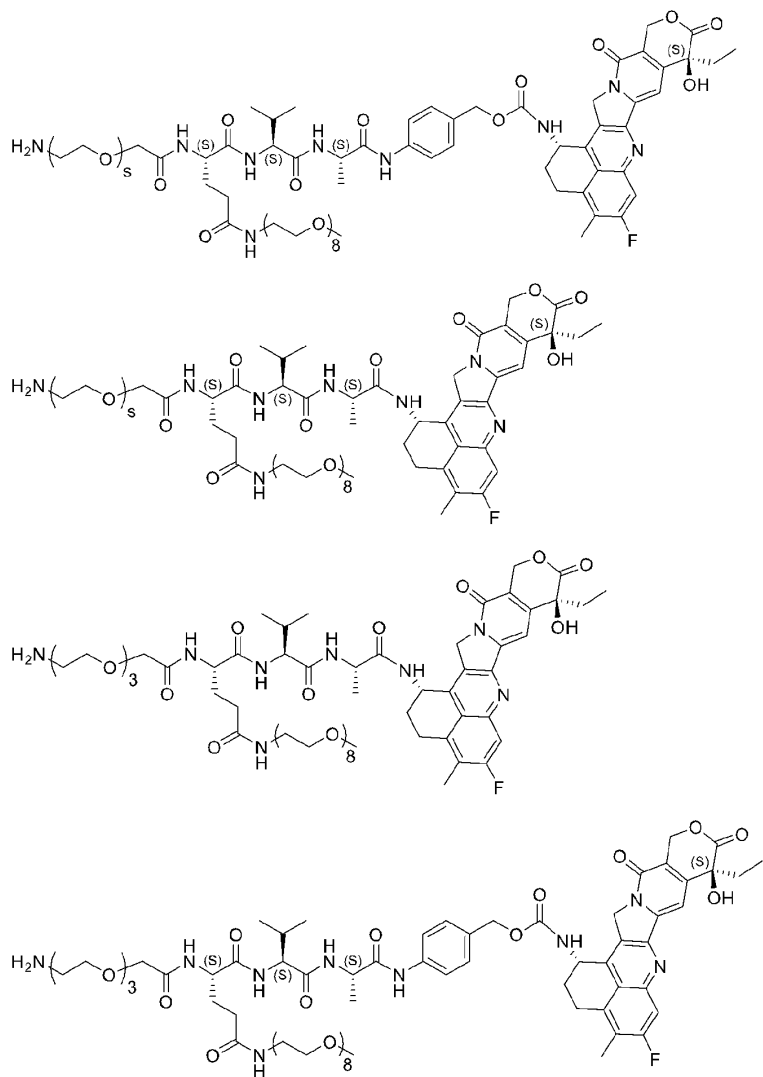




其中，n、s的定义同上。

在一些实施方案中，式(II)所示结构的接头-药物化合物选自：





其中，s 的定义同上。

其中所述抗体-药物偶联物中的由接头和药物组成的部分结构被称为“接头-药物化合物”。所述接头-药物化合物与所述抗体中的链间二硫键位点（重链之间的两个位点，重链与轻链之间的两个位点）中的一个或多个被还原后形成的硫醇基（半胱氨酸残基的硫原子）反应进行连接或通过谷氨酰胺转氨酶（mTGase）偶联至抗体上。

本发明提供一种药物组合物，其包含本发明所述的抗体-药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物。所述药物组合物进一步包括药学上可接受的辅料和载体。

本发明提供本发明所述的抗体-药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映

异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物在制备用于治疗增殖性疾病的药物中的用途。所述增殖性疾病优选为HER2、B7H3异常表达相关疾病，包括癌症，所述癌症优选乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌（例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌）、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病（例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病）骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤（例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤）。

本发明提供一种用于治疗或预防增殖性疾病的方法，该方法包括向需要其患者施用治疗有效剂量的本发明的抗体-药物偶联物，及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物或包含其的药物组合物；所述增殖性疾病优选为HER2、B7H3异常表达相关疾病，包括癌症。所述癌症优选乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌（例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌）、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病（例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病）骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤（例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤）。

在一些实施方案中，所述癌症为肿瘤细胞表面表达HER2（HER2+）、B7H3（B7H3+）的肿瘤。

本发明提供本发明所述的接头-药物化合物在制备抗体-药物偶联物中的用途。

本发明的抗体-药物偶联物可以单独使用，也可以与其它抗肿瘤剂组合使用。

本发明提供一种药物组合物，包含本发明的抗体-药物偶联物和其它抗肿瘤剂。

本发明提供本发明所述的抗体-药物偶联物的制备方法，其包括如下步骤：

S1：抗体的还原；具体为：将抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。按照还原量加入适量 10mM TCEP 水溶液及 1M 磷酸氢二钾水溶液，确认了该溶液的 pH 为正确后，于 37°C 孵育数小时，由此将抗体内的二硫键还原。

S2：抗体与接头-药物化合物的偶联；

具体为：在室温下向上述溶液中添加适量二甲基亚砷溶液溶解的 10mM 化合物，混匀，在室温下反应 0.5-4 小时，将接头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100mMN-乙基马来酰亚胺水溶液，进而在室温下搅拌，终止接头-药物化合物的反应。

S3 抗体-药物偶联物的纯化：

具体为：在 AKTA 系统上用 PBS7.0/EDTA 溶液(10 mM PB, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.0)平衡 1 mL Mabselect SuRe 预装层析柱，使用上样环进行抗体-药物偶联物上样，使用 PBS7.0/EDTA 再平衡 10~20 mL 后，用 pH 3.5 的醋酸盐缓冲液进行洗脱，加入 1/10 体积的柠檬酸钠中和液进行中和，得到纯化后的抗体-药物偶联物。

本发明提供本发明所述的抗体-药物偶联物的制备方法，其包括如下步骤：

将接头-药物化合物和抗体在 mTgase（优选茂源链霉菌(*Streptovorticillium mobaraense*)）存在下反应。

具体为：分别将一定体积的接头-药物化合物、反应缓冲液、抗体、mTgase（优选茂源链霉菌(*Streptovorticillium mobaraense*)）、H₂O 加入 EP 管中，ADC 由 mTgase 催化。密封混匀后置于室温，反应时间不超过 4 天。当重链偶联率超过 95%时，认为缀合反应完成，立即纯化，ADC 纯化方式与抗体相同。使用 RP-HPLC 监测反应。

使用消毒的 AKTA® Ready 系统，将完成的反应物以 30-35g ADC/L 树脂装载至消毒的 CAPTIVA®蛋白 A 柱上，最短停留时间为 5 分钟，以确保 ADC 产物的完全结合。使用深度过滤器，在纯化期间从反应物和/或缓冲液中除去任何颗粒，并维持无菌。然后用过量的结合和洗涤缓冲液洗涤柱，以便在期望产物的低 pH 洗脱之前除去 mTgase、未反应的毒素分子和任何不需要的缓冲液组分。将洗脱部分收集在预填充有中和缓冲液的无菌收集袋中。

本发明还提供了一种抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包括重链和/或轻链，所述重链包括 3 个互补决定区(CDR)，其中重链互补决定区 1(HCDR1)氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，重链互补决定区 2(HCDR2)氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，重链互补决定区 3(HCDR3)氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示；所述轻链包括轻链 3 个互补决定区(CDR)，其中轻链互补决定区 1(LCDR1)氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，轻链互补决定区 2(LCDR2)氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示，轻链互补决定区 3(LCDR3)氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，其中 CDR 按照 Kabat 编号规则确定。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包括重链和/或轻链，所述重链的可变区(HV)序列如 SEQ ID NO:7 所示，所述轻链的可变区(LV)序列如 SEQ ID NO:8 所示。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体还包括重链恒定区序列或其变体，和/或轻链恒定区序列或其变体。

在一些实施方案中，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv 或 F(ab')₂。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段为人源化或全人源抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体包括重链和/或轻链，所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所示，所述轻链的氨基酸（LV）序列如 SEQ ID NO:11 所示。

本发明提供了包含上述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段的药物组合物。

本发明提供了编码上述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

本发明提供包含上述编码抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列的表达载体。

本发明提供包含上述表达载体的宿主细胞。

本发明提供包含上述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段的双抗或多抗。

本发明提供偶联上述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段的抗体药物偶联物。

本发明提供一种抗体药物偶联物，其包含上述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，和细胞毒剂。

本发明的抗体-药物偶联物相比现有技术已知的抗体-药物偶联物如 DS-8201 或目前在不同靶点效果较好的实验样品作为对照，均展现出具有更好的抗细胞增殖效果，具有显著的抑瘤效果，具有更好的稳定性，包括血浆稳定性和缓冲液稳定性，具有更低的毒性，具有更好的旁观者效应（即目标基因阳性的肿瘤细胞死亡以后，还可引起邻近肿瘤细胞的死亡），具有更宽的治疗窗口，目前发现的毒素分子在高浓缩时展现出更高的拓扑异构酶抑制活性。

本发明的抗 B7H3 抗体相比现有技术已知的抗 B7H3 抗体如 M30(CN103687945B)，展现出具有更高的细胞结合活性，更快的内吞速率。

M30 抗体序列如下：

>M30-H1 (SEQ ID NO:24)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYFTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVVKYNEKFGRVTITADES
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYGSPLYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPP
CPAPPELLGGPVSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>M30-L4 (SEQ ID NO:25)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDF
AVYYCQQWNSNPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

定义

除另有规定外，术语“抗体-药物偶联物”是指将抗体(如单克隆抗体)或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素药物相连。

除另有规定外，术语“接头-药物化合物”是指“抗体-药物偶联物”中由接头化合物和药物化合物组成的部分结构。

本发明中所述接头-药物化合物与所述抗体通过本领域常规的偶联方式进行连接，包括：赖氨酸偶联、轻重链间还原性二硫键偶联、酶法偶联和定向偶联(Beck A, Reichert JM. Antibody-drug conjugates: Present and future; MAbs, 2014, 6: 15-17; McCombs J R, Owen S C. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. The AAPS journal, 2015, 17: 339-351)。本发明优选通过轻重链间还原性二硫键偶联，即轻重链间二硫键位点(重链之间的两个位点，重点与轻链之间的两个位点)中的一个或多个被还原后形成的硫醇基(半胱氨酸残基的硫原子)反应进行连接。还优选酶法偶联，即通过谷氨酰胺转氨酶(mTGase)将接头-药物化合物偶联至抗体上。

除另有规定外，术语“药物上可接受的盐”或“药用盐”是指在合理医学判断范围内适用于与哺乳动物特别是人的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应等并与合理的效益/风险比相称的盐，比如胺、羧酸和其他类型化合物的医学上可接受的盐在所属领域中是被熟知的。可以在本发明化合物的最终分离和纯化期间原位制备所述盐，或单独通过将游离碱或游离酸与合适的试剂反应制备所述盐。

除另有规定外，术语“同位素标记物”是指本发明的化合物可以以同位素示踪的或富集形式存在，含有一个或多个原子，这些原子的原子量或质量数不同于自然界中发现的最大量的原子的原子量或质量数。同位素可以是放射性或非放射性的同位素。通常用作同位素标记的同位素是：氢同位素： ^2H 和 ^3H ；碳同位素： ^{13}C 和 ^{14}C ；氯同位素： ^{35}Cl 和 ^{37}Cl ；氟同位素： ^{18}F ；碘同位素： ^{123}I 和 ^{125}I ；氮同位素： ^{13}N 和 ^{15}N ；氧同位素： ^{15}O 、 ^{17}O 和 ^{18}O 和硫同位素 ^{35}S 。这些同位素标记化合物可以用来研究药用分子在组织中的分布情况。尤其是 ^2H 和 ^{13}C ，由于它们容易标记且方便检测，运用更为广泛。某些重同位素，比如重氢(2H)，的取代能增强代谢的稳定性，延长半衰期从而达到减少剂量的目的而提供疗效优势的。同位素标记的化合物一般从已被标记的起始物开始，用已知的合成技术象合成非同位素标记的化合物一样来完成其合成。

除另有规定外，术语“溶剂合物”、“溶剂化物”意指本发明化合物与一个或多个溶剂分子(无论有机的还是无机的)的物理缔合。该物理缔合包括氢键。在某些情形中，例如当一

个或多个溶剂分子纳入结晶固体的晶格中时，溶剂化物将能够被分离。溶剂化物中的溶剂分子可按规则排列和/或无序排列存在。溶剂合物可包含化学计量或非化学计量的溶剂分子。

“溶剂合物”涵盖溶液相和可分离的溶剂合物。示例性溶剂合物包括但不限于水合物、乙醇合物、甲醇合物和异丙醇合物。溶剂化方法是本领域公知的。

除另有规定外，术语“立体异构体”是指具有相同化学构造，但原子或基团在空间上排列方式不同的化合物。立体异构体包括对映异构体、非对映异构体、构象异构体(旋转异构体)、几何异构体(顺/反)异构体、阻转异构体等。所得的任何立体异构体的混合物可以依据组分物理化学性质上的差异被分离成纯的或基本纯的几何异构体，对映异构体，非对映异构体，例如，通过色谱法和/或分步结晶法。

除另有规定外，术语“杂原子”即指氮、氧、硫、卤素原子。

除另有规定外，术语“烷基”指一价饱和脂肪族烃基团，包含1-20个碳原子的直链或支链基团，优选包含1-10个碳原子(即C₁₋₁₀烷基)，进一步优选包含1-8个碳原子(C₁₋₈烷基)，更优选包含1-6个碳原子(即C₁₋₆烷基)。例如“C₁₋₆烷基”指的是该基团为烷基，且碳链上的碳原子数量在1-6之间(具体地为1个、2个、3个、4个、5个或6个)，实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、新戊基、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、正己基等。

除另有规定外，术语“-烷基-”或“亚烷基”是指饱和直链或支链二价烃基。例如，C₁-C₈亚烷基是指具有1-8数目的碳原子的直链或支链亚烷基。

除另有规定外，术语“杂烷基”是指烷基中的一个或多个碳原子被杂原子替代。

除另有规定外，术语“亚杂烷基”是指两端连接其他基团的二价“杂烷基”。

除另有规定外，术语“亚苯基”是指两端连接其他基团的二价“苯基”。

除另有规定外，术语“环烷基”即指完全饱和的并且可以以单环、桥环或螺环存在的碳环。优选地包含3-12个碳原子(即C₃₋₁₂环烷基)，更优选包含3-10个碳原子(C₃₋₁₀环烷基)，进一步优选3-7个碳原子(C₃₋₇环烷基)、4-6个碳原子(C₄₋₆环烷基)、5-6个碳原子(C₅₋₆环烷基)。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、甲基环丙基、2-乙基-环戊基、二甲基环丁基、降冰片基(双环[2.2.1]庚基)、双环[2.2.2]辛基、金刚烷基等。

除另有规定外，术语“亚环烷基”是指两端连接其他基团的二价“环烷基”。

除另有规定外，术语“氨基酸残基”是指当一个氢原子从氨基酸的胺和/或一个羟基从羧基末端去除时的相应残基。

除另有规定外，术语“肽”是指通过肽（酰胺）键连接的氨基酸单体的短链。

附图说明

- 图 1 为 DP001-042 DAR 值检测结果。
- 图 2 为 DP001-043 DAR 值检测结果。
- 图 3 为 43A-DXd DAR 值检测结果。
- 图 4 为 43A-042 DAR 值检测结果。
- 图 5 为 43B-042 DAR 值检测结果。
- 图 6 为 43A-043 DAR 值检测结果。
- 图 7 为 43B-043 DAR 值检测结果。
- 图 8 为抗体-药物偶联物的疏水性检测结果。
- 图 9 为 43A 抗体亲和力检测结果。
- 图 10 为 43B 抗体亲和力检测结果。
- 图 11 为 43A、43B 抗体流式亲和力结果。
- 图 12、图 13 为抗体-药物偶联物对 SK-OV-3、SK-BR-3 细胞抑制活性检测结果。
- 图 14、图 15 为抗体-药物偶联物对人黑色素瘤细胞 A375 细胞抑制活性检测结果。
- 图 16 为抗体-药物偶联物对人肺癌细胞 Calu-6 细胞移植瘤肿瘤体积的影响。
- 图 17 为化合物 12 的单晶衍射图。
- 图 18 为抗体-药物偶联物对人黑色素瘤细胞 A375 小鼠移植瘤体积的影响。
- 图 19 为抗体-药物偶联物对人肺癌细胞 Calu-6 小鼠移植瘤体积的影响。
- 图 20 为抗体-药物偶联物对人黑色素瘤细胞 A375 小鼠移植瘤体积的影响。
- 图 21 为抗体-药物偶联物对人食管鳞癌 KYSE-150 小鼠移植瘤体积的影响。
- 图 22 为抗体-药物偶联物对人非小细胞肺癌 SK-MES-1 小鼠移植瘤体积的影响。
- 图 23 为抗体-药物偶联物对人肝癌 Hep3B 小鼠移植瘤体积的影响。
- 图 24 为抗体-药物偶联物对人肺癌细胞 Calu-6 小鼠移植瘤体积的影响。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或者按照制造厂商所建议的条件。除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域专业人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法之中。文中所示的较佳实施方法与材料仅做示范之用。

本发明的化合物结构是通过核磁共振（NMR）或/和液质联用色谱（LC-MS）或/和液相色谱（HPLC）来确定的。NMR 的测定使用的仪器是 Bruker Avance III 400 MHz 核磁共振仪；LC-MS 使用的仪器是 SHIMADZU LC-20AD-PDA-LCMS-2020；HPLC 使用的仪器是 SHIMADZU LC-20AD-PDA 高效液相色谱仪。

本发明实施例中的起始原料是已知的并且可以在市场上买到，或者可以采用或按照本领域已知的方法来合成。

缩写词说明

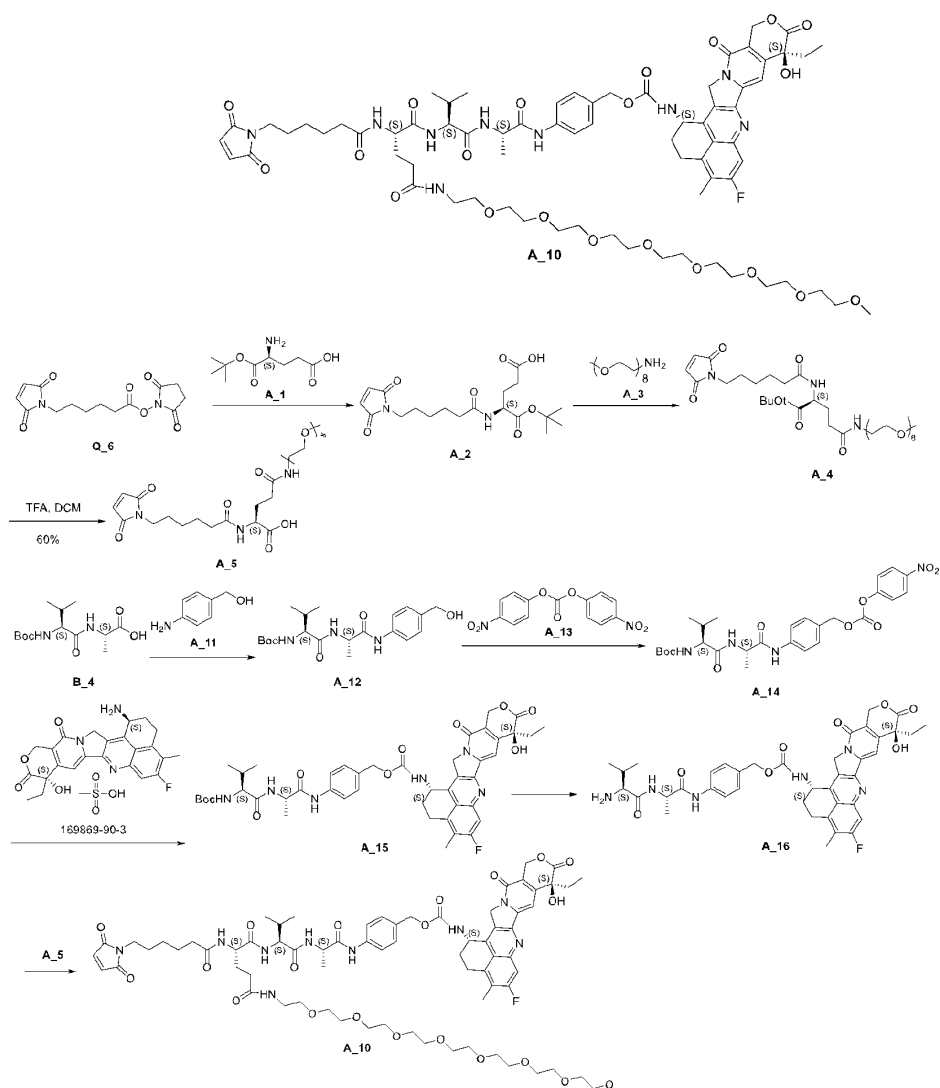
DMF	N,N-二甲基甲酰胺	TBAF	四丁基氟化铵
TEA	三乙胺	DMSO	二甲亚砜
THF	四氢呋喃	DIBAL-H	二异丁基氢化铝
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺	TFAA	三氟乙酸酐
DBU	1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯	Boc	叔丁氧羰基
EEDQ	2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉	Fmoc	9-芴甲氧羰基
PPTS	对甲基苯磺酸吡啶	TECP	三(2-羧乙基)膦
THPTA	三(3-羟丙基三唑甲基)胺	DCA	二氯乙酸
EDCI	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
9-BBN	9-硼双环[3.3.1]壬烷	Py	吡啶
tBuOH	叔丁醇	HOBT	1-羟基苯并三唑
NPCCI	对硝基苯甲酰氯	NH ₄ FA	甲酸铵

制备实施例

一、接头-药物化合物（Linker-Drug）的制备

实施例 1

4-((30S, 33 S, 36 S)-30-(6-(2,5-二氧 -2,5-二氢 -1H- 吡咯 -1-基)己氨基) -33-异丙基 -36-甲基 -27,31,34-三氧基 -2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂 -26,32,35-三氮杂庚三酸 -37-氨基)苄基(1S, 9 S) -9-乙基 -5-氟 -9-羟基 -4-甲基 -10,13-二氧 -2,3,9,10,13,15-六氢 -1H, 12 H- 苯并[de]吡喃[3', 4': 6,7]吡啶[1,2-b]喹啉 -1-基)氨基甲酸酯 (A₁₀)



第一步：化合物 **A_2** 的制备：

(1) 将 **Q_6** (10 g, 32.5 mmol)、**A_1** (6.59 g, 32.5 mmol) 用 120 ml DMF 溶解，加入 DIEA (12.56 g, 97.4 mmol)，室温下反应 2 h。

(2) LC-MS 监测反应结束，将反应液加到 1mol/L HCl 中，乙酸乙酯萃取两次，合并有机相，用饱和食盐水洗涤两次，无水硫酸钠干燥后浓缩得到 30 g 淡黄色油状物粗品，上述粗品拌样后柱层析 (DCM:MeOH=50:1) 得 12g 淡黄色油状物 **A_2**。LC-MS[M+H]⁺: m/z 397.1。

第二步：化合物 **A_4** 的制备：

(1) 将 **A_2** (1.2 g, 3 mmol)、**A_3** (1 g, 3 mmol) 用 15 ml DMF 溶解，加入 DIEA (1.16 g, 9 mmol)、HATU (1.14 g, 3 mmol)，室温下反应 2 h。

(2) LC-MS 监测反应结束, 经反相柱 (水: 乙腈=65%: 35%) 得到产品, 冻干得 1g 淡黄色油状物 **A_4**。LC-MS[M+H]⁺: m/z 762.4。

第三步: 化合物 **A_5** 的制备:

(1) 将 **A_4** (1 g, 3 mmol) 用 10 ml (DCM:TFA=1:1) 溶解, rt 反应 17 h。

(2) LCMS 监测反应结束, 浓缩得到 1.2 g 黄色油状物粗品。LC-MS[M+H]⁺: m/z 706.4。

第四步: 化合物 **A_12** 的制备:

(1) 将 **B_4** (1 g, 3.5 mmol)、**A_11** (427 mg, 3.5 mmol) 用 20 ml DMF 溶解, 加入 2,4,6-三甲基吡啶 (1.1 g, 10.4 mmol)、(2-脞基-氰基乙酸乙酯)-N,N-二甲基-吗啉基脒六氟磷酸酯 (COMU) (1.49 g, 3.5 mmol), 室温下反应 2 h。

(2) LC-MS 监测反应结束, 经反相柱 (水: 乙腈=65%: 35%) 得到产品, 冻干得 1.2 g 白色固体粉末。

第五步: 化合物 **A_14** 的制备:

(1) 将 **A_12** (500 mg, 1.27 mmol)、**A_13** (774 mg, 2.55 mmol) 用 120 ml DMF 溶解, 加入 DIEA (492 mg, 3.81 mmol), 室温下反应 3 h。

(2) LC-MS 监测反应结束, 将反应液加到 1mol/L HCl 中, 乙酸乙酯萃取两次, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤两次, 无水硫酸钠干燥后浓缩拌样后柱层析 (PE:EA=1:1) 得到产品, 浓缩得 590 mg 白色固体。

第六步: 化合物 **A_15** 的制备:

(1) 将依喜替康甲磺酸盐 (169869-90-3) (300 mg, 0.56 mmol)、**A_14** (315 mg, 0.56 mmol)、HOBt (153 mg, 1.13 mmol) 用 9ml DMF 溶解, 加入 DIEA (219 mg, 1.69 mmol), 室温下反应 2 h。

(2) LC-MS 监测反应结束, 反应液经反相柱 (水: 乙腈=40%: 60%) 得到产品, 冻干得 510 mg 黄色固体。LC-MS[M+H]⁺: m/z 855.4。

第七步: 化合物 **A-16** 的制备:

(1) 将 **A_15** (300 mg, 0.56 mmol) 用 6 ml (DCM:TFA=1:1) 溶解, 室温下反应 2 h。

(2) LC-MS 监测反应结束, 将反应液倒入乙醚中, 有黄色固体析出, 离心得 150 mg 黄色固体粗品。LC-MS[M+H]⁺: m/z 755.2。

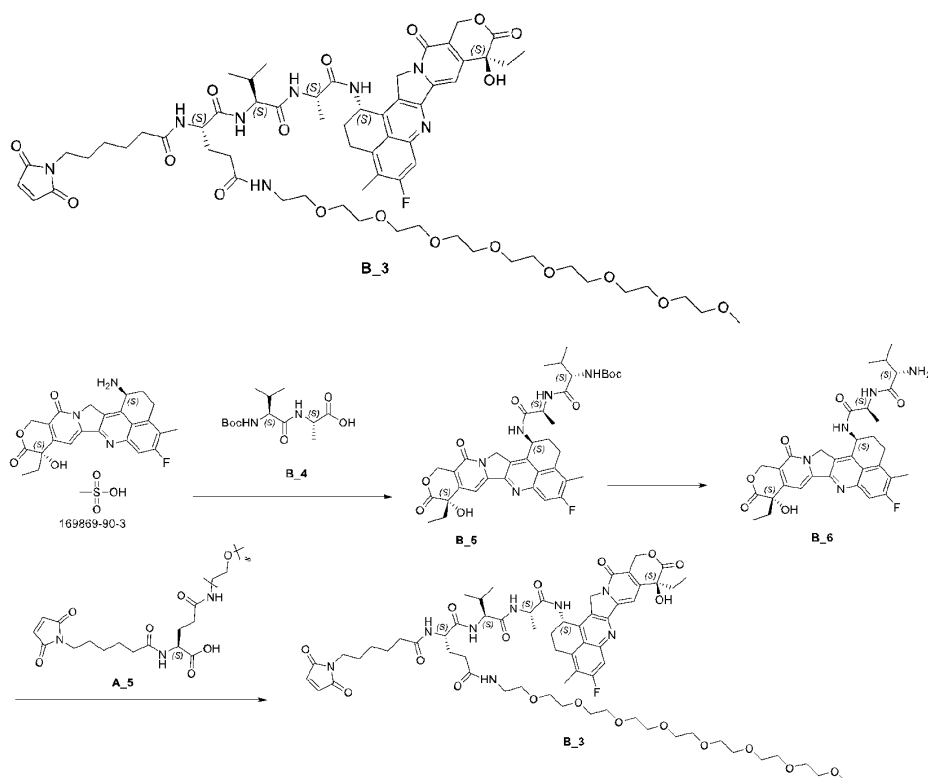
第八步: 化合物 **A_10** 的制备:

(1) 将 **A_16** (100 mg, 0.14 mmol)、**A_5** (220 mg, 0.28 mmol)、用 4 ml DMF 溶解, 加入 2,4,6-三甲基吡啶 (54 mg, 0.5 mmol)、HATU (85 mg, 0.27 mmol), 室温下反应 2 h。

(2) LC-MS 监测反应结束, 送制备, 制备液冻干得 22 mg 黄色固体 **A_10**。LC-MS[M+H]⁺: m/z 1443.6。

实施例 2

(S)-2-(6-(2,5-二氧 -2,5-二氢 -1H- 吡咯 -1-基)己氨基)-N1-(((S)-1-(((S)-1-((1S, 9 S)-9-乙基 -5-氟 -9-羟基 -4-甲基 -10,13-二氧 -2,3,9,10,13,15-六氢 -1H, 12 H- 苯并[de]吡喃[3', 4': 6,7] 吡啶里氮[1,2-b] 喹啉 -1-基)氨基) -1-氧丙烷 -2-基)氨基) -3-甲基 -1-氧代丁烷 -2-基)-N5-(2,5,8,11,14,17,20,23- 八氧戊五聚糖 -25-基)戊二胺 (**B_3**)



第一步: 化合物 **B_5** 的制备: (1) 将依喜替康甲磺酸盐(169869-90-3) (300 mg, 0.56 mmol)、**B_4** (163 mg, 0.56 mmol) 用 3 ml DMF 溶解, 加入 2,4,6-三甲基吡啶 (205 mg, 1.69 mmol)、COMU (242 mg, 0.56 mmol), 室温下反应 0.5 h。

(2) LC-MS 监测反应结束, 将反应液加到 40 ml 水中, 有青灰色固体析出, 过滤, 滤饼用清水洗涤, 固体冻干得 330 mg 青灰色固体粗品。LC-MS[M+H]⁺: m/z 706.2。

第二步: 化合物 **B_6** 的制备:

(1) 将 **B_5** (330 mg, 0.47 mmol) 用 10 ml (DCM:TFA=1:1) 溶解, 冰浴下反应 20 min。

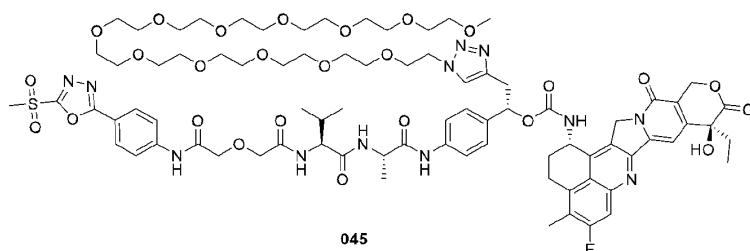
(2) LC-MS 监测反应结束, 将反应液倒入乙醚中, 有青灰色固体析出, 离心, 固体送制备, 制备液冻干得 150 mg 黄色固体。LC-MS[M+H]⁺: m/z 606.2。

第三步: 化合物 **B_3** 的制备:

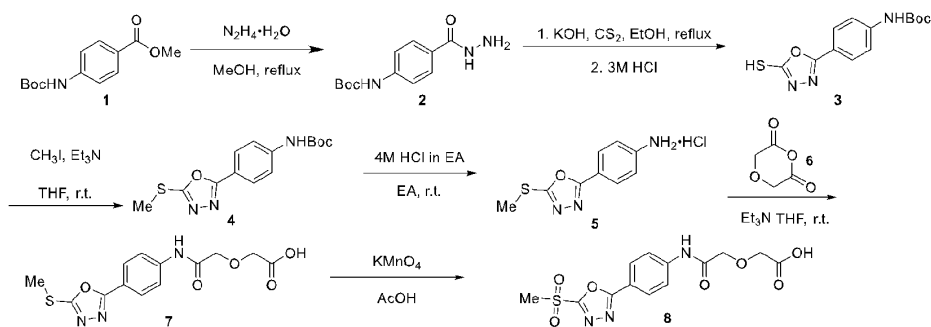
(1) 将 **B_6** (50 mg, 0.08 mmol)、**A_5** (115 mg, 0.16 mmol) 用 3 ml DMF 溶解, 加入 2,4,6-三甲基吡啶 (26.5 mg, 0.25 mmol)、HATU (47 mg, 0.125 mmol), 室温下反应 3 h。

(2) LC-MS 监测反应结束, 送制备。制备液冻干得 25 mg 黄色固体粉末。

实施例 3: 化合物 **045** 的制备



1、中间体化合物 **8** 的制备



将化合物 **1** (47.5 g, 189 mmol) 和甲醇 (250 mL) 加入反应瓶中, 室温下缓慢加入 80% 水合肼 (35.4 g, 567 mmol), 升温至 70 °C 回流反应 6 小时结束。冷却后析出白色晶体, 抽滤, 甲醇 (20 mL×3) 洗涤剩余固体, 得白色固体 **2** (47.47 g, 产率 100%)。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 252.1, 实验值 252.2。

将化合物 **2** (47.4 g, 189 mmol)、氢氧化钾 (12.7 g, 227 mmol) 和乙醇 (400 mL) 加入反应瓶中, 室温搅拌溶解。缓慢加入二硫化碳 (17 g, 283 mmol) 后升温至 100 °C 回流反应 5 小时结束。减压移去溶剂后加入水 (50 mL), 用稀盐酸调 pH 为 6, 用二氯甲烷萃取 (100 mL×3), 合并有机相, 用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤后将滤液减压浓缩, 残余物通过硅胶色谱纯化, 得到化合物 **3** (49.9 g, 产率 90%)。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 294.1, 实验值 294.3。

在反应瓶中加入化合物 **3** (5.86 g, 20 mmol)、三乙胺 (2.42 g, 24 mmol) 和四氢呋喃 (36 mL), 向上述反应液中加入碘甲烷 (3.12 g, 22 mmol)。在 25 °C 下搅拌反应 1.5 小时后反应结束,

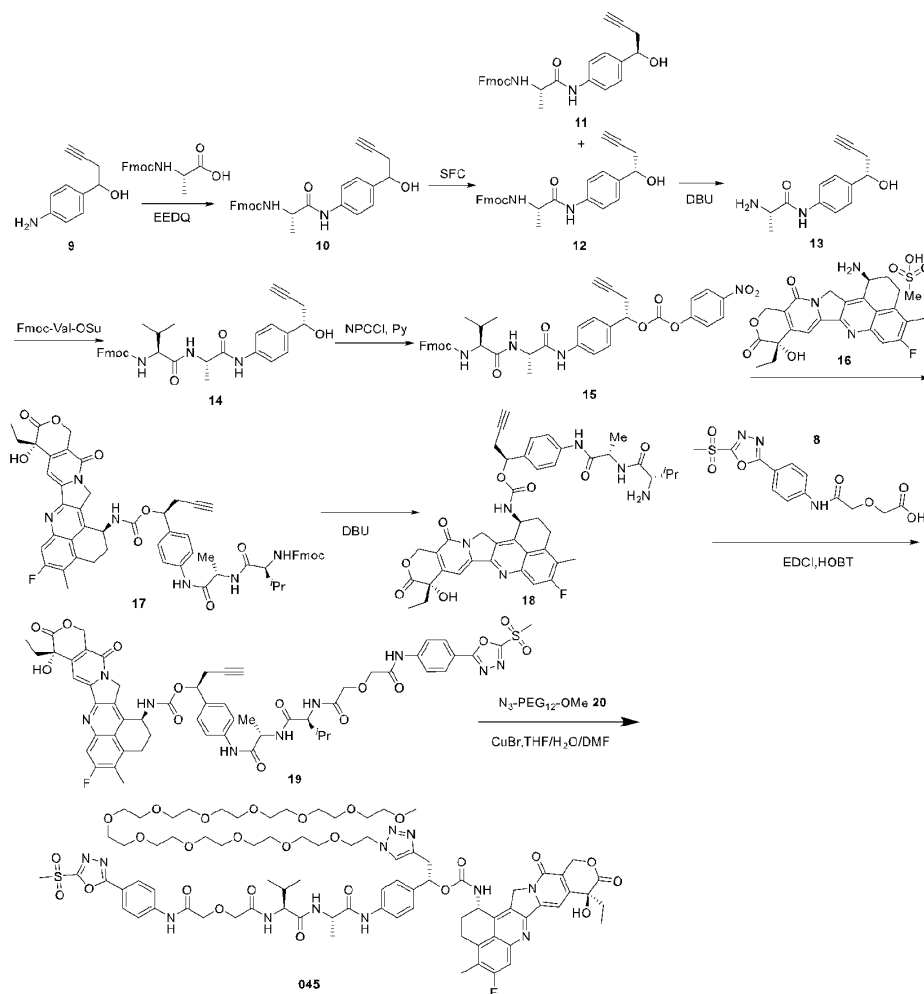
减压移去溶剂,残余物通过硅胶色谱纯化,得到化合物 **4** (4.05 g, 产率 66%)。MS(ESI) : (M+H)⁺ 计算值 308.1, 实验值 308.2。

将化合物 **4** (3.3 g, 10.6 mmol)和乙酸乙酯(20 mL)加入反应瓶中,在 25 °C 下滴加氯化氢乙酸乙酯溶液(2.7 mL, 4 M),继续反应 6 小时,减压移去溶剂后得到粗产物 **5**,直接投下一步反应。

将粗产物 **5**、二甘醇酐 **6** (1.35 g, 11.7 mmol)、三乙胺(2.14 g, 21.2 mmol)和四氢呋喃(30 mL)加入反应瓶中,25 °C 反应 1.5 小时,减压移去溶剂,残余物加入乙醚,抽滤后用水和乙醚洗涤,得化合物 **7** (3.4 g, 产率 99%)。MS(ESI) : (M+H)⁺ 计算值 324.1, 实验值 324.2。

将化合物 **7** (3.4 g, 10.5 mmol)和冰醋酸(20 mL)加入反应瓶中,待溶解后,在 0°C 加入高锰酸钾(2.48 g, 15.7 mmol),恢复至 25 °C 反应 1 小时,加入饱和亚硫酸钠溶液至溶液变为无色,用乙酸乙酯萃取 (100 mL×3),合并有机相,用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩,残余物通过硅胶色谱纯化,得到化合物 **8** (2.4 g, 产率 65%)。MS(ESI) : (M+H)⁺ 计算值 356.0, 实验值 356.0。

2、化合物 045 的制备



0 摄氏度下, 将 1-(4-氨基苯基)-3-丁炔-1-醇(4997 mg, 31 mmol)、N-苄氧羰基-L-丙氨酸 (9651 mg, 31 mmol)、EEDQ(11498 mg, 46.5 mmol)和超干 DCM (90 mL)加入反应瓶。反应 3h 后, 减压移去溶剂, 残余物中加入 500 mL MTBE 打浆, 得到化合物 **10** (9007 mg, 产率 64%, $dr=1:1$)。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 455.2, 实验值 455.2。

中间体 **10** 的手性拆分: 将化合物 **10**(50 g)经 SFC 拆分得到 **11** (19 g, 保留时间 13.55 min) 和 **12** (20 g, 保留时间 16.29 min)。SFC 拆分方法: 柱型号: DAICEL CHIRALCEL OD(250mm-50mm,10um); 流动相: A: CO₂, B: CO₂-ACN/i-PrOH(0.1% NH₃H₂O); 等度洗脱: B in A for 50%; 流速: 200mL/min; 检测仪: PDA; 柱温: 25℃; 背压: 100 Bar;

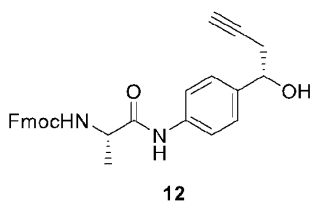
HPLC 方法: 仪器信息: Thermo 液相色谱仪(ADC-U3000-01); 色谱柱: CHIRALPAK®ID (4.6*150 mm, 5 μm); 柱温: 25℃; 进样盘温度: 25℃; 流动相: A: 10 mM NH₄FA; B:

ACN; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样体积: 2 μ L;

梯度条件:

Time(min)	A%	B%
0	40.0	60.0
30.000	40.0	60.0

经 X-RAY 确认, 化合物 **12** 的结构及构型如下, 其单晶衍射图参见图 17。



0 摄氏度下, 将 **12** (3632 mg, 8 mmol), 90 mL THF (市售)加入反应瓶。搅拌并缓慢加入 DBU (1215 mg, 8 mmol), 反应半小时后移至室温。TLC 监测原料消失后, 减压移去溶剂, 残余物通过硅胶色谱纯化 (DCM/MeOH 95:5), 得到化合物 **13** (1707 mg, 产率 92%)。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 233.1, 实验值 233.2。

将化合物 **13** (1624 mg, 7 mmol)、Fmoc-Val-OSu(362 mg, 8.4 mmol)和 N,N-二甲基甲酰胺 (150 mL)加入反应瓶, 搅拌并缓慢滴加 DIEA (1158 μ L, 7 mmol), 25 $^{\circ}$ C 反应 12 小时, 减压移去溶剂, 加入 50 mL EA 和 50 mL PE 打浆, 析出白色固体, 重复三次, 得到化合物 **14**。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 554.3, 实验值 554.4。

将化合物 **14**(1661 mg, 3 mmol)、氯甲酸对硝基苯酯(1206 mg, 6 mmol)和 THF(150 mL)加入反应瓶, 搅拌并滴加 Py (474 μ L, 6 mmol), 65 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 减压移去溶剂, 残余物通过硅胶色谱纯化 (DCM/MeOH 98:2), 得到化合物 **15** (1831 mg, 产率 85%)。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 719.8, 实验值 719.9。

将化合物 **15** (1436 mg, 2 mmol)、依喜替康甲磺酸盐 **16** (1168.2 mg, 2.2 mmol)和 N,N-二甲基甲酰胺(100 mL)加入反应瓶, 搅拌并缓慢滴加 DIEA (695 μ L, 4 mmol), 25 $^{\circ}$ C 反应 20 小时, 减压移去溶剂, 残余物通过硅胶色谱纯化 (DCM/MeOH 95:5), 得到化合物 **17** (1664 mg, 产率 82%)。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 1015.4, 实验值 1015.1。

0 摄氏度下, 将 **17** (1522 mg, 1.5 mmol), 40 mL THF (市售)加入反应瓶。搅拌并缓慢加入 DBU (228 mg, 1.5 mmol), 反应半小时后移至室温继续反应 40 分钟, 直至 TLC 原料消失。将反应液真空浓缩除去 THF, 加入 15 mL DCM 和 300 mL PE, 产生大量黄绿色固体, 布氏漏斗滤出固体 **18** (1177 mg, 产率 99%)。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 793.3, 实验值 793.6。

将化合物 **18** (1031 mg, 1.3 mmol)、**8** (554 mg, 1.56 mmol)、EDCI (498 mg, 2.6 mmol) 、

HOBt (263 mg, 1.95 mmol)和 N,N-二甲基甲酰胺(20 mL)加入反应瓶, 25 °C 反应 1 小时, 减压移去溶剂, 残余物通过 C18 纯化(60% ACN/0.05% 甲酸 in H₂O), 冻干得到化合物 **19**(1322mg, 产率 90%)。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 1130.4, 实验值 1130.7。

将化合物 **19** (903 mg, 0.8 mmol)、化合物 **20** (702 mg, 1.2 mmol)、三(3-羟丙基三唑甲基)胺(34.7 mg, 0.08 mmol)和溴化亚铜(11.4 mg, 0.08 mmol)加入反应瓶, 换氮气三次, 加入 THF/DMF/H₂O(3.5 mL: 0.6 mL: 0.4 mL), 25 °C 反应 0.5 小时, 残余物通过 C18 制备纯化(62% ACN/0.05% 甲酸 in H₂O), 得到化合物 **045** (1276 mg, 产率 93%)。MS(ESI): (M+H)⁺ 计算值 1715.7, 实验值 1716.2。¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10.71 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.48 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.6 Hz, 3H), 8.09 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.81 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.42 – 7.36 (m, 3H), 6.61 (s, 1H), 6.02 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.38 – 5.26 (m, 3H), 4.55 – 4.47 (m, 3H), 4.46 – 4.41 (m, 1H), 4.36 (q, J = 15.6 Hz, 2H), 4.28 (s, 2H), 3.80 (s, 5H), 3.62 – 3.55 (m, 36H), 3.52 – 3.47 (m, 9H), 3.44 – 3.36 (m, 2H), 3.30 – 2.29 (m, 1H), 3.19 – 3.09 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.28 – 2.19 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.17 – 2.10 (m, 1H), 2.04 – 1.89 (m, 2H), 1.42 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.98 (t, J = 7.2 Hz, 6H)。

二、抗体药物偶联物 (ADC) 的制备

共通操作 A: 抗体-药物偶联物的纯化

在 AKTA 系统上用 PBS7.0/EDTA 溶液(10 mM PB, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.0)平衡 1 mL Mabselect SuRe 预装层析柱, 使用上样环进行抗体-药物偶联物上样, 使用 PBS7.0/EDTA 再平衡 10~20 mL 后, 用 pH 3.5 的醋酸盐缓冲液进行洗脱, 加入 1/10 体积的柠檬酸钠中和液进行中和, 得到纯化后的抗体-药物偶联物。

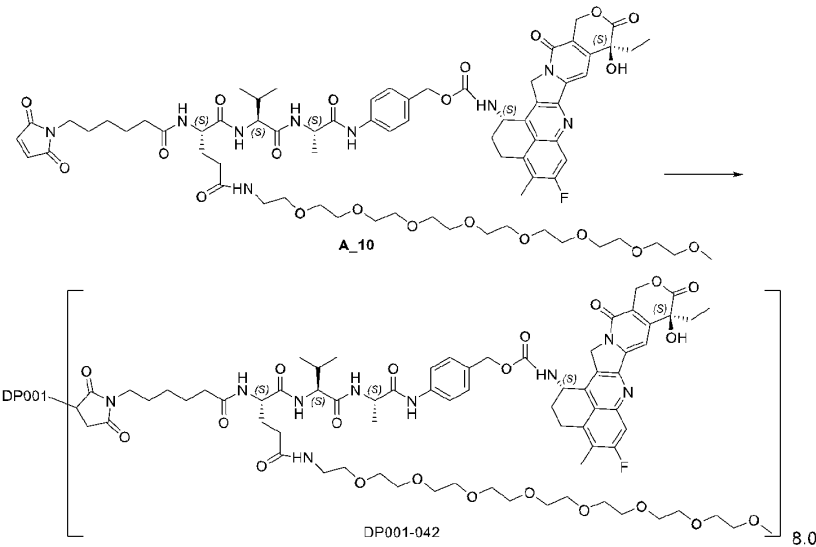
共通操作 B: 抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定

向抗体-药物偶联物中加入终浓度为 20 mM 的二硫苏糖醇, 于 37 °C 水浴 30 分钟, 由此将切断了抗体-药物偶联物链间二硫键的样品用于 HPLC 分析。HPLC 系统选择 Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC, 色谱柱选择 PLRP-S(5 μ m 粒径; 2.1 mm $\times$ 50 mm; Agilent Technologies), 柱温 80 °C, 流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液, 流动相 B 为 0.1% 三氟乙酸(TFA)乙腈溶液。上样量为 10 μ L, 梯度程序为 0-3 分钟 27%-27%, 3-8 分钟 27%-35%, 8-25 分钟 35%-43%, 25-26 分钟 43%-95%, 26-31 分钟 95%-95%, 31-31.5 分钟 95%-27%, 31.5-40 分钟, 27%-27%。相对于未连接的轻链 (L0) 及重链 (H0), 连接了药物的轻链 (连接一个药物的轻链, L1) 及重链 (连接了一个药物的重链, H1; 连接了两个药物的重链, H2;

连接三个药物的重链，H3）而言，疏水性随着连接药物的数目的增加而增加，因此按照 L0、L1、H0、H1、H2、H3 顺序洗脱。根据 280nm 下的峰面积计算 DAR 值。

$$\text{DAR} = \left(\frac{\text{L1}}{\text{L0} + \text{L1}} \times 1 + \frac{\text{H1}}{\text{H0} + \text{H1} + \text{H2} + \text{H3}} \times 1 + \frac{\text{H2}}{\text{H0} + \text{H1} + \text{H2} + \text{H3}} \times 2 + \frac{\text{H3}}{\text{H0} + \text{H1} + \text{H2} + \text{H3}} \times 3 \right) \times 2$$

实施例 4 抗体-药物偶联物 DP001-042 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 DP001 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA，制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液（1.0 mL）放入到 1.5 mL EP 管中，向其中添加 100 mM TCEP（百灵威科技有限公司）水溶液（8.16 μL；相对于一分子抗体为 12 当量），于 37℃ 孵育 3 小时，由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与接头-药物化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 A₁₀ 的 DMSO 溶液（68.0 μL；相对于一分子抗体为 10 当量），混匀，在室温下反应 30 分钟，将接头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺（百灵威科技有限公司）水溶液（10.2 μL；相对于一分子抗体为 15 当量），进而在室温下反应 20 分钟，终止偶联反应。

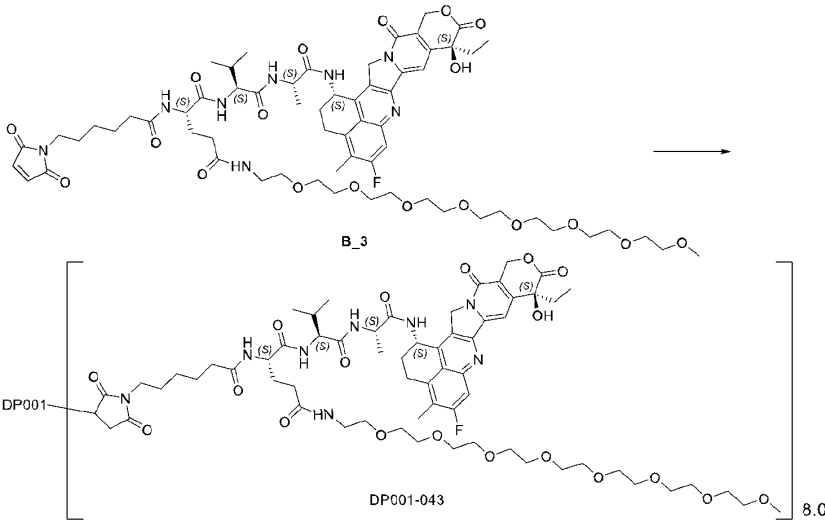
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液，进行共通操作 A 的纯化，得到含有 DP001-042 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比（DAR）的测定：

利用共通操作 B 进行 DAR 测定，结果如图 1 所示，得到 DP001-042 的 DAR 值为 8.0。

实施例 5 抗体-药物偶联物 DP001-043 制备



工程 1:

抗体的还原：

将实验室制备得到的 DP001 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA，制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液（1.0 mL）放入到 1.5 mL EP 管中，向其中添加 100 mM TCEP（百灵威科技有限公司）水溶液（8.16 μL；相对于一分子抗体为 12 当量），于 37°C 孵育 3 小时，由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 B₃ 的 DMSO 溶液（68.0 μL；相对于一分子抗体为 10 当量），混匀，在室温下反应 30 分钟，将接头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺（百灵威科技有限公司）水溶液（10.2 μL；相对于一分子抗体为 15 当量），进而在室温下反应 20 分钟，终止偶联反应。

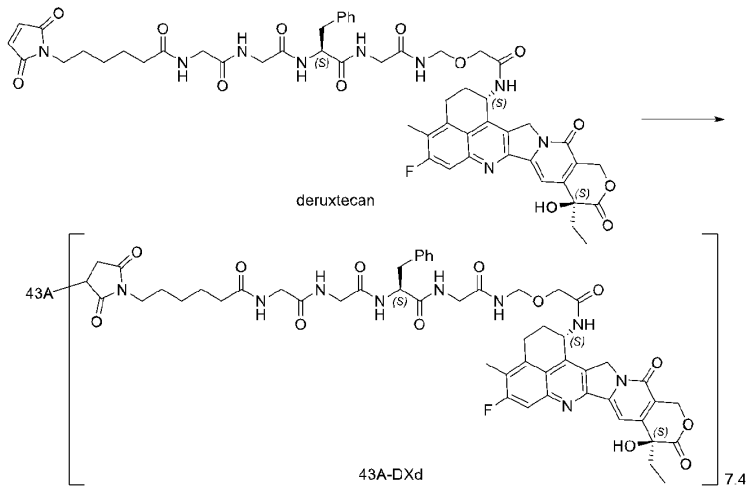
抗体—药物偶联物的纯化：

针对上述溶液，进行共通操作 A 的纯化，得到含有 DP001-043 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比（DAR）的测定：

利用共通操作 B 进行 DAR 测定，结果如图 2 所示，得到 DP001-043 的 DAR 值为 8.0。

实施例 6 抗体-药物偶联物 43A-DXd 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43A 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与接头-药物化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 deruxtecan (上海皓元生物医药科技有限公司) 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将接头-药物化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

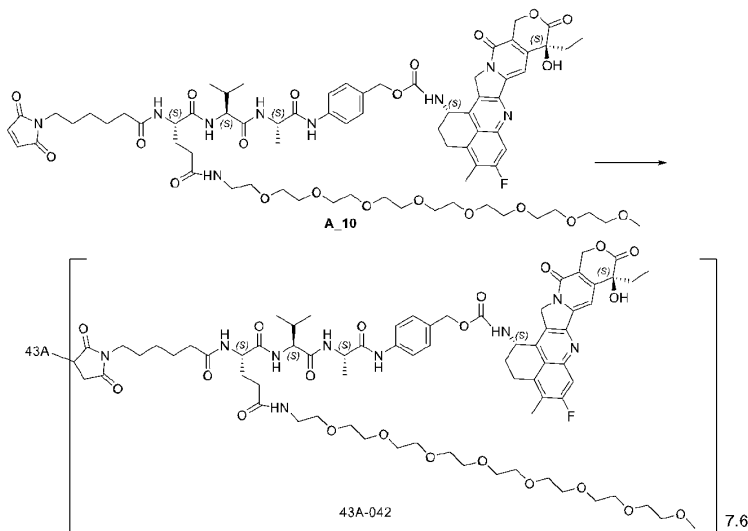
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43A-DXd 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 结果如图 3 所示, 得到 43A-DXd 的 DAR 值为 7.4。

实施例 7 抗体-药物偶联物 43A-042 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43A 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与接头-药物化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 A₁₀ 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将接头-药物化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

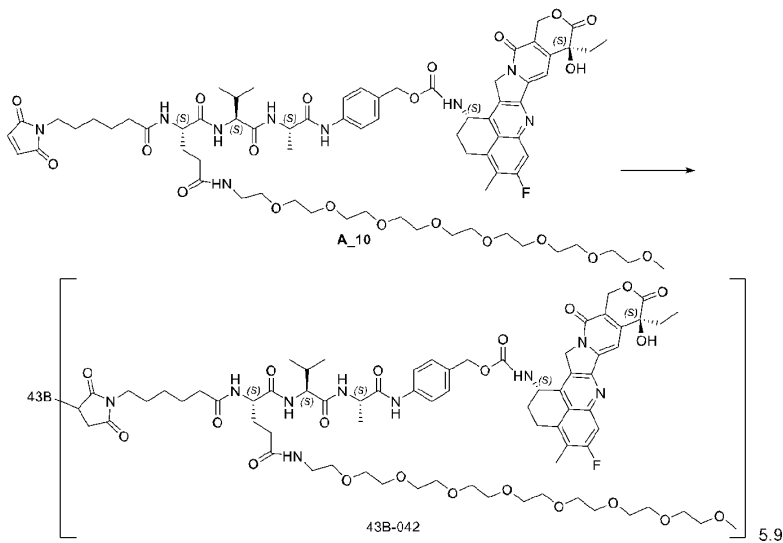
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43A-042 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 结果如图 4 所示, 得到 43A-042 的 DAR 值为 7.6。

实施例 8 抗体-药物偶联物 43B-042 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43B 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与接头-药物化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 A₁₀ 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将接头-药物化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

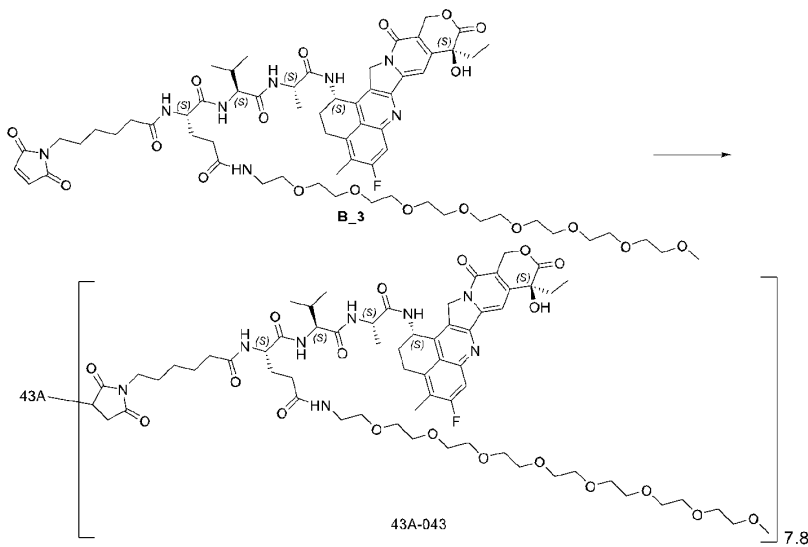
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43B-042 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 结果如图 5 所示, 得到 43B-042 的 DAR 值为 5.9。

实施例 9 抗体-药物偶联物 43A-043 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43A 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与接头-药物化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 B₃ 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将接头-药物化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

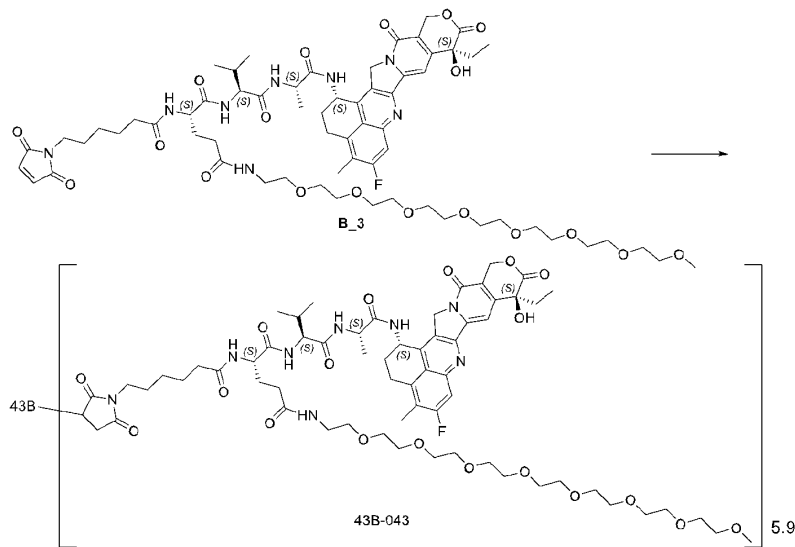
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43A-043 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 结果如图 6 所示, 得到 43A-043 的 DAR 值为 7.8。

实施例 10 抗体-药物偶联物 43B-043 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43B 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与接头-药物化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 B₃ 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将接头-药物化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

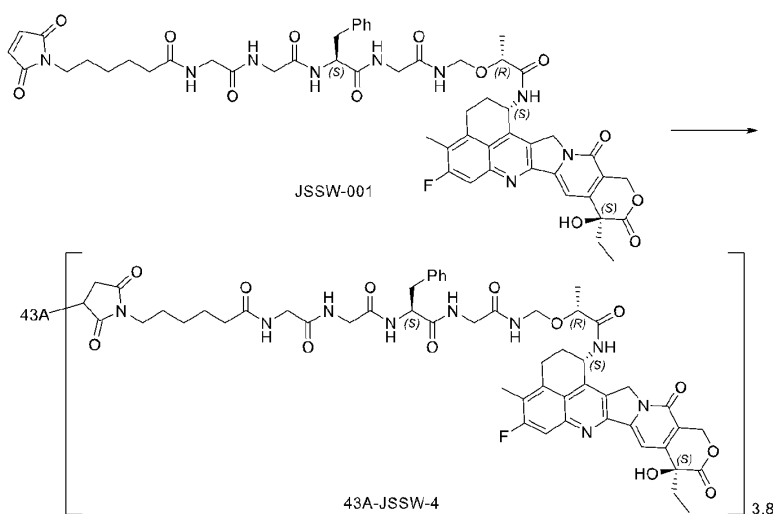
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43B-043 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 结果如图 7 所示, 得到 43B-043 的 DAR 值为 5.9。

实施例 11: 抗体-药物偶联物 43A-JSSW-4 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43A 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 10 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (15.64 μ L; 相对于一分子抗体为 2.3 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与药物-接头化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 JSSW-001 (上海皓元生物医药科技有限公司) 的 DMSO 溶液 (30.6 μ L; 相对于一分子抗体为 4.5 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将药物-接头化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

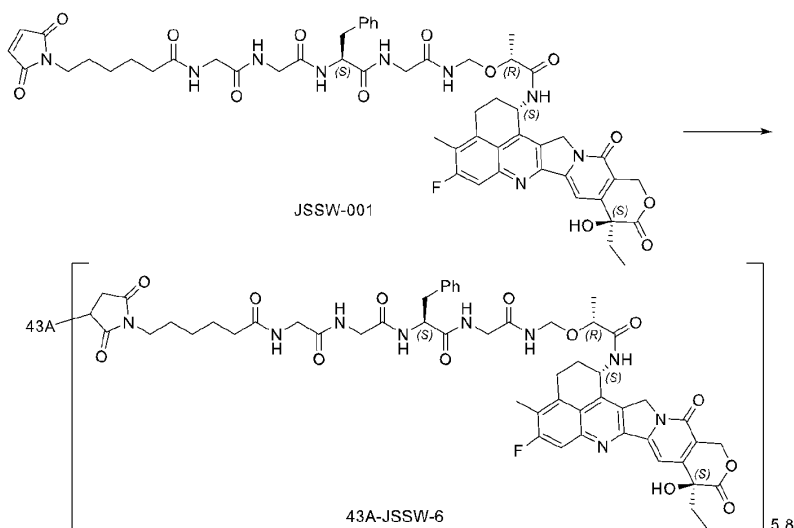
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43A-JSSW-4 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 得到 43A-JSSW-4 的 DAR 值为 3.8。

实施例 12: 抗体-药物偶联物 43A-JSSW-6 制备

**工程 1:**

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43A 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 10 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (22.44 μ L; 相对于一分子抗体为 3.3 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与药物-接头化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 JSSW-001 (上海皓元生物医药科技有限公司) 的 DMSO 溶液 (43.5 μ L; 相对于一分子抗体为 6.4 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将药物-接头化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

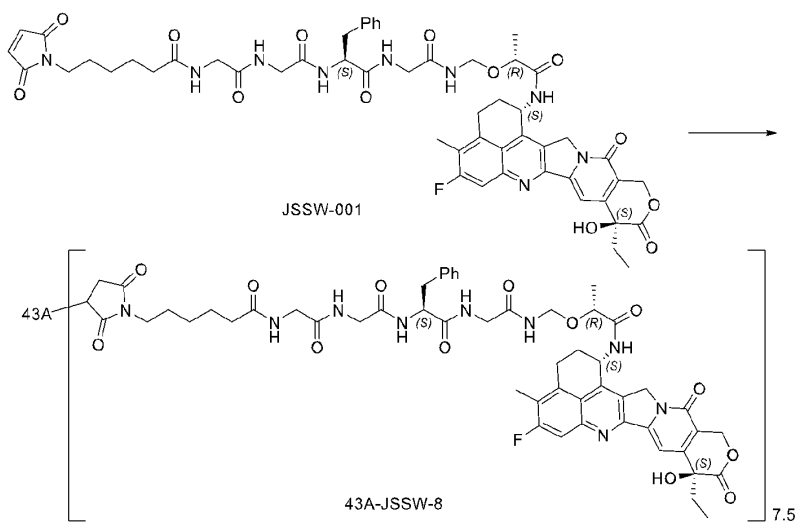
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43A-JSSW-6 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 得到 43A-JSSW-6 的 DAR 值为 5.8。

实施例 13: 抗体-药物偶联物 43A-JSSW-8 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43A 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与药物-接头化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 JSSW-001 (上海皓元生物医药科技有限公司) 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将药物-接头化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

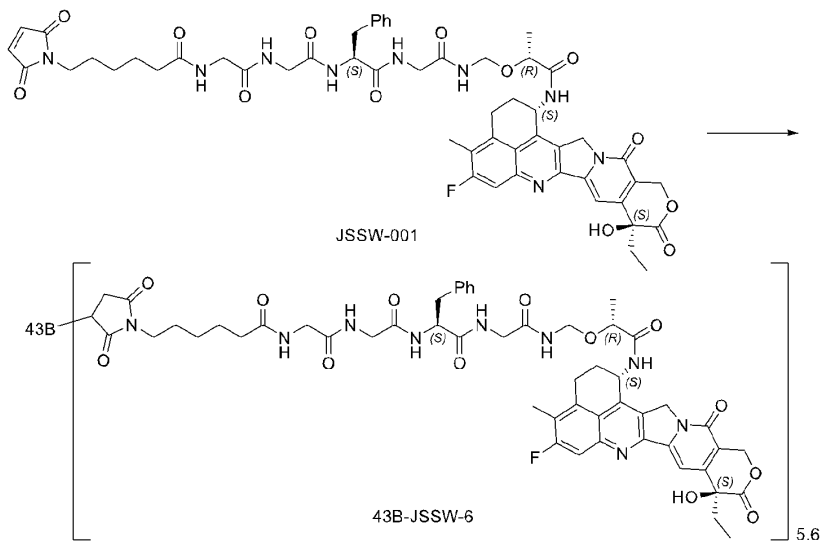
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43A-JSSW-8 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 得到 43A-JSSW-8 的 DAR 值为 7.5。

实施例 14: 抗体-药物偶联物 43B-JSSW-6 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43B 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与药物-接头化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 JSSW-001 (上海皓元生物医药科技有限公司) 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将药物-接头化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

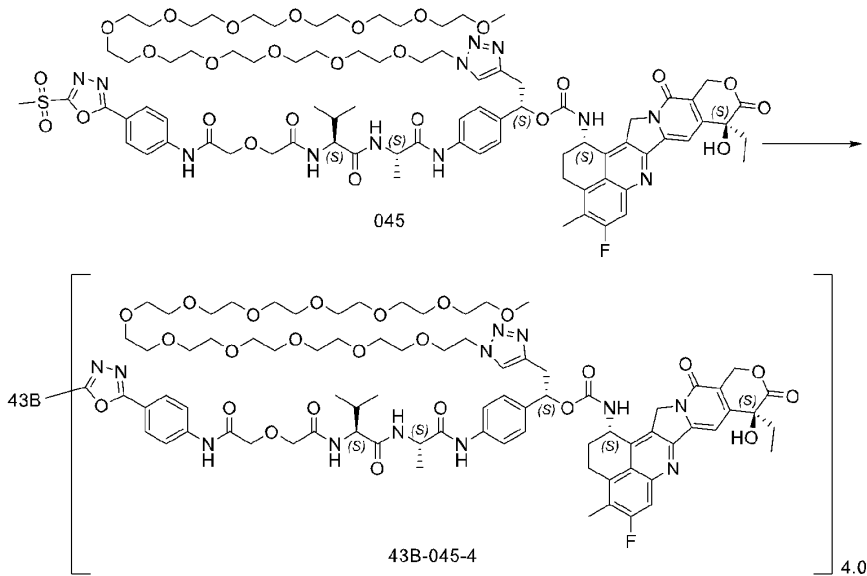
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43B-JSSW-6 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 得到 43B-JSSW-6 的 DAR 值为 5.6。

实施例 15: :抗体-药物偶联物 43B-045-4 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43B 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 10 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (15.64 μ L; 相对于一分子抗体为 2.3 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与药物-接头化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的化合物 045 的 DMSO 溶液 (29.92 μ L; 相对于一分子抗体为 4.4 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将药物-接头化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

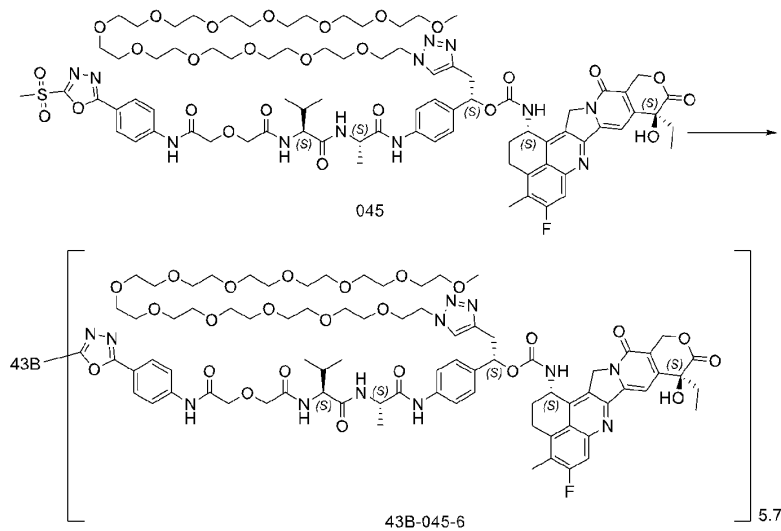
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43B-045-4 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 得到 43B-045-4 的 DAR 值为 4.0。

实施例 16: 抗体-药物偶联物 43B-045-6 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43B 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与药物-接头化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的化合物 045 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将药物-接头化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

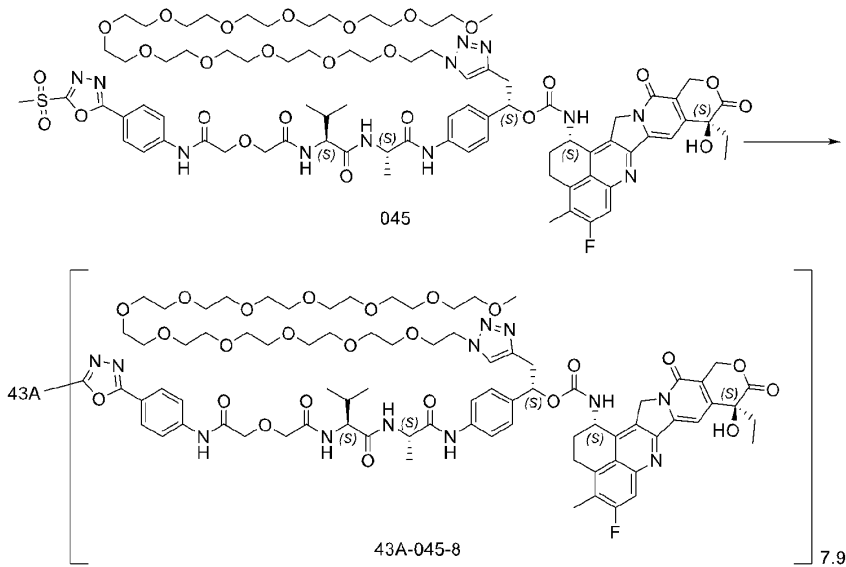
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行利用了共通操作 A 的纯化, 得到含有 43B-045-6 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 得到 43B-045-6 的 DAR 值为 5.7。

实施例 17: 抗体-药物偶联物 43A-045-8 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 43A 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 100 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (8.16 μ L; 相对于一分子抗体为 12 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与药物-接头化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的化合物 045 的 DMSO 溶液 (68.0 μ L; 相对于一分子抗体为 10 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将药物-接头化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

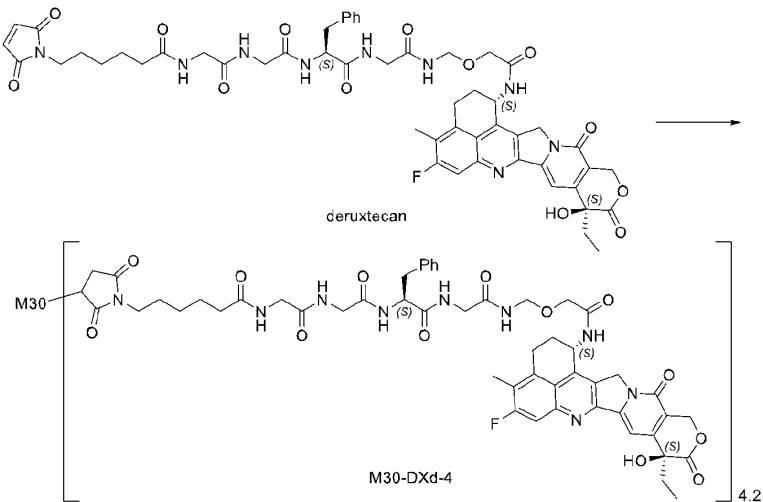
抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 43A-045-8 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 得到 43A-045-8 的 DAR 值为 7.9。

实施例 18: 抗体-药物偶联物 M30-DXd-4 制备



工程 1:

抗体的还原:

将实验室制备得到的 M30 抗体介质替换为 PBS7.0/EDTA, 制备成 10 mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0 mL) 放入到 1.5 mL EP 管中, 向其中添加 10 mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (15.64 μ L; 相对于一分子抗体为 2.3 当量), 于 37°C 孵育 3 小时, 由此将抗体内的二硫键还原。

抗体与药物-接头化合物的偶联:

在室温下向上述溶液中添加 10 mM 的 deruxtecan (上海皓元生物医药科技有限公司) 的 DMSO 溶液 (30.6 μ L; 相对于一分子抗体为 4.5 当量), 混匀, 在室温下反应 30 分钟, 将药物-接头化合物连接于抗体。接下来, 添加 100 mM 的 N-乙基马来酰亚胺 (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L; 相对于一分子抗体为 15 当量), 进而在室温下反应 20 分钟, 终止偶联反应。

抗体-药物偶联物的纯化:

针对上述溶液, 进行共通操作 A 的纯化, 得到含有 M30-DXd-4 化合物的溶液。

抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定:

利用共通操作 B 进行 DAR 测定, 得到 M30-DXd-4 的 DAR 值为 4.2。

实施例 19: 抗体-药物偶联物的疏水性检测

采用疏水相互作用色谱法比较 43A-042、43B-042、43A-043、43B-043、43A-DXd 的疏水性。在 μ 2695 高效液相色谱仪上使用 TSKgel Butyl-NPR 色谱柱 (4.6mm*10cm, 货号 0042168/TOSOH) 进行检测。流动相 A 为 1.0M 硫酸铵, 25mM 磷酸缓冲液, 流动相 B 为 25%

异丙醇，75% 25mM 磷酸缓冲液。流速为 0.8 ml/min，检测波长为 280 nm，柱温 30℃，流动相梯度为 0-20 分钟 100%-0%A，20-23 分钟 0%-0%A，23-24 分钟 0%-100%A，24-28 分钟，100%-100%A。

结果如图 8 所示，43A-042、43B-042、43A-043、43B-043、43A-DXd 均具有良好的亲水性，其中 43A-043 亲水性优于 DAR 值相近的 43A-DXd 及 43A-042，保留时间分别为 7.130 min、8.809 min 和 9.189 min。同样，43B-043 的亲水性强于 DAR 值相等的 43B-042，保留时间分别为 6.426 min 和 8.643 min。

实施例 20：生物膜干涉测定抗体亲和力

使用 ForteBio Octet red 96e（赛多利斯公司）仪器测定抗 B7H3 抗体 43A、43B 与人 B7H3 的亲和力。用 Protein A 捕获传感器固化 5 μg/ml 的不同供试品，将 B7H3 抗原进行梯度稀释，起始浓度为 100 nM，2 倍梯度稀释，共 7 个梯度：缓冲体系为 PBS pH 7.4+0.02% 吐温 20，步骤设置：① Baseline 60 s（基线），② Loading 800 s（抗体固化，阈值设定为 0.50 nm），③ Baseline2 120 s（基线），④ Association 120 s（结合），⑤ Dissociation 300 s（解离），⑥ Regeneration 300 s（再生传感器）。使用空白缓冲液进行空白处理，基线与 y 轴对齐，并通过 Octet 数据分析软件中的 Savitzky-Golay 拟合。43A 与 43B 的拟合曲线分别见图 9 及图 10，实验结果见表 1。

表 1 不同抗体与人 B7H3 的亲和力

抗体	K _D (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Full R ²
43A	6.05E-10	7.54E+05	4.57E-04	0.9981
43B	6.09E-10	7.18E+05	4.37E-04	0.9983

实施例 21：细胞结合活性实验

使用 B7H3 阳性人黑色素瘤细胞株 A375 检测抗 B7H3 抗体 43A、43B 的亲和力，以 M30 抗体为阳性参照。将样品用含 2 % BSA 的 PBS 溶液稀释至 15000 ng/mL，然后倍比稀释 11 个梯度，使得样品浓度为 0.014~15000 ng/mL。取 A375 细胞，500×g 离心 5 min，使用含 2 %BSA 的 PBS 溶液洗涤 3 次，与不同稀释浓度的样品在 4 °C 孵育 2 h，洗涤后与羊抗人 Alexa Fluor 488 荧光染料在 4 °C 避光孵育 1 h。洗涤后重悬，使用流式细胞仪 Attune NxT flow cytometer（Thermo Fisher Scientific, inc）检测细胞平均荧光强度（MFI）。

实验结果如图 11 所示，43A 与 43B 均能与 B7H3 阳性的 A375 细胞以高亲和力结合，EC₅₀ 分别为 54.5 ng/ml 及 61.2 ng/ml，均显著优于 M30 的 125.3 ng/ml。

抗体 43B 的偶联物 43B-045-6 与 B7H3 阳性的 A375 细胞也以高亲和力结合，EC₅₀ 为 37.78

ng/ml。

实施例 22 内吞活性研究

将 M30、43A、43B 抗体分别与人黑色素瘤细胞 A375 于 4℃冰箱放置共孵育 2h；共孵育结束后，用 PBS 洗涤两次，加入培养基，然后放入 37℃，5% CO₂ 二氧化碳培养箱进行内吞。在所指示的孵育时间结束后收获细胞。再用羊抗人 Alexa Fluor 488 荧光染料进行染色，4℃避光孵育 60 分钟。孵育结束后，用实验缓冲液（2% FBS/PBS）洗涤两次，加入缓冲液重悬细胞，之后采用流式细胞仪进行检测，使用板式读数读取实验板中对应孔的荧光信号中位值。

内吞率%=(初始平均中位荧光值-不同时间点平均中位荧光值) / 初始平均中位荧光值×100%。

实验结果如表 2 所示，43A 及 43B 与 A375 细胞结合后，均可快速内吞至细胞中，内吞速率均快于 M30。

表 2 不同时间点抗体的内吞率

时间	43A	43B	M30
2 h	18%	16%	11%
4 h	29%	34%	20%
6 h	46%	47%	30%
24 h	84%	86%	71%

实施例 23 抗原结合活性检测

用包被液将 His 标签标记的人 B7H3 蛋白（购自北京百普赛斯生物科技股份有限公司）稀释至 1 μg/mL，每孔加 100 μL，4℃过夜；向盛有包被液的酶标板中每孔加入 100 μL 封闭液，室温震荡 2 h，然后用洗涤缓冲液洗板 3 次。梯度稀释样品及参比品，每孔加入 100 μL，室温震荡 2 h，用洗涤缓冲液洗 4 次，加酶标抗体，用样品稀释液稀释山羊抗人 IgG-HRP，每孔加入 100 μL，室温震荡 1 h，用洗涤缓冲液洗板 4 次，加底物液显色，与各反应孔中加入现配的 TMB 反应液 100 μL，室温反应 5-10 分钟，各孔加入 100 μL 终止液温和混匀，终止反应。使用酶标仪 450/650 nm 波长测定吸光度，利用软件进行四参数拟合作图，其中 C 值为半效浓度 EC₅₀。分别以 43A、43B 抗体为参比品，检测相应的抗体-药物偶联物的结合活性。实验结果如表 3 所示，抗体与相应抗体-药物偶联物的结合活性相当。

表 3 人 B7H3 蛋白结合活性汇总表

	43A	43A-DXd	43A-042	43A-043	43B	43B-042	43B-043
EC ₅₀ (ng/ml)	1.02	1.19	1.17	1.09	1.05	1.16	1.05

实施例 24 抗体-药物偶联物对 SK-OV-3、SK-BR-3 细胞体外生长的抑制作用

收集靶细胞重悬为单细胞悬液，台盼蓝染色法鉴定细胞活力和细胞计数；调整细胞密度为 1×10^5 cells/mL；每孔 100 μ L 加至 96 孔黑色平底细胞培养板；以市售的 Enhertu（抗 HER2 抗体-药物偶联物）作为参比品，将稀释好的供试品每孔 20 μ L 加至已接种细胞的 96 孔黑色平底细胞培养板；置于细胞培养箱（37℃，5% CO₂）孵育 168±8 hr；加入刃天青钠溶液（0.03%），每孔 20 μ L；37℃作用 3-4 h，酶标仪 550 nm/610 nm 读取荧光值，利用 Prism 或同类作图软件作图，拟合出参比品和样品的半抑制浓度 IC₅₀。

实验结果如图 12、图 13 所示，在人卵巢腺癌细胞 SK-OV-3 及人乳腺癌细胞 SK-BR-3 体外实验中，DP001-042 抑制活性明显优于 Enhertu。半抑制浓度数据汇总见表 4。

表 4 抗体-药物偶联物的体外生长抑制活性

	细胞	Enhertu	DP001-042	DP001-043
IC ₅₀ (ng/ml)	SK-OV-3	112.7	57.03	100.2
	SK-BR-3	53.74	26.92	55.58

实施例 25 抗体-药物偶联物对人黑色素瘤细胞 A375 细胞体外生长的抑制作用

收集靶细胞重悬为单细胞悬液，台盼蓝染色法鉴定细胞活力和细胞计数；调整细胞密度为 1×10^5 cells/mL；每孔 100 μ L 加至 96 孔黑色平底细胞培养板；以 43A-DXd 作为参比品，将稀释好的供试品每孔 20 μ L 加至已接种细胞的 96 孔黑色平底细胞培养板；置于细胞培养箱（37℃，5% CO₂）孵育 168±8 hr；加入刃天青钠溶液（0.03%），每孔 20 μ L；37℃作用 3-4 h，酶标仪 550 nm/610 nm 读取荧光值，利用 Prism 或同类作图软件作图，拟合出参比品和样品的半抑制浓度 IC₅₀。

在人黑色素瘤细胞 A375 体外实验中，43A-042、43B-042、43A-DXd、43A-043、43B-043 均具有良好的细胞生长抑制活性。结果见表 5、表 6 和图 14、图 15。

表 5 抗体-药物偶联物的体外生长抑制活性

	细胞	43A-DXd	43A-042	43B-042
IC ₅₀ (ng/ml)	A375	24.19	9.41	14.05

表 6 抗体-药物偶联物的体外生长抑制活性

	细胞	43A-DXd	43A-043	43B-043
IC ₅₀ (ng/ml)	A375	24.29	22.69	36.78

实施例 26 抗体-药物偶联物对人肺癌细胞 Calu-6 小鼠移植瘤的抗肿瘤实验

本实验选用适龄雌性 NOD/SCID 小鼠接种人肺癌细胞 Calu-6, 待肿瘤体积长至约 100 -200 mm³ 时, 挑选肿瘤生长良好的 48 只动物, 将动物按肿瘤体积均衡分为 6 组, 动物分组及剂量方案如表 7 所示。

表 7 动物分组及剂量方案

组别	动物数量（只）	剂量（mg/kg）	给药途径/频次
溶媒组 (0.9% INJ NS)	8	0	静脉给药/单次
43A-DXd	8	3.0	静脉给药/单次
43A-042	8	3.0	静脉给药/单次
43A-043	8	3.0	静脉给药/单次
43B-042	8	3.0	静脉给药/单次
43B-043	8	3.0	静脉给药/单次

分组完成后进行给药并称量小鼠体重, 记录数据, 通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径, 动态观察肿瘤的生长情况, 计算肿瘤体积, 公式如下:

肿瘤体积 (mm³) = 1/2 × 长径 (mm) × [短径 (mm)]²

给药后第 25 天, 用二氧化碳窒息小鼠后, 剥瘤称量瘤重。

实验终点, 与溶媒组相比, 所有抗体-药物偶联物均能显著抑制肿瘤的生长, 43B-042 瘤重抑制率高达 84.8%, 43B-043、43A-042、43A-043 药效均优于 43A-DXd, 详细信息见图 16 和表 8。

表 8 给药 25 天各组肿瘤参数表

组别	D25 肿瘤体积 (mm ³)	肿瘤抑制率 (%)	瘤重 (g)	瘤重抑制率 (%)
溶媒组	1737.6±282.1	—	1.369±0.240	—
43A-DXd	725.4±208.4	63.3	0.583±0.153	57.4
43A-042	475.8±194.2	78.9	0.389±0.167	71.6
43A-043	619.6±229.3	85.2	0.498±0.189	63.6
43B-042	273.2±194.2	91.6	0.167±0.000	84.8
43B-043	376.1±119.3	69.9	0.275±0.079	79.9

实施例 27 抗体-药物偶联物对人黑色素瘤细胞 A375 细胞体外生长的抑制作用

收集靶细胞重悬为单细胞悬液，台盼蓝染色法鉴定细胞活力和细胞计数；调整细胞密度为 1×10^5 cells/mL；每孔 100 μ L 加至 96 孔黑色平底细胞培养板；将稀释好的供试品每孔 20 μ L 加至已接种细胞的 96 孔黑色平底细胞培养板；置于细胞培养箱（37℃，5% CO₂）孵育 168 $\pm$ 8 hr；加入刃天青钠溶液（0.03%），每孔 20 μ L；37℃作用 3-4 h，酶标仪 550 nm/610 nm 读取荧光值，利用 Prism 或同类作图软件作图，拟合出供试品的半抑制浓度 IC₅₀。

在人黑色素瘤细胞 A375 体外实验中，43A-JSSW-4、43A-JSSW-6、43A-JSSW-8、43B-JSSW-6、43B-045-4、43B-045-6 和 43A-045-8 均具有良好的细胞生长抑制活性。结果见表 9。

表 9 抗体-药物偶联物的体外生长抑制活性

供试品	IC ₅₀ (ng/mL)
43A-JSSW-4	73.66
43A-JSSW-6	38.64
43A-JSSW-8	27.13
43B-JSSW-6	42.55
43B-045-4	31.27
43B-045-6	17.06
43A-045-8	13.35

实施例 28 抗体-药物偶联物对人黑色素瘤细胞 A375 小鼠移植瘤的抗肿瘤实验

本实验选用适龄雌性 NU/NU 小鼠接种人黑色素瘤细胞 A375，待肿瘤体积长至约 100-200 mm³ 时，挑选肿瘤生长良好的 28 只动物，将动物按肿瘤体积均衡分为 4 组，动物分组及剂量方案如表 10 所示。

表 10 动物分组及剂量方案

组别	动物数量（只）	剂量（mg/kg）	给药途径/频次
溶媒组	7	0	静脉给药/单次
43A-JSSW-4	7	1.5	静脉给药/单次
43A-JSSW-6	7	1.5	静脉给药/单次
43A-JSSW-8	7	1.5	静脉给药/单次

分组完成后进行给药并称量小鼠体重，记录数据，通过测量给药后不同时间的肿瘤径，动态观察肿瘤的生长情况，计算肿瘤体积，公式如下：

肿瘤体积（mm³）=1/2×长径（mm）×[短径（mm）]²

实验终点,与溶媒组相比,所有抗体-药物偶联物均能显著抑制肿瘤的生长,43A-JSSW-4、43A-JSSW-6和43A-JSSW-8的抑瘤率分别为53.6%、65.2%和87.7%,详细信息见图18和表11。

表 11 ADC 对荷瘤小鼠 A375 移植瘤的药效

组别	D0 平均肿瘤体积 (mm ³)	D14 平均肿瘤体积 (mm ³)	抑瘤率 TGI (%)
溶媒组	192.1±33.8	1,948.5±373.9	N/A
43A-JSSW-4	192.4±27.7	1,006.8±211.3	53.6
43A-JSSW-6	192.9±26.1	803.5±586.8	65.2
43A-JSSW-8	192.7±25.3	409.0±370.9	87.7

实施例 29 抗体-药物偶联物对人肺癌细胞 Calu-6 小鼠移植瘤的抗肿瘤实验

本实验选用适龄雌性 NOD/SCID 小鼠接种人肺癌细胞 Calu-6,待肿瘤体积长至约 100-200 mm³时,挑选肿瘤生长良好的 35 只动物,将动物按肿瘤体积均衡分为 5 组,动物分组及剂量方案如表 12 所示。

表 12 动物分组及剂量方案

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频次
溶媒组	7	0	静脉给药/单次
43A-JSSW-4	7	3.0	静脉给药/单次
43A-JSSW-6	7	3.0	静脉给药/单次
43A-JSSW-8	7	3.0	静脉给药/单次
43B-JSSW-6	7	3.0	静脉给药/单次

分组完成后进行给药并称量小鼠体重,记录数据,通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径,动态观察肿瘤的生长情况,计算肿瘤体积,公式如下:

肿瘤体积 (mm³) = 1/2 × 长径 (mm) × [短径 (mm)]²

实验终点,与溶媒组相比,所有抗体-药物偶联物均能显著抑制肿瘤的生长,详细信息见图 19 和表 13。

表 13 ADC 对荷瘤小鼠 Calu-6 移植瘤的药效

组别	D0 平均肿瘤体积 (mm ³)	D14 平均肿瘤体积 (mm ³)	抑瘤率 TGI (%)
----	---------------------------------	----------------------------------	-------------

溶媒组	128.2±7.4	982.7±70.1	N/A
43A-JSSW-4	127.8±21.8	532.0±75.7	52.7
43A-JSSW-6	129.2±27.8	437.3±56.1	63.9
43A-JSSW-8	128.9±30.5	422.7±263.6	65.6
43B-JSSW-6	127.3±21.9	447.7±62.3	62.5

实施例 30 抗体-药物偶联物对人黑色素瘤细胞 A375 小鼠移植瘤的抗肿瘤实验

本实验选用适龄雌性 NU/NU 小鼠接种人黑色素瘤细胞 A375,待肿瘤体积长至约 100-200 mm³ 时,挑选肿瘤生长良好的动物,将动物按肿瘤体积均衡分组,动物分组及剂量方案如表 14 所示。

表 14 动物分组及剂量方案

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频次
溶媒组	7	0	静脉给药/单次
43B-045-6	7	2.0	静脉给药/单次

分组完成后进行给药并称量小鼠体重,记录数据,通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径,动态观察肿瘤的生长情况,计算肿瘤体积,公式如下:

肿瘤体积 (mm³) = 1/2 × 长径 (mm) × [短径 (mm)]²

实验终点,与溶媒组相比,所有抗体-药物偶联物均能显著抑制肿瘤的生长,详细信息见图 20 和表 15。

表 15 ADC 对荷瘤小鼠 A375 移植瘤的药效

组别	D0 平均肿瘤体积 (mm ³)	D26 平均肿瘤体积 (mm ³)
溶媒组	128.7±32.9	N/A
43B-045-6	128.9±39.0	144.6±90.1

注:第 22 天,溶媒组动物瘤体积均值达 3000 mm³,根据动物福利进行安乐死处理。

实施例 31 抗体-药物偶联物对人食管鳞癌 KYSE-150 小鼠移植瘤的抗肿瘤实验

本实验选用适龄雌性 NU/NU 小鼠接种人食管鳞癌细胞 KYSE-150,待肿瘤体积长至约 100 mm³ 左右时,挑选肿瘤生长良好的动物,将动物按肿瘤体积均衡分组,动物分组及剂量方案如表 16 所示。

表 16 动物分组及剂量方案

组别	动物数量（只）	剂量（mg/kg）	给药途径/频次
溶媒组	6	0	静脉给药/单次
43B-JSSW-6	6	2.0	静脉给药/单次
M30-DXd-4	6	2.0	静脉给药/单次

分组完成后进行给药并称量小鼠体重，记录数据，通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径，动态观察肿瘤的生长情况，计算肿瘤体积，公式如下：

肿瘤体积（mm³）=1/2×长径（mm）×[短径（mm）]²

实验终点，与溶媒组相比，43B-JSSW-6 能显著抑制肿瘤的生长，详细信息见图 21 和表 17。

表 17 ADC 对荷瘤小鼠 KYSE-150 移植瘤的药效

组别	D0 平均肿瘤体积 （mm ³ ）	D25 平均肿瘤体积 （mm ³ ）	抑瘤率 TGI（%）
溶媒组	79.6±24.2	1,536.7±1,854.6	N/A
43B-JSSW-6	79.2±13.1	563.6±466.6	66.8
M30-DXd-4	79.9±18.5	2,021.4±888.0	-33.2

实施例 32 抗体-药物偶联物对人非小细胞肺癌 SK-MES-1 小鼠移植瘤的抗肿瘤实验

本实验选用适龄雌性 NU/NU 小鼠接种人非小细胞肺癌 SK-MES-1，待肿瘤体积长至约 100 mm³ 左右时，挑选肿瘤生长良好的动物，将动物按肿瘤体积均衡分组，动物分组及剂量方案如表 18 所示。

表 18 动物分组及剂量方案

组别	动物数量（只）	剂量（mg/kg）	给药途径/频次
溶媒组	6	0	静脉给药/单次
43B-JSSW-6	6	2.0	静脉给药/单次
M30-DXd-4	6	2.0	静脉给药/单次

分组完成后进行给药并称量小鼠体重，记录数据，通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径，动态观察肿瘤的生长情况，计算肿瘤体积，公式如下：

肿瘤体积（mm³）=1/2×长径（mm）×[短径（mm）]²

实验终点，与溶媒组相比，43B-JSSW-6 能显著抑制肿瘤的生长，详细信息见图 22 和表 19。

表 19 ADC 对荷瘤小鼠 SK-MES-1 移植瘤的药效

组别	D0 平均肿瘤体积 (mm ³)	D22 平均肿瘤体积 (mm ³)	抑瘤率 TGI (%)
溶媒组	135.0±35.1	727.4±489.0	N/A
43B-JSSW-6	134.3±32.7	322.9±140.6	68.2
M30-DXd-4	134.6±35.1	588.8±266.4	23.3

实施例 33 抗体-药物偶联物对人肝癌 Hep3B 小鼠移植瘤的抗肿瘤实验

本实验选用适龄雌性 NU/NU 小鼠接种人肝癌细胞 Hep3B，待肿瘤体积长至约 100~200 mm³ 时，挑选肿瘤生长良好的动物，将动物按肿瘤体积均衡分为 3 组，动物分组及剂量方案如表 20 所示。

表 20 动物分组及剂量方案

组别	动物数量（只）	剂量（mg/kg）	给药途径/频次
溶媒组	6	0	静脉给药/单次
43B-JSSW-6	6	2.0	静脉给药/单次
43B-045-6	6	2.0	静脉给药/单次

分组完成后进行给药并称量小鼠体重，记录数据，通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径，动态观察肿瘤的生长情况，计算肿瘤体积，公式如下：

肿瘤体积（mm³）=1/2×长径（mm）×[短径（mm）]²

实验终点，与溶媒组相比，供试品组均能显著抑制肿瘤的生长，详细信息见图 23 和表 21。

表 21 ADC 对荷瘤小鼠 Hep3B 移植瘤的药效

组别	D0 平均肿瘤体积 (mm ³)	D22 平均肿瘤体积 (mm ³)	抑瘤率 TGI (%)
溶媒组	152.9±46.8	2434.6±529.4	N/A
43B-JSSW-6	153.5±56.6	1008.6±611.5	62.5
43B-045-6	153.0±57.1	917.5±405.8	66.5

实施例 34 抗体-药物偶联物对人肺癌 Calu-6 小鼠移植瘤的抗肿瘤实验

本实验选用适龄 NOD/SCID 小鼠接种人肺癌细胞 Calu-6, 待肿瘤体积长至约 100~200 mm³ 时, 挑选肿瘤生长良好的 24 只动物, 将动物按肿瘤体积均衡分为 4 组, 动物分组及剂量方案如表 22 所示。

表 22 动物分组及剂量方案

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频次
溶媒组	6	0	静脉给药/两周一次
43B-JSSW-6	6	3.0	静脉给药/两周一次
43B-045-4	6	3.0	静脉给药/两周一次
M30-DXd-4	6	3.0	静脉给药/两周一次

分组完成后进行给药并称量小鼠体重, 记录数据, 通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径, 动态观察肿瘤的生长情况, 计算肿瘤体积, 公式如下:

肿瘤体积 (mm³) = 1/2 × 长径 (mm) × [短径 (mm)]²

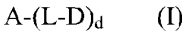
实验终点, 与溶媒组相比, 供试品组均能显著抑制肿瘤的生长, 且 43B-JSSW-6 和 43B-045-4 药效显著优于阳性参照 M30-DXd-4, 详细信息见图 24 和表 23。

表 23 ADC 对荷瘤小鼠 Calu-6 移植瘤的药效

组别	D0 平均肿瘤体积 (mm ³)	D28 平均肿瘤体积 (mm ³)	抑瘤率 TGI (%)
溶媒组	157.7±51.2	3041.5±1395.0	N/A
43B-JSSW-6	158.3±58.3	117.8±68.0	101.4
43B-045-4	158.5±55.3	276.2±123.7	95.9
M30-DXd-4	158.5±44.2	1604.8±403.6	49.8

权 利 要 求 书

1、一种具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物：



其中 A 选自抗体（如单克隆抗体）或其抗原结合片段；

L 为连接子部分，一端与 A 连接，一端与生物活性分子 D 连接；

D 为生物活性分子；

d 表示生物活性分子与 A 的摩尔比（又称 DAR，即药物抗体偶联比率），选自 1 到 12 的整数或小数（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）；

当 d 为小数时，其指每个 A 缀合的接头-生物活性分子（L-D）个数的平均数。

2、权利要求 1 所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

A 选自靶向 HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)、HER4(ErbB4)、EGFR、dII3、TROP2、B7H3、B7H4、TF(Tissue factor)、c-Met、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD47、CD56、CD70、CD73、CD79b、CD105、CEA、A33、Cripto、EphA2、G250、MUC1、Lewis Y、EDB-FN、VEGFR、VEDF、PD-1、PD-L1、MET、RET、GPNMB、Integrin、PSMA、Tenascin-C、SLC44A4、Claudin18.2 或 Mesothelin 的抗体或其抗原结合片段。

3、权利要求 1-2 任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

A 为靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包括重链和/或轻链，所述重链包括 3 个互补决定区（CDR），其中重链互补决定区 1（HCDR1）氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，重链互补决定区 2（HCDR2）氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，重链互补决定区 3（HCDR3）氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示；所述轻链包括轻链 3 个互补决定区（CDR），其中轻链互补决定区 1（LCDR1）氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，轻链互补决定区 2（LCDR2）氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示，轻链互补决定区 3（LCDR3）氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，其中 CDR 按照 Kabat 编号规则确定。

4、权利要求 1-3 任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，

其中

A为靶向B7H3的抗体或其抗原结合片段，所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包括重链和/或轻链，所述重链的可变区（HV）序列如SEQ ID NO:7所示，所述轻链的可变区（LV）序列如SEQ ID NO:8所示。

5、权利要求1-4任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

A为靶向B7H3的抗体，所述抗B7H3抗体还包括重链恒定区序列或其变体，和/或轻链恒定区序列或其变体。

6、权利要求1-5任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

A为靶向B7H3的抗原结合片段，所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv或F(ab')₂。

7、权利要求1-6任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

A为靶向B7H3的抗体或其抗原结合片段，所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段为人源化或全人源抗体或其抗原结合片段。

8、权利要求1-7任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

A为靶向B7H3的抗体或其抗原结合片段，所述抗B7H3抗体包括重链和/或轻链，所述重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示，所述轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

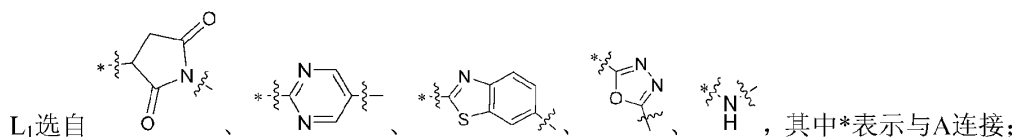
9、权利要求1所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

A选自靶向B7H3的43A或43B、靶向HER2的DP001、靶向TROP2的sacituzumab、靶向B7H4的Alsevalimab、靶向TF的Tisotumab、靶向EDB-FN的L19A、靶向Claudin18.2的Zolbetuximab或其生物类似物，其中43A包括2条相同的重链和轻链，重链氨基酸序列如

SEQ ID NO:9 所示,轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示;43B 包括 2 条相同的重链和轻链,重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示,轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示。

10、权利要求1-9所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物,其中
-L-选自-L₁-L₂-L₃-L₄-L₅-,其中,L₁为共价连接单元,其与A共价连接,L₂为延伸单元,L₃选自键或任选极性亲水性基团取代的氨基酸残基,L₄选自由2-8个氨基酸组成的肽残基,L₅为键或自裂解片段或极性亲水基团取代的自裂解片段。

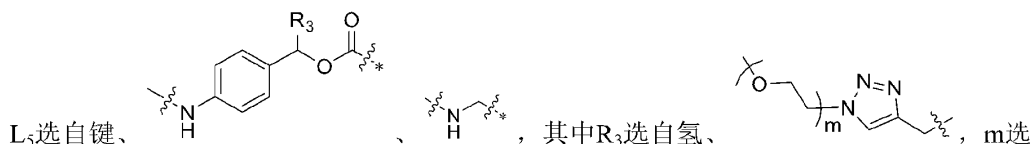
11、权利要求10所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物,其中



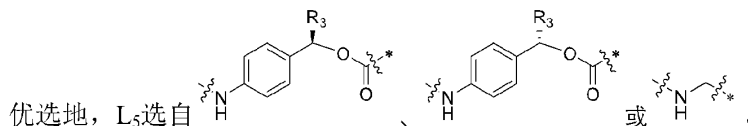
L₂选自-L_{2a}-、-L_{2a}-C(O)-、-C(O)-L_{2a}-C(O)-NH-L_{2b}-C(O)-、-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-,其中L_{2a}和L_{2b}各自独立的选自-C₁-C₈亚烷基-、-C₁-C₈亚烷基-C₃-C₈亚环烷基-、-亚炔基-C₁-C₆亚烷基-、-亚苯基-、-亚苯基-C₁-C₃亚烷基-、1-50(优选9-30,更优选9-26,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50)个原子的直链或支链亚杂烷基,所述亚烷基、亚环烷基、亚杂环基各自任选地被独立地选自C₁-C₆烷基、1-6个原子的杂烷基、C₁-C₆烷氧基、羟基、氨基、羧基或C₃-C₈环烷基中的一个或者多个取代基所取代,所述亚杂烷基含有1-12(优选1-8,更优选3-8,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12)个杂原子,所述亚杂烷基的杂原子选自N、O或S中的一个或多个(优选O);

L₃选自键或极性亲水性基团取代的氨基酸残基,所述极性亲水性基团含糖残基及其衍生物或聚乙二醇残基及其衍生物或聚肌氨酸残基及其衍生物或其组合;

L₄选自由2-8个氨基酸组成的肽残基,所述氨基酸选自苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、丙氨酸、苏氨酸、组氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、脯氨酸、瓜氨酸、天冬氨酸和甘氨酸;



自3-50的整数, 优选8-24的整数, 进一步优选8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24, *表示与D连接;



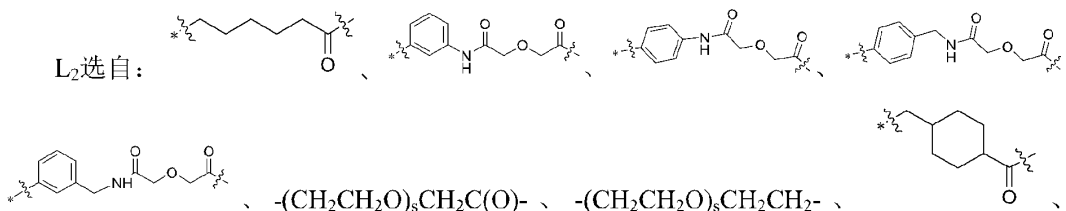
12、权利要求11所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

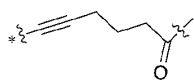
L₂选自-L_{2a}-、-L_{2a}-C(O)-、-C(O)-L_{2a}-C(O)-NH-L_{2b}-C(O)-、-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-, 其中L_{2a}和L_{2b}各自独立的选自-C₁-C₆亚烷基-、-C₁-C₃亚烷基-C₃-C₆亚环烷基-、-亚乙炔基-C₁-C₆亚烷基-、-(CH₂CH₂O)_s-、-(CH₂CH₂O)_sC₁₋₃亚烷基-、-C₁₋₃亚烷基(CH₂CH₂O)_sC₁₋₃亚烷基-、亚苯基、亚苯基亚甲基, 其中s选自1-12 (优选3-8, 如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12) 的整数。

13、权利要求11-12所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

L_2 选自 $-L_{2a}-$ 、 $-L_{2a}-C(O)-$ 、 $-C(O)-L_{2a}-C(O)-NH-L_{2b}-C(O)-$ 、 $-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-$ ，其中 L_{2a} 和 L_{2b} 各自独立的选自亚甲基、亚乙基、亚正丙基、亚异丙基、亚正戊基、亚甲基亚环己基、亚乙炔基亚甲基、亚乙炔基亚乙基、亚乙炔基亚正丙基、亚乙炔基亚正丁基、亚乙炔基亚正戊基、亚乙炔基亚正己基、亚苯基、亚苯基亚甲基、 $-(CH_2CH_2O)_sCH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_sCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2(OCH_2CH_2)_s-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_s-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2(OCH_2CH_2)_sCH_2-$ ，其中s选自1-12（优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）的整数。

14、权利要求11-13所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中



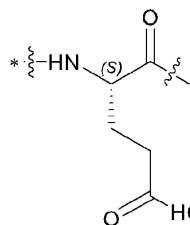


，其中s选自1-12（优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）的整数。

15、权利要求11-14所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

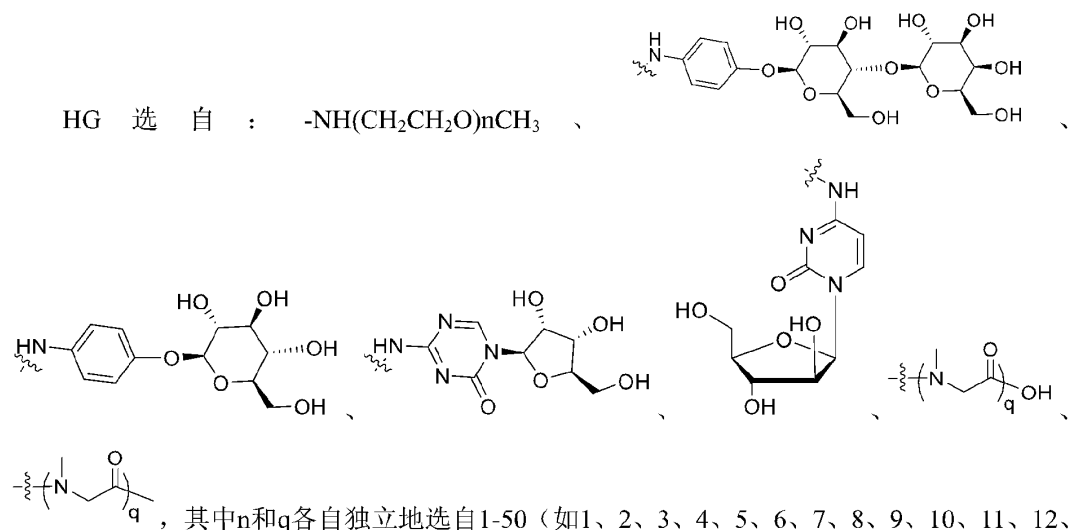
L_3 选自极性亲水性基团取代的谷氨酸，所述极性亲水性基团包含糖残基及其衍生物或聚乙二醇残基及其衍生物或聚肌氨酸残基及其衍生物或其组合。

16、权利要求11-15所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中



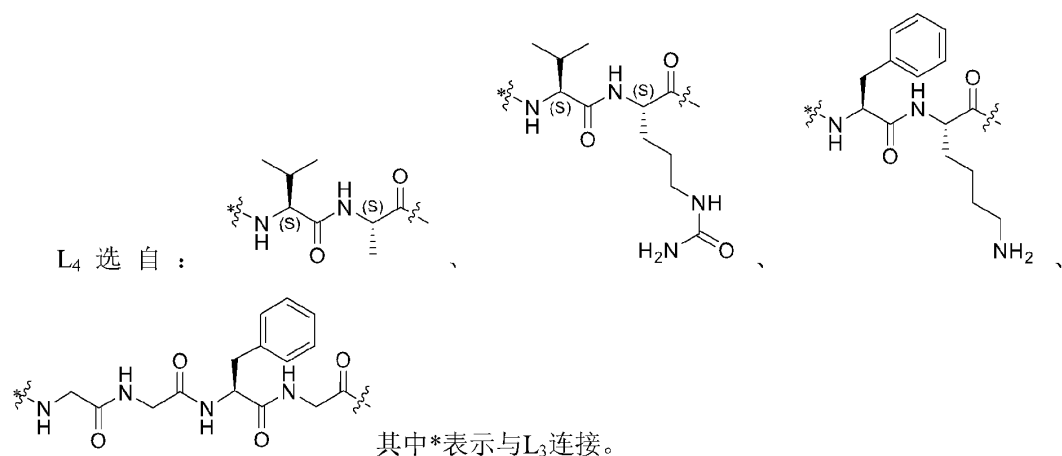
L_3 选自：，其中HG选自包含糖残基及其衍生物的基团、包含聚乙二醇残基及其衍生物的基团、包含聚肌氨酸残基及其衍生物或其组合，其中*表示与 L_2 连接。

17、权利要求11-16所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中

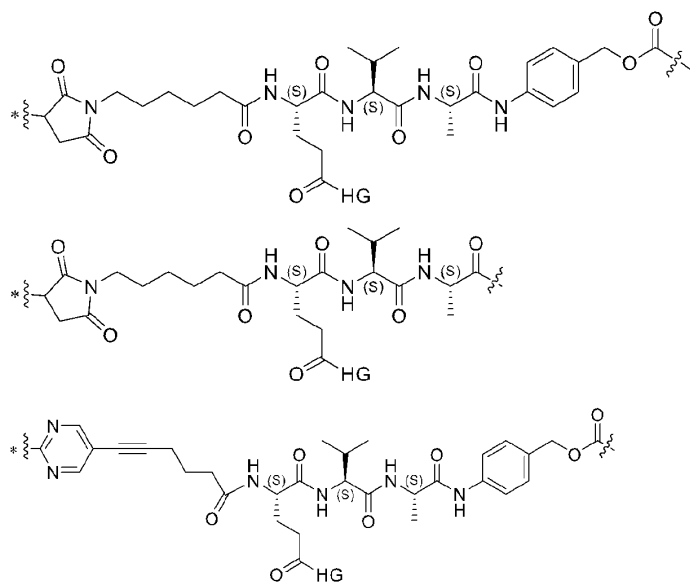


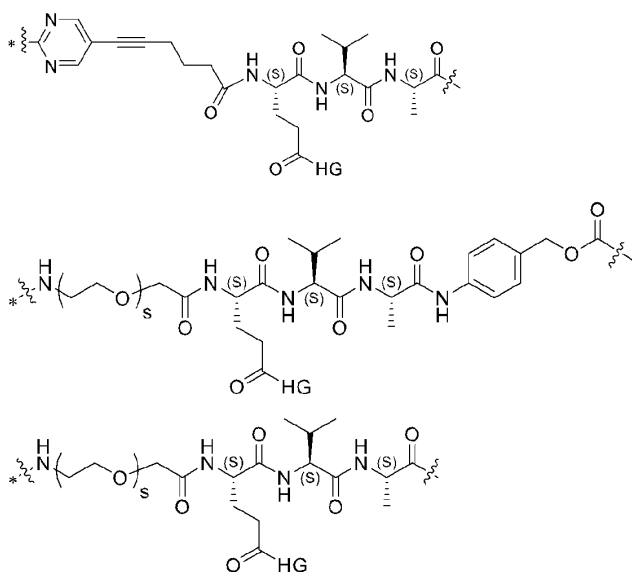
13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50) 的整数, 优选1-24, 进一步优选3-12。

18、权利要求11-17所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物, 其中



19、权利要求1-9任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物, 其中-L-选自:

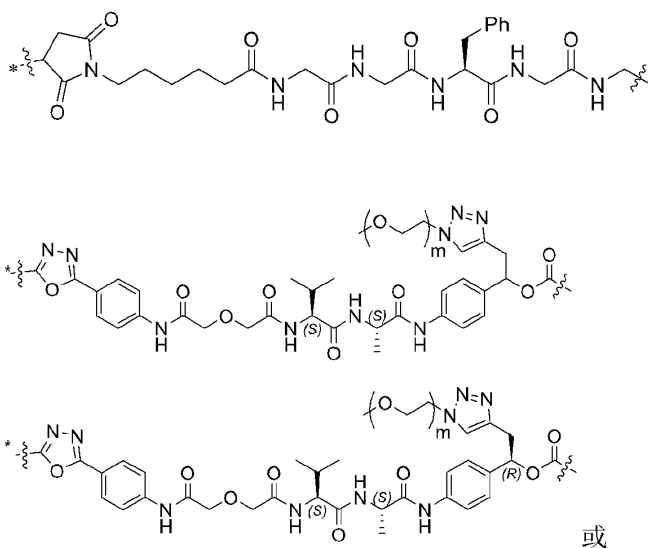


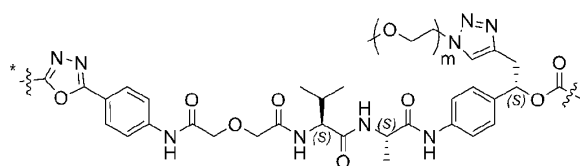


其中s选自1-12（优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）的整数，HG的定义同权利要求17，*表示与A连接。

20、权利要求1-9任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中-L-选自-L₁-L₂-L₄-L₅-，其中L₁、L₂、L₄、L₅的定义同权利要求11-18。

21、权利要求 1-9 任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其中-L-选自：

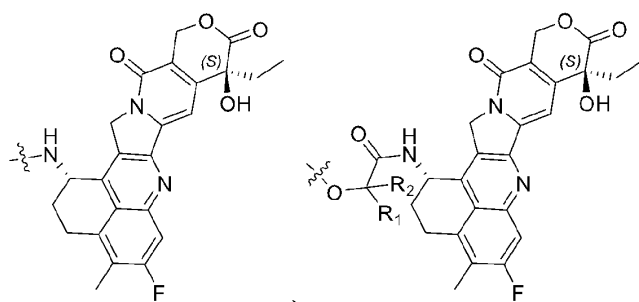




其中, m 选自3-50的整数, 优选8-24的整数, 进一步优选8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24。

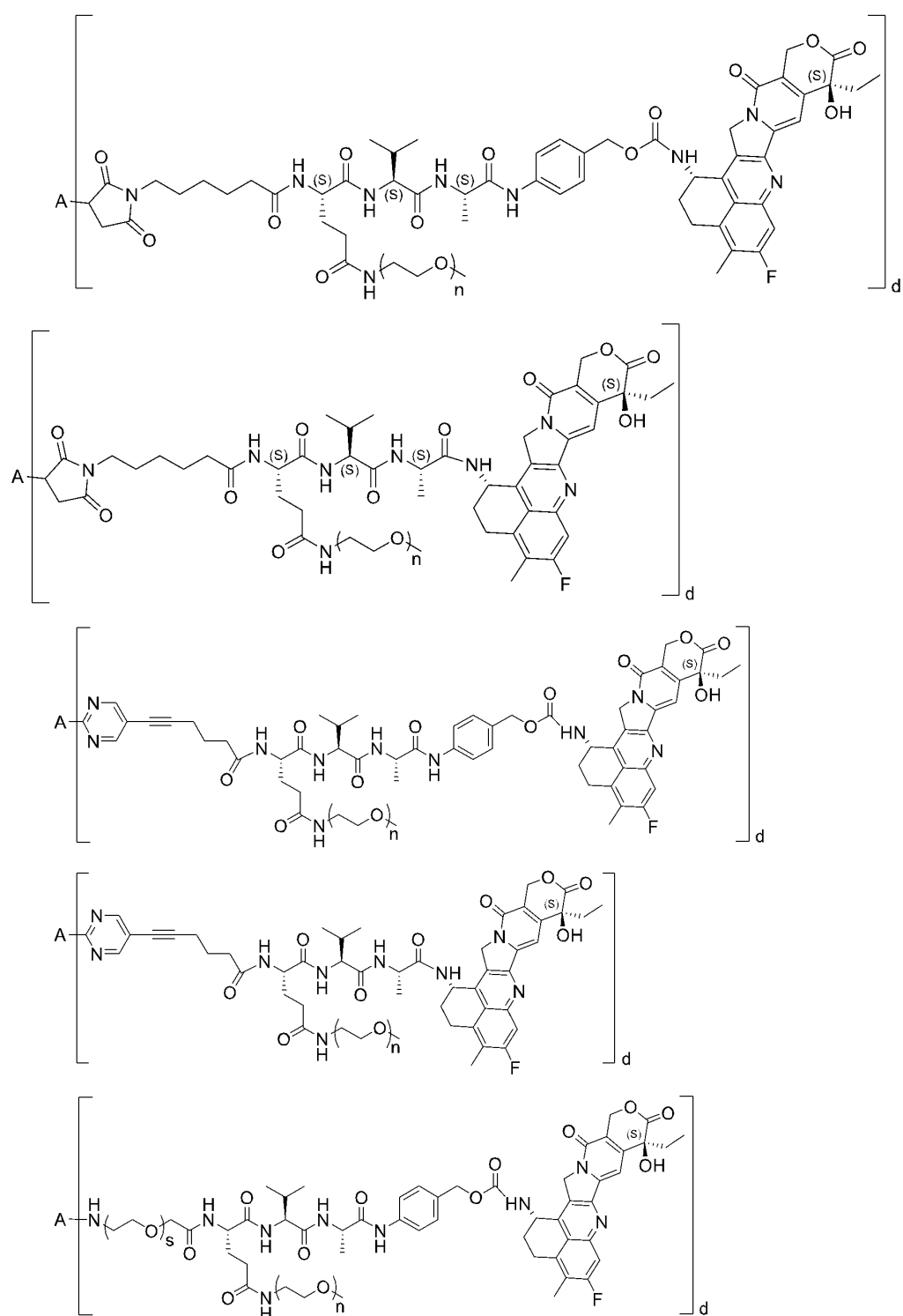
22、权利要求 1-21 任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物, 其中 D 选自拓扑异构酶 I 抑制剂(如喜树碱衍生物)、微管蛋白抑制剂(如 MMAE、MMAF、艾日布林)、DNA 损伤剂(如吡咯并苯并二氮卓)。

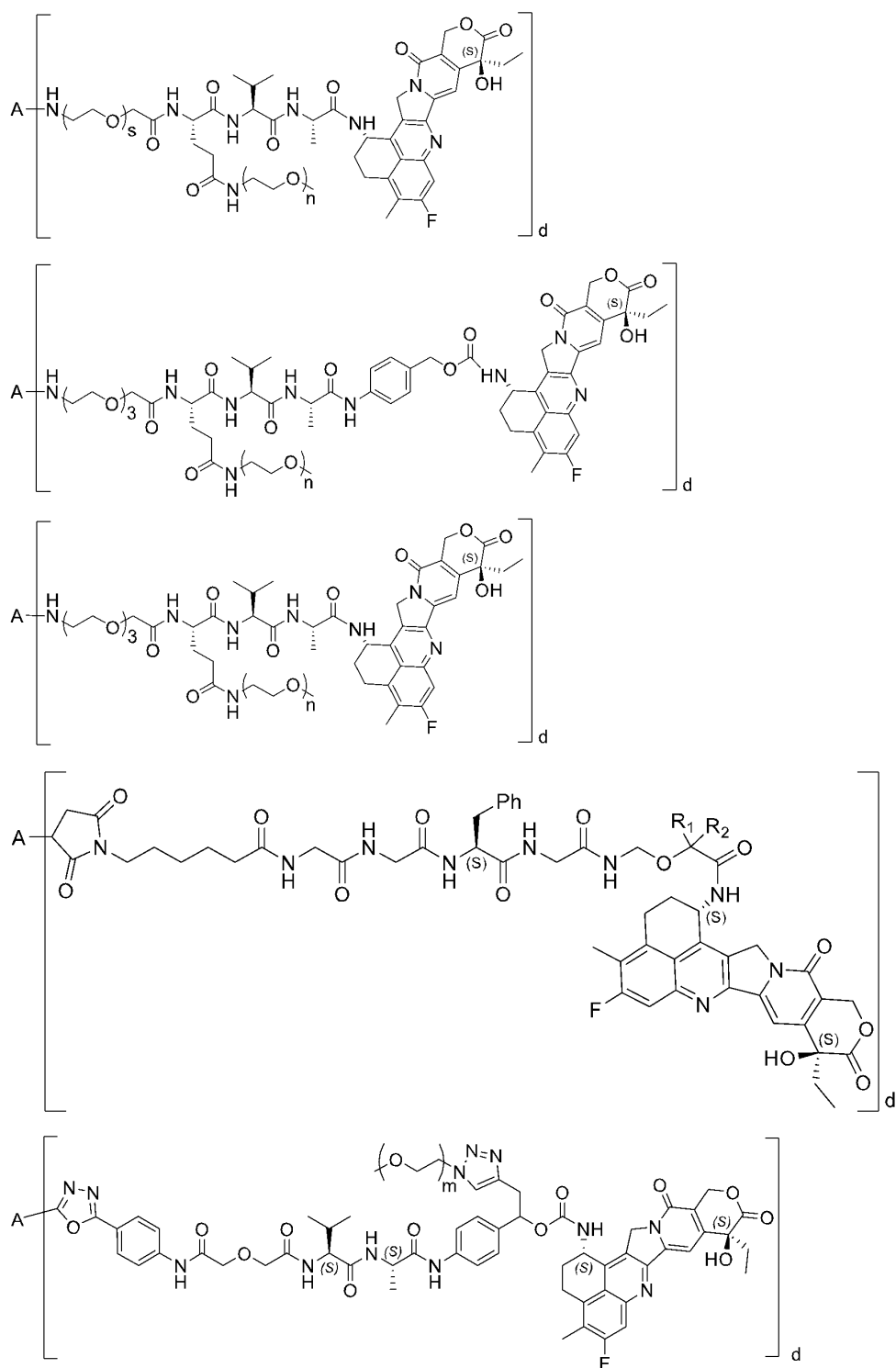
23、权利要求 1-22 任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物, 其中 D 选自:

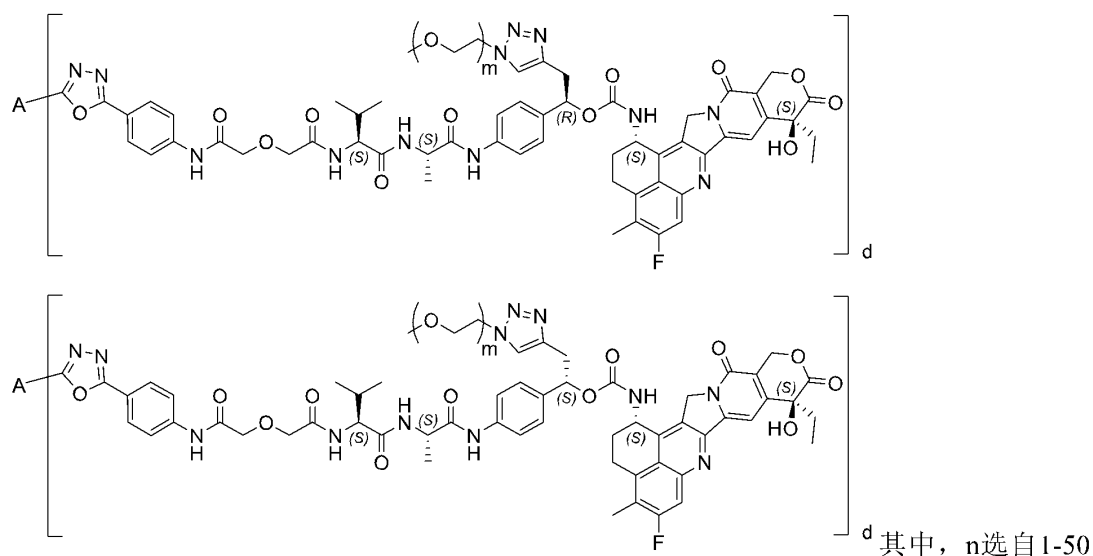


, 其中 R_1 、 R_2 各自独立的选自 H、C1-3 烷基(优选甲基、乙基、正丙基、异丙基)、3-6 元环烷基(优选环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己烷基), 或者 R_1 和 R_2 与连接其的碳原子一起形成 3-6 元环烷基(优选环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己烷基)。

24、权利要求 1-23 任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物, 其具有如下结构:







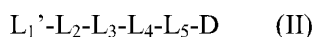
的整数, 优选1-24, 进一步优选3-12, d 选自1到12的整数或小数, s 选自1-12的整数, m 选自3-50的整数, 优选8-24的整数, 进一步优选8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24。

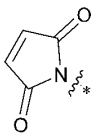
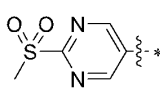
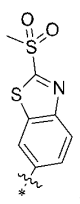
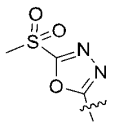
25、一种药物组合物, 其包含权利要求1-24任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物。

26、权利要求1-24任一所述的具有式(I)所示结构的抗体药物偶联物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物在制备用于治疗增殖性疾病的药物中的用途。

27、权利要求26所述的用途, 其中所述增殖性疾病优选为HER2、B7H3异常表达相关疾病, 包括癌症, 所述癌症优选乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌(例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤)。

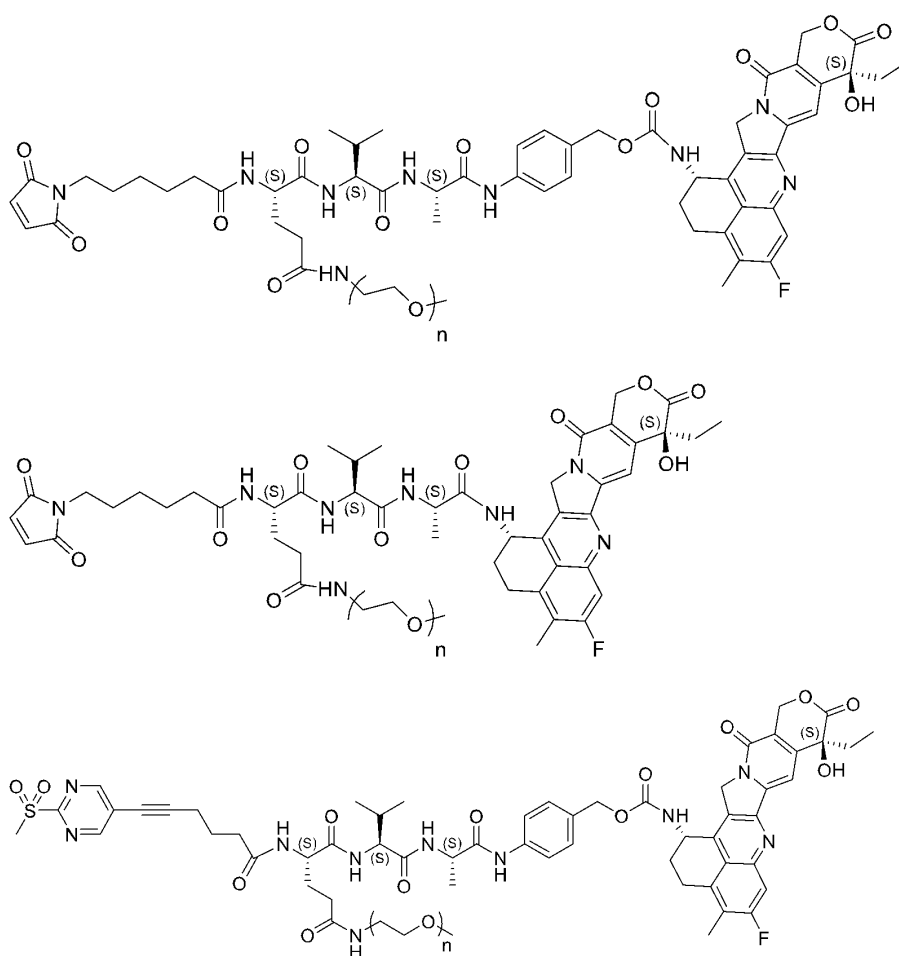
28、式(II)所示结构的接头-药物化合物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物:

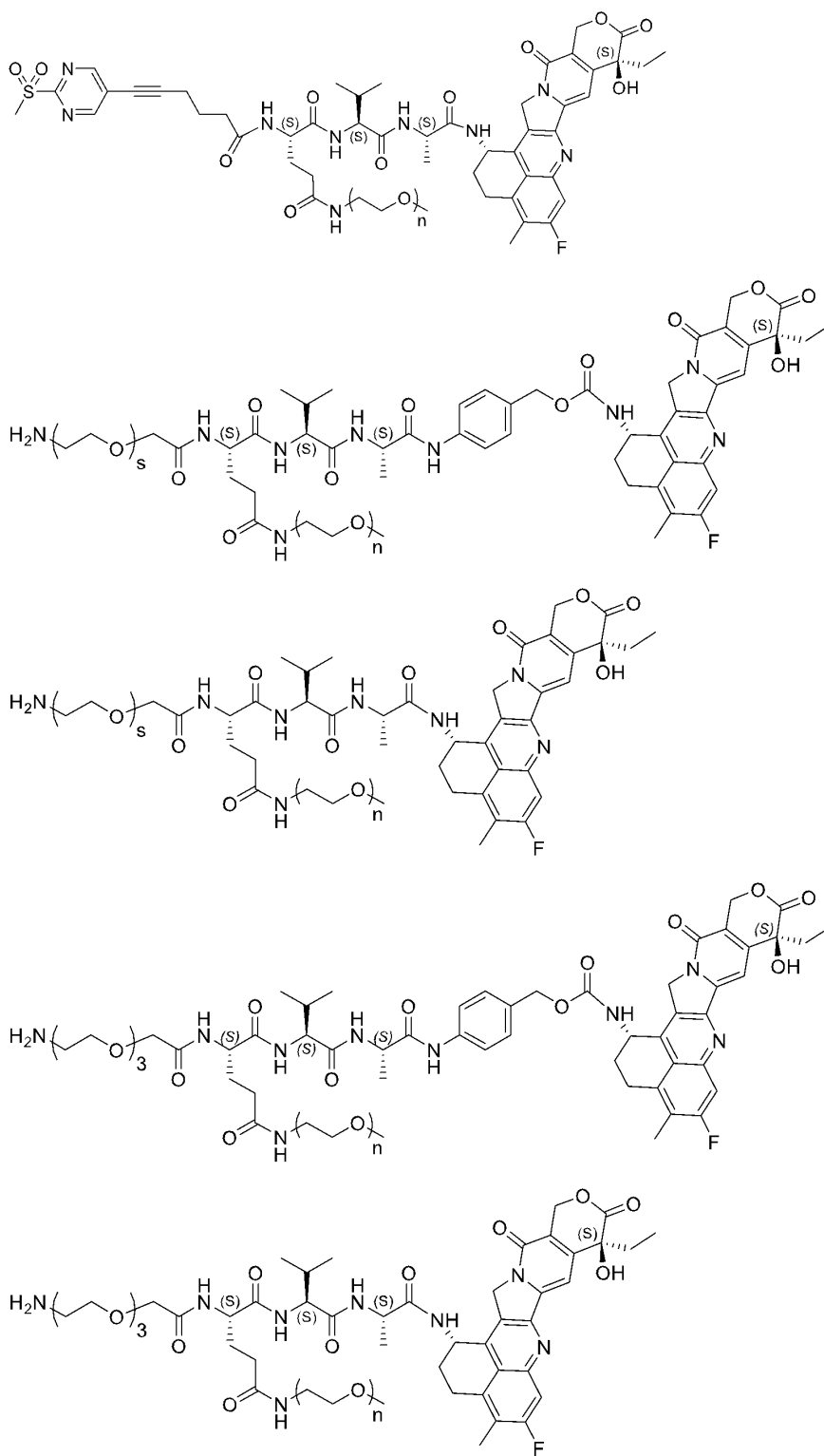


其中 L_1' 选自 、、、、 H_2N- ； L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 D

的定义同式(I)。

29、权利要求 28 所述的式(II)所示结构的接头-药物化合物及其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、药用盐、水合物、溶剂合物或同位素标记物，其选自：





其中, n 选自 1-50 的整数, 优选 1-24, 进一步优选 3-12, d 选自 1 到 12 的整数或小数, s 选自 1-12 的整数。

30、靶向B7H3的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包括重链和/或轻链，所述重链包括3个互补决定区（CDR），其中重链互补决定区1（HCDR1）氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，重链互补决定区2（HCDR2）氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，重链互补决定区3（HCDR3）氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示；所述轻链包括轻链3个互补决定区（CDR），其中轻链互补决定区1（LCDR1）氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示，轻链互补决定区2（LCDR2）氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示，轻链互补决定区3（LCDR3）氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示，其中CDR按照Kabat编号规则确定。

31、权利要求30所述的靶向B7H3的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包括重链和/或轻链，所述重链的可变区（HV）序列如SEQ ID NO:7所示，所述轻链的可变区（LV）序列如SEQ ID NO:8所示。

32、权利要求30-31所述的靶向B7H3的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包括包括重链和/或轻链，所述重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示，所述轻链的可变区（LV）序列如SEQ ID NO:11所示。

33、一种抗体药物偶联物，其包含权利要求30-31所述的靶向B7H3的抗体或其抗原结合片段。